

**PRACE MŁODYCH PRACOWNIKÓW NAUKI I DOKTORANTÓW
WYDZIAŁU TECHNOLOGII ŻYWNOSCI
UNIwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
SERIA MONOGRAFIE
TOM 2**

**POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI
ODDZIAŁ MAŁOPOLSKI**

**WYDZIAŁ TECHNOLOGII ŻYWNOSCI
UNIwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie**

WYBRANE ZAGADNIENIA NAUKI O ŻYWNOSCI I ŻYWIENIU

Praca zbiorowa pod redakcją:

Mariusza Witczaka, Adama Florkiewicza, Teresy Witczak

ISBN 978-83-937001-9-6

Recenzenci Naukowi

Dr inż. Barbara Borczak, Dr inż. Adam Florkiewicz, Dr inż. Joanna Kapusta-Duch, Dr hab. inż. Anna Korus, Dr hab. inż. Ryszard Macura, Dr inż. Marta Skoczylas-Liszka, Dr hab. inż. Mariusz Witczak, Dr inż. Teresa Witczak, Dr inż. Magdalena Witek.

Redakcja

Mariusz Witczak
Adam Florkiewicz
Teresa Witczak

Redakcja techniczna i opracowanie graficzne

Mariusz Witczak

Wydawca:

Polskie Towarzystwo Technologów Żywności
Oddział Małopolski

*© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności
Oddział Małopolski, Kraków 2016*

ISBN 978-83-937001-9-6

Za treść umieszczonych prac odpowiadają ich autorzy

WYDZIAŁU TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI
UNIWERSYTET ROLNICZY IM. HUGONA KOŁŁATAJA W KRAKOWIE

PRACE MŁODYCH PRACOWNIKÓW NAUKI I DOKTORANTÓW
TOM 2

SPIS TREŚCI

Rozdział 1	Wpływ dodatku butylohydrksy toluenu (BHT) na ilość triacylogliceroli wydzielanych przez komórki Caco-2 <i>Anna Antończyk, Magdalena Mika, Krzysztof Żyła</i>	5
Rozdział 2	Wpływ różnych metod suszenia na jakość zielonych części szalwii lekarskiej, kopru ogrodowego i selera zwyczajnego <i>Grzegorz Fiutak, Magda Filipczak-Fiutak, Ryszard Macura</i>	14
Rozdział 3	Lignany – związki funkcjonalne pochodzenia roślinnego <i>Piotr Jakubowski</i>	24
Rozdział 4	Badania mechaniczne i akustyczne żywności <i>Marta Liszka-Skoczylas, Daniel Żmudziński, Urszula Goik, Łukasz Skoczylas</i>	35
Rozdział 5	Olej arganowy – właściwości i zastosowanie <i>Marta Liszka-Skoczylas, Urszula Goik, Daniel Żmudziński, Łukasz Skoczylas</i>	46
Rozdział 6	Hodowle komórkowe nabłonka jelita w badaniach nad funkcjonalnymi właściwościami probiotyków <i>Małgorzata Panek</i>	58
Rozdział 7	Inozytyle roślinne – potencjalny składnik żywności funkcjonalnej <i>Dagmara Poniewska, Krzysztof Żyła</i>	71
Rozdział 8	Spirulina – żywność XXI wieku <i>Magdalena Skotniczny, Paweł Satora, Anna Barwińska-Sendra</i>	80
Rozdział 9	Aktywność przeciwutleniająca soków z owoców rokitnika <i>Katarzyna Turek, Anna Tomf-Sarna, Jacek Słupski, Michał Stojak</i>	89

Rozdział 10	Ocena organoleptyczna niepasteryzowanych napojów owocowych wzbogacanych spiruliną <i>Łukasz Wajda, Aleksandra Duda-Chodak, Aleksandra Pękala</i>	101
Rozdział 11	Wybrane metody oznaczania właściwości przeciwutleniających miodu <i>Celina Habryka</i>	112
Rozdział 12	Wartość odżywcza i wykorzystanie marchwi w przemyśle spożywczym <i>Paulina Zegartowska, Anna Korus</i>	122

Rozdział 1

Anna Antończyk, Magdalena Mika, Krzysztof Żyła

*Katedra Biotechnologii Żywności, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

*Kierownik katedry: prof. dr hab. Krzysztof Żyła
Promotor: dr hab. Magdalena Mika*

WPŁYW DODATKU BUTYLOHYDRKSY TOLUENU (BHT) NA ILOŚĆ TRIACYLOGLICEROLI WYDZIELANYCH PRZEZ KOMÓRKI CACO-2

Streszczenie

Zapobieganie procesom oksydacyjnym w przetworzonych produktach spożywczych, zawierających nawet niewielkie ilości tłuszczu, wymaga stosowania syntetycznych antyoksydantów. Udział tych związków w procesie indukowania otyłości nie był jak dotąd badany. Doświadczenia żywieniowe z wykorzystaniem zwierząt wykazały, że dodatek 1 % BHT do diety powoduje zmiany charakterystyczne dla otyłości w szczególności w składzie lipidów osocza krwi. W pracy zbadano jak dodatek BHT wpływa na ilość wydzielanych triacylogliceroli przez komórki Caco-2 (model jelita cienkiego). Wykazano, że badany antyoksydant przyczynia się do ponad 56 % wzrostu sekrecji tłuszczu.

Słowa kluczowe: butylohydroksy toluen, BHT, syntetyczne antyoksydanty, komórki Caco-2

Wprowadzenie

Na przestrzeni ostatnich lat, w krajach wysoko rozwiniętych i rozwijających się coraz większym problemem stają się przewlekłe choroby niezakaźne. Do współczesnych chorób o masowym zasięgu należy zaliczyć m.in. otyłość, cukrzycę czy zmiany miażdżycowe. Według raportu WHO, 39 % dorosłych osób na świecie cierpi na nadwagę, a 13 % na otyłość [Raport WHO, 2016]. Wśród wielu czynników powodujących przewlekłe choroby niezakaźne wymienia się nieprawidłową dietę – bogatą w tłuszcz i węglowodany. Jednak ilość i rodzaj dostarczanych do organizmu składników pochodzących z diety nie jest jedynym parametrem decydującym o przyswajaniu związków odżywczych.

Posiłek wysokotłuszczowy do przewodu pokarmowego trafia w obecności składników mogących modulować biodostępność lipidów. Wśród związków takich wymienić należy antyoksydanty syntetyczne spożywane z produktami przetworzonymi, zawierającymi nawet niewielkie ilości tłuszczu. Posiadają one zdolność wygaszania wolnych rodników dzięki możliwości oddawania atomu wodoru oraz obecności pierścienia aromatycznego. W produktach spożywczych, własność ta zapewnia wydłużenie świeżości oraz zabezpiecza konsumenta przed szkodliwym wpływem procesu utleniania lipidów. Przede wszystkim oksysterole (produkty utleniania cholesterolu) wymieniane są jako czynnik w patogenezie miażdżycy. Dostarczane wraz z dietą transportowane są z lipoproteinami LDL powodując modyfikację tych cząsteczek (LDLox). Utlenione LDL gromadzą się w ścianach tętnic powodując przewlekłe stany zapalne [Rimner i in., 2005; Plat i in., 2014].

Rodzaj i stężenie przeciwutleniaczy dodawanych w procesie przemysłowej produkcji żywności regulowany jest przepisami [Dz. U. 2010 nr 232 poz. 1525], dopuszczając do stosowania galusany propylu (E310), oktylu (E311) i dodecyłu (E312), BHT (butylohydroksytoluen, E321), BHA (butylohydroksyanizol, E320), TBHQ (tetra-butylhydrochinon, E319). Przeprowadzone badania toksykologiczne pozwoliły ustalić wartość ADI (dopuszczalne dzienne spożycie) dla BHT na poziomie 0-0,05 mg/kg masy ciała oraz maksymalną dawkę stosowaną w żywności (100 mg/kg w przeliczeniu na tłuszcz). Przyjęte wartości są bezpieczne i chronią konsumenta przed negatywnymi skutkami działania reaktywnych form tlenu [EFSA, 2012].

Dotychczas syntetyczne dodatki do żywności były wielokrotnie badane pod kątem negatywnego działania na zdrowie człowieka. Oceniano, między innymi wpływ na uszkodzenia DNA, reprodukcję czy karcenogenezę [EFSA, 2012], pomijając ich działanie na przewód pokarmowy i zachodzące tam procesy, które mogą decydować o występowaniu otyłości.

Dostępna literatura pozwala przypuszczać, że antyoksydanty syntetyczne mogą przyczynić się do wzrostu występowania otyłości. U osób z nieprawidłową masą ciała występują zmiany profilu lipidowego: wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli, cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL oraz zmniejszenie stężenia cholesterolu HDL. Taką zmianę zaobserwowano u zwierząt żywionych dietą bogatą w cholesterol zawierającą dodatek 1 % BHT [Bjorkhem i in., 1999]. Doświadczenia toksykologiczne wykazały, że w zależności od dawki, BHT wykazuje różny wpływ na masę ciała zwierząt. Wysokie stężenia przyczyniają się do utraty masy ciała, natomiast małe dawki (stosowane w utrwalaniu żywności) powodują, że wzrost masy ciała zwierząt jest większy niż w grupie kontrolnej. Wykazano, że szczury żywione dietą zawierającą

0.2 % BHT, po 18 tygodniach ważyły o 20-25% więcej niż zwierzęta w grupie kontrolnej [Safer i Al.-Nughamish, 1999].

Celem pracy było określenie wpływu dodatku BHT do hydrolizatu tripalmitynianu w stężeniu 0,01 % na ilość triacylogliceroli wydzielanych przez komórki Caco-2 do komory podstawnej.

Materiały i metody badań

W celu zbadania wpływu dodatku BHT na proces absorpcji w jelicie produktów hydrolizy tłuszczu, tripalmitynian (12 mM) poddano emulgacji z solami żółciowymi (300 mg/g tłuszczu). Uzyskaną homogenną mieszaninę poddano procesowi hydrolizy za pomocą pankreatyny (480 mg/g tłuszczu). Reakcję prowadzono przez 4 h w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temp. 37°C. Pankreatynę i sole żółciowe rozpuszczano w PBS (zbuforowany roztwór soli fizjologicznej) z jonami wapnia i magnezu. Uzyskaną mieszaninę przesączono przez filtr o średnicy porów 0,45 µm. Do połowy uzyskanej mieszaniny wprowadzono BHT w stężeniu 0,01 %.

Do badania transportu produktów hydrolizy tłuszczu w jelitach użyto linii komórek Caco-2. Linia ta uzyskana została z gruczołakoraka jelita grubego, ale po uzyskaniu pełnej konfluencji spontanicznie różnicuje uzyskując cechy funkcjonalne i morfologiczne typowe dla komórek absorpcyjnych jelita (enterocytów) m.in. wytwarzają błonę rąbka szczoteczkowego z mikrokosmkami, syntetyzują białkowe transportery i enzymy. Dzięki temu jest najczęściej wykorzystywana do badania biodostępności składników pokarmowych.

Wszystkie zabiegi na komórkach wykonywano w warunkach sterylnych, w komorze z laminarnym przepływem powietrza, przy użyciu jednorazowego sprzętu. Hodowle prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C i 5 % stężeniu dwutlenku węgla. Komórki hodowano w pożywce standardowej o składzie: płyn DMEM zawierający 4,5 g/l glukozy, 10 % surowica bydlęca płodowa, 2 mM glutamina, mieszanina antybiotyków (100 jednostek/ml penicylina, 10 µg/ml streptomycyna, 0,25 µg/ml amfoterycyna B).

Absorpcja jelitowa (model Caco-2) prowadzona była w sześciodołkowych naczyniach hodowlanych (insertach) zawierających wkładkę z membraną polietylenową o dużej gęstości porów HD i średnicą porów 3 µm. Na każdą membranę nanoszono około 4×10^4 komórek. Hodowlę prowadzono w standardowej pożywce do czasu uzyskania jednolitej monowarstwy komórek (pomiar TEER: aparat EVOM, elektroda STX2, firma WPI). Przed wykonaniem doświadczenia usunięto pożywkę standardową. W komorze podstawnej umieszczono 1 ml płynu DMEM (bezbarwny, 1 g/l glukozy), a w komorze

apikalnej mieszaninę uzyskaną po procesie hydrolizy. Doświadczenie prowadzono przez 2 h. Po zakończeniu doświadczenia ponownie zmierzono wartość TEER (transmembranowa oporność elektryczna) i zebrano płyn z warstwy apikalnej i podstawnej.

W płynie komory apikalnej oznaczono stężenie produktów peroksydacji tłuszczu reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBARS), a w płynie komory podstawnej stężenie triacylogliceroli (zestaw do analizy firmy Cormway).

Wyniki i dyskusja

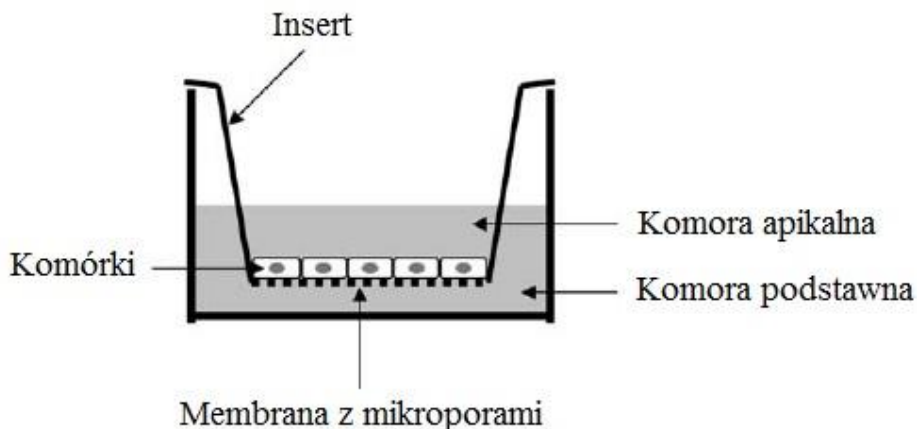
Wolne kwasy tłuszczowe i monoacyloglicerole, uwalniane w procesie trawienia tłuszczu, trafiają do jelita cienkiego, gdzie ulegają absorpcji zgodnie z gradientem stężeń. Proces dyfuzji wspomagany jest przez znajdujące się w błonie rąbka szczoteczkowego białkowe transportery kwasów tłuszczowych, takich jak: FABPpm (białko wiążące kwasy tłuszczowe), FATP 4 (białko transportujące kwasy tłuszczowe 4) i FAT/CD36 (translokaza kwasów tłuszczowych) [Stahl i in., 1999]. Wewnątrz komórki, obecny w cytoplazmie transporter FABP-2 (białko wiążące kwasy tłuszczowe 2), przemieszcza kwasy tłuszczowe do siateczki śródplazmatycznej gładkiej, gdzie posłużą do syntezy triacylogliceroli. Do krwioobiegu tłuszcz trafi w postaci chylomikronów (CM; cząsteczki, które umożliwiają transport lipidów we krwi dzięki obecności składnika białkowego apolipoproteiny apoB48). Proces produkcji chylomikronów w jelicie cienkim jest pod kontrolą wielu czynników np. składników pokarmowych, hormonów czy nutraceutyków.

Badanie mające na celu wykazać wpływ BHT na wydzielanie triacylogliceroli przez komórki Caco-2 do komory podstawnej przeprowadzono z wykorzystaniem specjalnych naczyń hodowlanych (insertów), symulując warunki panujące w jelicie cienkim. Składają się z dwóch komór: apikalnej (światło jelita) i podstawnej (krwioobieg) przedzielonych polietylenową membraną z mikroporami o średnicy 3 μm , na której komórki tworzą monowarstwę (Rys 1). Zastosowane warunki zapewniają swobodną dyfuzję wszystkich składników uwalnianych przez komórkę.

Komórki inkubowano przez 2h z tripalmitynianem po hydrolizie (mieszanina kwasów tłuszczowych i monoacylogliceroli). Wyniki przedstawione w tabeli 1 wskazują, że dodatek BHT (HT+ 0,01 % BHT) w porównaniu z próbą kontrolną (HT) przyczynił się do ponad 56 % wzrostu wydzielania triacylogliceroli.

Spożywanie żywności przetworzonej, takiej jak: chipsy czy zupki w proszku często łączone jest z występowaniem otyłości ze względu na wysoką wartość kaloryczną tych produktów. Jednak nigdy negatywnego wpływu tych produktów nie łączono z dodatkiem syntetycznych antyoksydantów fenolowych stosowanych do utrwalania.

Zaobserwowane w doświadczeniu działanie BHT na komórki Caco-2 może świadczyć o udziale tego antyoksydantu w absorpcji produktów hydrolizy tłuszczu w jelicie. Wzrost biodostępności lipidów, pochodzących z diety, może być przyczyną częstego występowania przewlekłych chorób niezakaźnych, zwłaszcza tych związanych z podniesionym poziomem triacylogliceroli i cholesterolu we krwi.



Rys 1. Schemat budowy naczynia hodowlanego (insertu) [Ichiki i in., 2004].

Tabela 1. Wpływ dodatku 0,01 % BHT na ilość triacylogliceroli wydzielanych do komory podstawnej.

Próby	Skład	Stężenie triacylogliceroli [µg/ml]	% wzrost sekrecji
Kontrolna	HT	78,54 ^a	56,38
Badana	HT + 0,01 % BHT	139,3 ^b	

Objaśnienie: różne litery superskryptu oznaczają różnice statystycznie istotne między wartościami średnimi. HT- mieszanina uzyskana po hydrolizie tripalmitynu.

Butylohydroksy toluen jest związkem syntetycznym, więc może być toksyczny dla komórek, czego efektem będzie utrata szczelności utworzonej monowarstwy i wyższe stężenie badanych związków w komorze podstawnej. W celu wykluczenia tego wpływu po zakończeniu 2 h inkubacji, zmierzono wartość TEER i porównano ją z wynikiem uzyskanym przed rozpoczęciem eksperymentu (tabela 2). Obliczono procentowy spadek wartości tego parametru, który obrazuje w jakim stopniu zastosowane warunki wpłynęły na kondycję monowarstwy komórek.

Tabela 2. Wpływ dodatku 0,01 % BHT na zmianę wartości TEER.

Próby	Pomiar	Średnia wartość TEER [Ωcm^2]	Spadek wartości TEER [%]
Kontrolna	Przed inkubacją	1282,83	21,3 ^a
	Po inkubacji	1009,54	
Badana	Przed inkubacją	1215,69	21,99 ^a
	Po inkubacji	948,28	

Objaśnienie: Różne litery superskryptu oznaczają różnice statystycznie istotne między wartościami średnimi.

Brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy średnimi wartościami dla wyznaczonego spadku wartości TEER wyklucza wpływ dodatku BHT na kondycję komórek wykorzystanych w doświadczeniu jako model jelita cienkiego.

Podawana w doświadczeniu komórkom mieszanina uzyskana po hydrolizie tripalmitynianu, może podlegać procesom oksydacyjnym efektem czego będzie powstawanie wtórnych produktów peroksydacji lipidów tj. MDA (dialdehyd malonowy). Jak pokazują badania, stres oksydacyjny mierzony wzrostem stężenia MDA, ogranicza syntezę tłuszczu w komórkach Caco-2 i jego wydzielanie do komory podstawnej [Courtois i in., 2000]. Natomiast zastosowanie antyoksydantów, takich jak BHT ma działanie ochronne i częściowo odwraca negatywne skutki procesu oksydacyjnego stymulując komórki Caco-2 do intensywniejszej produkcji chylomikronów [Courtois i in., 2002]. W celu zbadania wpływu procesu peroksydacji lipidów na wzrost wydzielania triacylogliceroli przez komórki Caco-2, w płynie uzyskanym z komory apikalnej, oznaczono stężenie produktów peroksydacji tłuszczu reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym (tabela 3).

Tabela 3. Wpływ dodatku 0,01 % BHT na stężenie produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w komorze apikalnej po 2h inkubacji z produktami hydrolizy tripalmitynianu.

Próby	Stężenie produktów peroksydacji lipidów [$\mu\text{M/ml}$]
Kontrolna	4,84 ^a
Badana	4,96 ^a

Objaśnienie: Różne litery superskryptu oznaczają różnice statystycznie istotne między wartościami średnimi.

Nie zaobserwowano, aby zastosowane warunki inkubacji (temperatura i czas) oraz skład mieszaniny reakcyjnej wpłynęły na postęp peroksydacji lipidów, zwłaszcza w próbie kontrolnej bez dodatku antyoksydantu.

W pracy wykluczono najczęściej podawane w literaturze przyczyny wzrostu wydzielania triacylogliceroli przez komórki Caco-2 do komory podstawnej. Przyczyn obserwowanego wzrostu sekrecji składników pokarmowych należy więc szukać

w zmianach jakie BHT powoduje w funkcjonowaniu komórki. Możliwy jest wpływ antyoksydantu na wzrost liczby transporterów kwasów tłuszczowych w błonie rąbka szczoteczkowego lub intensyfikacja procesu składania i wydzielania chylomikronów.

Białka transportujące kwasy tłuszczowe do wnętrza enterocytów zlokalizowane są po stronie światła jelita, a więc zwiększenie ich ilości przyczyni się do większego pobierania składników pokarmowych. Za przemieszczanie (translokację) transporterów od miejsca syntezy do błony rąbka szczoteczkowego odpowiedzialna jest m.in. kinaza AMP – zależna (AMPK). Literatura wskazuje na współpracę kinazy z białkiem CD36 [Samovski i in., 2015], które oprócz transportu wolnych kwasów tłuszczowych odgrywa również ważną rolę w formowaniu i wydzielaniu chylomikronów do krwioobiegu [Nauli i in., 2006]. Wzrost aktywności kinazy AMP – zależnej wykazany został pod wpływem antyoksydantów naturalnie występujących w produktach pochodzenia roślinnego tj. kwas chlorogenowy [Ong i in., 2013], kwas galusowy [Doan i in., 2015], resweratrol [Gu i in., 2014] czy EGCG (gallusan epigalokatechiny) [Hwang i in., 2005].

Podsumowanie

Dodatek BHT do hydrolizatu tripalmitynianu w dawce stosowanej do stabilizacji żywności stymuluje komórki Caco-2 do intensywniejszego wydzielania triacylogliceroli do komory podstawnej. Efekt działania antyoksydantu nie jest związany z toksycznym działaniem związku na komórki, ani z postępowaniem procesu peroksydacji, w związku z czym prawdopodobnie wynika z działania BHT na funkcjonowanie komórki. Wzrost biodostępności tłuszczu spowodowany spożywaniem antyoksydantów może przyczyniać się do wzrostu występowania przewlekłych chorób niezakaźnych związanych z nieprawidłowym stężeniem lipidów we krwi

Literatura

1. Obesity and Overweight – Facts. World Health Organisation Report. Geneva, Switzerland 2016. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Rimner A., Makdessi A.S., Sweidan A., Wischusen J., Rabenstein B., Shatat K., Mayer P., Spiridopoulos I., Revelance and mechanism of oxysterol stereospecificity in coronary artery disease, *Free Radical Biology & Medicine* 2005, 38:535–544.
3. Plat J., Theuwissen E., Husche C., Lutjohann D., Gijbels M.J.J., Jeurissen M., Shiri-Sverdlov R., van der Made I., Mensink R.P., Oxidised plant sterols as well as oxysterol increase the proportion of severe atherosclerotic lesions in female LDL receptor +/- mice, *British Journal of Nutrition* 2014, 111:64–70.

4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych. Dz. U. 2010 nr 232 poz. 1525
5. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT(E 321) as a food additive, EFSA Journal 2012, 10(3):2588.
6. Bjorkhem I., Henriksson-Freyschuss A., Breuer O., Diczfalusy U., Berglund L., Henriksson P., The butylated hydroxytoluene protects against atherosclerosis, Arteriosclerosis and Thrombosis 1991, 11:15-22.
7. Safer A.M., Al-Nughamish A.J., Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: An electron microscopical study, Histo Histopathol 1999, 14:391-406.
8. Stahl A., Hirsh D.J., Gimeno R.E., Punreddy S., Ge P., Watson N., Patel S., Kotler M., Raimondi A., Tartaglia L.A., Lodish H.F., Identification of the major intestinal fatty acid transport protein, Molecular Cell 1999, 4:299-308.
9. Ichiki Y., Leung P.S.C., Ishibashi H., Coppel R.L., Ansari A.A., Gershwin M.E., Mitochondria and autoimmunity in primary biliary cirrhosis, Mitochondrion 2004, 4:743-753
10. Courtois F., Suc I., Garofalo C., Ledoux M., Seidman E., Levy E., Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000, 279:12-19.
11. Courtois F., Delvin E., Ledoux M., Seidman E., Lavoie J-C., Levy E., The antioxidant BHT normalizes some oxidative effects of iron+ascorbate on lipid metabolism in Caco-2 cells, JN The Journal of Nutrition 2000, 1289-1292
12. Samovski D., Sun J., Pietka T., Gross R.W., Eckel R.H., Su X., Stahl P.D., Abumrad N.A., Regulation of AMPK activation by CD36 links fatty acid uptake to B-oxidation, Diabetes 2015, 64:353-359
13. Nauli A.M., Nassir F., Zheng S., Yang Q., Lo C-M., Vonlehmden S.B., Lee D., Jandacek R.J., Abumrad N.A.A., Tso P., CD36 Is Important for Chylomicron Formation and Secretion and May Mediate Cholesterol Uptake in the Proximal Intestine, Gastroenterology 2006, 131(4):1197-1207
14. Ong W.K., Hsu A., Tan B.K.H., Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediate by AMPK activation, Biochemical Pharmacology 2013, 85:1341-1351
15. Doan K.V., Ko C.M., Kinyua A.W., Yang D.J., Choi Y-H., Oh I.Y., Nguyen N.M., Ko A., Choi J.W., Jeong Y., Jung M.H., Cho W.G., Xu S., Park K.S., Park W.J., Choi S.Y., Kim H.S., Moh S.H., Kim K.W., Gallic Acid Regulates Body Weight and

- Glucose Homeostasis Through AMPK Activation, *Endocrinology* 2015, 156(1):157–168
16. Gu X.S., Wang Z.B., Ye Z., Lei J.P., Li L., Su D.F., Zheng X., Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure, *Genetics and Molecular Research* 2014, 13(1):323-335
 17. Hwang J.T., Park I-J., Shin J-I., Lee Y.K., Lee S.K., Baik H.W., Ha J., Park O.J., Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 338:694-699

IMPACT OF ADDITION OF BUTYLATED HYDROXYTOLUENE (BHT) ON THE AMOUNT OF SECRETED BY CACO-2 CELLS TRIACYLGLYCEROLS

Summary

In prevention of oxidation processes in food with long shelf-life, containing even small amount of fat, using synthetic antioxidants is necessary. Till now, the impact of these components in process leading to obesity has not been studied. Nutritional experiment using animals showed that addition of BHT at concentration 1 % to the diet lead to changes characteristic for obesity especially in plasma lipids composition. In the research was examined how addition of BHT affects on the amount of secreted by Caco-2 cells (intestinal model) triacylglycerols . We showed that tested antioxidant can increase the lipids secretion by more than 56 %.

Key words: butylated hydrokxytoluene, BHT, synthetic antioxidants, Caco-2 cells

Rozdział 2

Grzegorz Fiutak, Magda Filipczak-Fiutak, Ryszard Macura

*Katedra Chłodnictwa i Koncentratów Spożywczych, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

Kierownik katedry: prof. dr hab. inż. Krzysztof Surówka

WPŁYW RÓŻNYCH METOD SUSZENIA NA JAKOŚĆ ZIELONYCH CZĘŚCI SZAŁWII LEKARSKIEJ, KOPRU OGRODOWEGO I SELERA ZWYCZAJNEGO

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu homogenizacji oraz metod suszenia na zawartość barwników chlorofilowych, karotenoidów oraz witaminy C w liściach: szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.), kopru ogrodowego (*Anethum graveolens* L.) i selera zwyczajnego (*Apium graveolens* L.). Ponadto oszacowano straty przechowalnicze zachodzące w otrzymanych suszach składowanych przez okres do 12 miesięcy. We wszystkich analizowanych roślinach liofilizacja okazała się metodą pozwalającą na lepsze, niż tradycyjne suszenie owiewowe, zachowanie chlorofili i karotenoidów. Pomimo obróbki wstępnej polegającej na homogenizacji przed liofilizacją w suszu uzyskano zbliżone zawartości barwników, w porównaniu z wariantem suszonym tradycyjnie. W okresie rocznego przechowywania liofilizatów najmniejsze straty chlorofilu a odnotowano w szalwii lekarskiej liofilizowanej i zhomogenizowanej przed liofilizacją (41%), a największe stwierdzono w suszonych tradycyjnie liściach selera zwyczajnego (53%) i koprze ogrodowym (50%). Największe straty witaminy C podczas 12-miesięcznego przechowywania odnotowano w koprze suszonym tradycyjnie (62%).

Słowa kluczowe: Chlorofile, karotenoidy, witamina C, liofilizacja, suszenie owiewowe

Wprowadzenie

W ostatnich latach wzrosły wymagania konsumentów w zakresie jakości i bezpieczeństwa żywności. Dzisiejszy konsument stara się unikać żywności utrwalonej chemicznie, przy użyciu środków konserwujących. Ponadto istotne jest, aby wzbogacać codzienną dietę w zielone rośliny będące źródłem chlorofili, karotenoidów, białka i witamin. Wielu konsumentów nie ma możliwości codziennego spożywania świeżych

roślin, zarówno z powodu braku czasu, jak i dostępności surowca, stąd też muszą oni sięgać po żywność utrwaloną.

Suszenie jest jedną z naturalnych metod utrwalania żywności. Nie tylko chroni ją przed rozwojem drobnoustrojów, ale również efektywnie spowalnia przebieg przemian enzymatycznych i nieenzymatycznych. Ze względu na coraz większe wymagania dotyczące jakości suszonych produktów spożywczych istnieje potrzeba prowadzenia badań nad suszami w kierunku poprawy ich cech sensorycznych i wartości odżywczej. Założenia takie można spełnić eliminując wpływ wysokiej temperatury dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod suszenia np. liofilizacji. Proces ten polega na wstępnym zamrożeniu surowca i usunięciu z niego wody poprzez wysublimowanie lodu [Ratti 2001; Rowicka i in. 2002; Bazyma i in. 2006]. Dzięki tej metodzie można uzyskać susze, które mogą być stosowane jako składniki suchych mieszanek przyprawowych, do produkcji dań z mięsa, ryb, serów oraz jako składnik zup, sosów i dań wegetariańskich [Pszczola 2001; Sloan 2004]. Susze takie, pozyskiwane z roślin zielonych są bogate w barwniki chlorofilowe wykazujące dobroczynny wpływ na zdrowie, dodatkowo w ostatnich badaniach wykazano, że chlorofile zapobiegają występowaniu szkodliwych metabolitów hemu, które sprzyjają powstawaniu komórek nowotworowych [Czerwińska 2007]. Ponadto susze roślinne zawierają także karotenoidy, które również charakteryzują się prozdrowotnymi właściwościami szeroko opisanymi w literaturze [Yeum in. 1995; Bernstein in. 2001; Mares-Perlman in. 2002; Mozaffarieh in. 2003; Ribaya-Mercado i Blumberg 2004].

Celem pracy było określenie wpływu obróbki wstępnej polegającej na homogenizacji oraz dwóch metod suszenia (konwencjonalnego i liofilizacji) na zawartość chlorofili, karotenoidów i witaminy C w szalwii lekarskiej, koprze ogrodowym i selerze zwyczajnym, a także określenie strat przechowalniczych tych substancji w czasie rocznego składowania.

Material i metody badań

Materiał badawczy stanowiły liście szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.), kopru ogrodowego (*Anethum graveolens* L.) i selera zwyczajnego (*Apium graveolens* L.) zebrane pod koniec sierpnia. Liście po przebraniu, umyto, usunięto łodygi, a następnie część zhomogenizowano przy użyciu urządzenia wielofunkcyjnego Thermomix TM3 (France), aż do uzyskania prób o jednolitej konsystencji. Tak przygotowany materiał zamrożono i zliofilizowano w liofilizatorze LaborMim OE-950 (Węgry) w czasie 24 godzin, przy temperaturze płyt grzejnych 35°C. Próby niehomogenizowane również liofilizowano oraz dodatkowo część suszono metodą owiewową powietrzem

o temperaturze ok. 55°C w czasie 24h, w suszarce do warzyw 970.01PP (Niewiadów, Poland) o mocy 300 W. Susze przechowywano w temperaturze 21±1°C w szczelnie zamkniętych pojemnikach, bez dostępu światła.

Zawartość suchej substancji oznaczano w temp. 105°C zgodnie z normą PN-90/A-75101/03, a białko ogółem metodą Kjeldahla wykorzystując piec do spalań CH-9230 oraz aparat destylacyjny B-324 (Büchi Labortechnik AG Switzerland) [PN-75/A-04018]. Witaminę C analizowano z wykorzystaniem 2,6-dichloroindofenolu wg: PN-90/A-75101/11.

Chlorofile oraz karotenoidy oznaczano metodą spektrofotometryczną [Lichtenthaler i Buschmann 2001]. Do 40 – 60 mg suszu (70 – 110 mg świeżego produktu), dodawano 100 – 200 mg tlenku magnezu oraz 4,5 cm³ acetonu i całość homogenizowano przez 60 s przy pomocy homogenizatora Heidolph Diax 900 (Germany). Następnie homogenat odwirowano (2325 x g, 10 min) MPW-330 (Poland) i mierzono absorbancję supernatantu przy użyciu spektrofotometru PERKIN ELMER Lambda Bio+ (USA), przy długościach fal: 662 nm, 645 nm i 470 nm. Stężenia barwników w ekstrakcie (µg/cm³) obliczano korzystając z następujących wzorów:

$$\text{Chlorofil}_a = 11,24 A_{662} - 2,04 A_{645}$$

$$\text{Chlorofil}_b = 20,13 A_{645} - 4,19 A_{662}$$

$$\text{Karotenoidy} = (1000 \cdot A_{470} - 1,90 \cdot \text{Chlorofil}_a - 63,14 \cdot \text{Chlorofil}_b) / 214$$

Zawartości poszczególnych barwników w badanym materiale wyrażono w mg/100 g suchej masy (wyjątek stanowiły wyniki uzyskane dla świeżych roślin, które w celu porównania z wartościami innych autorów, dodatkowo wyrażono w przeliczeniu na świeżą masę).

Statystyczną analizę danych przeprowadzono wykorzystując program Statistica 12.0 StatSoft wykonując jednoczynnikową analizę wariancji na poziomie istotności p≤0,05. Istotności różnic pomiędzy średnimi oszacowano testem Tukeya. Badania wykonano w 3 powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Surowce roślinne użyte podczas badań różniły się pod względem zawartości suchej masy i białka. Najwięcej suchej masy zawierały liście selera (19,97 ± 0,45%) i szalwii lekarskiej (17,12 ± 0,97%) a najmniej liście kopru ogrodowego (15,45 ± 0,24%), który z kolei zawierał najwięcej białka (5,15 ± 0,36%). Znacznie mniej białka zawierały szalwia lekarska (3,84 ± 0,01%) i seler zwyczajny (3,77 ± 0,12%).

Spośród analizowanych gatunków roślin najwięcej barwników chlorofilowych (tab. 1 i 2) w 100 g świeżej masy zawierały liście selera zwyczajnego (887mg/100 g

s.m.), natomiast dwie pozostałe rośliny charakteryzowały się o 13 – 16% mniejszą zawartością sumy tych barwników. Lisiewska i in. [2006] analizując w swojej pracy ziele kopru uzyskali bardzo zbliżone wyniki, w porównaniu do analiz własnych. Świeża, 20-centymetrowa roślina kopru zawierała $77,9 \pm 2,3$ mg/100 g ś.m. chlorofilu a (w badaniach własnych $83,4 \pm 1,9$ mg/100 g ś.m.), natomiast chlorofilu b $17,4 \pm 0,7$ mg/100 g ś.m. w badaniach własnych $31,9 \pm 1,0$ mg/100 g ś.m.). Dodatkowo autorzy podają, iż zawartość barwników chlorofilowych uzależniona jest od wielkości rośliny. 60-centymetrowa roślina zawierała o ok. 53% więcej sumy tych barwników, w porównaniu do 20-centymetrowej. Ponadto zawartość chlorofilu uzależniona jest od części anatomicznej rośliny. Błazki liściowe zawierają prawie 4,5 razy więcej sumy tych barwników niż ogonki liściowe, ponad 11 razy więcej niż łodygi oraz o 66% więcej, w porównaniu z całą rośliną. Potwierdzają to Lisiewska i in. [2004] podając, że liście zawierają o 67% więcej sumy chlorofilu, w porównaniu z całą rośliną. Analizowany przez Lisiewską i in. [2004] koper zawierał 115 mg barwników chlorofilowych w 100 g ś.m., co potwierdzają badania własne, w których suma odmian a i b chlorofilu wynosiła 115 mg/100 g ś.m.

W przypadku wszystkich badanych roślin operacje suszenia wpłynęły negatywnie na zawartość obu form chlorofilu, z tym, że liofilizacja jest metodą pozwalającą na lepsze ich zachowanie niż suszenie owiewowe w 55°C. W wyniku liofilizacji spadek stężenia chlorofilu a we wszystkich analizowanych roślinach mieścił się w granicach od 17% dla szalwii lekarskiej do 26% w przypadku selera zwyczajnego, natomiast suszenie owiewowe spowodowało obniżenie stężenia tego barwnika od 33% (koper ogrodowy) do 40% (seler zwyczajny). W pracy podjęto również próbę określenia wpływu homogenizacji poprzedzającej proces liofilizacji na poziom barwników w suszach. Operacja ta we wszystkich analizowanych roślinach wpłynęła negatywnie na zawartość barwników chlorofilowych, niemniej jednak wartości te zbliżone były do prób suszonych owiewowo.

Istotne jest aby susze podczas przechowywania traciły jak najmniej swoich składników. Wszystkie badane produkty po rocznym składowaniu wykazywały wyraźny spadek zawartości chlorofilu a i b. Największe procentowe straty odnotowano we wszystkich surowcach suszonych owiewowo i wynosiły one od 45% (liście szalwii lekarskiej) do 53% (liście selera). Zarówno produkty liofilizowane, jak i zhomogenizowane przed procesem sublimacyjnego suszenia charakteryzowały się mniejszymi stratami w porównaniu do suszenia tradycyjnego i wynosiły one 41 – 46%.

Poczynione obserwacje są zgodne z dostępnymi w literaturze przedmiotu informacjami, na temat stabilności chlorofilu w innych surowcach. Witrowa-Rajchert i in. [2009] wykazali, iż suszenie sublimacyjnie lepiej wpływa na zachowanie chlorofilu

w oregano, w porównaniu do suszenia gorącym powietrzem. Ponadto Śledź i Witrowa-Rajchert [2012] stwierdzili iż po 3-miesięcznym przechowywaniu suszonej pietruszki straty chlorofilu b sięgały tylko 5%. Powszechnie uważa się, że zawartość chlorofilu w produktach żywnościowych jest ważnym wskaźnikiem ich jakości oraz świadczy o prawidłowości stosowanych procesów technologicznych. Kachel-Jakubowska [2009] stwierdziła, że wyższe temperatury stosowane podczas suszenia (powyżej 70°C) bardziej negatywnie oddziałują na analizowane związki, niż suszenie w niższej temperaturze.

Tabela 1. Zawartość chlorofilu a w analizowanych roślinach, w zależności od metody suszenia i czasu przechowywania [mg/100 g s.m.].

Roślina i metoda suszenia	Czas przechowywania [miesiące]				
	0	3	6	9	12
Sz – świeża	534,05^d ± 20,15	-	-	-	-
Sz – ST	372,73^{bD} ± 47,27	308,36^{abcC} ± 17,90	283,68^{bBC} ± 6,15	237,11^{abAB} ± 12,31	205,34^{abA} ± 7,90
Sz – L	441,55^{cB} ± 20,07	396,67^{eAB} ± 19,37	389,46^{cA} ± 11,87	386,28^{dA} ± 10,56	259,50^{dC} ± 20,18
Sz – HL	364,79^{abC} ± 21,87	273,49^{abB} ± 14,49	226,8^{aA} ± 4,58	215,72^{acA} ± 6,64	216,70^{abA} ± 10,83
K – świeża	539,74^d ± 12,23	-	-	-	-
K – ST	362,93^{abB} ± 15,98	345,99^{cdAB} ± 20,97	320,96^{dA} ± 10,64	237,29^{abD} ± 11,48	182,37^{acC} ± 3,94
K – L	419,53^{bcC} ± 27,92	327,79^{bcB} ± 2,73	271,28^{ba} ± 19,65	261,88^{ba} ± 5,07	227,80^{bdA} ± 17,63
K – HL	331,13^{aA} ± 9,91	292,27^{abB} ± 4,86	273,94^{bc} ± 5,50	237,92^{abD} ± 7,61	188,93^{acE} ± 1,67
S – świeża	571,16^d ± 18,48	-	-	-	-
S – ST	344,16^{aD} ± 9,06	289,36^{abC} ± 14,00	209,84^{aA} ± 18,36	198,56^{cA} ± 9,43	162,76^{cB} ± 11,23
S – L	423,82^{bcC} ± 14,77	377,14^{deB} ± 15,11	358,77^{cb} ± 13,20	232,89^{abA} ± 18,26	233,44^{bdA} ± 8,21
S – HL	380,95^{abcC} ± 9,90	309,87^{abcB} ± 17,88	224,59^{aA} ± 7,49	221,16^{acA} ± 9,90	214,90^{abA} ± 14,75

Oznaczenia: Sz – szalwia; K – koper; S – seler; ST – suszenie tradycyjne; L – liofilizacja, HL – homogenizacja + liofilizacja. a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$). A, B, C – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszu różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Zawartość chlorofilu b w analizowanych roślinach, w zależności od metody suszenia i czasu przechowywania [mg/100 g s.m.].

Roślina i metoda suszenia	Czas przechowywania [miesiące]				
	0	3	6	9	12
Sz – świeża	236,80 ^{cd} ± 7,83	-	-	-	-
Sz – ST	170,45 ^{abA} ± 26,44	154,44 ^{abcA} ± 9,21	157,60 ^{abA} ± 36,15	147,70 ^{abA} ± 34,25	120,93 ^{bcA} ± 1,57
Sz – L	240,99 ^{cdB} ± 17,71	226,07 ^{eA} ± 15,37	205,28 ^{dA} ± 13,32	203,93 ^{cA} ± 10,34	195,37 ^{fA} ± 17,26
Sz – HL	198,84 ^{acA} ± 30,43	190,49 ^{cdeA} ± 25,39	178,96 ^{abdAB} ± 4,51	158,31 ^{abcAB} ± 2,13	136,79 ^{cdeB} ± 7,00
K – świeża	206,60 ^{ac} ± 6,28	-	-	-	-
K – ST	170,27 ^{abA} ± 29,84	166,45 ^{abcA} ± 36,42	144,71 ^{abcA} ± 5,94	165,48 ^{bcD} ± 18,34	83,39 ^{abB} ± 2,95
K – L	165,00 ^{abB} ± 9,18	131,62 ^{abA} ± 4,15	123,45 ^{acA} ± 9,18	126,99 ^{abA} ± 2,29	127,86 ^{bcdA} ± 12,87
K – HL	136,19 ^{bcC} ± 2,23	119,27 ^{aA} ± 6,31	116,65 ^{cA} ± 3,46	112,52 ^{aA} ± 2,23	96,61 ^{abB} ± 3,99
S – świeża	316,73 ^e ± 10,47	-	-	-	-
S – ST	186,96 ^{abB} ± 4,75	172,80 ^{bcdAB} ± 9,37	158,45 ^{abA} ± 11,81	133,28 ^{abD} ± 9,46	76,53 ^{aC} ± 6,83
S – L	271,99 ^{deC} ± 5,04	222,11 ^{deB} ± 18,10	204,01 ^{dAB} ± 7,20	201,93 ^{cAB} ± 23,23	167,33 ^{efA} ± 11,38
S – HL	213,07 ^{acB} ± 18,77	167,81 ^{abcA} ± 15,04	161,06 ^{ba} ± 2,73	150,53 ^{abA} ± 7,00	158,47 ^{deA} ± 20,50

Oznaczenia: Sz – szalwia; K – koper; S – seler; ST – suszenie tradycyjne; L – liofilizacja, HL – homogenizacja + liofilizacja. a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$). A, B, C – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszu różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$).

Z danych zestawionych w tabeli 3 wynika, że sumaryczna koncentracja karotenoidów w świeżych liściach badanych roślin, wahała się w granicach od 129,49 do 155,55 mg/100 g s.m., najwięcej tych barwników zawierała szalwia lekarska, a najmniej (o około 17%) seler zwyczajny. Podobnie jak w przypadku chlorofilu suszenie sublimacyjne pozwoliło zachować barwniki znacznie lepiej niż suszenie owiewowe. Natomiast zastosowanie homogenizacji przed procesem liofilizacji było zmienne, w zależności od analizowanej rośliny. Po 12 miesiącach składowania, największą zawartością karotenoidów charakteryzowały się susze uzyskane na drodze liofilizacji, choć straty tych barwników sięgały nawet 68%, w przypadku liofilizowanych liści selera.

Tabela 3. Zawartość sumy karotenów w analizowanych roślinach, w zależności od metody suszenia i czasu przechowywania [mg/100 g s.m.].

Roślina i metoda suszenia	Czas przechowywania [miesiące]				
	0	3	6	9	12
Sz – świeża	155,55 ^d ± 4,79	-	-	-	-
Sz – ST	119,43 ^{aB} ± 14,03	94,44 ^{aA} ± 3,28	79,72 ^{aA} ± 4,60	63,59 ^{aA} ± 3,19	59,09 ^{aA} ± 5,84
Sz – L	159,00 ^{bB} ± 8,59	137,53 ^{bB} ± 5,67	106,68 ^{dA} ± 9,02	102,30 ^{bcA} ± 2,43	75,97 ^{bA} ± 6,55
Sz – HL	94,88 ^{aC} ± 10,10	68,05 ^{aA} ± 5,12	62,55 ^{abB} ± 1,12	54,07 ^{aAB} ± 2,21	55,61 ^{aAB} ± 3,16
K – świeża	141,29 ^{cb} ± 4,20	-	-	-	-
K – ST	119,47 ^{cC} ± 4,67	99,11 ^{bA} ± 2,00	84,61 ^{cB} ± 1,64	57,62 ^{cA} ± 4,87	40,23 ^{bA} ± 0,49
K – L	155,45 ^{bcC} ± 14,27	124,89 ^{cA} ± 0,45	79,79 ^{cA} ± 8,93	74,90 ^{bB} ± 0,49	70,85 ^{cA} ± 6,16
K – HL	119,90 ^{eB} ± 3,24	84,03 ^{cAB} ± 1,61	64,25 ^{eB} ± 1,83	48,29 ^{eA} ± 2,10	34,75 ^{cA} ± 0,65
S – świeża	129,49 ^{cb} ± 5,81	-	-	-	-
S – ST	79,20 ^{aB} ± 1,33	59,52 ^{aAB} ± 1,33	38,64 ^{aA} ± 2,20	35,20 ^{aA} ± 2,01	26,08 ^{aA} ± 2,43
S – L	136,95 ^{bB} ± 4,22	97,45 ^{dB} ± 3,85	73,83 ^{fA} ± 2,27	52,21 ^{fA} ± 5,73	43,57 ^{dC} ± 2,71
S – HL	92,15 ^{aA} ± 2,73	62,22 ^{aB} ± 3,66	43,99 ^{bA} ± 1,51	40,08 ^{dAB} ± 0,77	35,82 ^{aC} ± 1,75

Oznaczenia: Sz – szalwia; K – koper; S – seler; ST – suszenie tradycyjne; L – liofilizacja, HL – homogenizacja + liofilizacja. a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$). A, B, C – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszu różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$).

Zawartość karotenoidów w zielonych roślinach badali również Lisewska i in. [2006], w blaszkach liściowych świeżej 20-centymetrowej roślinie kopru oznaczyli zawartość karotenoidów na poziomie 27,8 mg/100 g, a w roślinie 60-centymetrowej 34,9 mg/100 g. Autorzy podają również, że blaszki liściowe zawierają 8,5 razy więcej karotenoidów niż łodygi oraz 4,3 razy więcej niż ogonki liściowe. Potwierdzają to Lisewska i in. [2004] prezentując badania, w których stwierdzają, że liście zawierały o 40% więcej tych związków, w stosunku do całej rośliny. Ponadto wynik dotyczący całej rośliny jest bardzo zbliżony do uzyskanego w badaniach własnych (21,8 mg/100 g s.m.), gdyż autorzy donoszą, że cała roślina kopru zawiera 19,3 mg karotenoidów w 100 g świeżej masy. Zróznicowany poziom karotenoidów, w zależności od części anatomicznej rośliny, potwierdza również Gębczyński [2003] analizując róże brokuła. Stwierdził on, że główne róże zawierały mniej tych związków niż róże boczne. Ponadto

Ćwintal i Wilczek [2008] donoszą, że górna połowa lucerny będąca na początku fazy kwitnienia zawiera o 60% więcej karotenoidów, w stosunku do dolnej.

Tabela 4. Zawartość witaminy C w analizowanych roślinach, w zależności od metody suszenia i czasu przechowywania [mg/100 g s.m.].

Roślina i metoda suszenia	Czas przechowywania [miesiące]				
	0	3	6	9	12
Sz – świeża	87,05^a ± 3,39	-	-	-	-
Sz – ST	41,71 ± 2,84	31,73^{aA} ± 3,48	31,72^A ± 2,94	32,51^B ± 4,72	32,30^{aB} ± 0,16
Sz – L	87,84^b ± 4,21	79,01 ± 6,25	51,26 ± 4,75	57,10^{aA} ± 0,86	55,06^{bA} ± 2,30
Sz – HL	51,69^c ± 6,61	41,28^b ± 2,73	37,57^{aA} ± 4,14	31,05^{aA} ± 0,53	32,91^{bA} ± 1,07
K – świeża	169,12^{ad} ± 11,07	-	-	-	-
K – ST	148,82^A ± 15,46	71,28^{bcdA} ± 0,66	95,34^{cdA} ± 2,78	61,58^{deA} ± 1,95	56,53^{cdeA} ± 1,98
K – L	181,43^{ef} ± 9,52	99,34^{bcA} ± 1,48	93,21^{cA} ± 4,27	54,75^{da} ± 0,64	87,12^{aA} ± 3,29
K – HL	120,86^c ± 13,40	102,43^{bcA} ± 8,82	112,14^{cdAB} ± 2,05	89,66^{dB} ± 1,17	86,28^{acAB} ± 1,92
S – świeża	162,77 ± 6,61	-	-	-	-
S – ST	37,34^c ± 0,53	33,39^{cA} ± 3,33	29,77^{aA} ± 0,11	30,94^{cA} ± 1,17	29,23^d ± 1,58
S – L	183,53^e ± 13,61	176,73^{cA} ± 10,13	136,46^A ± 0,78	130,56^{aA} ± 2,77	108,17^{da} ± 0,93
S – HL	43,99^{ab} ± 2,12	37,06^A ± 2,41	41,77^A ± 0,10	40,87^a ± 0,47	31,23 ± 0,92

Oznaczenia: Sz – szalwia; K – koper; S – seler; ST – suszenie tradycyjne; L – liofilizacja, HL – homogenizacja + liofilizacja. a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$). A, B, C – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszu różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$).

Błaszki liściowe kopru i liście selera charakteryzowały się bardzo zbliżonymi poziomami witaminy C. Obydwie rośliny zawierały tego związku ok. 165 mg/100 g s.m., natomiast szalwia lekarska zawierała blisko o 50% mniej tej witaminy. Z uwagi na termolabilność witaminy C, liofilizacja była zdecydowanie lepszą metodą pozwalającą na jej zachowanie prawie na niezmienionym poziomie. Znacznie większe straty sięgające aż 77%, odnotowano w liściach selera suszonych owiewowo. Natomiast zastosowanie homogenizacji przed procesem suszenia sublimacyjnego, wpłynęło negatywnie na zawartość analizowanej witaminy, ale wariant ten w przypadku szalwii i selera zawierał i tak więcej tego związku w porównaniu z surowcem suszonym owiewowo.

Podsumowanie

Liofilizacja, w porównaniu z tradycyjnym suszeniem owiewowym, jest metodą umożliwiającą w większym stopniu zachowanie w warzywach liściowych takich labilnych składników jak chlorofile, karotenoidy czy witamina C. Operacja homogenizacji poprzedzająca proces liofilizacji spowodowała obniżenie zawartości omawianych składników, niemniej jednak wariant ten był porównywalny z suszeniem uzyskanym na drodze suszenia owiewowego. Roczemu składowaniu wysuszonych warzyw liściowych, towarzyszy spadek zawartości chlorofili i karotenoidów oraz witaminy C. Mniejsze straty w tym zakresie mają miejsce w surowcach liofilizowanych, w porównaniu do produktów suszonych owiewowo.

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

Literatura

1. Bazyma L.A., Guskov V.P., Basteev A.V., Lyashenko A.M., Lyakhno V., Kutovoy V.A. The investigation of low temperature vacuum drying process of agricultural materials. *Journal of Food Engineering*, 2006, 74, 410 – 415.
2. Bernstein P.S., Khachik F., Carvalho L.S., Muir G.J., Zhao D.Y., Katz N.B. Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. *Experimental Eye Research*. 2001, 72, 215 – 223.
3. Czerwińska D. Gramy w zielone. *Przegląd Gastronomiczny*. 2007, 6, 12 – 13.
4. Ćwintal M., Wilczek M. Agrotechnika lucerny. W: Grela E.R (red.): *Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt. 3rd International Conference „Feed and Food Additives”*, Dzierżówka-Lublin 2008, 7 – 18.
5. Gębczyński P. Zmiany ilościowe wybranych składników chemicznych w procesie mrożenia i zamrażalniczego składowania głównych i bocznych róż brokuła. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 2003, 2 (1), 31 – 39.
6. Kachel-Jakubowska M. Zawartość chlorofilu w nasionach rzepaku poddanych procesowi suszenia. *Inżynieria Rolnicza*. 2009, 8 (117), 39 – 45.
7. Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. Extraction of photosynthetic tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Mesurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, F4.2.1-F4.2.6, F4.3.1-F4.3.8.

8. Lisiewska Z., Kmiecik W., Korus A. Content of vitamin C, carotenoids, chlorophylls and polyphenols in green parts of dill (*Anethum graveolens* L.) depending on plant height. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, 19, 134 – 140.
9. Lisiewska Z., Kmiecik W., Słupski J. Contents of chlorophylls and carotenoids in frozen dill: effect of usable part and pretreatment on the content of chlorophylls and carotenoids in frozen dill (*Anethum graveolens* L.), depending on the time and temperature of storage. *Food Chemistry*. 2004, 84, 511 – 518.
10. Mares-Perlman J.A., Millen A.E., Ficek T.L., Hankinson S.E. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin delaying chronic disease. *Journal of Nutrition*. 2002, 132, 518 – 524.
11. Mozaffarieh M., Sacu S., Wedrich A. The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin in protecting against age-related macular degeneration: A review based on controversial evidence. *Nutrition Journal*. 2003, 2 (20), 1 – 8.
12. PN-75/A-04018:1975. Produkty rolniczo-żywnościowe - Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
13. PN-90/A-75101/03:1990. Oznaczenie zawartości suchej masy metodą wagową. Przetwory owocowe i warzywne.
14. PN-A-04019:1998. Produkty spożywcze -- Oznaczanie zawartości witaminy C.
15. Pszczola, D.E. A spice odyssey. *Food Technology*. 2001, 55, 36 – 44.
16. Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*. 2001, 49, 311 – 319.
17. Ribaya-Mercado J.D., Blumberg J.B. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *The Journal of the American College of Nutrition*. 2004, 23 (6), 567 – 587.
18. Rowicka R., Nowak D., Lewicki P.P. Wpływ aktywności wody na właściwości mechaniczne kostek jabłka suszonych sublimacyjnie, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2002, 9(1), 66 – 78.
19. Sloan, A.E. New rules for ready-to-eat. *Food Technology*. 2004, 58, 16.
20. Śledź M., Witrowa-Rajchert D. Składniki biologicznie czynne w suszonych ziołach - czy ciągle aktywne? *Kosmos*. 2012, 61(2), 319 – 329.
21. Witrowa-Rajchert D., Hankus M., Pawlak E. Wpływ metody suszenia na zawartość chlorofilu i barwę oregano oraz bazylii. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*. 2009, 49, 1, 70 – 71.
22. Yeum K.J., Taylor A., Tang G., Russell R.M. Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherols in human lenses. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1995, 36, 2756–2761.

Rozdział 3

Piotr Jakubowski

*Katedra Technologii Węglowodanów, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

Kierownik Katedry/Promotor: Prof. dr hab. inż. Halina Gambuś

LIGNANY – ZWIĄZKI FUNKCJONALNE POCHODZENIA ROŚLINNEGO

Streszczenie

Lignany jest to grupa związków polifenolowych zaliczana do fitoestrogenów. Z kolei polifenole będące nadrzędną grupą dla lignanów są istotne z powodu ich funkcjonalnego charakteru. Podobnie jak polifenole, lignany posiadają szereg istotnych właściwości od przeciwtleniających poprzez przeciwbakteryjne do antykancerogennych. Są one szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Za najbardziej bogaty w te związki produkt uważany jest len (*Linum usitatissimum* L.). Ponadto lignany zawarte są w nasionach zbóż, warzywach, owocach, herbacie, orzechach. Obecnie do lignanów zalicza się ogromną grupę związków bardzo zróżnicowanych taksonomicznie. Fitoestrogeny, jakimi są lignany, odznaczają się działaniem podobnym do estrogenów, regulując tym samym gospodarkę hormonalną organizmu. Znajdują zastosowanie w przypadku leczenia różnych rodzajów nowotworów, regulacji poziomu cholesterolu oraz glukozy we krwi, chronią przed chorobami układu sercowo-naczyniowego. W pracy przedstawiono informacje dotyczące budowy, roli oraz znaczenia lignanów dla organizmu człowieka.

Słowa kluczowe: lignany, len, polifenole, antyoksydanty, związki funkcjonalne

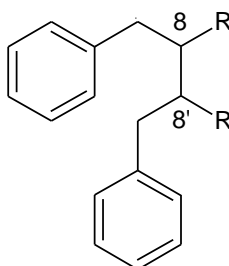
Wprowadzenie

W obecnych czasach zwraca się coraz większą uwagę na związki funkcjonalne występujące w żywności. W pewnym stopniu każdy rodzaj żywności jest funkcjonalny, gdyż dostarcza smaku, zapachu czy też wartości odżywczej. Jednak obecnie taki termin dotyczy żywności przynoszącej dodatkowe korzyści fizjologiczne, co może zmniejszyć ryzyko występowania niezakaźnych chorób przewlekłych lub w inny sposób zoptymalizować funkcjonowanie organizmu człowieka. Wysiłki badaczy spowodowały rosnące globalne zainteresowanie tą kategorią żywności nazywaną „żywnością

funkcjonalną”. Obecnie nie ma przyjętej jednoznacznej definicji „żywności funkcjonalnej”, jednak jej koncepcja pojawiła się w Japonii w 1980 roku [Hasler, 2002]. FFC (Functional Food Center) definiuje „żywność funkcjonalną” jako naturalny lub przetworzony rodzaj żywności, która zawiera znane lub nieznanne substancje biologicznie – czynne. Żywność ta w „skutecznych”, nietoksycznych ilościach musi dostarczać udowodnionych i udokumentowanych korzyści zdrowotnych dotyczących zapobiegania lub leczenia chorób przewlekłych [Martirosyan i Singh, 2015]. Do tego typu żywności zalicza się produkty zawierające kwasy tłuszczowe, bądź też związki bioaktywne [Hasler, 2002].

Biorąc pod uwagę korzyści zdrowotne wynikające ze spożywania żywności bogatej w związki bioaktywne, kładzie się coraz większy społeczny nacisk na opracowywanie nowych metod mających poprawić stabilność, biodostępność, a ponadto ułatwić ich wyosabnianie z surowców. Wykazano, że w obrębie każdego surowca jego właściwości fizykochemiczne mają wpływ na proces przenikania masy, dostępności, strawności i stabilności wielu związków, co jest istotne w procesach ich wyosabniania [Crowe, 2013]. Wśród związków bioaktywnych wyróżniamy związki polifenolowe, które są szeroko znane ze swoich właściwości m. in. Antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych [Waszkowiak, 2013].

Do tej szerokiej grupy związków, zróżnicowanych pod względem budowy i właściwości, zaliczamy lignany. Ta drugorzędowa grupa związków jest metabolizowana przez rośliny, a podstawową jednostką budującą ich szkielet jest 2,3-dibenzyllobutan [Waszkowiak, 2013]. Obie budujące je jednostki propylobenzenowe są ze sobą połączone atomami węgla w pozycji 8-8' (Rysunek 1). Znane są jednak inne związki zaliczane do lignanów nie połączone ze sobą w wyżej wspomnianej konfiguracji. Są one nazywane neolignanami. Przez ostatnich kilka lat powstało wiele publikacji dotyczących form klasyfikacji wspomnianych związków od uwzględniających ich budowę strukturalną, przez ich biogenezę (proces ich powstawania), do ich aktywności biologicznej [Begum i in., 2010].



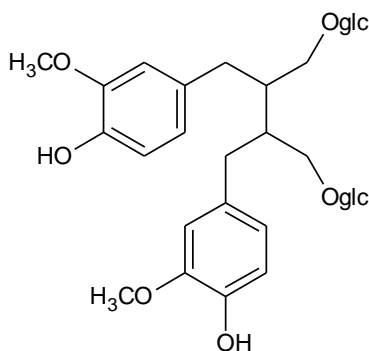
Rys 1. Podstawowa jednostka budująca lignany.

Ponadto lignany zaliczane są do fitoestrogenów [Waszkowiak, 2013]. Ich zachowanie w organizmie człowieka zależy od poziomu estrogenu. W przypadku gdy poziom tego hormonu w organizmie jest normalny, lignany działają w stosunku do niego antagonistycznie, natomiast, gdy poziom estrogenu jest niski (najczęściej obserwowane u kobiet po menopauzie) lignany działają jako słaby estrogen [Kajla i in., 2014].

Występowanie lignanów

Identyfikacji obecności lignanów w drzewach dokonano w XIX wieku, jednak ich nazwa została zaproponowana przez Haworth'a w 1936 roku. Obecnie wiemy, że lignany są szeroko rozpowszechnionymi związkami w świecie roślinnym. Występują one w ich zdrewniałych częściach, korzeniach, kwiatach, owocach, nasionach oraz liściach. Uważa się, że lignany pełnią w roślinach głównie funkcje obronne, ale ponadto biorą udział w regulacji procesów wzrostu. Stąd też ich wysoka koncentracja w tkankach okrywających drzew [Willför i in., 2006].

Najwyższą zawartość lignanów stwierdzono w siemieniu lnianym oraz sezamie, natomiast ich mniejszą zawartość można spotkać w roślinach z rodziny *Brassica* (warzywa kapustne), orzechach, nasionach zbóż, słonecznika, ale ponadto w jagodach, herbacie i innych produktach [Smeds i in., 2012]. W tabeli 1 przedstawiono sumaryczną i jednostkową zawartość wybranych lignanów w wybranych rodzajach produktów.



Rys. 2. Diglikozyd sekoizolaricirezinolu (SDG).

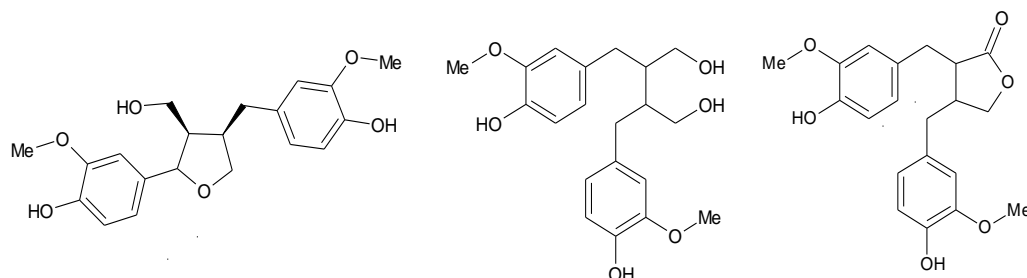
Wspomniane nasiona lnu (*Linum usitatissimum* L.) są bogatym źródłem diglikozydowej formy sekoizolaricirezinolu (SDG), który jest uważany za prekursor enterolignanów [Schmidt i in. 2012]. W wyniku przeprowadzonych badań wiadomo, że zawartość diglikozydu sekoizolaricirezinolu (Rysunek 2) w lnieniu zmienia się wraz ze stopniem dojrzałości nasion (wzrasta). Stwierdzono również, że lignany

są zgromadzone głównie w warstwach zewnętrznych nasion, a w szczególności w ścianie komórkowej okrywy nasiennej [Attoumbré i in. 2011].

Tabela 1. Zawartość lignanów w wybranych produktach ($\mu\text{g}/100$ g świeżej masy) [Landete 2011].

Rodzaj produktu	Sekoizolaricirezolin (Seco)	Pinorezolin (Pin)	Laricirezolin (Lari)	Matairezolin (Mat)	Łączna zawartość lignanów
Siemię lniane	294210	3324	3041	553	301129
Nasiona sezamu	66	29331	9470	481	39348
Nasiona słonecznika	53	167	671	0	891
Szparagi	743	122	92	14	971
Brokuł	5,8	6,1	82,0	0,1	93,9
Czosnek	42,0	481,9	54,4	4,8	583,2
Pszenica	868	138	672	410	-
Suszone daktyle	106,2	100,2	116,9	0,3	323,6
Truskawki	5,1	20,8	22,9	0,1	48,9
Czarna herbata	5,0–6,2	27,0–40,6	28,9–30,8	1,1–1,5	63,6–77,1
Wino czerwone	29,4	0,4	7,4	0,0	37,3

Oprócz diglikozydu sekoizolaricirezolinu w nasionach lnu można spotkać inne lignany jak: matairezolin, pinorezolin, laricirezolin (Rysunek 3) [Landete, 2011].



Rys. 3. Wzory strukturalne lignanów. Od lewej: laricirezolin (Lari), sekoizolaricirezolin (Seco), matairezolin (MR).

Głównymi lignanami w ziarnach sezamu oraz oleju sezamowym jest sezamina i sezamolina [Ahmad Dar i Arumugan, 2013; Kamal-Eldin i in., 2011]. Do lignanów występujących w formie aglikonu zawartych w nasionach tej rośliny zaliczamy: sezamol, sezaminol, pinorezolinol (Pin), matairezolinol (Mat), laricirezolinol (Lari) i episezaminę. Natomiast do form glikozydowych mono-, di-, triglukozydy sezaminy, sezamoliny, pinorezolinolu. Sezam zawiera również biologicznie aktywne homologi tokoferolu, tokotrienole i naftochinony [Ahmad Dar i Arumugan, 2013]. Zawartość lignanów w ziarnie sezamu jest jednak niższa niż w przypadku ich zawartości w oleju. Według przeprowadzonych przez Shinmena i in. [1993] badań możliwe jest wyodrębnienie, (przy zastosowaniu rozpuszczalnika organicznego) 32,23% lignanów z ziarna sezamowego w stosunku do ich zawartość w oleju [Reshma i in., 2010].

W przypadku jagód i owoców jagodowych (truskawki, maliny) profil zawartości lignanów prezentuje się znacznie inaczej niż w przypadku roślin oleistych, gdzie dominuje Seco, Pin, i Lar. Głównym lignanem w tych owocach jest syringarezolinol (Syr) [Smeds i in., 2012].

Wyosabnianie lignanów

Ekstrakcja lignanów z surowców jest istotnym problemem, który we wczesnych badaniach nad tymi związkami był bagatelizowany. Wiele z tych badań było prowadzonych w destrukcyjnym dla lignanów alkalicznym, bądź kwasowym środowisku. Obecnie są znane dużo wydajniejsze i łagodniejsze metody wyodrębniania lignanów z materiału roślinnego [Smeds i in., 2007].

Ekstrakcję lignanów prowadzi się zwykle z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych, kwasowej bądź zasadowej hydrolizy lub kombinacji tych metod. Alkaliczna hydroliza wykorzystywana jest między innymi do wyodrębniania diglikozydu sekoizolaricirezolinolu z siemienia lnianego. Wspomniany związek tworzy w siemieniu lnianym oligomer z kwasem 3-hydroksy-3-metyloglutarowym. Rozpad łączącego ich wiązania estrowego, może uzyskać wykorzystując hydrolizę zasadową [Milder i in., 2004].

Mazur i in. [2000] opracowali ilościową metodę wyosabniania fito estrogenów w produktach roślinnych z zastosowaniem rozcieńczenia izotopowego z wykorzystaniem chromatografii gazowej, sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS). Ponadto do wyodrębniania lignanów wykorzystuje się hydrolizę enzymatyczną z zastosowaniem β -glukozydazy lub β -glukuronidazy/sulfatazy wyizolowanej z *Helix pomatia* [Sicilia i in., 2003].

Do pomiaru zawartości lignanów z żywności wykorzystuje się wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z detekcją w zakresie UV-VIS, chromatografię gazową ze spektrometrią mas (GC-MS) lub chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrem masowym (LC-MS) [Milder i in., 2004]. W HPLC z odwróconym układem faz, faza mobilna składa się zasadniczo z mieszaniny rozpuszczalników organicznych, typowych jak metanol czy acetonitryl oraz fazy wodnej, na którą składa się woda, bufor kwasowy lub rozcieńczony kwas. Lim i Ayres, [1983] wykazali, że wybór organicznego modyfikatora silnie wpływa na zachowanie retencji aryltetrahydronaftalenowych lignanów w RP-HPLC [Słanina i Glatz, 2006].

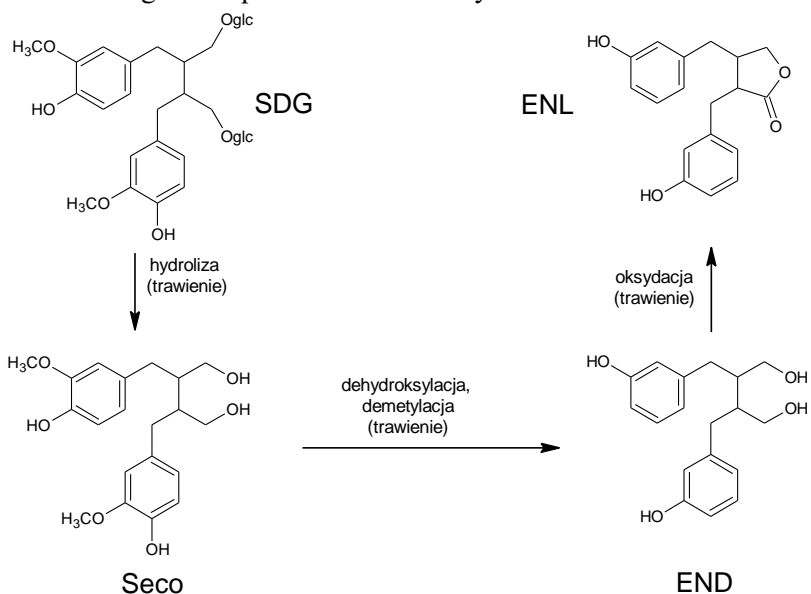
Ponadto stosowane są metody elektromigracyjne na przykład elektroforeza lub micelarna chromatografia elektrokinetyczna (MEKC), czy też elektrochromatografia kapilarna. W MEKC wykorzystuje się jeden lub kilka środków powierzchniowo czynnych, który dodaje się do elektrolitu powyżej ich krytycznego stężenia micelnego. Powstające micle działają jako czynnik rozdzielający (faza pseudostacjonarna) dla naładowanych analitów. Song i in. [1994] po raz pierwszy opisali wykorzystanie tej techniki do analizy lignanów z chloroformowego ekstraktu stopowca himalajskiego (*Podophyllum emodi*) [Słanina i Glatz, 2006].

Właściwości

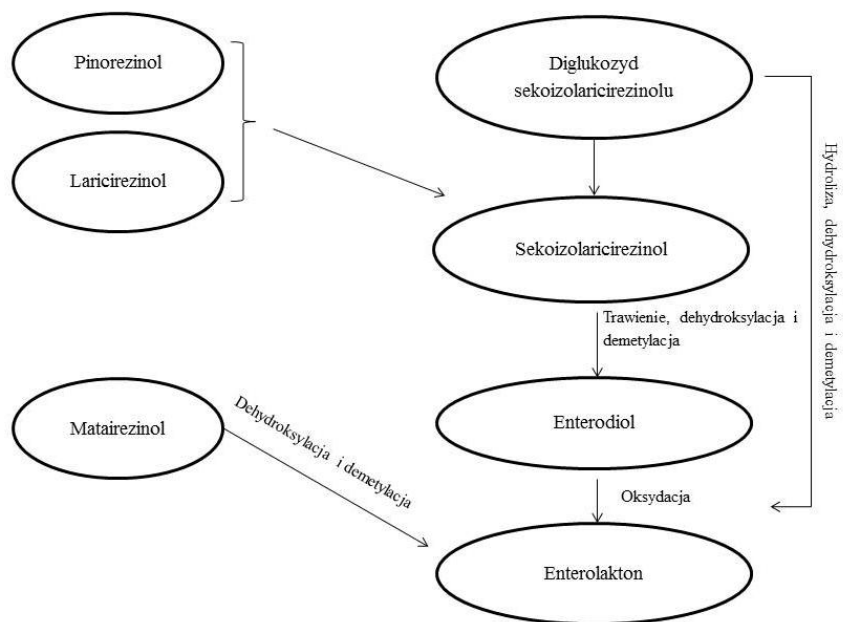
Za właściwości lignanów oraz związaną z tym aktywność biologiczną odpowiada ich powinowactwo do enterolaktonu i enterodiolu. Na początku XX wieku oba wspomniane związki zostały po raz pierwszy wyizolowane z surowicy, moczu i żółci człowieka oraz innych ssaków. Zostały one zaklasyfikowane do fitoestrogenów z powodu ich roślinnego pochodzenia oraz estrogenowego i antyestrogenowego działania w organizmie ludzkim. Enterolakton oraz enterodiol nazywane są lignanami zwierzęcymi, bądź też enterolignanami [Landete, 2011]. Prekursorami wspomnianych enterolaktonu (ENL) i enterodiolu (END) są sekoizolaricirezinol oraz matairezol (Rysunek 4). W wyniku trawienia przez bakterie przewodu pokarmowego ulegają one przekształceniu do enterolignanów. Obecnie znanych jest wiele innych prekursorów lignanów zwierzęcych, jak na przykład laricirezinol czy pinorezinol [Milder i in., 2005].

Proces trawienia lignanów, a w szczególności SDG odbywa się w jelicie. Po spożyciu SDG niewielka jego ilość jest wchłaniana w jelicie cienkim i wydalana z moczem. Pozostała jego część transportowana jest do okrężnicy i metabolizowana przez mikroflorę jelitową. Dwie grupy beztlenowców obecne w jelicie, *Peptostreptococcus* i *Eubacterium* katalizują demetylację i dehydroksylację wspomnianego diglikozydu sekoizolaricirezinolu. W jelicie SDG i inne lignany ulegają konwersji do enterolignanów

i stamtąd transportowane są do krwioobiegu lub wydalane z kałem [Patel i in., 2012]. Metabolizm trawienia lignanów przedstawiono na Rysunku 5.



Rys. 4. Schemat trawienia SDG do END i ENL.



Rys. 5. Metabolizm lignanów [Kajla i in. 2014].

Enterolakton i enterodiol przyczyniają się do spadku ryzyka chorób onkologicznych, w tym raka prostaty, raka piersi czy też raka jelita grubego. Można spotkać się z doniesieniami, że leczenie z wykorzystaniem diety bogatej w diglukozyd sekoizolaricirezinolu hamuje wzrost guzów i zmniejsza ryzyko przerzutów [Tolkachev i Zhuchenko, 2000].

Jak wiadomo wolne rodniki uszkadzają tkanki, kwasy nukleinowe i białka, co może powodować nowotwory płuc, choroby neurologiczne, przedwczesne starzenie się, czy cukrzycę. Aktywność przeciwnowotworowa lignanów przypisywana jest ich zdolności do zmiatania wolnych rodników. Codzienne podawanie 100 mg SDG okazało się skuteczne w zmniejszaniu poziomu cholesterolu we krwi oraz ryzyka pojawiania się hipercholesterolemii u mężczyzn [Kajla i in., 2014].

Badania kliniczne wskazują, że lignany zapobiegają powstawaniu raka piersi, poprzez regulację i równoważenie mechanizmów hormonalnych. Hamują aktywność aromatazy w tkance tłuszczowej w wyniku cyrkulacji estrogenu [Kajla i in., 2014].

Składniki siemienia lnianego mogą chronić przed odkładaniem się płytek miażdżycowych w tętnicach szyjnych i aorcie. Dieta bogata w siemię lniane może poprawiać rozluźnienie śródbłonna naczyń krwionośnych, w przypadku spożywania produktów o wysokiej zawartości cholesterolu. Spożycie lignanów może mieć tym samym pozytywny efekt chroniąc przed zawałami i udarami [Landete, 2012].

Wykazano także, że diglukozyd sekoizolaricirezinolu (SDG) może zapobiegać rozwojowi cukrzycy. Związane jest to z jego aktywnością antyoksydacyjną [Patel i in., 2012].

Inny z lignanów, sezamina obecna w sezamie ma działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie δ -5-desaturazy, będącej kluczowym enzymem w biosyntezie kwasu arachidonowego. Kwas ten z kolei zmniejsza zdolność do tworzenia substancji pośrednich wywołujących stany zapalne. Sezamina powoduje ponadto wzrost stężenia ciał ketonowych, jeśli poziom glukozy w tkance mózgowej jest zbyt niski [Ahmad Dar i in., 2013]. Sezamina przy dość niskiej dawce 65 mg/dzień lub równoważnej jej ilości 13 g nasion sezamu powoduje obniżenie cholesterolu w osoczu u pacjentów z hipercholesterolemią [Landete, 2012].

Podofilotoksyna, aryltetrahydronaftalenowy lignan oraz jej pochodne występują w dużych ilościach w korzeniach i kłączach roślin z rodzaju stopowców *Podophyllum* (*Berberidaceae*) na przykład stopowiec tarczowaty (*Podophyllum peltatu*) lub stopowiec himalajski (*Podophyllum emodi*). Już od wieków w Chinach *Podophyllum emodi* była stosowana w leczeniu ukąszeń węża, reumatyzmie, wrzodach. Alkoholowy wyciąg z *Podophyllum peltatum* nazywany podofiliną lub czystą podofilotoksyną jest lekarstwem na chorobę weneryczną wywołaną przez wirusa brodawczaka. Ponadto podofilotoksyna

jest substratem do syntezy powszechnie stosowanego w leczeniu nowotworów etopozydu. Mechanizm działania tej pochodnej lignanu polega na nieodwracalnym hamowaniu topoizomerazy II, która indukuje pęknięcie nici DNA i śmierć komórek [Słanina i Glatz, 2006].

Podsumowanie

Lignany stają się coraz bardziej istotną grupą związków dla zdrowia człowieka. Transformacja lignanów przez mikroflorę człowieka może mieć istotne znaczenie dla ich działania przeciwutleniającego, przeciwnowotworowego czy też przeciwzapalnego.

Wciąż bardzo mało wiemy o ich roli. Jednak zaczyna pojawiać się pozytywny trend dotyczący rozwoju wiedzy na temat lignanów. W bardzo ograniczonym zakresie badane są ich enancjomery, obecność i występowanie ich form związanych, polimerów, sposobów ich wyodrębniania oraz syntezy. Przeprowadzanie kolejnych badań może przyczynić się do głębszego poznania oraz zrozumienia znaczenia tych związków dla zdrowia człowieka.

Literatura

1. Arai S. Studies on functional foods in Japan- state of the art. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60, 9-15.
2. Attoumbré J., Laoualy A. B. M., Bienaime Ch., Dubois F., Baltora-Rosset S. Investigation of lignan accumulation in developing *Linum usitatissimum* seeds by immunolocalization and HPLC. *Phytochemistry Letters*, 2011, 4, 194-198.
3. Begum S. A., Sahai M., Ray A. B.: Non-conventional lignans: coumarinolignans, flavanolignans, and stilbenolignans. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 93. Eds. A. D. Kinghorn, H. Falk, J. Kobayashi. Springer-Vierlag/Wien, 2010, pp. 1-64.
4. Crowe K. M.: Designing functional foods with bioactive polyphenols: highlighting lessons learned from original plant matrices. *Journal of Human Nutrition and Food Science*, 2013, 1(3), 1018.
5. Dar A. A., Arumugan N.: Lignans of sesame: purification methods, biological activities and biosynthesis – a review. *Bioorganic Chemistry*, 2013, 50, 1-10.
6. Hasler C. M.: Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the american council on science and health. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132, 3772-2781.

7. Kajla P., Sharma A., Sood D. R.: Flaxseed- a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 52, 1857-1871.
8. Kamal-Eldin A., Moazzami A., Washi S.: Sesame seed lignans: potent physiological modulators and possible ingredients in functional foods and nutraceuticals. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, 2011, 3, 17-29.
9. Landete J. M.: Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*, 2012, 46, 410-424.
10. Lim C. K., Ayres D. C.: High-performance liquid chromatography of aryltetrahydronaphthalene lignans. *Journal of Chromatography A*, 255, 247-254.
11. Martirosyan D. M., Singh J.: A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique. *Functional Foods in Health and Disease*, 2015, 5, 209-223.
12. Mazur W. M., Uehara M., Wähälä K., Adlercreutz H.: Phytoestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 2000, 83, 381-387.
13. Milder I. E. J., Arts I. C. W., van de Putte B., Venema D. P., Hollman P. C. H.: Lignan contents of dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*, 2005, 93, 393-402.
14. Milder I. E. J., Arts I. C. W., Venema D. P., Lasaroms J. J. P., Wähälä K., Hollman P. C. H.: Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2004, 52, 4643-4651.
15. Patel D., Vaghasiya J., Pancholi S. S., Paul A.: Therapeutic potential of secoisolariciresinol diglucoside: a plant lignin. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2012, 4(1), 15-18.
16. Reshma M. V., Balachandran C., Arumughan C., Sunderasan A., Sukumaran D., Thomas S., Saritha S.S.: Extraction, separation and characterisation of sesame oil lignan for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 2010, 120, 1041-1046.
17. Schmidt T. J., Klaes M., Sendker J.: Lignans in seeds of *Linum* species. *Phytochemistry*, 2012, 82, 89-99.
18. Shinmen Y., Akimoto K., Asami S., Suwa Y., Kitagawa Y., Sugano M., Yamada H., Shimizu S.: Liver function improver. USA. Patent US 1993, 5. 211. 95.

19. Sicilia T., Niemeyer H. B., Honig D. M., Metzler M.: Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2003, 51, 1181-1188.
20. Slanina J., Glatz Z.: Separation procedures applicable to lignan analysis. *Journal of Chromatography B*, 2004, 812, 215–229.
21. Smeds A. I., Eklund P. C., Sjöholm R. E., Willför S. M., Nishibe S., Deyama T., Holmbom B. R.: Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2007, 55, 1337-1346.
22. Smeds A. I., Eklund P. C., Willför S. M.: Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. *Food Chemistry*, 2012, 134, 1991-1998.
23. Song L. G., Zhang S. M., Ou Q. Y., Yu W. L.: Studies of crude chloroform extract of roots of *Podophyllum emodii* var. *chinesis* Sprague by micellar electrokinetic chromatography. *Chromatographia* 39 (11), 682-686.
24. Tolkachev O. N., Zhuchenko A.A.: Biologically active substances of flax: medicinal and nutritional properties (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2000, 7 (34), 23-30.
25. Waszkowiak K.: Lignany funkcjonalny składnik żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2013, 67, 34-37.
26. Willför S. M., Smeds A. I., Holmbom B. R.: Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1112, 64-77.

Rozdział 4

¹Marta Liszka-Skoczylas, ¹Daniel Żmudziński, ¹Urszula Goik, ²Łukasz Skoczylas

¹Katedra Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego,

²Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów

Wydział Technologii Żywności,

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kierownik ¹katedry: prof. dr hab. inż. Mirosław Grzesik

Kierownik ²katedry: dr hab. inż. Piotr Gębczyński, prof. UR

BADANIA MECHANICZNE I AKUSTYCZNE ŻYWNOSCI

Streszczenie

Obecnie produktom żywnościowym stawia się coraz wyższe wymagania dotyczące ich jakości. Istotnym wskaźnikiem jakości, który wpływa na ocenę konsumenta, poza smakiem i wyglądem, jest tekstura produktu, która nie powinna się zmieniać w czasie jego przechowywania. Ważną rolę w jej postrzeganiu odgrywa dźwięk, który jest generowany podczas rozdrabniania produktu.

W artykule omówiono percepcje tekstury, jako wskaźnika jakości żywności. Opisano niektóre metody pomiaru tekstury jak i analizę emisji akustycznej oraz wpływ aktywności wodnej na te dwa parametry.

Słowa kluczowe: tekstura, profil tekstury, test TPA, emisja akustyczna, aktywność wodna

Wprowadzenie

Tekstura żywności jest doświadczeniem człowieka wynikającym z jego kontaktu z żywnością, jej strukturą i zachowaniem podczas jej obróbki. Aby zrozumieć reakcję człowieka na strukturę żywności, trzeba połączyć różne dziedziny nauki od aspektów fizjologicznych i psychologicznych po badania fizyczne struktury oraz chemiczne składu surowców i produktów żywnościowych. Ważne jest również zwrócenie uwagi na zachowanie artykułów żywnościowych podczas działania na nie sił odkształcających i niszczących. W trakcie ich oddziaływań na strukturę produktu, dochodzi najczęściej do gwałtownego wyzwolenia zakumulowanej w nim energii sprężystej w postaci emisji akustycznej. Dźwięk, a szczególnie jego częstotliwość oraz amplituda, często jest wskaźnikiem jakości produktu spożywczego.

Percepcja tekstury

Podczas poszukiwania i wyboru pożywienia człowiek posługuje się zmysłami. Postrzeganie tekstury żywności jest skomplikowanym procesem obejmującym percepcję zmysłami wzroku, słuchu oraz dotyku [Wilkinson i in., 2000]. Najistotniejszym z nich jest zmysł wzroku. Dzięki niemu wiadomo czy dostrzeżony produkt jest z grupy spożywczych oraz jeśli tak, czy nadaje się do konsumpcji. Na podstawie oceny wzrokowej można oczekiwać pewnych właściwości smakowych oraz teksturalnych żywności. Kolejna część informacji zbierana jest za pomocą zmysłu dotyku. Pierwsze wrażenia sensoryczne związane z teksturą przekazywane są bezpośrednio przez opuszki palców lub pośrednio poprzez nóż i/lub widelec. Dalsza weryfikacja produktu następuje przez zmysł powonienia, bezpośrednio przez nos lub pośrednio przez usta. Szeroki zakres możliwych zapachów ma wpływ na różnorodność w odczuwaniu smaku. Informacje otrzymywane z jamy ustnej podczas gryzienia lub przeżuwania pożywienia są złożone. Część z nich zawiera dane dotyczące smaku, który definiowany jest jako określona reakcja języka na rozpuszczalne i nielotne materiały, a związany jest ściśle ze składem chemicznym produktu spożywczego. Natomiast poprzez dotyk, zęby, język i podniebienie przekazywane są informacje dotyczące tekstury: twardości, kruchości, żujności, adhezyjności itp. Podczas pracy jamy ustnej w trakcie gryzienia i żucia emitowane są dźwięki, które przekazywane są do ucha pośrednio przez powietrze lub bezpośrednio przez kości żuchwy do ucha wewnętrznego. Zatem bezpośredni wpływ na ocenę tekstury mają zmysł dotyku i słuchu [Kilcast, 1999]. Według Cardello [1996] istnieje wpływ wyglądu, szczególnie koloru produktu na odbieranie przez konsumentów jego tekstury. Dodatkowo zaobserwowano, że na jej percepcję wpływ również ma emisja akustyczna. Natomiast smak produktu postrzegany jest przez pryzmat wyglądu i tekstury [Vickers, 1991]. Większość badań dotyczących akceptowalności sensorycznej produktów spożywczych wśród konsumentów wskazuje, że ich tekstura jest bardziej istotnym wyznacznikiem jakości od wyglądu, ale mniej od smaku [Moskowitz i Krieger, 1995]. W przypadku produktów o niskim poziomie cech smakowych np.: płatki owsiane, cechy tekstury stają się najważniejszym kryterium oceny jakości żywności [Duizer, 2001].

Analiza tekstury

W literaturze przedmiotu można spotkać wiele klasyfikacji cech tekstury. Szcześniak [1963] zaproponował podział na trzy grupy skupiając się na charakterystyce właściwości: (1) mechanicznych - dzieląc je na podstawowe i pomocnicze, (2) geometrycznych - związanych z ziarnistością i strukturą oraz (3) powierzchniowych -

zależnych od zawartości wody i tłuszczu w produkcie. Natomiast Sherman [1969] stworzył alternatywną charakterystykę cech tekstury w oparciu o stanowisko, że definicje cech mechanicznych zawierały pewne wady. Bardziej praktyczny system zaproponował Jowit [1974] proponując cztery grupy terminów opisujących teksturę. Tak duża ilość określeń tekstury wprowadzała zamieszanie w interpretacji wyników badaczy. Dodatkowo, występował problem z tłumaczeniem poszczególnych określeń na inne języki. W 1992 ustalono standard nazewnictwa określający poszczególne wyznaczniki tekstury w normie British Standard BS 5098 (ISO5492). Niemniej jednak w literaturze przedmiotu nadal zdarza się odmienne definiowanie lub nazywanie poszczególnych parametrów. Tekstura w znacznym stopniu uzależniona jest od fizycznych, a szczególnie mechanicznych właściwości żywności. Dokładne relacje pomiędzy cechami sensorycznymi, a właściwościami fizycznymi często są przedmiotem badań, ale nie są do końca wyjaśnione [Lillford, 1991; Meullenet i in., 1998; de Wijk i in., 2003].

Badanie cech tekstury odbywać się może z wykorzystaniem metod analizy sensorycznej lub badań konsumenckich, a także z wykorzystaniem urządzeń typu penetrometr czy teksturometr [Juszczak, 2005]. Pierwsza grupa badań jest jednak stosunkowo pracochłonna, a uzyskane wyniki mogą być obciążone błędami. Wyniki one mogą z oddziaływania na członków panelu sensorycznego czynników natury psychologicznej, fizjologicznej czy też środowiskowej. Dlatego też, często powyższe metody zastępuje się analizą instrumentalną, która daje większą powtarzalność i dokładność wyników. Można ją także łatwiej zastosować w warunkach przemysłowych. Zajmuje się ona badaniem sił oraz odkształceń występujących podczas deformacji produktów (metody podstawowe), pomiarem odkształceń związanych z destrukcją lub deformacją badanej próbki (pomiary empiryczne) oraz imitacją warunków panujących w jamie ustnej. Na początku lat 60-tych XX w. opracowano metodę nazwaną analizą profilu tekstury - TPA (Texture Profile Analysis), która pozwala w sposób ilościowy na pomiar i obliczenie wielu wyznaczników tekstury. Dane uzyskane z teksturometru podczas testu TPA dostarczają informacji na temat podstawowych cech mechanicznych tj.: twardość, spoistość, sprężystość, adhezyjność oraz pomocniczych: kruchość, przeżuwalność, gumistość [Szcześniak, 1963]. Pomiar TPA realizowany jest poprzez dwukrotne oddziaływanie sensorem na próbkę poprzez jej kompresję i rejestrację siły, dystansu oraz wymiarów próbki, a także rejestrację czasu. W aspekcie badania żywności suchej najistotniejsze są kruchość odczytywana jako pierwszy pik na wykresie i twardość jako maksimum pierwszego wykresu w teście TPA.

Analiza emisji akustycznej

Metody akustyczne stosowane są do badania różnego rodzaju materiałów niespożywczych. Stosunkowo niedawno zainteresowano się rejestracją i analizą fal dźwiękowych generowanych w artykułach spożywczych. Podczas oddziaływania na produkt sił zewnętrznych dochodzi do jego deformacji i często do zniszczenia. Powstają liczne mikro i makro pęknięcia na powierzchni oraz wewnątrz jego struktury. Ta ulega odkształceniu i pojawiają się większe oraz mniejsze fragmenty przemieszczające się względem siebie. Ruch takich kawałków może wywołać zjawisko emisji akustycznej. Drgania materiału przenoszone są na powierzchnię, a następnie emitowane do otoczenia gdzie można je rejestrować i analizować [Malecki i Opilski, 1994; Ranachowski, 2008].

To czy emisja akustyczna pojawi się, w dużej mierze uzależnione jest od charakterystyki budowy wewnętrznej produktu oraz stanu skupienia materii. Produkty suche będą miały inną charakterystykę od wilgotnych, a te o budowie komórkowej odmienną od warstwowej. Suche produkty często mają budowę komórkową, gdzie wewnątrz wypełnione jest powietrzem, a ściany zbudowane są z materiału składającego się na produkt. Podczas przyłożenia siły, ściany ulegają ugięciu. Im większa będzie wilgotność materiału budulcowego, tym większa będzie elastyczność ścian komórkowych i większa odporność na deformację pod wpływem przyłożonej siły. W przypadku niskiej wilgotności ściany komórkowe zaczną pękać, a struktura powietrzna zapadnie się. Podczas rozrywania dochodzi do gwałtownego wyzwolenia energii zgromadzonej w materiale w postaci dźwięku. Dochodzi wtedy do zjawiska emisji akustycznej. Pęknięcie pojedynczej ściany powoduje jednorazowy epizod dźwiękowy. Rozpad wielu komórek wyzwala ich serię dając emisję charakterystycznego dźwięku. Źródłem emisji jest również ścieranie się poszczególnych ścian komórkowych ze sobą oraz pozostałości po nich. Amplituda emitowanego dźwięku zależy od głośności pęknięć pojedynczej komórki oraz głośności wszystkich pęknięć [Dacremont, 1995]. W przypadku suchych produktów o budowie nie komórkowej generowanie fali akustycznej wynika z pęknięcia poszczególnych warstw cienkich płatków oraz ich interakcji ze sobą [Vickers i Bourne, 1976].

Problem emisji akustycznej dotyczy także produktów charakteryzujących się dużą wilgotnością oraz budową komórkową. Oddziaływanie siłami na owoce lub warzywa, również powoduje deformacje i emisję akustyczną. Jednak ich budowa nie jest jednorodna w całej objętości. W komórkach występuje płyn, który wywiera ciśnienie na ściany komórek nadając im turgor, a tkanki są w stanie ciągłego naprężenia. Czynniki te powodują, że emisja akustyczna, która pojawia się podczas oddziaływania sił zewnętrznych może pochodzić ze zmian struktury oraz z własnych naprężeń

wynikających z budowy wewnętrznej [Rajewska, 2000]. Pęknięcia struktury organicznego produktu wynikać będą z oddziaływania sił zewnętrznych na strukturę komórkową powodując wewnętrzny wzrost ciśnienia. Ścianki swoją elastycznością i wytrzymałością reagują na przyłożoną siłę. Jednak nadmierny wzrost ciśnienia powoduje destrukcję ścian komórki roślinnej co powiązane jest z wydobyciem się jej zawartości na zewnątrz i wygenerowaniem fali akustycznej [Vickers i Bourne, 1976; Zdunek, 1997]. Zarówno dla produktów suchych jak i mokrych o budowie komórkowej, nie będzie różnicy w odczuwaniu chrupkości [Edmister i Vickers, 1985]. Jednak samo jej postrzeganie jest ograniczone jedynie do pierwszego ugryzienia, kiedy osiąga maksimum, a później maleje wraz z żuciem pokarmu. Związane jest to z systematyczną destrukcją struktury produktu oraz jego uwodnieniem śliną [Lee i in, 1990]. Pangborn i Lundgren [1977] uważa, że ilość wydzielanej śliny jest uzależniona od tekstury produktu.

Instrumentalne metody analizy tekstury w aspekcie badań zdarzeń dźwiękowych skupiają się głównie na mechanicznym badaniu kruchości oraz twardości produktów spożywczych. Próbkę zostaje poddana zgniataniu w teksturometrze lub maszynie wytrzymałościowej. Jednocześnie rejestrowana jest emisja akustyczna w celu skorelowania sił normalnych występujących podczas oddziaływania sensor – próbka z emitowanymi dźwiękami [Christensen i Vickers, 1981; Szcześniak, 1988; Vickers i Bourne, 1976]. W pomiarach akustycznych istotna jest amplituda fali, związana z głośnością dźwięku oraz jej częstotliwość, a także ich zmiany w czasie. Pomiar dźwięku realizowany jest w sposób pośredni z wykorzystaniem mikrofonu kierunkowego [Mohamed i in., 1982; Roudaut i in., 1998; Tesch i in., 1996] lub bezpośredni metodą kontaktową [Marzec i in., 2005]. Metoda pośrednia jest obarczona pewnym błędem wynikającym z występowania tła akustycznego, które może być na podobnym poziomie jak głośność emitowanych dźwięków. Dlatego też istotne jest zastosowanie do badań odpowiednich komór dźwiękoszczelnych. W obu metodach tło akustyczne jednak będzie występować, co wynika z pracy teksturometru lub maszyny wytrzymałościowej [Hickling i Wei, 1995; Stasiak i in., 2002; Zdunek i Ranachowski, 2006]. Badania akustyczne żywności dostarczają informacji na temat częstotliwości, amplitudy i charakterystyki fali akustycznej podczas oddziaływania na próbkę siłą. Jednak nie dają rzeczywistego obrazu dźwiękowego jaki powstaje w realnych warunkach. Podczas żucia w jamie ustnej generowany dźwięk przenosi się przez kości żuchwy i powietrze. Częstotliwość rezonansowa żuchwy wynosi 16Hz, zatem dźwięki wytwarzane o tej częstotliwości będą przez nią wzmacniane. Układ pomiarowy powinien tłumić tą częstotliwość, natomiast wzmacniać przy 3,5kHz w celu dopasowania do percepcji ucha środkowego, które reaguje odmiennie gdy dźwięki generowane są wewnątrz lub na zewnątrz jamy ustnej [Dacremont i in., 1991; Kapur, 1971; Vickers i Bourne, 1976]. Emisja akustyczna

suchych produktów zwykle oscyluje w zakresie 1 – 15kHz [Al Chakra i in., 1996; Lee i in., 1988; Lewicki i in., 2004]. Natomiast inni badacze dokładnie określili częstotliwości dźwięków emitowanych podczas żucia i dla chrupkich produktów zawierały się one w zakresie 5 – 13kHz, natomiast dla chipsów ziemniaczanych od 3 do 6kHz [Dacremont, 1995] lub 1,9 - 3,3kHz [Seymour i Hamann, 1988].

Atrakcyjność suchych produktów typu przekąskowego czy też śniadaniowego uzależniona jest przede wszystkim od twardości i kruchości. Dźwięk powstający podczas ich rozgryzania jednoznacznie wpływa na postrzeganie tekstury, stąd konsumenci chętnie spożywają produkty charakteryzujące się dużą kruchością i chrupkością [Juszczak, 2005; Marzec i Gondek, 2007; Surówka, 2000]. Moskowitz i Kapsalis [1974] zauważyli dodatnią korelację pomiędzy kruchością i chrupkością, natomiast ujemną ze spoistością. Luyten i in. [2004] zaobserwowali, że konsumenci są w stanie dostrzec różnice pomiędzy tymi dwoma określeniami. Kruchości przypisali dźwięk trwający krótko, natomiast chrupkości dłużej. Obie te cechy związane są z pękaniem materiałów spożywczych. Produkty kruche i chrupkie trudno jest odkształcić nie niszcząc ich struktury, natomiast łatwiej jest złamać generując jednocześnie dźwięk. Podczas gryzienia i żucia pożywienia w jamie ustnej, zmysły bombardowane są szeregiem bodźców, które wytwarzają w mózgu człowieka odczucie kruchości lub chrupkości. W chwili obecnej niewiele wiadomo, które bodźce i jaka ich ilość wpływa na ich postrzeganie i jak reaguje na to mózg człowieka. W związku z tym jest niezwykle trudno zdefiniować oba te terminy [Hutchings i Lillford, 1988; Szcześniak, 1988]. Zampini i Spence [2003] przeprowadzili multisensoryczne badanie zależności pomiędzy wrażeniami słuchowymi, odczuwaniem w jamie ustnej oraz mechanicznymi właściwościami chipsów ziemniaczanych. W szczególności badano, czy emitowane przez nie dźwięki wpływają na postrzeganie świeżości produktu. Zadaniem uczestników umieszczonych w dźwiękoszczelnych boksach było pojedyncze ugryzienie plasterka chipsa tylko przednimi zębami, bez żucia i połykania próbki. Wyniki wskazywały, że wzrost amplitudy przy częstotliwości 2kHz zwiększa odczucie chrupkości produktu u testujących. Pokrywa się to z doniesieniami innych naukowców, którzy odkryli podobną zależność dla częstotliwości 1,9kHz [Seymour i Hamann, 1988] i 5kHz [Dacremont, 1995]. Przeprowadzone badania dają interesujące wyniki pozwalające na taką modyfikację składu i optymalizację procesu produkcji żywności, aby otrzymany produkt miał pożądaną przez konsumenta cechy teksturalne oraz dawał mu przyjemność podczas jedzenia w postaci dźwięków o określonej częstotliwości i amplitudzie. Takie warunki może spełniać żywność o mało gęstej strukturze, zmniejszonej masie oraz o większej sztywności, co sprzyja zwiększeniu częstotliwości wibracji [Zampini i Spence, 2003].

Wpływ aktywności wodnej (a_w) na teksturę i emisję akustyczną

Pożądane przez konsumentów cechy takie jak twardość czy kruchość są charakterystyczne dla suchego produktu typu krakersy, płatki śniadaniowe czy ekstrudaty kukurydziane. Dźwięk emitowany przez produkty podczas zginiatania w dużej mierze uzależniony jest od technologii wytwarzania. W mniejszym stopniu zależy od składu chemicznego [Marzec i in., 2005]. Istotnym problemem z punktu widzenia technologów jest utrzymanie kruchości i chrupkości przez produkt. Podczas przechowywania suchych produktów obie te cechy mogą zniknąć. Związane jest to ze wzrostem a_w żywności poprzez sorpcję wilgoci znajdującej się w otoczeniu. Aktywność wody jest wskaźnikiem związania składników żywności z cząsteczkami wody. Informuje o ilości wody, która jest dostępna dla mikroorganizmów, a tym samym świadczy o jakości i trwałości produktu. Problem jednak nie dotyczy tylko w/w produktów. Dużym wyzwaniem jest utrzymanie kruchości i chrupkości produktów, które są wilgotne w swoim wnętrzu. Przykładem takiej żywności jest pieczywo, którego skórka jest chrupiąca tylko przez kilka godzin po wypieku. Po tym czasie woda zawarta w produkcie, migrując z wnętrza, skutecznie likwiduje tą pożądaną cechę. Z tym samym zagadnieniem stykają się producenci mięs pokrytych panierką, która zaraz po przyrządzeniu jest chrupka, natomiast wraz z upływem czasu jej chrupkość zanika [Luyten, 2004]. W przypadku zwiększenia wilgotności produktów suchych, materiał budulcowy staje się bardziej elastyczny i podatny na odkształcenia. Efektem tego jest obniżona emisja akustyczna lub jej brak oraz pogorszenie się lub utrata pożądaných właściwości teksturalnych [Peleg, 1998]. W literaturze przedmiotu odnaleźć można doniesienia potwierdzające to zjawisko. Gondek i in. [2009] zaobserwowali, że wraz ze wzrostem aktywności wody zmieniała się charakterystyka teksturalna oraz dźwiękowa płatków owsianych. W omawianym przypadku amplituda emitowanych dźwięków malała, natomiast najwcześniej zanikały dźwięki o niskich częstotliwościach. Zmniejszeniu ulegała również ilość zdarzeń dźwiękowych. W przypadku badania krakersów wykazano, że dla instrumentalnej oceny produktu bardziej korzystne było zastosowanie badania akustycznego niż mechanicznego [Marzec i Gondek, 2007]. Autorka zauważyła, że emisja dźwiękowa produktów suchych jest dobrym wskaźnikiem zawilgocenia produktu, jednocześnie dając informację o jakości i świeżości produktu. Zmiany zawartości wody, tłuszczów, soli mineralnych występujących w badanym produkcie globalnie lub miejscowo są możliwe do stwierdzenia poprzez zmiany teksturalne oraz poprzez badanie sygnału akustycznego w nich generowanego.

Podsumowanie

Instrumentalne metody badania tekstury wiele wnoszą w możliwości poznania struktury żywności. Połączenie ich z badaniem emisji akustycznej daje pełniejszy obraz budowy i zachowania się produktów żywnościowych oraz pozwala lepiej zrozumieć istotę zjawiska chrupkości. Emisja akustyczna jest także dobrym narzędziem umożliwiającym kontrolę jakości produktów spożywczych. Dalsze rozwijanie badań mechaniczno - akustycznych żywności umożliwi kreowanie nowych produktów dających konsumentowi satysfakcję z jedzenia poprzez odpowiednio zmodyfikowane właściwości teksturalne oraz soniczne.

Literatura

1. Al Chakra W., Allaf K., Jemai A.B. Characterization of brittle food products: application of the acoustical emission method. *Journal of Texture Studies*, 1996, 27, 327–348.
2. Cardello A.V. The role of the human senses in food acceptance w: *Food Choice, Acceptance and Consumption* (red. H. L. Meiselman, H. J. H. MacFie), Chapman & Hall., 1996, 1-82.
3. Christensen C.M., Vickers Z.M. Relationships of chewing sounds to judgments of food crispness. *Journal of Food Science*, 1981, 46, 574–578.
4. Dacremont C. Spectral composition of eating sounds generated by crispy, crunchy and crackly foods. *Journal of Texture Studies*, 1995, 26, 27-43.
5. Dacremont C., Colas B., Sauvageot F. Contribution of air- and bone-conduction to the creation of sounds perceived during sensory evaluation of foods. *Journal of Texture Studies*, 1991, 22, 443–456.
6. De Wijk R.A., Engelen L., Prinz J.F. The role of intraoral manipulation in the perception of sensory attributes. *Appetite*, 2003, 40, 1–7.
7. Duizer L. A review of acoustic research for studying the sensory perception of crisp, crunchy and crackly textures. *Trends in Food Science & Technology*, 2001, 12, 17-24.
8. Edmister J.A., Vickers Z.M. Instrumental acoustical measures of crispness in foods. *Journal of Texture Studies*, 1985, 16, 153–167.
9. Gondek E., Jakubczyk E., Maniewski M. Wpływ aktywności wody płatków owsianych na wybrane deskryptory emisji akustycznej. *Acta Agrophysica*, 2009, 13(1), 77-87.

10. Hickling R., Wei W. Sound transmission in stored grain. *Applied Acoustics*, 1995, 45, 1-8.
11. Hutchings J.B., Lillford P. The perception of food texture – the philosophy of the breakdown path. *Journal of Texture Studies*, 1988, 19, 103–115.
12. Jowitt R. The terminology of food texture. *Journal of Texture Studies*, 1974, 5, 351–358
13. Juszczak L. Tekstura żywności. *Laboratorium przemysłowe*, 2005, 2, 40 – 44.
14. Kapur K.K. Frequency spectrographic analysis of bone conducted chewing sounds in persons with natural and artificial dentitions. *Journal of Texture Studies*, 1971, 2, 50 –61.
15. Kilcast D. Sensory techniques to study food texture w: *Food Texture Measurement and Perception* (red. Andrew J. Rosenthal), Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland 1999, 30-47.
16. Lillford P.J. Texture and acceptability of human foods w: *Feeding and the Texture of Food* (red. J.F.V. Vincent and P.J. Lillford), Cambridge University Press, Cambridge, UK 1991, 231–243.
17. Lee W.E., Schweitzer G.M., Morgan G.M., Shepherd D.C. Analysis of food crushing sounds during mastication: total sound level studies. *Journal of Texture Studies*, 1990, 21, 156–178.
18. Lee W.E., Deibel A.E., Glembin C.T., Munday E.G. Analysis of food crushing sounds during mastication: frequency–time studies. *Journal of Texture Studies*, 1988, 19, 27 –38.
19. Lewicki P.P., Marzec A., Ranachowski Z. Acoustic properties of crunchy products. 3 rd International Workshop on Water in Food. 29th – 30th March 2004. Lausanne, Switzerland, CD 2004.
20. Luyten H., Plijter J.J., Van Vliet T. Crispy/crunchy crusts of cellular solid foods: a literature review with discussion. *Journal of Texture Studies*, 2004, 35, 445–492.
21. Malecki I., Opilski A. Charakterystyka i klasyfikacja sygnałów EA. w: *Emisja Akustyczna. Źródła. Metody. Zastosowania.* (red. Malecki I., Ranachowski J.), Wyd. Biuro PASCAL, Warszawa 1994, 19-35.
22. Marzec A., Gondek E. Zależności pomiędzy wybranymi wyróżnikami tekstury krakersów oznaczonymi instrumentalnie i sensorycznie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, 2 (47) Suplement, 223-230.
23. Marzec A., Borowiec M., Lewicki P. Badanie tekstury pieczywa chrupkiego metodą emisji akustycznej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, 4 (45) Suplement, 75-85.

24. Meullenet J.F., Lyon B.G., Carpenter J.A., Lyon C.E. Relation between sensory and instrumental texture profile attributes. *Journal of Sensory Studies*, 1998, 13, 77–93.
25. Mohamed A.A.A., Jowitt R., Brennan J.G. Instrumental and sensory evaluation of crispness: I- in friable foods. *Journal of Food Engineering*, 1982, 1, 55-75.
26. Moskowitz H.R., Krieger B. The contribution of sensory liking to overall liking: n analysis of six food categories. *Food Quality and Preference*, 1995, 6, 83-90.
27. Moskowitz H.R., Kapsalis J.G. Psychophysical relations intexture. Paper presented at the Symposium on Advances in Food Texture, August 28–30 1974. Guelph, Ontario.
28. Pangborn R.M. Lundgren B. Salivary secretion in response to mastication of crisp bread. *Journal of Texture Studies*, 1977, 8, 463–472.
29. Peleg M. Mechanical properties of dry brittle cereal products w: The properties of water in foods ISOPOW 6. (red. David S. Reid). Blackie Academic & Professional, London 1998, 233-253.
30. Rajewska K. Doświadczalna analiza destrukcji materiału suszonego w: Problemy deformacji i destrukcji materiałów suszonych. (Praca zb. pod red. S.J. Kowalskiego), Wyd. Politechniki Poznańskiej, Poznań 2000, 129-150.
31. Ranachowski Z. Emisja akustyczna w badaniach żywności w: Jakość i bezpieczeństwo żywności. Wyd. SGGW, Warszawa 2008,135-160.
32. Roudaut G., Dacremont C., Le Meste M. Influence of water on the crispness of cereal –based foods: acoustic, mechanical, and sensory studies. *Journal of Texture Studies*, 1998, 29, 199 – 213.
33. Seymour, S.K., Hamann, D.D. Crispness and crunchiness of selected low moisture foods. *Journal of Texture Studies*, 1988, 19, 79 –95
34. Sherman P. A texture profile of foodstuffs based upon well-defined rheological properties. *Journal of Food Science*, 1969, 34 (458), 4-62.
35. Stasiak M., Molenda M., Lipiński M.J. Możliwość zastosowania pomiaru prędkości fal akustycznych do wyznaczania parametrów sprężystości materiałów sypkich. *Acta Scientiarum Polonorum, Technica Agraria*, 2002, 1(2), 89-93.
36. Surówka K. Tekstura żywności i metody jej badania. *Przemysł Spożywczy*, 2000, 10, 12-17.
37. Szcześniak A. Classification of textural characteristics. *Journal of Food Science*, 1963, 28, 385-389.
38. Szcześniak A. The meaning of textural characteristics. *Journal of Texture Studies*, 1988, 19, 51–59.

39. Tesch R., Normand M., Peleg M. Comparison of the acoustic and mechanical signatures of two cellular crunchy cereals at various water activity level. *Journal of Food and Agricultural Sciences*, 1996, 70, 347 – 354.
40. Vickers Z. M. Sound perception and food quality. *Journal of Food Quality*, 1991, 14, 87-96.
41. Vickers, Z.M., Bourne, M.C. A Psychoacoustical Theory of Crispness. *Journal of Food Science*, 1976, 41, 1158 –1164.
42. Wilkinson C., Dijksterhuis G.B., Minekus M. From food structure to texture. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11, 442–450.
43. Zampini M., Spence C. The role of auditory cues in modulating the perceived crispness and staleness of potato chips. *Journal of Sensory Studies*, 2003, 19, 347 – 363
44. Zdunek A., Konstankiewicz K. Acoustic emission as a method for the detection of fractures in the plant tissue caused by the external forces. *International Agrophysics*, 1997, 11, 223 – 227.
45. Zdunek A., Ranachowski Z. Acoustic emission in puncture test of apples during shelf-life. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2006, 9(4).

Rozdział 5

¹Marta Liszka-Skoczylas, ¹Urszula Goik, ¹Daniel Żmudziński, ²Lukasz Skoczylas

¹Katedra Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego,

²Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów

Wydział Technologii Żywności,

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kierownik ¹katedry: prof. dr hab. inż. Mirosław Grzesik

Kierownik ²katedry: dr hab. inż. Piotr Gębczyński, prof. UR

OLEJ ARGANOWY – WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE

Streszczenie

W ciągu ostatnich lat spożycie olejów roślinnych, zwłaszcza tych tłoczonych na zimno, wzrasta. Do olejów roślinnych najbogatszych w cenne składniki o właściwościach prozdrowotnych zaliczyć można m.in. olej arganowy. Olej ten jest cennym źródłem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach oraz związków polifenolowych. Wysoka wartości odżywcza, intensywny zapach, wyrazisty smak oleju arganowego spowodowały, że ludzie na całym świecie coraz częściej sięgają po niego w kuchni. Ponadto olej ten zaliczany jest do żywności funkcjonalnej. Ze względu na swój skład i dobre wchłanianie, szeroko stosowany jest w kosmetyce i kosmetologii. Właściwości prozdrowotne, takie jak: działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, czy przeciw cukrzycowe oleju arganowego powodują, że produkt ten coraz częściej stosowany jest w profilaktyce, a nawet leczeniu chorób cywilizacyjnych.

Słowa kluczowe: olej arganowy, niezbędnie nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT), tokoferole, polifenole

Wprowadzenie

Od lat obserwuje się coraz większą świadomość konsumentów w zakresie prowadzenia zdrowego trybu życia, w szczególności w odżywianiu się. Prowadzi to do wykorzystywania w przemyśle spożywczym coraz to bardziej egzotycznych surowców jak i do projektowania i tworzenia nowych produktów spożywczych atrakcyjnych pod względem wartości odżywczych.

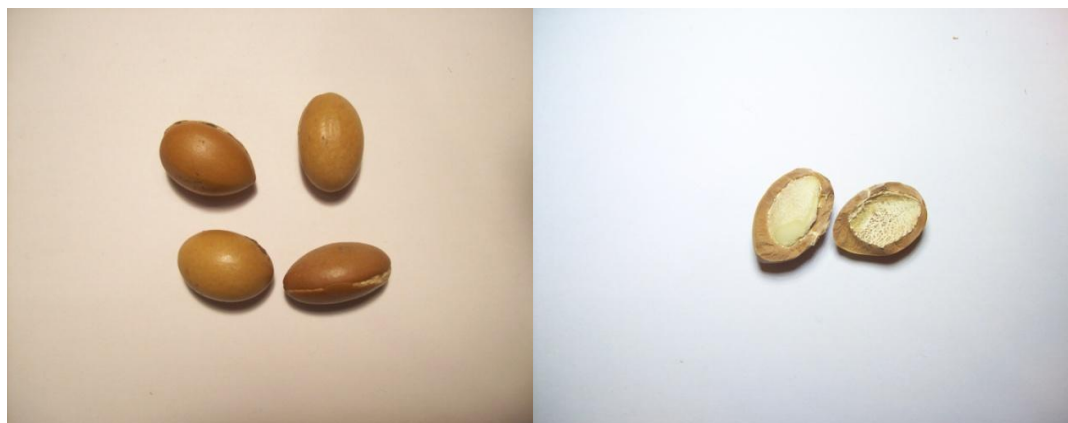
Surowce roślinne od zawsze towarzyszyły człowiekowi jako pożywienie, źródło cennych oraz ważnych związków potrzebnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Nasiona, owoce, kielki niektórych gatunków roślin stanowią podstawowy surowiec olejów roślinnych. Oleje od dawna wykorzystywane są w przemyśle spożywczym. Niektóre z nich stosowane są do smażenia, inne jako dodatek do sałatek czy surówek. Oleje wzbogacają smak przygotowanych potraw, a dzięki bogatej gamie zawartych w nich składników posiadają cenne właściwości prozdrowotne. Do najpopularniejszych olejów roślinnych stosowanych na co dzień przez konsumentów zaliczyć należy olej rzepakowy i słonecznikowy. Jednak od wielu lat można zaobserwować wzrost zainteresowania olejami dziewiczymi, które posiadają taki sam skład, jaki znajduje się w nasionach roślin oleistych, a otrzymuje się je za pomocą tłoczenia na zimno. To właśnie te oleje są najcenniejsze pod względem wartości odżywczej i jakości. Stanowią nie tylko bogate źródło niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) omega-3 i omega-6 ale również witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Ponadto, dzięki obecności zawartych w nich związków antyoksydacyjnych, takich jak: polifenole, tokoferole czy karotenoidy zapobiegają procesom starzenia [Lamer-Zarawska i in., 2012].

Pod względem żywieniowym oleje roślinne, które posiadają w swoim składzie istotne polienowe kwasy tłuszczowe z rodziny ω -3, stanowią ważną grupę produktów tłuszczowych, wykorzystywanych w profilaktyce chorób cywilizacyjnych m.in. do walki z nadciśnieniem [Domagała i in., 2014].

Do olejów roślinnych najbogatszych w cenne składniki odżywcze o właściwościach prozdrowotnych zaliczyć można m.in. olej arganowy. Od wieków olej ten używany jest jako tradycyjny składnik kuchni marokańskiej. W kuchniach całego świata początkowo stosowany był jako dodatek egzotyczny. Z czasem zdobył uznanie i stał się cenionym i wzbogacającym smak, ale również wartości odżywcze, składnikiem wielu potraw. Ogromną popularność zdobył jednak nie jako składnik kulinarny, ale jako kosmetyk. Wzrost zainteresowania olejkami arganowymi, ze względu na jego skład chemiczny i związane z nim właściwości prozdrowotne, odnotowano także w farmacji i medycynie. Pamiętać należy jednak, że olej arganowy kulinarny różni się od kosmetycznego sposobem produkcji, co ma znaczny wpływ na jego aromat, smak i właściwości.

Otrzymywanie oleju arganowego

Olej arganowy otrzymywany jest z nasion drzewa arganowego Drzewo arganowe, argania żelazna, olejara żelazna (*Argania spinosa* (L) skeels), to roślina tropikalna występująca endemicznie w południowo-zachodnim Maroku i Algierii, gdzie jej owoce i liście są zjadane przez bydło. Drzewa arganowe żyją nawet do 200 lat na suchych i słabych glebach. Posiadają gęsto rozrośniętą sieć korzeni dzięki czemu mogą czerpać wodę nawet z głębokości ~30 m. Ze względu na korzyści jakie daje i zapewnia mieszkańcom zostało nazwane drzewem życia. W 1998 roku UNESCO wpisało lasy arganowe na listę rezerwatów chronionej biosfery [Clarius i in., 2006]. Argania żelazna owocuje dając mięsiste, zielono-żółte owoce, które w trakcie dojrzewania brązowieją. Przybierają kształt jajowaty, nieco przypominający wielkie oliwki. Owoce (długość 2-4 cm i szerokość 1,5-3 cm) zawierają do trzech nasion (rys.1).



Rys. 1 . Owoce drzewa arganowego [archiwum własne].

Olej arganowy otrzymywany tradycyjnie jest wyłaczany wyłącznie ręcznie [Charrouf i in., 2002; Charrouf i Guillaume, 2008]. Po zbiorze dojrzałych owoców, skórki i pulpy są odrzucane, dając jajowate nasiona (orzechy) arganu. Orzechy są ręcznie uszkodzane, jądra ich zbierane i prażone w ciągu kilku minut na glinianych płytkach. Wyprażone ziarna są kruszone oraz mielone na żarnach. Tak otrzymane brązowe ciasto jest mieszane z dodatkiem ciepłej wody. Mokra ciasto po ręcznym wyciśnięciu została się uwalniająca brązową emulsję, którą dekantuje się po upływie kilku minut otrzymując olej arganowy. Jest to tak zwana ekstrakcja ręczna. Tradycyjnie przygotowany olej arganowy posiada wiele wad, co definitywnie wyklucza go ze sprzedaży na większą skalę. Związane jest to głównie ze złą jakością mikrobiologiczną

wody, która jest dodawana w trakcie otrzymywania oleju. Olej otrzymany w złych warunkach sanitarnych posiada krótki czas przechowywania (do kilku tygodni). Olej wytworzony tradycyjnie, ale zgodnie z regułami sanitarnymi można przechowywać 1 rok [Charrouf i Guillaume, 2008].

Na szerszą skalę olej arganowy otrzymuje się pół-automatyczną metodą ekstrakcyjną na zimno. W ten sposób otrzymuje się olej najwyższej jakości. W metodzie tej olej ekstrahuje się na zimno za pomocą pras mechanicznych, co powoduje brak konieczności ręcznego wyrabiania ciasta i dodawania wody. Jednocześnie zastosowanie prasy zwiększa wydajność procesu tłoczenia, a placek filtracyjny zawiera mniej niż 10% oleju. Całkowity czas potrzebny do przygotowania 1 litra oleju został zredukowany o 1/5 w stosunku do metody tradycyjnej, poprzez znaczne skrócenie najbardziej uciążliwych etapów wytwarzania [Charrouf i Guillaume, 2008].

Na skalę przemysłową olej arganowy ekstrahuje się chemicznie. Do zmielonej maszynowo masy z nasion arganii dodawane są rozpuszczalniki chemiczne, które umożliwiają szybkie i skuteczne wypłukanie oleju. Po odparowaniu rozpuszczalnika bezpośrednio otrzymuje się olej arganowy. Ten sposób ekstrakcji jest najtańszy i najbardziej wydajny, ale wytworzony olej ma niższą zawartość bioaktywnych składników. Metodę tę wykorzystuje się tylko do otrzymania oleju arganowego kosmetycznego [Matthäus i in., 2010].

Najwartościowszy olej arganowy posiada jasnożółtą lub lekko rudawą barwę o delikatnym zapachu. Wyłaczany jest na zimno w sposób mechaniczny. Olej ten jest cennym surowcem spożywczym, farmaceutycznym oraz kosmetycznym o wielu walorach smakowych i właściwościach leczniczych [Matthäus i in., 2010].

Ze względu na to, że proces produkcji oleju arganowego jest procesem żmudnym i długotrwałym, a roślina z której jest wytwarzany jest gatunkiem endemicznym, ceny tego oleju są jednymi z najwyższych ze wszystkich olejów roślinnych.

Skład chemiczny oleju arganowego

Olej arganowy jest bogatym źródłem bardzo wielu cennych składników prozdrowotnych, mających wpływ na zdrowie człowieka. W tabeli 1 przedstawiono skład chemiczny oleju arganowego podawany przez różne źródła [Cabrera-Vique i in., 2012; Cherki i in., 2006; Khallouki i in., 2003; Yousfi i in., 2009].

Głównymi składnikami oleju są przede wszystkim nienasycone kwasy tłuszczowe, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu (Niezbędne Nienasycone Kwasy Tłuszczowe NNKT). NNKT, często nazywane witaminą F, wyróżniają się wyjątkowo dobrą wchłanianością i właściwościami przeciwalergicznymi.

Związki te nie są syntetyzowane przez organizm człowieka. Należą do tzw. egzogennych składników odżywczych, dostarczanych do organizmu z zewnątrz – najczęściej z pożywieniem [Kromhout, 1992].

Tabela 1. Skład chemiczny oleju arganowego.

Związek chemiczny	[Yousfi i in., 2009]	[Cabrera-Vique i in., 2012]	[Cherki i in., 2006]	[Khallouki i in., 2003]
Jednonienasycone kwasy tłuszczowe [%]	45,0 - 47,7	43,0 - 49,1	43 – 49	44,8
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe [%]	29,7 - 35,0	29,3 - 36,0	29 – 36	35,8
Nasycone kwasy tłuszczowe [%]	20,0	15,8 - 22,2	15 – 22	18,5
Związki fenolowe [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	3,3	56	-	3269
Sterole [mg/100g]	295	-	295	295
Tokoferole [mg/kg]	637	600 - 700	637	637

Do najważniejszych nienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie człowieka zaliczyć należy kwas α -linolenowy i kwas linolowy, które stanowią powinny 1/3 dziennego zapotrzebowania na tłuszcz, przy odpowiednim stosunku ω -3 do ω -6 jak od 5:1 do 3:1 [Kolanowski i Świdorski, 1997]. Zbyt duże spożywanie kwasów ω -6 zaburza metabolizm kwasów ω -3 i nie jest korzystne dla fizjologicznej równowagi związków, które są syntetyzowane z tych kwasów [Newton, 1996].

Dostarczenie do organizmu NNKT, szczególnie ważne jest w żywieniu dzieci i młodzieży, ponieważ składniki te potrzebne są do ich prawidłowego rozwoju umysłowego [Kłosiewicz-Latoszek, 2002]. Redukcja spożycia kwasów tłuszczowych nasyconych na korzyść wielonienasyconych jest dobrą metodą obniżenia poziomu cholesterolu we krwi i występowania chorób sercowo-naczyniowych oraz wielu rodzajów raka i alergii [Connor, 2000]. Poniżej w tabeli 2 zestawiono kwasy tłuszczowe występujące w oleju arganowym.

Tabela 2. Kwasy tłuszczowe występujące w oleju arganowym.

Wyższe kwasy tłuszczowe		% [Charrouf i in., 2014; Hilali i in., 2005]	% [Gharby i in., 2013]
Nienasycone kwasy tłuszczowe	Kwas palmitooleinowy	≤ 0,2	0,1±0,1
	Kwas oleinowy	43,0–49,1	44,7±0,1
	Kwas gadoleinowy	≤ 0,5	-
	Kwas linolowy	29,3–36,0	35,1±0,1
	Kwas linolenowy	≤ 0,3	0,1±0,1
Nasycone kwasy tłuszczowe	Kwas mirystynowy	≤ 0,2	0,1±0,1
	Kwas palmitynowy	11,5–15,0	14±0,1
	Kwas stearynowy	4,3–7,2	5,1±0,1
	Kwas arachidowy	≤ 0,5	-
	Kwas behenowy	≤ 0,2	-

Cennym składnikiem oleju arganowego jest witamina E. Witamina ta, to grupa lipofilnych organicznych związków chemicznych, do której należą m.in. tokoferole [Kumirska i in., 2010]. Poniżej w tabeli 3 przedstawiono zawartość tokoferoli w oleju arganowym.

Tabela 3. Zawartość tokoferoli w oleju arganowym.

Tokoferol	(mg/kg oleju) [Cherki i in., 2006; Khallouki i in., 2003]	(mg/kg oleju) [Yousfi i in., 2009*]	(mg/kg oleju) [Gharby i in., 2013]
α - tokoferol	35	325	58,6
β - tokoferol	122	2,86	6,07
(γ+δ) tokoferol	480	700	580
Razem	637	1027,86	674,8

*dane dotyczą oleju arganowego z Algierii w przeciwieństwie do pozostałych pochodzących z Maroka

Tokoferole to naturalne antyoksydanty, których obecność w olejach roślinnych jest często skorelowana z dużą ilością nienasyconych kwasów tłuszczowych. Aktywność

tokoferoli w organizmie człowieka sprowadza się głównie do aktywności witaminowej jako witaminy E oraz aktywności przeciwutleniającej. Ich funkcja biochemiczna polega na ochronie polienowych kwasów tłuszczowych. Tokoferole osiągają efekt przeciwutleniający poprzez szereg różnych biochemicznych i biofizycznych mechanizmów, takich jak: zmiatanie wolnych rodników, wygaszanie reaktywnych form tlenu oraz przerwanie reakcji łańcuchowej autooksydacji lipidów. Witamina E uważana jest za witaminę płodności, bowiem stymuluje ona prawidłowy rozwój narządów rozrodczych [Kołodziejczyk, 2004]. Ponadto u dzieci stwierdzono pozytywny jej wpływ na wytwarzanie czerwonych krwinek w przypadku anemii.

Olej arganowy stanowi bogate źródło fitosteroli, posiadających właściwości prozdrowotne. Zwiększenie spożycia steroli roślinnych to skuteczny sposób na ograniczenie redukcji hipercholesterolemii, w wyniku zmniejszenia stężenia cholesterolu we krwi, ograniczając tym samym choroby układu sercowo-naczyniowego. Poniżej w tabeli 4 zestawiono sterole roślinne występujące w oleju arganowym.

Tabela 4. Skład steroli występujących w oleju arganowym.

Sterole roślinne	% [Gaharby i in., 2015]	% [Charrouf i Guillaume, 2008]
Schottenol	46±2	44,0-49
Spinasterol	40±2	34,0-44
Stigma-8,22-dien-3-beta-ol	5±2	3,2-5,7

Bardzo istotnym składnikiem oleju arganowego są związki polifenolowe. Do związków tych zaliczamy: flawonoidy (flawonole, flawony, izoflawony, flawanony, antocyjany, flawanole, chalkony i inne), kwasy fenolowe (pochodne kwasu benzoowego, pochodne kwasu cynamonowego), alkohole fenolowe, stilbeny i lignany. Polifenole roślinne znane są z ich właściwości prozdrowotnych. Należą do antyoksydantów, które wspólnie z kwasem askorbinowym, karotenoidami i tokoferolami chronią organizm ludzki przed reaktywnymi formami tlenu. Związki polifenolowe posiadają również właściwości przeciwzapalne, przeciwniażdżycowe, przeciwalergiczne oraz antymutagenne [Ellis i in., 2011]. Dzięki wielokierunkowemu działaniu polifenole mogą być wykorzystywane jako substancje wspomagające utrzymanie dobrej kondycji organizmu, w tym również skóry, przeciwdziałające wielu chorobom oraz wspomagające w ich leczeniu [Paszkiwicz i in., 2012].

Związki polifenolowe obecne są przede wszystkim w olejach tłoczonych na zimno. W taki sposób pozyskuje się właśnie olej arganowy najwyższej jakości.

Poniżej w tabeli 5 zamieszczono wybrane związki fenolowe znajdujące się w oleju arganowym.

Tabela 5. Związków fenolowe występujące w oleju arganowym.

Komponenty fenolowe	(µg/kg oleju), [Cherki i in., 2006; Khallouki i in., 2003]
Kwas wanilinowy	67±3
Kwas syringowy	37±5
Kwas ferulowy	3147±20
Tyrozol	12±1

Zastosowanie oleju arganowego

Wysoka wartości odżywcza, intensywny, orzechowy zapach, unikatowy, wyrazisty smak i właściwości fizyczne oleju arganowego spowodowały, że ludzie na całym świecie coraz częściej sięgają po niego w swojej kuchni. W przemyśle spożywczym olej arganowy może być stosowany jako zamiennik innych olejów. W pracy Yaghmur i in. [2001] badano jego stabilność i porównywano do stabilności otrzymanej w przypadku oliwy z oliwek i oleju bawełnianego podczas smażenia w głębokim tłuszczu. Stwierdzono, że posiada on podobną charakterystykę jakościową z oliwą i olejem bawełnianym oraz rozszerzoną stabilność podczas smażenia, co prowadzi do zwiększenia okresu trwałości przygotowywanych produktów. Autorzy innej pracy [Peev i in., 2013] badali stabilność oksydacyjną olejów arganowych przygotowanych z ziaren prażonych w temperaturze 110°C w czasie od 15 do 45 min., które następnie oceniano i porównywano z olejem arganowym kosmetycznym. Kolor i zawartość fosforu były zróżnicowane podczas prażenia, ale zawartości kwasów tłuszczowych i tokoferoli pozostały stabilne. W celu zachowania wartości odżywczych, organoleptycznych i właściwości fizykochemicznych badanego oleju czas prażenia ziaren arganu do 30 minut okazał się optymalny. Dłuższe prażenie ziaren (30 - 45 min.) powodowało otrzymanie oleju o wyczuwalnym spalonym smaku.

Olej arganowy swoje zainteresowanie i ogromną popularność zdobył jednak nie w przemyśle spożywczym a kosmetycznym. Ze względu na swoje właściwości natłuszczające, zmiękczejące, wygładzające i ochronne zaliczany jest do grupy emolientów. NNKT zawarte w oleju mają zdolność wbudowywania się w elementy tłuszczowe błon komórkowych oraz regenerują uszkodzoną barierę lipidową naskórka, przez co ograniczają utratę wody. NNKT mają również duże znaczenie w leczeniu wielu dermatoz [Silny, 2012]. Olej arganowy pełni rolę podłoża do kremów, mleczek

kosmetycznych itp. produktów. W kosmeceutykach wykorzystywany jest jako baza jak i związek biologicznie czynny.

Od niedawna poświęca się wiele uwagi, potencjalnym korzyściom zdrowotnym wynikającym ze spożywania oleju arganowego w odniesieniu do chorób cywilizacyjnych. Potencjał leczniczy oleju tkwi w różnorodności i ilości substancji aktywnych, które zawiera on w swoim składzie. Praca Berrougui i in. [2003] wskazuje na wpływ diety z olejem arganowym na zawartość lipidów w surowicy krwi. Wyniki otrzymane przez autorów wskazują na korzystne jego działanie w leczeniu zaburzeń lipidowych (dyslipidemia). Również wyniki zamieszczone w innej pracy [Ould Mohamedou i in., 2012] potwierdzają korzystny wpływ oleju arganowego na stężenie cholesterolu w krwi i postulują jego wykorzystanie w profilaktyce żywieniowej u chorych na dyslipidemię. Z kolei w pracy Mekhfi i in. [2012] badano działanie przeciwzakrzepowe oleju arganowego. Otrzymując pozytywne wyniki swoich prac, autorzy stwierdzili, iż olej ten można uznać za nowy, naturalny suplement w profilaktyce zaburzeń sercowo-naczyniowych. Spożywanie oleju arganowego wpływa dodatkowo na obniżenie ciśnienia krwi oraz zwiększa aktywność antyoksydacyjną organizmu [Cherki i in., 2006].

Literatura naukowa dowodzi, że olej arganowy można z powodzeniem stosować przy leczeniu chorób o wieloczynnikowym podłożu. Jedną z tych chorób jest otyłość [Adlouni i in., 2008]. Od lat trwają również badania nad zmniejszeniem ryzyka zachorowań na raka prostaty. γ -tokoferol to związek, który istotnie przeciwdziała wystąpieniu tej choroby nowotworowej, a którego wyjątkowo dużo jest w oleju arganowym [Wright, 2007].

Wiele innych badań, wykorzystujących zarówno modele ludzkie jak i zwierzęce, wykazało, że olej arganowy posiada szeroki zakres właściwości prozdrowotnych. Oprócz tych wymienionych powyżej, zaliczyć do nich można: przeciwdziałanie proliferacji błon, działanie przeciwzapalne, przeciwalergiczne czy przeciwcukrzycowe [Cherki i in., 2006]. Ta aktywność prozdrowotna oleju arganowego coraz częściej wykorzystywana jest w farmacji. W pracy Xi i in. [2013] badano mikrokapsułki z olejem arganowym, które zapewniają skuteczną metodę ochrony składników aktywnych w nich zawartych.

Podsumowanie

W pracy omówiono skład chemiczny, właściwości prozdrowotne i zastosowanie oleju arganowego w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym oraz medycynie. Najlepszej jakości olej arganowy pozyskiwany jest z nasion drzewa arganowego metodą tłoczenia na zimno. Olej ten jest olejem jadalnym i leczniczym. Zawiera on wiele cennych związków mających wpływ na organizm człowieka, takich

jak: kwasy tłuszczowe, w tym niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe NNKT, tokoferole, związki fenolowe oraz fitosterole. Dzięki obecności zawartych w nim tokoferoli i polifenoli o działaniu antyoksydacyjnym, olej ten stymuluje procesy oddychania wewnątrzkomórkowego, neutralizuje wolne rodniki oraz chroni organizm przed szkodliwym działaniem promieniowania UV. Przy podaniu doustnym posiada działanie regenerujące nabłonek w przewodzie pokarmowym, obniżające poziom triglicerydów i cholesterolu we krwi, przez co charakteryzuje się działaniem przeciwmiażdżycowym, antyzakrzepowym, przeciwzatorowym, obniża podwyższone ciśnienie tętnicze i działa antyoksydacyjne.

Literatura

1. Adlouni A., Christon R., Cherki M., Khalil A., El Messal M. The nutritional benefits of argan oil in obesity risk prevention. *Atherosclerosis Supplements*, 2008, 9, 137–138.
2. Berrougui H., Ettaib A., Herrera Gonzalez M.D., Alvarez de Sotomayor M., Bennani-Kabchi N., Hmamouchi M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 89, 15-18.
3. Cabrera-Vique C., Marfil R., Giménez R., Martínez-Augustin O. Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil - an edible oil with potential as a functional food. *Nutrition Reviews*, 2012, 70(5), 266-279.
4. Charrouf Z., Guillaume D. Argan oil, the 35-years-of-research product. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, 116(10), 1316-1321.
5. Charrouf Z., Guillaume D. Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2008, 110, 632-636.
6. Charrouf Z., Guillaume D., Driouich A. The argan tree, an asset for Morocco (in French). *Biofutur.*, 2002, 220, 54-57.
7. Cherki M., Berrougui H., Drissi A., Adlouni A., Khalil A. Argan oil: Which benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacological Research*, 2006, 54, 1-5.
8. Clarius T., Stussi I., Henry F., Pauly G. *Argania Spinosa*: Jak uprawa ekologiczna, zrównoważony handel i stały rozwój mogą stymulować badania nad nowymi składnikami aktywnymi kosmetyków. *Wiadomości PTK*, 2006, 9, 3-4.
9. Connor W.E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71, 171.

10. Domagała P., Żuralska R., Mziray M. The role of essential unsaturated fatty acids and their significance in selected diseases. *Theoretical papers*, 2014, 1(46), 27-30
11. Ellis L.Z., Liu W., Luo Y., Okamoto M., Qu D., Dunn J.H., Fujita M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL-1b secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 414, 551-556.
12. Gaharby S., Harhar H., Bouzoubaa Z., Elmadani N., Charrouf Z. The Effect of Storage Conditions and Roasting Kernels on Extra Virgin Argan Oil Quality. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2015, 6(1), 254-263.
13. Hilali M., Charrouf Z., Aziz Soulhi A. El, Hachimi L., Guillaume D. Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 2081–2087.
14. Khallouki F., Younos C., Soulimani R., Oster T., Charrouf Z., Spiegelhalter B., Bartsch H., Owen RW. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention*, 2003, 12(1), 67-75.
15. Kłosiewicz-Latoszek L. Znaczenie kwasów tłuszczowych omega-3 w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, 2002, 29(1/2), 78-87.
16. Kolanowski W., Świdorski F. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe z grupy n-3 (n-3 PUFA). Korzystne działanie zdrowotne, zalecenie spożycia, wzbogacanie żywności. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, 1997, 2, 49-63.
17. Kołodziejczyk A. *Naturalne związki organiczne*. PWN, Warszawa 2004.
18. Kromhout D. Dietary fats: long term implication for health. *Nutrition Reviews*, 1992, 4(II), 49.
19. Kumirska J., Gołębiowski M., Paszkiewicz M., Bychowska A. *Analiza żywności*, Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.
20. Lamer-Zarawska E., Chwała C., Gwardys A. *Rośliny w kosmetyce i kosmetologii przeciwstarzeniowej*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012.
21. Matthäus B, Guillaume D, Gharby S, et al. Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chemistry*, 2010, 120, 426-432.
22. Mekhfi H., Belmekki F., Ziyat A., Legssyer A., Bnouham M., Aziz M. Antithrombotic activity of argan oil: An in vivo experimental study. *Nutrition*, 2012, 28, 937-941.
23. Newton J.S. Long chain fatty acids in health and nutrition. *Journal of Food Lipids*, 1996, 31(3), 233-249.

24. Ould Mohamedou M.M., Tacha A., El Messal M., El Kebbjaj M.S., Chraibi A., Adlouni A. The consumption of argan oil induces a lipid-lowering effect in dyslipidemic patients. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 5, 143-147.
25. Paszkiewicz M., Budzyńska A., Różalska B., Sadowska B. The immunomodulatory role of plant polyphenols. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2012, 66, 637-646.
26. Peev C., Avram S., Pop G., Marius C., Cătălin D., Dehelean C., Danciu C. Study of the applicability of vegetable oils in phytocosmetology. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2013, 19(3), 344-347.
27. Silny W. [red] *Atopowe zapalenie skóry*. Termedia, Poznań 2012.
28. Wright M.E., Weinstein S.J., Lawson K.A., Albanes D., Subar A.F., Dixon L.B., Mouw T., Schatzkin A., Leitzmann M.F. Supplemental and dietary vitamin E intakes and risk of prostate cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2007, 16(6), 1128-1135.
29. Yagmur A., Aserin A., Mizrahi Y., Nerd A., Garti N. Evaluation of Argan Oil for Deep-Fat Frying. *LWT - Food Science and Technology*, 2001, 34, 124-130.
28. Xi Z., Dong-sheng Y., Xiao-li W., Li-yan W., Yuan-bao J., Cheng-guo Z. Thermal stability study and microcapsule preparation of argan oil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2013, 5(11), 244-249.
29. Yousfi M., Bombarda I., Hamia Ch., Djeridane A., Stocker P., Gaydou E. Fatty acid, triglyceride and tocopherol composition of Algerian Argan (*Argania spinosa*) fruit seed lipids. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 2009, 2, 197-203.

Rozdział 6

Małgorzata Panek

*Katedra Biotechnologii Żywności, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

*Kierownik katedry/promotor: prof. dr hab. inż. Krzysztof Żyła
Opiekun naukowy: dr Małgorzata Pierzchalska*

HODOWLE KOMÓRKOWE NABŁONKA JELITA W BADANIACH NAD FUNKCJONALNYMI WŁAŚCIWOŚCIAMI PROBIOTYKÓW

Streszczenie

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania wykorzystaniem żywności bogatej w bakterie probiotyczne w ramach promocji zdrowia oraz w zapobieganiu chorób poprzez przeciwdziałanie rozwojowi bakterii patogennych w przewodzie pokarmowym. Ciągłe poszukiwane są nowe, bardziej specyficzne szczepy bakterii probiotycznych, które mogłyby zostać wykorzystane do produkcji bądź suplementacji szerokiej gamy produktów spożywczych – od nabiału po preparaty dla niemowląt, żywność dla dzieci, produkty na bazie soków owocowych bądź ziaren zbóż. Wszystkie szczepy probiotyczne przed ich wprowadzeniem do produkcji żywności lub farmaceutyków muszą zostać przebadane pod kątem właściwości i bezpieczeństwa stosowania. Zastosowanie hodowli *in vitro* komórek nabłonka jelita jest jedną z metod pozwalających na wstępną ocenę właściwości probiotycznych mikroorganizmów. W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę najpopularniejszych hodowli komórek nabłonka jelitowego takich jak: hodowle narządowe, pierwotne hodowle komórek nabłonka jelitowego, ciągłe linie komórkowe (Caco-2, HT-29, IEC-18, 2/4/A1) czy trójwymiarowe hodowle komórek nabłonka jelitowego oraz zaprezentowano przykłady wykorzystania poszczególnych modeli w badaniach dotyczących bakterii probiotycznych.

Słowa kluczowe: bakterie probiotyczne, organoidy jelitowe, hodowla trójwymiarowa, mikroflora jelitowa

Wprowadzenie

W przewodzie pokarmowym człowieka w 1g treści występuje około 10^{12} różnych drobnoustrojów, określanych mianem mikroflory jelitowej. Obecne w jelitach

mikroorganizmy mają istotny wpływ na zdrowie gospodarza, chroniąc przed rozwojem potencjalnych patogenów i przyczyniając się do występowania odpowiedzi immunologicznej [Wasilewska i in., 2013; Dunne i in., 2001].

Stosowana dieta, wiek, stres czy też przebyte leczenie (np. przyjmowanie antybiotyków, radioterapia) mają zasadniczy wpływ na skład mikroflory jelitowej. Wraz z wiekiem wzrasta częstość występowania chorób, które mogą być wywoływane zaburzeniami lub niedoborami mikroflory jelitowej. Do schorzeń o takiej etiologii należą zakażenia przewodu pokarmowego (wywoływane m.in. przez *Clostridium difficile*, bakterie z rodzaju *Shigella* i *Campylobacter*, norowirusy, bakterie enterotoksyczne jak *Vibrio cholerae* oraz enterotoksyczny szczep *Escherichia coli* czy niektóre pierwotniaki zwłaszcza *Entamoeba histolytica* i *Giardia lamblia*), zaparcia, zespół jelita drażliwego, choroby zapalne jelit o podłożu autoimmunologicznym (w tym choroba Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego), alergię pokarmową, biegunki poantybiotykowe, a także niektóre rodzaje nowotworów. Nie bez znaczenia dla równowagi mikroflory jelitowej jest również obserwowany rozwój oporności drobnoustrojów patogennych, wynikający z nadużywania antybiotyków zarówno w leczeniu ludzi, jak i w hodowli zwierząt, których mięso przeznacza się do konsumpcji [Dunne i in., 2001]. Jedną z proponowanych strategii, która może przyczynić się do zwalczania wymienionych wyżej chorób przewodu pokarmowego jest wykorzystanie profilaktycznego oraz terapeutycznego potencjału bakterii probiotycznych [Daly i in., 1998; Bengmark i in., 1998].

Zgodnie z definicją zatwierdzoną przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) oraz Organizację Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) probiotyki są to żywe mikroorganizmy, które po podaniu/spożyciu w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza. Dodatkowo bakterie probiotyczne stosowane w żywności muszą być zdolne do przetrwania w przewodzie pokarmowym oraz proliferować w jelitach. Przed przeprowadzeniem badań efektywności klinicznej potencjalnego probiotyku z udziałem zwierząt lub ludzi, rekomendowane jest wykonanie testów w warunkach *in vitro* pozwalających na charakterystykę właściwości funkcjonalnych oraz ocenę bezpieczeństwa stosowania danego szczepu mikrobiologicznego [FAO/WHO Expert Consultation, 2001]. Hodowle komórek wywodzących się z nabłonka jelita pozwalają wstępnie ocenić efektywność i właściwości analizowanego szczepu bakterii przed rozpoczęciem badań *in vivo* na zwierzętach, a następnie badań klinicznych. Niektóre ze starych modeli nabłonka jelitowego mają wiele wad, dlatego też ciągle poszukiwane są nowe modele, które w jeszcze większym stopniu odzwierciedlałyby *in vitro* warunki panujące *in vivo*.

Hodowle komórek nabłonka jelitowego w warunkach *in vitro*

W połowie lat siedemdziesiątych XX wieku wzrosło zainteresowanie możliwością hodowli komórek nabłonka jelitowego w warunkach *in vitro* i podjęto próby opracowania pierwszych metod hodowli. Natomiast największy rozwój w tej dziedzinie nastąpił na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych.

Początkowo najprostszą metodę hodowli nabłonka jelita stanowiła hodowla narządowa. Po umieszczeniu w warunkach hodowli *in vitro* fragmentów jelita pobranych z płodów zwierzęcych, prawidłowa organizacja tkanki utrzymywana była przez około trzy tygodnie. Natomiast gorsze rezultaty uzyskiwano w przypadku hodowli wyprowadzanych z eksplantatów pobieranych od osobników dorosłych. Jednak hodowle narządowe ze względu na szybko postępującą nekrozę i degradację komórek nabłonka nie znalazły szerokiego zastosowania w badaniach [Chopra i in., 2010; Kaeffer, 2002; Quaroni, 1985].

Inne podejście opiera się na izolacji komórek nabłonka jelita za pomocą związków chelatujących czy też enzymów proteolitycznych i wyprowadzeniu hodowli pierwotnej lub linii komórkowej. Jedną z pierwszych hodowli normalnych enterocytów w warunkach *in vitro* opracowano w 1979 roku przy wykorzystaniu komórek pozyskanych z jelita cienkiego dorosłych szczurów [Quaroni i in., 1979]. Ciągłe linie komórkowe uzyskano poprzez transformację nowotworową prawidłowych komórek nabłonka jelita lub na drodze różnicowania komórek nowotworowych jelita grubego w komórki przypominające pod względem morfologicznym i fizjologicznym prawidłowe enterocyty. Należy jednak zaznaczyć, że zastosowanie w badaniach pierwotnych hodowli komórek nabłonka prowadzonych na podłożu stałym jest stosunkowo niewielkie, ponieważ taka hodowla jest zwykle krótkotrwała i nieefektywna, a jej założenie i utrzymanie wymaga przewyciężenia wielu trudności metodologicznych [Chopra i in., 2010; Kaeffer, 2002].

Znacznie częściej w badaniach *in vitro* wykorzystywane są ciągłe linie komórkowe. Najbardziej znanymi i najczęściej stosowanymi ciągłymi liniami komórkowymi nabłonka jelita są Caco-2, HT-29, IEC-18 czy 2/4/A1. Linia Caco-2 została wyprowadzona z gruczolakoraka jelita grubego siedemdziesięciodwu letniego mężczyzny rasy białej. Stanowi ona ustaloną linię i jest zdolna do wzrostu adherentnego zarówno na stałych powierzchniach, jak i mikroporowatych membranach. W trakcie hodowli, komórki ulegają spontanicznemu różnicowaniu, a po około 2-3 tygodniach tworzą spolaryzowaną monowarstwę, której enterocytopodobne komórki charakteryzują się obecnością rąbka szczoteczkowego, licznych mitochondriów oraz jądrem komórkowym zlokalizowanym przy podstawie komórki. Linia Caco-2 znalazła

zastosowanie przede wszystkim jako model enterocytów w badaniach dotyczących transportu błonowego, adhezji bakterii jelitowych oraz patogenności mikroorganizmów. Również z gruczolakoraka jelita grubego (czterdziestoletniej kobiety) została wyprowadzona linia komórkowa HT-29. Różni się ona jednak od Caco-2 zdolnością do wytwarzania dużej ilości śluzu jelitowego, wynikającej z obecności znacznej liczby komórek kubkowych oraz brakiem rąbka szczoteczkowego. Najczęściej stosowana jest w badaniach adhezji bakterii jelitowych do nabłonka jelita. Natomiast inna powszechnie stosowana w laboratoriach linia, IEC-18, została wyprowadzona z komórek krypt jelitowych szczura. Charakteryzuje się ona lepszą przepuszczalnością, mniejszym zagęszczeniem komórek w monowarstwie, a także mniejszym stopniem zróżnicowania komórek w porównaniu do Caco-2. Z kolei linia 2/4/A1 została wyprowadzona z komórek jelita pozyskanych ze szczurzego płodu. Zarówno IEC-18, jak i 2/4/A1 stosowane są jako modele jelita w badaniach żywieniowych i testach farmakologicznych dotyczących transportu pasywnego [Chopra i in., 2010; Grajek i in., 2006].

W ostatnich latach coraz częściej wykorzystywane są trójwymiarowe hodowle komórkowe (3D), które w przeciwieństwie do tradycyjnych hodowli dwuwymiarowych (2D), pozwalają na odzwierciedlenie wzajemnych przestrzennych interakcji pomiędzy komórkami oraz między komórkami a macierzą pozakomórkową. Właściwość ta ma szczególne znaczenie w przypadku hodowli komórek nabłonka jelita. Utrzymanie trójwymiarowej struktury pozwala odtworzyć proces różnicowania komórek wzdłuż osi krypta-kosmki. Jest to niemożliwe do osiągnięcia w warunkach hodowli komórek w postaci monowarstwy na podłożu płaskim. Uważa się, że dzięki temu hodowle 3D w większym stopniu odzwierciedlają warunki *in vivo*, co przekłada się na wiarygodność uzyskiwanych wyników [Rainaldi i in., 2016]. Skutkuje to opracowaniem różnych technik hodowli 3D – m.in. hodowli w kropli wiszącej, hodowli na podłożach nieadhezyjnych, hodowli rotacyjnych, hodowli z dodatkiem nanowłókien polimerowych oraz hodowli „na rusztowaniach” takich jak np. żele białkowe [Kitel i in., 2013].

W 1991 roku Olson i in. stworzyli trójwymiarowy model nabłonka jelita, umieszczając komórki linii IEC-6 (linia wyprowadzona z krypt jelitowych szczura) w żelu, w wyniku czego uzyskali cylindryczne, puste w środku struktury przypominające krypty jelitowe, zbudowane z pojedynczej warstwy przylegających do siebie, spolaryzowanych komórek z mikrokosmkami na powierzchni [Olson i in., 1991]. Również linie Caco-2 i HT-29 wykorzystano do opracowania trójwymiarowych modeli nabłonka jelitowego określanych mianem sferoidów, wykazujących cechy morfologiczne typowe dla nabłonka jelitowego i dość precyzyjnie odzwierciedlających przestrzenną

organizację komórek nabłonka obserwowaną *in vivo* [Doillon i in., 2004; Rainaldi i in., 2016].

Przełom w badaniach z wykorzystaniem hodowli komórek nabłonka jelitowego stanowiło opracowanie trójwymiarowych pierwotnych hodowli długoterminowych. Ootani i in. (2009) dzięki zastosowaniu rusztowania z żelu kolagenowego oraz stymulacji odpowiednimi czynnikami wzrostu, z materiału pobranego od noworodków myszy uzyskali model nabłonka jelita, w którym komórki zachowały zdolność zarówno do proliferacji, jak i różnicowania. W tym samym roku Sato i in. (2009) zaprezentowali model nabłonka jelita określane mianem organoidu. W modelu tym komórki macierzyste krypt jelitowych myszy zostały zawieszane w macierzy białkowej typu Matrigel i w obecności odpowiednich czynników formowały puste w środku sfery. Ściany uzyskanych organoidów tworzone są przez komórki nabłonka i posiadają struktury przypominające krypty oraz kosmki jelitowe. Zaprezentowanie pierwszych metod długoterminowej hodowli komórek nabłonka jelitowego przyczyniło się do pojawienia w krótkim czasie wielu nowych publikacji z zakresu hodowli *in vitro* komórek jelitowych [Gracz i in., 2010; Jung i in., 2011; Lahar i in., 2010]. Opracowano również trójwymiarowe modele nabłonka jelitowego wyprowadzone z komórek pozyskanych od ludzi. Jung i in. (2011) wykorzystali komórki krypt nabłonka okrężnicy do uzyskania pustych w środku sferoidów, które rozrastały się promieniście dzięki szybkiej proliferacji komórek. Inna metoda opierała się na ukierunkowaniu różnicowania ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych w stronę komórek budujących tkankę jelita, a po umieszczeniu tych komórek w macierzy białkowej i stymulacji czynnikami wzrostowymi uzyskiwano organoidy jelitowe [Spence i in., 2011].

Wykorzystanie hodowli komórkowych nabłonka jelita w badaniach właściwości probiotyków

Jedną z podstawowych właściwości bakterii jelitowych i pożądaną cechą bakterii probiotycznych jest zdolność adhezji do powierzchni nabłonka jelitowego, a w konsekwencji do kolonizacji jelita. U noworodków przewód pokarmowy jest jałowy, jednak szybko dochodzi do jego zasiedlenia przez bakterie pochodzące z pokarmu oraz środowiska. Jednym z pierwszych mikroorganizmów kolonizujących jelita jest *Escherichia coli* (*E. coli*), która przyczynia się do obniżenia potencjału redoks w jelicie i stworzenia korzystnych warunków do rozwoju pozostałych drobnoustrojów komensalnych. Natomiast najczęściej badaną bakterię probiotyczną stanowi *Lactobacillus acidophilus*. Zasadniczą rolę w procesie adhezji bakterii probiotycznych do powierzchni jelita odgrywa rozkład ładunków na jego powierzchni oraz obecność

w budowie śluzu pokrywającego nabłonek specyficznych komponentów (między innymi węglowodanów i białek). Ze względu na ograniczone możliwości analizy adhezji bakterii jelitowych do powierzchni nabłonka jelitowego w warunkach *in vivo*, hodowle komórkowe nabłonka jelitowego *in vitro* znalazły zastosowanie w badaniach zależności pomiędzy składnikami pokarmowymi oraz drobnoustrojami a powierzchnią jelita [Grajek i in., 2004].

Najczęściej wykorzystywane w badaniach nad adhezją bakterii probiotycznych są linie komórkowe Caco-2 oraz HT-29. Dodatkowo linia HT-29, a w szczególności jej podtyp HT-29 MTX jest zdolna do produkcji dużej ilości mucyn tworzących warstwę śluzu na powierzchni enterocytów, która również odgrywa rolę w kontakcie z drobnoustrojami. Ze względu na różnice w fenotypie komórek poszczególnych linii, bakterie wykazują różny stopień adhezji w zależności od użytego modelu – wyniki badań sugerują przeważnie wyższą adhezję bakterii jelitowych do komórek linii HT-29 MTX w porównaniu do Caco-2 i HT-29, niezależnie od tego jaki gatunek i szczep jest badany [Ouweland i in., 2003]. Dodatkowo stopień adhezji bakterii do nabłonka jelitowego może być także związany z rozmieszczeniem odpowiednich receptorów na powierzchni enterocytów. W badaniach *in vitro* wykazano właściwości adhezyjne bakterii *Lactobacillus bulgaricus ssp. Cremoris*, chociaż szczep ten słabo kolonizuje jelita, jednak z drugiej strony udowodniono również silną adhezję do enterocytów bakterii szczepu *Lactobacillus GG*, *L. johnsonii* LJ1, *L. bulgaricus* czy *L. Lactis ssp. Cremoris*. Wysokie zdolności adhezyjne niektórych bakterii bezpośrednio do enterocytów wskazują, że bakterie te produkują białka adhezyjne o powinowactwie do receptorów zlokalizowanych na enterocytach. Wysokie zdolności adhezyjne do nabłonka jelitowego wykazują przede wszystkim bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus*. Tuomola i in. (1998) analizowali adhezję różnych szczepów probiotycznych należących do rodzaju *Lactobacillus* przy wykorzystaniu linii Caco-2. Największe zdolności adhezyjne wykazywały szczepy *L. casei*, *L. acidophilus* 1, *L. rhamnosus* LC-705 i *Lactobacillus GG*, natomiast najmniejszy stopień przyczepności obserwowano w przypadku *L. casei var. Rhamnosus*. Prowadząc badania z wykorzystaniem hodowli *in vitro* należy pamiętać, że również wpływ środowiska w znacznym stopniu oddziałuje na zdolności adhezyjne bakterii do nabłonka jelitowego. Wykorzystywanie w badaniach różnych linii komórkowych, podłoży hodowlanych, buforów oraz bakterii w różnych fazach wzrostu, skutkuje dużą różnorodnością uzyskiwanych wyników i utrudnia sformułowanie ogólnych konkluzji [Grajek i in., 2006].

Kolejną istotną cechą bakterii probiotycznych jest zdolność do zapobiegania rozwojowi mikroflory patogennej. W badaniach z wykorzystaniem linii Caco-2 lub HT-29 wykazano, że bakterie probiotyczne skutecznie ograniczały wzrost i hamowały

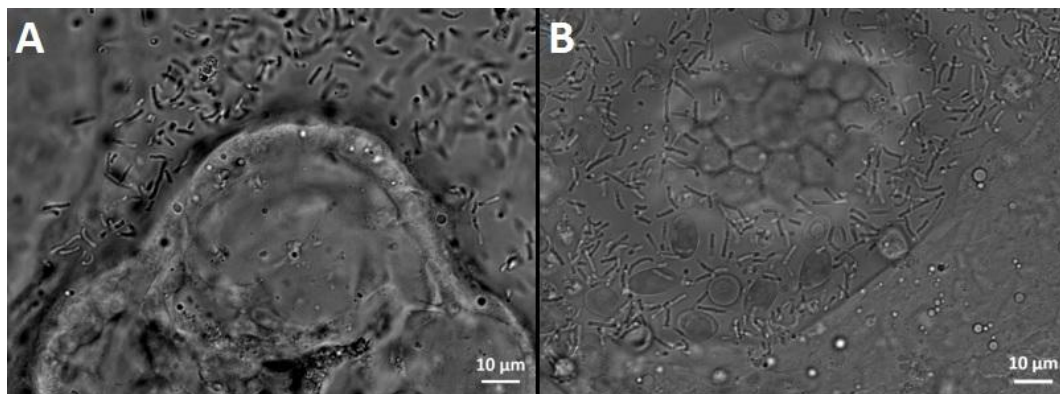
adherencję do powierzchni nabłonka jelitowego bakterii patogennych takich jak: enteroinwazyjny szczep *E. coli* (Resta-Lenert i in. 2003), eteropatogeny szczep *E. coli* (Forestier i in., 2001; Mack i in., 1999), enterotoksyczny szczep *E. coli* oraz *Klebsiella pneumoniae* (Forestier i in., 2001). W badaniach nad protekcyjnymi właściwościami bakterii probiotycznych znalazły również zastosowanie różnego rodzaju techniki hodowli nabłonka jelitowego w warunkach trójwymiarowych. Zastosowanie hodowli trójwymiarowych może przyczynić się do zwiększenia wiarygodności uzyskiwanych wyników dzięki lepszemu odzwierciedleniu warunków panujących w żywym organizmie. Höner zu Bentrup i in. (2006) uzyskali trójwymiarowy model nabłonka jelitowego poprzez umieszczenie komórek linii HT-29 w bioreaktorze do hodowli rotacyjnej, dzięki czemu trójwymiarowe agregaty komórkowe utrzymywane były w zawiesinie przez cały okres trwania hodowli. Opracowany model wykorzystano w badaniach dotyczących wczesnych stadiów zakażenia przez bakterie *Salmonella* i porównano uzyskane rezultaty z wynikami badań przeprowadzonych z wykorzystaniem dwuwymiarowej hodowli komórek HT-29. Wykazano, że komórki utrzymywane w warunkach trójwymiarowych charakteryzowały się lepszą organizacją w obrębie połączeń szczelinowych, macierzy zewnątrzkomórkowej oraz rąbka szczoteczkowego, a także zwiększoną produkcją mucyn w porównaniu do tradycyjnej hodowli w postaci monowarstwy. Natomiast bakterie szczepu *Salmonella typhimurium* badane w hodowli 3D wykazywały większą przyczepność, ale równocześnie mniejszą inwazyjność, w porównaniu do tych samych właściwości mierzonych w warunkach hodowli dwuwymiarowej. Dodatkowo obserwowano mniejszą produkcję IL-8 przez komórki nabłonka jelitowego hodowanego w 3D zarówno przed, jak i po infekcji bakteriami *Salmonella* (Höner zu Bentrup i in., 2006). Również technikę hodowli rotacyjnej komórek linii HT-29-16E wykorzystał Mappley i in. (2011) w celu zbadania wpływu dwóch szczepów probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus* na zakażenie krętkami *Brachyspira pilosicoli*, które u wielu gatunków zwierząt wywołują ciężką biegunkę krętkową. Wykazano, że dodatek do hodowli nadsączy dwóch szczepów bakterii probiotycznych *L. reuteri* LM1 i *L. salivarius* LM2 skutecznie ogranicza przyczepność i inwazyjność *Brachyspira pilosicoli* do komórek nabłonka (Mappley i in., 2011). Z kolei Costello i in. (2014) opracowali model nabłonka wykorzystując trójwymiarowe syntetyczne rusztowanie imitujące strukturę kosmka jelitowego, umożliwiając różnicowanie komórek linii Caco-2 wzdłuż osi krypta-kosmki. Przy użyciu tego modelu wykazano, że *Lactobacillus gasperi* skutecznie ogranicza adhezję bakterii patogennych *Salmonella typhimurium* i *Pseudomonas aeruginosa* do komórek nabłonka jelitowego (Costello i in., 2014).

Hodowle nabłonka jelitowego *in vitro* znalazły także zastosowanie w badaniach nad immunomodulacyjnymi właściwościami probiotyków. Oddziaływanie bakterii

probiotycznych na nabłonek jelitowy inicjuje wytwarzanie przez enterocyty różnych cząsteczek immunomodulujących, które wpływają na odporność gospodarza. Interakcje między bakteriami probiotycznymi a enterocytami odgrywają zasadniczą rolę w kontrolowanej produkcji cytokin i chemokin wytwarzanych przez nabłonek jelitowy. Wykazano, że niektóre bakterie probiotyczne w warunkach *in vitro* modulują ekspresję zarówno prozapalnych jak i przeciwzapalnych molekuł, przy czym obserwowany efekt jest zależny od rodzaju bakterii probiotycznej. Przykładowo, *Lactobacillus sakei* indukował ekspresję IL-1, IL-8 oraz TNF- α w komórkach Caco-2, podczas gdy *L. johnsonii* stymulował ekspresję TGF- α (Haller i in., 2000). Z kolei w komórkach linii HT-29 obserwowano indukcję produkcji IL-8 przez bakterie szczepu *E. coli* Nissle 1917, podczas gdy mieszanka probiotyków VSL#3 (zawierająca różne szczepy *Lactobacillus* i *Bifidobacteria*) nie oddziaływała na produkcję tej chemokiny (Lammers i in., 2002; Otte i Podolsky, 2004).

Najwięcej badań nad właściwościami i wpływem probiotyków na komórki nabłonka jelitowego przeprowadzanych jest przy wykorzystaniu ustalonych nowotworowych linii komórkowych. Należy jednak pamiętać, że linie te pod wieloma aspektami różnią się od prawidłowych komórek nabłonka jelitowego, a ich fenotyp zależny jest od długości trwania hodowli. Dlatego w ostatnich latach w badaniach nad fizjologią jelita coraz częściej wykorzystywane są trójwymiarowe modele wyprowadzane z prawidłowych komórek nabłonkowych. Zastosowanie technik hodowli trójwymiarowych pozwoliło na lepsze odzwierciedlenie warunków panujących w żywym organizmie oraz umożliwiło prowadzenie nawet długoterminowej hodowli prawidłowych komórek nabłonka jelitowego, czego nie można było osiągnąć stosując hodowle w postaci monowarstwy komórek. Zaprezentowanie przez Sato i in. (2009) modelu organoidów jelitowych (wyprowadzonych z mysich komórek macierzystych krypt jelitowych) nazywanych obecnie mini-jelitami (ang. *mini guts*) pozwoliło naukowcom na uzyskanie organoidów z większości rodzajów tkanek nabłonkowych jelita pozyskiwanych zarówno od ludzi, jak i od zwierząt w różnych fazach osobniczego rozwoju. Technika ta, z pewnym modyfikacjami, została także z powodzeniem zaadoptowana dla potrzeb hodowli kurzego nabłonka jelitowego w postaci organoidów (Fot. 1). Wykorzystanie tego modelu w badaniach nad interakcją pomiędzy probiotykami a nabłonkiem jelitowym drobiu, pozwoli na lepsze poznanie mechanizmów obronnych i immunoregulacyjnej funkcji jelit u ptaków. Dobór odpowiedniego szczepu probiotycznego i sposób jego wykorzystania w profilaktyce i leczeniu chorób zakaźnych i immunomodulacyjnych jest szczególnie ważny w przypadku hodowli drobiu. Zgromadzenie dużej ilości osobników na małej przestrzeni oraz brak kontaktu wylęgających się piskląt z matką (a tym samym z jej florą bakteryjną) wpływają

negatywnie na rozwój prawidłowej odporności ptaków i zwiększają możliwość szerzenia się w stadzie niebezpiecznych infekcji, które nie tylko obniżają efektywność produkcji, ale mogą także stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi. Modele nabłonka jelitowego w postaci organoidów znajdują również zastosowanie w badaniach dotyczących stadiów rozwojowych nabłonka jelitowego w obecności lub przy braku bodźców mikrobiologicznych, roli fizycznych i biochemicznych komponentów bariery nabłonkowej, a także roli komórek nabłonkowych w powstawaniu odpowiedniej odpowiedzi immunologicznej wywoływanej przez komensalne lub patogenne drobnoustroje. Ponieważ proces uzyskania organoidów jelitowych pośrednio odzwierciedla rozwój nabłonka jelitowego w warunkach *in vivo*, model ten może również znaleźć zastosowanie w badaniach żywieniowych dotyczących między innymi wpływu probiotyków na różnicowanie, dojrzewanie czy też regenerację komórek nabłonkowych [Bermudez-Brito i in., 2013; Sato i in., 2009; Schultz i Butt, 2014).



Fotografia 1. Trójwymiarowa hodowla komórek nabłonka jelitowego w postaci organoidów jelitowych w obecności bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidphillus* (LA-5) – obserwacja z użyciem kontrastu Nomarskiego: A - przekrój poprzeczny przez organoid, widoczna ściana organoidu zbudowana z komórek nabłonkowych i puste wnętrze organoidu; B - powierzchnia organoidu, widoczne ściśle przylegające do siebie komórki nabłonkowe tworzące charakterystyczny wzór „plastra miodu” (rysunek pochodzi z pracy magisterskiej mgr Aleksandry Orzechowskiej).

Podsumowanie

Hodowle *in vitro* komórek nabłonka jelita są narzędziem często wykorzystywanym w badaniach dotyczących właściwości bakterii probiotycznych. Stanowią one atrakcyjną alternatywę dla badań przeprowadzanych z udziałem zwierząt lub ludzi, ponieważ pozwalają na szybsze wstępne określenie właściwości danego

mikroorganizmu, a jednocześnie są stosunkowo tania i powtarzalną metodą stwarzającą mniej wątpliwości etycznych. Ciągły rozwój w dziedzinie hodowli komórek w warunkach *in vitro* oraz poszukiwanie nowych, lepszych rozwiązań zaowocowało opracowaniem trójwymiarowych modeli nabłonka jelitowego, które lepiej odzwierciedlają warunki panujące w organizmie i mogą być w przyszłości ważnym narzędziem w badaniach dotyczących interakcji pomiędzy nabłonkiem jelitowym a mikroorganizmami.

W trakcie pisania niniejszej pracy przeglądowej i wykonywania badań przedstawionych na fot. 1. autorka była wykonawcą w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (2013/09/B/NZ9/00285 kierowanym przez dr Małgorzatę Pierzchalską).

Literatura

1. Wasilewska E, Złotkowska D, Pijagin M. Rola mikroflory jelitowej i bakterii probiotycznych w profilaktyce i rozwoju raka jelita grubego. *Postępy Hig Med. Dosw*, 2013, 67, 837-847.
2. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Yhornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan G, Shanahan F, Collins JK. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73, 386S–392S.
3. Daly C, Davis R. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agric Food Sci Finland*. 1998,7:251–265.
4. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic bacteria. *Gut*, 1998,42, 2–7.
5. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba, Argentina 1-4 October 2001.
6. Quaroni A. Development of fetal rat intestine in organ and monolayer culture. *The Journal of Cell Biology*, 1985, 100, 1611-1622.
7. Kaeffer B. Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture: a mini-review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2002, 38, 123-134.
8. Chopra D., Dombkowski A., Stemmer P., Parker G. Intestinal epithelial cells *in vitro*. *Stem Cells and Development*, 2010, 19, 131-141.

9. Grajek W, Olejnik A. Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Pol. J. Food Nutr. Sci*, 2004, 13/54(1), 5–24.
10. Quaroni A, Wands J, Trelstad R, Isselbacher K. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Cell Biology*, 1979, 80, 248-265.
11. Grajek W, Olejnik A, Staniaszek K. Kultury komórkowe nabłonka jelitowego jako model do badania transportu trans nabłonkowego. *Biotechnologia*, 2006, 2(73), 148-165.
12. Olson A, Pysher T, Bienkowski R. Organization of intestinal epithelial cells into multicellular structures requires laminin and functional actin microfilaments. *Experimental Cell Research*, 1991,192, 543-549.
13. Rainaldi G, Boe A, Gessani S. 3D (Three-Dimensional) Caco-2 Spheroids: Optimized in vitro Protocols to Favor Their Differentiation Process and to Analyze Their Cell Growth Behavior. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016, 4, 341-350
14. Kitel J, Czarnecka J, Rusin A. Trójwymiarowe hodowle komórek — zastosowania w badaniach podstawowych i inżynierii tkankowej. *Postępy Biochemii*, 2013, 59(3), 305-314.
15. Doillon J, Gagnon E, Paradis R, Koutsilieris M. Three-dimensional Culture System as a Model for Studying Cancer Cell Invasion Capacity and Anticancer Drug Sensitivity. *Anticancer Research*, 2004, 24, 2169-2178.
16. Sato T, Vries R, Snippert H, van de Wetering M, Barker N, Stange D, van Es J, Abo A, Kujala P, Peters P, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459, 262-265.
17. Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho Q, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman I, Capecchi M, Kuo C. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nature Medicine*, 2009,15, 701-706.
18. Gracz A, Ramalingam S, Magness S. Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 298, 590-600.
19. Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga F, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco M, Sancho E, Clevers H, Batlle E. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nature Medicine*, 2011, 17, 1225-1227.
20. Lahar N, Lei N, Wang J, Jabaji Z, Tung S, Joshi V, Lewis M, Stelzner M, Martin M., Dunn J. Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. *PLOS ONE*, 2011, 6, 1-9.

21. Spence J, Mayhew C, Rankin S, Kuhar M, Vallance J, Tolle K, Hoskins E, Kalinichenko V, Wells S, Zorn A, Shroyer N, Wells J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 2011, 470, 105–109.
22. Tumola E, Salminen S. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 41, 45–51.
23. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol*, 2001, 152, 167–173.
24. Resta-Lenert S, Barrett K. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 2003, 52, 988–997.
25. Mack D, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth M. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1999, 276(4), G941-G950.
26. Honer zu Bentrup K, Ramamurthy R, Ott M, Emami K, Nelman-Gonzalez M, Wilson J, Richter E, Goodwin T, Alexander S, Pierson D, Pellis N, Buchanan K, Nickerson C. Three-dimensional organotypic models of human colonic epithelium to study the early stages of enteric salmonellosis. *Microbes and Infection*, 2006, 8, 1813-1825.
27. Mappley LJ, Tchórzewska MA, Cooley WA. *Lactobacilli* antagonize the growth, motility, and adherence of *Brachyspira pilosicoli*: a potential intervention against avian intestinal spirochetosis. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77, 5402–5411.
28. Costello C, Sorna R, Goh Y, Cengic I, Jain N, March J. 3-D Intestinal Scaffolds for Evaluating the Therapeutic Potential of Probiotics. *Mol. Pharmaceutics*, 2014, 11 (7), 2030–2039.
29. Haller D, Bode C, Hammes W, Pfeifer, Schiffrin E, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000, 47, 79- 87.
30. Lammers K, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, Kamm M, Brigidi P, Gionchetti P, Campieri M. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97, 1182-1186.
31. Otte J, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gramnegative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 286, 613-626.

32. Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Fontana L, Munoz-Quezada S, Gil A. In vitro cell and tissue models for studying host-microbe interactions: a review. *British Journal of Nutrition*, 2013, 109, 27–34.
33. Schultz M, Butt G. Mini Guts – Human Stem-Cell Derived Organoids as Tools to Study Epithelial Properties. *e-WGN Expert Point of View Articles Collection*, 2014, 19(3).

Rozdział 7

Dagmara Poniewska, Krzysztof Żyła

*Katedra Biotechnologii Żywności, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

Kierownik katedry/promotor: prof. dr hab. inż. Krzysztof Żyła

INOZYTOLE ROŚLINNE – POTENCJALNY SKŁADNIK ŻYWNOŚCI FUNKCJONALNEJ

Streszczenie

Inozytol zaliczany jest do węglowodanów o budowie cyklicznej, w których do każdego atomu węgla w pierścieniu przyłączona została grupa hydroksylowa. Występuje w formie dziewięciu stereo izomerów, z których największą aktywność biologiczną wykazuje mio-inozytol i jego fosforanowe pochodne oraz D-chiro-inozytol. Mio-inozytol oraz D-chiro-inozytol pełni wiele ważnych funkcji metabolicznych u roślin, zwierząt i ludzi. Uczestniczy w syntezie lipidów błonowych, transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych, odpowiedzi na stres oksydacyjny, utrzymywaniu prawidłowego poziomu insuliny we krwi oraz jest odpowiedzialny za prawidłowe funkcjonowanie układu nerwowego. Bogatym źródłem inozytoli w codziennej diecie są: gryka, nasiona roślin strączkowych, orzechy, owoce i warzywa.

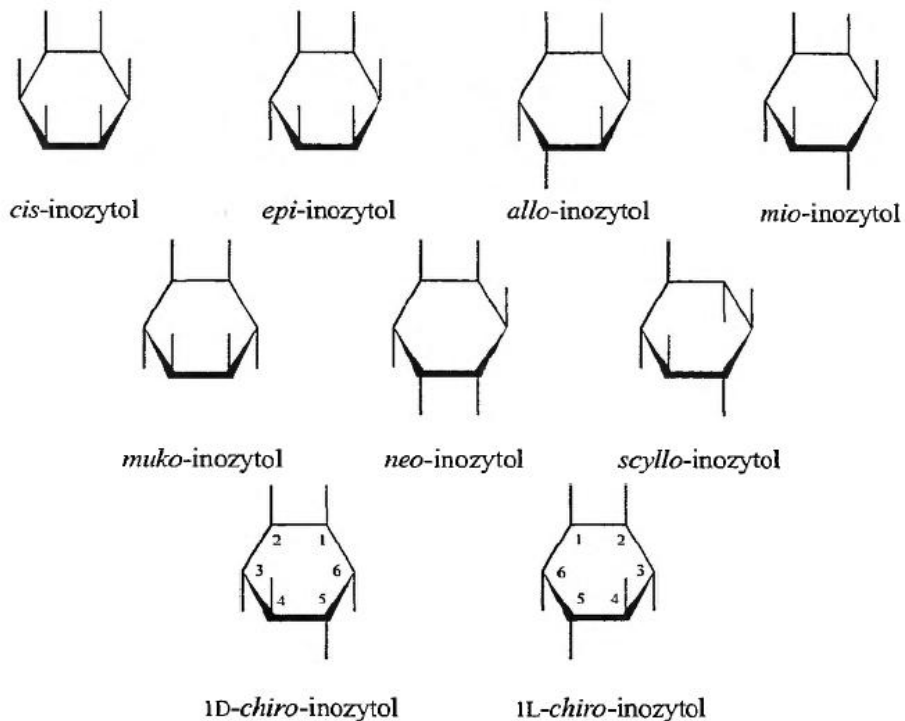
Słowa kluczowe: mio-inozytol, D-chiro-inozytol, funkcje inozytolu

Wprowadzenie

Cyklitole to związki wieloalkoholowe o strukturze cyklicznej, powszechnie występujące w przyrodzie, pełnią wiele ważnych funkcji u roślin, zwierząt i ludzi. Jednym z przedstawicieli tej grupy jest inozytol (1,2,3,4,5,6-hesksahydroksycykloheksan) [Schlemmer i in., 2009].

Inozytol jest związkiem karbocyklicznym, w którym do każdego atomu węgla w pierścieniu została przyłączona grupa hydroksylowa. Zaliczany jest do węglowodanów, charakteryzujących się słabo wyczuwalnym słodkim smakiem. Inozytol występuje w formie dziewięciu stereoizomerów, z których pięć występuje w warunkach naturalnych (scyllo -, muco-, D-chiro-, mio- i neo-inozytol), pozostałe cztery (L-chiro, allo-, epi-, cis-

inozytol) syntetyzowane są w sposób chemiczny (Rys.1) [Frankowski i in., 2001; Schlemmer i in., 2009].



Rys. 1. Formy stereoizometryczne inozytolu [Frankowski i in., 2001].

Formy występowania inozytolu

Najczęściej występującą formą inozytolu w przyrodzie, a zarazem charakteryzującą się najbardziej stabilną konformacją jest *mio*-inozytol. W formie tej, w konformacji krzeselkowej wszystkie grupy hydroksylowe, oprócz grupy przy węglu drugim znajdują się w pozycji ekwatorialnej. *Mio*-inozytol nie jest optycznie czynnym związkem, charakteryzuje się małą rozpuszczalnością w etanolu oraz innych rozpuszczalnikach organicznych. Odznacza się dużą odpornością na degradację oksydacyjną i termiczną, dlatego należy do najbardziej stabilnych węglowodanów [Agranoff, 2009; Frankowski i in., 2001]. W niewielkim stopniu syntezowany jest w organizmie człowieka, zaliczany do witamin (witamina B8). Największą

aktywność biologiczną wykazuje fosfatydylinozytol będący ufosforylowaną formą mio-inozytolu [Stevenson – Paulik i in., 2005].

Mio-inozytl może występować w przyrodzie w postaci trzech form:

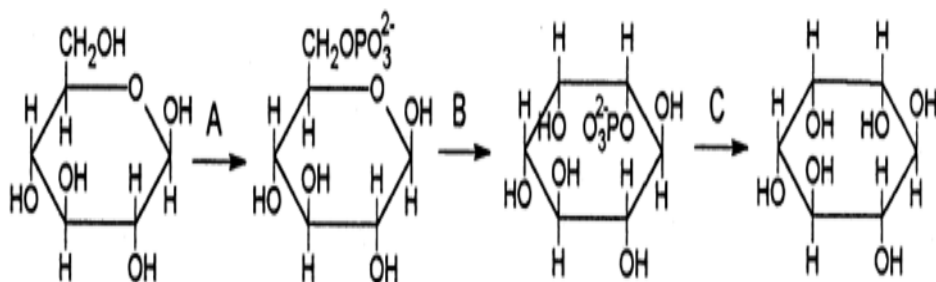
- a) Mio-inozytolu wolnego.
- b) Fosforanów inozytolu – ufosforylowana forma inozytolu, np. kwas fitynowy zaliczany jest do składników antyodżywczych, ograniczających biodostępność składników mineralnych i białek zawartych w produktach spożywczych, poprzez zdolność chelatowania jonów metali [Duliński i Starzyńska-Janiszewska, 2011]. Coraz częściej wskazuje się jednak na pozytywne działanie niższych fosforanów inozytolu w organizmie człowieka np.: zapobiegają rozwojowi raka jelita grubego. Zaliczane są także do przeciwutleniaczy pomocniczych, nie działających na reakcję utleniania w sposób bezpośredni, lecz mających na celu intensyfikowanie działania tradycyjnych przeciwutleniaczy [Stevenson – Paulik i in., 2005; Troszyńska i in., 2000].
- c) Glicerofosfolipidów inozytolu - forma związana z kwasami tłuszczowymi, np. fosfatydylinozytol, który zawiera kwas stearynowy i arachidowy [Eyster, 2006; Stevenson – Paulik i in., 2005].

Drugą formą inozytolu często spotykaną w przyrodzie jest D-chiroinozytol, który występuje w formie:

- a) D-chiroinozytolu wolnego.
- b) Fagopiryntoli – D-chiroinozytol związany jest z jednostkami galaktopiranozowymi. Związki te występują w nasionach gryki, zlokalizowane są w warstwie aleuronowej oraz bielmie zarodka. Synteza fagopiryntoli odbywa się z udziałem syntetazy galaktitolu-GolS, która przyłącza galaktozę do pierścienia inozytolu. Związki te występują w dwóch grupach różniących się między sobą sposobem wiązania pierwszej podjednostki galaktopiranozowej do pierścienia inozytolu. Wpływają na utrzymanie prawidłowego poziomu ciśnienia krwi oraz stężenia insuliny we krwi [Ueda i in., 2005].
- c) Metylowej pochodnej D-chiro-inozytolu - D-pinitol (3-O-metylo-chiroinozytol) – forma wykazująca prozdrowotne właściwości polegające między innymi na toksycznym działaniu względem komórek raka gruczołu krokowego [Frankowski i in., 2001; Lin i in., 2013].

Biosynteza mio-inozytoli

W komórkach zwierzęcych istnieją trzy szlaki pozyskiwania mio-inozytoli. Głównym źródłem jest biosynteza *de novo* z glukozy. Glukoza w wyniku fosforylacji przy udziale heksokinazy zostaje przekształcona do D-glukozy-6-fosforanu. Następnie MIPS (syntaza D-mio-inozytol-3-fosforanu) przekształca D-glukozy-6-fosforan do 1L-mio-inozytoli-1-fosforanu, który ulega defosforylacji przy udziale monofosfatazy inozytoli do mio-inozytoli (Rys. 2) [Loewus i Murthy, 2000]. Pozostałe stereoisomery inozytoli, nie są syntetyzowane *de novo*, powstają w wyniku epimeryzacji mio-inozytoli. U człowieka epimeryzacja mio-inozytoli do D-chiro-inozytoli zachodzi w tkankach wrażliwych na insulinę [Jakimiuk i Szamatowicz, 2014].



Rys. 2. Konwersja D-glukozy do mio-inozytoli: A-heksokinaza (EC 2.7.1.1), B- syntaza (EC 5.5.1.4), C- Monofosfataza inozytoli (EC 3.1.3.25) [Loewus i Murthy, 2000].

Innym źródłem inozytoli jest defosforylacja fosforanów inozytoli pochodzących z rozpadu fosfolipidów błonowych. Ostatnim mechanizmem jest pobór mio-inozytoli z płynu pozakomórkowego, przez specjalne transportery. Transport ten następuje w wyniku różnicy stężeń pomiędzy płynem mózgowo-rdzeniowym (100-500 μM), a komórkami mózgu (10 mM). Odpowiednie stężenie w obu środowiskach utrzymywane jest dzięki dwóm transporterom: SMIT (transporter Na⁺) i HMIT (transporter H⁺) [Deranieh i Greenberg, 2009; Jakimiuk i Szamatowicz, 2014].

Funkcje biologiczne mio-inozytoli

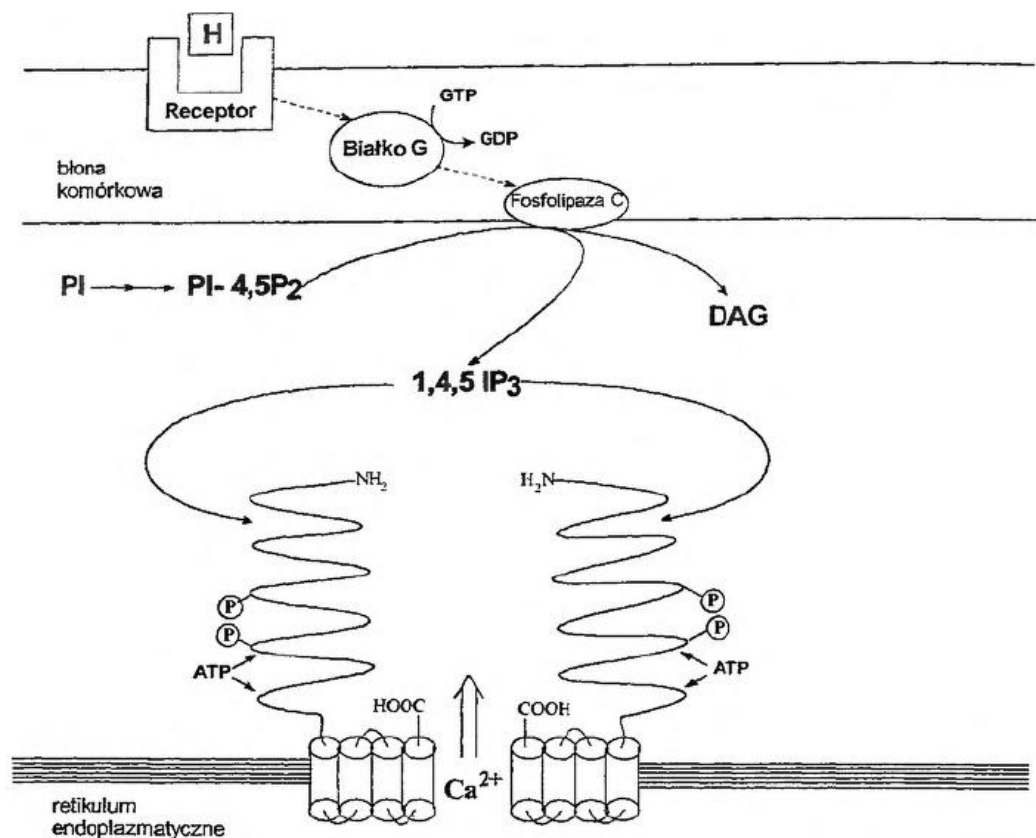
Inozytol jest substancją niezbędną do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu człowieka [Duliński i Starzyńska-Janiszewska, 2011].

Podstawową rolą mio-inozytolu jest udział w biosyntezie lipidów błonowych. Mio-inozytol sprzęgany jest do glicerofosfolipidów za pomocą syntazy fosfatydyloinozytolu. Powstały w wyniku reakcji fosfatydyloinozytol (PI) może ulec fosforylacji katalizowanej przez kinazę fosfatydyloinozytolu i kinazę fosforanu fosfatydyloinozytolu. Fosforylacja obejmuje grupy hydroksylowe przy 3, 4 i 5 atomie węgla w pierścieniu mio-inozytolu. Fosfatydyloinozytol może zostać również hydrolizowany (fosfolipaza D), w wyniku takiej reakcji powstaje kwas fosfatydowy, który następnie przekształcany jest w glicerofosfolipidy [Lofke i in., 2008]. Gotowe lipidy zostają przetransportowane do błon za pomocą transportu pęcherzykowego lub wyspecjalizowanych białek transportujących [Eyster, 2006].

Inną ważną funkcją pochodnych mio-inozytolu (fosforanów fosfatydyloinozytolu) jest udział w transdukcji sygnałów, czyli przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych. Głównymi enzymami biorącymi udział w tym procesie są fosfolipazy, które pełnią kluczową rolę w odpowiedzi na bodźce pozakomórkowe. Reakcja zostaje zapoczątkowana w chwili związania się neuroprzekaźnika lub hormonu (H) z receptorem 7TM znajdującym się w błonie komórkowej, a następnie poprzez białko G aktywuje fosfolipazę C (fosfodiesterazę 4,5-difosforanu fosfatydylo-mio-inozytolu). Fosfolipaza C katalizuje hydrolizę 4,5-difosforanu fosfatydylo-mio-inozytolu (PI-4,5-P2) do 1,4,5-trifosfo-mio-inozytolu (1,4,5-IP₃) i diacyloglicerolu (DAG). DAG nie bierze udziału w dalszych przemianach. Pozostaje w błonie komórkowej, gdzie odpowiedzialny jest za aktywację kinazy białkowej C. 1,4,5-trifosfo-mio-inozytol w wyniku dyfuzji wędruje do retikulum endoplazmatycznego, gdzie łączy się ze specyficznymi receptorami. Następuje otwarcie kanałów wapniowych, w wyniku czego uwalniane są jony wapnia do cytozolu (Rys. 3) [Albero i in., 2002; Frankowski i in., 2001].

Fosforany inozytolu biorą również udział w przekazywaniu sygnałów, poprzez oddziaływanie bezpośrednie z domenami białek cytoplazmatycznych lub domenami białek błonowych z naładowanymi ujemnie grupami fosforanowymi połączonymi z pierścieniem inozytolu. Połączenie takie umożliwia regulowanie aktywności białek błonowych. Może być także miejscem przyłączenia cytoszkieletu oraz elementów uczestniczących w szlaku transdukcji sygnałów komórkowych. Do białek oddziaływujących z fosforanami fosfatydyloinozytolu zaliczamy między innymi: GAP (białko odpowiedzialne za aktywację – GTP-azy) oraz białko GEF (czynnik odpowiedzialny za wymianę nukleotydów guaninowych) [Paolo i Camilli 2006].

Pochodne D-chiro inozytolu (D-ononitolu i D-pinitolu) uczestniczą w odpowiedzi komórek na stres osmotyczny. Udowodniono, iż pełnią one rolę molekularnego sygnalizatora, informującego organizm o zbyt dużym stężeniu soli w organizmie [Hirano i in., 2015].



Rys. 3. Mechanizm działania 1,4,5 IP₃ jako „drugiego posłańca”
[Frankowski i in., 2001].

Inozytol jest substancją niezbędną do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu człowieka. Szacuje się, że człowiek spożywa w ciągu dnia ok. 1g, głównie w postaci mio-inozytolu [Jakimiuk i Szamatowicz, 2014]. Związek ten wykazuje pozytywny wpływ na zdrowie człowieka, co stwarza możliwość wzbogacania żywności w inozytol, w celu produkcji żywności funkcjonalnej [Jakimiuk i Szamatowicz, 2014; Troszyńska i in., 2000]. Wykazuje również właściwości terapeutyczne i zapobiegawcze w leczeniu raka gruczołu krokowego, piersi, jelita grubego, trzustki, wątroby oraz płuc. Stosowany jest również w profilaktyce zachorowań na cukrzycę, zaćmę, neuropatie, nefropatie, zaburzenia neuropsychiatryczne (wpływa na zachowanie prawidłowej równowagi cynku i miedzi w mózgu) [Flores i in., 2011].

Przypuszcza się, iż fagopirytole oraz ich pochodne odpowiedzialne są za zwiększenie wychwyty glukozy poprzez translokację transporterów glukozy 4 (GLUT4) i przebudowę włókien w szkieletu mięśniowym, wpływając na wtórny szlak

sygnałowy insuliny. Wykazano, iż zwiększenie spożycia D-chiro-inozytolu, powoduje obniżenie stężenia glukozy we krwi. Związki te mogą być wykorzystane w terapii cukrzycy typu II i zespołu policystycznych jajników [Nam i in., 2013].

Źródła inozytolu

Za najważniejsze źródła inozytolu uważana jest żywność pochodzenia roślinnego, przede wszystkim gryka, kukurydza, nasiona roślin strączkowych, owoce cytrusowe, orzechy oraz warzywa [Wieczorek i Lahuta, 2007]. Zawartość różnych form inozytolu w przykładowych produktach spożywczych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Źródła inozytolu w żywności.

Nazwa produktu	Mio-inozytol [mg/g s.m.]	D-chiro-inozytol [mg/g s.m.]	Pinitol [mg/g s.m.]
soja	3,88	2,36	26,0
soczewica	2,53	2,36	0,73
ciecierzyca	2,68	3,50	1,96
groch	1,93	-	-
orzeszki ziemne	1,33	-	-
orzeszki arachidowe	3,78	3,90	4,50
gryka	2,29	1,20	-
kukurydza	4,30	-	-
Owoce cytrusowe	1,13-3,07	0,30-1,14	-

Źródło: [McDonald i in., 2012; Wieczorek i Lahuta, 2007].

Podsumowanie

Inozytol jest substancją naturalnie występującą w wielu produktach spożywczych, w których występuje w postaci związanej lub wolnej. Inozytol pełni wiele ważnych funkcji w organizmach roślin, zwierząt i ludzi. Odpowiedzialny jest, między innymi za odpowiedź na stres oksydacyjny, biosyntezę lipidów błonowych, przekazywanie informacji wewnątrzkomórkowych. Według licznych badań jest substancją niezbędną do prawidłowego funkcjonowania organizmu, zapobiega rozwojowi licznych chorób, co stwarza nowe kierunki badań, nad biologicznie aktywnymi formami inozytolu w projektowaniu żywności funkcjonalnej.

Literatura

1. Agranoff B. W. Trutles All the Way: Reflection on my-Inositol. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(32), 21121-21126.
2. Albero M. M., Manzoli L., Faenza I., Bortul R., Billi A-M. Cocco L. Nuclear inositol lipid signaling and its potential involvement in malignant transformation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1603, 11-17.
3. Deraniew R.M., Greenberg M.L. Cellular consequences of inositol depletion. *Biochemical Society Transactions*, 2009, 37, 1099–1103.
4. Di Paolo G., De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 2006, 433, 651-657.
5. Duliński R., Starzyńska - Janiszewska A. Zastosowanie chromatografii jonowej sprzężonej z pulsacyjną detekcją amperometryczną do oznaczenia zawartości mio-inozytolu w materiałach paszowych pochodzenia roślinnego. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 3 (76), 173 – 185.
6. Eyster K.M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Advances in Physiology Education*, 2006, 31, 5-16.
7. Flores M. I. A, Moreno J. L. F, Frenich A. G, Vidal J. L. M. Fast determination of myo-inositol in milk powder by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2011, 129, 1281 – 1286.
8. Frankowski R., Maszewska W., Smiatacz Z. Cyklitole. *Wiadomości chemiczne*, 2001, 55 (9-10), 821-848.
9. Hirano T., Munnik T., Sato M.H. Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, FAB1/PKfyv kinase mediates endosome maturation to establish endosome-cortical microtubule interaction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2015, 169, 1961-1974.
10. Jakimiuk A. J, Szamatowicz J. The role of inositol deficiency in the etiology of polycystic ovary syndrome disorders. *Ginekol Pol.*, 2014, 85, 54 – 57.
11. Lin T. H., Tan T. W., Tsai T. H., Chen C. C., Hsieh T. F., Lee S. S., Liu H. H., Chen W. C., Tag C. H. D-pinitol Inhibits Prostate Cancer Metastasis through Inhibition of $\alpha V\beta 3$ Integrin by Modulating FAK, c- Src and NF-Kb Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14, 9790-9802.
12. Loewus F. A, Murthy P. P. N. *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* 2000, 150, 1 – 19.
13. Lofke Ch., Ischebeck T., König S., Freitag S., Heilmann I. Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 2008, 413, 115–124.

14. McDonald L. W., Goheen S. C., Donald P. A., Campbell J. A., 2012. Identification and quantitation of various inositols and o-methylinositols present in plant roots related to soybean cyst nematode host status. *Nematropica*, 2012, 42 (1), 1-8.
15. Nam H., Hwang K., Jung H., Know S-H., Park O. K., Suh J.G. Fagopyritol, a Derivative od D-chiro-inositol, Induces GLUT4 translocation wia action filment remodeling in L6 GLUT4myc skeletal muscle cell. *Journal of Life Science*, 2013, 23 (9), 1163-1169.
16. Schemmer U. Froich W., Prieto R. M. , Grases F. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability protective roe and analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, 53, 330-375.
17. Stevenson – Paulik J., Bastidas R. J., Chiou S-T., Frye R.A., York J.D., Generation of phytate-free seeds in Arabidopsis though disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102 (35), 12612-12617.
18. Troszyńska A., Honke J., Kozłowska H. Natural non-nutrients of plant origin as the components of functional food. *Postępy Fitotreapii*, 2000, 2, 17-22.
19. Ueda T, Coseo M. P, Harrell T. J, Obendorf R. P a multifunctional galactinol synthase catalyzes the synthesis of fagopyritol A1 and fagopyritol B1 in buckwheat seed. *Pant Science*, 2005, 168, 681 – 690.
20. Wiczorek C., Lahuta L.B. Wpływ niektórych zabiegów kulinarnych na zmiany poziomów węglowodanów rozpuszczalnych w nasionach soczewicy i ciecierzycy. *Żywnosc. Nauka. Technologia*, 2007, 52, 3, 159-172.

Summary

Inositol is one of the carbohydrates of a cyclic structure, where each ring carbon atom is bonded hydroxyl group. There is the form of nine stereoisomers thereof, which exhibits the greatest biological activity of myo-inositol phosphate and its derivatives, and D-chiro-inositol. Myo-inositol and D-chiro-inositol have many important metabolic functions in plants, animals and humans. Participates in the synthesis of membrane lipids, intracellular signal transduction, response to oxidative stress, maintaining proper insulin levels in the blood and is responsible for the proper functioning of the nervous system. A rich source of inositols in the daily diet are: buckwheat, legumes, nuts, fruits and vegetables.

Keywords: myo-inositol, D-chiro-inositol, inositol functions

Rozdział 8

Magdalena Skotniczny¹, Paweł Satora¹, Anna Barwińska-Sendra²

¹Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

²Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, Wielka Brytania

Kierownik katedry i promotor: dr hab. inż. Paweł Satora

SPIRULINA – ŻYWNOSĆ XXI WIEKU

Streszczenie

Biomasa sinic z rodzaju *Arthrospira* znana pod handlową nazwą Spirulina, z uwagi na udowodnione właściwości dietetyczno-lecznicze, coraz częściej wykorzystywana jest jako suplement diety. Mikroorganizmy te są źródłem cennych substancji bioaktywnych takich jak prowitamina A, kwas γ -linolenowy czy fikocyjanina. Oprócz wzbogacania organizmu w powyższe składniki, Spirulina wspomaga zwalczanie chorób, w szczególności sercowo-naczyniowych, nowotworów oraz różnego rodzaju infekcji wirusowych.

Słowa kluczowe: *Arthrospira*, sinice, GLA, fikocyjanobiliny

Historia Spiruliny

Sinice (cyjanobakterie) z rodzaju *Arthrospira*, znane pod handlową nazwą „Spirulina”, już od wielu wieków wykorzystywane są jako żywność w różnych rejonach świata.

Pierwszym odnotowanym przypadkiem używania ich jako pożywienia jest zapis dokonany w 1521 roku przez Bernala Diaz del Castillo – żołnierza wojsk Hernana Corteza. Dotyczy on procesu pozyskiwania mikroalg z gatunku *Arthrospira Maxima* z jeziora Texcoco, ich suszenia, a następnie sprzedaży do spożycia przez ludzi na terenie dzisiejszego Meksyku. Kilka lat później Franciszkanin Bernardino da Sahagún, opisując w Kodeksie Florenckim życie i obyczaje Azteków, wymieniał popularne wówczas pożywienie zwane „Tecuitlatl”, co w języku Azteków oznaczało „wydalinę skał” (Gershwin i Belay, 2008).

Historycznie drugim miejscem, gdzie Spirulina była spożywana przez ludność są okolice jeziora Czad w Afryce. W roku 1940 francuski naukowiec Pierre Dangeard

opublikował artykuł o nitkowatych, spiralnie skręconych, niebieskich algach, z których przyrządzano suszone, cienkie placki koloru niebiesko-zielonego zwane „dihe”. W swoim raporcie wspominał także o występowaniu takich samych niebieskich alg w innych jeziorach na terenie Doliny Ryftowej we wschodniej Afryce, gdzie stanowiły one główne źródło pożywienia flemingów. Dopiero w 1966 roku belgijski botanik Jean Leonard potwierdził, że „dihe” składało się głównie z suszonych komórek *Arthrospira platensis*, pozyskiwanych z alkalicznych jezior na terenie regionu Kanem. Spirulina do dziś stanowi główne źródło białka w diecie tamtejszych plemion (Gershwin i Belay, 2008).

Lata siedemdziesiąte XX wieku uważane są za początek przemysłowej, komercyjnej produkcji Spiruliny. Pierwsza fabryka – Sosa Texcoco, została założona w 1969 roku przez Francuzów, na terenie jeziora Texcoco w Meksyku. Był to jedyny tego typu zakład na świecie aż do 1976 roku, kiedy to japońska firma Dainippon Ink. and Chemicals rozpoczęła produkcję Spiruliny na terenie Tajlandii. W kolejnych latach powstawały inne zakłady takie jak Microbio w Kalifornii czy Cyanotech na Hawajach. Aktualnie Spirulina produkowana jest już w ponad 22 krajach na świecie, a spożywana w ponad 77 (<http://iimsam.org/en/iimsam-spirulina-resource-centre/>).

Charakterystyka ogólna

Niekonwencjonalne źródła witamin, kwasów tłuszczowych, niezbędnych aminokwasów czy też β -karotenu odgrywają obecnie kluczową rolę w suplementacji żywności i pasz. Różne gatunki cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* są pod tym względem jednymi z najbardziej obiecujących mikroorganizmów. Spirulina jest szczególnie zasobna w białko, które stanowi od 60-70% jej suchej masy, a węglowodany i lipidy to odpowiednio 8-16% i 5-10% (Hoseini i in., 2013). W składzie mineralnym dominują pierwiastki takie jak żelazo, magnez, potas, wapń, fosfor oraz sód. Jest ona również bogatym źródłem witamin z grupy B oraz prowitaminy A, a także witamin C, E i biotyny (Shetty i in., 2006).

Polisacharydy funkcjonalne są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i chemicznym. W produkcji żywności wykorzystywane są ich właściwości żelujące, stabilizujące, zagęszczające oraz emulgujące. Obecnie pozyskiwane są głównie z brunatnic, co obarczone jest jednak brakiem ciągłości w zaopatrzeniu w surowiec wynikający z sezonowości pozyskiwania glonów w naturalnym środowisku (Shetty i in., 2006). Z tego względu cyjanobakterie stanowią cenne, alternatywne źródło polisacharydów. Większość ich komórek posiada kilkuwarstwową, zewnętrzną, śluzową otoczkę zbudowaną w głównej mierze z polisacharydów, której rozpuszczalna część zwykle obecna jest w medium hodowlanym. Polisacharydy produkowane przez *Arthrospira* spp. należą do grupy

heteropolisacharydów zbudowanych głównie z glukozy, galaktozy, mannozy, ramnozy oraz ksylozy, rzadko rybozy (Richert i in., 2005).

Ważną składową wielu polisacharydów produkowanych przez cyjanobakterie są kwasy uronowe – glukuronowy i galakturonowy, decydujące o anionowej naturze biopolimeru. Kompleksowość budowy chemicznej powoduje obecność podstawników polipeptydowych oraz acetylowych (De Philippis i Vincenzini, 1998). Charakter anionowy polisacharydów produkowanych przez cyjanobakterie determinuje możliwość wiązania metali przez komórki w środowisku o wysokiej koncentracji jonów. Ich rola może polegać na zwiększaniu dostępności niezbędnych jonów poprzez ich wiązanie, akumulację oraz powolne uwalnianie przez komórki cyjanobakterii. W przypadku metali toksycznych, polisacharydy mogą w ten sposób niwelować ich negatywny wpływ na komórkę. Produkcja polisacharydów przez komórki cyjanobakterii może być postrzegana jako cecha adaptacyjna do środowiska, w którym występuje wysoka koncentracja metali ciężkich. Właściwość ta znalazła zastosowanie przy usuwaniu metali ciężkich ze środowiska wodnego (De Philippis i in., 2001).

Nitkowate gatunki cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*, odznaczają się wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFAs) od 25 do 60% w stosunku do lipidów ogółem. W ich biomasie dominują: kwas oleinowy (C18:1n-9), palmitynowy (C16:0), linolowy (C18:2n-6) i γ -linolenowy (C18:3n-6, GLA). Konwencjonalnym źródłem kwasu γ -linolenowego (GLA) są rośliny wyższe, takie jak wiesiołek, czarna porzeczka, ogórecznik. Alternatywę dla surowców roślinnych stanowią hodowle grzybów, jak i cyjanobakterii. Hodowla sinic wydaje się być jednak lepszym źródłem tego składnika, ponieważ materiał roślinny cechuje stosunkowo niska zawartość tego kwasu oraz konieczność izolacji produktu od zasocjowanych z nim, niepożądanych kwasów tłuszczowych (Vonshak, 1997).

Witaminy stanowią ważny składnik biomasy cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*, kształtujący ich wartość biologiczną oraz odżywczą. Naukowcy badający na terenie Azji Środkowej różne szczepy zidentyfikowali szereg witamin wchodzących w skład ich biomasy. Wśród witamin rozpuszczalnych w wodzie przeważały witamina C (42,0-195,3 mg/100g), B1 (0,8-15,4 mg/100g), nikotynamid (0,6-5,3 mg/100g), B6 (0,3-4,0 mg/100g), B2 (0,2-0,9 mg/100g), kwas foliowy (0,2-0,6 mg/100g) oraz pseudowitamina B12 (0,3-0,8 mg/100g). W biomasie analizowanych gatunków cyjanobakterii wykryto również obecność witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, takich jak β -karoten (prowitamina A) (64-140 mg/100g), witamina E (10-19 mg/100g) i D (12,000 U). Analiza próbek pobieranych w różnych porach roku ujawniła, że biomasa szczepów pozyskanych w okresie wiosenno-letnim cechowała się wyższą zawartością witamin, niż pochodzących z okresu zimowego (Babadzhanov i in., 2004).

Innymi komponentami biomasy sinic z rodzaju *Arthrospira* są fikocyjaniny – rozpuszczalne w wodzie, niebieskie barwniki mogące stanowić nawet do 20% frakcji białkowej biomasy. U szczepów z rodzaju *Arthrospira* występują głównie dwie substancje z tej grupy związków – c-fikocyjanina oraz allofikocyjanina, które różnią się między sobą masą cząsteczkową oraz maksimami absorpcji. Chromoforem w obydwu cząsteczkach jest fikobilina. Wykazano, że poza funkcją barwnika, fikocyjanina może stanowić dla sinic *Arthrospira* materiał zapasowy. Fikocyjanina znajduje zastosowanie w przemyśle głównie jako bezpieczny, naturalny barwnik żywności. Niewielkie ilości są stosowane także w biochemicznych testach immunologicznych oraz mikroskopii i cytometrii, gdzie wykorzystywane są własności fluorescencyjne barwnika. Japońska firma DIC Corporation (dawniej Dainippon Ink & Chemicals) skomercjalizowała pozyskiwanie fikocyjaniny ze Spiruliny, pod nazwą „Lina Blue”, która obecnie wykorzystywana jest do produkcji zdrowej żywności i kosmetyków (Dasgupta, 2015).

Właściwości odżywcze

Od ponad 40 lat Spirulina produkowana jest metodą przemysłową z przeznaczeniem na żywność oraz specjalne pasze dla zwierząt. Produkcja komercyjna opiera się zwykle na hodowli cyjanobakterii w odkrytych, otwartych stawach lub zamkniętych bioreaktorach. Najczęściej prowadzi się ją w ciepłym klimacie, na obszarach o minimalnych opadach atmosferycznych (szczególnie na pustyniach), tak aby umożliwić ścisłą kontrolę składu chemicznego wody (Small, 2012). Możliwość kontrolowania i regulowania warunków hodowli cyjanobakterii ma znaczący wpływ na ilość produkowanych przez szczepy składników odżywczych (Khan i in., 2005).

Wysokie właściwości odżywcze i biodostępność składników mikroalg z rodzaju *Arthrospira* już od połowy lat 70. z wielkim powodzeniem wykorzystywane są w walce z głodem i niedożywieniem na świecie przez międzynarodową organizację: Intergovernmental Institution for the use of Microalgae Spirulina Against Malnutrition (IIMSAM) (<http://iimsam.org>).

Wprowadzenie do diety preparatów zawierających biomasę cyjanobakterii *Arthrospira*, dostarcza organizmowi cennych składników odżywczych. Uznawane są one za żywność funkcjonalną. Brak celulozy w ścianie komórkowej Spiruliny powoduje, że jest odpowiednim pożywieniem także dla osób mających problemy jelitowe (Doshi, 2016). Jak wspomniano wcześniej, Spirulina cechuje się wysoką zawartością witamin, zwłaszcza prowitaminy A. Przyjmuje się, że już 3 gramy pokrywają dzienne jej zapotrzebowanie. Jednocześnie jeden gram stanowi 21% zalecanej dziennej dawki tiaminy oraz ryboflawiny (Shetty i in., 2006).

Mimo że w dostępnych handlowo preparatach stwierdzono znaczne ilości witaminy B12, ostatnie badania wykazują że jest to jednak głównie pseudowitamina B12, nieaktywna biologicznie u ludzi. Rozbieżności wynikają z metody jej oznaczania. Dopiero chromatograficzna analiza Spiruliny wykazała różnice w aktywności biologicznej tej witaminy. W związku z tym, cyjanobakterie i ich produkty nie są dobrym źródłem witaminy B12 np. dla wegetarian (Watanabe i in., 2014).

Pozytywny wpływ na organizm ma również bogaty skład mineralny Spiruliny, a zwłaszcza zawartość wapnia, żelaza, magnezu, manganu, potasu oraz cynku. Szczepy z rodzaju *Arthrospira* mogą być wykorzystane do produkcji preparatów wzbogaconych w cenne pierwiastki śladowe, jak na przykład selen. Komórki cyjanobakterii są zdolne do przetwarzania nieorganicznych soli selenu w związki organiczne, odznaczające się wyższą przyswajalnością. Substancje wewnątrzkomórkowe, takie jak białka, lipidy czy polisacharydy tworzą swego rodzaju matrycę, umożliwiającą włączenie i związanie tych organicznych składników (Huang i in. 2006).

Bez wątpienia cennymi składnikami odżywczymi Spiruliny są kwasy tłuszczowe, a wśród nich kwas γ -linolenowy (GLA), którego zawartość w 10 gramach próbki stanowić może ponad 100 mg (Gershwin i Belay, 2008).

Spirulina zawiera w suchej masie nawet do 70% białka, co dziesięciokrotnie przewyższa zawartość białka w soi, a trzykrotnie w mięsie wołowym. O wysokiej wartości tego białka świadczy obecność wszystkich dziewięciu aminokwasów egzogennych, niezbędnych dla organizmu człowieka, co czyni ją idealnym suplementem diety wegetarian i wegan.

Wysoka dostępność składników mineralnych stanowi niewątpliwą zaletę preparatów Spiruliny. Na przykład żelazo zawarte w niej jest o 60% lepiej wchłaniane niż z siarczanu żelaza i innych suplementów (Mishra i in., 2014). Dzieje się to za sprawą fikocyjaniny zawartej w komórkach *Arthrospira*, o strukturze porfirynowej zdolnej do tworzenia kompleksów z żelazem. Jednym z dowodów naukowych potwierdzających taki wpływ na organizm, są badania laboratoryjne obrazujące fakt podwyższenia poziomu żelaza w trakcie trwania ciąży i laktacji u szczurów. W związku z tym przypuszcza się, że Spirulina może być stosowana do leczenia anemii, także przez kobiety w ciąży i w okresie laktacji (Kapoor i Mehta, 1998).

Bezpieczeństwo stosowania Spiruliny jako składnika żywności potwierdzono szeregiem testów toksykologicznych oraz ostatecznie przyznaniem statusu GRAS (Generally Recognized As Safe) przez FDA w Stanach Zjednoczonych (Gershwin i Belay, 2008). Brak jest jednak danych w literaturze na temat jej interakcji z innymi składnikami diety lub lekami.

Spirulina znajduje również szerokie zastosowanie w produkcji pasz dla zwierząt. Szacuje się że około 30% światowej produkcji jest wykorzystywana przez przemysł paszowy (Becker, 2007). Analiza składu, wartości biologicznej oraz badania toksykologiczne dowiodły przydatności cyjanobakterii, jako dodatku do pasz, a nawet potencjalnego substytutu konwencjonalnych źródeł białka takich jak mączka sojowa i rybna. Skarmianie paszami z dodatkiem Spiruliny jest najbardziej obiecujące w przypadku ptactwa, a zwłaszcza drobiu. Coraz prężniej rozwija się również rynek wykorzystania cyjanobakterii w hydroponice (Becker, 2007). Spirulina jest jednak wciąż stosunkowo droga w porównaniu do innych dodatków paszowych, przez co jest niepraktyczna w produkcji zwierzęcej na większą skalę. Dodatkowo nieprzyjemny smak, zapach i sproszkowana forma ograniczają jej zastosowanie (Holman i Malau-Aduli, 2013).

Potencjał terapeutyczny

Spirulina stanowi bogate źródło substancji odżywczych, dzięki którym posiada szereg właściwości prozdrowotnych. Wśród wspomnianych własności wyróżnić można działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antynowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe, przeciwwirusowe, wpływ na układ immunologiczny czy na metabolizm lipidów i węglowodanów. Wiele badań przeprowadzonych *in vitro* na modelach zwierzęcych, a coraz częściej również wśród ludzi dowodzi pozytywnego wpływu Spiruliny na organizm pacjentów chorych na chorobę Parkinsona oraz choroby układu naczyniowo-sercowego (Gershwin i Belay, 2008).

Wykazano, że Spirulina wspomaga wzrost rezydentnej mikroflory jelitowej, zwłaszcza bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*, dodatkowo ograniczając rozwój patogenów, takich jak *Escherichia coli* czy *Candida albicans* (Bhowmik i in. 2009; Khan i in. 2005).

Wytwarzane przez szczepy *Arthrospira* lotne substancje organiczne, wykazują aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybową. Stwierdzono, że metabolity cyjanobakterii inhibują wzrost takich bakterii jak *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, a także drożdżaków z gatunku *C. albicans* (Ozdemir i in., 2004). Również produkowane przez cyjanobakterie różnego typu białka m.in. fikobiliproteiny, hamują wzrost niektórych bakterii chorobotwórczych. Ukazuje to potencjał Spiruliny jako ewentualnego nowego leku w walce z antybiotykoopornością bakterii (Muthulakshmi i in., 2012).

Jedną z cennych własności Spiruliny jest wysoka aktywność antyoksydacyjna jej ekstraktów. Głównymi składnikami odpowiedzialnymi za zmiatanie wolnych rodników

są między innymi związki fenolowe, karotenoidy, fikobiliproteiny, chlorofil oraz produkty jego rozkładu (Wang i in., 2007). Reaktywne formy tlenu są generowane w trakcie regularnej aktywności metabolicznej organizmu. Wywierają one wpływ na składniki komórkowe, powodując oksydacyjne uszkodzenie lipidów, białek czy DNA komórki. Wykazano że Spirulina, zarówno w postaci ekstraktów jak i kapsulek, zapobiega wystąpieniu stresowi oksydacyjnemu, który w konsekwencji może powodować rozwój nowotworów lub przewlekłych chorób naczyniowo-sercowych (Gershwin i Belay, 2008).

Fikocyjanina zawarta w Spirulinie, jest główną substancją odpowiadającą za neutralizację wolnych rodników. Dodatkowo stymuluje hematopoezę, a zwłaszcza erytropoezę, poprzez indukcję uwalniania erytropoetyny. Przyczynia się również, wraz z polisacharydami, do zwiększania produkcji przeciwciał oraz białych ciałek krwi. Ma działanie przeciwzapalne, gdyż inhibuje cyklooksigenazę-2 (COX-2), odpowiedzialną za konwersję kwasu arachidonowego do prostaglandyn i innych eikozanoidów zapalnych. Wykazano, że aktywność COX-2 zwiększa się w tkankach nowotworowych raka jelita grubego, jak również ludzkich nowotworów żołądka i piersi. Etapy kancerogenezy mogą być także zahamowane przez naprawę uszkodzeń DNA. Dzieje się tak ze względu na aktywność endonukleaz, stymulowanych przez unikalne zawartości polisacharydów w Spirulinie (Hoseini i in., 2013).

Preparaty szczepów *Arthrospira*, ze względu na znaczną zawartość niezbędnych, nienasyconych kwasów tłuszczowych mogą wspomagać leczenie lub zapobiegać takim schorzeniom jak miażdżycza tętnic, otyłość czy zaburzenia ciśnienia. Dodatkowo Spirulina ze względu na obecność kwasu γ -linolenowego, który jest prekursorem biosyntezy prostaglandyn, może korzystnie wpływać na regulację ciśnienia krwi, syntezę cholesterolu, proliferację komórek i inne procesy (Shetty i in., 2006). GLA stosowany u pacjentów z hipercholesterolemią, obniżał poziom lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Kwas ten znalazł również zastosowanie w leczeniu atopowego zapalenia skóry, dolegliwości związanych z zespołem napięcia przedmiesiączkowego, chorób serca, choroby Parkinsona czy stwardnienia rozsianego (Sajilata i in., 2008).

Polisacharydy, jak i monosacharydy będące produktami metabolizmu cyjanobakterii, stanowią przedmiot zainteresowania również ze względu na właściwości antywirusowe. Wykazano, że obecność grup siarczanowych warunkuje szeroką aktywność antywirusową polisacharydów, skierowaną przeciwko takim wirusom, jak HIV, HSV, HCV, odry, świnki czy grypy. Ponadto, efektywność działania przeciwwirusowego wzrasta wraz ze wzrostem stopnia usiarczenia polisacharydów. Wykazano również, że polisacharyd, którego łańcuch główny zbudowany jest

z cząsteczek ramnozy i 3-O-metyloksylozy, siarczanowany, chelatujący jony wapnia – tak zwany Ca-spirulan, posiada właściwości antynowotworowe (Mishima i in., 1998).

Podsumowanie

Spirulina jako naturalny suplement diety zyskuje coraz większą popularność wśród konsumentów, także w Polsce. Ze względu na bogaty skład (wysoką zawartość białka oraz mikro- i makroelementów) może uzupełniać dietę mieszkańców w krajach rozwiniętych, jak również pomagać zwalczać głód i niedożywienie w biedniejszych rejonach świata. Obok funkcji żywieniowej może pełnić rolę farmaceutyku, wspomagając leczenie chorób cywilizacyjnych tj. otyłość, choroby sercowo-naczyniowe czy nowotwory. Z wyżej wymienionych względów Spirulina aspiruje do miana żywności XXI wieku.

Literatura

1. Babadzhyanov A., Abdusamatova N., Yusupova F., Faizullaeva N., Mezhlumyan L., Malikova M. Chemical Composition Of *Spirulina platensis* Cultivated In Uzbekistan. Chemistry of Natural Compounds, 2004, 40, 3.
2. Bhowmik D, Dubey J, Mehra S. Probiotic efficiency of *Spirulina platensis* stimulating growth of Lactic Acid Bacteria. Journal of Agriculture and Environmental Sciences, 2009, 6, 546-549.
3. Dasgupta C. N. Algae as a Source of Phycocyanin and Other Industrially Important Pigments. Springer International Publishing, 2015.
4. De Philippis R., Sili C., Paperi R., Vincenzini M. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review. Journal of Applied Phycology, 2001, 13, 293-299.
5. De Philippis R., Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. FEMS Microbiology Reviews, 1998, 22, 151-175.
6. Doshi H., Ray A., Kothari I. L. Spirulina Biotechnology. CRC Press 2016.
7. Gershwin M., Belay A. Spirulina in human nutrition and health. Taylor & Francis Group, London, 2008.
8. Holman B. W. B., Malau-Aduli A. E. O. Spirulina as a livestock supplement and animal feed. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2013, 97(4), 615-623.
9. Hoseini S. M., Khosravi-Darani K., Mozafari M. R. Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2013, 13(8), 1231-1237.

10. Huang Z., Zheng W., Yang F., Guo B. Chemical Composition And Selenium Distribution In Selenium Enriched *Spirulina platensis* Biomass. *Chemistry of Natural Compounds*, 2006, 42, 6.
11. Kapoor R., Mehta U. Supplementary effect of spirulina on hematological status of rats during pregnancy and lactation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1998, 52(4), 315-324.
12. Khan Z., Bhadouria P., Bisen P. Nutritional and Therapeutic Potential of Spirulina. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2005, 6, 373-379.
13. Mishima T., Murata J., Toyoshima M., Fujii H., Nakajima M., Hayashi T., Kato T., Saiki I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clinical and Experimental Metastasis*, 1998, 16, 541-550.
14. Mishra P., Singh V. P., Prasad S. M. Spirulina and its Nutritional Importance: A Possible Approach for Development of Functional Food. *Biochemical Pharmacology*, 2014, 3, e171.
15. Muthulakshmi M., Saranya A., Sudha M., Selvakumar G. Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from Spirulina isolated from fresh water body against various human pathogens. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2012, 3 (3), 7-11.
16. Ozdemir G., Ulku Karabay N., Dalay M., Pazarbasi B. Antibacterial Activity of Volatile Component and Various Extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research*, 2004, 18, 754-757.
17. Richert L., Golubic S., Le Guedes R., Ratiskol J., Payri C., Guezennec J., Characterization of Exopolysaccharides Produced by Cyanobacteria Isolated from Polynesian Microbial Mats. *Current Microbiology*, 2005, 51, 379-384.
18. Sajilata M., Singhal R., Kamat M. Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis* ARM 740 using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 2008, 84, 321-326.
19. Shetty K., Paliyath G., Pometto A., Levin R. *Food biotechnology*. Taylor & Francis Group, London, 2006.
20. Small E. Spirulina—food for the universe. *Biodiversity*, 2012, 12 (4), 255-265.
21. Wang L., Pan B., Sheng J., Xu J., Hu Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, 2007, 105, 36-41.
22. Watanabe F., Yabuta Y., Bito T., Teng F. Vitamin B12-containing plant food sources for vegetarians. *Nutrients*, 2014, 6(5), 1861-1873.

Rozdział 9

Katarzyna Turek, Anna Tomf-Sarna, Jacek Słupski, Michał Stojak

*Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

Kierownik katedry: dr hab. inż. Piotr Gębczyński, prof. UR

AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA SOKÓW Z OWOCÓW ROKITNIKA

Streszczenie

Unikalny skład chemiczny owoców rokitnika, jego właściwości prozdrowotne, atrakcyjna barwa oraz oryginalny smak decydują o jego przydatności dla przemysłu spożywczego. Najczęściej owoce rokitnika wykorzystywane są do wyrobu oleju - surowca dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego. Duże zainteresowanie wzbudzają również soki i inne przetwory z dodatkiem jagód rokitnika. Celem pracy było porównanie właściwości przeciwutleniających soków z rokitnika dostępnych w handlu na terenie Krakowa.

Słowa kluczowe: Rokitnik, *Hippophaë rhamnoides*, soki, aktywność przeciwutleniająca

Wprowadzenie

Rokitnik zwyczajny (*Hippophaë rhamnoides* L.) jest rośliną, która ze względu na swoje właściwości prozdrowotne, terapeutyczne oraz funkcjonalne zyskuje z roku na rok coraz większą popularność. Naturalnie występuje na Syberii, w Azji Środkowej, Chinach, Mongolii i na Kaukazie [Szałkiewicz i in., 2006]. Hodowany jest w Europie (Niemcy, Finlandia i Estonia), Azji (Chiny oraz Rosja) oraz Ameryce Północnej [Arimboor i in., 2006]. Liderem w hodowli rokitnika jest Rosja, gdzie wyselekcjonowano ponad 60 ze 150 znanych dziś odmian [Lipowski i in., 2012; Szałkiewicz i in., 2006]. W Polsce znajduje się kilka plantacji rokitnika, na których uprawiane jest 10 odmian sprowadzonych z Białorusi. Większość zbiorów eksportowana jest do Niemiec i Czech [Marszałek i in., 2014].

Należy do rodziny roślin oliwnikowatych (*Elaeagnaceae*) i charakteryzuje się dużą odpornością na mróz i suszę oraz małymi wymaganiami pokarmowymi. Sprawia to, że jest on idealny do obsadzania nieużytków rolnych lub jako roślina dekoracyjna w parkach. Krzewy owocują dopiero w wieku 3-4 lat, zaś największą produktywność

osiągają po około siedmiu i kończą owocować kilkanaście lat później [Arimboor i in., 2006; Kawecki i in., 2010]. Dziko rosnący rokitnik jest w Polsce pod ochroną. Jego krzewy spotkać można na wybrzeżu oraz w Pieninach [Kawecki i in., 2010; Lipowski i in., 2012]. Owoce rokitnika mają kolor od żółtego poprzez pomarańczowy do ciemnopomarańczowego i osiągają średnicę 7-10 mm, a nawet 15 mm. Mogą być wykorzystywane do produkcji przetworów lub być spożywane na surowo [Arimboor i in., 2006; Kawecki i in., 2010; Sobczak, 1997].

Rokitnik i produkty z niego otrzymane należą do grupy produktów nazywanych superfoods. W grupie tej jest 11 owoców – w jej skład wchodzi: acai, borówka amerykańska, żurawina, goji, czerwone winogrona, guarana, mango, mangustan, noni, granat oraz rokitnik [Cieślowska i Cieślowska, 2016; Druri, 2010]. Zaliczany do superowoców (termin użyty po raz pierwszy w 2005 roku) charakteryzuje się kwaśnym smakiem, który poprawia się po przemarzeniu. Jego zapach jest bardzo złożony i według różnych badaczy wyczuwalne są zapachy: truskawki, brzoskwini oraz mango [Gut i in., 2008] lub cytrusa i jagody [Tittinen i in., 2006]. Na charakterystyczny zapach tego owocu składa się 45 lotnych związków w tym: estry, alkohole, aldehydy, ketony i terpeny [Gut i in., 2008; Niesteruk i in., 2013]. W związku z cierpkim smakiem raczej nie nadaje się do bezpośredniej konsumpcji, natomiast świetnie sprawdza się, jako dodatek do produktów z owoców i warzyw, nadając im atrakcyjną barwę i zwiększając ich wartości prozdrowotne [Lipowski i in., 2012].

Historia i właściwości prozdrowotne

Rokitnik i jego właściwości prozdrowotne znane były już w starożytnej Grecji. Stanowił on pokarm dla koni wyścigowych, które zawdzięczały mu lśniąca sierść. Stąd pochodzi jego łacińska nazwa – *Hippophaë* – co oznacza błyszczący koń (*hippos* – koń, *pháo* – błyszczący) [Druri, 2010; Niesteruk i in., 2013; Zeb, 2004]. Karmiono nim także inne zwierzęta, co poza zdrowym włosiem skutkowało także przybieraniem na masie [Suryakumar i Gupta, 2011]. Pierwsze informacje na temat korzystnego wpływu owoców rokitnika można znaleźć w medycznych tekstach pochodzących z Tybetu oraz w greckich dziełach Teofrasta z Ereos (ok. 300 l. p.n.e.) lub Pedaniosa Dioskurydesa – żyjącego na początku pierwszego stulecia, autora pięciotomowego podręcznika ziołarstwa *De Materia Medica* stosowanego aż do XVII wieku naszej ery [Zeb, 2004]. Właściwości prozdrowotne jagód rokitnika były także znane w medycynie ludowej krajów Dalekiego Wschodu i Rosji [Lipowski i in., 2012]. Owoce rokitnika stosowane były jako środek na choroby skórne, kaszel, poprawę krążenia, przeziębienia oraz dolegliwości trawienne [Yang i Kalio, 2002; Zeb, 2004, Stobnicka i in., 2011]. Również obecnie spożywa się

owoce i ich przetwory oraz stosuje się produkty z rokitnika pomocniczo w leczeniu wielu dolegliwości [Bal i in., 2011; Suryakumar i Gupta, 2011].

Rokitnik i preparaty farmaceutyczne z jego udziałem stosowane są w leczeniu chorób układu krążenia. Owoce rokitnika zawierają składniki o działaniu przeciwutleniającym, przeciwbakteryjnymi, zapobiegającym przedwczesnemu starzeniu się komórek [Negi i in., 2005; Kumar i in., 2013]. W związku z dużą zawartością związków o charakterze antyoksydacyjnym oraz przeciwzapalnym uważa się, że rokitnik i jego produkty mogą być stosowane w profilaktyce nowotworowej. Powstrzymują proliferację komórek, minimalizują peroksydację lipidów, pomagają w odtruwaniu organizmu [Suryakumar i Gupta, 2011; Xu i in., 2011]. Opóźniają produkcję wolnych rodników, apoptozę i fragmentację DNA. Badania kliniczne pokazują, że spożycie rokitnika obniża ciśnienie krwi, zwiększa zawartość flawonoidów w surowicy krwi, poprawia odporność naczyń krwionośnych, zapobiega miażdżycy oraz chorobie wieńcowej. Stwierdzono, że składniki znajdujące się w rokitniku mogą poprawić funkcjonowanie układu krążenia i działanie mięśnia sercowego [Zeb, 2004; Suryakumar i Gupta, 2011; Xu i in., 2011; Christaki, 2012; Wani i in., 2016]. Substancje zawarte w jagodach wzmacniają wzrok, wspomagają leczenie choroby popromiennej [Wilkowska i in., 2009], przyspieszają syntezę kolagenu [Suryakumar i Gupta, 2011]. Uważa się także, że mogą być suplementem wspomagającym leczenie gruźlicy w związku z właściwościami immunostymulującymi, przeciwbakteryjnymi oraz osłonowym wpływem na wątrobę [Anbarasu i in., 2015]. Związki występujące w gałęziach i liściach tej rośliny stosowane są do leczenia biegunki oraz innych problemów trawiennych [Yasukawa i in., 2009; Wani i in., 2016]

Olej rokitnikowy wykorzystywany jest w leczeniu oparzeń, odleżyn, odmrożeń, egzemy oraz uszkodzeń skóry i błon śluzowych powstałych na skutek wystawienia ich na działanie słońca i promieniowania radioaktywnego. Działa przeciwbólowo, przyspiesza tworzenie się naskórka i regenerację uszkodzonych tkanek [Yang i in., 2000; Yang i Kallio, 2002; Li i in., 2007; Wilkowska i in., 2009]. Wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne dzięki zawartości steroli oraz alkoholi długołańcuchowych. Zmniejsza objawy atopowego zapalenia skóry [Yang i Kallio, 2002]. Działa łagodząco oraz hamuje aktywność lipazy i lipooksydazy [Zadernowski, 2002; Niesteruk i in., 2013].

Możliwości wykorzystania w przemyśle

W związku z dużą zawartością związków prozdrowotnych zawartych w całej roślinie, już w 1943 r. produkowano pierwsze soki i syropy z rokitnika [Gut i in., 2008].

Przez wieki ludzie wykorzystywali zarówno owoce jak i liście, gałęzie, korzenie oraz korę ze względu na ich medyczne i odżywcze właściwości [Suryakumar i Gupta, 2011]. Najbardziej wartościowe są jednak owoce i znajdujące się w nich pestki [Mendelova i in., 2016]. Jagody składają się w 70% z miąższu, w 22% z pestek oraz w 8% ze skórki [Burcova i in., 2016]. Wykorzystuje się je głównie do produkcji soków oraz olejów o silnych właściwościach prozdrowotnych [Wilkowska i in., 2009]. Świeże lub suszone liście mogą być świetną alternatywą dla zwykłej herbaty. Zaparzone w wodzie dają napar o delikatnym smaku i aromacie, bogatym w wapń, potas, magnez, β -karoten oraz witaminę E [Xu i in., 2011; Wani i in., 2016].

Olej tłoczony z całych jagód lub z samych pestek jest wykorzystywany zarówno do bezpośredniego spożycia jak i w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym [Xu i in., 2011; Yang i in., 2000]. Z ekstraktem z rokitnika produkuje się szampony, mydła, kremy, balsamy, pomadki do ust, krople i maści [Gut i in., 2008; Bal i in., 2011; Niesteruk i in., 2013].

Soki przecierowe lub po obróbce enzymatycznej stają się coraz bardziej pożądanym przez konsumentów produktem w związku z dużą zawartością witaminy C, karotenoidów i innych związków o charakterze prozdrowotnym [Wilkowska i in., 2009]. Nie każdy konsument pozytywnie ocenia soki z rokitnika w związku z ich dość cierpkim smakiem, wynikającym ze znacznej zawartości nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych – zwłaszcza w owocach zbyt dojrzałych lub dłużej przechowywanych [Piłat i Zadernowski, 2014]. Jest to powodem tworzenia nowych produktów, mających znaleźć większe uznanie na rynku. Dobrym pomysłem wydaje się być wytwarzanie nektarów z użyciem soku z owoców rokitnika [Piłat i Zadernowski, 2014]. Owoce nadają się także do produkcji dżemów, konfitur, nalewek, likierów oraz wina [Cieślowska i Cieślowska, 2016; Negi i Dey, 2009; Marszałek i in., 2014]. W ostatnich latach produkuje się coraz więcej różnych produktów z dodatkiem rokitnika nie tylko w celu zwiększenia wartości odżywczych, ale także poprawy właściwości funkcjonalnych produktu. Przykładem mogą być ciasta produkowane z dodatkiem mąki z rokitnika. Charakteryzują się one lepszym wyglądem, kolorem oraz konsystencją i strukturą produktu niż te produkowane w sposób tradycyjny [Sturza i in., 2016]. W ostatnich latach tworzy się także coraz więcej preparatów farmaceutycznych, z wykorzystaniem owoców rokitnika lub jego wyciągów, jako alternatywę do stworzenia naturalnych preparatów multiwitaminowych lub produktów o właściwościach przeciwutleniających mających chronić komórki przed stresem oksydacyjnym [Gut i in., 2008; Jurca i in., 2016]. Inne produkty obecne na rynku produkowane z wykorzystaniem owoców rokitnika to galaretki, przyprawy do mięsa oraz jogurty [Gut i in., 2008].

Skład chemiczny

Rokitnik jest rośliną o niezwykle bogatym składzie chemicznym [Zadernowski i in., 2005; Druri, 2010; Dulf, 2012]. Jagody *Hippophaë rhamnoides* są bogatym źródłem związków fitochemicznych pełniących fizjologiczne role w organizmie człowieka. Należą do nich witaminy rozpuszczalne w wodzie oraz tłuszczach, mikro i makroelementy, kwasy organiczne, przeciwutleniacze i inne [Dulf, 2012]. Ich zawartość jest bardzo silnie uzależniona od odmiany, miejsca uprawy (zarówno długość i szerokość geograficzna jak i wysokość nad poziomem morza), roku zbiorów, na przykład: zawartość kwasu askorbinowego w jagodach zebranych z tych samych upraw, w tym samym miejscu, ale w obrębie dwóch lat może się różnić ponad dwukrotnie (1,61 g/100 ml soku wyciśniętego z jagód zebranych w 2006 roku w porównaniu do 0,64 g/100 ml soku z owoców z 2008 roku) [Zheng i in., 2011].

Liście rokitnika wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym lub do produkcji naparów zawierają znaczne ilości związków bioaktywnych, zwłaszcza fenolowych. Należą do nich flawonole, leukoantocyjanidyny, (-)epikatechina, (+)gallokatechina, (-)epigallokatechina, kwas galusowy. Charakteryzują się także dużą zawartością karotenoidów, chlorofili, wolnych i zestryfikowanych steroli, triterpenów, witaminy E, katechin, kwasu foliowego, ferulowego oraz elagowego. Ponadto można w nich znaleźć pewne ilości magnezu, wapnia i potasu [Syryakumar i Gupta, 2011; Christaki, 2012; Anbarasu i in., 2015].

Owoce *Hippophaë rhamnoides* charakteryzują się zawartością suchej masy w zakresie 12,4-16,0 g/100 g świeżej masy oraz średnią zawartością ekstraktu (6,2-11,5 g/100 g), co pozwala na porównanie ich do innych roślin jagodowych [Zadernowski i in., 2005]. Zawartość popiołu wynosi około 1,8 g/100 g, a zawartość cukrów jest bardzo różna i zazwyczaj waha się w przedziale 2,7-5,8 g/100 g [Bal i in., 2011; Zadernowski i in., 2005]. Podobne wartości otrzymali Zheng i in. [2011], w sokach z owoców rokitnika uprawianych w Chinach. Według tych autorów zawartość cukrów ogółem wahała się, zależnie od regionu uprawy, w granicach 2,74-5,26 g/100 ml soku. Natomiast zawartość kwasów organicznych zależy od odmiany i zawierała się między 1,3-5,0%, a są to m.in. kwas maleinowy, jabłkowy, winowy, szczawiowy i cytrynowy [Univer i in., 2004; Zadernowski i in., 2005; Wilkowska i in., 2009; Bal i in., 2011; Zheng i in., 2011; Piłat i in., 2012; Buya i in., 2012].

Wiele prozdrowotnych związków zawartych w owocach rokitnika ma charakter lipofilny. Owoce zawierają olej nie tylko w nasionach, ale także w miąższu. Zawartość oleju w świeżych owocach wynosi 2,3-3,0 g/100 g, co stanowi 17,2-20,9 g/100 g suchej

masy [Zadernowski, 2003]. Zidentyfikowano 20 kwasów tłuszczowych, zarówno nasyconych jak i nienasyconych, przy czym dominują kwasy nienasycone (53-71,5%) [Zadernowski, 2005]. Główne składniki tzw. oleju tłustego to nienasycone kwasy tłuszczowe, takie jak kwas oleinowy, linolowy, izolinolowy i linolenowy [Zadernowski i in., 2005; Ercisli i in., 2007; Wilkowska i in., 2009; Suryakumar i Gupta, 2011, Bal i in., 2011; Piłat i in. 2012; Buya i in., 2012; Niesteruk i in., 2013]. Tłuszcz rokitnika wyróżnia się także zawartością rzadko występujących w naturze kwasów tłuszczowych z grupy n-7 [Burcova i in., 2016]. Zawartość tokoferoli waha się zależnie od odmiany i wynosi 101-128 mg/100 g oleju (3-18 mg/100 g świeżych owoców). Na tą ilość składa się głównie α -tokoferol, ale zidentyfikowano także γ -, β - oraz δ -tokoferol [Zadernowski i in., 2003, 2005]. Zawartość karotenoidów jest większa w oleju tłoczonym z owoców niż z samych pestek i wynosi 314-2139 mg/100 g oleju (7,94-28,16 mg/100 g świeżych owoców). Głównie na tą ilość składa się γ -karoten (30%), β -karoten (20%) oraz likopen (30%). Zawartość steroli roślinnych waha się od 1,3-2,0%. W owocach rokitnika można także znaleźć większą niż w innych roślinach zawartość witaminy K (0,9-15 mg/100 g) [Zadernowski i in., 2005]. W jagodach znajduje się także znaczna ilość fitosteroli (2,66-5,90 g/100 g) [Hussain i in., 2014].

Cechą wyróżniającą jagody rokitnika spośród innych owoców jest wysoka zawartość witaminy C (27,4-137,9 mg/100 g – wg Zadernowskiego i in. [2005], 52,9-131,0 mg/100 g – wg Teleszko i in. [2015] oraz 250-2500 mg/100 g – [Bal i in., 2011; Buya i in., 2012; Zheng I in., 2011]). Istotny jest także fakt, że rokitnik charakteryzuje się niską aktywnością askorbinazy, co zwiększa trwałość witaminy C w owocach i ich przetworach [Golis, 2010; Niesteruk i in., 2013; Wilkowska i in., 2009; Zheng i in., 2011]. Związki fenolowe występują w rokitniku w formie wolnej i związanej. Do ich głównych przedstawicieli należą kwasy (kawowy, galusowy, protokatechowy oraz chlorogenowy), kwercetyna, izokwercetyna, kemferol, rutyna, antocyjany i katechiny. Ich sumaryczna zawartość waha się od 121 do 550 mg/100 g owoców i jest dość stabilna tj. nie ulega dużym przemianom w trakcie mrożenia owoców [Zadernowski i in., 2005]. W jagodach zidentyfikowanych zostało także 15 mikroelementów, a wśród nich żelazo, bor, miedź, magnez, mangan, nikiel, chrom. W składzie dominował potas, sód, wapń i magnez [Zadernowski i in., 2005; Hussain i in., 2014].

Material i metody

Do badań wykorzystano cztery soki z rokitnika dostępne w sklepach ze zdrową żywnością na terenie Krakowa. Były to soki:

- sok A, 100%, bez konkretnie określonego terminu spożycia po otwarciu – który należy spożyć „jak najszybciej“ po otwarciu,
- sok B, 100%, o terminie przydatności 30 dni po otwarciu,
- sok C, 100%, o terminie przydatności 7 dni po otwarciu,
- sok D, NFC, 100% bez cukru, o terminie przydatności 10 dni po otwarciu.

W sokach oznaczono zawartość ekstraktu refraktometrycznego [PN-90/A-75101/2] oraz flawonoidów ogółem [Socha, 2009]. Soki (1 ml) ekstrahowano 80% metanolem (25 ml) zakwaszonym kwasem solnym. W ekstraktach oznaczono aktywność przeciwutleniającą z zastosowaniem wolnego rodnika DPPH [Brand-Williams i in., 1995], z zastosowaniem wolnego rodnika ABTS [Miller i Rise-Evans, 1996; Zieliński, 2002] oraz metodą kationorodnika FRAP [Benzie i Strain, 1996]. Aktywność metodami ABTS i DPPH wyrażono jako %RSA (Radical Scavenging Activity) czyli zdolność eliminacji wolnych rodników przez związki o działaniu przeciwutleniającym zawarte w 1 ml ekstraktu, natomiast w metodzie FRAP oznaczenie polegało na pomiarze wzrostu absorbancji podczas redukcji związku Fe^{+3} -TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6-tripirydylo-s-triazyny) do Fe^{+2} -TPTZ pod wpływem działania przeciwutleniaczy zawartych w 1 ml soku.

Wyniki

Soki z rokitnika różniły się znacznie między sobą zawartością ekstraktu oraz ilością związków o działaniu przeciwutleniającym. Najwyższą zawartością ekstraktu, flawonoidów i aktywności przeciwutleniającą oznaczoną z użyciem ABTS, DPPH i FRAP charakteryzował się sok D, najmniejszą sok B (Tabela 1). Zawartość ekstraktu w soku B wynosiła tylko 3,02 g/100 g, podczas gdy w pozostałych sokach stwierdzono 7,82-8,37 g/100 g, a więc w zakresie podanym przez Lipowskiego i in. [2012] i Zadernowskiego i in., [2005]. Według Wilkowskiej i in. [2009] zawartość ekstraktu w sokach z rokitnika różniła się ponad dwukrotnie w zależności od sposobu ich pozyskiwania. Również zawartość flawonoidów ogółem w soku B (228 μ g/100 ml) była znacznie niższa niż w pozostałych badanych sokach (643-3391 μ g/100 ml). Aktywność przeciwutleniająca soków wobec ABTS wynosiła 12,7-62,2% RSA, wobec DPPH 21,8-90,0% RSA i była zbliżona do wartości podanych przez Leja i in. [2007], a zdolność do redukcji jonów żelaza mieściła się w zakresie 13,8-101,4 μ mol Fe^{2+} /ml.

Tabela 1. Zawartość ekstraktu, flawonoidów i aktywność przeciwutleniająca soków z rokitnika.

Sok	Ekstrakt [%]	Flawonoidy ogółem [µg/100 ml]	ABTS [%RSA]	DPPH [%RSA]	FRAP [µmolFe ²⁺ /ml]
Sok A	7,82±0,08	643±68	17,2±0,9	31,4±1,4	28,9 ±0,3
Sok B	3,02±0,04	228±13	12,7±1,2	21,8±0,5	13,8±0,7
Sok C	8,23±0,12	1622±42	36,4±1,3	67,1±1,0	59,3±4,4
Sok D	8,37±0,08	3391±49	62,2±1,0	90,0±0,5	101,1±3,7

Podsumowanie

Badane soki różniły się znacznie między sobą zawartością ekstraktu, flawonoidów ogółem i aktywnością przeciwutleniającą. Rokitnik i produkty z niego lub z jego dodatkiem wyprodukowane mogą być świetną alternatywą dla osób spożywających małe ilości świeżych warzyw i owoców. Dostarczą one duże ilości flawonoidów i innych związków o charakterze przeciwutleniającym, mających za zadanie ochronę przed chorobami cywilizacyjnymi.

Projekt został sfinansowany ze środków MNiSW przyznanych na działalność statutową.

Literatura

1. Anbarasu S., Radhakrishnan M., Suresh A., Joseph J. Phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological potentials of seabuckthorn – a mini review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2015, 6, (3), 263-272.
2. Arimboor R., Venugopalan VV., Sarinkumar K., Arumughan C., Chand Sawhney R. Integrated processing of fresh Indian sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries and chemical evaluation of products, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86, 2345–2353.
3. Bal LM., Meda V., Naik SN., Satya S. Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Research International*, 2011, 44, 1718-1727.
4. Benzie IFF., Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239, 70-76.
5. Burcova Z., Kreps F., Schmidt S., Jablonsky M., Haz A., Sladkova A., Surina I. Biologically active compounds of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). 6th

- International Scientific Conference, May 31-June 2, 2016 Tatranske Matliare High Tatras, Slovak Republic.
6. Buya B., Zheng Hu-Zhe, Chung Shin-Kyo. Chemical composition of Mongolian sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruits. *Current Research on Agriculture and Life Sciences*, 2012, 30, 6, 35-39.
 7. Cieślowska B., Cieślowska P. Superfoods czyli żywność o wysokiej wartości odżywczej. Wydawnictwo SBM Sp. z o.o., Warszawa 2016, ISBN 978-83-8059-055-7.
 8. Druri M. Superowoce. *Przemysł Spożywczy*, 2010, 64, 5, 12-16.
 9. Dulf F. V. Fatty acids in berry lipids of six sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L., *subspecies carpatica*) cultivars grown in Romania. *Chemistry Central Journal*, 2012, 6, (106).
 10. Ercisli S., Orhan W., Ozdemir O., Sengul M. The getotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries grown in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 2007, 115, 27-33.
 11. Golis T. Rokitnik pospolity – naturalna apteka. *Hasło Ogrodnicze*, 2010, 8, 95-97.
 12. Gut M., Gasik A., Mitek M. Rokitnik – roślina niczym apteka. *Przemysł Spożywczy*, 2008, 6, 36-38.
 13. Hussain M., Ali S., Awan S., Hussain M., Hussain I. Analysis of minerals and vitamins in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pulp collected from Ghizer and Skardu districts of Gilgit-Baltistan, *International Journal of Biosciences*, 2014, 12, 144-152.
 14. Christaki E. *Hippophaë rhamnoides* L. (Sea Buckthorn): a potential source of nutraceuticals. *Food and Public Health*, 2012, 2(3), 69-72.
 15. Jurca T., Vicas, L., Marian E., Vicas, S., Muresan M. A new natural antioxidant supplement - design and development. *Farmacologia*, 2016, 64, 1, 135-142.
 16. Kawecki Z., Bieniek A., Szalkiewicz M. Plonowanie i cechy biometryczne owoców rokitnika zwyczajnego *Hippophaë rhamnoides* L. *Acta Scientiarum Polonorum, Administratio Locorum*, 2010, 9(3), 45–53.
 17. Kumar MSY., Tirpude RJ., Maheshwari DT., Bansal A., Misra K. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaves in vitro. *Food Chemistry*, 2013, 141, 3443-3450.
 18. Leja M., Mareczek A., Nanaszko B. Antyoksydacyjne właściwości owoców wybranych gatunków dziko rosnących drzew i krzewów. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu*, 2007, 383, 327-331.

19. Li T. S. C., Beveridge T. H. J., Drover J. C. G. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 2007, 101, 1633-1639.
20. Lipowski J., Marszałek K., Skąpska S., Jasińska U. Charakterystyka owoców wybranych odmian rokitnika pospolitego (*Hippophaë rhamnoides* L.) uprawianych w Polsce. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2012, 7-8, 18-20.
21. Marszałek K., Lipowski J., Skąpska S. Wykorzystanie rokitnika pospolitego (*Hippophaë rhamnoides* L.) do produkcji dżemów. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2014, 3, 12-14.
22. Mendelova A., Mendel L., Czako P., Marecek J. Evaluation of carotenoids, polyphenols content and antioxidant activity in the sea buckthorn fruit juice. *Potravinarstvo*, 2016, 10, 1, 59-64.
23. Miller NJ., Rice-Evans CA. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 1996, 2, 161-171.
24. Negi B. Dey G. Comparative analysis of total phenolic content in sea buckthorn wine and other selected fruit wines. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2009, 3, 350-353.
25. Negi PS., Chauhan AS., Sadia GA., Rohinishree YS., Ramteke RS. Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 2005, 92, 119-124.
26. Niesteruk A., Lewandowska H., Golub Ż., Świśłocka R., Lewandowski W. Zainteresujmy się rokitnikiem. Preparaty z rokitnika zwyczajnego (*Hippophaë rhamnoides* L.) jako dodatki do żywności oraz ocena ich rynku w Polsce. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2013, 62, 4(301), 571-581.
27. Piłat B., Zadernowski R. Nektary owocowe z udziałem soku z owoców rokitnika. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2014, 47, 3, 676-680.
28. Piłat B., Zadernowski R., Bieniek A. Charakterystyka chemiczna różnych odmian rokitnika. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2012, 45, 3, 897-901.
29. PN-90/A-75101/2. Przetwory owocowe i warzywne - Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych - Oznaczanie zawartości ekstraktu ogólnego. *Polski Komitet Normalizacyjny*, 1990.
30. Sobczak R. Bez i rokitnik. *Głos Lasu*, 1997, 4, 5-8.
31. Socha R., Juszczak L., Pietrzyk S., Fortuna T. Antioxidant activity and phenolic compounds of herbhoneys. *Food Chemistry*, 2009, 113, 568-574.
32. Stobnicka A., Gniewosz M., Miętuszevska A. Przeciwbakteryjne działanie soków owocowych z żurawiny, rokitnika, noni i goji. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2011, 44, 3, 650-655.

33. Sturza RA., Ghendov-Mosanu AA., Deseatnicov OI., Suhodol NF. Use of sea buckthorn fruits in the pastry manufacturing. Scientific Study and Research - Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, 2016, 17, 1, 35.
34. Suryakumar G., Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.). Journal of Ethnopharmacology, 2011, 138, 268-278.
35. Szalkiewicz M., Zadernowski R. Rokitnik: możliwości jego produkcji i wykorzystania owoców. Hasło Ogrodnicze, 2006, <http://www.ho.haslo.pl/article.php?id=2601>.
36. Teleszko M., Wojdyło A., Rudzińska M., Oszmiański J., Golis T. Analysis of lipophilic and hydrophilic bioactive compounds content in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63, 16, 4120-4129.
37. Tittinen K., Hakala M., Kallio H. Headspace volatiles from frozen berries of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) varieties. European Food Research and Technology, 2006, 223, 455-460.
38. Univer T., Jalakas M., Kelt K. Chemical composition of the fruits of sea buckthorn and how it changes during the harvest season in Estonia. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. Special ed., 2004, 12, 339-344.
39. Wani TA., Wani SM., Ahmad M., Ahmad M., Gani A., Masoodi FA. Bioactive profile, health benefits and safety evaluation of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.): A review. Cogent Food and Agriculture, 2016, 2, 1128519.
40. Wilkowska A., Pogorzelski E., Ambroziak W., Gwiazdecki R. Kierunki przetwórstwa jagód rokitnika. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2009, 4, 7-8.
41. Xu YJ., Kaur M., Dhillon RS., Tappia PS., Dhalla NS. Health benefits of sea buckthorn for the prevention of cardiovascular diseases. Journal of Functional Food, 2011, 3, 2-12.
42. Yang B., Kalimo KO., Tahvonon RL., Mattila LM., Katajisto JK., Kallio HP. Effect of dietary supplementation with sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) seed and pulp oils on the fatty acid composition of skin glyceropholipids of patients with atopic dermatitis. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2000, 11, 338-340.
43. Yang B., Kallio H. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophaë*) lipids. Trends in Food Science and Technology, 2002, 13, 160-167.
44. Yasukawa K., Kitanaka, S., Kawata K., Goto K. Anti-tumor promoters phenolic and triterpenoid from *Hippophaë rhamnoides*. Fitoterapia, 2009, 80, 164-167.

45. Zadernowski R., Naczek M., Amarowicz R. Tocopherols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2003, 80, 1, 55-58.
46. Zadernowski R., Szalkiewicz M., Czaplicki S. Skład chemiczny i wartość odżywcza owoców rokitnika [*Hippophae rhamnoides* L.]. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2005, 49, 8-9, 56-58.
47. Zeb A. Important therapeutic uses of Sea Buckthorn (*Hippophaë*): a review. Journal of Biological Sciences, 2004, 4, 5, 687-693.
48. Zheng J., Kallio H., Linderborg K., Yang B. Sugars, sugar alcohols, fruit acids, and ascorbic acid in wild Chinese sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* ssp. *sinensis*) with special reference to influence of latitude and altitude. Food Research International, 2011, 44, 2018-2026.
49. Zieliński H. Low molecular weight antioxidant in cereal grains – a review. Polish Journal of Food and Nutritional Sciences, 2002, 11, 52, 3-9.

Rozdział 10

Łukasz Wajda, Aleksandra Duda-Chodak, Aleksandra Pękala

*Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej,
Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

*Kierownik katedry: dr hab. inż. Paweł Satora, prof. UR
Promotor: dr hab. Aleksandra Duda-Chodak*

OCENA ORGANOLEPTYCZNA NIEPASTERYZOWANYCH NAPOJÓW OWOCOWYCH WZBOGACANYCH SPIRULINĄ

Streszczenie

Wzrost konkurencji pomiędzy producentami żywności wymaga opracowywania nowych produktów, które dzięki swoim niepowtarzalnym właściwościom znajdą nabywców i pozwolą na pozostanie na rynku. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie niepasteryzowanymi sokami owocowymi, dodatkowo wzbogaconymi w witaminy, przeciwutleniacze, minerały, ekstrakty z egzotycznych owoców czy wyciągi z ziół bądź roślin leczniczych. Ze względu na bogactwo składników odżywczych spirulina (wysuszona biomasa sinic *Arthrospira platensis*) jest powszechnie wykorzystywana w profilaktyce i leczeniu wielu jednostek chorobowych, a ostatnio wzbudza też zainteresowanie jako składnik funkcjonalny lub barwnik żywności. Jednak, z uwagi na nieprzyjemny zapach, dodawanie biomasy sinic do soków owocowych stanowi duże wyzwanie dla producenta. Celem badań było sprawdzenie czy niepasteryzowane napoje uzyskane z kiwi, jabłek i winogron oraz wzbogacone biomasą sinic z rodzaju *Arthrospira* w stężeniu 0,5 do 1,5% znajdują akceptację potencjalnych konsumentów.

Uzyskane wyniki wskazują, że konsumenci pozytywnie przyjęli napój z kiwi z dodatkiem spiruliny w stężeniu 0,5% oraz napój winogronowy ze spiruliną w stężeniu 0,5% do 1,5%. Zmiany barwy, kwaśności, słodkości oraz ogólnej smakowości wywołane dodatkiem biomasy sinic do soku jabłkowego były niekorzystne i uzyskany produkt oceniono gorzej niż wyjściowy sok jabłkowy. W przypadku wykorzystania tego surowca do produkcji napojów warto rozważyć wzbogacanie ekstraktem z sinic zamiast całą ich wysuszoną biomasą.

Słowa kluczowe: cyjanobakterie, napoje owocowe, ocena organoleptyczna

Wprowadzenie

Rozwój cywilizacyjny oraz postęp technologiczny, choć bardzo korzystne pod względem uproszczenia funkcjonowania człowieka w świecie, spowodowały jednocześnie pogorszenie jakości życia. Towarzyszące im zwiększenie tempa życia, spożywanie pokarmów zawierających ilości cukrów i tłuszczów znacznie przekraczające zapotrzebowanie organizmu ludzkiego, dostępność używek oraz coraz częstsza i dłuższa ekspozycja na zanieczyszczenia i stres, przy jednoczesnym zmniejszeniu aktywności fizycznej spowodowały, że - mimo postępu i rozwoju cywilizacji - ludzie coraz częściej mają problemy zdrowotne natury fizycznej i psychicznej. Zapadalność na tzw. „choroby cywilizacyjne”, w tym cukrzycę, miażdżycę, rozmaite nowotwory czy otyłość, stale rośnie i wymusza by nie tylko lekarze włączyli się w walkę z nimi. Istotną rolę w zwalczaniu objawów choroby pełnią także dietetycy, producenci żywności, fizjoterapeuci i trenerzy, zaś w edukowaniu i profilaktyce również nauczyciele.

Jednym ze sposobów zapobiegania rozwojowi wielu chorób niezakaźnych jest stosowanie zróżnicowanej diety bogatej w cenne składniki bioaktywne, wywierające korzystny wpływ na zdrowie konsumenta. Wiele produktów obecnie dostępnych na rynku przechodzi obróbkę chemiczną oraz fizyczną, tracąc przy tym cenne dla zdrowia składniki odżywcze, w tym witaminy, przeciwutleniacze i minerały. Wzrost świadomości konsumentów sprawia, że coraz chętniej sięgają oni po produkty jak najmniej przetworzone, bądź wzbogacane w te cenne składniki. Niepasteryzowane soki owocowe są idealnym rozwiązaniem dla osób, które dbają o racjonalny sposób odżywiania i pragną uzupełnić niedobory substancji odżywczych w organizmie, gdyż są one idealnym źródłem wielu cennych witamin, błonnika oraz składników mineralnych. Dzięki temu pomagają w utrzymaniu prawidłowej masy ciała, oczyszczają organizm z toksyn oraz zapobiegają powstawaniu wielu chorób [Słowińska i Wądołowska, 2015]. Świeżo wyciskane soki mogą być spożywane jako jedna z pięciu zalecanych w ciągu dnia porcji warzyw i owoców.

Wysoka konkurencja pomiędzy producentami żywności wymaga tworzenia nowych produktów, które znajdą zainteresowanie wśród konsumentów i pozwolą na utrzymanie firmy na rynku. Dlatego też soki są dodatkowo wzbogacane w witaminy czy minerały, ekstrakty z egzotycznych owoców czy wyciągi z ziół bądź roślin leczniczych. W ostatnich latach zaczęto badania nad dodawaniem do żywności substancji pochodzenia bakteryjnego. Na dużą uwagę zasługuje biomasa cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*.

Spirulina

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* należą do sinic, fotosyntetyzujących bakterii o nitkowatych komórkach i niebiesko-zielonym zabarwieniu. Naturalnie występują w ciepłych alkalicznych jeziorach z regionów tropikalnych i subtropikalnych, o dużej zawartości węglanów, wodorowęglanów oraz wysokim zasoleniu [Ali i Saleh, 2012]. Na rynku preparaty z wysuszonej biomasy sinic *Arthrospira platensis* lub *Arthrospira maxima* dostępne są pod nazwą 'spirulina' i są sprzedawane w postaci proszku, sprasowanych tabletek oraz chipsów [Miklaszewska i in., 2008a]. Coraz częściej dodaje się spirulinę do żywności, gdyż jej biomasa stanowi cenne źródło wielu substancji odżywczych [Wolfe, 2009] oraz stanowi źródło naturalnych barwników [Habib i in., 2008].

Ogromną wartość żywieniową spirulina zawdzięcza wysokiej zawartości białka, witamin, soli mineralnych, kwasów tłuszczowych oraz barwników (chlorofil, karotenoidy, fikocyjanina) [Miklaszewska i in., 2008a, 2008b; Chow i Deng, 2010]. Wysokowartościowe białko stanowi 60-70% suchej masy, co daje większą zawartość tej grupy substancji odżywczych niż w mięsie, jajach, mleku w proszku czy ziarnach soi. Ponadto, spirulina zawiera wszystkie niezbędne aminokwasy egzogenne oraz endogenne, a białko to cechuje się bardzo dobrą przyswajalnością (83-90%), z uwagi na brak ścian celulozowych w komórkach bakterii. Dlatego też preparaty przygotowane na bazie spiruliny nie wymagają obróbki termicznej, zapewniającej zwiększenie dostępności białek [Hosseini i in., 2013].

Biomasa spiruliny jest cennym źródłem wielu witamin o korzystnym wpływie na organizm człowieka, w tym witamin B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C, D, E, biotyny, kwasu foliowego [Ali i Saleh, 2012].

Kolejną istotną grupą składników odżywczych, która również występuje w biomacie opisywanych cyjanobakterii, są kwasy tłuszczowe, w tym nienasycone kwasy tłuszczowe (kwas gamma-linolenowy GLA) oraz omega-3 i omega-6. Kwasy te wykazują wielorakie działanie, m.in. zapobiegają zawałom serca i udarom mózgu, poprawiają krążenie, obniżają poziom cholesterolu, regulują podziały komórek oraz pomagają usuwać nadmiar płynów z organizmu [Moorhead i in., 2011].

W biomacie sinic z rodzaju *Arthrospira* związki mineralne występują w dużych ilościach. Spośród mikroelementów należy wymienić: żelazo, miedź, chrom, cynk, jod oraz selen; natomiast spośród makroelementów: wapń, magnez oraz fosfor. Substancje mineralne, obecne w spirulinie, polecane są szczególnie dla vegetarian, ponieważ uzupełniają niedobory składników, które są tracone podczas stosowania diety bezmięsnej. Zawartość makroelementów w spirulinie jest porównywalna do tych ilości, które znajdują

się w mleku. Ponadto spirulina jest pokarmem bogatym w żelazo. Wchłanianie tego pierwiastka jest o 60% skuteczniejsze niż wchłanianie siarczanu żelaza obecnego w preparatach farmaceutycznych z żelazem. Warto również zwrócić uwagę na jod, którego ilość znajdująca się w biomacie sinic (3 $\mu\text{g}/10$ g suszonej biomasy) jest dawką bezpieczną, nie powodującą efektu przedawkowania [Hosseini i in., 2013].

Ze względu na bogactwo składników odżywczych spirulina jest powszechnie wykorzystywana w profilaktyce i leczeniu wielu jednostek chorobowych [Belay, 2002]. Jak dotąd wykazano i potwierdzono naukowo jej działanie antymutagenne, antynowotworowe, przeciwwrzodowe, detoksykacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, antyoksydacyjne, przeciwzapalne, odchudzające oraz wspomagające działanie układu immunologicznego [Hayashi i in., 1993; Hayashi i in., 1996; Bhat i Madyastha, 2000; Furse i in., 2001; Hernandez-Corona i in., 2002; Hirahashi i in., 2002; Chamorro-Cevallos i in., 2008; Cingi i in., 2008; Chirasuwan i in., 2009; Azharuddin i in., 2010; Chow i Deng, 2010; Duda-Chodak i in., 2010; Pielesz, 2010; Ali i Saleh, 2012; Hosseini i in., 2013], choć należy zaznaczyć, że przytaczane badania dotyczą głównie badań w warunkach *in vitro* lub dotyczą zwierząt. Spirulina znajduje też zastosowanie w preparatach kosmetycznych, głównie z uwagi na jej działanie przeciwrodnikowe, antibakteryjne oraz wysoką zawartość białka, witamin i minerałów [Priyadarshain i Rath, 2012].

Cenne składniki spiruliny świadczą o ogromnym potencjale jaki tkwi w tych mikroorganizmach i stwarzają możliwości ich wykorzystania w produkcji wzbogaconych napojów owocowych. Niestety, spirulina ma dość nieprzyjemny, intensywny zapach (trawy, morza, a nawet rybi, w zależności od stężenia), przez co jej wprowadzanie do wielu produktów stanowi nie lada wyzwanie dla producentów.

Jak dotąd wytwarzane są napoje warzywne z dodatkiem biomasy tych sinic w formie proszku, gdyż intensywny smak i zapach niektórych warzyw oraz zbliżona nuta, przejawiająca się zapachem i posmakiem trawiastym, umożliwiając zamaskowanie nieprzyjemnych wrażeń organoleptycznych pochodzących od spiruliny. W przypadku owoców jest to o wiele trudniejsze, gdyż cechują się one delikatniejszym smakiem i aromatem, na dodatek o całkowicie odmiennym charakterze, przez co trudno jest zniwelować nieprzyjemne doznania węchowe.

Dlatego też celem tej pracy było sprawdzenie czy zaproponowane przez nas niepasteryzowane napoje owocowe wzbogacane biomasą sinic z rodzaju *Arthrospira* znajdują akceptację potencjalnych konsumentów.

Material i metody

W doświadczeniach wykorzystano owoce kiwi (odmiana Hayward, Włochy), jabłek (odmiana Ligol, Polska) oraz winogron (odmiana Regina, Hiszpania). Wybrano takie owoce, których barwa jest pochodną koloru zielonego, dzięki czemu – w zamyśle – powinna się dobrze komponować z barwą dodanej biomasy sinic o intensywnie zielonym kolorze. Owoce umyto, usunięto niejadalne części (liście, skórki, ogonki) i przy użyciu sokowirówki (ZELMER typ 476) pozyskano z nich sok.

W celu zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego napojów oraz lepszego rozprowadzenia spiruliny w sokach owocowych odpowiednio przygotowano biomasę przed dodaniem do soku. W tym celu mieszano 35 g spiruliny (suplement diety firmy Ivarsson's, Niemcy) z etanolem w stosunku 1:1, po czym mieszaninę homogenizowano przy użyciu homogenizatora laboratoryjnego (IKA T-25 Ultra-Turrax Digital High-Speed Homogenizer Systems, 1 min, 16 000 rpm) i po odparowaniu etanolu (przy użyciu CO₂) biomasę dodano do przygotowanych wcześniej soków owocowych.

Końcowe stężenia spiruliny wynosiły 0% (czysty wyjściowy sok), 0,5%, 1,0% oraz 1,5% (w/v). Stężenie 1,5% jest maksymalnym stężeniem zalecanym dla soków i napojów owocowych przez FDA gwarantującym bezpieczeństwo stosowania (GRAS) [FDA, 2011]. Uzyskane napoje poddano energicznemu wymieszaniu przy użyciu blendera kuchennego, po czym rozlano do szklanych naczyń opisanych zakodowanymi symbolami.

Ocenę organoleptyczną przeprowadzono metodą skalowania (ocena zapachu, barwy, konsystencji, kwaśności, słodkości oraz smakowitości) w laboratorium Katedry Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej Wydziału Technologii Żywności (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie). Wykorzystano skalę 5-punktową (1 – ocena najniższa, 5 – ocena najwyższa) oraz następujące współczynniki ważkości: zapach – 0,2; barwa – 0,15; konsystencja – 0,15; kwaśność – 0,15; słodkość – 0,15; smakowitość – 0,2. W ocenie organoleptycznej brało udział 15 osób, które poproszono o wypełnienie karty oceny organoleptycznej.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie R: A Language and Environment for Statistical Computing, Version 3.1.3 (Foundation for Statistical Computing, Wiedeń, Austria 2015). Przy wykonywaniu obliczeń posłużono się testem Shapiro-Wilka w celu sprawdzenia normalności rozkładu zmiennej losowej (poziom istotności 0,05). W celu analizy wpływu stężenia spiruliny na kształtowanie się oceny danego wskaźnika sensorycznego wykorzystano test Kruskala-Wallisa oraz test Dunna.

Wyniki i dyskusja

Wyniki oceny organoleptycznej przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki oceny organoleptycznej dla napojów z dodatkiem spiruliny.

Wyróżnik	Stężenie końcowe spiruliny [% w/v]	Napój z kiwi	Napój jabłkowy	Napój winogronowy
Smakowitość	0,0	0,85 ± 0,18 ^a	0,85 ± 0,18 ^a	0,71 ± 0,25 ^a
	0,5	0,79 ± 0,19 ^a	0,88 ± 0,13 ^a	0,77 ± 0,18 ^a
	1,0	0,77 ± 0,24 ^a	0,73 ± 0,16 ^b	0,71 ± 0,18 ^a
	1,5	0,67 ± 0,29 ^a	0,71 ± 0,25 ^b	0,63 ± 0,24 ^a
Zapach	0,0	0,89 ± 0,17 ^a	0,77 ± 0,24 ^a	0,55 ± 0,28 ^a
	0,5	0,83 ± 0,18 ^a	0,72 ± 0,20 ^a	0,64 ± 0,17 ^a
	1,0	0,76 ± 0,24 ^a	0,68 ± 0,20 ^a	0,60 ± 0,17 ^a
	1,5	0,71 ± 0,28 ^a	0,63 ± 0,24 ^a	0,64 ± 0,17 ^a
Barwa	0,0	0,52 ± 0,11 ^a	0,66 ± 0,08 ^a	0,35 ± 0,21 ^a
	0,5	0,69 ± 0,09 ^b	0,52 ± 0,14 ^b	0,41 ± 0,13 ^a
	1,0	0,68 ± 0,08 ^b	0,53 ± 0,15 ^b	0,59 ± 0,15 ^b
	1,5	0,68 ± 0,10 ^b	0,56 ± 0,16 ^b	0,60 ± 0,14 ^b
Konsystencja	0,0	0,65 ± 0,13 ^a	0,63 ± 0,13 ^a	0,50 ± 0,23 ^a
	0,5	0,69 ± 0,08 ^a	0,59 ± 0,12 ^a	0,54 ± 0,14 ^a
	1,0	0,68 ± 0,08 ^a	0,56 ± 0,13 ^a	0,59 ± 0,13 ^a
	1,5	0,68 ± 0,10 ^a	0,54 ± 0,18 ^a	0,57 ± 0,13 ^a
Kwaśność	0,0	0,65 ± 0,13 ^a	0,65 ± 0,13 ^a	0,53 ± 0,15 ^a
	0,5	0,69 ± 0,08 ^a	0,60 ± 0,10 ^b	0,54 ± 0,19 ^a
	1,0	0,68 ± 0,08 ^a	0,57 ± 0,08 ^b	0,58 ± 0,13 ^a
	1,5	0,68 ± 0,10 ^a	0,48 ± 0,14 ^c	0,50 ± 0,15 ^a
Słodkość	0,0	0,60 ± 0,14 ^a	0,65 ± 0,12 ^a	0,53 ± 0,15 ^a
	0,5	0,63 ± 0,12 ^a	0,61 ± 0,12 ^a	0,60 ± 0,15 ^a
	1,0	0,62 ± 0,10 ^a	0,52 ± 0,14 ^b	0,56 ± 0,18 ^a
	1,5	0,61 ± 0,12 ^a	0,48 ± 0,16 ^b	0,50 ± 0,19 ^a
Ocena sumaryczna	0,0	4,17 ± 0,15 ^a	4,22 ± 0,09 ^a	3,17 ± 0,11 ^a
	0,5	4,28 ± 0,08 ^a	3,92 ± 0,13 ^b	3,50 ± 0,12 ^a
	1,0	4,08 ± 0,07 ^a	3,59 ± 0,09 ^c	3,63 ± 0,05 ^a
	1,5	3,89 ± 0,04 ^b	3,39 ± 0,09 ^c	3,44 ± 0,06 ^a

Te same litery przy wartościach średnich punktacji za dany wyróżnik w obrębie danego napoju wskazują na brak statystycznie istotnych różnic dla $p < 0,05$. W przypadku barwy statystycznie istotne różnice wystąpiły przy $p < 0,01$.

Spośród wszystkich ocenianych wariantów najwyższą ocenę sumaryczną uzyskał napój z kiwi z dodatkiem spiruliny w stężeniu 0,5%. Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic w odbiorze przez konsumenta smakowitości, zapachu, konsystencji,

kwaśności i słodkości pomiędzy napojami z kiwi o różnej zawartości spiruliny oraz w porównaniu z sokiem wyjściowym (0% spiruliny). Natomiast w przypadku barwy napoju z kiwi wykazano, że dodatek biomasy sinic wpłynął korzystnie na ocenę tego parametru, przy czym nie stwierdzono istotnego wpływu stężenia zastosowanego dodatku. Zarówno biomasa sinic, jak i napój z kiwi charakteryzują się zieloną barwą, dlatego też niewielki dodatek spiruliny wywoływał pogłębienie koloru napoju, co podniosło jego atrakcyjność i spowodowało uzyskanie istotnie wyższych ocen konsumenckich niż dla soku z kiwi bez jej dodatku. Brak zauważalnego wpływu wzrastającej dawki spiruliny na wyniki oceny barwy spowodowany był prawdopodobnie przez opadanie biomasy na dno naczynia, w którym podawano napój. Ponieważ tylko niewielka ilość barwników ulegała rozpuszczeniu w soku, intensywność barwy nie ulegała istotnej zmianie. Z drugiej strony, objętość występującego w napoju osadu, będącego zjawiskiem naturalnym, wizualnie nie różniła się pomiędzy badanymi wariantami, stąd nie wpłynęła na ocenę konsumentów. Niska nota końcowa napoju z kiwi o 1,5% dodatku spiruliny jest prawdopodobnie efektem skumulowania się nieco gorszej akceptowalności zapachu i smakowitości tego napoju. Uzyskane wyniki sugerują, że sok z kiwi wzbogacany spiruliną znajdzie zainteresowanie wśród konsumentów pod warunkiem, że producent właściwie dobierze stężenie dodatku.

Podobnie jak w przypadku napoju z kiwi, także w przypadku napoju z winogron jedynie w odniesieniu do barwy stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy sokiem wyjściowym a napojami zawierającymi 1% i 1,5% spiruliny. Należy przy tym podkreślić, że w tym przypadku, barwa wyjściowego soku winogronowego (nieklarowanego i niepasteryzowanego) była odbierana raczej negatywnie przez ankietowanych. Dochodziło do rozwarstwienia się cząstek stałych soku od jego klarownej frakcji, a górna frakcja soku w krótkim czasie ulegała procesowi brunatnienia, co w rezultacie przełożyło się na znaczne obniżenie not z oceny wizualnej. Wprowadzenie do soku spiruliny znacząco poprawiło ostateczną barwę napoju, choć nadal występowało rozwarstwianie się fazy płynnej (ośrodek rozpraszający) oraz stałej (w tym przypadku nierozpuszczalna w soku spirulina). Dlatego też, do produkcji tego typu napoju konieczne będzie zastosowanie metod ograniczających rozwarstwianie soków, np. wykorzystanie hydrokoloidów, zmniejszenie wielkości cząsteczek stałych poprzez homogenizację, wirowanie, dodatek preparatów pektynowych, podgrzewanie miazgi. Procesy te muszą być jednak wcześniej dokładnie przebadane, aby dobrać najlepsze parametry, gdyż mogą przyczynić się do zmniejszenia lub osłabienia walorów smakowo-zapachowych soków owocowych [Hoffmann i Żebrowska-Krasuska, 2012]. W ogólnej ocenie, napój winogronowy z dodatkiem spiruliny pozyskał jednak akceptację konsumentów uzyskując noty wyższe niż wyjściowy sok winogronowy.

W przypadku soku z jabłek stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic dla parametrów takich jak zapach i konsystencja, natomiast istotne statystycznie pogorszenie jakości zaobserwowano w odniesieniu do smakowości, barwy, kwaśności oraz słodkości, szczególnie dla większych dawek spiruliny. Wyjściowy sok jabłkowy miał atrakcyjną, typową dla danego surowca barwę; dodatek biomasy spiruliny spowodował niekorzystne zmiany w postaci barwy, która nie uzyskała akceptacji konsumentów (wg ankietowanych 'bura', 'brudna', 'obca'). Sok z jabłek miał też delikatny, lekko kwaskowy i lekko słodki smak. W napojach z dodatkiem 1% i 1,5% spiruliny, wyczuwalność kwaśności i słodkości istotnie zmalały, sok stał się mdły, jakby rozwodniony, a jednocześnie nieprzyjemny aromat pochodzący z biomasy był już na tyle wyczuwalny, że ostatecznie negatywnie wpłynął na ogólną smakowość napoju.

We wszystkich ocenianych napojach stwierdzono występowanie pewnej wady technologicznej – po niedługim czasie następowało rozwarstwienie z osadzeniem spiruliny na dnie naczynia. By uniknąć wpływu tego zjawiska na odbiór napoju przez konsumenta można zastosować butelki z ciemnych tworzyw, podać informację o konieczności zmieszania zawartości przed spożyciem, ostatecznie zastosować odpowiednie dodatki do żywności wydłużające stan zawieszenia cząstek spiruliny w całej objętości napoju. Ostatni z wymienionych zabiegów nie jest jednak pożądany przez konsumentów, którzy szukają produktów jak najbliższych surowcom, z jak najmniejszą ilością dodatków "technologicznych". Dlatego też, kolejnym etapem badań będzie zastosowanie jako dodatku do soków i napojów zamiast sproszkowanej biomasy cyjanobakterii przygotowanego z niej ekstraktu. Takie podejście technologiczne powinno z jednej strony rozwiązać problem z osadem, a z drugiej istotnie zmniejszyć niekorzystne zmiany sensoryczne jakie obserwowano dla napoju jabłkowego. W ten sposób znacząco wydłuży się lista owoców, z których można będzie przygotować napoje wzbogacane spiruliną, a tym samym potencjalnie wzrośnie asortyment takich napojów.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują, że niepasteryzowane napoje z kiwi oraz z winogron wzbogacane spiruliną zyskują zainteresowanie konsumentów i warto rozważyć ich wprowadzenie na rynek. Należy przy tym podkreślić, że dla soku z kiwi stężenie spiruliny zapewniające korzystne zmiany barwy napoju wynosi 0,5% (w/v), zaś w napoju winogronowym zakres stężeń dodatku może być szerszy, od 0,5 do 1,5%. Sok jabłkowy po wzbogaceniu biomasą sinic nie uzyskał akceptacji konsumenta, przede wszystkim ze względu na negatywny odbiór barwy, kwaśności, słodkości oraz ogólnej smakowości. W dalszych badaniach warto też rozważyć wytworzenie napojów

wielooowocowych lub wzbogacanie ich ekstraktem z sinic zamiast całą ich wysuszoną biomasą.

Projekt został częściowo sfinansowany ze środków przyznanych na Badania Młodych nr decyzji BM-4734/KTFiMT/16.

Literatura

1. Ali S.K., Saleh A.M. Spirulina - An Overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, 3, 9–15.
2. Azharuddin S., De S.L., Paul S., Ravi M. The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2010, 2, 73–83.
3. Belay A. The potential application of Spirulina (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 2002, 5, 27–49.
4. Bhat V.B., Madyastha K.M.: C-Phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2000, 275, 20–25.
5. Chamorro-Cevallos G., Garduño-Siciliano L., Barrón B.L., Madrigal-Bujaidar E., Cruz-Vega D.E., Pages N. Chemoprotective effect of Spirulina (*Arthrospira*) against cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46, 567–574.
6. Chirasuwan N., Chaiklahan R., Kittakoop P., Chanasattru W., Ruengjitchatchawalya M., Tanticharoen M., Bunnag B. Anti HSV-1 activity of sulphoquinovosyl diacylglycerol isolated from *Spirulina platensis*. *Science Asia*, 2009, 35, 137–141.
7. Chow T-J., Deng R. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovascular Therapeutics*, 2010, 28, 33–45.
8. Cingi C., Conk-Dalay M., Cakli H., Bal C. The effects of spirulina on allergic rhinitis. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 2008, 265, 1219–1223.
9. Duda-Chodak A., Wajda Ł., Kobus M., Kubica M., Tarko T. Wpływ bakterii z rodzaju *Arthrospira* na funkcjonowanie układu immunologicznego *Postępy Mikrobiologii*, 2010, 49, 1, 15–23.
10. FDA 2011: <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm269772.pdf> (dostęp on-line 18.11.2016 r.)

11. Furse R.K., Rossetti R.G., Zurier R.B. Gamma-linolenic acid, an unsaturated fatty acid with anti-inflammatory properties, blocks amplification of IL-1 beta production by human monocytes. *Journal of Immunology*, 2001, 167, 490–496.
12. Habib M.A.B., Huntington T.C., Hasan M.R. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034, Rzym, 2008.
13. Hayashi K., Hayashi T., Morita N., Kojima I. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of Herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cells. *Phytotherapy Research*, 1993, 7, 76–80.
14. Hayashi K., Hayashi T., Kojima I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 1996, 12, 1463–1471.
15. Hernandez-Corona A., Nieves I., Meches M., Camorro G., Barron B.L. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*, 2002, 56, 279–285.
16. Hirahashi T., Matsumodo M., Hazzeki K., Saeki Y., Ui M., Seya T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International Immunopharmacology*, 2002, 2, 423–434.
17. Hoffmann M., Żebrowska-Krasuska M. Prozdrowotne soki i napoje - nowe trendy. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2012, 2, 105–109.
18. Hosseini S.M., Khosravi-Darani K., Mozafari M.R. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, 13 (8), 1231–1237.
19. Miklaszewska M., Waleron M., Waleron K. Biotechnologiczny potencjał cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*. *Biotechnologia*, 2008a, 3 (82), 119–142.
20. Miklaszewska M., Waleron M., Waleron K. Charakterystyka jadalnej cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*. *Biotechnologia*, 2008b, 3 (82), 103–118.
21. Moorhead K., Capelli B., Cysewski G.R. *Spirulina*- Nature's Superfood. wyd. Cyanotech Corporation, Kailua-Kona, Hawaii, USA, 2011.
22. Pielesz A. Algi i alginiany – leczenie, zdrowie, uroda. Wydawnictwo internetowe E-bookowo, 2010.
23. Priyadarshain I., Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae - A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2012, 3 (4), 89–100.

24. Słowińska M.A., Wądołowska L. Zdrowotne aspekty spożycia soków owocowych i słodzonych napojów: związek z nadwagą u młodzieży i nowotworami u dorosłych. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, 2015.
25. Wolfe D. Superżywność. Jedzenie i medycyna przyszłości. Wydawnictwo Illuminatio, Białystok, 2009.

Rozdział 11

Celina Habryka

*Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności,
Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

Kierownik katedry: Prof. dr hab. Teresa Fortuna

Promotor: Prof. dr hab. inż. Lesław Juszczyk

WYBRANE METODY OZNACZANIA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCYCH MIODU

Streszczenie

Produkty pochodzenia pszczelego wykazują właściwości przeciwutleniające, ponieważ zawierają znaczne ilości polifenoli i ich pochodnych. Przeciwutleniacze to związki, które występując w bardzo małym stężeniu chronią aktywne biologiczne substancje przed utlenianiem. Stanowią one naturalną obronę przed wolnymi rodnikami. Właściwości przeciwutleniające miodu, wynikają z obecności w nim zarówno przeciwutleniaczy enzymatycznych jak i nieenzymatycznych. Do oznaczania aktywności przeciwutleniającej miodów można zastosować szereg metod badawczych. Zwykle stosuje się metody oparte o właściwości redukcyjne przeciwutleniaczy mierzone z zastosowaniem metod spektroskopii absorpcyjnej. Najczęściej oznacza się całkowitą zawartość polifenoli lub aktywność przeciwutleniającą jako zdolność redukcyjną metodą FRAP oraz w reakcji z rodnikami DPPH^o i ABTS^{o+}.

Słowa kluczowe: miód, polifenole, właściwości przeciwutleniające

Wprowadzenie

Podstawowymi źródłami polifenoli w diecie człowieka są warzywa i owoce oraz inne produkty spożywcze. Bogatym źródłem wymienionych związków jest również miód pszczeli. Zawartość polifenoli zależy od pochodzenia botanicznego poszczególnych miodów, czynników środowiskowych i klimatycznych, a także przebiegu procesu jego pozyskiwania. Do miodów związki te dostają się z nektaru, propolisu i pyłku kwiatowego. W miodach zidentyfikowano 32 flawonoidy, z których występowanie jedenastu stwierdzono w nektarze, dziewięciu w pyłku kwiatowym, a dwudziestu pięciu

w propolisie [Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2008]. Według różnych źródeł zawartość związków fenolowych w miodach waha się w granicach od 0,01 do kilkudziesięciu mg/kg [Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2008]. Przy czym przeważają fenolokwasy, a nieco mniej jest flawonoidów. Najwyższą aktywnością przeciwutleniającą i zawartością polifenoli charakteryzują się miody ciemne – spadziowe, wrzosowe oraz gryczane. Przeciwutleniacze nie należą do niezbędnych składników odżywczych, ale są niezwykle ważne. Ich zwiększona podaż w diecie sprzyja mniejszej zachorowalności na wiele chorób.

Miód pszczeli znany jest od starożytności, jako jedna z pierwszych naturalnych substancji słodzących. Jest on naturalnym produktem pszczelim, pozyskiwanym z nektaru kwiatowego, soków, żywicznych wydzielin roślin, rosy miodowej oraz spadzi. Ta wonna, słodka, gęsta i lepka substancja o charakterystycznym zabarwieniu od jasnożółtego po ciemno brązową, nieraz z zielonym odcieniem występuje zarówno w postaci płynnej (patoka), jak i krystalicznej (krupiec). Pod względem chemicznym stanowi przesycony, wodny roztwór cukrów, zawierający głównie monosacharydy: glukozę i fruktozę oraz wiele związków o różnym działaniu, na przykład przeciwutleniacze. Jego skład uzależniony jest od pochodzenia miodu, środowiska, klimatu, gleby, sposobu wytwarzania, przechowywania itp. [Bogdanov i in., 2004; Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2008; Lachman i in., 2007].

Polskie dane wskazują, że całkowita zawartość związków fenolowych w przeliczeniu na kwas galusowy waha się od 257 do 1260 mg/kg. W miodach jasnych, takich jak miód akacjowy, rzepakowy i lipowy, jest ona wyraźnie niższa (267-390 mg/kg) w porównaniu do miodów ciemnych ze spadzi iglastej, wrzosowego, gryczanego i ze spadzi liściastej (645-1260 mg/kg) [Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2008].

Przeciwutleniacze i wolne rodniki

Wolne rodniki oraz przeciwutleniacze są nie tylko szkodliwymi, ale również nieodzownymi składnikami organizmów żywych. Rozwój nauki i technik analitycznych pozwala na coraz dokładniejsze ich oznaczanie, a także wyjaśnienie ich wpływu na organizm człowieka. Pozytywny wpływ na zdrowie ma sposób odżywiania się, a zawarte w pokarmach przeciwutleniacze pozwalają skuteczniej bronić się przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Produkty pochodzenia pszczelego wykazują znaczne właściwości antyoksydacyjne, ponieważ zawierają dużo polifenoli i ich pochodnych [Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2008]. Wolne rodniki są to cząsteczki, ich fragmenty, jony, atomy oraz grupy atomów posiadające na swojej powłoce walencyjnej co najmniej jeden niesparowany elektron, który nadaje im właściwości

paramagnetycznie i czyni je reaktywnymi [Cheng i in., 2002; Valko i in., 2006]. Ludzie poszukują produktów, które mogłyby spowolnić proces starzenia się organizmów żywych. W dużej mierze za ten proces odpowiedzialne są wolne rodniki. Przeciwutleniacze to związki, które występując w bardzo małym stężeniu chronią aktywne biologiczne związki przed utlenianiem. Stanowią one naturalną obronę przed wolnymi rodnikami. Właściwości przeciwutleniające miodu, wynikają z obecności w nim zarówno przeciwutleniaczy enzymatycznych jak i nieenzymatycznych. Do enzymatycznych przeciwutleniaczy zalicza się katalazę i peroksydazę glutationową [D'Arcy, 2005; Valko i in., 2006]. Oksydaza glukozowa jest głównym enzymem miodu, którego działanie uaktywnia się dopiero w wodnym roztworze. Wobec tlenu powoduje ona katalityczne utlenianie glukozy do glukono-1,5-laktonu z jednoczesnym wytworzeniem nadtlenu wodoru (H₂O₂) [D'Arcy, 2005; Weston, 2000]. Obecność nadtlenu wodoru w połączeniu z jonami żelaza na drugim stopniu utlenienia (Fe(II)), które są obecne w miodzie, może przyczynić się do powstania reakcji wolnorodnikowej i prowadzić do powstania bardzo reaktywnych rodników hydroksylowych •OH. Enzym katalaza może hamować tworzenie rodników hydroksylowych, ponieważ katalaza redukuje nadtlenek wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego. Wyższa zawartość nadtlenu wodoru uzależniona jest od wysokiego stężenia oksydazy glukozowej oraz niskiego stężenia katalaz zawartych w miodzie [Emes 2009]. W miodzie dojrzałym oksydaza glukozowa jest nieaktywna, w związku z czym powstająca ilość nadtlenu wodoru jest niewystarczająca do zahamowania wzrostu bakterii. Dodatkowo oksydaza jest bardzo wrażliwa na warunki środowiskowe takie jak: temperatura i światło, pod wpływem których ulega rozkładowi, stąd nazywana jest inhibiną termolabilną. Innym czynnikiem decydującym o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym miodów może być wysokie ciśnienie osmotyczne. W miodach wykryto też niewielkie ilości lizyny – substancji o działaniu bakteriobójczym. Na aktywność bakteriobójczą miodów może mieć także wpływ ich wysoka kwasowość [Wilczyńska i Przybyłowski, 2009].

Do przeciwutleniaczy nieenzymatycznych zalicza się:

- flawonoidy, wśród których występują: hesperetyna, trycetyna, myricetyna, pinocembryna, galangina, kampferol, kwercetryna, naryngenina, chrysyna, pinobanksyna oraz luteolina;
- niearomatyczne kwasy organiczne np.: cytrynowy;
- kwasy fenolowe i ich estry takie jak: chlorogenowy, galusowy, cynamonowy, benzoesowy, kawowy, wanilinowy, ferulowy, abiscynowy i elagowy;
- wolne aminokwasy, głównie prolina;
- witaminy: E - tokoferol oraz C - kwas askorbinowy;

- pochodne karotenoidów [Ball, 2001; Beretta i in. 2005].

Związki te w miodach zaliczane są do tzw. inhibin termostabilnych, w przeciwieństwie do enzymów nie są wrażliwe na działanie podwyższonych temperatur. Flawonoidy i kwasy fenolowe wykazują działanie bakteriobójcze, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwzakrzepowe oraz przeciwnowotworowe. Zawartość polifenoli i flawonoidów zależy od pochodzenia botanicznego poszczególnych miodów [Wilczyńska i Przybyłowski, 2009].

Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających

W celu określenia wartości prozdrowotnych miodów wykonuje się oznaczanie aktywności przeciwutleniającej i antybiotycznej. Powszechnie wiadomo, że przeciwutleniacze przeciwdziałają powstawaniu wolnych rodników, a tym samym wielu schorzeniom i chorobom. Właściwości przeciwutleniające wpływają głównie na skład chemiczny miodu. Wykazano, że aktywność przeciwutleniająca miodów jest wprost proporcjonalna do ogólnej zawartości polifenoli [Wilczyńska, 2009].

Do oznaczania aktywności przeciwutleniającej miodów można zastosować szereg metod badawczych. Zwykle stosuje się metody oparte o właściwości redukcyjne przeciwutleniaczy mierzone z zastosowaniem metod spektroskopii absorpcyjnej. Najczęściej oznacza się całkowitą ilość zawartość polifenoli lub aktywność przeciwutleniającą jako zdolność redukcyjną metodą FRAP oraz w reakcji z rodnikami DPPH^o i ABTS^{o+} [Wilczyńska i Przybyłowski, 2009].

Metody optyczne są przydatnym narzędziem do badania związków biologicznie czynnych i umożliwiają pomiar przy niskich stężeniach badanych substancji oraz w warunkach fizjologicznych. Szereg metod badawczych przeprowadzonych *in vitro* pozwala określić potencjał przeciwutleniający przygotowanych ekstraktów. Systemy *in vitro* są łatwiejsze do przeprowadzenia, szybsze i mniej kosztowne w porównaniu z tradycyjnymi metodami *in vivo*. Metody te są częściej stosowane, ponieważ pozwalają zaoszczędzić czas, zmniejszyć koszty oraz wyeliminować wiele czynników wpływających na powstawanie błędów przy pomiarach *in vivo*. Przed przystąpieniem do właściwego badania każdą próbkę należy przygotować w sposób określony w metodyce. Związki o właściwościach przeciwutleniających są labilne, a w świeżym surowcu łatwo utleniane przez endogenne enzymy. Dlatego też surowiec należy poddać starannej obróbce w warunkach, które zminimalizują straty związków biologicznie czynnych. Takim niezbędnym procesem technologicznym poprzedzającym badanie jest ekstrakcja. Stosowana bywa także hydroliza kwasowa, zasadowa lub enzymatyczna ułatwiająca identyfikację występujących w surowcach roślinnych związków

przeciwutleniających w połączeniach z cukrami i innymi substancjami. Dlaczego jest tu mowa o surowcach roślinnych skoro praca dotyczy miodu?

W badaniach prowadzonych poza organizmami żywymi wykorzystywana jest zdolność przeciwutleniaczy do dezaktywacji wolnych rodników. Reakcje te mogą przebiegać według dwóch mechanizmów:

1. mechanizmu przeniesienia atomu wodoru, tzw. HAT. W metodach opartych na przeniesieniu atomu wodoru wynik zależny jest od energii dysocjacji wiązania oraz potencjału jonizacji w grupie, będącej donorem atomu wodoru. Są one zazwyczaj szybkie i nie zależą od rozpuszczalnika oraz pH środowiska;
2. mechanizmu przeniesienia pojedynczego elektronu, tzw. SET. Reakcje oparte na przeniesieniu elektronu zależne są od potencjału jonizacji aktywnej grupy funkcyjnej w cząsteczce przeciwutleniacza, a więc również zależą od pH. Wartość potencjału jonizacji maleje ze wzrostem pH, ponieważ rośnie zdolność elektronowo–donorowa. W kwaśnym środowisku zdolności redukujące związków polifenolowych mogą być hamowane. W środowisku zasadowym, sprzyjającym deprotonowaniu grup hydroksylowych, utlenianie związków polifenolowych może być natomiast ułatwione. W metodach z zastosowaniem mechanizmu typu SET mieszaninę reakcyjną stanowią przeciwutleniacz i utleniacz zmieniający barwę wskutek redukcji, czyli przeniesienia elektronu z przeciwutleniacza [Cybul i Nowak, 2008; Wilczyńska i Przybyłowski, 2009; Pyrzyńska i in., 2010].

Metoda Folin-Ciocalteu

Do oznaczania potencjału przeciwutleniającego używa się metody do analizy całkowitej zawartości fenoli, która oparta jest na barwnej reakcji między polifenolami a odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Jej zaletą jest duża prostota i użyteczność do standaryzacji materiałów biologicznych, wadą zaś mała specyficzność. Związki fenolowe reagują z tym odczynnikiem jedynie w środowisku alkalicznym przy pH 10. W tych warunkach powstaje anion fenolowy, który redukuje odczynnik Folina-Ciocalteu. Mechanizm reakcji opiera się na przenoszeniu elektronu, a tworzenie niebieskiego barwnika w reakcji związków fenolowych z odczynnikiem jest niezależne od struktury badanych fenoli [Pękal 2014].

Metoda z rodnikiem DPPH•

Jedną z częściej wykorzystywanych metod do pomiaru aktywności przeciwutleniającej jest metoda z użyciem roztworu DPPH^o (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Jest on wolnym rodnikiem o stosunkowo dużej trwałości i z tego powodu można go łatwo przygotować do badań. Metanolowy roztwór DPPH^o ma barwę purpurową z maksimum absorpcji przy długości fali 515 nm. W wyniku przebiegi reakcji obserwowany jest spadek intensywności zabarwienia. Barwa roztworu zmienia się na żółtą, proporcjonalnie do zawartości przeciwutleniacza. Zmianę tę można monitorować spektrofotometrycznie. W celu ułatwienia interpretacji wyników wprowadzono parametr EC₅₀ zwany również IC₅₀ oznaczający stężenie antyoksydantu niezbędne do neutralizacji rodnika DPPH o 50%. Im bardziej efektywny przeciwutleniacz tym niższa (im bardziej efektywny tym mniej go potrzeba) wartość EC₅₀. Parametr ten jest charakterystyczny dla danego przeciwutleniacza tylko w określonych warunkach. Podczas przeprowadzania pomiarów należy ograniczyć dostęp światła i tlenu do próbek, a także starannie dobrać pH i rozpuszczalnik, ponieważ wszystkie te czynniki powodują spadek absorpcji roztworu DPPH^o. Ograniczeniem tej metody jest fakt, że DPPH^o rozpuszcza się jedynie w rozpuszczalnikach organicznych i nie pozwala na oznaczenia przeciwutleniaczy hydrofilowych. Metoda z zastosowaniem odczynnika DPPH^o jest szeroko stosowana do pomiarów zdolności przeciwutleniającej, szczególnie często używa się jej przy określaniu właściwości przeciwutleniających związków fenolowych. Jest szybka i dokładna, a otrzymane wyniki są odtwarzalne i porównywalne z wartościami uzyskanymi podczas innych badań opartych na zdolności dezaktywacji wolnych rodników [Pękal, 2014; Pyrzyńska i in., 2010].

Metoda z kationrodnikiem ABTS^{o+}

Kolejną, równie chętnie wykorzystywaną metodą jest test, w którym wolnym rodnikiem jest związek ABTS^{o+} (2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)). Zastosowanie tego odczynnika umożliwia pomiar całkowitej aktywności przeciwutleniającej próbek, rodniki te są tworzone podczas reakcji. Utlenienie ABTS^{o+} następuje natychmiast, a rodniki generowane podczas reakcji mają barwę niebieskozieloną i wykazują maksimum absorpcji przy kilku długościach fal: 417, 645, 734 oraz 815 nm. Przeciwutleniacze redukują ABTS^{o+} w zależności od aktywności, stężenia przeciwutleniacza i czasu trwania reakcji

Następuje zanik barwy roztworu. Spadek intensywności zabarwienia jest proporcjonalny do zawartości przeciwutleniaczy w roztworze. Zawartość

przeciwutleniaczy w analizowanych próbkach wyrażana jest najczęściej jako ilość równoważników troloksu na jednostkę objętości bądź masy próbki. Prosty sposób wykonania oznaczeń w metodzie ABTS^{o+} sprawia, że jest to analiza rutynowo używana do oznaczania zdolności antyoksydacyjnych próbek przeciwutleniaczy zarówno hydrofobowych, jak i hydrofilowych. Ponadto ważna jest duża szybkość reakcji kationorodnika ABTS^{o+} z przeciwutleniaczami - najczęściej w ciągu 30 min oraz jego rozpuszczalność zarówno w wodnych, jak i organicznych rozpuszczalnikach. Poza wartością TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), można wyznaczyć zdolności antyutleniające mierząc tzw. czas indukcji, czyli czas po jakim pojawi się niebieskie zabarwienie pochodzące od ABTS^{o+} będącego w obecności przeciwutleniacza. Reagują one w pierwszej kolejności z obecnymi w układzie wolnymi rodnikami, a dopiero po ich wyczerpaniu, przechodząc w formę rodnikową, reaguje ABTS^{o+}. Czas indukcji proporcjonalny jest do stężenia badanego przeciwutleniacza [Lachman, 2007; Pękał, 2014; Pyrzyńska i in., 2010; Wilczyńska, 2009].

Metoda FRAP

(ferric ion reducing antioxidant power)

Metoda oznaczania zdolności redukowania jonów Fe(III) FRAP pozwala na bezpośrednie określenie redukujących zdolności czystego związku, mieszaniny substancji, czy też próbki materiału biologicznego. Zasada działania tej metody opiera się na pomiarze redukcji jonów Fe(III) pod wpływem działania przeciwutleniacza. Następuje zmiana zabarwienia substratu, powstaje intensywnie niebieski kompleks TPTZ i jonów Fe(II) z maksimum absorpcji przy długości fali 593-595 nm. Zdolność przeciwutleniającą próbki określa się przez porównanie zmian absorbancji analizowanej próbki roztworu wzorcowego Fe(II). Metoda ta jest tania, a otrzymane wyniki są powtarzalne. Dodatkową zaletą jest szybki przebieg analizy. Zdolność przeciwutleniającą próbki określa się przez porównanie zmian absorbancji analizowanej próbki z wartością roztworu wzorcowego Fe(II). Wyznaczona wartość absorbancji próbki jest wprost proporcjonalna do stężenia przeciwutleniacza. Przyjęto, że jednostka FRAP określa zdolność redukcji 1 mola jonów żelaza(III) do żelaza(II) [Cybul i Nowak, 2008; Hu i in., 2008; Pękał, 2014; Zappala i in., 2005].

Metoda CUPRAC

(cupric reducing antioxidant capacity)

Wariantem metody FRAP jest metoda oznaczania zdolności redukowania jonów miedzi(II) CUPRAC. Różnica między tymi metodami polega na tym, że zamiast żelaza zredukowane są jony miedzi. Pod wpływem działania przeciwutleniaczy obecnych w próbce kompleks Cu(II) jest redukowany do barwnego kompleksu miedzi Cu(I). W metodzie tej wykorzystuje się pomiar wartości absorpcji tego barwnego produktu. Istnieją dwie opcje tej metody. Pierwsza z nich wykorzystuje związek batokuproinę (2,9-dimetylo-4,7-difenylo-1,10-fenantrolina), który tworzy pomarańczowy kompleks z miedzią Cu(I), z maksimum absorbancji przy długości fali 490 nm. W drugiej opcji stosuje się pokrewny związek neokuproinę (2,9-dimetylo-1,10-fenantrolina) tworzący pomarańczowo-żółty kompleks z Cu(I) z maksimum absorbancji przy długości fali 450 nm. Reakcja zachodzi w roztworze octanu amonu, a więc w środowisku obojętnym. Proste cukry czy kwas cytrynowy nie powodują występowania interferencji w tej metodzie. Jako substancję standardową stosuje się najczęściej troloks lub kwas askorbinowy. Odczynnik w metodzie CUPRAC reaguje wystarczająco szybko, by utleniać przeciwutleniacze należące do tioli. Do zalet tej metody zalicza się lepszą selektywność w porównaniu do metody FRAP, stosunkowo małe interferencje, wysoką stabilność odczynników, prostotę wykonania oraz łatwość użycia w rutynowej analizie. Ponadto metodę tą charakteryzuje szeroki przedział liniowości wskazań oraz wysoka precyzja. Wartości absorpcji poszczególnych składników mieszaniny przeciwutleniaczy wykazują addytywność, a powstające jony Cu(I) związane są w stabilny kompleks i nie stanowią potencjalnego czynnika utleniającego tlenek wodoru. Metoda CUPRAC stosowana jest często do oznaczeniu zdolności redukujących próbek żywności [Hu i in., 2008; Pękał, 2014; Zappala i in., 2005].

Podsumowanie

Wzrastające wymagania konsumentów co do jakości miodu spowodowały rozwój nowych technik i metod jej oceny. Wolne rodniki, jak i antyoksydanty można oznaczać metodami bezpośrednimi, wykorzystując ich właściwości utleniania lub redukcji. Bardzo krótki czas życia i wysoka reaktywność wielu rodników bardzo utrudnia te pomiary. Dlatego opracowano szereg metod pośrednich. Polegają one na badaniu produktów reakcji wolnych rodników ze związkami naturalnie występującymi w organizmach żywych.

Literatura

1. Ball S. Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka. Wyd. Medyk, Warszawa, 2001, 146.
2. Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Facino R.M. Standarization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorometric assays and chemometrics, *Anal. Chim. Acta*, 2005, 533, 185-191.
3. Bogdanov S., Ruoff K., Oddo L. P. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 2004, 35, 4-17.
4. F.Ch. Cheng F.Ch., J.F. Jen J.F., T.H. Tsai T.H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods, *Journal of Chromatography B*, 2002, 81, 481.
5. Cybul M., Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych, 2008, 54, 1, 69-79.
6. B.R. D'Arcy B.R. Antioxidants in Australian Floral Honeys - Identification of health-enhancing nutrient components, Australian Government, RIRDC, 2005, 05/040, 1.
7. I.M. Emens I.M. A different and safe method of split thickness skin graft fixation: Medicinal honey application, *Burns*, 2007, 33, 782.
8. Hu Y.L., Lu Y., Zhou G.J., Xia X.H. A simple electrochemical method for the determination of hydroxyl free radicals without separation process, *Talanta*, 2008, 74, 760-765.
9. Kędzia B., Hołderna-Kędzia E. Występowanie związków fenolowych w miodzie pszczelim. *Borgis - Postępy Fitoterapii*, 2008, 4, 225-232.
10. Lachman J., Koliňová D., Miholová D., Kołata J., Titra D. Kult K. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality, *Food Chem.*, 2007, 101, 973-979.
11. Pękał. A. Wpływ doboru procedury analitycznej na wyznaczenie właściwości antyutleniających próbek żywności, <https://depotuw.ceon.pl/bitstream/handle/item/825/Doktorat%20AP%20final%20version.pdf?sequence=1> (dostęp on-line: 25.10.2016 r.).
12. Pyrzyńska K., Drożdż P., Pękał A. Jak wyznaczać aktywność przeciwutleniającą flawonoidów w próbkach żywności? Cz. I. metody spektrofotometryczne, *Analytyka: nauka i praktyka*, 2010, 3, 8-12.
13. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, *Chem. Biol. Interac.*, 2006, 160, 1.
14. Weston R.J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review, *Food Chem.*, 2000, 71, 235-239.

15. Wilczyńska A. Metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLII, 2009, 3, 870-874.
16. Wilczyńska A., Przybyłowski P. Charakterystyka związków fenolowych zawartych w miodach, *Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej W Gdyni*, 2009, 61, 11, 33-38.
17. Zappalá M., Fallico B., Arena E., Verzera A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison, *Food Control*, 2005, 16, 273.

Rozdział 12

Paulina Zegartowska, Anna Korus

*Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów,
Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

Kierownik katedry: dr hab. inż. Piotr Gębczyński, prof. UR

Promotor: dr hab. inż. Anna Korus

WARTOŚĆ ODŻYWCZA I WYKORZYSTANIE MARCHWI W PRZEMYŚLE SPOŻYWCZYM

Streszczenie

W pracy omówiono aspekty dietetyczne marchwi oraz określono możliwości jej wykorzystania w przetwórstwie spożywczym. Marchew, spożywana jest m.in. ze względu na wysoką zawartość β -karotenu. Źródła naukowe donoszą, że może jednak zawierać znaczne ilości niepożądanych metali ciężkich takich jak kadm, ołów, rtęć, nikiel, chrom oraz arsen. W publikacji przeanalizowano zawartość szkodliwych pierwiastków oraz doniesienia związane z ubytkami składników odżywczych wynikającymi z procesu technologicznego. Po weryfikacji badań największe stężenia szkodliwych pierwiastków obserwowano w marchwi hodowanej na terenie Niemiec oraz Włoch. Przeanalizowano walory smakowe przekąsek produkowanych z marchwi, oraz parametry wpływające na polepszenie cech pożądaných przez konsumentów.

Słowa kluczowe: marchew, wartość odżywcza, przemysł spożywczy

Wprowadzenie

W kształtowaniu właściwości produktów spożywczych największą rolę odgrywają wymagania konsumentów [14]. Na rynku obserwowany jest ciągły wzrost zainteresowania konsumentów surowcami i produktami odżywczymi, niskokalorycznymi, ich pochodzeniem oraz ceną. Spośród gamy takich produktów na szczególną uwagę zasługuje marchew, która jest często spożywanym warzywem [2]. Sięgają po nią konsumenci dorośli, dzieci oraz osoby cierpiące na schorzenia układu pokarmowego [3]. Należy zwrócić uwagę na fakt, że do marchwi może przenikać wiele szkodliwych substancji zawartych w glebie. Do najszkodliwszych zalicza się: ołów, kadm, rtęć, nikiel, arsen i chrom. Obecność oraz stężenie wymienionych pierwiastków

jest zależne od sposobu uprawy i obecności nawozów [6]. Kadm, który jest kumulowany w tkankach korzeniowych z łatwością jest transportowany, zaś ołów jest pierwiastkiem zatrzymywany w błonach komórkowych. Jakość oraz wartość odżywcza marchwi zależy od stopnia jej oczyszczenia, a zanieczyszczenia należy tak usuwać aby zachować składniki odżywcze. Duże zainteresowanie marchwią wynika z jej wartości odżywczej. Jest zalecana w wielu schorzeniach, przede wszystkim w zaburzeniach trawienia, działa przeciwbakteryjnie. Jako źródło β -karotenu poprawia koloryt skóry, zapewnia prawidłowe funkcjonowanie wzroku, ale także wspomaga odporność oraz leczenie trądziku [13]. W ostatnich latach wśród konsumentów wzrosło zainteresowanie zdrowymi przekąskami produkowanymi między innymi z marchwi. Stanowią one atrakcyjną i zdrową alternatywę dla słonych, wysokotłuszczowych przekąsek będących jedną z przyczyn powstawania chorób dietozależnych [5].

Wpływ procesów technologicznych na wartość odżywczą marchwi

W ostatnim czasie dużą wagę przywiązuje się do obecności w produktach spożywczych naturalnych antyoksydantów, odgrywających główną rolę w profilaktyce szkodliwego działania wolnych rodników, które są toksyczne i kancerogenne [2]. Do substancji o właściwościach przeciwutleniających, zalicza się witaminy A, C, E, karotenoidy oraz polifenole. Bogatym źródłem tych związków jest między innymi marchew. Najcenniejszymi składnikami marchwi są α - i β -karoten, stanowiące źródło prowitaminy A. Zawartość β -karotenu w korzeniach marchwi wynosi 6-11 mg/100 g. W marchwi β -karoten stanowi 50-70% karotenoidów, α -karoten do 40%, a pozostała reszta to β -zeakaroten, luteina, likopen, neurosporen, fitoen, fitofluen. Barwniki karotenoidowe mają istotne znaczenie nie tylko ze względów sensorycznych, lecz współdziałając z odpowiednimi lipoproteinami zapobiegają utlenianiu cholesterolu LDL (lipoproteiny o niskiej gęstości), co wykazuje działanie przeciwmiażdżycowe. Karotenoidy w organizmie człowieka wychwytyują wolne rodniki oraz aktywny tlen atomowy, zapobiegając powstaniu stresu oksydacyjnego [2].

Przyswajalność β -karotenu zwiększa się po obróbce termicznej lub mechanicznej (rozdrabnianie, wysokociśnieniowa homogenizacja czy pasteryzacja) w skutek rozluźnienia i zerwania ścian komórkowych, co powoduje wyodrębnienie tego składnika. Badania prowadzone przez Knockaert i in. [2012] wykazały, że biodostępność β -karotenu poprawia się po dodaniu oliwy z oliwek i zastosowaniu wyższych temperatur. Zabieg ten umożliwia lepsze rozpuszczenie się składnika w kroplach oliwy [7]. Domaradzki i in. [2010] przeprowadzili badania oceny zawartości β -karotenu oraz kwasu L-askorbinowego w przetworach sporządzanych z marchwi, które są dostępne na rynku

polskim. Najbogatszym źródłem β -karotenu okazała się marchew apertyzowana firmy Bonduelle, która zawierała około 20 mg β -karotenu w 100 g produktu. Nieco niższą zawartość stwierdzono w marchwi firmy Jamar, wynosiła ona około 16 mg/100 g produktu. Wysokim poziomem omawianego składnika charakteryzowały się także produkty dla dzieci firmy Gerber (15,78 mg/100 g produktu), nieco mniej β -karotenu zawierały produkty dla dzieci firmy HIPPI (13,52 mg/100 g produktu). Z kolei analizowane soki jednodniowe firmy Marwit miały 8,40 mg β -karotenu w 100 g produktu, a pozostałe soki takich firm jak Witaminka czy Siti zawierały około 6 mg w 100 g produktu [2].

Poza β -karotenem, Domaradzki i in. [2010], oznaczyli także w wybranych produktach z marchwi, zawartość kwasu L-askorbinowego. Najwyższym poziomem cechował się sok „Kubuś”, w którym stwierdzono 49,18 mg kwasu L-askorbinowego w 100 g produktu (deklaracja na opakowaniu 30 mg/100 ml). W soku „Witaminka” zawartość witaminy C, w porównaniu z sokiem „Kubuś”, była prawie o połowę niższa (27,3 mg/100 g). Poziom witaminy C w przypadku soku „Witaminka” był o 36% wyższy, w odniesieniu do deklaracji producenta (20 mg/100 ml). W kolejnym badanym soku „Karkotka” zawartość oznaczanej witaminy wynosiła 19,92 mg/100 g i była zgodna z deklaracją producenta. Zawartość kwasu L-askorbinowego w przypadku jednodniowych soków naturalnie mętnych („Victoria Cymes”, „Marwit”) była podobna i stosunkowo niska (1,06-1,35 mg/100 g). Istotnym faktem jest informacja, że w soku „Victoria Cymes” oznaczona zawartość witaminy C znacznie odbiegała od deklarowanej na etykiecie, która wynosiła 7,3 mg/100 g. W pozostałych produktach z marchwi („Siti”, „HiPP”, „Gerber”, „BoboVita”, „Bonduelle”, „Crosse&Blackwell”, „Jamar”) nie stwierdzono zawartości witaminy C. Fakt ten może wynikać ze stosowanej obróbki termicznej podczas procesu produkcji, długim czasem przechowywania oraz tym, że do produktu gotowego nie dodawano kwasu askorbinowego [2].

Końcowa jakość potraw z marchwi zależy nie tylko od jakości surowca, ale w dużym stopniu od zmian wartości odżywczej i sensorycznej zachodzącej podczas procesów przetwórczych i kulinarnych. Na jakość potraw wpływa również ich wysoka wartość odżywcza, niskie stężenie składników nieodżywczych [5]. Wachowicz i in. [2004] w swoich badaniach przeprowadzili ocenę wpływu procesu technologicznego na jakość potraw z warzyw korzeniowych. Materiał badawczy stanowiła marchew odmiany „Perfekcja”, która przed gotowaniem została odpowiednio oczyszczona oraz rozdrobniona. W Tabeli 1 przedstawiono metody gotowania marchwi. Po obróbce wstępnej i po gotowaniu, w marchwi dokonano oceny wydajności, zawartości suchej masy, zawartości sumy karotenoidów, azotanów(III) i (V) oraz zawartości ołowiu i kadmu. Na zakończenie przeprowadzono analizę sensoryczną [22].

Tabela 1. Warunki gotowania marchwi.

METODA GOTOWANIA	STOPIEŃ ROZDROBNIENIA	CZAS GOTOWANIA [MIN]	ILOŚĆ WODY [ML]
Rozpoczęcie procesu od wrzącej wody	kostka	28	700
Rozpoczęcie procesu od zimnej wody	kostka	30	700
W szybkowarze w wodzie	kostka	11	200
W szybkowarze na parze	kostka	10	50
W mikrofalówce	kostka	18	50
W garnku akutermicznym	kostka	30	50

Źródło: [Wachowicz i in. 2004].

Po obraniu marchwi zaobserwowano istotny spadek zawartość karotenoidów, β - karotenu, kadmu i ołowiu (Tabela 2) a wzrost zawartości suchej masy oraz azotanów V [22].

Tońska i in. [2015] przeprowadzili analizę poziomu metali ciężkich w marchwi ekologicznej pochodzącej z różnych krajów lecz dostępnych na rynku polskim [21]. Wyniki wykazały, że najmniejszą ilością kadmu (0,0016 mg/kg) cechowała się marchew ekologiczna pochodząca z Holandii w porównaniu do marchwi ekologicznej z terenu Włoch, czy Niemiec [21]. Badania prowadzone przez Śmiechowską i Florek [2011] , wykazały stężenie kadmu na poziomie 0,010 mg/kg [16], z kolei w swoich badaniach Kawecka i in. [2013], uzyskali zawartość 0,30 mg/kg [6]. Badania zawartości ołowiu, również wykazały różne stężenia. Analizy marchwi ekologicznej przeprowadzone przez Śmigiel i in. [1994], wykazały zawartość ołowiu przekraczającą 0,33 mg/ kg, a badania Nedelescu i in. [2015], nawet powyżej 0,54 mg/kg [13]. Ponadto Wyka i in. [2009], podjęli się analizy stężeń rtęci w marchewce pochodzącej z gospodarstw rolnych znajdujących się na terenie huty, które wykazały zawartość tego pierwiastka na poziomie 0,0002 mg/kg [25].

Tabela 2. Zmiany zawartości składników marchwi.

SUROWIEC	OZNACZANY SKŁADNIK	ZAWARTOŚĆ		ZMIANY PO OBRANIU [%]
		ZE SKÓRKĄ	BEZ SKÓRKI	
MARCHEW	Sucha masa	11,8 ± 0,2	12,1±0,5	Wzrost 2,2
	∑ karotenoidów	14,9± 0,1	13,9 ± 0,4	Spadek 6,7
	β- karoten	12,2 ± 0,2	11,2 ±0,2	Spadek 8,2
	Azotany V	483 ± 17	556 ± 33	Wzrost 15,1
	Azotany III	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	-
	Kadm	0,079 ± 0,001	0,068 ± 0,003	Spadek 12,6
	Ołów	0,206± 0,001	0,089± 0,3	Spadek 56,8

Źródło: [Wachowicz i in. 2004].

Analizując aspekty odżywcze Platta i in. [2009], przeprowadzili analizę mikroelementów by ocenić wartość odżywczą trzech odmian marchwi tj. Nigel F, Niagara F, Nipomo F[13]. Szczegółowe dane dotyczące mikroskładników zostały przedstawione w Tabeli 3.

Z kolei Śmiegiel i in. [1994], w swoim doświadczeniu oznaczyli ilość mikroelementów w odmianie marchwi Amsterdamka oraz Perfekcja (Tabela 4) [20]. Przedstawione odmiany charakteryzowały się najwyższą zawartością potasu, przy czym odmiany Nigel F, Niagara F oraz Nipomo F, osiągały wyższe wartości analizowanych mikroskładników, w porównaniu z odmianami Amsterdamka oraz Perfekcja [20].

Tabela 3. Zawartość składników mineralnych w odmianach marchwi Nigel F, Niagara F, Nipomo F.

MIKROSKŁADNIK	SUROWIEC	ZAKRES ZAWARTOŚCI w mg/100g
Wapń	Marchew	58,75- 64,47
Magnez		21,79-30,25
Sód		19,45-38,64
Potas		287,03- 370,13

Źródło: [Platta i in. 2009].

Tabela 4. Zawartość mikrośladników w odmianach marchwi Amsterdamka i Perfekcja.

MIKROSKŁADNIK	SUROWIEC	ZAKRES ZAWARTOŚCI w mg/100g
Wapń	Marchew	36,2-46,3
Magnez		14,0-21,8
Sód		10,4- 15,5
Potas		172, 1-187,3

Źródło: [Śmiegiel i in. 1994].

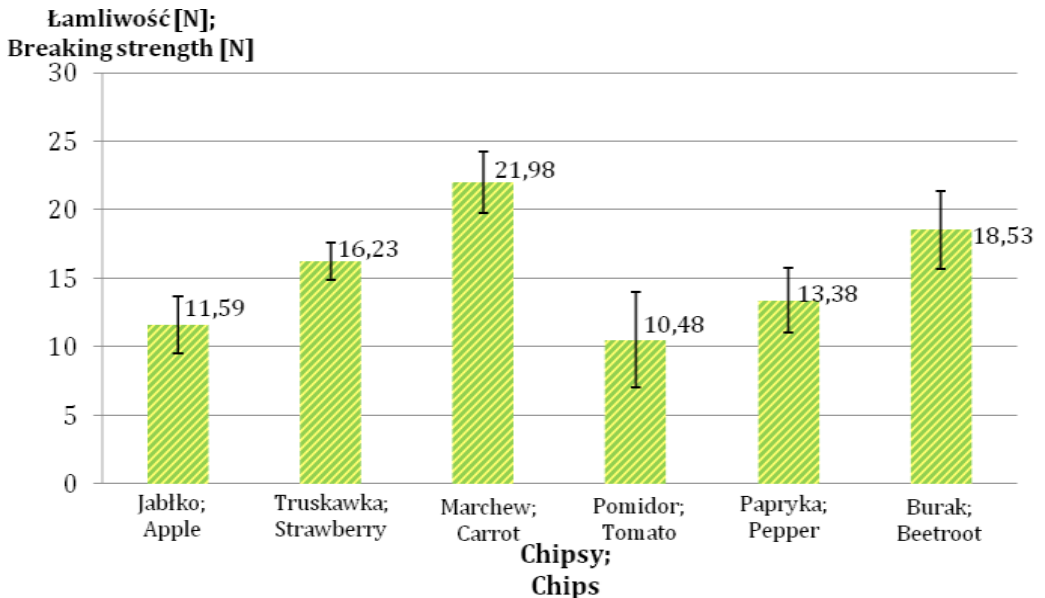
W przemyśle spożywczym największe zużycie energii obserwowane jest w procesach opierających się na ruchu ciepła, tj. pasteryzacji, sterylizacji lub masy tj. suszenia, czy zamrażania. Są to często wykorzystywane procesy do utrwalania żywności. Mrożenie, jest uznawane za jedną z najkorzystniejszych metod przedłużania jakości i trwałości surowca [25]. Jest to związane z ograniczeniem wpływu tego procesu na zmiany cech fizykochemicznych oraz sensorycznych w przypadku rozmrażania produktu. W badaniach przeprowadzonych przez Wiktor i in. [2015] [23], analizowano wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego na kinetykę zamrażania, rozmrażania immersyjnego oraz właściwości mechanicznych marchwi [23]. Zauważano, że obróbka wstępna polem pulsacyjnym pozwoliła na zminimalizowanie czasu zamrażania marchwi o ponad 30%. Zastosowanie pola elektromagnetycznego przed procesem zamrażania immersyjnego pozwoliło na zmodyfikowanie ubytku masy w czasie zamrażania [23]. Rożańska i in. [2013], wykazali, że gotowanie marchwi na parze, spowodowało większe straty witaminy C, w porównaniu do gotowania w wodzie [16]. W przypadku procesu smażenia, straty witaminy C w marchwi były poniżej progu detekcji.

Jedną z najstarszych metod utrwalania produktów spożywczych jest suszenie, które prowadzi do ubytku wody i wyższych stężeń składników rozpuszczalnych, zwiększa sztywność błon komórkowych surowca. Konsument ocenia walory organoleptyczne suszu, czyli smak, zapach, barwę, teksturę oraz chrupkość. Badane przez Marzec i in. [2008] susze marchwiowe charakteryzowały się podobnymi wartościami aktywności wody. Zauważono, że porowatość produktów zależała od zastosowanej metody suszenia. Największą porowatością charakteryzował się susz sublimacyjny, natomiast najmniejszą susz otrzymany metodą konwekcyjną. Przyczyną tego był skurcz materiału podczas suszenia konwekcyjnego. Wszystkie zastosowane metody suszenia, za wyjątkiem liofilizacji, wpłynęły na zmniejszenie pola powierzchni komórek względem świeżego materiału, co wynikało ze skurczenia surowca [11].

Ocena parametrów tekstury przekąsek przyrządzanych z marchwi

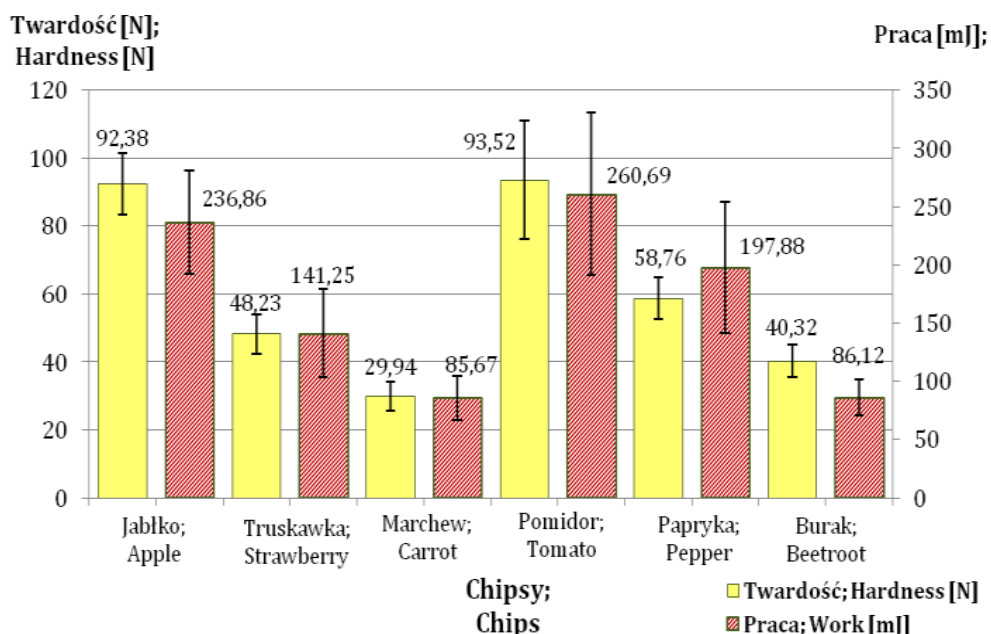
W ostatnich latach wzrosła świadomość konsumentów na temat konieczności spożywania warzyw oraz owoców. Niemniej, wielu z nich nadal spożywa słone przekąski, które są jedną z głównych przyczyn nadwagi, otyłości oraz nadciśnienia [14]. Producenci w trosce o konsumentów oferują, odżywcze oraz zdrowe przekąski. Atrakcyjną alternatywę stanowią przekąski z warzyw, będące bogatym źródłem błonnika pokarmowego, jednocześnie nie zawierające w swym składzie tłuszczu, konserwantów i polepszaczy smaku. W przeciwieństwie do tradycyjnych chipsów, nie zawierają również glutenu i są niskokaloryczne [9]. Beztłuszczowe chipsy wytwarzane są z cienkich plasterków marchwi odpowiednio wysuszonych, tak aby uzyskać pożądaną teksturę. Niedawno została opracowana nowatorska metoda wytwarzania dietetycznych i zdrowych przekąsek, w której została wykorzystana energia mikrofalowo-rotacyjno-próżniowa MIRVAC. Dzięki tej technologii możliwe jest suszenie plasterków w temperaturze poniżej 40 °C w czasie 2 i 3 godzin do uzyskania wilgotności 3 % dzięki której uzyskuje się odpowiednią chrupkość produktu [9]. Zaletą tej metody pozyskiwania przekąsek jest uzyskanie wysokich walorów smakowo-zapachowych, odpowiednia wartość odżywcza oraz naturalny wygląd. W technologii MIRVAC proces usuwania pary wodnej z surowców roślinnych jest krótki i nie prowadzi do zmian strukturalnych [9]. Dodatkowo cały proces można udoskonalić o etap nasycenia surowca przy użyciu różnorodnych dodatków smakowych. Pozwala to na zwiększenie oferty konsumenckiej. Uzyskane produkty przybierają różnorodną formę, chrupkość oraz strukturę. Suszona marchewka, o obniżonej zawartości wody, charakteryzuje się skoncentrowaną zawartością składników odżywczych [9]. Wysoka zawartość mikroskładników, witamin oraz błonnika wspomaga prawidłowe funkcjonowanie organizmu i ochronę przed szkodliwym wpływem środowiska. Wysokobłonnikowe produkty zapobiegają

powstawaniu zapań, udrażniają jelita i usprawniają pracę jelit [5]. Większość tego typu przekąsek nie wymaga dodatku cukru, soli ani konserwantów, ponieważ niska zawartość wody umożliwia uwydatnienie pożądanych cech smakowych. Istotną cechą nowych przekąsek jest pożądana przez konsumentów kruchość i twardość. W badaniach przeprowadzonych przez Juszczak i in. [2005] wykazano, że konsumenci chętnie spożywają przekąski charakteryzujące się dużą chrupkością [4]. W analizie tekstury chipsów marchewkowych przeprowadzonych przez Kozak i in. [2015], dokonano pomiaru łamliwości i kruchości na podstawie teksturogramów (Rycina 1, 2) [9].



Rycina 1. Łamliwość badanych przekąsek [Kozak i in., 2015].

Twardość ocenianych chipsów mieściła się w przedziale 29,94 do 93,52 N i była uzależniona od rodzaju surowca. Najwyższą twardością charakteryzowały się chipsy pomidorowe, najniższą marchewkowe. Niskie wartości w przypadku marchwi prawdopodobnie wynikały z falistego kształtu oraz najmniejszej średnicy plasterków. Określenie siły przy której produkt ulega pęknięciu, czyli łamliwości jest także bardzo istotne, łamliwość ściśle związana jest z kruchością produktu. Obserwuje się, że im niższa jest jej wartość tym bardziej kruchy jest produkt [17], natomiast analiza statystyczna wykazała, istnienie ujemnej korelacji pomiędzy łamliwością i twardością badanych przekąsek ($r = -0,726$) [9].



Rycina 2. Twardość badanych przekąsek [Kozak i in., 2015].

Podsumowanie

W dzisiejszych czasach wartość odżywcza pożywienia ma bardzo duże znaczenie. Marchew, będąca źródłem β -karotenu oraz wielu innych cennych składników odżywczych, może być doskonałym zamiennikiem słonych przekąsek. Atrakcyjną alternatywę stanowią chipsy z warzyw, będące bogatym źródłem błonnika pokarmowego, jednocześnie nie zawierające w swym składzie tłuszczu, konserwantów i polepszaczy smaku. W przeciwieństwie do tradycyjnych chipsów, są niskokaloryczne. Prowadzone badania wykazały zmiany składu marchwi w zależności od sposobu obróbki oraz procesów technologicznych. Zaobserwowano wysokie stężenia składników mineralnych takich jak: wapń, potas, magnez, sód. Po obraniu marchewki zauważono istotny spadek zawartość karotenoidów, β -karotenu, kadmu i ołowiu, oraz wzrost zawartości suchej masy oraz azotanów V. Rozpoczęcie procesu gotowania marchwi, od wrzucenia jej do wrzątku powodowało wzrost zawartości wody, natomiast najmniejszą ilość przenikającej wody obserwowano w procesie gotowania w szybkowarze na parze, za pomocą mikrofal oraz w zastosowaniu garnka akutermicznego.

Projekt został sfinansowany z dotacji przyznanej przez MNiSW na działalność statutową.

Literatura

1. Biller E., Neryng A. Wykorzystanie instrumentalnych metod pomiaru barwy na przykładzie rozdrobnionej marchwi. *Inżynieria Rolnicza*, 2003, 8, 27-35.
2. Domaradzki P., Malik A., Wójcik W. Zawartość β -karotenu i witaminy C w wybranych produktach z marchwi. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2010, 2, 118-123.
3. Gozdecka G., Domowicz B. Charakterystyka cech akustycznych chipsów ziemniaczanych w zależności od rodzaju testu mechanicznego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, 6, 126-136.
4. Juszczak L. Tekstura Żywności. *Laboratorium Przemysłowe*, 2005, 2, 44-45.
5. Janowicz M., Kowalska H., Lenart A. Przyszłość przekąsek owocowych i warzywnych. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2012, 2, 9-11.
6. Kawecka W., Rychlik E., Rachtan-Janicka J., Wrońska A. Obecność kadmu i ołowiu w warzywach i zbożach pochodzących z uprawy konwencjonalnej i ekologicznej. *Journal of Ecology and Health*, 2013, 17(1), 18-21.
7. Knockaert G., Lemmens L., Van Buggenhout S., Hendrickx M., Van Loey A. Changes in β -carotene bioaccessibility and concentration during processing of carrot puree. *Food Chemistry*, 2012, 133(1), 60–67.
8. Kondej D. Metale ciężkie – korzyści zagrożenia dla zdrowia i środowiska. *Bezpieczeństwo Pracy*, 2007, 2, 25-27.
9. Kozak M. Ocena wybranych parametrów tekstury popularnych przekąsek owocowych i warzywnych. *Inżynieria Przetwórstwa Spożywczego*, 2015, 16, 16-20.
10. Kunachowicz H., Rutkowska U., Nadolna I., Iwanow K., Karłowski K., Marzec Z., Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I. Zawartość niektórych składników odżywczych i zanieczyszczeń chemicznych w wybranych warzywach pochodzących z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej. *Żywność Człowieka i Metabolizm*, 1993, XX(4), 339-350.
11. Marzec A., Pasik S. Wpływ metody suszenia na właściwości mechaniczne i akustyczne suszy marchwiowych. *Inżynieria Rolnicza*, 2008, 1(99), 291-296.
12. Moreira R G. Impingement drying of food using hot air and superheated steam. *Journal of Food Engineering*, 2001, 49, 453-456.
13. Nedelescu M., Bălălaşu D., Baconi D., Jula M., Morar D., Gligor A., Bălălaşu C. Preliminary assessment of heavy metals content of vegetables grown in industrial areas in Romania. *Farmacia*, 2015, 63(2), 296-200.
14. Platta A., Kolenda H. Kształtowanie się zawartości składników mineralnych (Ca, Mg, Na, K) w wybranych odmianach marchwi jadalnej. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2009, 3, 294-298.

15. Rembiałkowska E. Wpływ metody uprawy ekologicznej i konwencjonalnej na wybrane parametry wartości odżywczej marchwi [*Daucus carota*]. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, 2007, 34, 550-556.
16. Różańska D., Regulska-Iłow B., Iłow R. Wpływ procesów kulinarnych na zawartość wybranych witamin w żywności cz. I. Witamina C i foliany. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2013, 3, 241-249.
17. Skiepmo N., Chwastowska-Siwiecka I., Kondratowicz J. Właściwości likopenu i jego wykorzystanie do produkcji żywności funkcjonalnej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 6, 20-32.
18. Surówka K. Tekstura żywności i metody jej badania. *Przemysł Spożywczy*, 2000, 10, 12-17.
19. Śmiechowska M., Florek A., Zawartość metali ciężkich w wybranych warzywach z uprawy konwencjonalnej, ekologicznej i działkowej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 2011, 56(4), 152-156.
20. Śmigiel D., Kumulacja metali ciężkich (Pb, Cd) w wybranych warzywach różnych odmian. *Roczniki Polskiego Zakładu Higieny*, 1994; 45(4): 279-284.
21. Tońska E., Łuczyńska J., Paszczyk B. Poziom wybranych metali ciężkich (ołów, kadm i rtęć) w marchwi ekologicznej w zależności od kraju pochodzenia. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2015, 2, 205-209.
22. Wachowicz I., Czarniecka- Skubina E. Wpływ procesu kulinarnego na wybrane mierniki jakości marchwi i buraków. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, 3, 204- 217.
23. Wiktor A., Schulz M., Voigt E., Knorr D., Witrowa-Rajchert A. Wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego na kinetykę zamrażania immersyjnego, rozmrażania oraz właściwości mechaniczne marchwi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 2, 124-137.
24. Wszelaczyńska E., Pobrzeżny J., Keutugen A., Szczepanek M., Idaszewska N., Brewka J. Qualitative changes in carrot preserves depending on foliar fertilization of plants with magnesium and on selected technological processes. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 5, 182-197.
25. Wyka J., Orzeł D., Figurska-Ciura D., Bronkowska M., Styczyńska M., Żechałko-Czajkowska A., Biernat J. Ocena zanieczyszczenia rtęcią produktów roślinnych z rejonu legnicko-głogowskiego. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2009, 42(2), 189-193.

NUTRITIONAL VALUE AND THE USE OF CARROT IN FOOD INDUSTRY

Summary

The paper discusses aspects of the diet of carrot and identifies the possibility of its use in food processing. Carrots, consumed include due to the high content of β -carotene. Sources of scientific reports that may, however, contain significant amounts of undesirable heavy metals such as cadmium, lead, mercury, nickel, chromium and arsenic. The publication analyzes the content of harmful elements and reports related to the losses of nutrients resulting from the process. After verification testing largest concentration of harmful elements observed in carrots grown in Germany and Italy. It analyzed the taste of snacks made from carrots and the parameters that affect the improvement of the characteristics desired by consumers.

Keywords: carrot, nutritional value, food industry