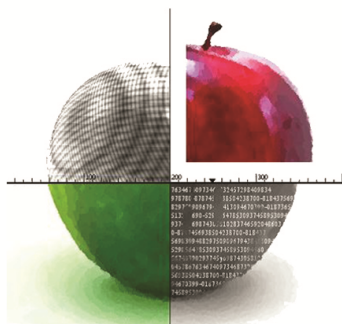


BIOPRODUKTY - POZYSKIWANIE, WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE W PRODUKCJI ŻYWNOSCI



POD REDAKCJĄ
GRAŻYNY LEWANDOWICZ
JOANNY LE THANH-BLICHARZ

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Poznań, 2016

**BIOPRODUKTY - POZYSKIWANIE,
WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE
W PRODUKCJI ŻYWNOŚCI**



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu



SPONSORZY



Colian™



Zeelandia

stwarzamy możliwości

**BIOPRODUKTY - POZYSKIWANIE
WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE
W PRODUKCJI ŻYWNOŚCI**

Redakcja naukowa

Grażyna Lewandowicz
Joanna Le Thanh-Blicharz

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Poznań 2016

Redakcja naukowa

Prof. dr hab. inż. Grażyna Lewandowicz
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr inż. Joanna Le Thanh-Blicharz
Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

©Copyright by
Polskie Towarzystwo Technologów Żywności Oddział Wielkopolski
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Poznań 2016

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany ani rozpowszechniany za pomocą urządzeń elektronicznych, kopiujących, nagrywających i innych bez pisemnej zgody Wydawcy.

ISBN 978-83-7160-835-3

Redakcja

Joanna Le Thanh-Blicharz

Jacek Lewandowicz

Projekt okładki

Przemysław Kowalczewski

Wydawca

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań

Ark. wyd. 7,64

Wydanie I
Poznań 2016

Recenzenci

Dr hab. Hanna Maria Baranowska

Katedra Fizyki i Biofizyki

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr hab. Renata Cegielska-Radziejewska

Katedra Zarządzania Jakością Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Prof. dr hab. inż. Danuta Górecka

Katedra Technologii Żywności Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr inż. Joanna Le Thanh-Blicharz

Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

Prof. dr hab. inż. Grażyna Lewandowicz

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr inż. Agnieszka Makowska

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr hab. inż. Krzysztof Melski

Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości

Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr inż. Michał Piątek

Instytut Technologii Mięsa

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Prof. dr hab. inż. Edward Pospiech

Instytut Technologii Mięsa

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr hab. inż. Dorota Walkowiak-Tomczak

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Autorzy

Anna Arczuk

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

Piotr Barbaś

Zakład Agronomii, IHAR-PIB, oddział Jadwisin

Ewa Flaczyk

Katedra Technologii Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dorota Gumul

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

Celina Habryka

Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności

Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Marzanna Hęś

Katedra Technologii Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wojciech Juzwa

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Anna Kiełtyka-Dadasiewicz

Katedra Technologii Produkcji Roślinnej i Towaroznawstwa

Wydział Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Dominik Kmiecik

Katedra Technologii Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Joanna Kobus-Cisowska

Katedra Technologii Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Marek Kruczek

Wydział Technologii Żywności

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Katarzyna Mikołajczak

Koło Naukowe Studentów Biotechnologii "Operon"

Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Katarzyna Mikołajczyk-Bator

Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości

Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Grażyna Neunert

Katedra Fizyki i Biofizyki

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ali Hulail Noaema
Katedra Technologii Produkcji Roślinnej i Towaroznawstwa
Wydział Agrobioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Przemysław Piotr Olejnik
Koło Naukowe Studentów Biotechnologii "Operon"
Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Krzysztof Polewski
Katedra Fizyki i Biofizyki
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Monika Przeor
Katedra Technologii Żywienia Człowieka
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Piotr Pszczółkowski
Zakład Doświadczalnej Oceny Odmian Uhnin

Barbara Sawicka
Katedra Technologii Produkcji Roślinnej i Towaroznawstwa
Wydział Agrobioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Przemysław Siejak
Katedra Fizyki i Biofizyki
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Domnika Skiba
Katedra Technologii Produkcji Roślinnej i Towaroznawstwa
Wydział Agrobioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Krystyna Szymandera-Buszk
Katedra Technologii Żywienia Człowieka
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Piotr Wałęjko
Instytut Chemii
Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku

Stanisław Witkowski
Instytut Chemii
Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku

SPIS TREŚCI

Streszczenie.....	10
Wstęp	12
<i>Celina Habryka</i> Pyłek pszczeli produktem pracy pszczół.....	13
<i>Katarzyna Mikołajczyk-Bator</i> Zawartość barwników betalainowych, zdolność antyoksydacyjna oraz cechy sensoryczne świeżych, pasteryzowanych i przechowywanych soków z buraka ćwikłowego	21
<i>Joanna Kobus-Cisowska, Ewa Flaczyk, Monika Przeor, Dominik Kmiecik, Marzanna Hęś, Krystyna Szymandera-Buszk</i> Możliwości wykorzystania preparatów z liści morwy jako składników mlecznych napojów fermentowanych.....	30
<i>Monika Przeor, Ewa Flaczyk, Joanna Kobus-Cisowska, Dominik Kmiecik</i> Stabilność wybranych polifenoli z liści morwy białej w warunkach symulowanego przewodu pokarmowego (<i>in vitro</i>).....	38
<i>Dominika Skiba, Barbara Sawicka</i> Możliwość wykorzystania bulw <i>Helianthus tuberosus</i> w produkcji żywności.....	47
<i>Piotr Pszczółkowski, Barbara Sawicka</i> Wartość odżywcza białka wybranych odmian ziemniaka	56
<i>Barbara Sawicka, Ali Hulail Noaema, Anna Kiełtyka-Dadasiewicz, Piotr Barbaś</i> Wartość odżywcza bulw ziemniaka w warunkach stosowania bioregulatorów wzrostu	65
<i>Grażyna Neunert, Piotr Walejko, Stanisław Witkowski, Krzysztof Polewski</i> Wpływ parametrów fizycznych środowiska na przebieg procesu fotodegradacji estrowych pochodnych alfa-tokoferolu	74
<i>Przemysław Siejak, Krzysztof Polewski</i> Wpływ suplementów diety zawierających koloidalne nanocząstki srebra na właściwości witaminy E. Badania modelowe.....	84
<i>Marek Kruczek, Dorota Gumul, Anna Areczuk</i> Melatonina roślinna jako mało znany przeciwutleniacz i regulator zegara biologicznego – charakterystyka i możliwości aplikacji w przemyśle spożywczym	95
<i>Katarzyna Mikołajczak, Przemysław Piotr Olejnik</i> Substancje bioaktywne w algach.....	104
<i>Przemysław Piotr Olejnik, Wojciech Juzwa</i> Możliwości wykorzystania cytometrii przepływowej do izolacji nowych szczepów alg	111

STRESZCZENIE

Przetwarzanie surowców rolniczych z wykorzystaniem organizmów żywych było metodą wytwarzania żywności, jaką człowiek stosował już od czasów prehistorycznych. W ten sposób produkowano najpierw wino i piwo, a nieco później sery. Pozwoliło to z jednej strony przedłużyć trwałość produktów spożywczych, a z drugiej zwiększyć ich wartość odżywczą. Ta strategia jest realizowana również współcześnie, jednak aktualnie odbywa się nie metodą prób i błędów, ale z wykorzystaniem najnowszych zdobyczy nauki i techniki. Równocześnie ze względu na wzrost świadomości konsumentów na temat zależności pomiędzy dietą a zdrowiem, rośnie zapotrzebowanie na żywność funkcjonalną. Celem pracy było przedstawienie głównych kierunków pozyskiwania prozdrowotnych składników żywności metodami biotechnologicznymi realizowanych, bądź też możliwych do zrealizowania, w warunkach przyrodniczo-gospodarczych Polski.

Monografię otwiera artykuł na temat pozyskiwania i właściwości pyłku pszczelego uważanego za cenny produkt leczniczy i odżywczy. Jego wytwarzanie musi być realizowane z zachowaniem najwyższych standardów, ponieważ konsumenci sięgają po ten produkt z reguły w momencie poważnych problemów zdrowotnych. Autorzy zwracają uwagę, że właściwości i działanie prozdrowotne pyłków są zależne głównie od gatunków roślin, z których są pozyskiwane. Znaczenie ma jednak również okres zbioru, urodzajność gleby oraz warunki atmosferyczne w okresie, kiedy występuje formowanie i dojrzewanie pylników.

Rośliną, której korzystne dla organizmu właściwości są doskonale znane jest burak ćwikłowy. Zawiera on związki betalainowe i polifenolowe wykazujące działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Tej tematyce poświęcony jest rozdział drugi, w którym porównano zawartości składników bioaktywnych i cechy sensoryczne soków z buraka w zależności od rodzaju surowca i warunków technologicznych. Jednak wysiłki technologów nie ograniczają się do coraz efektywniejszego wykorzystania klasycznych źródeł substancji prozdrowotnych, ale poszukiwane są ich nowe źródła. Temu problemowi poświęcone są kolejne dwa rozdziały. W pierwszym z nich opisano przydatność liści morwy do wytwarzania mlecznych napojów fermentowanych. Liście te zawierają znaczne ilości związków polifenolowych, a przemiany, jakie zachodzą w przewodzie pokarmowym *in vitro*, zostały przedstawione w następnym rozdziale.

Bogatym źródłem związków bioaktywnych są również bulwy topinamburu (*Helianthus tuberosus*). Budzą one zainteresowanie głównie ze względu na zawartość znacznej ilości inuliny – popularnej substancji prebiotycznej. Bulwy topinamburu mogą być stosowane do wytwarzania szerokiej gamy produktów spożywczych, mogą być nawet kiszone i marynowane, przy czym na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż mogą być stosowane podobnie jak ziemniaki do wytwarzania chipsów. Natomiast ziemniaki ze względu na swoją powszechną dostępność i niską cenę są w Polsce rośliną często niedocenianą, a wręcz pogardzaną. Tymczasem posiadają wysoką wartość odżywczą, a także są źródłem substancji bioaktywnych. Ich wartość odżywcza zależy od szeregu czynników zarówno odmianowych jak i uprawowych. Co istotne, przy aktualnym poziomie

spożycia ziemniaków, są one ważnym źródłem witaminy C redukującej stres oksydacyjny organizmu. Zagadnieniom tym poświęcono rozdziały szósty i siódmy.

Działanie przeciwutleniające wykazuje też witamina E, przy czym jak większość składników bioaktywnych żywności, jest ona czuła na czynniki zewnętrzne. Prowadzenie badań metodami spektroskopowymi na poziomie molekularnym może przyczynić się do poszerzenia wiedzy o właściwościach tego typu składników. Zmiany parametrów spektroskopowych w układach modelowych produktów spożywczych dostarczają istotnych informacji o wpływie otoczenia na ich właściwości fizyczne (a tym samym zdrowotne). W rozdziale ósmym pokazano wpływ fizycznych parametrów środowiska zewnętrznego, takich jak promieniowanie z zakresu UVB, atmosfera ochronna czy temperatura, na szybkość procesu rozpadu α -tokoferolu i jego estrowych pochodnych. Natomiast rozdział dziewiąty poświęcono badaniom wpływu obecności nanocząstek metalu na molekularną strukturę elektronową i fotostabilność α -tokoferolu. Wykazano, że nanocząstki srebra przyczyniają się do przyspieszenia procesu fotodegradacji i utraty właściwości antyoksydacyjnych tego składnika.

Bardzo silnym przeciwutleniaczem jest także melatonina. Jest ona dobrze znana ze względu na silne powiązanie intensywności jej wydzielania z rytmem jasno/ciemno. Ostatnio zwrócono uwagę, że hormon ten występuje również w roślinach, m. in. w ziarniakach jęczmienia, owsa, winogronach, a także wielu ziołach i roślinach leczniczych. Przedmiotem rozdziału dziesiątego jest charakterystyka aktywności biologicznej oraz możliwości jej zastosowania w przemyśle spożywczym.

Ostatnie dwa rozdziały poświęcono tematyce alg. Początkowo były one wykorzystywana tylko do celów paszowych, ale ostatnio (po udowodnieniu, że są one bardzo bogatym źródłem różnorodnych naturalnych związków bioaktywnych o działaniu przeciwutleniającym, przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym oraz przeciwnowotworowym) zwróciły uwagę technologów żywności. Produkcja substancji bioaktywnych alg (podobnie jak innych pochodzenia drobnoustrojowego) wymaga prowadzenia hodowli bioreaktorowej. Jej efektywność zależy w znacznym stopniu od precyzyjnego kontrolowania hodowli. Do tego celu doskonałym narzędziem jest cytometria przepływowa. Ta nowoczesna metoda analityczna stworzona na potrzeby współczesnej mikrobiologii i biotechnologii staje się użytecznym narzędziem w rękach technologa żywności.

Słowa kluczowe: substancje bioaktywne, przeciwutleniacze, witaminy, wartość odżywcza, działanie prozdrowotne, biotechnologia

WSTĘP

Biotechnologia obok nanotechnologii jest jedną z najburzliwiej rozwijających się dziedzin nauk stosowanych. Jest ona definiowana jako: zastosowanie technologiczne, które używa systemów biologicznych, organizmów żywych lub ich składników, żeby wytwarzać lub modyfikować produkty lub procesy w określonym zastosowaniu. Jej historyczne początki związane są z procesami fermentacyjnymi zachodzącymi podczas wytwarzania wina i piwa i są nierozdzielnie związane z technologią żywności. Rozwój obu dyscyplin następował w ścisłym związku, który występuje do dzisiaj.

Biotechnologia nowożytna zaczęła się rozwijać od schyłku XIX wieku i wiązała się ze zrozumieniem roli mikroorganizmów w procesach fermentacyjnych. Zostały wtedy opracowane m.in. technologie produkcji etanolu, butanolu, metanolu, acetonu i kwasów organicznych. Rozwój mikrobiologii technicznej zaowocował opracowaniem technologii antybiotyków, szczepionek, surowic, białek paszowych, czystych aminokwasów, enzymów i polisacharydów pochodzenia drobnoustrojowego. Współczesna produkcja biotechnologiczna wyszła poza ramy mikrobiologii i obejmuje również hodowlę komórek *in vitro* organizmów wyższych oraz inżynierię genetyczną. Wielu ludzi błędnie utożsamia współczesną biotechnologię żywności z uprawą roślin transgenicznych. Tymczasem obejmuje ona znacznie szerszy zakres zagadnień, m.in. technologię bioprosesową czyli zagadnienia związane z izolacją i utrwalaniem bioproduktów.

Termin „bioprodukty” jest często stosowany w odniesieniu do wytwarzania energii i jest definiowany jako „materiały pochodzące z odnawialnych, biologicznych źródeł”. To uproszczenie, aczkolwiek powszechne, może być mylące. Technologia bioprosesowa definiuje bioprodukty jako materiały pozyskiwane metodami biotechnologicznymi, czyli przede wszystkim metabolity drobnoustrojowe, ale również substancje pozyskiwane z tkanek roślinnych i zwierzęcych. W niniejszej monografii termin bioprodukty jest rozumiany w sposób nieco węższy i oznacza on tu składniki żywności pozyskiwane metodami biotechnologicznymi bądź też wykazujące aktywność biologiczną, przydatną w wytwarzaniu żywności funkcjonalnej.

Wykorzystanie bioproduktów wymaga zastosowania modelowych badań podstawowych niektórych ich składników. Dlatego też czytelnik znajdzie w niniejszej monografii informacje dotyczące nie tylko technologii i zastosowania, ale również struktury związków bioaktywnych, ich właściwości oraz przemian przy narażeniu na światło, tlen atmosferyczny i inne czynniki środowiskowe. Książka jest adresowana głównie do specjalistów w zakresie technologii żywności, lecz może być interesującą dla każdego czytelnika poszukującego wiedzy na temat prozdrowotnych składników żywności.

Grażyna Lewandowicz, Joanna Le Thanh-Blicharz

CELINA HABRYKA

Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności

Wydział Technologii Żywności

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

celina.habryka@gmail.com

PYLEK PSZCZELI PRODUKTEM PRACY PSZCZÓŁ

Streszczenie

Pylek kwiatowy jest oprócz miodu podstawowym pokarmem pszczoł. Miód to pokarm energetyczny, pyłek to białko, tłuszcze, sole mineralne, witaminy, kwasy organiczne i hormony. Pszczoły zbierają z kwiatów pyłek, mieszają z odrobiną miodu, nektaru lub śliny i w postaci uformowanych kulek, obnóży przenoszą do ula w specjalnych koszyczkach na tylnych nogach. Pyłek pszczeli należy do produktów żywnościowych, które powinny odznaczać się wysokimi standardami jakościowymi. Wynika to z faktu, że konsumenci sięgają po ten produkt w momencie poważnych problemów zdrowotnych. Jako wieloskładnikowy, naturalny preparat pszczeli, niezbędny do prawidłowego przebiegu podstawowych reakcji życiowych, znajduje szerokie zastosowanie. Pszczeli pyłek kwiatowy jest bogaty w flawonoidy, białka, aminokwasy, witaminy, węglowodany, substancje mineralne, enzymy, koenzymy i pierwiastki śladowe. Dlatego też uważa się go za cenny produkt leczniczy i odżywczy. Na rynku konsumpcyjnym pyłek występuje w postaci wysuszonych obnóży, tabletek, granulatu oraz w postaci mieszaniny z miodem. Właściwości i działanie prozdrowotne pyłków są zależne głównie od gatunków roślin i okresu zbioru jak również od urodzajności gleby, zasobności wilgoci w glebie oraz od warunków atmosferycznych w okresie, kiedy występuje formowanie i dojrzewanie pylników.

Słowa kluczowe: miód, obnóża pyłkowe, pyłek kwiatowy

Wprowadzenie

Pylek pszczeli jest to pyłek kwiatowy w formie obnóży. Pszczoły zbierają z kwiatów pyłek, mieszają z odrobiną miodu, nektaru lub śliny i w postaci uformowanych kulek, obnóży przenoszą do ula w specjalnych koszyczkach na tylnych nogach. Pyłek kwiatowy jest podstawowym i niezbędnym pokarmem pszczoł. Bez niego pszczela rodzina nie może się rozwijać i jest zagrożona śmiercią głodową, pomimo dużych zapasów miodu. Przetworzony przez pszczoły jest najbogatszym i najbardziej kompletnym pożywieniem w przyrodzie. Badając pyłki kwiatowe różnego pochodzenia botanicznego wyodrębniono ponad 200 substancji w nim zawartych. Jego właściwości odżywcze i terapeutyczne wynikają ze składu chemicznego tj. obecności wody, węglowodanów prostych i złożonych, kwasów tłuszczowych, składników mineralnych oraz białek [Jarosz i Wierzejska, 2004].

Pylek kwiatowy – samo zdrowie

Pszczelarstwo jest jedną z najintensywniej rozwijających się dziedzin gospodarki człowieka. Spośród całego świata owadów, z którymi człowiek ma do czynienia, pszczoły należą do tych, które są wykorzystywane przez niego bardzo wszechstronnie. Od pszczoł uzyskuje się między innymi: miód, pyłek kwiatowy, propolis, pierzgę. Elementarnym składnikiem pożywienia pszczoł jest pyłek kwiatowy, będący produktem niezbędnym do życia, tj.: do spełniania różnych funkcji życiowych, a przede wszystkim do odżywiania larw. Rodzina pszczoła zużywa go rocznie 30-50 kg. Człowiek jest w stanie pobrać dla swoich potrzeb zaledwie 1-3 kg od jednej rodziny pszczelej. Pyłek kwiatowy może pochodzić z roślin wiatropylnych lub owadopylnych. Pszczoły zbierają z kwiatów nie tylko nektar, ale także właśnie pyłek, który przygotowują do przechowywania w komórkach plastra, ubijając go w celu zabezpieczenia przed dostępem powietrza. Zostaje on zalany miodem i zasklepiony woskiem. W warunkach beztlenowych następuje proces fermentacji mlekowej trwającej 7 dni. Ta postać zakonserwowanego pyłku nosi nazwę pierzgi. W trakcie fermentacji białka pyłku ulegają rozpadowi do peptydów i aminokwasów. W wyniku tego procesu zawartość tych związków w pierzdze wzrasta o około 20% w stosunku do produktu wyjściowego. Pierzga ma silniejsze działanie lecznicze niż pyłek kwiatowy i aby uzyskać ten sam efekt wystarczy przyjmować 30 g pierzgi przez miesiąc, natomiast 30 g pyłku należy przyjmować przez trzy miesiące [Banaszak, 1993; Da-Rong i in., 2006, Majewska, Trzanek, 2009].

Pyłek kwiatowy stanowi zbiór męskich komórek rozrodczych, tworzących się w pylnikach kwiatowych. Na powierzchni ziaren pyłku roślin owadopylnych tworzą się różnego rodzaju urzeźbienia, wyrostki i wgłębienia, ułatwiające ich przyklejanie się do ciała owadów. Na jego powierzchni znajdują się też pory i bruzdy, przez które przerasta łagiewka pyłkowa, podczas kiełkowania na znamieniu słupka. Aby przynieść do ula 15 mg pyłku, pszczoła musi odwiedzić 80 kwiatów. Każda roślina wytwarza inny charakterystyczny dla niej pyłek. Aby zwiększyć szansę na zapłodnienie, rośliny produkują pyłek w bardzo dużych ilościach. 1 gram pyłku może zawierać do 300 000 ziaren. Pszczoły formują pyłek w postaci obnóży. Para obnóży waży ok. 12-20 mg. Do gromadzenia i przenoszenia pyłku pszczołom służą koszyczki, które znajdują się na zewnętrznej stronie goleni trzeciej pary obnóży. Powierzchnia goleni jest lekko wklęsła i nieowłosiona, jedynie w środkowej części występują 2-3 szczecinki. Na brzegach znajduje się rząd włosków pochylonych ku środkowi. W powstałej w ten sposób komorze owady gromadzą zebrany pyłek. Naturalna lepkość ziaren, wzbogacona śliną pszczoły powoduje, że pyłek tworzy kulkę. Szczecinki zapobiegają przesuwaniu się jej w pszczelich koszyczkach, a włoski uniemożliwiają jej wypadnięcie. Pyłek, w zależności od odwiedzanych przez pszczoły kwiatów, daje obnóże o kolorze charakterystycznym dla danej rośliny, np. z jabłoni – jasnoszary, a z czereśni – brązowoczerwony. Ma on również zróżnicowany skład, który zależy od rośliny z której pochodzi, urodzajności i wilgotności gleby oraz od warunków atmosferycznych panujących w okresie formowania się i dojrzewania pylników. To od gatunku rośliny, z której pszczoły zbierają nektar, a co za tym idzie również rodzaju pyłku zależy skład miodu. W pyłku pszczelim stwierdzono występowanie: białka od 25 do 50%, węglowodanów od 15 do 35%, tłuszczów od 2 do 7%, kwasów nukleinowych od 0,3 do 3%, flawonoidów od 2 do 4%, popiołu od 3 do 5% oraz stosunkowo dużej ilości błonnika wynosząca około 6-7%

[Typański, 1998; Faff 2003; Wilde i Prabucki, 2008; Bazylak i Śliwińska, 2011; Flaczyk i in., 2011]. Białko pyłku kwiatowego obfituje w biologicznie czynne aminokwasy egzogenne, do których zalicza się: lizynę, treoninę, walinę, metioninę, leucynę, izoleucynę, histydynę, fenyloalaninę, argininę, tyrozinę i tryptofan oraz endogenne: kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, serynę, prolinę, glicynę, alaninę i cysteinę. Przyjęto, że dawka 30 g pyłku jest wystarczająca do pokrycia dziennego zapotrzebowania organizmu człowieka na podstawowe aminokwasy. Pyłek jest skromnym ilościowo źródłem węglowodanów, biorąc pod uwagę dzienne zapotrzebowanie organizmu człowieka na cukry. Jest natomiast łatwo przyswajalnym źródłem energetycznym. Węglowodany występują w pyłku w postaci polisacharydów (skrobia, celuloza), a także mono- i disacharydów (glukoza, fruktoza, ksyloza i arabinoza). W pszczelim pokarmie stwierdzono obecność 14 niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), takich jak: kwas linolowy, linolenowy, arachidowy, jak również fosfolipidów. Kompleks witamin obecnych w pyłku ma działanie wielokierunkowe. Zaliczyć można do nich: karotenoidy (prowitamina A), tokoferole (witamina E), tiaminę (witamina B₁), ryboflawinę (witamina B₂), pirydoksynę (witamina B₆), cyjanokobalaminę (witamina B₁₂), kwas askorbinowy (witamina C), kwas nikotynowy (witamina PP), kwas pantotenowy (witamina B₃), kwas foliowy, a także bioflawonoidy (np. kwercetyna). W popiele pochodzącym z pyłku stwierdzono obecność różnych metali np.: K, Mg, Ca, Fe, Na, Mn, Zn i Cu. Występujące w pyłku pszczelim związki biologicznie czynne obejmują substancje o zróżnicowanym działaniu np. fitosterole, kwasy organiczne (jabłkowy, winowy i mlekowy) oraz enzymy (α i β amylaza, kwaśne fosfatazy, katalaza, invertaza, pepsyna, trypsyna, lipaza i laktaza). Do substancji o działaniu antybakteryjnym można zaliczyć: inhibiny oraz fenolokwasy, trójterpeny i fitohormony. Substancje zapachowe obecne w pyłku zaliczane są do olejków eterycznych. Barwniki natomiast są mieszaniną takich związków jak: karotenoidy, flawony, antocyjany, chlorofil, melanina i inne. Wszystkie wymienione substancje są wrażliwe na działanie podwyższonej temperatury, promieni ultrafioletowych, a ponadto na zmianę odczynu pH [Pikulska i Terao, 1998; Almaraz-Abarca i in., 2007; Grzebalska i in., 2007; Balog i in., 2009].

Pyłek kwiatowy pochodzący z różnych gatunków roślin można podzielić na 4 grupy:

- do pierwszej grupy należy zaliczyć pyłek o bardzo dużej wartości odżywczej zbierany z: brzozy, trawy, wrzосу, szafranu, maku polnego, kukurydzy, gruszy, koniczyzny czerwonej i białej, babki i wierzby;
- drugą grupę stanowi pyłek o dość dużych właściwościach odżywczych, pochodzący z: jaworu, buku, bukszpanu, mniszka lekarskiego, topoli i wiazu;
- natomiast pyłek o średniej wartości odżywczych pochodzący z: olchy czarnej, grabu, leszczyny i osiki stanowi trzecią grupę;
- czwarta grupa to pyłek zbierany z drzew iglastych o małej wartości odżywczej [Banaszak 1993].

Metody pozyskiwania pyłku kwiatowego

Zbieraniem pyłku kwiatowego zajmuje się niewielu pszczelarzy, ponieważ jest to czynność mozolna, a sam produkt szybko się psuje. Do pozyskiwania pyłku służą specjalne urządzenia, zwane poławiaczami pyłku. Ogólna zasada ich funkcjonowania polega

na odbieraniu obnóży pyłkowych pszczołom zbieraczkom podczas ich powrotu do ula. W tym celu na ich drodze ustawia się różne przeszkody. Obnóża odbiera się, umieszczając poławiacze pyłku w dennicy lub na wylocie, wskutek czego pszczoły powracając do ula, muszą przeciskać się przez otwory w płycie i pozostawiają większość pyłku na zewnątrz. Ciekawostką jest fakt, że kiedy wlot ula jest zagrodzony przez poławiacz, pszczoły lecą do innych uli, które mają odkryty wlot, dlatego każdy ul powinien być zaopatrzony w poławiacz. Wewnątrz ula poławiacze zakłada się na dennicy lub w górnej części, są to tzw. poławiacze nadramkowe. W dennicy znajduje się szuflada, czyli komora zbiorcza. Jest ona odgradzona dla pszczół, tak żeby nie mogły się do niej dostać i wynosić pyłku. Obnóża pyłkowe należy odbierać codziennie, ponieważ pyłek zawiera 35% wody, szybko pleśnieje i wytwarzają się w nim toksyny. Niedopuszczalne jest natomiast pozostawienie go na kilka dni w stanie wilgotnym po zbiorze - należy go niezwłocznie wysuszyć po zebraniu. Pozyskiwanie pyłku może odbywać się przez cały sezon. Rodziny pszczele, od których uzyskuje się pyłek nie cierpią na jego niedostatek, gdyż pszczoły pracują wówczas intensywniej. Pyłku nie wolno odbierać, jeśli czerw choruje na grzybicę, w rodzinie pszczelej jest słaby instynkt czyszczenia, rodzina jest słaba oraz kiedy gniazdo zostało właśnie poszerzone. Kiedy w ulu jest duży zapas pierzgi, pszczoły przestają zbierać pyłek, pozostawiając w ten sposób miejsce na nektar. Aby pobudzić pszczoły do przynoszenia pyłku, należy zabrać z uli plastry z pierzgą [Meurer-Grimes, 1995; Majewska i Trzanek, 2009]. Do intensywnego poławiania pyłku używa się poławiaczy dennicowych, plastrowych, powałkowych lub zawieszonych nad wylotkami. Poławiacze dennicowe muszą mieć wymiary takie same, jak korpusy uli w pasiece. W przypadku zawieszonego poławiacza pyłku, możliwe jest jego zastosowanie do każdego rodzaju ula, jednak w użytkowaniu jest on dość kłopotliwy, gdyż jego płytka poławiająca może być tylko przez kilka godzin wystawiona na strącanie obnóży. Pszczoły zmuszone są do przeciskania się w obie strony bardzo często blokując otwór, co prowadzi do uduszenia się rodziny.

Wybieranie obnóży pyłkowych powinno odbywać się jak najczęściej, aby nie dopuścić do zawilgocenia pyłku, gdyż zaatakowany przez pleśń pyłek nie nadaje się do spożycia. Niebezpieczne są szczególnie okresy wilgotne i deszczowe. Wysuszone obnóża pyłkowe muszą zostać oczyszczone z wosku i martwych pszczół. Pyłek można czyścić ręcznie, jednak bardziej efektywne jest użycie mechanicznej wialni, w której wykorzystuje się wymuszony przepływ powietrza z wentylatora napędzanego silnikiem elektrycznym. W pojemniku zasobnika powinno się mieścić 11,8 dm³ pyłku, ale z praktyki wynika, że pojemność ta wynosi ok. 10 dm³. Komora oczyszczająca podzielona jest na trzy korytka z pochylniami. Do korytek spadają: obnóża duże i małe oraz zanieczyszczenia o różnych wymiarach. Zanieczyszczenia są wydmuchiwanie na zewnątrz, a pyłek przesuwany jest do komory oczyszczającej [Kluczewski, 2003; Klimek i Tokar, 2007].

Następnym etapem przygotowania pyłku do konsumpcji jest jego wysuszenie. Pyłek rozkłada się cienką warstwą na gęstych sitkach, ustawionych w przewiewnym, ciepłym oraz ciemnym miejscu. Po wstępnym przesuszeniu pyłek zsypuje się na grubszą warstwę. Zaleca się mieszanie pyłku, zwłaszcza na początku procesu suszenia, który powinien trwać ok. 5 dni. Wysuszone obnóża tworzą twarde bryłki o zmienionym zabarwieniu. Zawartość wody w wysuszonym pyłku waha się w granicy od 3 do 6 %. W gospodarstwach

pasiecznych, nastawionych na zbiory większych ilości pyłku stosuje się szafki grzewcze lub suszarki zbudowane na wzór suszarek przemysłowych. Wykorzystuje się też suszarki elektryczne, jednakże temperatura podczas zabiegu nie może przekraczać 40°C, a czas suszenia powinien być możliwie jak najkrótszy, aby ograniczyć utratę składników lotnych pyłku. Uzyskane w ten sposób obnóża rozkłada się cienką warstwą na każdej z półek. Pyłek jest suchy, gdy nie da się go zagnieść, natomiast zbyt silnie wysuszony nie da się sproszkować. Urządzenia te nie powinny wykorzystywać promieniowania ultrafioletowego, gdyż niszczą one składniki pyłku. Innym sposobem suszenia jest suszenie próżniowe lub liofilizacja [Typański, 1998].

Właściwości odżywcze pyłku kwiatowego

Karmienie pyłkiem larw i młodych pszczoł warunkuje ich lepszą kondycję i zwiększoną odporność na choroby. Pozwala to im na efektywniejsze loty i w efekcie końcowym zwiększenie produktywności rodziny pszczelej. Publikacje nawiązujące do wartości odżywczej pyłku pszczelego i jego aktywności biologicznej opisują najczęściej jego wpływ na organizm ludzki, nie skupiając się na właściwościach poszczególnych składników chemicznych pyłku, ale raczej na obecnych na rynku różnych preparatach pyłkowych, np. mieszaniny miodowo-pyłkowej, rozdrobnionych obnóż, wyciągów, drażetek, charakteryzując w ten sposób kompleksowe działanie związków aktywnych. Skuteczność działania pyłku zależy od formy jego podania i stopnia jego przyswajalności przez organizm człowieka. Pszczele obnóża byłyby korzystniejsze dla organizmu człowieka, gdyby nie to, że dla wielu konsumentów są one ciężkostrawne i trudno przyswajalne. Dlatego też sporządza się wyciągi wodne i tłuszczowe [Bratkowski i Wilde, 2002; Alcatara-Neves i in., 2008].

Pyłek pszczeli wykazuje różnorodne działanie bioterapeutyczne:

- antybakteryjne i antybiotyczne – różne w zależności od gatunku rośliny z których pochodzi pyłek;
- regenerujące – pyłek jest cenną odżywką stosowaną w stanach rekonwalescencji i niedożywienia, środkiem wzmacniającym podczas wyczerpania oraz zmęczenia psychofizycznego, poprawiającym wydolność intelektualną w przypadkach opóźnionego rozwoju, jak również poprawiającym łaknienie, oraz eliminującym potrzebę przyjmowania anabolików przez sportowców i osób ciężko pracujących;
- uodparniające – korzystnie wpływa na układ immunologiczny powodując wzrost odporności, wzmacnia wytwarzanie przeciwciał, przyspiesza leczenie zakażeń, chroni przed promieniowaniem jonizującym;
- detoksykacyjne – w odniesieniu do związków chemicznych i leków syntetycznych działa osłaniająco i odtruwająco na komórki wątroby;
- terapeutyczne – zależne od rodzaju rośliny z której pochodzi np. pyłek z kwiatów akacji działa uspokajająco, natomiast uzyskiwany z kwiatów jabłoni polecany jest w schorzeniach serca, pyłek pochodzący z tymianku reguluje ciśnienie krwi;
- odżywcze – pobudza apetyt, normalizuje procesy trawienia, ma wysoką wartość dietetyczną i odżywczą [Almaraz-Abarca i in., 2007; Louaileche i in., 2007; Balog i in., 2009; Kuźmicka i in., 2010].

Pyłek kwiatowy znalazł zastosowanie w leczeniu wielu schorzeń. Jego spożycie wskazane jest przy:

- chorobach skóry np. łuszczycy i wypadaniu włosów;
- stanach zapalnych i wrzodziejących błony śluzowej jamy ustnej i opryszczce;
- gruźlicy;
- nadciśnieniu tętniczym;
- zapaleniu mięśnia sercowego;
- miażdżycy i jej powikłaniach poprzez obniżenie poziomu lipidów oraz korzystnym wpływie na układ krążenia i działaniu rozkurczowym na naczynia wieńcowe;
- chorobach górnych dróg oddechowych takich jak: przeziębienie, grypa, poprzez skrócenie czasu leczenia i łagodzenie infekcji;
- chorobach przewodu pokarmowego np. zaparcia, biegunki, wrzodziejące zapalenie jelita grubego;
- chorobach wątroby np.: zapalenia wątroby typu bakteryjnego i wirusowego, toksyczne uszkodzenia, marskość, stany pourazowe;
- stanach zapalnych i przerostowych gruczołu krokowego, pęcherzyków nasiennych, nieswoistych zapaleń cewki moczowej – pyłek wpływa na cofanie się zmian zapalnych, likwidację zalegania moczu, impotencję, poprawa również spermatogenezę i owogenezę;
- bywa pomocny przy niedokrwistości, anemii i chorobach alergicznych;
- chorobach narządów wydzielania wewnętrznego – następuje zwiększenie wydzielania insuliny i tyroksyny;
- chorobach narządu wzroku np.: zapalenie siatkówki, rogówki bądź spojówki;
- chorobach psychicznych, zaburzeniach starczych, stanach wyczerpania, nerwicach oraz chorobach nowotworowych [Almaraz-Abarca i in., 2007; Louaileche i in., 2007; Balog i in., 2009; Kuźmicka i in. 2010].

Ze względu na swoje właściwości pyłek kwiatowy znalazł również bardzo szerokie zastosowanie w kosmetyce [Kuźmicka i in., 2010].

Dawkowanie pyłku pszczelego

Zwykle w celach leczniczych polecana jest miesięczna kuracja, która polega na przyjmowaniu pyłku pszczelego codziennie, najlepiej rano na czczo, zaczynając od kilku gramów i dochodząc do ok. 35 g na dobę. W kuracjach wielomiesięcznych, sezonowych np. zimowo-wiosennych nie należy przekraczać ilości 20 g pyłku na dobę. W kompleksowej terapii w połączeniu z innymi produktami pszczelimi należy zmniejszyć jego dawki. Dzieciom do lat 10 należy podawać 1/3 dawki, natomiast dzieciom w wieku 10-15 lat połowę dawki przeznaczonej dla dorosłych. Przerwa w leczeniu powinna trwać ok. 3 miesięcy. Spożywanie pyłku zalecane jest w stanie naturalnym, po zmieszaniu z np. masłem, mlekiem, sokiem owocowym, konfiturami lub twarogiem. Jednak najczęściej stosuje się mieszanki miodowo-pyłkowe, wykonywane w różnych proporcjach. Im mniejsza zawartość pyłku w stosunku do miodu, tym taką mieszankę można dłużej przechowywać, np. mieszanka o proporcji 1:1 może być przechowywana przez okres roku, a mieszanka

o proporcji 1,7:1,0 nie traci zdolności do spożycia po upływie pół roku [Kałuży, 1996; Flaczyk i in., 2011,].

Podsumowanie

Pyłek pszczele należy do produktów żywnościowych, które powinny odznaczać się wysokimi standardami jakościowymi. Wynika to z faktu, że konsumenci sięgają po ten produkt w momencie poważnych problemów zdrowotnych. Możliwość skażenia pyłku jest bardzo prawdopodobna przez zanieczyszczenia środowiskowe lub leki weterynaryjne, które mogą zawierać łatwo kumulujące się w roślinach pierwiastki toksyczne. Korzystne działanie pyłku zostało udokumentowane naukowo, jest on dość zróżnicowanym produktem roślinnym, bogatym w substancje biologicznie aktywne. Pozwala on na uzupełnianie niedoborów pokarmowych, jak również na lepsze przystosowanie organizmu ludzkiego do niekorzystnych warunków otoczenia, poprawiając jego stan fizyczny i psychiczny. Na tej podstawie można przyjąć, że pyłek kwiatowy należy uznać za wartościowy suplement diety. Należy dodać, że omawiany produkt pszczele nie stanowi zagrożenia dla zdrowia i znajduje się już od dłuższego czasu w charakterze suplementów diety na rynku krajowym i rynkach innych krajów Unii Europejskiej.

Literatura

- Alcantara – Neves N.M., Figueiredo C. A. V., Figueirredo T. B., Freire K. R. L., Medeiros K. C. P., Piuvezam M. R., Santos F. A. R., Silva T. M. S., Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin – sensitized mice. *Jurnal of Ethnopharmacology*, 2008, 119, 41-46.
- Almaraz – Abarca N., Ávila – Reyes J. A., Corral J. H., González – Valdez L. S., Graça Campos M., Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee – collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Jurnal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20, 119-124.
- Balog T., Bubalo D., Kušić B., Likić S., Marotti T., Pinto B., Reali D., Rusak G., Sobočanec S., Šarić A., Šverko V., Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47, 547-554.
- Banaszak J., *Ekologia pszczół*. Wydawnictwo PWN, Warszawa, Poznań, 1993.
- Bratkowski J., Wilde J., Technologie zwiększające pozyskiwanie obnoży pyłkowych w polepszaniu dochodowości pasiek. *Biul. Nauk.*, 2002, Nr 18 (5), 113-122.
- Bazylak G., Śliwińska A., Wstępna ocena jakości miodów pszczelich na podstawie wybranych parametrów fizykochemicznych i mikrobiologicznych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2011, 3, 784-791.
- Da – Rong Y., Fang – Lin L., Jian – Ping C., Xue – Wen Z., Pollen phenolics and regulation of pollen foraging in honeybee colony. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 2006, 59, 582-588.
- Faff J., Czy wysiłek fizyczny wymaga zwiększonej podaży antyoksydantów. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, 2003, 1/2, 290-295.

- Flaczyk E., Górecka D., Korczak J., *Towaroznawstwo żywności pochodzenia roślinnego*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2011, 254-257.
- Grzebalska A., Szkoda J., Żmudzki J., *Zawartość wybranych pierwiastków w miodzie pszczelim*. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2007, 1, 31-35.
- Jarosz M., Wierzejska R., *Związki polifenolowe w herbacie i ich znaczenie zdrowotne*. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, 2004, 3, 274-280.
- Kałuży E., *Pszczela apteczka*. Wydawnictwo i Wytwórnia Leków Naturalnych „APIHERBA”, Leszno 1996.
- Klimek B., Tokar M., *Rośliny z rodzaju Forsythia jako źródło naturalnych antyoksydantów i fitoestrogenów*. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2007, 1, 45-55.
- Kluczewski W., *Wialnia do pyłku kwiatowego*. *Pszczelarstwo*, 2003, 1, 22-23.
- Kuźmicka L., Puzanowska-Tarasiewicz H., Tarasiewicz M., *Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu*. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2010, 1, 9-14.
- Louaileche H., Ouchemoukh S., Schweitzer P., *Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys*. *Food Control*, 2007, 18, 52-58.
- Majewska E., Trzanek J., *Właściwości przeciwutleniające miodów wielokwiatowych i innych produktów pszczelich*. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2009, 4, 1089-1094.
- Meurer – Grimes B., *New evidence for the systematic significance of acylated spermidines and flavonoids in pollen of Higher Hamamelidae*. *Brittonia*, 1995, 47 (2), 130-142.
- Pikulska M. K., Terao J., *Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes*. In: *Flavonoids in Health and Disease*. Ed. C. Rice-Evans, New York, 1998, 277-293.
- Typański C., *Pszczoły. Pasieka towarowa*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań 1998.
- Wilde J., Prabucki J., *Hodowla pszczół*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań 2008.

KATARZYNA MIKOŁAJCZYK-BATOR

Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości

Wydział Towaroznawstwa

Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

katarzyna.mikolajczyk-bator@ue.poznan.pl

**ZAWARTOŚĆ BARWNIKÓW BETALAINOWYCH, ZDOLNOŚĆ
ANTYOKSYDACYJNA ORAZ CECHY SENSORYCZNE ŚWIEŻYCH,
PASTERYZOWANYCH I PRZECHOWYWANYCH SOKÓW
Z BURAKA ĆWIKŁOWEGO**

Streszczenie

Celem pracy była ocena zawartości barwników betalainowych, zdolności antyoksydacyjnej i cech sensorycznych soków świeżych, pasteryzowanych i przechowywanych otrzymanych z korzeni 3 odmian buraka ćwikłowego. Najwyższą zawartością barwników betalainowych oraz zdolnością antyoksydacyjną charakteryzował się sok z odmiany Chrobry, a najniższą sok z odmiany Nochowski. Proces pasteryzacji soków spowodował znaczną degradację betacyjanów wynoszącą od 24 do 29 %, i wzrost betaksantyn od 10 do 56%, oznaczonych metodą wg Nilssona. Zdolności antyoksydacyjne soków pasteryzowanych nie uległy istotnym zmianom.

Półroczne przechowywanie pasteryzowanych soków bez dostępu światła w temp. 4°C, powodowało niewielkie straty barwników fioletowych (ok. 3%) i znaczne straty barwników żółtych (od 11 do 20%), w porównaniu do soków pasteryzowanych przed przechowywaniem. Zdolności antyoksydacyjne soków pasteryzowanych po półrocznym przechowywaniu nie różniły się istotnie od zdolności antyoksydacyjnych soków świeżych.

Proces pasteryzacji miał istotny wpływ na zmniejszenie odczucia smaku i posmaku gorzkiego, oraz smaku cierpkiego w sokach, a półroczne przechowywanie dodatkowo wpłynęło na obniżenie gorzkości i cierpkości soku z buraków badanych odmian.

Z kolei odczucie smaku słodkiego było silniejsze w sokach pasteryzowanych niż w sokach świeżych, a przechowywanie soków pasteryzowanych miało istotny wpływ na zwiększenie odczucia smaku słodkiego.

Słowa kluczowe: betalainy, antyoksydanty, cechy sensoryczne, sok z buraka ćwikłowego

Wprowadzenie

Żywność pochodzenia roślinnego zawiera wiele składników, które oprócz dostarczania substancji odżywczych i energii mogą oddziaływać prozdrowotnie na ludzki organizm. Burak ćwikłowy jest cennym źródłem biologicznie czynnych związków, które wykazują szereg korzystnych dla organizmu właściwości, m.in. przeciwutleniające, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [Pedreno i Escribano, 2000; Strack, 2003]. Właściwości prozdrowotne buraka ćwikłowego wynikają z obecności barwników

betalainowych, a także częściowo z obecności związków polifenolowych isaponin triterpenowych [Escribano i in., 1998; Ravichandran i in., 2012; Mikołajczyk-Bator, 2015].

Betalainy zaliczane są do kationowych antyoksydantów, betacyjany, dzięki obecności grupy fenolowej (-OH) w pozycji C6 i grupy aminowej (-NH) w pierścieniu, są dobrymi donorami elektronów [Strack i in., 2003], i mogą działać jako zmiatacze wolnych rodników [Pedreno i Escribano, 2000].

Burak ćwikłowy należy do warzyw spożywanych w dużej ilości przez cały rok, jest tanim i łatwo dostępnym surowcem na polskim rynku. Surowiec ten jest spożywany głównie po jego przetworzeniu, w trakcie którego zmienia się struktura barwników betalainowych oraz właściwości przeciwutleniające tego surowca. Sok z buraka ćwikłowego w postaci koncentratu lub suszu może być wykorzystany do wyrobu koncentratów barszczu oraz jako preparat barwiący, używany do barwienia produktów słabo kwaśnych i obojętnych, takich jak produkty mleczarskie, cukiernicze (w tym dżemy) czy wyroby wędliniarskie [Zielińska-Przyjemka i in., 2009; Georgiev i in., 2010]. Zawartość barwników betalainowych w soku buraka ćwikłowego waha się od 0,8 do 1,3 g/L w zależności od odmiany buraka [Wruss i in., 2015].

Poszczególne odmiany buraków ćwikłowych różnią się długością okresu wegetacji, cechami morfologicznymi, plennością, a także składem i cechami smakowymi [Kowalski i Pędzinski, 2003].

Celem pracy była ocena zawartości barwników betalainowych, zdolności antyoksydacyjnej i cech sensorycznych soków świeżych, pasteryzowanych i przechowywanych otrzymanych z 3 odmian korzeni buraka ćwikłowego.

Material i metody

Materiałem do badań były korzenie buraka ćwikłowego trzech odmian Bonel, Chrobry i Nochowski. Korzenie buraków ćwikłowych pochodziły ze „Spójni”, Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze w Nochowie. Sok przygotowywano za pomocą sokowirówki (Zelmer), a następnie odwirowano (15 min, 4600 obr./min).

Pasteryzację soku przeprowadzono w zamkniętych szklanych pojemnikach, przy użyciu łaźni wodnej w temp. 90°C przez 30 min. Bezpośrednio po zakończeniu pasteryzacji pojemniki z sokiem chłodzono w wodzie o temp. 20°C. Pasteryzowany sok w pojemnikach szklanych (250 ml) przechowywano przez 6 miesięcy bez dostępu światła w temp. 4°C.

Zawartość barwników betalainowych w sokach z buraka ćwikłowego oznaczono metodą różnicową wg Nilssona [Nilsson, 1970]. Metoda ta pozwala na równoczesne oznaczenie zawartości fioletowych betacyjanów i żółtych betaksantyn. Zawartość barwników podano w mg/100 ml próby. Pomiary absorbancji wykonywano przy 476, 538 i 600 nm, stosując spektrofotometr Thermo Electron Corporation *Helios Beta*. Przed pomiarem absorbancji, próbę rozcieńczano buforem fosforanowym o pH 6,5 tak, aby wartość absorbancji mieściła się w zakresie 0,2 — 0,8. Jako próbę zerową stosowano bufor fosforanowy o pH 6,5.

Zdolność antyoksydacyjną soków z buraka oznaczono metodą z kationorodnikiem ABTS [Re i in., 1999], polegającą na określeniu stopnia zmiatania rodników ABTS⁺ wytworzonych uprzednio podczas reakcji chemicznych z nadsiarczanem potasu K₂O₈S₂. Wytworzone podczas reakcji rodniki mają barwę niebieskozieloną, dodawane

antyoksydanty, redukując kationorodnik ABTS (kwas 2,2'-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy), powodują zanik barwy roztworu, przy czym spadek intensywności zabarwienia zależy od zawartości przeciwutleniaczy w roztworze. Na podstawie prostoliniowej zależności procentowej redukcji kationorodnika ABTS od stężenia soku wyznaczono równanie regresji. Współczynniki z równania regresji badanych soków oraz z krzywej standardowej wyznaczonej dla Troloxu posłużyły do wyliczenia wartości TEAC poszczególnych soków w μmol Troloxu na ml soku.

Ocenę sensoryczną wykonywano za pomocą arkusza sporządzonego przy zastosowaniu metody profilowania smakowości [Baryłko-Pikielna i Matuszewska, 2009]. Badano następujące wyróżniki: smak gorzki, posmak gorzki (ang. bitter aftertaste), smak cierpki, słodki i buraczany. Natężenie not smakowych było mierzone 10-stopniową skalą. Analizę sensoryczną prowadzono techniką przeplukiwania jamy ustnej (ang. *sip-and-spit*) [Frank i in., 2008]. We wszystkich przeprowadzonych ocenach sensorycznych brał udział 11-osobowy zespół osób oceniających, odpowiednio wyselekcjonowany i przeszkolony, o sprawdzonej wrażliwości sensorycznej [PN-ISO8586—1(2): 1998].

Ocenę różnic pomiędzy wartościami średnimi przeprowadzono na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji, na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. W celu niepewności pomiaru TEAC wykreślono krzywe metodą najmniejszych kwadratów. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone w trzech niezależnych powtórzeniach, dane opisano podając odchylenie standardowe ($\pm\text{SD}$). Obliczeń dokonano za pomocą arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel.

W celu opracowania wyników ocen sensorycznych oraz określenia różnic między zdolnością antyoksydacyjną soków świeżych, ogrzewanych i przechowywanych otrzymanych z 3 odmian buraka, zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji i weryfikację hipotez przy zastosowaniu poziomu istotności $\alpha = 0,05$, za pomocą arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel. Weryfikowano następujące hipotezy: analizowane soki z 3 odmian różnią się badanymi wyróżnikami smakowymi. Soki świeże, pasteryzowane i przechowywane różnią się zdolnością antyoksydacyjną oraz natężeniem odczuwania smaku i posmaku gorzkiego, smaku cierpkiego, słodkiego i buraczanego.

Wyniki i dyskusja

Największą zawartość barwników betalainowych uzyskano w soku odmiany Chrobry, a najmniejszą z odmiany Nochowski (tab. 1). Stwierdzono korelację między zawartością betacyjanów a zdolnością antyoksydacyjną soków ($R^2 = 0,98$) z badanych odmian buraków ćwikłowych. Zawartość barwników fioletowych w odmianie Chrobry wynosiła 113 $\text{mg}/100 \text{ ml}$ soku, a żółtych 52 $\text{mg}/100 \text{ ml}$ soku. Wysoką zawartością barwników fioletowych i żółtych charakteryzował się również sok z odmiany Bonel, zawartość barwników fioletowych wynosiła 99 $\text{mg}/110 \text{ ml}$, a żółtych 90 $\text{mg}/100 \text{ ml}$ soku.

Pasteryzacja miała istotny wpływ na zmiany zawartości barwników betalainowych w sokach. Ogrzewanie soków buraka ćwikłowego w temperaturze 90°C przez 30 minut powodowało znaczne straty barwników fioletowych wynoszące od 24 do 29%, w zależności od analizowanego soku otrzymanego z 3 odmian buraka, a w przypadku barwników żółtych obserwowano wzrost zawartości tych barwników od 10 do 56%.

Jak wynika z doświadczenia, ogrzewanie soków z buraka ćwikłowego powodowało znaczną degradację barwników fioletowych, natomiast nie wpływało destrukcyjnie na zawartość barwników żółtych, których poziom znacznie wzrósł. Podobne wyniki uzyskali Kidoń i in., [2007] – wg autorów działanie podwyższonej temperatury (suszenie, blanszowanie) zmniejsza zawartość barwników fioletowych i zwiększa barwników żółtych w korzeniach buraka ćwikłowego [Kidoń i Czapski, 2007].

Zmniejszenie stężenia betacyjanów podczas obróbki termicznej jest wynikiem przede wszystkim rozpadu betaniny na kwas betalainowy i *cyklo-DOPA* [Saguy i in., 1978]. Badania innych autorów dowodzą, że pod wpływem wysokiej temperatury fioletowe betacyjany mogą ulegać różnym przemianom chemicznym, w tym dekarboksylacji, dehydrogenacji, hydrolizy prowadząc do powstania produktów degradacji betacyjanów o barwie żółtej [Nemzer i in., 2011].

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że pomimo bardzo dużych strat barwników fioletowych w czasie ogrzewania, zdolność antyoksydacyjna nie ulegała istotnym zmianom, a w przypadku soku z odmiany Chrobry, zdolność antyoksydacyjna zwiększyła się o 3%. Jednocześnie w soku z tej odmiany, stwierdzono największy wzrost zawartości barwników żółtych w czasie ogrzewania (o 56%), co wskazuje na powstanie produktów rozpadu z betacyjanów o barwie żółtej, posiadających dużą zdolność antyoksydacyjną.

Wzrost zdolności antyoksydacyjnej buraka ćwikłowego w czasie przetwarzania obserwowali również Ravichandran i in. [2013]. Autorzy stwierdzili, że w czasie procesów technologicznych takich jak gotowanie, pieczenie i podgrzewanie mikrofalowe buraka ćwikłowego, następuje 2-3 krotny wzrost zdolności antyoksydacyjnej tego surowca, w porównaniu z próbą kontrolną [Ravichandran i in., 2013]. Podobne wyniki uzyskali Kidoń i in. [2007], stwierdzili 2-krotny wzrost zdolności antyoksydacyjnej buraków w czasie blanszowania, pomimo strat barwników czerwonych na poziomie 25% [Kidoń i in., 2007].

Bardzo duża degradacja barwników fioletowych w czasie ogrzewania i niewielki spadek lub wzrost zdolności antyoksydacyjnej soków ogrzewanych (tab. 1), pozwala przypuszczać, że zdolność antyoksydacyjna soków z buraka jest sumą naturalnie występujących w buraku ćwikłowym różnych metabolitów wtórnych (barwników betalainowych, związków polifenolowych i saponin triterpenowych) i ich produktów rozpadu.

Z danych dostępnych w literaturze wynika, że za zdolność antyoksydacyjną buraków ćwikłowych odpowiedzialne są nie tylko barwniki betalainowe, ale również częściowo związki polifenolowe oraz saponiny triterpenowe [Escribano i in., 1998; Ravichandran i in., 2012; Mikołajczyk-Bator, 2015]. W burakach ćwikłowych występują małe ilości kwasów hydroksycynamonowych takich jak galusowy, syringowy, kofeinowy i flawonoidy [Kazimierczak i in., 2014], oraz saponiny triterpenowe które stanowią liczną grupę związków o bardzo zróżnicowanej budowie chemicznej, będących *O*-glikozydowymi pochodnymi 4 różnych aglikonów: kwasu oleanolowego, hederageniny, kwasu akebonowego i gipsogeniny [Mikołajczyk-Bator i in., 2016].

Zdolność antyoksydacyjna soków pasteryzowanych po półrocznym przechowywaniu w temp. 4°C, nie różniła się istotnie od zdolności antyoksydacyjnej soków świeżych i ogrzewanych z poszczególnych odmian. Przechowywanie pasteryzowanych soków powodowało niewielkie straty barwników fioletowych (około 3%) i znaczne straty

barwników żółtych (od 11 do 20%), w porównaniu do soków pasteryzowanych przed przechowywaniem. Jedną z przyczyn dużych strat barwników żółtych po przechowywaniu może być to, że produkty rozpadu betacyjanów, charakteryzujące się barwą żółtą i powstające w czasie ogrzewania, są niestabilne w czasie przechowywania.

Analizując oceny sensoryczne soków świeżych, pasteryzowanych i przechowywanych/trzymanych z 3 odmian buraka, największym odczuciem gorzkości charakteryzowały się soki z odmian Nochowski i Chrobry. Gorzkość korzeni tych odmian odczuwano na poziomie 3,7 i 3,2 pkt. w 10-stopniowej skali ocen (rys. 1), natomiast sok z odmiany Bonel cechował się mniejszym odczuciem smaku gorzkiego (2,0 pkt.). Podobnie było w przypadku posmaku gorzkiego (aftertaste), który był cechą dominującą w sokach z odmian Chrobry i Nochowski. Posmak gorzki w świeżych sokach z tych odmian odczuwano na poziomie 4,6 pkt., a w soku z odmiany Bonel na poziomie 3,5 pkt. Proces pasteryzacji istotnie wpłynął na zmniejszenie posmaku gorzkiego w badanych sokach (4,0, 3,6 i 1,8 pkt. odpowiednio dla odmiany Chrobry, Nochowski i Bonel). Półroczne przechowywanie pasteryzowanych soków wpłynęło na dalszy spadek odczuwania cech goryczkowych (smaku i posmaku gorzkiego) we wszystkich analizowanych sokach (rys. 1).

Podobną zależność stwierdzono w przypadku smaku cierpkiego, soki świeże były znacznie bardziej cierpkie niż soki pasteryzowane, a półroczne przechowywanie soków pasteryzowanych dodatkowo wpłynęło na obniżenie cierpkości.

Odwrotną zależność stwierdzono w przypadku smaku słodkiego, soki ogrzewane były słodsze niż soki świeże, średnio o 0,6 pkt. Odczucie smaku słodkiego w sokach świeżych było na poziomie od 3,8 do 4,1 pkt., w zależności od odmiany, a po ogrzewaniu na poziomie od 4,5 do 4,6 pkt., natomiast po przechowywaniu odczucie słodkości w sokach było jeszcze wyżej ocenione na poziomie od 4,9 do 5,0 pkt.

Stwierdzono istotne różnice smaku słodkiego i cierpkiego w sokach świeżych, ogrzewanych i przechowywanych z buraka ćwikłowego.

We wszystkich analizowanych odmianach natężenie smaku buraczanego oceniono na wysokim poziomie w zakresie od 4,4 do 4,7 pkt. Smak buraczany jest typowym wyróżnikiem tego surowca. Odczucie smaku buraczanego w analizowanych sokach z 3 odmian buraka ćwikłowego nie różniło się istotnie po ogrzewaniu czy przechowywaniu, w porównaniu do soków świeżych.

Stwierdzono, że pasteryzowanie i przechowywanie soków pasteryzowanych poprawia ich cechy sensoryczne, wpływając na zmniejszenie intensywności odczucia cech goryczkowych oraz smaku cierpkiego i jednocześnie zwiększenie odczucia smaku słodkiego. Szczególną uwagę zwraca fakt, że wszystkie soki charakteryzowały się silniejszym posmakiem (aftertaste) gorzkim, niż smakiem gorzkim.

Istotne różnice w smaku i posmaku gorzkim badanych soków, powodują na ogół różne grupy związków chemicznych, do których zalicza się obecne w burakach ćwikłowych saponiny triterpenowe. Wyniki badań sensorycznych wyizolowanej mieszaniny saponin z odmiany Nochowski wykazały, że grupa tych związków powoduje silny smak gorzki [Mikołajczyk-Bator i Kikut-Ligaj, 2016].

Tabela 1. Zawartość barwników betalainowych i zdolność antyoksydacyjna w sokach świeżych, pasteryzowanych oraz przechowywanych po pasteryzacji, z 3 odmian buraka ćwikłowego

Odmiana buraka	Zawartość barwników betalainowych wg Nilssona[mg/100ml]						TEAC[μM Trolox/ml]		
	Sok świeży		Sok pasteryzowany ¹		Sok świeży		Sok pasteryzowany ¹		
	barwniki fioletowe	barwniki żółte	barwniki fioletowe	barwniki żółte	barwniki fioletowe	barwniki żółte	świeży	pasteryzowany	paster./przech.
Bonel	99.5 ^{b, A} ±1.05	90.1 ^{b, A} ±1.55	75.2 ^{b, B} ±1.00	99.7 ^{b, B} ±1.44	72.8 ^{b, C} ±1.02	88.3 ^{b, C} ±0.09	17.7 ^{e, F} ±0.02	16.6 ^{e, E} ±0.03	16.2 ^{e, D} ±0.04
Chrobry	113.8 ^{c, A} ±1.39	52.5 ^{c, A} ±1.73	80.5 ^{c, B} ±0.51	82.2 ^{c, B} ±0.65	79.1 ^{c, C} ±1.04	68.9 ^{c, C} ±1.02	20.7 ^{f, F} ±0.01	21.4 ^{f, E} ±0.02	20.2 ^{f, D} ±0.02
Nochowski	84.2 ^{a, A} ±1.05	43.3 ^{a, A} ±0.70	63.7 ^{a, B} ±0.50	58.4 ^{a, B} ±0.49	61.3 ^{a, C} ±0.06	46.3 ^{a, C} ±0.05	15.5 ^{d, F} ±0.02	15.2 ^{d, E} ±0.03	15.1 ^{d, D} ±0.04

¹Warunki pasteryzacji: 90°C/30minut

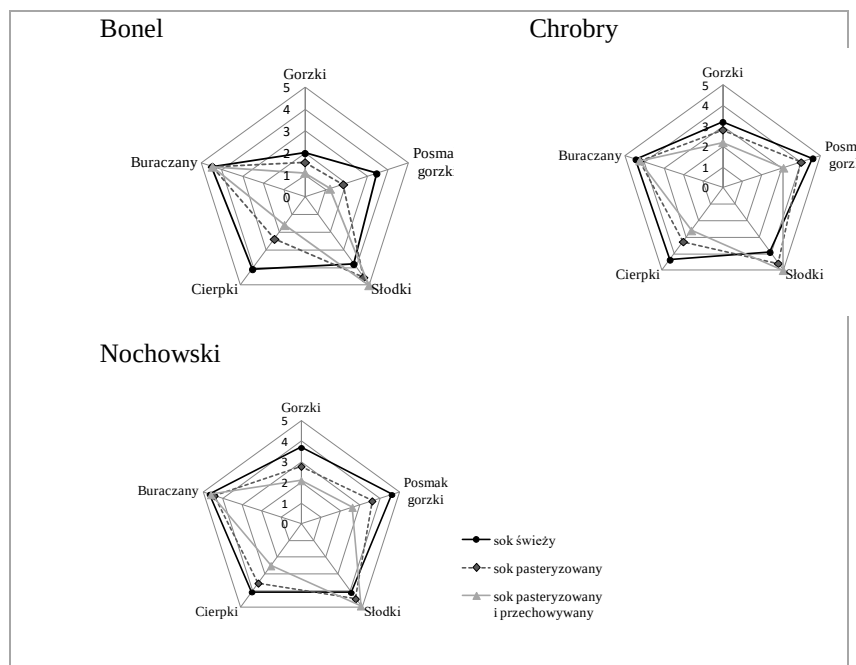
²Warunki przechowywania: 6 miesięcy, bez dostępu światła w temp.

^{a, b, c} zawartość barwników fioletowych lub żółtych różni się istotnie między odmianami (istotne różnice między średnimi w wierszach)

^{A, B, C} zawartość barwników fioletowych lub żółtych różni się istotnie w sokach świeżych, pasteryzowanych i przechowywanych (istotne różnice między średnimi w kolumnach)

^{d, e, f} zdolność antyoksydacyjna soków różni się istotnie między odmianami (istotne różnice między średnimi w wierszach)

^{D, E, F} zdolność antyoksydacyjnasoków świeżych, pasteryzowanych i przechowywanych nie różni się istotnie (brak istotnych różnic między średnimi w kolumnach)



Rysunek 1. Relacja pomiędzy cechami sensorycznymi soku świeżego, pasteryzowanego i przechowywanego po pasteryzacji, z 3 odmian buraka ćwikłowego (A) Bonel, (B) Chrobry, (C) Nochowski

warunki pasteryzacji: 90°C/30min; warunki przechowywania: 6 miesięcy, bez dostępu światła w temp. 4°C

Wnioski

Proces pasteryzacji soków powodował znaczną degradację betacyjanów wynoszącą od 24 do 29 %, i wzrost betaksantyn od 10 do 56%, oznaczonych metodą wg Nilssona.

Przechowywanie pasteryzowanych soków z buraka powodowało niewielkie straty barwników fioletowych (około 3%) i znaczne straty barwników żółtych (od 11 do 20%) w porównaniu do soków pasteryzowanych przed przechowywaniem.

Zarówno pasteryzacja jak i półroczne przechowywanie pasteryzowanych soków nie powodowało istotnych różnic w zdolności antyoksydacyjnej soku z buraków analizowanych odmian.

Soki świeże charakteryzowały się większym natężeniem odczuwania smaku i posmaku gorzkiego oraz smaku cierpkiego, niż soki pasteryzowane. Największą intensywnością smaku i posmaku gorzkiego, charakteryzowały się soki z odmian Nochowski i Chrobry.

Półroczne przechowywanie pasteryzowanych soków wpłynęło na zmniejszenie odczucia gorzkości i cierpkości soku z buraków badanych odmian.

Proces pasteryzacji miał istotny wpływ na zwiększenie odczucia smaku słodkiego w sokach, a przechowywanie dodatkowo nasiliło odczucie słodkości w sokach z buraków badanych odmian.

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Nauki grant nr 2012/07/B/NZ9/00047

Literatura

- Barylko-Pikielna N., Matuszewska I., Sensoryczne Badanie Żywności. Podstawy. Metody. Zastosowania. Wydawnictwo Naukowe Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2009.
- Escribano J., Pedreno M. A., Garcia-Carmona F., Munoz R., Characterization of the Antiradical Activity of Betalains from *Beta vulgaris* L. Roots. *Phytochemical Analysis*, 1998, 9, 124-126.
- Frank O., Blumberg S., Krümpel G., Hofmann T., Structure determination of 3-O-caffeoyl-epiquinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (20), 9581-9585.
- Georgiev V.G., Weber J., Kneschke E.M., Denev P.N., Bley T., Pavlov A.I., Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit dark red. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2010, 62 (2), 105-111.
- Kazimierczak R., Hallmann E., Lipowski J., Drela N., Kowalik A., Pussa T., Matt D., Luik A., Gozdowski D., Rembia X.K.E., Beetroot (*Beta vulgaris* L.) and naturally fermented beetroot juice from organic and conventional production: metabolomics, antioxidant levels and anti-cancer activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94 (13), 2618-2629.
- Kidoń M., Czapski J., Wpływ obróbki termicznej na zawartość barwników betalainowych i zdolność przeciwutleniającą buraka ćwikłowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2007, 1, 124-131.
- Kowalski M., Pędzinski W., Odmiany buraków ćwikłowych ze „Spójni” Nochow. Owoce, Warzywa i Kwiaty, 2003, 7, 23-25.
- Mikołajczyk-Bator K., Antioxidant activity of triterpene saponins from red beet. BACIF International Conference. Abstracts. 2015, 15-16 October, Łódź, 28.
- Mikołajczyk-Bator K., Błaszczak A., Czyżniewski M., Kachlicki P., Characterization and identification of triterpene saponins in the roots of red beet (*Beta vulgaris* L.) using two HPLC-MS systems. *Food Chemistry*, 2016, 192, 979-990.
- Mikołajczyk-Bator K., Kikut-Ligaj D., Triterpene saponins as bitter components of red beetroot. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2016, 1(104). ISBN 83-7417-113-8.
- Nemzer B., Pietrzakowski Z., Spórna A., Stalica P., Thresher W., Michałowski T., Wybraniec S., Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet Root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chemistry*, 2011, 127, 42-53.
- Nilsson T., Studies into the Pigments in Beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *Vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbrukshogskolans Annaler*, 1970, 36, 179-219.
- Pedreno M.A., Escribano J., Studying the oxidation and the antiradical activity of betalain from beetroot. *Journal of Biological Education*, 2000, 35, 49-51.

PN-ISO8586—1(2) 1998. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania oceniających. Wybrani oceniający.

Ravichandran K., Ahmed A.R., Knorr D., Smetanska I., The effect of different processing methods on phenolic acid content and antioxidant activity of red beet. *Food Research International*, 2012, 48, 16-20.

Ravichandran K., Thaw Saw N.M.M., Mohdaly A.A.A., Gabr A.M.M., Kastell A., Riedel H., Cai Z., Knorr D., Smetanska I., Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International*, 2013, 50, 670-675.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26, 1231-1237.

Saguy I., Kopelman I.J., Mizrahi S.: Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26, 360-362.

Strack D., Vogt, T., Schielmann W., Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 2003, 62, 247-269.

Wruss J., Waldenberger G., Huemer S., Uygun P., Lanzerstorfer P., Müller U., Höglinger O., Weghuber J., Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, 42, 46-55.

Zielińska-Przyjemaska M., Olejnik A., Dobrowolska-Zachwieja A., Grajek W., In vitro effects of beetroot juice and chips on oxidative metabolism and apoptosis in neutrophils from obese individuals. *Phytotherapy Research*, 2009, 23 (1), 49-55.

JOANNA KOBUS-CISOWSKA, EWA FLACZYK, MONIKA PRZEOR,
DOMINIK KMIĘCIK, MARZANNA HEŚ, KRYSZYNA SZYMANDERA-BUSZKA
Katedra Technologii Żywności Człowieka
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
joannak@up.poznan.pl

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA PREPARATÓW Z LIŚCI MORWY JAKO SKŁADNIKÓW MLECZNYCH NAPOJÓW FERMENTOWANYCH

Streszczenie

Celem pracy była ocena sensoryczna napojów mlecznych: mleka czekoladowego oraz maślanki z dodatkiem ekstraktu z morwy białej (*Morus alba* L.) oraz kakao, żurawiny i aronii. W tym celu wykonano ocenę konsumencką oraz ocenę metodą ilościowej analizy opisowej czyli profilowania sensorycznego. Stwierdzono, że ekstrakt z liści morwy białej użyty jako składnik mleka czekoladowego, korzystnie wpływał na cechy sensoryczne. W metodzie konsumenckiej najlepiej oceniono próbę z 0,3% dodatkiem ekstraktu, a w ocenie profilowania sensorycznego próbę, która zawierała 0,5% ekstraktu z morwy. Wyniki oceny sensorycznej maślanki z ekstraktem z liści morwy białej przy jednoczesnym dodatku owoców aronii i żurawiny, zależały od użytego stężenia wymienionych dodatków. Najlepiej oceniono próbę zawierającą dodatek ekstraktu na poziomie 0,4% oraz owoce aronii w ilości 5% i żurawiny 10%. Stwierdzono, że zastosowanie dodatku ekstraktu z liści morwy umożliwia otrzymanie nowych, atrakcyjnych napojów mlecznych, które oprócz dobrej jakości sensorycznej mogą stanowić nowego rodzaju asortyment żywności będącej źródłem składników bioaktywnych.

Słowa kluczowe: napoje mleczne, morwa biała, ocena sensoryczna

Wprowadzenie

Rynek produktów mleczarskich to jeden z głównych segmentów rynku produktów żywnościowych w Polsce. Jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się sekcji tego rynku są napoje mleczne. Produkty te, ze względu na swoją wysoką wartość odżywczą, głównie dużą zawartość białka i wapnia, stanowią istotny element diety polskich konsumentów. Wiąże się to z coraz większymi wymaganiami i oczekiwaniami jakie stawiają oni producentom. W związku z tym producenci rozszerzają swoją ofertę, w czym pomaga im stosowanie różnego rodzaju substancji dodatkowych wpływających na cechy organoleptyczne, tak by stały się one nie tylko bardziej atrakcyjne sensorycznie dla konsumenta, ale także wносиły dodatkowe korzyści zdrowotne [Zaręba i Ziarno, 2008].

Coraz większe uznanie, obok owoców i warzyw, mają inne mniej popularne surowce roślinne. Jednym z nich są owoce oraz liście morwy białej (*Morus alba* L.). Niestety na polskim rynku brak jest produktów, zawierających ten bogaty w substancje biologicznie aktywne i wpływający korzystnie na zdrowie surowiec.

Morwa biała należy do roślin z rodziny morwowate (Moraceae). Rośnie w różnym klimacie w szerokim zakresie warunków topograficznych i glebowych. Z tego względu jest uprawiana w wielu krajach Europy, Azji i Ameryki [Ercisli i Orhan, 2005].

W Polsce uprawiana jest odmiana „Wielkolistna żółwińska”, której pędy i liście zaczynają rosnąć w maju, są zielone i lśniące, w październiku stają się intensywnie żółte i opadają. W liściach morwy białej zawarte są duża ilość białek bogatych głównie w metioninę, treoninę, lizynę, histydynę, leucynę, tryptofan, argininę, prolinę i kwas asparaginowy, tłuszczów, błonnika oraz składników mineralnych (żelazo, cynk, wapń, fosfor) oraz witamin (C, B1, B2, B6, D, E, kwas foliowy, PP) [Jeszka-Skowron i in., 2014]. W liściach, obecne są też naturalne substancje przeciwutleniające głównie związki polifenolowe, wśród których możemy wyróżnić flawonoidy (3-(6-malonyloglikozyd) kwercetyny, 3-(6-malonyloglikozyd) kemferolu, rutyna, izokwercetyna, taniny), kumaryny (skopolina, skimina) oraz fenolokwasy (kwas chlorogenowy i kwas kawowy). Dominującymi przeciwutleniaczami są jednak 3-(6-malonyloglikozyd) kwercetyny i rutyna. Oprócz związków polifenolowych liście morwy białej zawierają także działające przeciwdiabetycznie alkaloidy oraz terpeny [Chen i in., 2005, Jeszka-Skowron i in., 2009]. Przeprowadzono wiele badań odnośnie wpływu składników zawartych w liściach i owocach morwy białej na zdrowie człowieka. Wykazano między innymi, iż polifenole zawarte w tej części rośliny jak i owocach, oprócz właściwości przeciwutleniających działają antymutagennie i mogą uczestniczyć w prewencji nowotworów. Związane jest to także z wysoką zawartością niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie linolenowego, linolowego i oleinowego w owocach morwy białej [Ercisli i Orhan, 2007; Jeszka-Skowron, 2009]. Dowiedziono także leczniczy wpływ naparów z liści, które mogą przyczynić się do zapobiegania wielu chorobom dietozależnym między innymi układu krążenia, cukrzycy, chorobom układu nerwowego. Z uwagi na tłumienie aktywności mediatorów zapalnych mogą działać także antyalergiczenie [Chen i in., 2005]. Przeciwmiażdżycowe działanie naparów z liści morwy białej wynika głównie z zawartości związków przeciwutleniających, które hamują utlenianie frakcji cholesterolu o niskiej gęstości (LDL) [Ercisli i Orhan, 2007]. Działanie przeciwcukrzycowe wynika z obecności w liściach alkaloidów, które mają zdolność do redukcji poboru glukozy z pożywienia i obniżania jej absorpcji z krwi. Jednym z bardziej istotnych alkaloidów jest DNJ, którego działanie polega na hamowaniu enzymów takich jak sacharoza, izomaltaza, glikoamylaza, które powodują rozkład cukrów i umożliwiają wchłonięcie ich w jelitach [Jeszka-Skowron i in., 2009].

Ekstrakt z liści morwy białej może odgrywać także istotną rolę w zapobieganiu chorobie Alzheimera. Dowiedziono bowiem, iż hamuje on tworzenie się związków odpowiedzialnych za powstawanie tej choroby, głównie białka β -amyloidu 1-42 [Jeszka-Skowron i in., 2009].

Przedmiotem pracy jest określenie, w jaki sposób dodatek ekstraktu z liści morwy wpływa na jakość sensoryczną napojów mlecznych i czy tego typu produkt zyskałby uznanie wśród konsumentów.

Material i metody

Material

Liście morwy białej pozyskano w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Pętkowie k. Środy Wielkopolskiej. Zielone liście wysuszono w temperaturze 60°C a następnie rozdrobniono. Ekstrakt otrzymano w wyniku dwukrotnej ekstrakcji wodnej (10g : 100 ml (60 ml + 40 ml) wody redestylowanej) poprzez wytrząsanie w temperaturze 95°C po 15 minut. Mleko czekoladowe (Krasnystaw) z ekstraktem z liści przygotowano w wariantach zróżnicowanych pod względem ilości ekstraktu: 0,3% (próba A), 0,4% (próba B). Próbę C stanowiło mleko czekoladowe z dodatkiem ekstraktu z liści morwy na poziomie 0,5% oraz dodatkiem naturalnego kakao na poziomie 0,6%. Ocenie poddano też mleko bez dodatku ekstraktu z liści morwy (K).

Maślanek (Milko) wzbogacono w ekstrakt z liści morwy oraz żurawinę, aronię i cukier w ilości odpowiednio: próba AA- dodatek ekstraktu z liści morwy na poziomie 0,4%, dodatek owoców aronii na poziomie 10% oraz dodatek cukru 3%; próba BB- dodatek ekstraktu z liści morwy na poziomie 0,4%, dodatek owoców aronii i żurawiny na poziomie 5%; próba CC dodatek ekstraktu z liści morwy na poziomie 0,4%, dodatek owoców aronii na poziomie 5% i żurawiny na poziomie 10%. Próbę kontrolną (KK) stanowiła naturalna maślanka bez dodatków. Próby maślanek z dodatkami owoców i ekstraktu z liści morwy miksowano przez 30 sekund.

Metody

Ocena konsumencka

Wykonano ocenę konsumencką w grupie 50 osób, stosując metodę siedmiopunktowej skali hedonicznej. Analizę przeprowadzono, w laboratorium sensorycznym spełniającym wymagania podane w normie PN-ISO 8589:1998. Wyróżnikami jakie oceniający brali pod uwagę były barwa, smak, zapach oraz ogólna pożądalność danej próbki[PN-ISO 11035:1999].

Ocena profilowa

Ocenę profilową, doświadczalnych prób przeprowadzono w laboratorium sensorycznym spełniającym wymagania podane w normie PN-ISO 8589:1998. Do szczegółowej charakterystyki sensorycznej tych prób zastosowano metodę ilościowej analizy opisowej czyli profilowania sensorycznego, którą wykonywał 15 osobowy zespół, specjalnie wyszkolony w tym celu. Intensywność każdej noty jakościowej określano przy pomocy 10-cm niestrukturyzowanej skali liniowej z odpowiednimi oznaczeniami brzegowymi – niewyczuwalny – bardzo intensywny. Wyróżnikami jakie oceniający brali pod uwagę w przypadku mleka czekoladowego był smak: mleczny, czekoladowy, cierpki, słodki, obcy, liściasty; zapach: mleczny, czekoladowy, obcy oraz ogólna pożądalność danej próbki [PN-ISO 11035:1999]. Wyróżnikami jakie oceniający brali pod uwagę w przypadku maślanki był wygląd zewnętrzny: barwa; smak: maślankowy, owocowy, słodki, cierpki, kwaśny, obcy, liściasty; zapach: maślankowy, owocowy, kwaśny, obcy; oraz ogólna pożądalność danej próbki.

Analiza statystyczna

Opracowanie statystyczne wyników wykonano w oparciu o program STATISTICATMPL 8.0 firmy StatSoft stosując jednoczynnikową analizę wariancji na poziomie ufności 5%. Do interpretacji wyników wykorzystano test Tukey'a.

Wyniki i dyskusja

Atrakcyjność spożywanych produktów zależy nie tylko od jej wartości odżywczej czy bezpieczeństwa zdrowotnego, ale również od walorów sensorycznych. W przemyśle mleczarskim stosuje się wiele dodatków, dzięki którym asortyment proponowanych napojów mlecznych jest obszerny. Spośród tych, które w istotny sposób wpływają na smakowitość zaliczyć można dodatki pochodzenia roślinnego.

Ekstrakty z morwy mogą być nośnikami gorzkiej bądź cierpkiej nuty smakowej, dlatego zbadano wpływ ich dodatku na jakość sensoryczną doświadczalnych prób mleka czekoladowego i maślanki.

Przygotowane próby mleka czekoladowego oraz maślanki poddano ocenie konsumenckiej. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Stwierdzono, że dodatek ekstraktu morwy wpłynął na barwę prób mleka czekoladowego. Statystycznie istotnie lepiej oceniono barwę próby A zawierającej dodatek ekstraktu z liści morwy na poziomie 0,3%. Nie stwierdzono różnic w barwie pozostałych badanych prób. Oceniający nie stwierdzili różnic w zapachu wszystkich badanych prób mleka i ocenili go od 4,7 (B) do 5,33 (A). Pod względem smaku najlepiej oceniona została próba C, która zawierała 0,5% dodatek ekstraktu z morwy i dodatkową ilość kakao, natomiast statystycznie najgorzej ocenioną próbą było mleko kontrolne (5,07). Ogólna pożądalność najlepiej wypadła dla próby z dodatkiem 0,3% ekstraktu morwy (5,43) a najgorzej dla próby B z 0,4% dodatkiem ekstraktu morwy (4,97).

Stwierdzono, że dodatek ekstraktu morwy wpłynął na barwę prób maślanki. Statystycznie istotnie lepsza okazała się barwa próby A, która zawierała dodatek ekstraktu z liści morwy na poziomie 0,4%, dodatek owoców aronii na poziomie 10% oraz dodatkową ilość cukru. Najniżej pod względem barwy została oceniona próba B zawierająca dodatek owoców aronii i żurawiny na poziomie 5%. Pod względem zapachu natomiast, najlepiej oceniono próbę kontrolną (5,73), w pozostałych próbach oceniający nie dostrzegli różnic i ocenili go w zakresie od 4,67 w maślanke B i C do 4,83 w próbce A.

Pod względem smaku statystycznie lepiej ocenionymi próbkami okazały się próbka kontrolna (5,90) oraz próba C, która zawierała dodatek ekstraktu na poziomie 0,4% oraz dodatek owoców aronii w ilości 5% i żurawiny w ilości 10%, natomiast gorzej oceniono maślanke B (3,83). Ocena ogólna najlepiej wypadła dla próby kontrolnej (5,87), biorąc jednak pod uwagę próby z dodatkami, najlepiej oceniono próbę C (4,90).

Wykonano ocenę profilową mleka czekoladowego oraz maślanki z dodatkiem ekstraktu z morwy, a wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Na podstawie wstępnej oceny prób doświadczalnych mleka czekoladowego wybrano następujące deskryptory zapachowe: mleczny, czekoladowy, obcy i smakowe: mleczny, czekoladowy, liściasty, cierpki, słodki oraz obcy.

Tabela 1. Ocena konsumencka (n=50) napojów mlecznych z dodatkiem ekstraktu z liści morwy

MLEKO CZEKOLADOWE/ CHOCOLATE MILK				
Wyróżnik / Index	K	A	B	C
Barwa / Colour	5,53 ^a	5,80 ^b	5,50 ^a	5,30 ^a
Zapach / Odour	5,20 ^a	5,33 ^a	4,70 ^a	5,07 ^a
Smak / Taste	5,07 ^a	5,70 ^b	5,20 ^a	5,93 ^c
Ogólna pożądalność / General desirability	5,37 ^{b,c}	5,43 ^c	4,97 ^a	5,23 ^b
MAŚLANKA/ BUTERMILK				
Wyróżnik / Index	KK	AA	BB	CC
Barwa / Colour	6,20 ^b	6,60 ^c	5,43 ^a	6,20 ^b
Zapach / Odour	5,73 ^b	4,83 ^a	4,67 ^a	4,67 ^a
Smak / Taste	5,90 ^c	4,37 ^b	3,83 ^a	4,77 ^b
Ogólna pożądalność / General desirability	5,87 ^c	4,53 ^b	3,97 ^a	4,90 ^c

*a, b, c – wartości liczbowe oznaczone różnymi literami w wierszu wykazują różnice statystycznie istotne, $p < 0,05$ / Different letters denote a significant difference for means, $p < 0,05$

Spośród badanych cech zapachu dominującym był zapach czekoladowy. Największą jego intensywność wykazano w próbie C (7,44 w skali 10 punktowej). Pozostałe próby charakteryzowały się statystycznie istotnie niższą intensywnością zapachu czekoladowego, który kształtował się na poziomie od 5,91 w próbie A do 6,21 w próbie kontrolnej. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w intensywności odczuwania zapachu mlecznego w badanym mleku czekoladowym, który kształtował się w zakresie od 1,67 do 2,02 dla próby B. Oceniający nie stwierdzili zapachu obcego w próbie kontrolnej oraz próbie A z najmniejszym dodatkiem ekstraktu z morwy. Zwiększenie dodatku ekstraktu spowodowało statystycznie istotne zwiększenie wyczuwalności zapachu obcego. Określono go na poziomie 0,57 dla próby B i 1,71 dla próby C.

Podobnie spośród badanych deskryptorów smaku, smak czekoladowy oceniono jako najbardziej dominujący. Najbardziej wyczuwalny był on w próbie kontrolnej 7,73, a statystycznie istotnie najmniej w próbie B (6,81). Nie stwierdzono różnic w odczuwaniu smaku mlecznego, który oceniono od 2,85 w próbie C do 3,12 w próbie B. Smak słodki był zbliżony w próbach kontrolnej i próbie z 0,5% dodatkiem ekstraktu, odpowiednio 2,65 i 2,64. Słodycz statystycznie istotnie intensywniej odczuwana była w próbach A i B (3,11 i 3,01).

Zaobserwowano, że dodatek ekstraktu z morwy w każdej ilości wpłynął w niewielkim stopniu na odczuwanie smaku liściastego oraz obcego. Dodatek morwy wpłynął też na odczuwanie smaku cierpkiego, co jest zrozumiałe, z uwagi na obecność polifenoli w tym tanin, które mają zdolność do łączenia się z białkami błony śluzowej powodując w ten sposób efekt charakterystycznego „ściągnięcia” [Jeszka-Skowron i in., 2009]. Biorąc pod uwagę ogólną pożądalność, najlepiej oceniono mleko C z 0,5% dodatkiem ekstraktu, gdzie zwiększono zawartość kakao (6,21). Najniższą notę natomiast stwierdzono w B, gdzie dodatek ekstraktu był na poziomie 0,4%.

Tabela 2. Profil sensoryczny (n=15) napojów mlecznych z dodatkiem ekstraktu z liści morwy

MLEKO CZEKOLADOWE					
Wyróżnik/ Index		K	A	B	C
Zapach/Odour	Mleczny/ milk	1,85 ^{a*}	1,88 ^a	2,02 ^a	1,67 ^a
	Czekoladowy/ chocolate	6,21 ^b	5,91 ^a	5,92 ^a	7,44 ^c
	Obcy/ strange	0,25 ^a	0,15 ^a	0,57 ^b	1,71 ^c
	Mleczny/ milk	3,04 ^a	3,1 ^a	3,12 ^a	2,85 ^a
	Czekoladowy/ chocolate	7,73 ^c	7,27 ^b	6,81 ^a	7,45 ^b
	Cierpki/ acrid	0,04 ^a	1,71 ^b	2,2 ^c	1,85 ^b
	Słodki/ sweet	2,65 ^a	3,11 ^b	3,01 ^b	2,64 ^a
Smak/ Taste	Obcy/ strange	0,00 ^a	0,73 ^b	2,7 ^d	1,72 ^c
	Liściasty/ deciduous	0,00 ^a	0,29 ^b	1,22 ^c	0,25 ^b
	Ogólna pożądalność/ General desirability	5,97 ^{b,c}	5,34 ^b	4,69 ^a	6,21 ^c
MAŚLANKA					
Wyróżnik/ Index		KK	AA	BB	CC
Zapach/ Odour	Maślankowy/buttermilk	9,78 ^c	6,55 ^{a,b}	6,82 ^b	6,11 ^a
	Owocowy/ fruity	0,02 ^a	4,39 ^c	2,85 ^b	5,29 ^c
	Kwaśny/sour	7,24 ^b	4,69 ^a	4,15 ^a	4,42 ^a
	Obcy/ strange	0,2 ^a	0,56 ^c	0,63 ^c	0,37 ^b
	Maślankowy/ buttermilk	9,65 ^c	5,93 ^b	5 ^{a,b}	4,01 ^a
	Owocowy/ fruity	0,03 ^a	5,91 ^{b,c}	4,66 ^b	6,84 ^c
	Słodki/ sweet	0,27 ^a	5,31 ^{b,c}	4,3 ^b	6,72 ^c
Smak/ Taste	Cierpki/ acrid	0,51 ^a	2,57 ^b	4,56 ^c	2,16 ^b
	Kwaśny/ sour	7,61 ^d	3,89 ^b	5,07 ^c	2,78 ^a
	Obcy/ strange	0,2 ^a	3,01 ^b	3,5 ^b	2,45 ^b
	Liściasty/ deciduous	0,03 ^a	1,39 ^b	2,03 ^c	1,05 ^b
	ogólna pożądalność / General desirability	8,18 ^b	3,46 ^b	2,8 ^a	5,79 ^c

*a, b, c – wartości liczbowe oznaczone różnymi literami w wierszu wykazują różnice statystycznie istotne, $p < 0,05$ / Different letters denote a significant difference for means, $p < 0,05$

Podsumowując stwierdzono, że dodatek ekstraktu z liści morwy białej do prób mleka czekoladowego korzystnie wpływał na cechy sensoryczne. Widoczne to było szczególnie w odniesieniu do ogólnej pożądalności, gdzie próba z największym dodatkiem ekstraktu została oceniona najlepiej.

Na podstawie wstępnej oceny prób doświadczalnych maślanki wybrano następujące deskryptory zapachowe: maślankowy, owocowy, kwaśny, obcy i smakowe: maślankowy, owocowy, słodki, cierpki, kwaśny, obcy oraz liściasty. Spośród badanych cech zapachu dominującym był maślankowy. Największą jego intensywność stwierdzono w próbie kontrolnej oraz w próbie BB, która osiągnęła wartość 6,82 w skali 10 punktowej. Najmniejszą intensywność zapachu maślankowego stwierdzono w próbie CC (6,11). Próba CC miała najbardziej intensywny zapach owocowy (5,29), który był statystycznie najmniej intensywny w próbie BB. Próba kontrolna oraz próba AA charakteryzowały się najbardziej

intensywnym zapachem kwaśnym, w pozostałych próbach nie stwierdzono różnic w jego odczuwaniu. Ponadto nie stwierdzono zapachu obcego w próbie kontrolnej. W pozostałych próbach był on najmniej odczuwalny z podobną intensywnością od 0,37 w próbie C do 0,63 w próbie B.

Dominującym smakiem we wszystkich próbach był smak maślankowy oraz owocowy w próbach, gdzie zastosowano dodatek owoców. Najbardziej wyczuwalny smak owocowy był w próbie CC (6,84), a najmniej intensywny w próbie BB (4,66). Najbardziej intensywny smak słodki odczuwalny był w próbie CC (6,72) a najmniej intensywną słodycz wykazano w próbie BB (4,3). Zaobserwowano, że dodatek ekstraktu z morwy wpłynął na odczuwanie smaku cierpkiego, który statystycznie najbardziej intensywny okazał się w próbie BB (4,56), natomiast najmniej w próbie CC (2,16). Oprócz próby kontrolnej najbardziej intensywny smak kwaśny wykazano w próbie BB (5,07), a najmniej w próbie CC (2,78). Stwierdzono, że dodatek ekstraktu wpłynął także na odczuwanie smaku obcego, który oceniono w zakresie od 2,45 w próbie CC do 3,5 w próbie BB i obcego od 1,05 w próbie CC do 2,03 w próbie BB.

Biorąc pod uwagę ogólną pożądalność, najlepszą próbą maślanki, oprócz próby kontrolnej okazała się próba CC (5,79), z dodatkiem ekstraktu z morwy na poziomie 0,4% oraz dodatkiem owoców aronii na poziomie 5% i żurawiny na poziomie 10% natomiast najgorszą okazała się próba BB (2,8), w której dodatek ekstraktu był na poziomie 0,4%, a dodatek owoców aronii i żurawiny wynosił 5%.

Podsumowując tę część badań stwierdzono, że dodatek ekstraktu z liści morwy białej przy jednoczesnym dodatku owoców aronii i żurawiny, do prób maślanki nie zawsze korzystnie wpływał na cechy sensoryczne. Najkorzystniejszy jednak efekt uzyskano, w maślance z dodatkiem ekstraktu z morwy na poziomie 0,4% oraz owoców aronii w ilości 5% i owoców żurawiny w ilości 10%. Widoczne to było szczególnie w odniesieniu do oceny smaku oraz ogólnej pożądalności, gdzie próba z takim właśnie dodatkiem została oceniona najlepiej. Najniższą ocenę pod względem atrakcyjności okazała się maślanka BB (2,8), gdzie dodatek ekstraktu wynosił 0,4%, a owoców aronii i żurawiny 5%. Może to być wynikiem cierpkiego smaku wprowadzanego przez owoce aronii i żurawiny, którego nie udało się zamaskować dodatkową ilością cukru [Hołderna- Kędzia 2006, Rodowski 2001, Wolski i in 2007] . Lepiej natomiast została oceniona próba A (3,46), gdzie zastosowano dodatek ekstraktu na poziomie 0,4%, owoców aronii w ilości 10% oraz cukier.

Podsumowanie

Dodatek ekstraktu z liści morwy białej wpłynął korzystnie na atrakcyjność sensoryczną zarówno mleka czekoladowego jak i maślanki. W konsumenckiej ocenie mleka czekoladowego najlepiej oceniono próbę z 0,3% dodatkiem ekstraktu z morwy, natomiast w ocenie profilowania sensorycznego mleko z 0,5% dodatkiem. W przypadku maślanki najlepszy efekt uzyskano w próbie zawierającej dodatek ekstraktu na poziomie 0,4% oraz owoców aronii w ilości 5% i żurawiny 10%.

Ekstrakt z liści morwy jako składnik mleka czekoladowego oraz maślanki w nieznacznym stopniu spowodował odczucie zapachu i smaku obcego i w niewielkim stopniu wpłynął na pojawienie się zapachu liściastego.

Ekstrakt z liści morwy białej może być użyty jako dodatek w produkcji napojów mlecznych takich jak: mleko czekoladowe i maślanka. Podwyższa on nie tylko wartość zdrowotną tych produktów, poprzez zwiększenie zawartości substancji biologicznie aktywnych jakimi są polifenole, ale wpływa pozytywnie na ich atrakcyjność sensoryczną.

Praca została zrealizowana w ramach projektu: „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych” POIG 01.01.02-00-061/09

Literatura

Chen C.C., Liu L.K., Hsu J.D., Huang H.P., Yang M.Y., Wang C.J., Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chemistry*, 2005, 91, 601–607.

Ercisli M. S., Orhan E., Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 2007, 103, 1380–1384.

Hołderna- Kędzia E., Charakterystyka botaniczna, skład chemiczny i właściwości biologiczne owoców żurawiny amerykańskiej (*Vaccinium macrocarpon* Aiton). *Postępy Fitoterapii* 1, 2006, 41-46.

Jeszka M. , Kobus-Cisowska J., Flaczyk E., Liście morwy jako źródło naturalnych substancji biologicznie aktywnych. *Postępy Fitoterapii*, 2009, 3, 175-178.

Jeszka-Skowron M., Flaczyk E., Kobus-Cisowska J., Kośmider A., Górecka D., Optymalizacja procesu ekstrakcji związków fenolowych o aktywności przeciwnadciśnieniowej z liści morwy białej za pomocą metody płaszczyzny odpowiedzi (RSM). *Żywność Nauka Technologia. Jakość*, 2014, 1 (92), 148-159.

PN-ISO 11035:1999, Analiza sensoryczna – Identyfikacja i wybór deskryptorów do ustalania profilu sensorycznego z użyciem metod wielowymiarowych.

PN-ISO 8589:1998 Analiza sensoryczna – Ogólne wytyczne dotyczące projektowania pracowni analizy sensorycznej.

Rodowski D., Żurawina – nowe spojrzenie na właściwości lecznicze. *Postępy Fitoterapii*, 2001, 2, 28-31.

Wolski T., Kalisz O., Prasał M., Rolski A., Aronia czarnoowocowa – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot – zasobne źródło antyoksydantów. *Postępy Fitoterapii*, 2007, 3, 145-154.

Zaręba D., Ziarno M., Substancje dodatkowe w produkcji płynnych produktów mlecznych. *Przemysł Spożywczy*, 2008, 3, 30-34.

MONIKA PRZEOR, EWA FLACZYK, JOANNA KOBUS-CISOWSKA,
DOMINIK KMIĘCIK

Katedra Technologii Żywności Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

monika.przeor@up.poznan.pl

STABILNOŚĆ WYBRANYCH POLIFENOLI Z LIŚCI MORWY BIAŁEJ W WARUNKACH SYMULOWANEGO PRZEWODU POKARMOWEGO (*IN VITRO*)

Streszczenie

Ze względu na swoją nieocenioną wartość polifenole przodują wśród związków o aktywności biologicznej. Ich szerokie spectrum działania oraz znaczenie, zarówno w aspekcie technologicznym (wytwarzania żywności) jak i zdrowotnym (właściwości antyoksydacyjne), zachęca żywieniowców do intensywnego wykorzystywania ich źródeł także w przemysłowej produkcji żywności. Duże zainteresowanie wzbudza morwa biała (*Morus alba* L.). Celem badań było określenie zmian w zawartości charakterystycznych polifenoli liści morwy białej na poszczególnych etapach symulowanego procesu trawienia w przewodzie pokarmowym *in vitro*. Badania prowadzono w bioreaktorze laboratoryjnym wykorzystując suszone liście morwy białej polskiej odmiany Wielkolistna żółwińska. Do badań wykorzystano rozdrobnione próby o masie 10g rozprowadzone w 540mL wody destylowanej. Oznaczenie zawartości związków polifenolowych (rutyna, glukopiranozyd kempferolu, kempferol, izokwercetyna, mirycetyna, izoramnetyna, malonyloglukozyd kwercetyny, kwercetyna) wykonano chromatograficznie (HPLC-DAD). Analiza uzyskanych wyników pozwoliła stwierdzić, że w toku postępującego procesu trawienia w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego zawartość badanych polifenoli ogółem zmniejszała się. Zmiany w zawartości odnotowano wśród wszystkich analizowanych polifenoli pochodzących z liści morwy białej.

Słowa kluczowe: liście, morwa biała, polifenole, przewód pokarmowy, stabilność, trawienie

Wprowadzenie

Polifenole jako związki o aktywności antyoksydacyjnej budzą duże zainteresowanie zarówno wśród naukowców, jak i zwykłych konsumentów zainteresowanych tzw. zdrowym stylem życia. W znaczącej mierze związane jest to z ich szerokim spectrum pozytywnego oddziaływania na organizm człowieka, w tym głównie przeciwdziałania niepożądanym procesom oraz niwelowania efektów już powstałych. Właściwości przeciwutleniającej polifenoli, z powodzeniem wykorzystywane są w przemyśle spożywczym. Polifenole wywierają pozytywny wpływ na trwałość, stabilność i jakość produktów i preparatów spożywczych, oraz zwiększają potencjał antyoksydacyjny wytwarzanej żywności funkcjonalnej. Bez względu jednak na przesłanki, jakimi kierują się żywieniowcy propagując związki polifenolowe jako wartościowe składniki, podstawą ich wykorzystania są odpowiednie surowce. W przypadku żywności są to rośliny – organizmy, które dzięki

swojej fizjologii wykształciły aparat ochronny wobec procesów oksydacji w postaci przeciwutleniaczy takich jak np. polifenole. Stają się one w ten sposób bezcennym źródłem związków biologicznych istotnych dla człowieka.

W elementach morfologicznych morwy białej wykryto dotąd szeroką gamę związków biologicznych [Jeszka i in., 2009; Naowaboot i in., 2009; Przeor i Flaczyk, 2011], potwierdzając w ten sposób naukowo wielowiekową tradycję ich stosowania m.in. w medycynie chińskiej. Wykazano, że liście morwy białej zawierające 1,5-dideoksy-1,5-imino-D-sorbitol i 2-arylobenzofuran działają jak naturalne inhibitory w stosunku do α -glukozydazy, opóźniając przyswajanie glukozy [Jamshid i Prakash, 2012]. W innych badaniach stwierdzono, że ekstrakt z liści morwy wspomagał regenerację komórek β trzustki, odpowiedzialnych za produkcję insuliny u szczurów [Sachdewa i Khemani, 2003], a spożywanie przez ludzi sproszkowanych liści w ilości 0.8-1.2g/dzień znacząco hamowało glikemię poposiłkową i wydzielanie insuliny [Butta i in., 2008]. Wykazano także właściwości przeciwnowotworowe ekstraktów z liści morwy na liniach komórkowych HCT-116 [Chon i in., 2009] oraz działanie cytotoksyczne kuwanonu i atalantoflawonu z morwy w stosunku do nowotworowych linii komórkowych HeLa, MCF-7, Hep3B i HO-8910 [Singh i in., 2008; Zhang i in., 2009]. Jak się okazuje, szczególnie znaczące właściwości przeciwutleniające liści morwy białej wynikają z obecności związków fenolowych, wśród których najsilniejszymi są rutyna i 3-(6-malonylo)-glukozyd kwercetyny [Katsube i in., 2006]. Stwierdzono, że 3-(6-malonylo)-glukozyd kwercetyny wykazuje znacznie większą zdolność do zmiatania wolnych rodników niż macierzysta kwercetyna [Panat i in., 2015]. Należące do polifenoli flawonoidy, dzięki swoim właściwościom mogą być nazywane związkami bioaktywnymi. Odgrywają one bowiem znaczącą rolę w profilaktyce coraz powszechniej występujących chorób cywilizacyjnych, poprzez działanie biologiczne i farmakologiczne [Mamta i in., 2013].

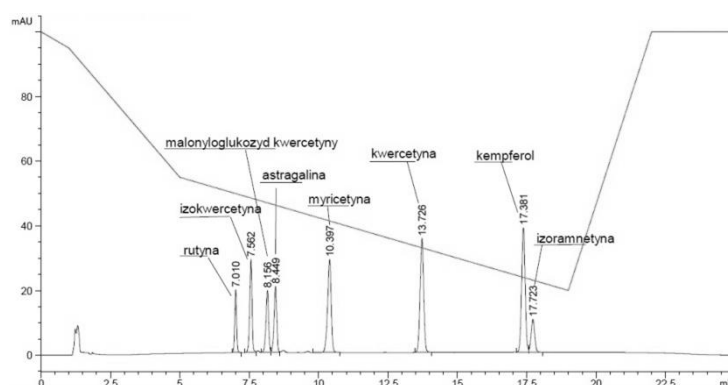
Polifenole, podobnie jak pozostałe składniki wprowadzane do organizmu wraz z dietą, ulegają w przewodzie pokarmowym szeregowi przemian metabolicznych. Przemiany te często mają wpływ na ich właściwości i biodostępność dla organizmu. Istnieją przypuszczenia, że jedynie 5% związków fenolowych pochodzących z diety, ulega absorpcji w dwunastnicy, natomiast pozostałe 95% jest fermentowane przez mikroflorę w jelicie grubym [Shivasankara i Acharya, 2010]. Na wchłanianie polifenoli ze spożywanej żywności wpływ ma wiele czynników, a metabolizm związków fenolowych można określić jako bardzo skomplikowany. Znaczenie ma tu nie tylko stopień przetworzenia żywności, przechowywanie czy czynniki związane z funkcjonowaniem przewodu pokarmowego, ale również forma w jakiej związki fenolowe zostaną dostarczone [D'Archivio i in., 2007]. Może się bowiem okazać, że w zależności od matrycy, a więc źródła pochodzenia polifenoli, ich dostępność dla organizmu będzie odmienna. Mając powyższe na uwadze, podjęto próbę określenia stabilności wybranych związków fenolowych, charakterystycznych dla liści morwy białej, na poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego (badania *in vitro*). Postawiony cel badań wymagał oznaczenia zawartości flawonoli w liściach morwy białej poddanych trawieniu w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego.

Material i metody badań

Materiał do badań stanowiły liście morwy białej (*Morus alba* L.) polskiej odmiany Wielkolistna żółwińska. Liście pozyskano w lipcu 2012 roku z plantacji Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, mieszczącej się w miejscowości Pętkowo k/Poznań. Po ręcznym zbiorze liście poddano suszeniu w suszarce taśmowo-bębnowej w temperaturze 90°C na wlocie i ~60°C na wylocie (Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Poznaniu). Susz liściowy rozdrobniono w młynku laboratoryjnym firmy Retsch GM200 (Germany), do proszku wielkości 0.8-0.08mm. Rozdrobnione próby w ilości 10g±0.05 rozprowadzono w 540mL destylowanej wody i umieszczono w zbiorniku szklanym (pojemność 1L) otoczonym płaszczem wodnym, wyposażonym w mieszadło i elektrodę. Proces statycznego trawienia *in vitro* prowadzono w bioreaktorze laboratoryjnym BIOSTAT B Plus (Sartorius Stedim, Germany), umożliwiającym regulację pH, temperatury, dozowanie enzymów, soli żółciowych, mikroflory jelitowej, azotu do zbiornika reakcyjnego oraz wyposażonym w pompy perystaltyczne. Całość procesu trawienia była regulowana i monitorowana komputerowo. Symulowanie następujących po sobie procesów trawienia odbywało się poprzez sekwencyjnie postępujące zmiany parametrów (pH, czas, obecność enzymów), odpowiadające warunkom panującym w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego. Odzworowano w ten sposób kolejno: żołądek (pH=2.0 przez 120 min), jelito cienkie (pH=6.0 przez 30 min, pH=7.4 przez 120 min) i jelito grube (pH=8.0 przez 18 h, warunki beztlenowe). Próby do analiz pobierano w trakcie trwania procesu sześciokrotnie: 1) 10min po wprowadzeniu pepsyny (etap początkowy), 2) 2h po wprowadzeniu (końcowy etap trawienia w żołądku), 3) 30min po podaniu pankreatyny z kwasami żółciowymi (etap trawienia w dwunastnicy), 4) 10min po wprowadzeniu mikroflory (etap trawienia w jelicie cienkim), 5) 2h po wprowadzeniu mikroflory (etap początkowy trawienia w jelicie grubym), 6) 18h po wprowadzeniu warunków względnie beztlenowych (etap końcowy trawienia w jelicie grubym).

Próby przechowywano w formie zamrożonej (-28°C) do momentu wykonania oznaczeń ilościowych poszczególnych składników.

Analiza jakościowa i ilościowa flawonoli (aglikonów i glikozydów) została przeprowadzona techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej metodą Kobus i in. [2009] z modyfikacjami, na chromatografie Agilent Infinity 1290 (Agilent Technology, USA) z detektorem Infinity Bin Pump DAD1290. Oznaczenia dokonano nastrzykując próbę (10µL) na kolumnę (3.9x150mm; 5µm) Zorbax SB C18 (Agilent Technology, USA), przy prędkości przepływu 1mL/min i temperaturze kolumny 22°C±0.8. Zastosowano nieliniowy gradient stężeń rozpuszczalników: woda zakwaszona kwasem ortofosforowym (pH=2.7) oraz roztwór wody i acetonitrylu (1:1, v/v). Całkowity czas analizy wynosił 25 minut z detekcją przy λ=370nm, dla glikozydów: malonyloglukozydu kwercetyny i izoramnetyny (3-metylokwercetyna), izokwercetyny (3-β-D-glukozyd kwercetyny), rutyny, 3-β-D-glukopiranozyd kempferolu (astragaliny) i aglikonów: myricetyny, kwercetyny i kempferolu. Identyfikację poszczególnych flawonoli przeprowadzono porównując widma UV-VIS i czas retencji badanych prób z widmami i czasem retencji standardów (wzorców) rozpuszczonych w metanolu. Chromatogram mieszaniny standardów oznaczanych flawonoli przedstawiono na rysunku 1, a wzory krzywych kalibracyjnych w tabeli 1.



Rysunek 1. Chromatogram mieszaniny standardów oznaczanych flawonoli

Tabela 1. Charakterystyka krzywych standardowych dla analizowanych flawonoli

Flawonol	Równanie krzywej	
rutyna	$y = 0.6571 x - 1.3036$	$R^2 = 0.9913$
izokwercetyna	$y = 1.1278 x + 2.1527$	$R^2 = 0.9984$
malonyloglukozyd kwercetyny	$y = 0.8326 x + 0.8665$	$R^2 = 0.9953$
astragalina	$y = 0.9217 x - 0.1985$	$R^2 = 0.9990$
myricetyna	$y = 1.6833 x - 2.7742$	$R^2 = 0.9922$
kwercetyna	$y = 2.1207 x - 5.7605$	$R^2 = 0.9980$
kempferol	$y = 2.2909 x - 6.0438$	$R^2 = 0.9917$
izoramnetyna	$y = 2.4590 x - 24.082$	$R^2 = 0.9972$

Do przeprowadzenia analiz wykorzystano odczynniki, enzymy, sole i standardy flawonoli pozyskane z firm Sigma Aldrich, POCH, Bionovo.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano przy pomocy programu komputerowego STATISTICA 12 (StatSoft, Polska). Dane analizowano testem Tukey’a przy poziomie istotności $p < 0.05$.

Wyniki i dyskusja

W prezentowanych badaniach przeprowadzono symulację procesu trawienia suszonych i rozdrobnionych liści morwy białej w warunkach laboratoryjnych. Wyniki analiz chromatograficznych flawonoli na poszczególnych etapach przewodu pokarmowego zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Zawartość analizowanych flawonoli na poszczególnych etapach trawienia liści morwy białej w warunkach *in vitro*

Flawonol	Etapy trawienia					
	1	2	3	4	5	6
	X [µg/mL treści pokarmowej] ± SD					
RUT	80.805 ^f ± 0.01	68.862 ^e ± 1.01	53.331 ^d ± 3.07	32.943 ^b ± 1.85	48.605 ^c ± 1.28	17.661 ^a ± 4.28
IZQ	17.629 ^d ± 0.03	13.419 ^b ± 0.28	15.119 ^c ± 0.99	9.105 ^a ± 0.74	14.651 ^c ± 0.38	8.662 ^a ± 1.27
MAL	78.649 ^e ± 0.04	54.541 ^d ± 0.40	46.001 ^c ± 6.23	33.837 ^b ± 5.77	43.810 ^c ± 0.50	2.353 ^a ± 0.45
AST	5.409 ^b ± 0.02	4.163 ^a ± 0.25	5.996 ^b ± 1.06	5.337 ^b ± 0.65	8.237 ^c ± 0.98	5.579 ^{ab} ± 1.75
MYR	12.372 ^c ± 0.03	8.365 ^b ± 0.19	14.295 ^c ± 2.03	8.311 ^b ± 1.31	11.212 ^c ± 0.39	0.729 ^a ± 0.12
KWE	0.240 ^a ± 0.00	0.227 ^a ± 0.00	0.233 ^a ± 0.01	0.380 ^b ± 0.02	0.232 ^a ± 0.00	0.343 ^b ± 0.06
KEM	0.175 ^b ± 0.00	0.145 ^a ± 0.01	0.224 ^d ± 0.05	0.184 ^{bc} ± 0.01	0.194 ^{cd} ± 0.01	0.289 ^d ± 0.06
IZR	0.000 ^a ± 0.00	0.598 ^b ± 0.02	0.611 ^b ± 0.07	0.567 ^b ± 0.01	0.558 ^b ± 0.00	0.000 ^a ± 0.00

X - średnia z 3 oznaczeń, ± SD - odchylenie standardowe; 1- etap początkowy, 2- końcowy etap trawienia w żołądku, 3- etap trawienia w dwunastnicy (pH 6.0), 4- etap trawienia w jelicie cienkim (pH 7.4), 5- etap początkowy trawienia w jelicie grubym, 6- etap końcowy trawienia w jelicie grubym; RUT-rutyna, IZQ-izokwercetyna, MAL-3-(6-malonylo)-glukozyd kwercetyny, AST-astragalina, MYR-myricetyna, KWE-kwercetyna, KEM-kempferol, IZR-izoramnetyna; a – f- różne litery w wierszu oznaczają różnice statystyczne w teście Tukey'a na poziomie istotności $p < 0.05$.

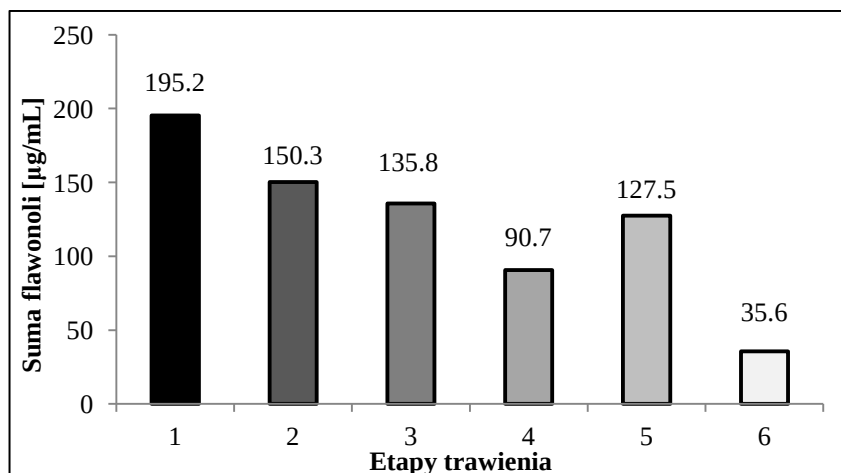
Bogactwo związków przeciwutleniających w surowcu jakim jest morwa biała odmiany polskiej potwierdzono już wcześniej [Flaczyk i in., 2013], jednak z punktu widzenia dostępności dla organizmu człowieka istotnymi są ilości poszczególnych flawonoli występujących dopiero w treści pokarmowej. Przeprowadzona analiza jakościowa na kolejnych etapach przewodu pokarmowego w warunkach *in vitro* pozwoliła stwierdzić, że związki: rutynę, izokwercetynę, malonyloglukozyd kwercetyny, astragalinę, myricetynę, kwercetynę i kempferol zidentyfikowano we wszystkich analizowanych próbach. Jedynie w przypadku izoramnetyny nie stwierdzono jej obecności w 1. etapie trawienia. Niewielkie ilości izoramnetyny oznaczono na kolejnych etapach trawienia (etap 2,3,4,5). Jak się okazuje, taka zmiana może być związana z metylacją grup hydroksylowych w pierścieniu B kwercetyny oraz jej glukozydów, prowadzącą do powstawania m.in. izoramnetyny [Makowska-Wąs i Janeczko, 2004]. Zawartość izoramnetyny oscylowała na granicy oznaczalności użytej metody, a określone różnice pomiędzy wynikami nie były istotne statystycznie.

Spośród ośmiu oznaczanych związków dwa flawonole stanowiły zdecydowaną większość na każdym etapie trawienia: rutyna i malonyloglukozyd kwercetyny. Odnotowane

różnice w zawartości rutyny pomiędzy kolejnymi etapami trawienia były istotne statystycznie. Zawartość malonyloglukozydu kwercetyny na etapach 3 i 5 była zbliżona, bez różnic istotnych statystycznie. Oba te związki obficie występują w liściach morwy. 3-(6-malonylo)-glukozyd kwercetyny w badaniach zespołu Enkhmaa i in. [2005] miał decydujące znaczenie w osłabieniu rozwoju blaszki miażdżycowej u myszy w porównaniu do grupy kontrolnej. Badania prowadzono zarówno dla wypreparowanej formy tego związku, jak i zawierających go liści morwy białej. Biorąc to pod uwagę, należy zauważyć jak ważnym dla prawidłowej gospodarki lipidowej organizmu jest 3-(6-malonylo)-glukozyd kwercetyny występujący w morwie białej.

Najważniejszym odcinkiem przewodu pokarmowego dla wchłaniania polifenoli jest jelito cienkie. Duże znaczenie mają występujące tam dwa enzymy: hydrolaza florydynowa w ścianie jelita cienkiego i β -glukozydaza cytozolowa, które sprzyjają wchłanianiu odpowiednich form flawonoli nawet na drodze dyfuzji [Day i in., 2000; Nemeth i in., 2003]. Niektóre połączenia z glukozą mogą przenikać przez błonę enterocytów na drodze transportu aktywnego. Taką możliwość wykazano m.in. dla glukozydów kwercetyny, które po spożyciu były wchłaniane w jelicie cienkim. Mikroflora jelita grubego degradując rozbudowane formy flawonoli, powodowała pośrednio zmniejszenie ich absorpcji [Hollman i in., 1997]. W prezentowanych badaniach zawartość flawonoli pochodzących z liści morwy białej była o od ~2% (astragalina) do nawet ~60% (rutyna) niższa na etapie końcowym jelita cienkiego (etap 4) w porównaniu z etapem początkowym (etap 1). Oddziaływanie mikroflory jelitowej (dodanej na ostatnich etapach trawienia) skutkuje znacznym obniżeniem ilości wszystkich flawonoli oznaczonych po przejściu przez jelito grube (etap 6).

Ogólna zawartość ośmiu badanych flawonoli występujących w surowcu na początku procesu trawienia wyniosła 195.2 $\mu\text{g/mL}$ (Rys.2). Po trawieniu w żołądku ich zawartość zmalała o 23%. Wielkość tej redukcji zależy przede wszystkim od formy w jakiej flawonole występują w danym surowcu, bowiem glikozydy nie ulegają kwaśnej hydrolizie w żołądku [Stahl i in., 2002]. Na kolejnych etapach trawienia, tj. w dwunastnicy i jelicie cienkim odnotowano spadek sumarycznej zawartości flawonoli, po czym ponowny wzrost ich zawartości na etapie początkowym jelita grubego. Na końcu odcinka symulującego jelito grube ich zawartość była niemal 6-krotnie niższa niż na początku trawienia. Tendencja ta jest zbliżona do zależności opublikowanych przez innych autorów [Correa-Betanzo i in., 2014].



Rysunek 2. Ogólna zawartość oznaczonych flawonoli na poszczególnych etapach trawienia liści morwy białej w warunkach *in vitro*; 1– etap początkowy, 2– końcowy etap trawienia w żołądku, 3– etap trawienia w dwunastnicy (pH 6.0), 4– etap trawienia w jelicie cienkim (pH 7.4), 5– etap początkowy trawienia w jelicie grubym, 6– etap końcowy trawienia w jelicie grubym

Wnioski

Przeprowadzone badania pilotażowe wykazały, że liście morwy białej polskiej odmiany poddane trawieniu w warunkach *in vitro* mogą być źródłem flawonoli dostępnych dla organizmu człowieka. Ich poziom oznaczony na etapie jelita cienkiego, szczególnie istotnego dla wchłaniania polifenoli, utrzymywał się na stosunkowo wysokim poziomie, co stwarza interesującą perspektywę na kontynuację badań *in vivo*.

Badania finansowane w ramach grantu POIG 01.01.02-00-061/09 „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych”.

Literatura

- Butta M. S., Nazirb A., Sultana M.T., Schroën K., Marus alba L. Nature's functional tonic. Trends in Food Science & Technology, 2008, 19, 505-512.
- Chon S.U., Kim Y.M., Park Y.J., Heo B.G., Park Y.S., Gorinstein S., Antioxidant and antiproliferative effects of methanol extracts from raw and fermented parts of mulberry plant (*Morus alba* L.). European Food Research and Technology, 2009, 230, 231-237.
- Correa-Betanzo J., Allen-Vercos E., McDonald J., Schroeter K., Corredig M., Paliyath G., Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. Food Chemistry, 2014, 165, 522-531.
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R., Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita, 2007, 43, 348-361.

- Day A.J., Canada F.J., Diaz J.C., Kroon P.A., McLauchlan R., Faulds C.B., Plumb G.W., Morgan M.R.A., Williamson G., Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*, 2000, 468, 166.
- Enkhmaa B., Shiwaku K., Katsube T., Kitajima K., Anuurad E., Yamasaki M., Yamane Y., Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Journal of Nutrition*, 2005, 135, 4, 729-734.
- Flaczyk E., Kobus-Cisowska J., Przeor M., Korczak J., Remiszewski M., Korbas E., Buchowski M., Chemical characterization and antioxidative properties of Polish variety of *Morus alba* L. leaf aqueous extracts from the laboratory and pilot-scale processes. *Agricultural Sciences China*, 2013, 4, 5B, 141-147.
- Hollman P.C.H., van Trijp J.M., Mengelers M.J., de Vries J.H., Katan M.B., Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Letters*, 1997, 114, 139.
- Jamshid M., Prakash R., The histopathologic effects of *Morus alba* leaf extract on the pancreas of diabetic rats. *Turkish Journal of Biology*, 2012, 36, 211-216.
- Jeszka M., Kobus-Cisowska J., Flaczyk E., Mulberry Leaves as a source of biologically active compounds. *Postępy Fitoterapii*, 2009, 3, 175-179.
- Katsube T., Imawaka N., Kawano Y., Yamazaki Y., Shiwaku K., Yamane Y., Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2006, 97, 25-31.
- Kobus J., Flaczyk E., Siger A., Nogala-Kałucka M., Korczak J., Pegg R.B., Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of Ginkgo leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009, 111, 1, 1150-1160.
- Makowska-Wąs J., Janeczko Z., Biodostępność polifenoli roślinnych. *Postępy Fitoterapii*, 2004, 3, 126-127.
- Mamta G., Bansal Y.K., Sandhu S.S., Recent patents on flavonoids. *Recent Patents on Biotechnology*, 2013, 7, 179-196.
- Naowaboot J., Pannangpetch P., Kukongviriyapan V., Kukongviriyapan U., Nakmareong S., Itharat A., Mulberry leaf extract restores arterial pressure in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Nutrition Research*, 2009, 29, 602-608.
- Nemeth K., Plumb G.W., Berrin J.G., Juge N., Jacob R., Naim H.Y., Williamson G., Swallow D.M., Kroon P.A., Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*, 2003, 42, 29.
- Panat N.A., Amrute B.K., Bhattu S., Haram S.K., Sharma G.K., Ghaskadbi S.S., Antioxidant profiling of C3 quercetin glycosides: Quercitrin, Quercetin 3-β-D-glucoside and Quercetin 3-O-(6''-O-malonyl)-β-D-glucoside in cell free environment. *Free Radicals and Antioxidants*, 2015, 5, 2, 90-100.

Przeor M., Flaczyk E., Wpływ temperatury suszenia pędów i liści morwy białej (*Morus alba*) na aktywność przeciwutleniającą. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2011, 569, 277-283.

Sachdewa A., Khemani L., Effect of *Hibiscus rosasinensis* Linn ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 89, 61–6.

Shivasankara K.S., Acharya S.N., Bioavailability of dietary polyphenols and the cardiovascular diseases. Open Nutraceuticals Journal, 2010, 3, 227-241.

Singh A., Note on Variation of Active Principles in Indian Medicinal Plants and TIM Formulations. Ethnobotanical Leaflets, 2008, 12, 603-606.

Stahl W., van den Berg H., Arthur J., Bast A., Dainty J., Faulks R.M., Gartner C., Haenen G., Hollman P., Holst B., Kelly F.J., Polidori M.C., Rice-Evans C., Southon S., van Vliet T, Vina-Ribes J., Williamson G., Astley S.B., Bioavailability and metabolism. Molecular Aspects of Medicine, 2002, 23, 39.

Zhang M., Wang R., Chen M., Zhang H., Sun S., Zhang L., New Flavanone Glycoside with Anti -proliferation Activity from the Root Bark of *Morus alba*. Chinese Journal of Natural Medicines, 2009, 7, 105–107.

DOMINIKA SKIBA, BARBARA SAWICKA

Wydział Agrobiotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

dominika.skiba@up.lublin.pl

MOŻLIWOŚĆ WYKORZYSTANIA BULW *HELIANTHUS TUBEROSUS* W PRODUKCJI ŻYWNOŚCI

Streszczenie

Helianthus tuberosus, powszechnie w Polsce zwany topinamburem, był jednym z pierwszych źródeł pożywienia dla ludzi i zwierząt. Z bulw można przyrządzić szereg potraw pozytywnie ocenionych pod względem organoleptycznym. Możliwe jest spożywanie bulw gotowanych, parowanych, pieczonych, blanszowanych, lub smażonych, a także surowych. Mogą one być również konserwowane i marynowane z dodatkiem cebuli lub czosnku, a także kiszone jak kapusta. Ważnym produktem pozyskiwanym z bulw jest mączka. Dodatek mączki do ciasta przedłuża jego świeżość. Spożywanie produktów z dodatkiem mączki z tej rośliny wpływa pozytywnie na metabolizm lipidów w organizmie. Jedną z najpopularniejszych przekąsek jaką można przygotować z bulw są chipsy będące alternatywą dla chipsów ziemniaczanych. Obecnie z powodzeniem są używane, jako pokarm dla gryzoni domowych.

Słowa kluczowe: *Helianthus tuberosus*, charakterystyka botaniczna bulw, wzbogacanie, produkty z dodatkiem topinamburu

Wstęp

Helianthus tuberosus, powszechnie w Polsce zwany topinamburem, był jednym z pierwszych źródeł pożywienia dla ludzi i zwierząt [Chekroun i in., 1996]. Bulwy tego gatunku są bardziej soczyste i słodsze niż bulwy ziemniaka, ponadto cechują się wysoką wartością odżywczą i energetyczną [Góral i Chrapkowska, 1999; Sawicka, 1999]. Zainteresowanie bulwami *Helianthus tuberosus*, przeznaczonymi do spożycia przez ludzi wynika z zawartości w nich m.in.: inuliny i fruktooligosacharydów, charakteryzujących się właściwościami prebiotycznymi oraz naturalnej fruktozy, związków mineralnych, niezbędnych aminokwasów, witamin i flawonoidów [Cieślik, 1998; Gordon i Baraniak, 2006]. Słonecznik bulwiasty, z racji swego składu chemicznego oraz walorów sensorycznych, budzi obecnie coraz większe zainteresowanie, jako surowiec mogący częściowo lub całkowicie zastąpić surowce deficytowe, jak również pozwolić na poszerzenie asortymentu wytwarzanych produktów, w tym również żywności funkcjonalnej [Cieślik, 1998; Prażnik i in., 1998; Cieślik i Filipiak-Florkiewicz, 2000; Kopeć i Cieślik, 2001; Baldini i in., 2004; Mystkowska i Zarzecka, 2013]. Za żywność funkcjonalną uznaje się taką, która wykazuje specyficzne działanie prozdrowotne, czyli jeśli jej wartości odżywcze wywierają korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu, co polega na poprawie stanu zdrowia i samopoczucia lub zmniejsza ryzyko występowania choroby [Kunachowicz i Kłys, 2002]. Spożywanie bulw *Helianthus tuberosus* pomaga

w stabilizowaniu poziomu cukru we krwi, obniża poziom „złego cholesterolu” w organizmie, reguluje ciśnienie krwi oraz pracę przewodu pokarmowego, chroni wątrobę i nerki, ułatwia przyswajanie żelaza, wapnia i magnezu, a także usuwanie alkoholu z krwi [Bachmanowa, 1954; Gałązka i in., 2004; Georgescu i Stoica, 2005; Zaky, 2009; Cieślík i Gębusia, 2010]. Działa oczyszczająco, pomaga pozbyć się rozmaitych trucizn, zarówno rakotwórczych metali ciężkich, jak i toksyn pochodzenia organicznego. Podnosi odporność organizmu, może, więc być pomocny przy wszelkiego rodzaju infekcjach. Oprócz tego działa antystresowo, dodaje energii, podnosi zdolność koncentracji [Cieślík i Gębusia, 2010; Sawicka, 2010].

Charakterystyka surowca

Na końcach pędów podziemnych *Helianthus tuberosus* tworzą się bulwy z pączkami śpiącymi. Odmiany wczesne wytwarzają bulwy w 10-12 tygodniu cyklu rozwojowego, a odmiany późne w 14-16 tygodniu [Chekroun i in., 1996]. *Helianthus tuberosus* posiada wiele odmian, których bulwy różnią się między sobą kształtem, wielkością, kolorem skórki i miąższu [Bachmanowa 1954; Góral, 1998; Vasić i in., 2002; Terzić i in., 2007; Kays i Nottingham, 2008]. Bulwy *Helianthus tuberosus* różnią się od bulw ziemniaka tym, że mają wypukłe oczka oraz nie posiadają warstwy korkowej, co powoduje szybką utratę wody, w konsekwencji, czego słabo się przechowują. Ich kształt jest bardzo zróżnicowany (maczugowaty, wrzecionowaty, owalny). Bulwy mogą być w różny sposób rozmieszczone: skupione lub luźne, co ma duże znaczenie praktyczne przy ich zbiorze. Zabarwienie delikatnej skórki jest zależne od odmiany i może to być kolor biały, żółty lub czerwony o różnych odcieniach, fioletowy czy nawet brązowy. Miąższ jest barwy białej lub kremowej. Powierzchnia bulwy może być gładka lub z guzkowatymi naroślami [Pas'ko, 1973; Chekroun i in., 1996; Góral, 1998; Cieślík i Filipiak-Florkiewicz, 2000; Vasić i in., 2002; Terzić i in., 2007]. Jedna roślina jest w stanie wytworzyć 50-80 sztuk bulw różnej wielkości [Bachmanowa 1954]. Tsvetoukhine [1960] podzielił bulwy ze względu na występowanie w skórce pigmentów antocyjanowych na 4 klasy: jednolite, pośrednie, plamiaste oraz z pigmentem jedynie przy oczkach. Swanson i in. [1956] wykazał, że w miąższu bulw również występuje nieregularne zabarwienie czerwone, które jest wynikiem obecności w tkankach kwasu 2,4-dichlorofenoksyacetowego. Pas'ko [1973] klasyfikował bulwy pod względem kształtu na 4 kategorie: gruszkowate, krótkogruszkowate (1,5-1,7 razy dłuższe niż szersze), podłużne (2,2-2,5 razy dłuższe niż szersze) i wrzecionowate (3 i więcej razy dłuższe niż szersze). Pierwsze 3 kategorie są zbliżone to zaproponowanych przez Tsvetoukhine [1960]: gruszkowate, ziemniaczano-gruszkowate i wrzecionowate. Natomiast wg wielkości Pas'ko [1973] dokonał podziału na: duże (>50 g), średnie (20-50 g) i małe (<20 g). Bulwy służą roślinie do wegetatywnego rozmnażania. Pozostawione na zimę w glebie, wytrzymują temperaturę do -30°C a nawet -50°C [Kryłowicz i in., 2001].

Zastosowanie bulw *Helianthus tuberosus*

Słonecznik bulwiasty w Europie Zachodniej uważany jest za bardzo smaczne, delikatne, soczyste warzywo, o słodkawym smaku, przypominającym karczochy, szparagi lub młode ziemniaki [Chrapkowska i Góral, 1995; Sawicka, 1999]. Można z niego uzyskać

wiele dietetycznych potraw ocenionych pozytywnie pod względem organoleptycznym [Chrapkowska i Góral, 1995]. Bulwy nadają się do spożycia w formie surowej pokrojone w plastry lub szatkowane, jako dodatek do sałatek, jak również po uprzednim ugotowaniu, parowaniu, pieczeniu, blanszowaniu, moczeniu w rozcieńczonych kwasach organicznych lub smażeniu [Chrapkowska i Góral 1995, Németh i Izasáki, 2006]. Do spożycia najlepiej nadają się bulwy *Helianthus tuberosus* zaraz po wykopaniu, ponieważ dość szybko się starzeją i w skutek tego nabierają niezbyt przyjemnego smaku [Sawicka i Skiba, 2009]. Bulwy mogą być także marynowane z dodatkiem cebuli lub czosnku i konserwowane, a także kiszone jak kapusta [Burdzenia, 2001; Németh i Izasáki, 2006]. Ważnym produktem pozyskiwanym z bulw jest mączka. Może ona być wykorzystywana, jako dodatek do pasz dla zwierząt gospodarskich. W badaniach na drobnoustrojach, liniach komórkowych i zwierzętach doświadczalnych wykazano aktywację transkrypcyjnych czynników komórkowych NFκ-B oraz obniżenie poziomu glukozy we krwi szczurów doświadczalnych, u których zastosowano diecie dodatek mączki ze słonecznika bulwiastego [Kopeć i Cieślik, 2001; Cisowski i Włodarczyk, 2006]. Z badań Yildiz i in. [2006] wynika, iż suplementowanie diety kur niosek bulwami tego gatunku przyczynia się do obniżenia zawartości cholesterolu w żółtku, jak i całym jajku. Kury w diecie, których zastosowano dodatek słonecznika bulwiastego znosiły jaja o większej masie oraz bardziej wytrzymałe na pęknięcia skorupki. Natomiast w cukiernictwie dodatek mączki z bulw *Helianthus tuberosus* do ciasta przedłuża jego świeżość [Prażnik i Cieślik, 2005; Gedrovica i Karklina, 2009]. Dodanie mąki z topinamburu do mąki pszennej w ilości większej niż 20% całkowitej zawartości mąki doprowadza do wydłużenia czasu rozwoju ciasta, ze względu na rosnącą ilość błonnika pokarmowego [Gedrovica i Karklina, 2009]. Częściowe zastąpienie mąki pszennej przez mąkę ze słonecznika bulwiastego zmniejsza wchłanianie wody w cieście – im większa część mąki pszennej zostanie zastąpiona przez mąkę z topinamburu, tym mniej wody zostanie zabsorbowane. Absorpcja wody z ciasta zmniejsza się, ponieważ *Helianthus tuberosus* zawiera cukry o niskiej masie cząsteczkowej i oligosacharydy [Rouille i in., 2005]. Badania Pęksy i in. [2015a,b] wykazały, iż dodatek mąki z topinamburu do chrupiek kukurydzianych przyczynił się do wykształcenia delikatnej, kruchej tekstury produktów oraz do polepszenia cech organoleptycznych. Dodatkowo mąka ta dodana w ilości 10 - 15 %, wpływał korzystnie na kruchość i delikatność wyrobów, szczególnie ekstrudowanych w temp. 160 °C, jak również produkty odznaczają się dużą porowatością i małą gęstością, niezależnie od temperatury ekstruzji [Pęksa i in. 2015b]. W celu dalszego zwiększania delikatności i kruchości chrupiek kukurydzianych z dodatkiem mąki ze słonecznika bulwiastego, wg Rytel i in. [2015] należy dodać soli. Poza tym zastosowanie mączki jako wypełniacza przyczynia się do spadku zawartości kalorii i zwiększa zawartość błonnika w produkcie, bez zmiany jego cech organoleptycznych, przez co z powodzeniem można ją wykorzystywać w produkcji żywności dietetycznej [Baltacıoğlu i Esin, 2012]. Spożywanie produktów z dodatkiem mączki z tej rośliny wpływa pozytywnie na metabolizm lipidów w organizmie [Cieślik i in., 2005].

Ze względu na zawartość inuliny, która nieulega trawieniu, bulw słonecznika bulwiastego są coraz częściej wykorzystywane jako funkcjonalny składnik żywności w różnych produktach spożywczych. Obecność inuliny i jej pochodnych (fruktooligosacharydów) w bulwach *Helianthus tuberosus* przyczynia się do wzrostu

korzystnych dla organizmu człowieka bakterii probiotycznych: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, hamujących wzrost patogenów, takich jak: *Clostridium*, *Fusobacterium*, czy też Gram-dodatnich paciorkowców [Cieślik, 1998; Kopeć i Cieślik, 2001; Cummings i Macfarlane, 2002; Cieślik Gębusia, 2010; Mystkowska i Zarzecka, 2013].

Obecnie na skalę przemysłową produkowane są polisacharydy pochodzenia mikrobiologicznego, takie jak: ksantyny [Mystkowska i Zarzecka, 2013]. Badania Janasa i Targońskiego [2007] wykazały, iż dla *Xanthomonas campestris* dobrym substratem do produkcji tego polimeru są rozdrobnione bulwy *Helianthus tuberosus*. Poza tym użycie pulpy z bulw topinamburu pozytywnie wpływa na jakość mikrobiologiczną sorbetów owocowych [Topolska i in., 2014].

Części podziemne słonecznika bulwiastego mają również szerokie zastosowanie farmakologiczne. Produkowany z nich sok można zastosować w leczeniu schorzeń jelita grubego, hemoroidach, zapaleniu spojówek, powiek i skóry oraz w leczeniu łuszczycy, owrzodzeń oraz oparzeń [Anioł-Kwiatkowska, 1994; Mystkowska i Zarzecka, 2013]. Ze względu na brak fenyloalaniny i tyrozyny w składzie aminokwasowym białka tej rośliny istnieje również możliwość zastosowania słonecznika bulwiastego w diecie w przypadkach fenyloketonurii [Sawicka, 1999, Cieślik i Gębusia, 2010]. W nadwadze i otyłości zalecane jest spożywanie bulw tego gatunku lub preparatów zawierających substancje pęczniące, wywołujące uczucie sytości, zmniejszających ilość przyjmowanych pokarmów. Za takie działanie odpowiedzialne są różne postaci błonnika, głównie celuloza oraz inulina, które pozyskiwane są z bulw *Helianthus tuberosus* przy produkcji preparatów, takich jak: Topinulin, Topinambur-Sirup i Topinambur-Pulver [Cieślik i Filipiak-Florkiewicz, 2000; Burdzenia, 2001; Cieślik i Gębusia, 2010; Mystkowska i Zarzecka, 2013]. W 1991 roku zarejestrowano w Polsce słonecznik bulwiasty w wykazie leków homeopatycznych [Cieślik i Filipiak-Florkiewicz, 2000]. Dieta zawierająca żywność funkcjonalną, do której można zaliczyć bulw topinamburu wpływają również na obniżenie poziomu glukozy w surowicy krwi, trójglicerydów i cholesterolu w hiperglikemii [Safwat i in., 2012].

Inulina znalazła szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne. Ma słodki smak oraz wykazuje właściwości żelujące. Po wymieszaniu z wodą tworzy gęstą, kremową teksturę, nadającą produktom spożywczym gładkość i łagodny smak. Dzięki tej właściwości możliwe jest zastosowanie jej w produktach fermentowanych tradycyjnie, w celu zastąpienia stosowanych stabilizatorów, często modyfikowanych chemicznie, takich jak: pochodne celulozy, skrobi czy alginianów a także żelatyny. Dzięki swoim właściwościom tłuszczonaśladowczym wykorzystywana jest, jako zamiennik tłuszczu w wielu produktach spożywczych, takich jak: ciastka, czy czekolady. W przemyśle mleczarskim może być wykorzystywana do produkcji napojów fermentowanych, serów twarogowych, serów topionych, koktajli mlecznych, śmietany, produktów masłopodobnych oraz lodów. Uważa się, że 1 g inuliny może zastąpić 4 g tłuszczu i stanowi tylko 1,5 kcal [Cieślik i Filipiak-Florkiewicz, 2000; Yildiz i in., 2008; Gramza-Michałowska i Górecka 2009; Mystkowska i Zarzecka, 2013]. Jednak inulina spożyta w większej ilości może mieć działanie gazotwórcze i laksacyjne [Kunachowicz i Kłys, 2002]. Większość krajów Unii Europejskiej, USA i Japonia wpisały produkty z dodatkiem inuliny na listę produktów żywnościowych, nadających się do spożycia bez ograniczeń [Cieślik i Filipiak-Florkiewicz, 2000].

W środowisku kwaśnym (pH <4,5) zachodzi hydroliza inuliny do fruktozy, powodując zmianę jej cech funkcjonalnych [Gramza-Michałowska i Górecka, 2009]. Badania Chrapkowskiej i in. [1994] wykazały, iż najkorzystniejszym katalizatorem tego procesu jest kwas siarkowy. Udział fruktozy jest istotny ze względu na zmniejszenie spożycia cukru konsumpcyjnego. Bulwy *Helianthus tuberosus* są cennym surowcem pod względem zawartości fruktozy, która posiada niższą wartość energetyczną, przy odczuwaniu tych samych wrażeń słodczy, dzięki czemu jest mniej szkodliwa dla diabetyków [Bachmanowa, 1954; Chekroun i in., 1996; Cieślik i Filipiak-Florkiewicz, 2000; Baldini i in., 2004]. Ze 100 kg bulw można otrzymać 9-10 kg fruktozy [Mystkowska i Zarzecka, 2013]. Niestety trudna krystalizacja fruktozy oraz wysokie straty przy wytrącaniu fruktozanu wapnia przyczyniły się do pozyskiwania, jako surowca ostatecznego, pozwalającego na lepsze wykorzystanie cukrów z bulwy, soku fruktozowego. Taki syrop ma szerokie zastosowanie w przemyśle cukierniczym, jako substytut sacharozy i glukozy, jak również może być wykorzystywany przy produkcji likierów [Bachmanowa 1954; Sirisansaneeyakul i in., 2007]. Dodatek syropu fruktozowego do konfitur, cukierków, dżemów, alkoholi i napojów bezalkoholowych przedłuża przydatność tych produktów do spożycia [Cieślik i Filipiak-Florkiewicz, 2000; Baldini i in., 2004]. Pieczone bulwy *Helianthus tuberosus* mogą być stosowane jako substytut kawy [Mystkowska i Zarzecka, 2013].

Jedną z najpopularniejszych przekąsek są chipsy ziemniaczane. Alternatywą dla nich mogą stać się chipsy wytwarzane z bulw *Helianthus tuberosus*, które z powodzeniem są używane, jako pokarm dla gryzoni domowych oraz ludzi. Smażenie jest szybką i wygodną metodą w produkcji żywności, o unikalnych właściwościach sensorycznych, kolorze, smaku, teksturze i smakowości. Ciepło jest przekazywane z oleju do żywności a olej wnika w skórę porami utworzonych przez odparowanie wody z żywności. Tak więc, pobieranie tłuszczu przez chipsy w dużym stopniu zależy od zawartości wody w żywności przetwarzanej [Baltacıoğlu i Esin, 2012].

Łodygi słonecznika bulwiastego mogą być używane do wyrobu napoju w smaku zbliżonym do piwa, a także wódek gatunkowych. Do tego celu wykorzystywane są suszone i spreparowane części nadziemne [Bachmanowa, 1954].

Podsumowanie

W świetle zebranych informacji nasuwa się stwierdzenie, że słonecznik bulwiasty można stosować w produkcji zarówno żywności dietetycznej, jak i funkcjonalnej. Należy kontynuować badania nad przydatnością tej rośliny w rozwoju nowych produktów oraz ich właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Ze względu na duży potencjał *Helianthus tuberosus* powinien być stałym komponentem diety ludzi oraz zwierząt domowych.

Literatura

- Chekroun M. B., Amzile J., Mokhtari A., Haloui N. E. E., Prevost J., Fontanillas R., Comparison of fructose production by 37 cultivars of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1996, 24, 115-120.
- Góral S., Chrapkowska K.J., Sprawozdanie roczne za rok 1999. SIBROL: 026199800123, RAP-ARPO001215->PRO-ARPO000961, 1999.

- Sawicka B., Możliwość wykorzystania słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) jako warzywa. Proceedings of the VIII Scientific Horticulture Plant Breeding Symposium, Horticulture Plant Breeding to start with XXI century. Lublin, 1999, 04-05.02, 95-98.
- Cieślik E., Zawartość składników mineralnych w bulwach nowych odmian topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.). Zeszyty Naukowe AR im H. Kołłątaja w Krakowie, 1998, 342, 23-30.
- Gordon D.B., Baraniak B.M., Wpływ modyfikacji chemicznej surowca, na jakość koncentratów białkowych koagulowanych z soku liści topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.). Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, Scientia Alimentaria, 2006, 251 (5), 13–22.
- Prażnik W., Cieślik E., Filipiak A., The influence of harvest time on the content of nutritional components in tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Proceedings of the Seventh Seminar on Inulin, Louvain, Belgia, 1998, 154-157.
- Cieślik E., Filipiak-Florkiewicz A., Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) – możliwości wykorzystywania do produkcji żywności funkcjonalnej, Żywność 2000, 1 (22), 71–81.
- Kopeć A., Cieślik E., Wpływ dodatku mączki z bulw topinamburu na poziom glukozy w surowicy krwi szczurów doświadczalnych. Żywność, 2001, 3 (28), 66-70.
- Baldini M., Danuso F., Turi M., Vannozzi G. P., Evaluation of new clones of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for inulin and sugar yield from stalks and tubers. Industrial Crops and Products, 2004, 19, 25–40.
- Mystkowska I., Zarzecka K., Wartość odżywcza i prozdrowotna słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.), Borgis - Postępy Fitoterapii, 2013, 2, 123-126.
- Kunachowicz H., Kłys W. Żywność funkcjonalna. Wpływ dodatku prebiotyków i probiotyków na wartość odżywczą żywności. Pediatria współczesna, 2002, 1 (4), 33-40.
- Bachmanowa S., Bulwa – *Helianthus tuberosus* – i jej zastosowanie w przemyśle spożywczym. Przemysł Rolny i Spożywczy, 1954, 6, 201–203.
- Gałązka I., Klewicki R., Grzelak K., Hydroliza fruktanów w warunkach symulujących działanie soku żołądkowego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2004, 3 (40) Supl., 68–76.
- Georgescu L.A., Stoica I., Studies Concerning the Dynamic of Enzyme Hydrolyse on the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) Inulin. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology, 2005, 1, 77–81.
- Zaky E. A. Physiological Response to Diets Fortified with Jerusalem Artichoke Tubers (*Helianthus tuberosus* L.) Powder by Diabetic Rats. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 2009, 5 (5), 682–688.
- Cieślik E., Gębusia A., Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) – bulwa o właściwościach prozdrowotnych. Postępy Nauk Rolniczych 2010, 3, 91–103.

- Sawicka B., Wartość energetyczna słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) jako źródła biomasy. Zeszyty Naukowe UP we Wrocławiu, Rolnictwo, 2010, XC VII, 578, 245-256.
- Góral S. Zmienność morfologiczna i planowanie wybranych klonów słonecznika bulwiastego-topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.). Hodowla Roślin i Nasiennictwa, 1998, 2, 6-10.
- Vasić D., Miladinović J., Marjanović-Jeromela A., Škorić D. Variability between *Helianthus tuberosus* Accessions collected in the USA and Montenegro. HELIA, 2002, 25 (37), 79-84.
- Terzić S., Mikić A., Atlagić J., Marinković R., Mihailović V., Morfološka varijabilnost krtola vrste *Helianthus tuberosus*. Zbornik radova, Sveska 2007, 44, 207-214.
- Kays S.J., Nottingham S.F., Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke *Helianthus tuberosus* L. CRC Press Taylor & Francis Group, Broken Sound Parkway NW, 2008.
- Pas'ko N.M., Basic morphological features for distinguishing varieties of Jerusalem artichoke. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii, 1973, 50 (2), 91-101.
- Tsvetoukhine V. Contribution a l'étude des variété de topinambour (*Helianthus tuberosus* L.), Annal. Amelior. Plant., 1960, 10, 275-308.
- Swanson C. R., Hendricks S. B., Toole V. K., Hagen C. E., Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Other Growth-Regulators on the Formation of a Red Pigment in Jerusalem artichoke Tuber Tissue. Plant Physiology, 1956, 12, 315-316.
- Kryłowicz A., Chrzanowski K., Usidus J., Zgłoszenia patentowe P-348681. Sposób i układ wytwarzania metanu, energii elektrycznej i cieplej. WKTiR Zamość, 2001.
- Sawicka B., Możliwość wykorzystania słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) jako warzywa. Proceedings of the VIII Scientific Horticulture Plant Breeding Symposium, Horticulture Plant Breeding to start with XXI century. Lublin, 1999, 04-05.02., 95-98.
- Németh G. Izasáki Z., Macro- and microelement content and uptake of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). V. Alps-Adria Scientific Workshop, 2006, 34 (1), 597-600.
- Sawicka B., Skiba D., Zmienność ciemnienia miąższu bulw surowych i gotowanych słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.). Annales UMCS, sectio E., 2009, 64 (2), 15-22.
- Burdzenia O., Topinambur – źródło zdrowia. Wiadomości Zielarskie, 2001, 43 (8), 16-18.
- Cisowski W., Włodarczyk M., Naturalne polisacharydy oraz korzyści i ryzyko ich stosowania w profilaktyce i terapii. Herba Polonica, 2006, 52 (3), 18.
- Yildiz G., Sacaklı P., Gungor T., The effect of dietary Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) on performance, egg quality characteristics and egg cholesterol content in laying hens. Czech Journal of Animal Science, 2006, 51 (8), 349-354.

- Prażnik W., Cieślik E., The composition of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) powders and their application in bakery products, 2005, <http://www.kokkinias.com/fructan/admin/abstracts/pdf/praznik.pdf>.
- Gedrovica I., Karklina D., Characteristics of cakes enriched with Jerusalem artichoke powder. *Cheminé Technologija*, 2009, 3 (52), 50–55.
- Pęksa A., Rytel E., Tajner-Czopek A., Kita A., Danilcenko H., Jarenie E., Figiel A., Lech K., Miedzianka J., Drożdż W., Wpływ surowca i parametrów procesu na cechy sensoryczne i fizyczne ekstrudowanych przekąsek. *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015a, 3 (100), 176 – 189.
- Pęksa A., Kita A., Tajner-Czopek A., Rytel E., Miedzianka J., Jakość chrupek kukurydzianych wzbogaconych dodatkiem mąki z amarantusa, topinamburu i mięszu dyni. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna – XLVIII*, 2015b, 3, 490 – 495.
- Rytel E., Kita A., Pęksa A., Tajner-Czopek A., Miedzianka J., Wpływ zastosowania soli w produkcji chrupek kukurydzianych wzbogaconych dodatkiem niekonwencjonalnych surowców na wybrane cechy jakościowe. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna – XLVIII*, 2015, 3, str. 512 – 517.
- Topolska K., Filipiak-Florkiewicz A., Cieślik E., Florkiewicz A., Maciejaszek I., Wpływ dodatku rozdrobnionych bulw topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.) na jakość mikrobiologiczną sorbetów owocowych. W: Tarko T., Duda-Chodak A., Witczak M., Najgebauer-Lejko D.(red.), *Właściwości produktów i surowców żywnościowych. Wybrane zagadnienia*, Wydawnictwo Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków, 2014, 205 – 2015.
- Rouillé, J., Della G. Valle, J. Lefebvre, Śliwinski E., Vliet V. T., Shear and extensional properties of bread doughs affected by their minor components. *Journal of Cereal Science*, 2005, 42, 45-57.
- Safwat H. Al, Mostafa I. Sarwat, Kareem M.K. El-Tobgy, Marwa S. Abd El Alem., Jerusalem artichoke tubers, Onion and Hulless barley as Functional Foods in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Journal of Applied Sciences Research*, 2012, 8 (2), 1328-1336.
- Baltacıoğlu C., Esin A. A., Chips Production from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Food and Nutrition Sciences*, 2012, 3, 1321-1328.
- Cummings J.H., Macfarlane G.T., Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition* 2002, 87, Suppl. 2, 145-151.
- Gramza-Michałowska A., Górecka D., Wykorzystanie inuliny, jako dodatku funkcjonalnego w technologii produkcji potraw. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna – XLII*, 2009, 3, 324–328.
- Janas P., Targoński Z., Wpływ źródła węgla i azotu na produkcję ksantanu i enzymów zewnątrzkomórkowych przez penicylinoopornego mutantu *Xanthomonas campestris*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, 1 (50), 161–172.

Anioł-Kwiatkowska J., Słonecznik bulwiasty to również roślina lecznicza. Wiadomości Zielarskie, 1994, 36 (12), 12–13.

Chrapkowska K.J., Piasecki M., Góral S., Ocena różnych metod technologicznych przy uzyskaniu syropu fruktozowego z bulw *Helianthus tuberosus* L. (topinambur). Materiały Konferencji Naukowej nt.: Postępy w technologii żywności, Lublin, 1994, 15-16.09., 174.

Sirisansaneeyakul S., Worawuthiyanan N., Vanichsriratana W., Srinophakun P., Chisti Y., Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23, 543–552.

PIOTR PSZCZÓŁKOWSKI

Zakład Doświadczalny Oceny Odmian Uhnin

p.pszczolkowski.inspektor@coboru.pl

BARBARA SAWICKA

Katedra Technologii Produkcji Roślinnej i Towaroznawstwa

Wydział Agrobiotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

e-mail:barbara.sawicka@gmail.com

WARTOŚĆ ODŻYWCZA BIAŁKA WYBRANYCH ODMIAN ZIEMNIAKA

Streszczenie

Wyniki badań oparto na doświadczeniu polowym przeprowadzonym w latach 2010-2012 w Zakładzie Doświadczalnym Oceny Odmian w Uhninie, należącego do Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych w Słupi Wielkiej. Doświadczenia polowe przeprowadzono zgodnie z metodyką oceny wartości gospodarczej odmian roślin uprawnych. Badano 5 średnio wczesnych odmian ziemniaka (trzy odmiany jadalne i dwie odmiany skrobiowe). Wszystkie cechy określano po dojrzeniu bulw. Zawartość białka ogólnego i właściwego oznaczano standardowymi metodami. Cechy genetyczne badanych odmian determinowały w największym stopniu zawartość i plon białka surowego i właściwego, a także udział białka właściwego w białku ogólnym. Czynnikiem kształtującym zawartość białka ogólnego i właściwego w bulwach ziemniaka okazały się także warunki atmosferyczne w latach badań. Akumulacji białka sprzyjały suchy okres od lipca do września. Właściwe określenie składu chemicznego bulw odmian znajdujących się aktualnie w Krajowym Rejestrze Odmian jest szansą na zwiększenie zysków w produkcji ziemniaka do bezpośredniego spożycia i przetwórstwa spożywczego.

Słowa kluczowe: białko ogólne, białko właściwe, odmiany ziemniaka

Wstęp

Ziemniak jest z jedną z podstawowych roślin konsumpcyjnych w Polsce. Wprawdzie produkcja tego gatunku w Polsce, w ciągu ostatnich 20 lat, zmniejszyła się kilkakrotnie, to jednak jego ilość przeznaczona na cele konsumpcyjne zmalała tylko nieznacznie. Spożycie ziemniaka w Polsce wynosi, bowiem ponad 110 kg na jednego mieszkańca [FAOSTAT 2014]. Aktualnie jest zarejestrowanych w naszym kraju 114 odmian ziemniaka, w tym 88 jadalnych i 26 skrobiowych, o odmiennym genotypie, zróżnicowanych możliwościami plonowania oraz odmiennych cechach jakościowych i odpornościowych [Gacek, 2015]. W świeżej masie bulw ziemniaka zawarte jest 1,7-2,9% białka ogółem, z czego 35-60% stanowi białko właściwe [Pęksa, 2003; Lachman i in., 2005; Zarzecka i Gugęła, 2006; Pszczółkowski i Sawicka, 2009]. Ilość ta jest pozornie niewielka, jednakże biorąc pod uwagę, że ziemniak jest spożywany w Polsce codziennie, a jego białko odznacza się wysoką wartością odżywczą, najwyższą spośród wszystkich białek roślinnych, stawia go na uprzywilejowanej pozycji [Pęksa, 2003; Miedzianka, 2011; Leszczyński, 2012; Nemš

i in., 2015]. Przy wykorzystaniu z ziemniaka tylko 0,4% białka otrzymujemy w skali rocznej 30.000MT białka, co odpowiada 4mld jaj [Harkema, 2015]. Białko ziemniaka zawiera wszystkie aminokwasy egzogenne w odpowiednich ilościach. Jest jedynym białkiem roślinnym o wartości porównywalnej z białkami pochodzenia zwierzęcego [Leszczyński, 2012; Harkema, 2015]. Pęksa [2003] dowiodła, iż dzięki wysokiej wartości białka ziemniaczanego jego ilość niezbędna do utrzymania bilansu azotowego człowieka jest porównywalna z ilościami białka zwierzęcego. W przypadku białka całego jaja kurzego ilość ta wynosi 0,509 g na 1 kg wagi ciała na dzień, białka ziemniaka 0,550 g, białka mleka 0,568 g, białka nasion fasoli 0,667 g, a białka pszenicy 0,901 g. Ze względu na znaczne spożycie ziemniaka na osobę w Polsce, w formie nieprzetworzonej, jak i przetworzonej, białko w nim zawarte odgrywa istotną rolę w żywieniu człowieka. Cenne jest również to, że dla konsumenta ziemniak jest dostępny przez cały rok [Zarzecka i in., 2013; Nemš i in., 2015; Harkema, 2015]. Poznanie składu chemicznego bulw nowych odmian ziemniaka, a zwłaszcza zawartości w nim białkowych form azotu, jest szansą na zaproponowanie konsumentom atrakcyjnych, wysokojakościowych odmian. W perspektywie może to być przyczyną podniesienia zysków producenta i przetwórcy ziemniaka. Stąd też celem niniejszej pracy była ocena zmienności zawartości i wydajności białka ogólnego i właściwego wybranych odmian ziemniaka.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły bulwy pięciu średnio wczesnych odmian ziemniaka z doświadczenia przeprowadzonego w latach 2010-2012, w Zakładzie Doświadczalnym Oceny Odmian w Uhninie, woj. lubelskie. Eksperyment polowy wykonano zgodnie z metodyką oceny wartości gospodarczej odmian roślin uprawnych [Kamasa, 1998], metodą bloków zrandomizowanych, w 3 powtórzeniach. Badano 5 średnio wczesnych odmian ziemniaka (trzy odmiany jadalne i dwie odmiany skrobiowe). Doświadczenie przeprowadzono na glebie płowej, wytworzonej z gliny lekkiej, kompleksu żytniego bardzo dobrego, o lekko kwaśnym odczynie (pH 6,4 w KCl). Eksperyment zakładano każdego roku wiosną, w ostatniej dekadzie kwietnia, w rozstawie 67,5 x 37 cm. Materiał sadzeniowy był w klasie C/A. Wiosną stosowano stałe nawożenie azotowo – fosforowo - potasowe w ilości: 90 kg N, 39,2 kg P i 112 kg K·ha⁻¹. Zabiegi uprawowe i ochronne przeprowadzono zgodnie z zasadami dobrej praktyki rolniczej. Przedplonem ziemniaka było pszenżyto ozime. Zbiór bulw przeprowadzono w okresie dojrzałości fizjologicznej. W czasie zbioru określono plon bulw i pobrano próby do oznaczeń chemicznych. Pobrane próby bulw zostały dokładnie umyte i pokrojone na cienkie plastry, które liofilizowano z użyciem liofilizatora ALPHA 1-4 (Osterode am Harz, SRN). Następnie liofilizowane plastry homogenizowano na mąkę ziemniaczaną, którą użyto do analizy zawartości białka surowego. Jego zawartość określano w suchej masie bulw, w atmosferze azotu i następnie pomnożono przez współczynnik 6,25. Całkowitą zawartość azotu oznaczono na analizatorze azotu FLASH EA 1112 (ThermoQuest, Włochy). Azot białkowy oznaczono metodą Bernsteina [AOAC, 2006]. Wszystkie analizy wykonano dla każdej kombinacji doświadczenia polowego, w trzech powtórzeniach. Wydajność białka surowego, jak i właściwego obliczono na podstawie plonu bulw z jednostki powierzchni i zawartości białka.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu statystycznego 6,0 Statistica (StatSoft, 2001) z zastosowaniem analizy wariancji ANOVA. Parametry funkcji określono metodą najmniejszych kwadratów, a weryfikację istotności testem t-Studenta. Oceny istotności różnic pomiędzy porównywanymi średnimi dokonano za pomocą wielokrotnych przedziałów Tukey'a.

Okres wegetacji w 2010 roku odznaczał się dobrym rozkładem i wielkością opadów, przy nieznacznie wyższych temperaturach powietrza, w stosunku do normy wieloletniej (tab. 1). W 2011 roku od kwietnia do lipca występował nadmiar opadów, natomiast sierpień i wrzesień okazały się skrajnie suche. W 2012 roku okres wegetacji odznaczał się przeciętnym rozkładem i wielkością opadów, jedynie wrzesień był skrajnie suchy (tab. 1).

Tabela 1. Współczynniki hydrotermiczne Sielianiowa dla lat 2010-2012

Miesiąc	2010	2011	2012	Średnia
IV	0,6	1,4	1,1	1,0
V	2,0	1,1	0,8	1,3
VI	1,2	2,1	1,9	1,7
VII	0,9	2,9	0,8	1,5
VIII	2,3	0,8	1,2	1,4
IX	2,1	0,2	0,8	1,0
Średnia	1,5	1,4	1,1	

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych stacji meteorologicznej w Uhninie

Wyniki i dyskusja

Zawartość białka ogólnego, w świeżej masie bulw, wahała się, zależnie od roku i odmiany od 1,47 do 2,44% (tab. 2, 3).

Tabela 2. Zawartość białka ogólnego w świeżej i suchej masie bulw w zależności od odmiany i lat badań (%)

Odmiana	W świeżej masie				W suchej masie			
	2010	2011	2012	Średnia	2010	2011	2012	Średnia
Irga	1,47	1,89	1,55	1,64	8,00	8,31	8,01	8,11
Kolia	1,80	2,22	1,69	1,91	9,10	8,61	7,63	8,45
Sante	1,64	1,94	1,65	1,75	9,71	7,42	7,46	8,20
Głada	1,92	2,18	2,00	2,03	7,44	7,79	8,04	7,76
Harpun	1,98	2,44	2,17	2,19	7,74	8,37	8,04	8,05
NIR p _{0,05}		0,33				1,41		
Średnia	1,76	2,13	1,81	1,90	8,40	8,10	7,84	8,11
NIR p _{0,05}		0,07		0,11		0,28		0,47

Źródło: badania własne

Wartości te są zgodne z doniesieniami, tak polskich [Mazurczyk i Lis, 2001; Pęksa, 2003; Zarzecka i Gugała, 2006; Pszczółkowski i Sawicka, 2009; Leszczyński, 2012; Zarzecka i in., 2013; Marks i in., 2014; Nemš i in., 2015; Sawicka i in., 2015], jak i zagranicznych autorów [Koningsveld, 2001; Koops, 2002; Lachman i in., 2005; Bártová i in., 2009; Öztürk i in., 2010]. Właściwości genetyczne badanych odmian wywarły istotny wpływ na badane cechy. Odmiana Harpun odznaczała się najwyższą zawartością białka ogółem w świeżej masie bulw we wszystkich latach badań. Rozpatrując te zależności, w suchej masie bulw, stwierdzono, że przeciętnie aż 4 odmiany są homologiczne pod względem tej cechy (Irga, Sante, Głada i Harpun). Badane odmiany reagowały odmiennie na warunki meteorologiczne w latach badań (tab. 2). Odmiana Głada najmniej białka wytworzyła w 2010 roku, zaś odmiana Sante – w latach 2011-2012 (tab. 2).

Czynnikiem kształtującym zawartość białka ogólnego, tak w świeżej, jak i suchej masie bulw, nie mniej ważnym niż odmiany, okazały się warunki atmosferyczne. Najbardziej sprzyjający koncentracji białka ogólnego w świeżej masie bulw był rok 2011, charakteryzujący się najbardziej korzystnymi warunkami pogodowymi. Potwierdzenie tych wyników uzyskano w badaniach Mazurczyka i Lis [2001], Zarzeckiej i Gugały [2006] oraz Marksa i in. [2014], którzy dowiedli, że w latach o równomiernym rozkładzie opadów i temperatury powietrza plon ogólny, jak i zawartość poszczególnych składników były wyższe. Marks i in. [2014] udowodnili, iż udział lat w analizie wariancji, w kształtowaniu zawartości białka ogólnego, wynosił 54%, zaś udział odmian tylko w 8,2% stanowił o zmienności zawartości białka.

Badane odmiany wykazały zróżnicowaną reakcję na warunki meteorologiczne w latach badań. Odmiana Harpun charakteryzowała się najwyższą zawartością białka ogólnego, w świeżej masie bulw w najcieplejszym, 2011 roku, podobnie reagowały odmiany Irga i Kolia, zaś odmiany: Głada i Sante nie wykazały istotnej zmiany zawartości białka ogólnego na przebieg pogody w okresie wegetacji ziemniaka (tab. 2). Odmienne wyniki obserwowano przy rozpatrywaniu białka ogólnego w suchej masie bulw. Tylko odmiana Sante reagowała istotnie na warunki atmosferyczne w latach badań. Najwięcej białka w bulwach zakumulowała ta odmiana w 2010 roku, o temperaturze powietrza wyższej od normy wieloletniej (tab. 2).

Zawartość białka właściwego w bulwach kształtowała się, zależnie od roku od 1,10 do 1,97% w świeżej masie bulw od 4,92 do 8,15% – w suchej ich masie (tab. 3). W badaniach Mazurczyka i Lis [2001], przeprowadzonych na 97 odmianach, wykazano podobne zróżnicowanie odmian, pod względem wartości tej cechy – od 0,56 do 1,48%, w świeżej masie bulw.

Właściwości odmianowe determinowały w największym stopniu zawartość białka właściwego w bulwach ziemniaka. Najwyższe stężenie tego składnika, tak w świeżej, jak i suchej masie bulw zaobserwowano u odmian skrobiowych: Harpun i Głada. Odmiany Irga i Sante znalazły się w tej samej grupie homologicznej, pod względem wartości tej cechy (tab. 3). Podobne obserwacje, ale na znacznie większej grupie odmian, prezentowali Mazurczyk i Lis [2001]. Z badań Marksa i in. [2014] wynika z kolei, że udział zmienności odmianowej stanowi tylko ok. 8% zmienności ogólnej.

Tabela 3. Zawartość białka właściwego w świeżej i suchej masie bulw w zależności od odmiany i lat badań (%)

Odmiana	W świeżej masie bulw				W suchej masie bulw			
	2010	2011	2012	Średnia	2010	2011	2012	Średnia
Irga	1,26	1,12	1,10	1,16	6,85	4,92	5,68	5,82
Kolia	1,61	1,40	1,24	1,42	8,15	5,41	5,59	6,38
Sante	1,17	1,25	1,13	1,18	6,91	4,76	5,13	5,60
Głada	1,72	1,51	1,45	1,56	6,67	5,42	5,81	5,97
Harpun	1,71	1,97	1,61	1,76	6,69	6,74	5,99	6,47
NIR $p_{0,05}$		0,25				1,05		
Średnia	1,49	1,45	1,31	1,42	7,05	5,45	5,64	6,05
NIR $p_{0,05}$		0,05		0,08		0,21		0,35

Źródło: badania własne

Najwyższą zawartość białka właściwego, tak w świeżej, jak i suchej masie bulw odnotowano w 2010 roku, o optymalnym przebiegu pogody w okresie wegetacji i temperaturze powietrza powyżej normy wieloletniej (tab. 3).

Istotnym okazało się również współdziałanie właściwości odmianowych i warunków w latach badań. Odmiany Kolia, Głada i Harpun reagowały istotnie na przebieg warunków atmosferycznych w okresie wegetacji; przy czym Kolia i Głada najwięcej tej formy białka zgromadziły w 2010 roku, o podwyższonej temperaturze powietrza w okresie wegetacji, zaś Harpun – 2011 roku. Zróznicowanie odmian pod względem reakcji na warunki wegetacji, w przypadku zawartości białka właściwego, potwierdza Mazurczyk i Lis [2001], którzy przebadali bardzo dużą grupę odmian w ciągu 25 lat. Uważają oni jednak, że generalnie w latach suchych ziemniak tworzy więcej, tak białka ogólnego, jak i właściwego, zaś najmniej – w latach wilgotnych, o niższej temperaturze powietrza w okresie wegetacji.

Tabela 4. Udział białka właściwego w białku ogółem świeżej i suchej masie bulw w zależności od odmiany i lat badań (%)

Odmiana	W świeżej masie bulw				W suchej masie bulw			
	2010	2011	2012	Średnia	2010	2011	2012	Średnia
Irga	85,71	59,20	70,96	71,96	85,62	59,20	70,91	71,91
Kolia	89,44	63,06	73,37	75,29	89,56	62,83	73,26	75,22
Sante	71,34	64,43	68,48	68,08	71,16	64,15	68,77	68,03
Głada	89,58	69,26	72,50	77,11	89,65	69,57	72,26	77,16
Harpun	86,36	80,73	74,19	80,43	86,43	80,52	74,50	80,48
NIR p _{0,05}		12,75				12,75		
Średnia	84,49	67,34	71,90	74,57	84,48	67,25	71,94	74,56
NIR p _{0,05}		2,55		4,25		2,55		4,25

Źródło: badania własne

Udział białka właściwego w białku ogółem stanowił 68,08-80,43%, zależnie od odmiany i 67,34-84,48%, zależnie od roku badań. W badaniach wieloletnich Mazurczyk i Lis [2001] udział ten wahał się od 39% do 65%, zależnie od roku; przy czym w latach suchych był on najniższy, a w latach przeciętnych, pod względem przebiegu opadów, jak i temperatur powietrza, był najwyższy. W przeprowadzonych badaniach zarówno cechy genetyczne badanych odmian, jak i warunki środowiska miały istotny wpływ na udział białka właściwego w białku ogólnym (tab. 4). Najwyższym udziałem białka właściwego, w białku ogólnym, odznaczała się odmiana Harpun, następnie odmiana Głada, najniższym zaś – odmiana Sante. Odmiany Irga i Kolia nie różniły się istotnie pod tym względem. Nemś i in. [2011], Miedzianka [2011] oraz Harkema [2015] podkreślają, iż białko ziemniaczane jest unikalne, łącząc wysoką zdolność teksturalną z "wolnością" od alergenów, wolne jest też od glutenu oraz laktozy. To wskazuje na wysoką wartość funkcjonalną badanych odmian ziemniaka. Amerykańskie Stowarzyszenie do Badań nad Ziemniakiem uznało ziemniak za żywność bezglutenową, o doskonałej jakości białka, dającą szereg możliwości jego wykorzystania, m.in. do: polepszania objętości i tekstury produktów żywnościowych, bez dodawania nowych alergenów; do pienienia się, dając np. większą objętość pieczywa, lepszą strukturę miększu; do żelowania, pozwalając zachować wysoką objętość i teksturę po upieczeniu; do fortyfikacji, gdyż zwłaszcza produkty standardowe GF (Gluten Free) mają tendencję do "zubażania". Główne korzyści z zastosowania białka ziemniaczanego to lepsza tekstura, lepsze odżywianie, brak alergenów [Miedzianka, 2011; Harkema, 2015].

Najwyższy udział białka właściwego, w białku ogółem, stwierdzono w 2010 roku, o najkorzystniejszym rozkładzie opadów w okresie wegetacji i wyższej od średniej wieloletniej temperaturze powietrza w miesiącach letnich, najniższy zaś w 2011 roku, o mokrym czerwcu i lipcu i suchym sierpniu i skrajnie suchym wrześniu (tab. 4).

Tabela 5. Wydajność białka ogólnego i właściwego, zależnie od odmiany i lat badań (kg·ha⁻¹)

Odmiana	Plon białka ogólnego				Plon białka właściwego			
	2010	2011	2012	Średnia	2010	2011	2012	Średnia
Irga	580	461	633	558	500	273	449	407
Kolia	890	685	581	719	800	430	426	552
Sante	1020	506	636	721	720	324	438	494
Głada	860	478	661	666	770	332	478	527
Harpun	850	653	766	756	740	526	571	612
NIR p _{0,05}	ns				ns			
Średnia	840	557	655	684	706	377	472	518
NIR p _{0,05}	23				17			

Źródło: badania własne; ns – nieistotne przy poziomie p_{0,05} – not significant at p_{0,05}

Najwyższym plonem, tak białka ogólnego, jak i właściwego odznaczała się wysokoskrobiowa odmiana Harpun, o najdłuższym okresie wegetacji, najniższym zaś – średnio wczesna, jadalna Irga. Odmiany Kolia i Sante nie różniły się istotnie pod względem plonu białka surowego, zaś Głada i Kolia – z uwagi na plon białka właściwego (tab. 5). Różnice odmianowe w wydajności białka podkreślają również Mazurczyk i Lis [2001], Zarzecka i Gugała [2006] oraz Pszczółkowski i Sawicka [2009]. Na podobną zmienność odmianową wskazują również wyniki Bombik i in. [2007].

Najwyższy plon białka ogólnego i białka właściwego odnotowano w pierwszym, najcieplejszym roku badań, najniższy zaś w wilgotnym, 2011 roku (tab. 5). Podobne spostrzeżenia wysunęli Mazurczyk i Lis [2001]. Nie wykazano zaś interakcji odmian z warunkami środowiska, na co wskazywał Yildirim i Caliskan [1985] oraz Jansen i in. [2001].

Wnioski

Cechy genetyczne badanych odmian ziemniaka okazały się decydujące w kształtowaniu, tak zawartości białka surowego, jak i właściwego w bulwach ziemniaka oraz ich wydajności. Najwyższą zawartością tych składników, jak i ich plonem odznaczała się skrobiowa odmiana Harpun, najniższą zaś - jadalna odmiana Irga.

Stosunek białka właściwego do białka ogólnego badanych bulwach ziemniaka determinowały zarówno czynniki genetyczne, jak i warunki środowiska. Najwyższy udział białka właściwego w białku ogółem zapewniały optymalne warunki meteorologiczne w okresie wegetacji oraz odmiany wysokoskrobiowe, w porównaniu do standardowych odmian konsumpcyjnych.

Bulwy ziemniaka należy traktować jako żywność funkcjonalną, prozdrowotną, bezglutenową, a białko ziemniaka można wykorzystać w przemyśle przetwórstwa spożywczego do produkcji i wzbogacania pieczywa i innych produktów, celem uzyskania lepszej ich tekstury, lepszej ich wartości odżywczej, przy jednoczesnym braku alergenów.

Literatura

- AOAC 2006. Official methods of analysis of AOAC International. Ed. by W. Horwitz
Publisher: Gaithersburg, Edition/Format: Book: English, 18. Ed., current through rev. 1.
- Bártová V., Bárta J., Diviš J., Švajner J., Peterka J. 2009. Crude protein content in tubers of starch processing potato cultivars in dependence on different agro-ecological conditions. *Journal of Central European Agriculture* 10 (1), 57-65.
- Bombik A., Rymuza K., Markowska M., Stankiewicz Cz. 2007. Variability analysis of selected quantitative characteristics in edible potato varieties. *Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura* 6 (3), 5-15.
- FAOSTAT2014.Production. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Gacek E. 2015. Lista odmian roślin rolniczych wpisanych do krajowego rejestru w Polsce. Wyd. COBORU, Słupia Wielka, 53-57.
- Harkema J. 2015. Potato Proteins “Free From” Texture & Nutrition. Conference Solanic® Potato Proteins - Free From Food Expo, Barcelona, 4-5 juni, <http://www.freefromfoodexpo.com/pdf/2015-conference-solanic.pdf>
- Jansen G., Flamme W., Schüller K., Wandrey M. 2001. Tuber and starch quality of wild and cultivated potato species and cultivars. *Potato Research*, 44 (2), 137-146.
- Kamasa J. 1998. Metodyka badania wartości gospodarczej odmian (WGO) roślin uprawnych. Ziemniak. Wyd. COBORU, Słupia Wielka.
- Koningsveld van G. 2001. Physico-chemical and functional properties of potato proteins. PhD thesis. Wageningen Agricultural University (Netherlands), 147.
- Koops G.H., Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination*, 2002, 144, 331-334.
- Lachman J., Hamouz K., Dvořák P., Orsák M., The effect of selected factors on the content of protein and nitrates in potato tubers. *Plant Soil and Environment*, 2005, 51 (10), 431–438.
- Leszczyński W., Żywnościowa wartość ziemniaka i przetworów ziemniaczanych (Przegląd literatury). *Biuletyn IHAR*, 2012, 266, 5-20.
- Marks N., Krzysztofik B., Szmigiel A. Zależności pomiędzy zawartością związków azotowych a podatnością bulw ziemniaka na mechaniczne uszkodzenia, 2014. <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.../c/Marks.pdf>.
- Mazurczyk W., Lis B., Variation of chemical composition of tubers of potato table cultivars grown under deficit and excess of water. *Polish Journal of Food Nutrition and Science*, 2001, 10 (2), 27-30.
- Miedzianka J., Właściwości funkcjonalne białka ziemniaczanego poddanego modyfikacji chemicznej. Praca dokt. UP, Wrocław 2011.

- Nemś A., Miedzianka J., Pęksa A., Kita A., Zawartość związków prozdrowotnych w ziemniakach odmian o różnej barwie miąższu. *Bromatologia Chemia Toksykologia*, 2015, 47 (3), 473-478.
- Öztürk E., Kavurmaci Z., Kara K., Polat T., The effects of different nitrogen and phosphorus rates on some quality traits of potato. *Potato Research*, 2010, 53, 309–312.
- Pęksa A. Białko ziemniaczane – charakterystyka i właściwości. *Postępy Nauk Rolniczych*, 2003, 5, 79-94.
- Pszczółkowski P., Sawicka B. Zawartość białka i azotanów w bulwach bardzo wczesnych odmian ziemniaka uprawianych pod osłonami. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2009, 542, 413-426.
- Sawicka B., Michałek W., Pszczółkowski P. The relationship of potato tubers chemical composition with selected physiological indicators. *Zemdirbyste-Agriculture*, 2015, 102, 41–50, ISSN 1392-3196 / e-ISSN 2335-8947, DOI 10.13080/z-a.2015.102.005.
- StatSoft, 2001. *Statistica - StatSoft Polska*.
- Yildirim M.B., Caliskan C.F. Genotype x environment interactions in potato (*Solanum tuberosum* L.). *American Journal of Potato Research*, 1985, 62 (7), 371.
- Zarzecka K., Gugala M., Zawartość białka ogólnego i właściwego w bulwach ziemniaka w zależności od sposobów uprawy roli i odchwaszczania. *Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura*, 2006, 5 (2), 107-115.
- Zarzecka K., Gugala M., Zarzecka M. Ziemniak jako dobre źródło składników odżywczych. *Postępy Fitoterapii*, 2013, 3, 191-194.

BARBARA SAWICKA, ALI HULAIL NOAEMA, ANNA KIEŁTYKA-DADASIEWICZ
Katedra Technologii Produkcji Roślinnej i Towaroznawstwa
Wydział Agrobiotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
e-mail: barbara.sawicka@up.lublin.pl

PIOTR BARBAŚ
Zakład Agronomii
IHAR-PIB Oddział Jadwisin

WARTOŚĆ ODŻYWCZA BULW ZIEMNIAKA W WARUNKACH STOSOWANIA BIOREGULATORÓW WZROSTU

Streszczenie

W pracy podsumowano stan wiedzy na temat wartości odżywczej ziemniaka, z uwzględnieniem właściwości prozdrowotnych i funkcjonalnych tego gatunku. Ziemniak oprócz zaspokajania głodu spełnia różne dodatkowe funkcje fizjologiczno-żywniowe, wywiera duży wpływ na poprawę stanu zdrowia oraz zapobiega niektórym chorobom. Małe wymagania glebowo-klimatyczne i łatwa uprawa ziemniaka, połączona z nieskomplikowanym procesem pozyskiwania skrobi o szerokim spektrum zastosowania, czynią ją bardzo atrakcyjnym produktem. Stosowanie regulatorów wzrostu i nawozów dolistnych zawierających makro- i mikrośkładniki ma wpływ m.in. na gospodarkę azotową roślin, aktywację i kontrolę wielu procesów życiowych. Mogą one być czynnikami pozwalającymi na zwiększenie wartości odżywczej ziemniaka i jego odporności na czynniki patogeniczne. Aplikacja ich w uprawie ziemniaka stanowi, zatem odpowiedź na rosnące potrzeby konsumentów.

Słowa kluczowe: makro-, mikroelementy, witaminy, sole mineralne, wartość energetyczna, ziemniak, regulatory wzrostu, nawożenie dolistne

Wartość odżywcza ziemniaka

Ziemniak jest jednym z podstawowych produktów spożywczych, dostępnych cały rok, bez ograniczeń. Jego wartość energetyczna, w zależności od składu chemicznego, wynosi od 50 do 90 kcal na 100 g świeżej masy bulw [Lisińska, 2006; Leszczyński, 2012]. Ziemniak o mniejszej zawartości skrobi (10-12%) ma około 50-55 kcal, o większej (16%) – około 80 kcal w 100 g [USDA, 2012]. Większą wartością energetyczną odznaczają się bulwy pieczone (93 kcal na 100 g) i gotowane, bez skórki (86 kcal na 100 g), niż bulwy surowe ziemniaka (79 kcal na 100 g) i gotowane w skórce (78 kcal na 100 g) [Love i Pavék, 2008; USDA, 2012; Bienia i in., 2015]. O wartości odżywczej bulw świadczy zawartość białka, węglowodanów, tłuszczu, witamin, soli mineralnych, jak i substancji bioaktywnych [Pobereźny i in., 2011; Leszczyński, 2012]. Bulwy ziemniaka jadalnego zawierają, w zależności od odmiany, około 12 do 16% skrobi, zaś skrobiowego – 18,0-27,5%. Zawartość skrobi ma znaczenie ze względu na przydatność bulw ziemniaka do przetwórstwa

i gastronomii. Ponadto wielocukier ten jest rozkładany do glukozy, która stanowi podstawowe źródło energii niezbędnej do funkcjonowania organizmu człowieka [Pobereźny i in., 2011; Bienia i in., 2015; Zarzecka i in., 2015]. Z węglowodanów, poza skrobią bulwy ziemniaka zawierają około 0,5% cukrów redukujących (glukozę, fruktozę, sacharozę), których wyższa zawartość (do około 1%) powoduje słodki smak bulw. Ich zawartość w bulwach ziemniaka ulega zmianie w wyniku obróbki kulinarnej bulw. Najwięcej tego składnika kumuluje się podczas pieczenia (1,70 g), a spada podczas gotowania ziemniaka [USDA, 2012].

W bulwach znajduje się ok. 2% substancji azotowych, jako tzw. białko surowe, z czego ponad połowę stanowi białko właściwe, a pozostała część to aminokwasy, peptydy, związki amonowe, amidy i inne. Jansen i in. [2001] badając 466 odmian uzyskali 4,5-13,6% białka w suchej masie bulw. Według USDA [2012] zawartość białka w 100 g świeżych bulw ziemniaka surowego wynosi 2,14 g, a po ugotowaniu, w "mundurkach" – 2,86 g. W białku ziemniaka przeważają takie aminokwasy jak: leucyna, lizyna, fenyloalanina i walina [Lisińska, 2006; Wroniak, 2006; Leszczyński, 2012]. Zdaniem Ciećko i in. [2004] białko ziemniaka charakteryzuje się też wysokim udziałem histydyny, znaczną ilością lizyny i treoniny. Wysoki indeks Osera – EAA, cechujący białko ziemniaka pod względem składu aminokwasowego wykazuje, że jest ono pod względem jakości zbliżone do białka jaja kurzego. W związku z tym wykorzystanie ziemniaka w żywieniu może rekompensować niedobór tych aminokwasów występujący w ziarnie zbóż [Sawicka, 1991; Stankiewicz i in., 2008; Bartová i in., 2009; Bienia i in., 2015; Zarzecka i in., 2015].

W ziemniaku występują też nierozpuszczalne substancje nieskrobiowe, będące głównie składnikami ścian komórkowych, takie jak: celuloza, pektyna (acetylowana, a nie jak większość roślin metylowana). Tworzą one tzw. błonnik pokarmowy w ilości ok. 2,3% masy bulw. Jest on odporny na działanie enzymów trawiennych i nie ma wartości energetycznej. Mimo to jest jednak niezbędny w żywieniu, „rozcieńczając” składniki odżywcze, ułatwiając dostęp do enzymów trawiennych. Poprawia również perystaltykę jelit, jak również adsorbuje kwasy żółciowe oraz toksyczne metale ciężkie. Porcja gotowanych ziemniaków w ilości 180 g dostarcza około 3 g błonnika, co stanowi ponad 10% dziennego zalecanego spożycia (25 g) [EFS, 2010; Bienia i in., 2015].

Tłuszcze stanowią w bulwach ziemniaka tylko około 0,1%, świeżej ich masy. Przeważają kwasy tłuszczowe, głównie linolowy i linolenowy, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania człowieka. Są to kwasy należące do grupy niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych [Mazurczyk i Lis, 2001; Wroniak, 2006; Bienia i in., 2015]. Z niezbędnych składników w żywieniu człowieka występują w bulwach ziemniaka witaminy, takie jak: witamina C, o zawartości 20-30 mg·100 g⁻¹, B₁ (tiamina) (24-180 µg·100 g⁻¹), B₂ (ryboflawina) (7-200 µg·100 g⁻¹), B₃ (niacyna) (360-3300 µg·100 g⁻¹), B₅ (kwas pantotenowy) (190-320 µg·100 g⁻¹), B₆ (pirydoksyna) (130-420 µg·100 g⁻¹), B₉ (kwas foliowy) (6-50 µg·100 g⁻¹) oraz H (biotyna) (0,6 µg·100 g⁻¹) [Love i Pavék, 2008; Leszczyński, 2012; USDA, 2012; Bienia i in., 2015]. Średnia porcja gotowanych bulw (180 g) pokrywa 1/2 zaporzebowania na witaminę C i ponad jedną szóstą dziennego zapotrzebowania osoby dorosłej na witaminy B₁, B₆ i kwas foliowy [Leszczyński, 2012].

Bulwy ziemniaka zawierają też składniki mające znaczenie w profilaktyce chorób nowotworowych, takie jak: polifenole, flawonoidy, tokoferole [Reddivari i in., 2007;

Zarzecka i in., 2015]. Związki te występują w ilości 15-30 mg·100g⁻¹, a nawet powyżej 45 mg·100g⁻¹ [Leszczyński, 2012]. Substancje mineralne występują w bulwach w ilości od 0,5 do 2%, w tym potas, fosfor, wapń, magnez, sód, siarka, żelazo, miedź, mangan i inne [Leszczyński, 2012; Żołnowski, 2013; Bienia i in., 2015]. Głównym składnikiem mineralnym jest potas wpływający na gospodarkę jonową i wodną organizmu. W 100 g gotowanego ziemniaka jest 370 mg potasu, w 100 g ziemniaka pieczonego 535 mg, zaś w takiej porcji frytek 451 mg tego składnika. Oprócz potasu bulwy ziemniaka zawierają wapń (15 mg%) i magnez (około 20 mg%), które neutralizują zakwaszający wpływ przetworów zbożowych, mięsa i ryb na człowieka. Spożywanie ziemniaka w ilości 200g pokrywa częściowo zapotrzebowanie na molibden (do 100%), jod (20%), chrom (50%), selen (20%), fluor (15%), magnez (15%), żelazo (15%), miedź (12%), fosfor (12%) [Bethke i Jansky, 2008]. Stąd też bulwy ziemniaka spełniają ważną rolę w utrzymaniu równowagi kwasowo-zasadowej oraz w gospodarce wodnej i jonowej człowieka. Ponadto są produktem tanim i zdrowym, smacznym i łatwym w przygotowaniu do spożycia, zalecanym dla wszystkich grup wiekowych [Leszczyński, 2012; Bienia i in., 2015; Zarzecka i in., 2015]. Bulwy ziemniaka zawierają też niewielkie ilości glikoalkaloidów (TGA) - substancji antyżywnościowych (chakonina, α -solanina, solanidyna, tomatidenol) głównie w owocach, kwiatach i liściach oraz kielkach ziemniaka. W bulwach związki te występują w ilości 5-40 mg·100 g⁻¹ świeżej masy bulw, głównie w okolicy oczek i tuż pod skórą. Miejsca te są obierane i odrzucane, zatem nie stwarza to zagrożenia dla zdrowia człowieka czy zwierząt. Ponadto badania przeprowadzone na ochotnikach wykazały, iż TGA rozkłada się w środowisku kwaśnym, w żołądku, lub w miejscu absorpcji. Lipofilne właściwości solanidyny przyspieszają jej wchłanianie [Badowski i Urbanek-Karłowska, 1999; Zarzecka i in., 2015].

Wpływ bioregulatorów na wartość odżywczą ziemniaka i jego odporność na czynniki patogeniczne

Czynnikami pozwalającymi na zwiększenie wartości odżywczej roślin i ich odporności na czynniki patogeniczne mogą być regulatory wzrostu oraz nawozy dolistne. Stosowanie nawozów dolistnych zawierających makro- i mikroskładniki ma wpływ m.in. na gospodarkę azotową roślin, aktywację i kontrolę wielu procesów życiowych (zwiększenie wydajności fotosyntezy – Fe, Cu, Mn, Zn; sprawnej kontroli funkcjonowania układów hormonalnych – Zn, Mn, Cu, B, zwiększenia odporności roślin na choroby – Fe, Mn, Cu, B oraz utrwalenie właściwości przechowalniczych [Kozera i Barczak, 2007; Żołnowski, 2013]. W Polsce, dla upraw ziemniaka najczęściej dostępne są takie nawozy dolistne, jak: Agrosol K, Adob Mn, Alkalin PK 10:20, Basfoliar 36 E, ChronPlon PK, Ekosol K, Insol 7, Mikrosol Zm, Plonvit K, Seniphos, Sonata Z, Wuxal Kombi czy Nutrifor. Nawożenie dolistne ma duże znaczenie w rozwoju roślin ziemniaka w warunkach stresowych [Bolińska, 2003]. Składniki pokarmowe powinny być dostarczane roślinom ziemniaka głównie w okresie zawiązywania bulw, gdy zapotrzebowanie na nie jest największe. Dla większości odmian przypada to na okres czerwiec-lipiec. Najczęściej pierwszy zabieg dolistnego nawożenia roślin stosuje się na dwa tygodnie przed kwitnieniem, zaś ostatni – w fazie owocowania [Bolińska, 2003; Ciećko i in., 2004; Jabłoński, 2009;

Żołnowski, 2013]. Nawożenie dolistne stanowi zabieg interwencyjny i powszechnie przypisuje się mu rolę zapobiegania obniżeniu plonów roślin uprawnych m.in. poprzez ograniczenie chorób [Warchołowa, 1998; Boligłowa, 2003; Sawicka, 2003; Sawicka i Krochmal-Marczak, 2009a,b; Sawicka i Skiba, 2009c]. W przypadku preparatów, takich jak: Ekolist Zm, Indol 7 własność ochronną stanowią bardzo wysokie poziomy poszczególnych mikroelementów, a zwłaszcza Zn, Cu, B, Fe i Mn. W przypadku nawozu dolistnego np. ChrońPlon jego własność ochronną stanowi wysokie pH. Najlepszy efekt ochronny, w postaci przedłużenia wegetacji roślin, w badaniach Sawickiej i Skiby [2009c], przyniosło zastosowanie nawozu dolistnego Chrońplon PK, w porównaniu z obiektem kontrolnym. Inny nawóz dolistny, np. Ekolist Zm można traktować jako preparat zwiększający odporność roślin na choroby grzybowe i hamujący częściowo rozwój zarazy ziemniaka oraz alternariozy [Sawicka i Krochmal-Marczak, 2009a,b]. Niejednakowy efekt ochronny stosowanych nawozów dolistnych wynika na ogół z ich składu mineralnego oraz ich różnego pH.

Podstawowym kryterium efektywności pozakorzeniowego dokarmiania roślin jest tempo absorpcji i przemieszczania składników pokarmowych wewnątrz rośliny, czyli czas, w którym zastosowane składniki zostaną włączone w metabolizm roślin. Szybkość przenikania poszczególnych kationów przez membranę kutykuli maleje w kierunku: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+}$ [Warchołowa, 1998]. Wpływ nawozów dolistnych na jakość bulw jest nadal słabo poznany [Boligłowa, 2003; Ciećko i in., 2004; Bogucka i in., 2010; Kozera i Barczak, 2007; Żołnowski, 2013]. Bogucka i in. [2010] akcentują zwiększenie galeczek skrobi na skutek stosowania tych nawozów. Kozyra i Barczak [2007] stwierdzili oddziaływanie nawożenia cynkiem, miedzią, molibdenem oraz wieloskładnikowego nawozu na wzrost zawartości azotu ogólnego w suchej masie bulw oraz zwiększenie udziału albumin w bulwach pod wpływem nawożenia dolistnego. Dolistna aplikacja roztworów miedzi oraz cynku powodowała wzrost udziału białek konstytucyjnych (albuminy+globuliny) w suchej masie bulw. Nawożenie miedzią, molibdenem, nawozem wieloskładnikowym, a także cynkiem, powodowało istotny wzrost udziału azotu nierozpuszczalnego w suchej masie bulw. Globuliny i gluteliny natomiast w niewielkim stopniu zmieniały się pod wpływem nawożenia dolistnego. Jabłoński [2009] stwierdził zmniejszenie poziomu azotanów w bulwach ziemniaka pod wpływem stosowanego nawożenia dolistnego. Zdaniem Żołnowskiego [2013] bulwy intensywniej nawożone nawozami dolistnymi zawierają w swoim składzie zwiększone ilości N, P i Mg a zmniejszone zawartość witaminy C, cukrów redukujących i skrobi. Jednocześnie charakteryzują się korzystniejszą strukturą miąższu, wyższą wyceną typu kulinarnego. W bulwach zawierających zwiększoną zawartość witaminy C, fosforu i magnezu stwierdził poprawę smakowości. Wg Sawickiej [2016] koncentrat nawozowy Insol 7 zwiększa istotnie zawartość fosforu, ale jednocześnie ogranicza gromadzenie się wapnia. Spośród wszystkich procesów regulacji wewnętrznej uczestniczących w regulacji procesów wzrostu i rozwoju regulatory wzrostu roślin wyróżniają: występowanie w bardzo niskich stężeniach, aktywność biologiczna, obecność we wszystkich roślinach, miejsce syntezy w roślinie różni się od miejsca fizjologicznej aktywności [Mikos-Bielak, 2005]. Substancje syntetyczne regulujące wzrost roślin zastosowane w wyższych stężeniach działają na rośliny niszcząco. Dlatego przy doborze substancji aktywnej biologicznie bardzo ważne są badania określające

dokładne granice stężeń, w których działają korzystnie na wzrost i rozwój roślin [Chekurov, 1990; Stutte i Clark, 1990; Sawicka i Mikos-Bielak, 1996; Malonova i Koupil, 1997; Vavrina, 1997; Sawicka, 1999, 2000, 2003; Rudzińska-Mękał, 2000; Mikos-Bielak, 2005; Sawicka i Krochmal-Marczak, 2009a,b; Matysiak i in., 2013].

Mało jest prac dotyczących wpływu regulatorów wzrostu na wartość odżywczą ziemniaka i zdrowotność bulw. Sawicka [1994a,b] uzyskiwała korzystne efekty stosując regulatory Mival i Poteitin. Obydwa opóźniały wybuch epidemii zarazy ziemniaka, a tym samym przyczyniały się do uzyskania wyższego plonu o lepszej jakości zdrowotnej. W licznych badaniach z regulatorami wzrostu wykazano zwiększenie zawartości suchej masy i skrobi w bulwach ziemniaka [Sawicka, 1994a, 1999, 2003; Sawicka i Mikos-Bielak, 1996; Czeczko i Mikos-Bielak, 1997, 2004; Mikos-Bielak i in., 1999a,b; Rudzińska-Mękał, 2000; Sawicka i Krochmal-Marczak 2009a,b]. Mikos-Bielak i in. [1999a,b] zaobserwowały, że wraz ze wzrostem zawartości skrobi w bulwach wzrastała zawartość cukrów redukujących i rozpuszczalnych ogółem, w tym sacharozy. Wskazuje to na wzrost wydajności fotosyntetycznej oraz transportu asymilatów z części nadziemnej do bulw, czemu sprzyjają enzymy aktywowane przez potas. Rudzińska-Mękał [2000] dowiodła, że zwiększenie zawartości skrobi, sacharozy i cukrów redukujących w bulwach ziemniaka, pod wpływem regulatorów Mival i Moddus, wynikało z zahamowania biosyntezy oligo- i polisacharydów z powodu spadku stężenia potasu w bulwach. Regulatory Mival i Poteitin zwiększały na ogół zawartość witaminy C w bulwach (24 na 37 badanych odmian) [Sawicka, 1996; Mikos-Bielak i in., 1999a,b], zaś aplikacja regulatora Moddus i Atonik – obniżała zawartość tej witaminy w bulwach ziemniaka [Rudzińska-Mękał 2000]. Z kolei Atonik i Kwartazyna nie tyle hamują biosyntezę witaminy C, co jej transport do organów generatywnych [Mikos-Bielak i Sawicka, 1996]. Związki fenolowe są przyczyną ciemnienia miąższu bulw surowych, jak i gotowanych, chociaż wskutek innych procesów. Regulatory wzrostu, będące aktywatorami jednych, a inhibitorami innych procesów wpływają również na zawartość związków fenolowych bulwach ziemniaka i na przemiany łączące się z tym procesem. Syntetyczne regulatory wzrostu, takie jak: Asahi, Mival, Moddus 250 ME, Poteitin, Kwartazyna na ogół zwiększają zawartość związków fenolowych w bulwach ziemniaka, co wiązało się z większymi skłonnościami do ciemnienia bulw surowych i gotowanych [Sawicka i in., 2000]. Wynika to stąd, iż egzogenne stosowanie syntetycznych regulatorów wzrostu przyczynia się na ogół do korzystnej modyfikacji wzrostu i rozwoju roślin, a dzięki temu do zwiększenia plonu i poprawienia jego struktury. Stosowanie regulatorów wzrostu do opryskiwania naci przyczynia się również do kontrolowania rozwoju alternarioz, septorioz i zarazy ziemniaka; zwiększenia zawartości suchej masy, skrobi oraz innych cukrowców w bulwach po zbiorze, a także po przechowaniu [Sawicka, 1999b,c; Sawicka i in., 2000; Mikos-Bielak, 2005; Sawicka i Krochmal-Marczak, 2009a,b; Sawicka i Skiba 2009c]. Z nieopublikowanych badań Sawickiej [2016] wynika, iż regulator wzrostu Asahi SL przyczynia się do zwiększenia zawartości azotu, a jednocześnie zmniejszenia stężenia wapnia w suchej masie bulw. Ponadto preparat Asahi SL może być polecany w uprawie odmian ziemniaka ze względu na jego duże możliwości ograniczania tempa szerzenia się alternariozy a jego działanie może się okazać szczególnie cenne, gdy rośliny są narażone na stresowe warunki pogodowe [Sawicka i Krochmal-Marczak, 2009a]. Do niekorzystnych efektów stosowania regulatorów wzrostu należy zaliczyć zwiększenie zawartości związków

fenolowych i spadek zawartości witaminy C [Vavrina, 1997; Mikos-Bielak i in., 1999a; Rudzińska-Mękal, 2000; Mikos-Bielak, 2005]. Aplikacja egzogennych regulatorów wzrostu Mival i Potejtin, stosowanych do opryskiwania sadzeniaków, poprawiają trwałość przechowalniczą, zmniejszają ubytki masy na transpirację i oddychanie, a także spowodowane zakażeniem bulw suchą zgnilizną [Sawicka, 1999d]

Korzystne aspekty oddziaływania nawozów dolistnych i regulatorów wzrostu pozwalają na łączne stosowanie niektórych bioregulatorów. Z badań Sawickiej i in. [2009] wynika, iż aplikowanie w okresie wegetacji bioregulatora Asahi SL, w formie roztworu wodnego w stężeniu 0,1%; bądź koncentratu nawozowego Insol 7 począwszy od kwitnienia, co 10-14 dni, stosując jednorazowo dawkę $1 \text{ dm}^{-3} \text{ ha}^{-1}$ ogranicza udział bulw porażonych, jak i stopień nasilenia szkód, wywoływanych przez parcha zwykłego. Zastosowane biostymulatory nie ograniczały zaś porażenia bulw rizoktoniozą. W aspekcie jakościowym łączne stosowanie preparatu Asahi SL i nawozu dolistnego Indol 7 wywarło istotny, dodatni wpływ na zawartość azotu w suchej masie bulw, zaś ujemny na stężenie wapnia w bulwach [Sawicka 1999a, 2016].

Podsumowanie

Stosowanie egzogennych regulatorów wzrostu i nawozów dolistnych zawierających makro- i mikropierwiastki w uprawie ziemniaka wywiera istotny wpływ na gospodarkę azotową roślin, aktywację i kontrolę wielu procesów życiowych. Mogą one być czynnikami pozwalającymi na zwiększenie wartości odżywczej ziemniaka i jego odporności na czynniki patogeniczne. Aplikacja ich w uprawie ziemniaka stanowi, zatem odpowiedź na rosnące potrzeby konsumentów.

Literatura

- Badowski P., Urbanek-Karłowska B., Solanina, chakonina, występowanie, właściwości, metody oznaczania. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 1999, 50 (1), 69-75.
- Bartová V., Bárta J., Diviš J., Švajner J., Peterka J., Crude protein content in tubers of starch processing potato cultivars in dependence on different agro-ecological conditions. Journal Central European Agriculture, 2009, 10 (1), 57-66.
- Bethke P.C., Jansky S.H., The effects of boiling and leaching on the content of potassium and Rother minerals in potatoes. Journal of Food Science 2008, 75 (5), 80-85.
- Bienia B., Sawicka B., Krochmal-Marczak B., Betlej I., Skiba D., Ziemniak jako źródło składników odżywczych [w:] Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna, J. Chrzanowska, H. Różański (red.), Krosno -Wrocław, 2015, 74-88.
- Bogucka B., Cwalina-Ambroziak B., Zięba T., The Effects of Varied Soil and Foliar Mineral Fertilization Levels in the Production of High-Starch Potatoes. Polish Journal of Natural Sciences, 2010, 25 (3), 215-228.
- Boligłowa E., Wpływ dolistnego dokarmiania na plon jego strukturę, zdrowotność i trwałość przechowalniczą bulw ziemniaka. Acta Agrophysica, 2003, 85, 99-106.

Chekurov V.V., Efektivnost' gibbellinnoj kisloty na razvitie i rasprastranienije patogenov. Zaščita Rast. Moskva, 1990, 2, 24-25.

Ciećko Z., Krajewski W., Wyszowski M., Żołnowski A., Działanie nawożenia fosforem na zawartość i jakość białka w bulwach ziemniaka. Prace Naukowe AE we Wrocławiu, 2004, 1017 (104), 99-110.

Czeczko R., Mikos-Bielak M., Efekty stosowania biostymulatora Asahi w uprawie różnych gatunków warzyw. Annales UMCS, 2004, 59 (3), 1073-1079.

Czeczko R., Mikos-Bielak M., Effect of applying the Atonik – Japanense growth stimulator in vegetables cultivation. Cost 915-Copernicus CIPA-CT 940120, Workshop on Food Quality Modelling, Leuven, 04-06.07, 1997, 39.

European Food Safety 2010. Authority website, News section. Available, www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902778363.htm.

Jabłoński K., Produkcyjne i jakościowe efekty dolistnego nawożenia ziemniaków Sonatą Z i Alkalinem PK 10 : 20. Annales UMCS, 2009, 64 (1), 59-67.

Jansen G., Flamme W., Shüler K., Vandrey M., Tuber and starch quality of wild and cultivated potato species and cultivars. Potato Research, 2001, 44, 137-146.

Kozera W., Barczak B., Wpływ dolistnego nawożenia mikroelementami roślin ziemniaka na skład frakcyjny białka bulw. Biuletyn IHAR, 2007, 243, 167-177.

Leszczyński W., Żywieniowa wartość ziemniaka i przetworów ziemniaczanych (Przegląd literatury). Biuletyn IHAR, 2012, 266, 5-12.

Lisińska G., Wartość technologiczna i jakość konsumpcyjna polskich odmian ziemniaka. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2006, 511, 81-94.

Love S.L., Pavek J.J., Positioning the potato as primary food source of vitamin C. American Journal of Potato Research, 2008, 85, 350-359.

Malonova H., Koupil S., Toxicity of biologically active preparations Atonik and Racine. Voj. Zdrov. Lis, 1997, 2, 12.

Matysiak K., Kaczmarek S., Kardasz P., Wpływ trineksapaku etylu na plon i parametry jakościowe korzeni buraka cukrowego. Nauka Przyroda Technologia, 2013, 7, 1, #3.

Mikos-Bielak M., Egzogenne regulatory wzrostu. Annales UMCS, E-60, 2005, 281-292.

Mikos-Bielak M., Sawicka B., Czeczko R., Rudzińska B., Syntetyczne regulatory wzrostu w uprawie ziemniaka. Cz. I. Wpływ Potejtinu na wybrane składniki chemiczne bulw kilkudziesięciu odmian ziemniaka. Annales UMCS-Polonia, EEE-7, 1999, 81-90.

Mikos-Bielak M., Sawicka B., Czeczko R., Rudzińska B. Syntetyczne regulatory wzrostu w uprawie ziemniaka. Cz. II. Wpływ Mivalu na wybrane składniki chemiczne bulw kilkudziesięciu odmian ziemniaka. Annales UMCS-Polonia, EEE-7, 1999, 91-99.

- Pobereźny J., Wszelaczyńska E., E., Effect of bioelements (N, K, Mg) and long-term storage of potato tubers on quantitative and qualitative losses. Part II. Content of dry matter and starch. *Journal of Elementology*, 2011, 16 (2), 237-246.
- Reddivari L., Hale A.L., Miller J.C., Genotype, location, and year influence antioxidant activity, carotenoid content, phenolic content, and composition in specialty potatoes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2007, 55, 8073–8079.
- Rudzińska-Mękal,. Modyfikacja składu chemicznego bulw ziemniaka przez syntetyczne regulatory wzrostu Mijal i Poteitin. Masz. pracy dokt. AR, Lublin, 2000.
- Sawicka B., Gospodarczy efekt stosowania regulatorów wzrostu w uprawie 37 odmian ziemniaka. *Pestycydy*, 1994a, 3, 1-12.
- Sawicka B., Zmienność pojawu i szerzenia się *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary w warunkach stosowania dwóch regulatorów wzrostu. *Pestycydy*, 1994b, 3, 13-22.
- Sawicka B., Jakość bulw w warunkach stosowania regulatorów wzrostu w uprawie ziemniaka. Praca zbiorowa. Wyd. SGGW, Warszawa, 1999a, 128-134.
- Sawicka B. Effects of growth regulators, Mival and Poteitin, application in potato cultivation. Part I. Influence of growth regulators on incidence of common scab (*Streptomyces* sp.). *Annals Agricultural Sciences, E - Plant Protection*, 1999b, 28 (1/2), 43-53.
- Sawicka B., Effects of growth regulators, Mival and Poteitin, application in potato cultivation. Part II. The influence of growth regulators on incidence of *Rhizoctonia solani* sclerotia bearing tubers. *Annals of Agricultural Sciences, E - Plant Protection*, 1999c, 28 (1/2), 55-65.
- Sawicka B., Effects of growth regulators, Mival and Poteitin, application in potato cultivation. Part III. The influence of growth regulators on storage losses of tubers. *Annals of Agricultural Sciences, E - Plant Protection*, 1999d, 28 (1/2), 67-80.
- Sawicka B., Wpływ dolistnego stosowania stymulatorów wzrostu na tempo szerzenia się *Phytophthora infestans* na roślinach ziemniaka. *Acta Agroph.* 2003, 85, 157-168.
- Sawicka B. 2016. Bioregulators influence on the content macroelements of potato tubers. [dane niepublikowane].
- Sawicka B., 1991. Studia nad zmiennością wybranych cech oraz degeneracją różnych odmian ziemniaka w rejonie białkopodlaskim, Rozpr. Habilit. 141, Wyd. AR Lublin, 87.
- Sawicka B., Kościelecka D., Pszczółkowski P., Wpływ regulatorów wzrostu Mival i Poteitin w uprawie ziemniaka. Cz. III. Wpływ regulatorów na ciemnienie miększu bulw surowych i gotowanych. *Biuletyn IHAR*, 2000, 214, 201-212.
- Sawicka B., Krochmal-Marczak B., Efekty łącznego stosowania nawozów dolistnych i bioregulatorów wzrostu w uprawie nowych odmian ziemniaka. *Annales UMCS, E-64(2)*, 2009a, 29-38.

- Sawicka B., Krochmal-Marczak B., Wpływ stosowania nawozu dolistnego Insol 7 i bioregulatora Asahi SL na zdrowotność bulw kilku odmian ziemniaka. *Annales UMCS, sectio E: Agricultura*, 2009b, LXIV(2), 29-38.
- Sawicka B., Mikos-Bielak M., The effect of Kvartazine application on potato crop and quality. *Proceedings of the International Conference, Plant Yield Process Control under Regulated Conditions. Sankt Petersburg, 07-11.09., 1996*, 44-46.
- Sawicka B., Skiba D. Wpływ dokarmiania dolistnego na zdrowotność roślin ziemniaka w okresie wegetacji. *Annales UMCS, E-64 (2)*, 2009c, 39-51.
- Stankiewicz Cz., Bombik A., Rymuza K., Starczewski J., Wpływ wybranych zabiegów agrotechnicznych na zawartość białka oraz aminokwasów egzogennych w bulwach ziemniaka odmiany Irga i Ekra w trakcie ich przechowywania, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2008, 530, 281-291.
- Stutte C.A. Clark T.H., Radiolabeled studies of Atonic in cotton HPLC. *Edd. University Arkansas, Department of Agronomy*, 1990, 171-174.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2012. www.ndb.nal.usda.gov
- Vavrina C. 1997. Atonic plant growth stimulator effect on bell pepper under drip irrigation in SW Florida. *Veget. Hortic., SVFREC Station Report*, 97, 3.
- Warchołowa M., Fizjologiczne podstawy dolistnego dokarmiania roślin. *Mat. Sem. Nauk. Dolistne dokarmianie roślin w świetle badań i doświadczeń praktyki rolniczej*. Wyd. IUNG, Puławy, 1998, 5-23.
- Wroniak J. 2006. Walory żywieniowe ziemniaka jadalnego. *Ziemniak Polski*, 2, 17-20.
- Zarzecka K., Gugala M., Mystkowska I., Zarzecka M., Chemical composition of edible potato tubers in retail outlets in east-central Poland. *Journal of Ecological Engineering*, 2015, 16 (1), 57-61.
- Żołnowski A.C. *Studia nad zmiennością plonowania i jakością ziemniaka jadalnego (Solanum tuberosum L.) w warunkach zróżnicowanego nawożenia mineralnego*. Wyd. UWM, Olsztyn, 191, 259, 2013.

GRAŻYNA NEUNERT¹, PIOTR WAŁEJKO², STANISŁAW WITKOWSKI²,
KRZYSZTOF POLEWSKI¹

¹*Katedra Fizyki i Biofizyki*

Wydział Nauk o Żywności i Żywnieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

neunert@up.poznan.pl

²*Instytut Chemii*

Wydział Biologiczno-Chemiczny

Uniwersytet w Białymstoku

WPLYW PARAMETRÓW FIZYCZNYCH ŚRODOWISKA NA PRZEBIEG PROCESU FOTODEGRADACJI ESTROWYCH POCHODNYCH ALFA-TOKOFEROLU

Streszczenie

Alfa-tokoferol jest znanym naturalnym przeciwutleniaczem o najwyższej aktywności biologicznej. Jednak niska rozpuszczalność w wodzie, mała trwałość oraz słaba bioprzyswajalność ograniczają jego praktyczne zastosowanie. Z tego powodu prowadzi się badania nad wytworzeniem pochodnych tokoferolu o zwiększonej stabilności i aktywności fizjologicznej. Szerokie perspektywy zastosowań pochodnych tokoferolu wymagają jednak między innymi szczegółowej oceny ich trwałości i odporności na czynniki zewnętrzne.

W pracy określono wpływ warunków środowiska na efektywność procesu fotodegradacji metodami spektroskopii fluorescencyjnej na podstawie pomiarów fluorescencji stacjonarnej (absorpcji i emisji) oraz czasów życia fluorescencji wybranych estrowych pochodnych tokoferolu w środowisku homogenicznym. Badane estry wykazują w widmie absorpcji dwa charakterystyczne pasma z maksimum przy 279nm oraz 286nm. W wyniku naświetlania promieniowaniem UVB zaobserwowano spadek natężenia tych pasm wraz z jednoczesnym wzrostem absorpcji w paśmie 240-260 nm oraz ok. 300 nm. Naświetlanie próbek długościami fal z zakresu UVB spowodowało przesunięcie maksimum pasma emisji fluorescencji w stronę długofalową wraz z wyraźnym wzrostem jego natężenia oraz obniżenie wartości czasów życia fluorescencji z kilku nanosekund do ok. 1.2 ns.

Na podstawie krzywych kinetyk procesu fotodegradacji określono fotostabilność badanych estrów. Wyznaczone wartości stałych szybkości procesu fotodysocjacji wskazują, iż najbardziej podatny na promieniowanie z zakresu UVB jest maleinian di- α -tokoferolu oraz, że proces ten przebiega szybciej w niższych temperaturach i w warunkach beztlenowych (atmosfera argonu).

Słowa kluczowe: absorpcja, czasy życia fluorescencji, estry alfa-tokoferolu, fluorescencja, fotodysocjacja.

Wprowadzenie

D- α -tokoferol jest jednym z czterech naturalnych homologów tokoferolu znanym jako naturalny przeciwutleniacz o najwyższej aktywności biologicznej. Pomimo pełnienia bardzo ważnych funkcji w żywych tkankach D- α -tokoferol ma ograniczone praktyczne

zastosowanie ze względu na bardzo niską rozpuszczalność w wodzie (<0.1 mg/ml) [Nielsen i in., 2001], słabą bioprzyswajalność oraz dużą czułość na światło i tlen atmosferyczny. Z literatury wiadomo, iż α -tokoferol pod wpływem światła ulega fotoredukcji do chinonu tokoferolu, tracąc tym samym swoje właściwości antyoksydacyjne [Kagan i in., 1992], co ogranicza jego praktyczne zastosowanie jako suplementu diety lub leku. Z tego powodu prowadzi się badania nad wytworzeniem pochodnych tokoferolu o zwiększonej stabilności i aktywności fizjologicznej, w których chemicznej modyfikacji podlega zazwyczaj grupa hydroksylowa w pierścieniu fenolowym tokoferolu [Kagan i in., 1992; Palozza i in., 2008; Wang i in., 2010]. Obecnie powszechnie stosowane są formy zestryfikowane tokoferolu: octan, fosforan czy ester kwasu bursztynowego, które powstają w wyniku modyfikacji pierścienia chromanolu w pozycji 6-O. Grupa hydroksylowa należy do najbardziej znaczących w całej cząsteczce tokoferolu, jest ona najbardziej reaktywna i odpowiada za antyoksydacyjne właściwości tej cząsteczki. Jej zablokowanie powoduje, że nie może powstać żadna z przejściowych form prowadzących do kolejnych etapów utleniania. Oznacza to również, że te pochodne w swojej natywnej postaci nie posiadają właściwości przeciwutleniających.

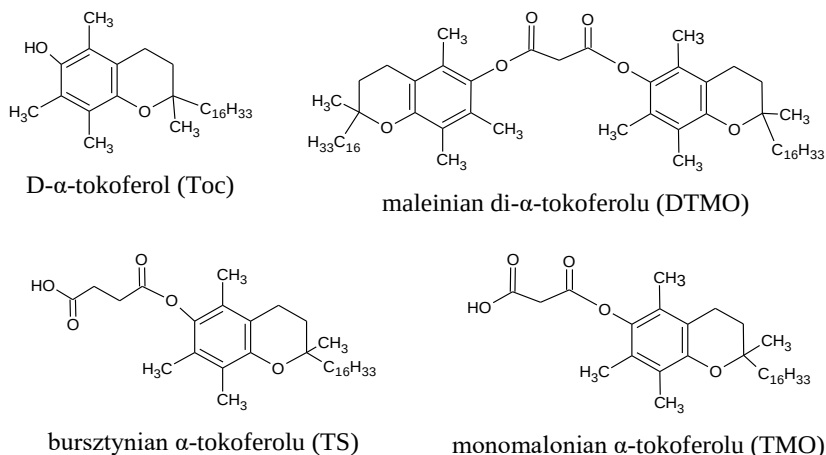
Estrowe pochodne tokoferolu charakteryzują się innymi właściwościami fizjologicznymi niż sam tokoferol, np. wywołują apoptozę komórek nowotworowych [Malafa i Neitzel, 2000; Quin i in., 2005], a ich aktywność biologiczna zależy od natury dołączonej do pierścienia fenolowego tokoferolu grupy estrowej [Birringer i in., 2003; Kogure i in., 2004]. Synteza pochodnych α -tokoferolu o zwiększonej amfifilowości, trwałości, lepszej przepuszczalności przez błony biologiczne a jednocześnie zachowanych – po estryfikacji – zdolnościach przeciwutleniających, zwiększa możliwości wykorzystania biologicznych właściwości witaminy E w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym czy też spożywczym. Tak szerokie perspektywy zastosowań nowych pochodnych tokoferolu wymagają jednak szczegółowej analizy wpływu tych cząstek na składniki błon komórkowych oraz ocenę ich trwałość i odporność na czynniki zewnętrzne, takie jak np. promieniowanie elektromagnetyczne, czy też tlen atmosferyczny. Podwyższona stabilność pochodnych tokoferolu jest bowiem jednym z podstawowych warunków ich dalszego praktycznego zastosowania.

Głównym celem pracy była analiza wpływu parametrów fizycznych środowiska na przebieg i szybkość procesu fotodegradacji wybranych estrowych pochodnych α -tokoferolu. Jednym z aspektów badań była również próba znalezienia korelacji pomiędzy strukturą chemiczną estrów a ich podatnością na fotodysocjację oraz przeprowadzenie porównania wpływu warunków środowiska na fotostabilność zsyntezowanych estrów i α -tokoferolu.

Material i metody

W badaniach zastosowano standard D- α -tokoferolu (Toc), firmy Albiochem (USA) oraz rozpuszczalniki organiczne (metanol, etanol, acetonitryl, n-oktanol, heksan) o czystości spektralnej firmy Sigma Aldrich (Niemcy). Badanymi estrami były: bursztynian α -tokoferolu (TS), monomalonian α -tokoferolu (TMO) i maleinian di- α -tokoferolu (DTMO) (rys.1), które zostały zsyntezowane na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku [Witkowski i in., 2000]. Badania polegały na pomiarach właściwości

spektroskopowych (absorpcji, emisji oraz czasów życia fluorescencji) estrów α -tokoferolu w układach homogenicznych, które poddane zostały działaniu promieniowania elektromagnetycznego z zakresu UVB ($\lambda = 280\text{nm}$). Analogiczne badania przeprowadzono także dla samego α -tokoferolu. Ocenę fotostabilności badanych estrów wykonano w różnych temperaturach i atmosferze ochronnej argonu.



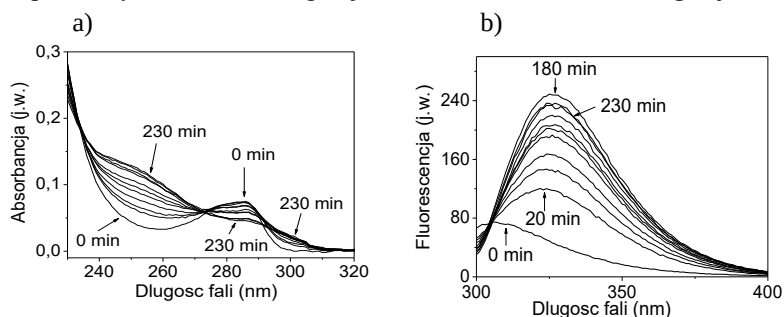
Rysunek 1. D- α -tokoferol i jego estrowe pochodne

Aktywność antyrodnikową próbek przed i po naświetlaniu sprawdzono wykorzystując metanolowy roztwór wolnych rodników DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) (Sigma Aldrich, Niemcy) o stężeniu $300\ \mu\text{M}$. Po zmieszaniu $1\ \text{mL}$ roztworu DPPH z $4\ \text{mL}$ roztworu badanego estru lub Toc po i przed naświetlaniem dokonano pomiaru absorbancji w paśmie $517\ \text{nm}$ zaraz po przygotowaniu mieszanin (A_0) oraz po 30 minutach przechowywania prób w ciemności w temperaturze pokojowej (A_{30}).

Źródłem promieniowania elektromagnetycznego do prowadzenia naświetlań w zakresie UV była 300W lampa ksenonowa sterowana zasilaczem. Pomiarów widm emisji fluorescencji dokonano za pomocą spektrofлуorymetru RF5001 PC firmy Shimadzu z układem termostatującym, przy długości fali wzbudzenia $280\ \text{nm}$. Dopomiarów widm absorpcji użyto spektrofotometru Top Sensor System firmy OceanOptics (Holandia). Czasy życia fluorescencji wyznaczono metodą algorytmu genetycznego z krzywych zaniku fluorescencji zarejestrowanych z wykorzystaniem czasowo-rozdzielczej metody zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC - Time-Correlated Single Photon Counting). Układ do pomiaru krzywych zaniku fluorescencji składał się z detektora PMA – 182-N-M (PicoQuant) połączonego z systemem zapisu danych z kartą pomiarową TimeHarp 200 (PicoQuant) oraz źródła impulsu wzbudzającego – impulsowej diody laserowej PLS 8-2-405 z zasilaczem PDL 800-D (PicoQuant) emitującej promieniowanie z maksimum przy $290\ \text{nm}$ o szerokości impulsu wzbudzającego $0,7\ \text{ns}$.

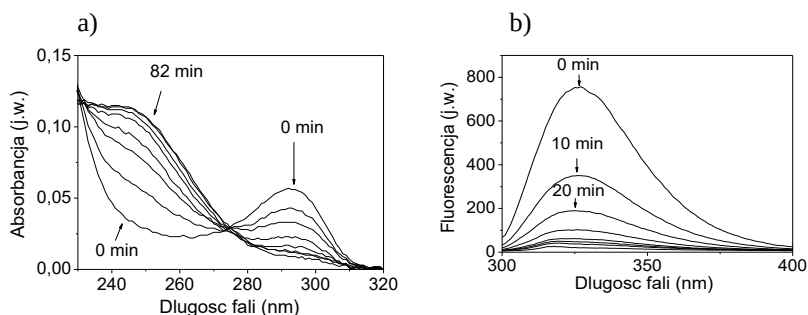
Wyniki i dyskusja

Na rys. 2a i 2b przedstawiono odpowiednio widma absorpcji i emisji TS rozpuszczonego w metanolu dla różnych czasów naświetlania próbki promieniowaniem o długości fali $\lambda = 280\text{ nm}$ w temperaturze pokojowej. Wraz ze wzrostem czasu naświetlania zaobserwowano spadek natężenia pasm charakterystycznych dla estru (z maksimum przy 279 nm oraz 286 nm) co wskazuje na jego fotodegradację. O podobnych zmianach w widmie absorpcji octanu tokoferolu poddanego promieniowaniu z zakresu UVC donosi [Tiburcio-Moreno i in., 2012]. W widmach absorpcji w zakresie 240-260 nm oraz ok. 300 nm z rys. 2a zauważyć można wzrost absorbancji progresywnie z czasem naświetlania. Naświetlanie próbek długościami fal z zakresu UVB powodowało przesunięcie maksimum pasma emisji fluorescencji w stronę długofalową do 325 nm wraz z wyraźnym wzrostem jego natężenia oraz obniżenie wartości czasów życia fluorescencji z kilku nanosekund do 1.2 ns. Po czasie naświetlania równym 180 min natężenie fluorescencji zaczęło nieznacznie maleć. Powyższe zależności zaobserwowano również w przypadku naświetlania pozostałych estrów, co sugeruje ten sam mechanizm badanego zjawiska.



Rysunek 2. a) Widma absorpcji i b) widma emisji TS w metanolu dla różnych czasów naświetlania próbki promieniowaniem o długości fali $\lambda = 280\text{ nm}$

Podobne pomiary zależności zmian natężenia maksimum absorbancji i fluorescencji od czasu naświetlania przeprowadzono dla samego Toc rozpuszczonego w metanolu. Wyniki przedstawiono na rys. 3a i 3b. W środowiskach homogenicznych maksimum pasma absorpcji charakterystycznego dla Toc przypada na około 295 nm a w widmie emisji fluorescencji obserwujemy pasmo z maksimum przy około 325 nm, co zgadza się z danymi literaturowymi [Neunert i in., 2010]. Czas życia fluorescencji Toc wynosił 1.3 ns. W wyniku działania promieniowania z zakresu UVB natężenia pasm absorpcji i emisji charakterystycznych dla Toc maleją, a w widmie absorpcji – podobnie jak dla badanych estrów – w zakresie 240-270 nm pojawia się nowe pasmo. Z literatury wiadomo, że pod wpływem promieniowania z zakresu UVB α -tokoferol ulega fotodysocjacji – przechodząc przez szereg form przejściowych – do chinonu tokoferolu [Kramer i Liebler, 1997; Pirisi i in., 1998], który posiada pasmo absorpcji z maksimum przy ok. 265 nm [Gruszka i in., 2008]. Dodatkowe pasmo zarejestrowane w widmie absorpcji Toc poddanego działaniu promieniowania z zakresu UVB wskazuje na taki właśnie przebieg procesu jego fotodegradacji.



Rysunek 3. a) Widma absorpcji i b) widma emisji Toc w metanolu dla różnych czasów naświetlania próbki promieniowaniem o długości fali $\lambda = 280$ nm

Zmiany w widmie absorpcji badanych estrów, przesunięcie maksimum pasma fluorescencji do 325 nm oraz obniżenie wartości czasów życia wyznaczonych z krzywych zaniku fluorescencji sugerują obecność w próbkach po naświetlaniu α -tokoferolu i chinonu tokoferolu. W celu potwierdzenia obecności α -tokoferolu zbadano przeciwutleniające właściwości próbek po i przed naświetlaniem, wykorzystując do tego celu metanолоwый roztwór DPPH. DPPH jest wolnym rodnikiem o stosunkowo dużej trwałości. Jego alkoholowe roztwory mają barwę purpurową z maksimum absorpcji przy długości fali ok. 517 nm. Po zmieszaniu z roztworem zawierającym przeciwutleniacze, w wyniku reakcji redukcji DPPH, następuje odbarwienie roztworu, co może być monitorowane poprzez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 517$ nm [Brand-Williams i in., 1995]. Obserwowana wartość absorbancji jest tym mniejsza im wyższa jest aktywność antyrodnikowa roztworu. Wyniki pomiarów uzyskane dla TS zamieszczono w tabeli 1 oraz dla porównania zamieszczono wartości absorbancji zmierzone dla samego Toc.

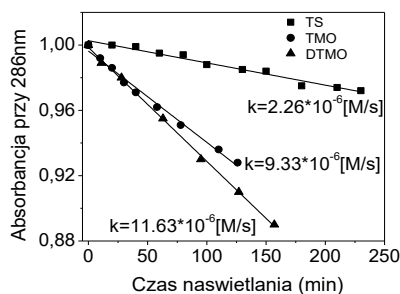
Tabela 1. Właściwości przeciwutleniające roztworu TS przed i po naświetlaniu (TS_{UVB}) oraz Toc oznaczone z wykorzystaniem DPPH. Błąd pomiaru obliczono jako odchylenie standardowe z trzech powtórzeń

Próba	A_0	A_{30}	% ± 1
Toc	0.700 ± 0.009	0.577 ± 0.007	18
TS - nienaświetlany	0.756 ± 0.006	0.758 ± 0.003	0
$TS_{UVB} - t=120$ min	0.694 ± 0.004	0.552 ± 0.005	20
$TS_{UVB} - t=180$ min	0.789 ± 0.009	0.663 ± 0.010	16

Z danych zawartych w tabeli jednoznacznie wynika, iż TS nie wykazuje aktywności antyrodnikowej. Dopiero po poddaniu próbki działaniu promieniowania z zakresu UVB zaczyna ona wykazywać właściwości przeciwutleniające, porównywalne z próbką zawierającą Toc. Zakładając, że zdolność do zmiatania wolnych rodników DPPH jest proporcjonalna do stężenia Toc w próbce, można założyć, że najwyższa koncentracja Toc występuje po 120 min naświetlania. Dalsze naświetlanie powoduje degradację Toc, na co wskazuje także spadek natężenia fluorescencji z maksimum przy 325 nm (rys. 2b), a tym samym obniżenie własności przeciwutleniających próbki.

Na podstawie przedstawionych wyników można zatem stwierdzić, że pod wpływem promieniowania o długości fali $\lambda = 280$ nm badane estry ulegają fotodegradacji do α -tokoferolu, który następnie sam ulega fotodysocjacji tworząc finalnie trwały chinon tokoferolu.

Fotostabilność badanych estrów określono na podstawie stałych szybkości procesu fotodysocjacji, wyznaczonych z krzywych kinetyk, przedstawionych na rys. 4. Krzywe kinetyki wykreślono na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji jako zależność natężenia pasma absorpcji z maksimum przy 286 nm od czasu naświetlania próbki. Największa wartość stałej k uzyskana dla DTMO, oznacza, że ulega on procesowi fotodysocjacji najszybciej z pośród badanych estrów. Częsteczka DTMO zbudowana jest z dwóch, połączonych mostkiem malonowym, części tokoferolowych. Taka struktura daje możliwość uzyskania po estryfikacji dwóch cząsteczek α -tokoferolu. Pod względem odporności na promieniowanie UVB jest jednak połączeniem najmniej korzystnym. Zastąpienie w budowie DTMO jednej z części tokoferolowej samą resztą kwasu malonowego, skutkuje zmniejszeniem szybkości procesu fotodegradacji otrzymanej w ten sposób monomalonowej pochodnej α -tokoferolu (TMO). Najmniejszą podatność na fotodysocjację wykazuje natomiast TS, posiadający dwie grupy metylenowe w części estrowej. Z literatury znana jest korelacja pomiędzy strukturą dołączonej grupy estrowej pochodnych α -tokoferolu a właściwościami fizykochemicznymi nowopowstałej cząsteczki [Birringer i in., 2003; Kogure i in., 2004; Palozza i in., 2008]. Uzyskane wyniki wskazują, że także szybkość procesu fotodysocjacji, której ulegają estry α -tokoferolu zależna jest od wielkości i rodzaju grupy estrowej dołączonej do pierścienia fenolowego α -tokoferolu.



Rysunek 4. Unormowane zależności natężenia pasma absorpcji badanych estrów z maksimum przy 286nm od czasu naświetlania próbki promieniowaniem o długości fali $\lambda = 280$ nm. Na rysunku podano wartości stałych szybkości procesu fotodysocjacji

W celu oceny wpływu warunków środowiska na proces fotodysocjacji badanych estrowych pochodnych α -tokoferolu, proces naświetlania promieniowaniem z zakresu UVB wykonano w różnych rozpuszczalnikach organicznych oraz w warunkach beztlenowych. Warunki beztlenowe uzyskano nasycając bezpośrednio otoczenie próbki gazem obojętnym – argonem. Fotodysocjację przeprowadzono także w kilku temperaturach w zakresie od 12°C do 40°C . Badania zrealizowano dla jednej z badanych pochodnych – bursztynianu, który odznaczał się największą fotostabilnością w metanolu w temperaturze pokojowej oraz dla porównania dla samego Toc.

W tabeli 2 zawarto wartości stałych szybkości procesu fotodysocjacji wyznaczone na podstawie widm absorpcji dla TS zarejestrowanych w różnych rozpuszczalnikach organicznych. Jak wskazują otrzymane wartości, proces fotodegradacji TS przebiega szybciej w rozpuszczalnikach aprotycznych w porównaniu z protycznymi. Z danych literaturowych wiadomo, że w zależności od rodzaju rozpuszczalnika proces oksydacji Toc może przebiegać w różny sposób, dając odmienne formy końcowe produktów jego degradacji [Suarnac i Southwell-Keely, 1968; Sumarno i in., 1987]. Zanotowane różnice stałych k mogą zatem wynikać z faktu, że w rozpuszczalnikach protycznych końcowym produktem fotoreakcji może być inna forma chinonu tokoferolu.

Tabela 2. Wartości stałych szybkości procesu fotodysocjacji dla TS w różnych rozpuszczalnikach

Rozpuszczalnik	k [M/s]* 10^{-6}
Metanol (protyczny, polarny)	2.26 ± 0.12
Etanol (protyczny, polarny)	1.73 ± 0.10
Heksan (aprotyczny, nie-polarny)	3.93 ± 0.15
n-Oktanol (protyczny, nie-polarny)	2.10 ± 0.13
Acetonitryl (aprotyczny, polarny)	4.66 ± 0.22

Błąd pomiaru obliczono jako odchylenie standardowe z trzech powtórzeń

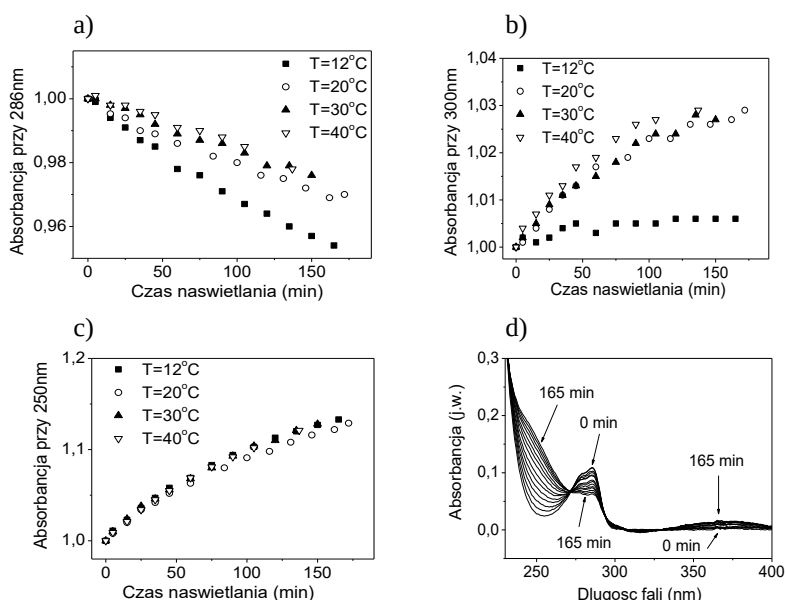
Wyznaczone stałe szybkości procesu fotodysocjacji Toc w powietrzu i w atmosferze argonu wynoszą odpowiednio: $3.83 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ oraz $2.62 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, co oznacza, że obecność tlenu przyspiesza proces fotodegradacji Toc. Z literatury wiadomo również, że na szybkość procesu rozpadu Toc istotny wpływ ma temperatura [Lange i Gierlach-Hładoń, 2015]. Przeprowadzając proces naświetlania Toc w zakresie $12 - 40^\circ\text{C}$ nie zanotowano jednak zmian wartości stałych szybkości fotodysocjacji. Świadczy to o tym, że w badanym zakresie czynnik temperaturowy nie ma znaczącego wpływu na przyspieszanie procesu fotodysocjacji Toc.

W przeciwieństwie do Toc, proces fotodegradacji TS bez dostępu tlenu przebiega szybciej niż w powietrzu, ze stałą szybkości k równą $3.70 \cdot 10^{-6} \text{ Ms}^{-1}$. Również szybciej TS ulega fotodegradacji w temperaturach niższych niż w temperaturach wyższych. Krzywe kinetyki procesu fotodysocjacji TS dla kilku temperatur przedstawiono na rys. 5a. Na rys. 5b i 5c umieszczono natomiast odpowiednio zależność natężenia pasma absorpcji przy 300 nm i przy 250 nm od czasu naświetlania zarejestrowane dla tych samych temperatur.

Szybszy proces rozpadu TS w niższych temperaturach skorelowany jest z wolniejszym wzrostem natężenia pasma przy 300 nm, które obrazuje powstawanie Toc. Jednocześnie wydajność tworzenia produktu finalnego, którego maksimum pasma absorpcji przypada w ok. 250 nm jest niemal jednakowa we wszystkich badanych temperaturach.

Takie zachowanie sugeruje, że mechanizm fotodegradacji TS przebiega inaczej w temperaturach niższych, prawdopodobnie ze względu na tworzenie dodatkowych produktów rozpadu samego estru. Na rys. 5d zamieszczono widma absorpcji TS poddanego promieniowaniu z zakresu UVB w temperaturze 12°C zarejestrowane w szerszym zakresie pomiarowym. Wyraźne widoczne jest dodatkowe pasmo w okolicach

350 – 400 nm, które nie występowało w widmach estrów poddanych naświetlaniu w wyższych temperaturach. Dokładna struktura powstających półproduktów nie jest jeszcze znana i wymaga dalszych badań.



Rysunek 5. a) Unormowane zależności natężenia pasma absorpcji TS z maksimum przy 286 nm od czasu naświetlania próbki dla różnych temperatur. b) Zależność natężenia pasma absorpcji przy 300 nm i c) przy 250 nm od czasu naświetlania dla tych temperatur. d) Widma absorpcji TS poddanego promieniowaniu z zakresu UVB w temperaturze 12°C

Wnioski

Przeprowadzono badania kinetyki procesu fotodysocjacji estrowych pochodnych α -tokoferolu w rozpuszczalnikach organicznych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że pojawienie się pasma absorpcji przy ok. 300 nm, zarejestrowane zmiany w widmie emisji oraz skrócenie czasu życia fluorescencji TS poddanego działaniu promieniowania z zakresu UVB wskazują na powstawanie w wyniku jego rozpadu α -tokoferolu. Pod względem podatności na fotodysocjację najbardziej trwałym okazał się TS, a najszybciej degradował DTMO.

Na proces fotodysocjacji pochodnych estrowych ma wpływ zarówno protyczność ośrodka, atmosfera ochronna, jak i temperatura. Wyznaczone wartości stałych szybkości procesu fotodysocjacji estrów wskazują, iż – w przeciwieństwie do samego Toc – proces ten przebiega szybciej w niższych temperaturach i w warunkach beztlenowych. Pojawienie się dodatkowego pasma w widmie absorpcji w niższych temperaturach dla TS sugeruje, że proces rozpadu estru przebiega w tych warunkach przez inne pośrednie półprodukty jego rozpadu.

Praca została sfinansowana przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu w ramach badań statutowych numer 508/782.00.

Literatura

- Birringer M., EyTina J.H., Salvatore B.A., Neuzil J., Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: structure-function relation. *British Journal of Cancer*, 2003, 88, 1948-1955.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1995, 28:25.
- Gruszka J., Pawlak A., Kruk J., Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers—determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008, 45, 920–928.
- Kagan V.E., Witt E., Goldman R., Scita G., Packer L., Ultraviolet Light-Induced Generation of Vitamin E Radicals and Their Recycling. a Possible Photosensitizing Effect of Vitamin E in Skin. *Free Radical Research Communications*, 1992, 16, 51–64.
- Kogure K., Hama S., Kisaki M., Takemasa H., Tokumura A., Suzuki I., Fukuzawa K., Structural characteristic of terminal dicarboxylic moiety required for apoptogenic activity of α -tocopheryl esters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1672, 93-99.
- Kramer K.A., Liebler D.C., UVB induced photooxidation of vitamin E. *Chemical Research in Toxicology*, 1997, 10, 219-224.
- Lange K., Gierlach-Hładoń T., Solid state characterization of α -tocopherol in inclusion complexes with cyclodextrins. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2015, 72, 21-30.
- Malafa M.P., Neitzel L.T., Vitamin E succinate promotes breast cancer tumor dormancy. *Journal of Surgical Research*, 2000, 93, 163–170.
- Neunert G., Polewski P., Markiewicz M., Walejko P., Witkowski S., Polewski K., Partition of tocopheryl- glucopyranoside into liposome membranes studied by fluorescence methods. *Biophysical Chemistry*, 2010, 146, 92-97.
- Nielsen P.B., Mullertz A., Norling T., Kristensen H.G., The effect of alpha-tocopherol on the in vitro solubilisation of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 222, 217-24.
- Palozza P., Simone R., Picci N., Buzzoni L., Ciliberti N., Natangelo A., Manfredini S., Vertuani S., Design, synthesis, and antioxidant potency of novel alpha-tocopherol analogues in isolated membranes and intact cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008, 44, 1452-1464.
- Pirisi F.M., Angioni A., Bandino G., Cabras P., Guillou C., Maccioni E., Reniero F., Photolysis of alpha-Tocopherol in Olive Oils and Model Systems. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1998, 46, 4529-4533.

Quin J., Engle D., Litwiller A., Peralta E., Grash A., Boley T., Hazelrigg S., Vitamin E succinate decreases lung cancer tumor growth in mice. *Journal of Surgical Research*, 2005, 127, 139–143.

Suarnac C., Southwell-Keely P.T., New oxidation products of α -tocopherol. *Lipids*, 1968, 23, 137-144.

Sumarno M., Atkinson E., Suarnac C., Southwell-Keely P.T., Solvent influence on model oxidations of alpha-tocopherol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, 920, 247-253.

Tiburcio-Moreno J.A., Marcelin-Jimenez G., Leanos-Castaneda O.L., Yanez-Limon J.M., Alvarado-Gil J.J., Study of photodegradation process of vitamin E acetate by optical absorption, fluorescence, and thermal lens spectroscopy. *International Journal of Thermophysics*, 2012, 33, 2062-2068.

Wang Y., Panagabko C., Atkinson J., Synthesis of alpha-tocohexaenol (alpha-T6) a fluorescent, oxidatively sensitive polyene analogue of alpha-tocopherol. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 2010, 18, 777–786.

Witkowski S., Maciejewska D., Wawer I.A., Solution and solid state conformations of chromanol esters, ^{13}C MAS NMR and d-NMR study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2000, 1471-1476.

PRZEMYSŁAW SIEJAK, KRZYSZTOF POLEWSKI

Katedra Fizyki i Biofizyki

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

siejak@up.poznan.pl

WPLYW SUPLEMENTÓW DIETY ZAWIERAJĄCYCH KOLOIDALNE NANOCZĄSTKI SREBRA NA WŁAŚCIWOŚCI WITAMINY E. BADANIA MODELOWE

Streszczenie

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań mających na celu określenie wpływu obecności koloidalnych nanocząstek srebra na właściwości tokoferolu, będącego podstawowym składnikiem witaminy E. Z uwagi na rosnącą popularność rozmaitych suplementów diety, w tym zawierających koloidalne nanocząstki srebra, jako element mogący modyfikować właściwości witaminy E, spożywanej jednocześnie z takimi preparatami, wybrano koloidalną zawiesinę nanocząstek srebra o powierzchniach hydrofobowych. Zarówno tokoferol, jak i wybrane nanocząstki srebra mają zdolność do wbudowywania się w błony lipidowe. Mając na uwadze powyższe, podjęto badania mające na celu określenie prawdopodobieństwa interakcji między nimi oraz ewentualnych konsekwencji wzajemnych oddziaływań w aspekcie zmian podstawowych właściwości witaminy E.

Właściwości tokoferolu oraz układów tokoferol-srebro badano w rozpuszczalnikach o różnych wartościach przenikalności elektrycznej i momentu dipolowego, tj. w heksanie i etanolu. Kinetykę fotodegradacji tokoferolu w tych układach, po ich naświetleniu promieniowaniem UVB (290 nm) oceniano w oparciu o metody spektroskopowe (spektrofotometrię, spektrofluorymetrię oraz rejestrację czasów zaniku fluorescencji tokoferolu). Stwierdzono, że obecność koloidalnych nanocząstek srebra, nie ma istotnego wpływu na właściwości tokoferolu w układach polarnych (w etanolu), natomiast w środowisku o niskiej przenikalności elektrycznej (heksanie), powoduje przyspieszenie fotodegradacji tokoferolu oraz powstawanie asocjatów wokół powierzchni metalicznych.

Słowa kluczowe: witaminy, tokoferol, suplementy diety, nanocząstki

Wprowadzenie

Witaminy i preparaty zawierające witaminy oraz inne mikroelementy, w tym suplementy diety są szeroko rozpowszechnione w codziennej diecie. Witaminy pełnią w organizmie szereg istotnych funkcji, wśród których można wyróżnić funkcje wspomagające przeciwdziałaniu i leczeniu wielu chorób, w tym nowotworowych [Azzi i Stocker, 2000; Thiele i Ekanayake-Mudiyanselage, 2007]. Działanie osłonowe i terapeutyczne polega na wiązaniu ("zmiataniu") wolnych rodników obecnych w organizmie, a tym samym na ich neutralizacji. Efektem tego mechanizmu jest utlenienie składników substancji przeciwutleniających, a tym samym utrata właściwości

antyoksydacyjnych [Zingg, 2007]. W celu ponownej aktywacji, konieczna jest neutralizacja utlenionego barwnika przez kolejny przeciwutleniacz (np. inne witaminy, głównie z grupy A i C) [Traber i Stevens, 2011]. Właściwości fizyczne i aktywność, w tym zdolność do wiązania rodników przez przeciwutleniacze zawarte w witaminach silnie zależą od warunków otoczenia, w szczególności obecności tlenu, a także ulegają zmianom w wyniku naświetlania [Cherng i in., 2005]. Efektywne działanie witamin zależy również od ich dystrybucji w organizmie i może być ograniczone ze względu na słabą rozpuszczalność tych składników w wodzie, roztworach wodnych i płynach ustrojowych, co wpływa na niewielki stopień ich przyswajania [Nielsen i in., 2001]. W celu zwiększenia stopnia przyswajania witamin i mikroelementów stosuje się rozmaite techniki mające na celu zarówno wzrost stopnia rozpuszczalności w wodzie, jak i zwiększenie ich bioaktywności [Lahmann i in., 1997; Satoh i in., 2001]. Nie bez znaczenia wydaje się być także wpływ innych czynników w tym parametrów mikrootoczenia barwników na ich poszczególne role pełnione w organizmie, już po wnikięciu w struktury biologiczne.

W przeciwieństwie do składników witamin oraz niektórych mikroelementów cząstki metaliczne o nanometrowych rozmiarach są dobrze przyswajalne przez organizm, przy czym czas ich retencji w organizmie jest stosunkowo krótki [Brown i in., 2010; Lee i in., 2014; Ye i in., 2014]. Znane są także właściwości antybakteryjne nanocząstek metalicznych, a coraz częściej twierdzi się, że nanocząstki takie, zwłaszcza złoto i srebro (a także nanodiamenty) mogą stanowić nowy materiał do medycznych zastosowań diagnostyki i terapii nowotworów w tym terapii celowanej [Khlebtsov i Dykman, 2010; Ganeshkumari in., 2014; Lee i in., 2014; Ye i in., 2014;]. W związku z powyższym materiały takie jak nanocząstki srebra i złota stały się obiektem szeroko rozpowszechnionych badań, głównie w celu poznania ich właściwości terapeutycznych lub wzmacniających funkcje ochronne pozostałych składników diety. Rosnącą popularnością cieszą się też paramedyczne preparaty, uznawane za suplementy diety, zawierające nanocząstki srebra i złota, a także różnego rodzaju preparaty zawierające ww. metale i ich mieszaniny. Ponadto, stale poszerzana jest oferta produktów, między innymi opakowań do żywności [Sadeghnehadi in., 2014], zawierających nanocząstki złota lub srebra, z uwagi na antybakteryjne i przeciwgrzybiczne właściwości tych nanocząstek. Mając na uwadze dostępność szerokiego asortymentu preparatów medycznych i paramedycznych zawierających między innymi nanocząstki srebra jako substancje czynne, w tym koloidalne zawiesiny tych nanocząstek, a także zdolność wnikania ich do struktur biologicznych oraz zależność efektywności wnikania od rozmiarów, kształtów i sposobu przygotowania ich powierzchni [Lee i in., 2014; Ye i in., 2014], wiele prac ukierunkowanych jest obecnie na określenie wpływu obecności nanocząstek metalicznych na wzrost odporności żywności i opakowań do żywności na działanie bakterii i grzybów [Sadeghnehadi in., 2014; Cheviron, 2016], a także na właściwości samych błon biologicznych [Park, 2005; Park, 2006; Bothun, 2008].

Dotychczas wykazano, że możliwe jest występowanie silnych wzajemnych oddziaływań powierzchni metalicznych z różnego rodzaju molekułami, prowadzące m.in. do zmian właściwości fotofizycznych [Siejak i Frąckowiak, 2005; Frąckowiak i in., 2006; Siejak i Frąckowiak, 2007a; Siejak i Frąckowiak, 2007b] oraz konformacyjnych różnorodnych molekuł, w tym o znaczeniu biologicznym [Frąckowiak i Siejak, 2006]. Ponadto, obecność nanocząstek metalicznych może wiązać się ze zmianami podstawowych

parametrów fizyko-chemicznych mikrootoczenia. W przeciwieństwie do składników witamin i niektórych mikroelementów, nanocząstki metaliczne mogą być zawieszone w niemal dowolnym rozpuszczalniku, również w roztworach i buforach wodnych, co wpływa na wysoki stopień ich przyswajania w organizmach żywych.

Mając na uwadze podobne funkcje pełnione w organizmie przez oba ww. elementy oraz ich powinowactwo do błon lipidowych, a także wysoki stopień przyswajania nanocząstek metalicznych w organizmie, zasadnym jest podjęcie próby określenia i wyjaśnienia zjawisk wynikających z ich wzajemnych oddziaływań występujących między witaminami i nanocząstkami. W obecnej pracy przedstawiono wyniki badań mających na celu określenie możliwości wystąpienia wzajemnych oddziaływań pomiędzy tokoferolem, będącym głównym składnikiem witaminy E a powierzchniami nanocząstek srebra o średnicach około 3-7 nm i powierzchniach przygotowanych hydrofobowo. Mając na uwadze fakt, iż oba elementy (tokoferol i hydrofobowo funkcjonalizowane nanocząstki metaliczne) mają tendencję do lokowania się wewnątrz dwuwarstwy lipidowej w błonach biologicznych, istnieje możliwość bliskiego kontaktu w takich układach pomiędzy tokoferolem a tymi nanocząstkami. Po zaabsorbowaniu energii promieniowania elektromagnetycznego dochodzić może do fotodegradacji tokoferolu [Gruszka i in., 2008] a także wystąpienia tzw. rezonansu plazmonów powierzchniowych, będących w istocie kolektywnymi drganiami elektronów swobodnych na powierzchni nanocząstek metalicznych [Frąckowiak i Siejak, 2006]. Oscylacje pola elektrycznego w mikrootoczeniu tokoferolu mogą prowadzić do zmian właściwości fotofizycznych tokoferolu, a także do modyfikacji kinetyki jego fotodegradacji. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań modelowych ww. zagadnienia, w izotropowych roztworach i zawiesinach tokoferolu i tokoferolu z nanocząstkami srebra w rozpuszczalnikach hydrofobowych o zróżnicowanych wartościach przenikalności elektrycznej, a tym samym różnych reakcjach mikrootoczenia na rezonans plazmonów na powierzchni metalicznej.

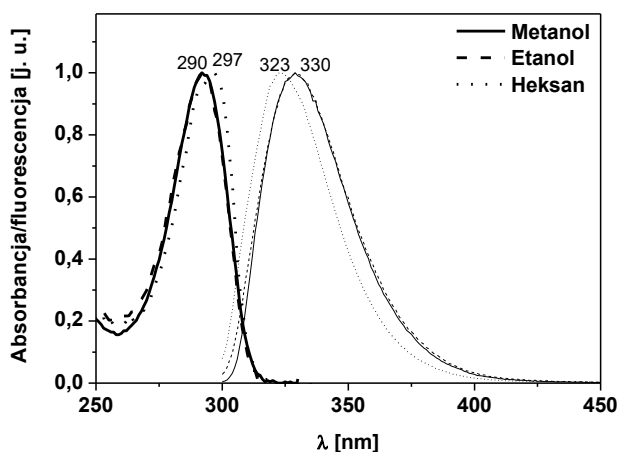
Material i metody

W celu określenia wpływu obecności nanocząstek metalicznych, na podstawowe właściwości witaminy E, do badań wybrano DL- α -tokoferol (Merck), jako główny składnik witaminy E oraz koloidalny roztwór nanocząstek srebra funkcjonalizowanych dekanetiolem o rozmiarach 3-7 nm w heksanie (Fluka). Koncentracja nanocząstek zawieszonych w dostarczonym koloidzie wynosiła 0,1% w/V, tj. 1mg/ml. Tokoferol rozpuszczono w czystych rozpuszczalnikach – alkoholu etylowym 99,8 % (POCH) oraz heksanie (Sigma-Aldrich), otrzymując roztwory o stężeniu 25 μ M (0,011 mg/ml). W celu wprowadzenia nanocząstek do roztworów tokoferolu, wstrzyknięto odmierzoną objętość wyjściowego koloidu do tych roztworów, w taki sposób, aby uzyskać końcową masę srebra w układzie 0,001 mg/ml (stosunek wagowy tokoferolu do srebra wynosił 10:1). Zgodnie z informacjami handlowymi, już niewielka ilość nanocząstek srebra lub złota wywołuje bowiem istotne (pozytywne) skutki biologiczne i medyczne. W celu określenia podstawowych właściwości spektralnych badanych układów, zarejestrowano widma ich absorpcji (przy użyciu spektrofotometru Shimadzu UV-VIS 1201), fluorescencji (przy użyciu spektrofluorymetru Shimadzu RF 5001 PC) oraz określono czasy zaniku emisji

fluorescencji tokoferolu (przy użyciu układu składającego się z pulsacyjnej diody laserowej i układu detekcji fluorescencji PicoQuantTime Harp100). Badania te wykonywano systematycznie, po poddaniu ww. układów promieniowaniu UVB (290 nm). Źródłem promieniowania padającego na te układy i wywołującego fotodegradację była lampa ksenowowa o mocy 150 W, a czas naświetlania zmieniał się w zakresie od 0 do 150 minut (dla układów w heksanie) oraz od 0 do 420 minut (dla układów w alkoholu etylowym). Długość czasu naświetlania i interwały czasowe, w których dokonywano rejestracji widm absorpcji, fluorescencji a także dodatkowych pomiarów mających na celu określenie czasów zaniku emisji promienistej dobrano w taki sposób, aby zaobserwować zmiany kinetyki fotodegradacji witaminy wynikające z obecności nanocząstek metalicznych.

Wyniki i dyskusja

Fotodegradacja tokoferolu wiąże się ze zmianami zarówno w widmie absorpcji jak i fluorescencji tego barwnika. Unormowane widma absorpcji i emisji tokoferolu w alkoholu metylowym, etylowym oraz heksanie, bezpośrednio po rozpuszczeniu tokoferolu w ww. rozpuszczalnikach zostały zaprezentowane na rysunku 1.

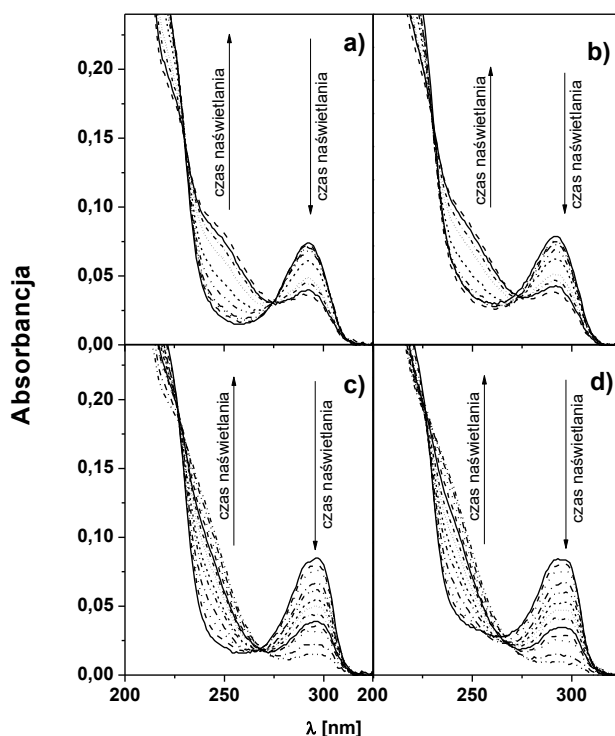


Rysunek 1. Unormowane widma absorpcji i fluorescencji tokoferolu rozpuszczonego w wybranych rozpuszczalnikach organicznych o różnych parametrach elektrycznych

Widma, zarówno absorpcji jak i fluorescencji tokoferolu rozpuszczonego w heksanie (rozpuszczalniku niepolarnym) w istotny sposób różnią się od widm tego komponentu rozpuszczonego w alkoholu metylowym i etylowym. W widmie absorpcji wyróżnić można dwa pasma z maksimami przy długościach fal 290 nm i 297 nm, natomiast pasmo emisji fluorescencji przesunięte jest w kierunku fal krótszych, niż ma to miejsce dla rozpuszczalników polarnych. Oznacza to, że charakter wewnątrz molekularnych przejść elektronowych pomiędzy stanem podstawowym a stanami wzbudzonymi tokoferolu, w wyniku pochłonięcia promieniowania UV silnie zależy od polarności ośrodka.

Mając na uwadze odmienne właściwości spektralne tokoferolu w zależności od polarności rozpuszczalnika, można spodziewać się również innych rezultatów

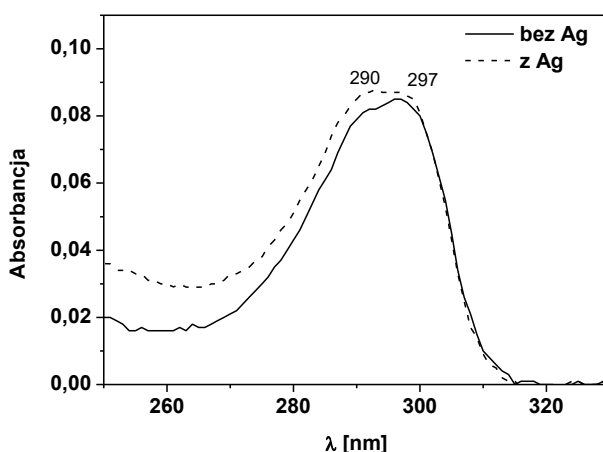
oddziaływań tokoferolu z plazmonami powierzchniowymi indukowanymi na powierzchni nanocząstek metalicznych, po poddaniu tych układów działaniu pola elektromagnetycznego. Na rysunku 2 przedstawiono widma absorpcji tokoferolu rozpuszczonego w alkoholu etylowym (a) oraz heksanie (b) i zmiany tych widm w wyniku naświetlania światłem o długości fali 290 nm, tj. promieniowaniem UV docierającym do powierzchni ziemi.



Rysunek 2. Widma absorpcji tokoferolu w alkoholu etylowym (a, b) oraz heksanie (c i d) bez (a, c) i w obecności nanocząstek metalicznych (b, d) i ich zmiany w wyniku naświetlania promieniowaniem UVB (290 nm)

Jak wynika z widm przedstawionych na rysunku 2, naświetlanie każdego z układów, niezależnie od obecności nanocząstek metalicznych, prowadzi do degradacji tokoferolu, objawiającej się jako spadek wartości absorbancji maksimum pasma charakterystycznego dla tokoferolu. Jednocześnie obserwuje się wzrost absorbancji przy długości fali 250 nm, charakterystycznej dla chinonu tokoferolu. Ponadto, obecność dwóch punktów izozbestycznych sugeruje, iż w każdym z analizowanych przypadków, przejście pomiędzy tokoferolem a jego chinonem następuje bez udziału form pośrednich. Kinetyki fotodegradacji tokoferolu w każdym z dyskutowanych układów zostały przedyskutowane w dalszej części niniejszej pracy. Analiza widm absorpcji przedstawionych na rysunku 2 prowadzi do wniosku, iż wprowadzenie nanocząstek srebra do roztworu tokoferolu w rozpuszczalniku niepolarnym, prowadzi do zmian wewnątrz molekularnej struktury elektronowej tokoferolu. Wspomniane powyżej zmiany widma absorpcji wynikające z obecności nanocząstek metalicznych zostały szczegółowo przedstawione

na rysunku 3. Jak już zostało zaznaczone, widmo absorpcji tokoferolu w niepolarnym rozpuszczalniku organicznym charakteryzuje się dwoma nakładającymi się pasmami z maksimami przy długościach fal 290 nm i 297 nm, przy czym pasmo 290 nm charakteryzuje się wyraźnie niższą wartością absorbancji. Długotrwałe naświetlanie tokoferolu promieniowaniem UVB nie powoduje zmiany stosunku natężenia obu pasm. Wprowadzenie nanocząstek metalicznych do układu nienaświetlonego powoduje zmianę stosunku natężeń obu pasm, bez zmiany ich położenia. Dominującym staje się pasmo z maksimum przy długości fali 290 nm, charakterystyczne dla tokoferolu umieszczonego w środowisku polarnym. Na tej podstawie można wnioskować, iż obecność powierzchni metalicznych, a tym samym plazmonów powierzchniowych prowadzi do zmiany właściwości elektrycznych mikrootoczenia, i lokalnego wzrostu wartości przenikalności elektrycznej środowiska w bezpośrednim sąsiedztwie powierzchni metalicznych.



Rysunek 3. Widma absorpcji tokoferolu w heksanie w nieobecności koloidalnych nanocząstek metalicznych (linia ciągła) i po ich wprowadzeniu do roztworu (linia przerywana)

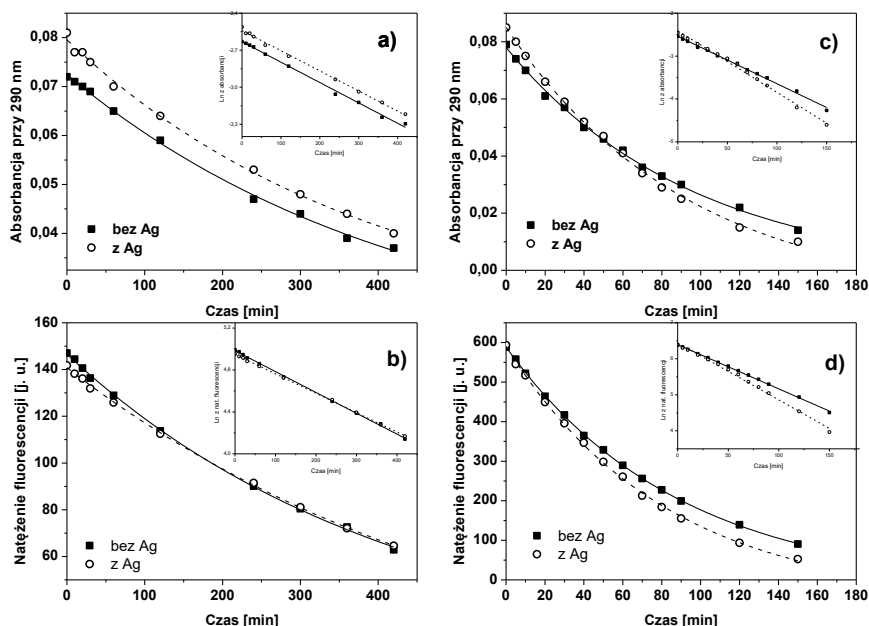
Położenie i szerokość połówkowa pasm w widmach emisji fluorescencji badanych układów nie ulegały zmianie w stosunku do przedstawionych na rysunku 1, niezależnie od czasu naświetlania badanych układów oraz obecności lub braku obecności nanocząstek metalicznych w układach. Jedyne obserwowane zmiany dotyczyły natężenia emisji. Wraz ze wzrastającym czasem naświetlania badanych układów, maleje w nich stężenie molekuł aktywnego tokoferolu, a tym samym ilość fluoroforów. Prowadzi to do systematycznego obniżania natężenia emisji. Zjawisko to obserwuje się w każdym z badanych układów. Wobec braku zmian położenia pasma emisji oraz jego szerokości połówkowej, w celu określenia wpływu obecności nanocząstek metalicznych, na właściwości spektralnetokoferolu, przeanalizowano kinetyki zmian wielkości absorbancji tokoferolu zawartego w badanych układach (przy długości fali 290 nm) oraz natężenia emisji tokoferolu w maksimum pasma fluorescencji. Wyniki przeprowadzanych analiz przedstawiono

na rysunku 4. Punkty eksperymentalne zostały przybliżone funkcjami jednowykładniczymi. Uzyskane współczynniki korelacji kształtowały się na poziomie wyższym niż 0,99, co świadczy o poprawności przyjętej metody. Dodatkowo, wykreślono zależności półlogarytmiczne i przybliżono uzyskane wyniki liniami prostymi, uzyskując równie wysokie wartości współczynników korelacji. Wykresy półlogarytmiczne (oś rzędnych zawiera wartości logarytmów naturalnych odpowiednio z wartości absorbancji lub natężenia emisji fluorescencji) zostały zaprezentowane jako insetsy wykresów głównych. Współczynniki nachylenia wyznaczonych prostych zostały zaprezentowane w tabeli 1.

Tabela 1. Współczynniki nachylenia wykresów półlogarytmicznych zależności absorbancji i natężenia emisji tokoferolu w badanych układach

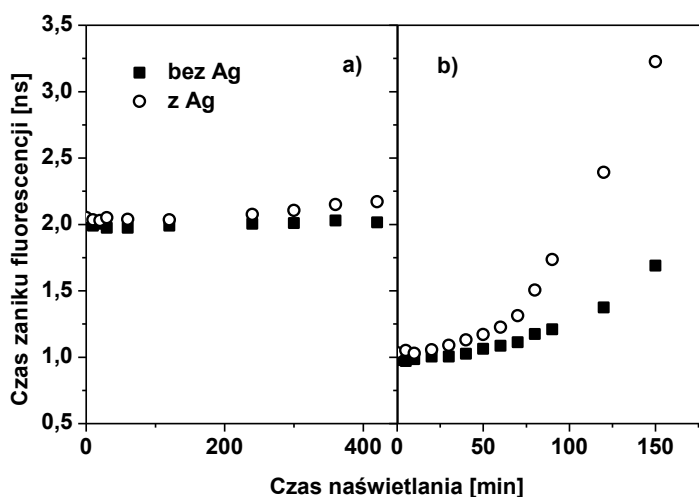
Rozpuszczalnik	Etanol		Heksan	
Zawartość Ag	Bez Ag	Z Ag	Bez Ag	Z Ag
Absorpcja	-0,00165	-0,00163	-0,0110	-0,0143
Fluorescencja	-0,00199	-0,00185	-0,0123	-0,0158

Jak wynika z tabeli 1 oraz rysunku 4, wpływ obecności nanocząstek srebra na kinetykę fotodegradacji tokoferolu w środowiskach polarnych jest niemal niezauważalny, podczas gdy w przypadku środowisk niepolarnych, wprowadzenie nanocząstek koloidalnych prowadzi do wyraźnego wzrostu kinetyki fotodegradacji tokoferolu.



Rysunek 4. Wartości absorbancji (a, c) i natężenia fluorescencji w maksimum pasma (b, d) tokoferolu w alkoholu etylowym (a, b) i heksanie (c, d) w nieobecności (linie ciągłe) i obecności (linie przerywane) nanocząstek srebra, w funkcji czasu. W insetach przedstawiono odpowiadające im wykresy półlogarytmiczne

Badania zostały uzupełnione poprzez oszacowanie czasów zaniku fluorescencji tokoferolu w badanych układach, ze szczególnym uwzględnieniem obecności nanocząstek metalicznych. Wyniki przeprowadzonych pomiarów i analiz przedstawiono w postaci wykresów prezentujących czas połowicznego zaniku fluorescencji w funkcji czasów naświetlania badanych układów na rysunku 5.



Rysunek 5. Zmiany czasu zaniku fluorescencji tokoferolu w badanych układach: a) – w alkoholu etylowym, b)- w heksanie

Podobnie, jak ma to miejsce w przypadku pozostałych analizowanych parametrów spektralnych, również czasy zaniku emisji tokoferolu różnią się w zależności od rozpuszczalnika. Różny jest też wpływ obecności nanocząstek metalicznych na zmiany tego czasu. Czas zaniku fluorescencji tokoferolu w rozpuszczalniku polarnym jest względnie stały, niezmienny, niezależnie od ilości pochłoniętego promieniowania UVB i wynosi około 2 ns, a obecność nanocząstek metalicznych wywiera niewielki wpływ na tą wartość. Zaobserwowano jedynie niewielki wzrost czasu zaniku emisji tokoferolu po wprowadzeniu metalu do układu. Wzrost ten wynosił około 0,2 ns i dotyczył głównie długich czasów naświetlania (ponad 200 minut). W przypadku środowiska niepolarnego, czasy zaniku emisji tokoferolu silnie zależą od ilości energii pochłoniętej i zmieniają się w zakresie od około 1 ns w przypadku braku naświetlania do około 1,7 ns już po około 150 minutach naświetlania. Obecność nanocząstek metalicznych prowadzi do wzrostu wielkości obserwowanych zmian i wzrostu czasu zaniku emisji tokoferolu do ponad 3 ns, po około 150 minutach naświetlania. Na tej podstawie można stwierdzić, że obecność nanocząstek metalicznych i związanych z nimi lokalnych zmian parametrów elektrycznych mikrootoczenia może prowadzić do powstawania agregatów tokoferolu, co wiąże się z wygaszaniem fluorescencji. W takim przypadku, tokoferol pozostanie przez dłuższy czas nieaktywny, a zatem ograniczone będą jego zdolności antyoksydacyjne.

Wnioski

Właściwości spektralne tokoferolu silnie zależą od właściwości elektrycznych środowiska otaczającego ten fluorofor, a obecność nanocząstek metalicznych i związanych z nimi plazmonów powierzchniowych może w istotny sposób zmieniać te właściwości w bezpośrednim sąsiedztwie nanocząstek. W konsekwencji wewnątrz molekularna struktura elektronowa tych z molekuł tokoferolu, które znajdują się w obszarze objętym lokalnymi zmianami polarności otoczenia może ulegać modyfikacjom. Jednocześnie, niezależnie od powyższego obecność nanocząstek srebra prowadzi do wzrostu szybkości fotodegradacji tokoferolu znajdującego się w środowisku niepolarnym i może prowadzić do tworzenia się jego agregatów. W konsekwencji, najprawdopodobniej właściwości antyoksydacyjne witaminy E, w przypadku jej połączenia z suplementami diety zawierającymi nanocząstki metaliczne mogą zostać ograniczone. Jednakże środowisko polarne, zapobiega wystąpieniu takiego efektu. W przypadku układów tokoferolu z nanocząstkami srebra w rozpuszczalniku o wyższej wartości przenikalności elektrycznej (alkoholu etylowym), nie obserwuje się istotnych zmian żadnego z analizowanych parametrów spektralnych tokoferolu. Można zatem stwierdzić, iż w takim przypadku nie będzie dochodzić ani do wzmocnienia ani do osłabienia właściwości osłonowych witaminy E, w przypadku jej jednoczesnego spożywania z suplementami diety zawierającymi nanocząstki srebra.

Praca została sfinansowana ze środków Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, projekt badawczy nr 507.782.57

Literatura

- Azzi A., Stocker A., Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*, 2000, 39, 231-255.
- Bothun G.D., Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: Size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties. *Journal of nanobiotechnology*, 2008, 6, art. nr 13.
- Brown S.D.,Nativo P., Smith J-A., Stirling D., Edwards P.R., Venugopal B., Flint D.J. Plumb J.A., Graham D., Wheate N.J., Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *Journal of American Chemical Society*, 2010, 132, 4678-4684.
- Cherng S.-H., Xia Q., Blankeship L.R., Freeman J.P., Wamer W.G., Howard P.C., Fu P.P., Photodecomposition of Retinyl Palmitate in Ethanol by UVA Light Formation of Photodecomposition Products, Reactive Oxygen Species, and Lipid Peroxides. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, 18 (2), 129-138.
- Chevion P., Preparation, characterization and barrier properties of silver/montmorillonite/starch nanocomposite films. *Journal of Membrane Science*, 2016, 497, 162-171.
- Frąckowiak D. Balter A., Karolczak J, Siejak P., The influence of silver colloidon fluorescein spectral properties. *ActaPhysicaPolonica*, 2006, 110 (4), 451-458.

- Frąckowiak D., Siejak P., Biofizyczne zastosowania plazmonów powierzchniowych. *Postępy Fizyki*, 2006, 57 (2), 58-65.
- Ganeshkumar M., Ponrasu T., Raja M.D., Subamekala M.K., Suguna L., Green synthesis of pullulan stabilized gold nanoparticles for cancer targeted drug delivery. *SpectrochimicaActa A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 130, 64-71.
- Khlebtsov N.G., Dykman L.A., Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 2010, 111, 1-35.
- Lahmann M., Thiem J., Synthesis of α -tocopheryl oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 1997, 299, 23-31.
- Lee J., Chatterjee D.K., Lee M.H., Krishnan S., Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer Letters*, 2014, 347 (1), 46-53.
- Nielsen P.B., Muellertz A., Norling T., Kristensen H.G., The effect of α -tocopherol on the in vitro solubilisation of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 222 (2), 217-224.
- Park S-H., 2006, Effects of silver nanoparticles on the fluidity of bilayer in phospholipid liposome. *Colloids and surfaces. B: Biointerfaces*, 2005, 44, 117-122.
- Park S-H., Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 2006, 48, 112-118.
- Sadeghnehad A., Aroujalian A., Raisi A., Fazel S., Antibacterial nano silver coating on the surface of polyethylene films using corona discharge. *Surface Coatings Technology*, 2014, 245, 1-8.
- Satoh T., Miyataka H., Yamamoto K., Hirano T., Synthesis and Physiological Activity of Novel Tocopheryl Glycosides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 49 (8), 948-953.
- Siejak P., Frąckowiak D., Spectral Properties of Fluorescein Molecules in Water with the Addition of a Colloidal Suspension of Silver. *Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109, 14382-14386.
- Siejak P., Frąckowiak D., Influence of silver colloid presence on stilbazoliummerocyanine emission. *Plasmonics*, 2007a, 2, 39-45.
- Siejak P., Frąckowiak D., Interactions between colloidal silver and photosynthetic pigments located in cyanobacteria fragments and in the solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2007b, 88, 126-130.
- Thiele J.J., Ekanayake-Mudiyanselage S., Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Molecular Aspects of Medicine*, 2007, 28, 646-667.
- Traber M.G., Stevens J.F., Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 51, 1000-1013.

Ye X., Shi H., Wang K, Li D., Qiu P., Gold nanorod-seeded synthesis of Au@Ag/Au nanospheres with broad and intense near-infrared absorption for photothermal cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 23, 3667-3673.

Zingg J.-M., Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*, 2007, 28, 400-422.

MAREK KRUCZEK, DOROTA GUMUŁ, ANNA ARECZUK

Wydział Technologii Żywności

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie

marekkruczek@gmail.com

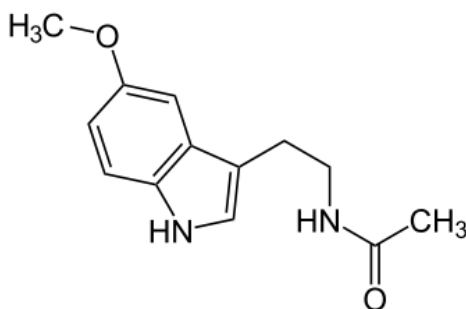
MELATONINA ROŚLINNA JAKO MAŁO ZNANY PRZECIWUTLENIACZ I REGULATOR ZEGARA BIOLOGICZNEGO – CHARAKTERYSTYKA I MOŻLIWOŚCI APLIKACJI W PRZEMYŚLE SPOŻYWCZYM

Wprowadzenie

Melatonina jest hormonem szeroko rozprzestrzenionym w świecie roślin i zwierząt. U kręgowców syntetyzowana jest głównie w ośrodkowym układzie nerwowym – wszyszyne. Podstawowym regulatorem wydzielania tego hormonu u kręgowców jest rytm światło/ciemność. W ostatnich latach coraz częściej pojawiają się informacje na temat jej występowania w roślinach. Melatoninę zalicza się do jednych z najsilniejszych przeciwutleniaczy świata ożywionego. Występuje we względnie dużej ilości w ziarniakach jęczmienia, owsa, winogronach, winie a także wielu ziołach i roślinach leczniczych. Przemysł spożywczy rocznie produkuje bardzo duże ilości odpadów poprodukcyjnych, których potencjał niejednokrotnie jest niedoceniany. Dlatego też wzbogacanie żywności surowcami bogatymi w melatoninę, w tym wytlókami, może znacząco podwyższyć wartość zdrowotną otrzymanych produktów.

Występowanie melatoniny

Melatoninę po raz pierwszy wyizolowano z szyszynki bydłcej niespełna 70 lat temu [Lerner i in., 1958]. Przez większość czasu od jej odkrycia uważano, iż występuje ona jedynie u kręgowców, jednak w kolejnych dekadach okazało się, że jest ona szeroko rozpowszechniona również w świecie roślin [Manchester i in., 1995; Van Tassel i in., 2001]. Melatonina występuje zarówno u kręgowców, bezkręgowców, roślin, pierwotniaków, grzybów, jak i bakterii. Występowanie melatoniny w tak wielu grupach organizmów żywych świadczy, iż jest ona bardzo starą ewolucyjnie związką, a jej struktura od milionów lat nie zmieniła się (Rys. 1).



Rysunek 1. Wzór strukturalny melatoniny

U kręgowców melatonina syntetyzowana jest głównie w szyszynce, regulując między innymi okołodobowy rytm biologiczny [Maksimovich, 2002] oraz działając jako zamiatacz wolnych rodników [Zatta i in., 2003; Hardeland, 2005]. Jej produkcja w organizmach kręgowców zwiększa się wraz z nastaniem nocy, by osiągnąć szczyt między godziną 24 a 3. U człowieka największe ilości melatoniny obserwuje się między 4 a 10 rokiem życia, a od 35 roku życia jej poziom stopniowo się zmniejsza [Reiter i in., 2002; Lahiri i in., 2004]. Niedobory melatoniny często występują u osób starszych, w związku z czym osoby te uskarżają się na problemy z jakością oraz długością snu oraz borykają się z licznymi chorobami przewlekłymi i stanami zapalnymi. Melatonina nie jest magazynowana w organizmie człowieka, tylko bezpośrednio uwalniana do krwioobiegu, gdzie jej okres półtrwania wynosi 40 minut [Reiter, 2003]. Maksymalna zawartość melatoniny w osoczu mierzona w szczytowym momencie jej produkcji u osób młodych wynosi od ~95 do ~200 pg/ml, a u osób starszych ~38 pg/ml [Zhdanova, 1998; Bonnefont-Rousselot i Collin, 2010].

Funkcje prozdrowotne melatoniny

Melatonina przyjmowana doustnie posiada zdolność przenikania bariery krew–mózg i bariery łożyskowej. Zastosowanie terapeutyczne melatoniny związane jest głównie z jej właściwościami antyoksydacyjnymi, ale nie tylko. Związek ten w postaci syntetycznej podawany jest jako suplement diety osobom starszym w celu ułatwienia zasypiania, podczas pracy zmianowej, czy w międzykontynentalnych podróżach lotniczych (jet-lag). Antyoksydacyjne właściwości melatoniny wykorzystywane są w leczeniu osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (10mg/dzień) [Forrest i in., 2007], nadciśnienie tętnicze (pacjenci w podeszłym wieku; 5mg/dzień) [Kedziora-Kornatowska i in., 2008], cukrzycę typu 2 (pacjenci w podeszłym wieku; 5mg/dzień) [Kedziora-Kornatowska i in., 2009], kobiet chorych na bezpłodność (3mg/dzień) [Tamura i in., 2008]. Udowodniono również funkcję leczniczą melatoniny w terapiach nowotworowych. Podawana egzogennie melatonina hamowała u zwierząt wzrost i rozwój raka sutka, czerniaka, włókniakomięsaka, gruczolaka oraz białaczki [Lenoir i in. 2005]. Natomiast w przypadku raka gruczołu krokowego, trzonu macicy i odbytnicy stwierdzono obniżenie stężenia melatoniny. Oddziaływanie melatoniny na nowotwór polega po pierwsze na dezaktywacji reaktywnych form tlenu i azotu doprowadzających do mutacji DNA oraz aktywacji enzymów antyoksydacyjnych [Anisimov i in. 2006; Reiter i in., 2009], a po drugie na hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych [Rao i in. 2000]. W badaniach na szczurach szczepu Wistar, stwierdzono również ochronne właściwości melatoniny na komórki nerwowe. Po usunięciu szyszynki (głównego producenta melatoniny) u szczurów stwierdzono znaczne zwiększenie śmierci komórek nerwowych. Zjawisko to towarzyszy wielu chorobom neurodegeneracyjnym, takim jak: Alzheimer, Parkinson, stwardnienie zanikowe boczne czy płasawica Huntingtona [Wang, 2009].

Melatonina w świecie roślin

W ostatnich latach coraz liczniej pojawiają się informacje na temat występowania melatoniny w roślinach, a co za tym idzie w produktach ich pochodzenia (Tab. 1). Melatonina występuje zarówno u glonów, jak i roślin nago oraz okrytonasiennych.

Melatoninę oznaczono w korzeniu, łodydze, liściach, kwiatach, owocach oraz nasionach. Jej zawartość zależy od wielu czynników, w tym od odmiany, warunków wzrostu, stadium dojrzałości, warunków środowiskowych czy metody oznaczenia [Feng i in., 2014].

Tabela 1. Występowanie melatoniny w roślinach i środkach spożywczych

Gatunek / Środek spożywczy	Zawartość melatoniny [pg/mL]	Źródło
Słonecznik	29	Manchester i in., 2000
Oliwa z oliwek	99	De La Puerta, 2007
Piwo	111	Maldonado i in., 2009
Wino czerwone	258	Tan i in., 1993; Peyrot i Ducroco 2008
Pszenica	320	Zieliński i in., 2000
Jęczmień	450	Zieliński i in., 2000
Imbir lekarski	584	Hattori i in., 1995
Rzepa	657	Hattori i in., 1995
Ryż	1 006	Hattori i in., 1995
Kukurydza zwyczajna	1 366	Hattori i in., 1995
Owies zwyczajny	1 796	Hattori i in., 1995
Winogrono	11 000	Vitalini i in., 2011
Pomidor	24 000	Reiter i in., 2007

U roślin melatonina zaangażowana jest w regulację zegara biologicznego, regulację wzrostu i rozwoju roślin oraz dezaktywację wolnych rodników. Udowodniono, iż melatonina posiada większą aktywność przeciwoksydacyjną niż witamina C i E [Gulcin i in., 2002], a funkcja ta uznawana jest za pierwotną ewolucyjnie [Hardeland i Poeggeler, 2003]. Melatonina dezaktywując wolne rodniki niejednokrotnie doprowadza do przekształcenia ich w związki mające również właściwości antyoksydacyjne. Jest ona rozpuszczalna zarówno w roztworach wodnych, jak i tłuszczach. Dzięki jej niewielkiej budowie oraz powyższych właściwościach hydrofilowo–hydrofobowych łatwo może przenikać między komórkami chroniąc je przed reaktywnymi formami tlenu i azotu. Wytwarzanie melatoniny u roślin prawdopodobnie ma miejsce w liściach i/lub korzeniach, skąd hormon ten transportowany jest do nasion, owoców i kwiatów [Arnao i Hernández–Ruiz, 2013]. Synteza melatoniny, podobnie jak polifenoli i innych drugorzędowych metabolitów uwarunkowana jest w głównej mierze czynnikami środowiskowymi, takimi jak: warunki klimatyczne, oddziaływanie mikroorganizmów czy działalność rolnicza. Warunki stresowe związane z powyższymi oddziaływaniami wzmagają produkcję melatoniny u roślin [Iriti i Varoni, 2016], dlatego duże jej stężenie obserwuje się wśród roślin śródziemnomorskich oraz alpejskich, a w szczególności w organach reprodukcyjnych tj. owocach i nasionach. Udowodniono również, iż hormon ten uczestniczy w procesie ochrony owoców przed mikroorganizmami [Iriti i in., 2006], procesie opóźniania kwitnienia [Kolár i in., 2005],

regulacji mitozy [Banerjee i Margulis, 1973], stymulacji wzrostu: korzenia, hipokotylu i koleoptylu [Hernández-Ruiz i in., 2005; Chen i in., 2009] regeneracji korzeni bocznych [Arnao i Hernández-Ruiz, 2007], ochronie rośliny przed stresem związanym z obniżeniem temperatury [Posmyk i in., 2009], czy stresem związanym ze wzrostem zasolenia gleby [Li i in., 2012].

Analiza zawartości melatoniny w materiale roślinnym napotyka szereg problemów i obarczona jest błędem ze względu na obecność, poza melatoniną, substancji towarzyszących takich, jak: związki fenolowe, barwniki, węglowodany i lipidy [Van Tassel i in., 2001]. Trudno również kontrolować sam proces ekstrakcji, co niejednokrotnie doprowadza do nieefektywnego wymycia tego hormonu [Arnao, 2014]. Do oznaczania zawartości melatoniny w materiale biologicznym wykorzystuje się: chromatografię gazową ze spektroskopią masową (GC–MS) [Skene i in., 1983], chromatografię cienkowarstwową (TLC) [Constantini i Paoli, 1998], wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) [Eriksson i in., 2003], elektroforezę kapilarną (CE) [Kim i in., 1999], metody chemiluminescencji [Lu i in., 2002] oraz metody spektrofotometryczne [Iriti i in., 2006].

Możliwości zastosowania melatoniny w produktach spożywczych

Największym wyzwaniem przemysłu spożywczego nie jest jednak ekstrakcja pojedynczych substancji z materiału biologicznego i tworzenie pełnoporcjowych mieszanek, lecz dostarczanie na rynek produktów już odpowiednio wzbogaconych. Produkty takie posiadać powinny większe walory prozdrowotne, dzięki zwiększeniu zawartości składnika bioaktywnego (tutaj: melatoniny), przy niewielkiej zmianie cech sensorycznych. Już dawno udowodniono, iż podawanie paszy bogatej w melatoninę pisklętom kurzym oraz szczurom powoduje wzrost stężenia tego hormonu w surowicy [Hattori i in., 1995; Reiter i in., 2005]. Natomiast Maldonado i in. (2009) udowodnili, iż nawet po wypiciu piwa, stwierdzano zwiększenie stężenia melatoniny oraz zwiększenie pojemności antyoksydacyjnej w osoczu krwi. Spożywanie natomiast soku z owoców wiśni poprawiło jakość i długość snu u dorosłych osób cierpiących na bezsenność [Pigeon i in., 2010].

Coraz dokładniejsze badania wskazują, iż melatonina obecna jest w wielu gatunkach roślin, szczególnie w owocach i nasionach, a co za tym idzie w produktach powstałych z ich przetworzenia. Bogatym źródłem melatoniny są owoce winogrona i wino czerwone, o odpowiednio 1ng/g i 0,5ng/mL zawartości melatoniny [Marcello i Varoni, 2016]. Badacze uważają, iż zdrowotne właściwości wina czerwonego nie wynikają jedynie z dużej zawartości polifenoli, ale także ze znacznej obecności melatoniny lub też synergistycznych efektów ich obecności. Wysoką zawartością melatoniny charakteryzują się również ziarniaki owsa i jęczmienia, a w szczególności ich okrywy owocowo-nasienne, co przemawia za zwiększeniem udziału mąk pełnoziarnistych w przemyśle spożywczym. Zbadanie poziomu melatoniny w wytyłkach winogronowych i otrębach zbożowych, jako możliwie cennego źródła tego związku, wydaje się w kontekście powyższych informacji bardzo obiecujące.

Podsumowanie

Melatoninę możemy uznać za związek o charakterze uniwersalnego antyoksydanta o dodatkowych właściwościach przeciwzapalnych. Melatonina wspomaga leczenie: bezsenności, raka, cukrzycy, chorób układu krążenia, chorób nerwowych, objawów starzenia i innych chorób przewlekłych [Marcello i in., 2010]. Większość ziół używanych w chińskiej kulturze, która słynie z długowieczności posiada wysoki poziom melatoniny [Chen i in., 2003]. Bezpieczna dawka spożycia melatoniny to 1g/dzień [Arnao, 2014]. Pomysł wprowadzenia do naszej diety melatoniny pochodzenia roślinnego, w postaci środków spożywczych powstałych z roślin lub odpadów poprodukcyjnych bogatych w ten związek, wydaje się być przyszłościowy. Zawartość prozdrowotnej melatoniny w produktach roślinnych sprawia, iż produkty takie mogą okazać się ciekawą alternatywą tradycyjnej suplementacji, dlatego też konieczne są dalsze badania w tym kierunku.

Literatura

- Anisimov V.N., Popovich I.G., Zabezhinski M.A., Anisimov S.V., Vesnushkin G.M., Vinogradova I.A., Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1757, 573–589.
- Arnao M.B., Hernández-Ruiz J., Melatonin promotes adventitious– and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *Journal of Pineal Research*, 2007, 42, 147–152.
- Arnao M.B., Hernández-Ruiz J., Growth conditions influence the melatonin content of tomato plants. *Food Chemistry*, 2013, 138, 1212–1214.
- Arnao M.B., Phytomelatonin: discovery, content, and role in plants. *Advances in Botanical Research*, 2014, ID 815769, 11 pages.
- Banerjee S., Margulis L., Mitotic arrest by melatonin. *Experimental Cell Research*, 1973, 78, 314–318.
- Bonnefont-Rousselot D., Collin F., Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 2010, 278, 55–67.
- Chen G., Huo Y., Tan D.X., Liang Z., Zhang W., Zhang Y., Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sciences*, 2003, 73, 19–26.
- Chen Q., Qi W.B., Reiter R.J., Wang B.M., Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166, 324–328.
- Costantini A., Paoli F., Melatonin: Quantitative analysis in pharmaceutical oral dosage forms using thin layer chromatography (TLC) densitometry. *Farmaco*, 1998, 53, 443–447.
- De la Puerta C., Carrascosa-Salmoral M.P., García-Luna P.P., Melatonin is a phytochemical in olive oil. *Food Chemistry*, 2007, 104, 609–612.

- Eriksson K., Östin A., Levin J.O., Quantification of melatonin in human saliva by liquid chromatography tandem mass spectrometry using stable isotope dilution. *Journal of Chromatography B*, 2003, 794, 115–23.
- Feng X., Wang M., Zhao Y., Han P., Dai Y., Melatonin from different fruit sources, functional sources, and analytical methods. *Trends in Food Science & Technology*, 2014, 37, 21–31.
- Forrest C.M., Mackay G.M., Stoy N., Stone T.W., Darlington L.G., Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2007, 64, 517–526.
- Gulcin I., Buyukokuroglu M.E., Oktay M., Kufrevioglu O.I., On the in vitro antioxidative properties of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 2002, 33, 167–171.
- Hardeland R., Antioxidative protection by melatonin. *Endocrine*, 2005, 27, 119–130.
- Hardeland R., Poeggeler B., Non-vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research*, 2003, 34, 233–241.
- Hattori A., Migita H., Iigo M., Itoh M., Yamamoto K., Ohtani-Kaneko R., Hara M., Suzuki T., Reiter R.J., Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1995, 35, 627–634.
- Hernández-Ruiz J., Cano A., Arnao M.B., Melatonin acts as a growth stimulating compound in some monocot species. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39, 137–142.
- Iriti M., Rossoni M., Faoro F., Melatonin content in grape: myth or panacea?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86, 1432–1438.
- Iriti M., Varoni E.M., The good health of Bacchus: Melatonin in grapes, the unveiled myth. *Food Science and Technology*, 2016, 65, 758–761.
- Kedziora-Kornatowska K., Szewczyk-Golec K., Czuczejko J., Pawluk H., van Marke de Lumen K., Kozakiewicz M., Bartosz G., Kedziora J., Antioxidative effects of melatonin administration in elderly primary essential hypertension patients. *Journal of Pineal Research*, 2008, 45, 312–317.
- Kedziora-Kornatowska K., Szewczyk-Golec K., Kozakiewicz M., Pawluk H., Czuczejko J., Kornatowski T., Bartosz G., Kedziora J., Melatonin improves oxidative stress parameters measured in the blood of elderly type 2 diabetic patients. *Journal of Pineal Research*, 2009, 46, 333–337.
- Kim Y.O., Chung H.J., Chung S.T., Determination of melatonin in biological samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1999, 850, 369–74.
- Kolár J., Machácková I., Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39, 333–341.
- Lahiri D., Ge Y.W., Sharman E.H., Bondy S.C., Age-related changes in serum melatonin in mice, higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral

cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. *Journal of Pineal Research*, 2004, 36, 217–223.

Lenoir V., de Jonage–Canonico M. B.Y., Perrin M.H., Martin A., Scholler R., Kerdehué B., Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylb enz[a]anthracene in the female Sprague–Dawley rat. *Breast Cancer Research*, 2005, 7, 470–476.

Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80, 2057–2058.

Li C., Wang P., Wei Z., Liang D., Liu C., Yin L., Jia D., Fu M., Ma F., The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity–induced stress in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*, 2012, 53, 298–306.

Lu J., Lau C., Lee M.K., Simple and convenient chemiluminescence method for the determination of melatonin. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 455, 193–8.

Maksimovich A.A., Structure and function of the vertebrate pineal gland. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2002, 38, 1–15.

Maldonado M.D., Moreno H., Calvo J.R., Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clinical Nutrition*, 2009, 28 (2), 188–191.

Manchester L.C., Poeggeler B., Alvares F.L., Ogden G.B., Reiter R.J., Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic procaryote *Rhodospirillum rubrum*, implications for an ancient antioxidant system. *Molecular Cell Biology Research*, 1995, 41, 391–395.

Manchester L.C., Tan D.–X., Reiter R.J., Park W., Monis K., Qi W.B., High levels of melatonin in the seeds of edible plants – possible function in germ tissue protection. *Life Sciences*, 2000, 67, 3023–3029.

Marcello I., Varoni E.M., Vitalini S., Melatonin in traditional Mediterranean diets. *Jurnal of Pineal Reserch*, 2010, 49, 101–105.

Marcello I., Varoni E.M., The good health of Bacchus: Melatonin in grapes, the unveiled myth. *LWT- Food Science and Technology*, 2016, 65, 758–761.

Peyrot F., Ducrocq C., Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Pineal Research*, 2008, 45, 235–246.

Pigeon W.R., Carr M., Gorman C., Perlis M.L., Effects of a tart cherry juice beverage on the sleep of older adults with insomnia: a pilot study. *Journal of Medicinal Food*, 2010, 13 (3), 579–583.

Posmyk M.M., Balabusta M., Wieczorek M., Sliwinska E., Janas, K.M., Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress. *Journal of Pineal Research*, 2009, 46, 214–223.

- Rao G.N., Ney E., Herbert R.A., Effect of melatonin and linolenic acid on mammary cancer in transgenic mice with c-neu breast cancer oncogene. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2000, 64, 287–296.
- Reiter R.J., Manchester L.C., Tan D.X., Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood, *Nutrition*, 2005, 21, 920–924.
- Reiter R.J., Melatonin, clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 17, 273–285.
- Reiter R.J., Paredes S.D., Manchester L.C., Tan D.X., Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 44, 125–200.
- Reiter R.J., Tan D.X., Manchester L.C., Simopoulos A.P., Maldonado M.D., Flores L.J., Melatonin in edible plants (phytomelatonin): identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 2007, 97, 211–30.
- Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C., Lopez-Burillo S., Melatonin, reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2002, 54, 1299–1321.
- Skene D.J., Leone R.M., Young I.M., The assessment of a plasma melatonin assay using gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 1983, 10, 655–659.
- Tamura H., Takasaki A., Miwa I., Taniguchi K., Maekawa R., Asada H., Taketani T., Matsuoka A., Yamagata Y., Shimamura K., Morioka H., Ishikawa H., Reiter R.J., Sugino N., Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 2008, 44, 280–287.
- Tan D.-X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C., Reiter R.J., Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal*, 1993, 1, 57–60.
- Van Tassel D.L., Roberts N., Lewy A., O’Neil S.D., Melatonin in plant organs. *Journal of Pineal Research*, 2001, 31, 8–15.
- Vitalini S., Gardana C., Zanzotto A., Simonetti P., Faoro F., Fico G., Iriti M., The presence of melatonin in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues, *Journal of Pineal Research*, 2011, 51, 331–337.
- Wang X., The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2009, 15, 345–357.
- Zatta P., Tognon G., Caramp in P., Melatonin prevents free radical formation due to the interaction between β -amyloid peptides and metal ions [Al (III), Zn (II), Cu (II), Mn (II), Fe (II)]. *Journal of Pineal Research*, 2003, 35, 98–103.
- Zhdanova I.V., Wurtman R.J., Balcioglu A., Kartashov A.I., Lynch H.J., Endogenous Melatonin Levels and the Fate of Exogenous Melatonin: Age Effects. *Journal of Gerontology, Biological Sciences*, 1998, 53A, 4, 293–298.

Zieliński H., Lewczuk B., Kozłowska H., Melatonin in cereal grains as a potential cancer prevention agent. In: Dietary Anticarcinogens and Antimutagens. Chemical and Biological Aspects. I.T. Johnson and G.R. Fenwick (eds). The Royal Society of Chemistry, Athenaeum Press Ltd, Gateshead, Tyne and Wear, UK, 2000, 266–273.

KATARZYNA MIKOŁAJCZAK, PRZEMYSŁAW PIOTR OLEJNIK

Koło Naukowe Studentów Biotechnologii "Operon"

Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

katarzyna.mikolajczak20@gmail.com

SUBSTANCJE BIOAKTYWNE W ALGACH

Streszczenie

Algi wykorzystywane są przez człowieka od wieków. Początkowo jako pasza dla zwierząt i pożywienie dla człowieka, które bogate jest liczne witaminy, aminokwasy egzogenne, a także mikro i makroelementy. Tradycyjnie substancjami pozyskiwanymi z tych organizmów są agar i alginiany. W ostatnim czasie udowodniono, że glony są bardzo bogatym źródłem różnorodnych naturalnych związków bioaktywnych. W ostatnich latach opisano szereg nowych związków, które zostały wyodrębnione z alg, a wiele z nich wykazuje działanie biologiczne. W pracy przedstawiono właściwości niektórych grup związków, które mają działanie bioaktywne, w tym między innymi: przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe.

Słowa kluczowe: substancje bioaktywne, algi, glony

Wprowadzenie

Algi występują na obszarze całego globu. Występują głównie w środowiskach wodnych, ale także lądowych, o wysokiej wilgotności [Tomaselli, 2004]. Organizmy te zdolne są do przeprowadzania procesu fotosyntezy, a do wzrostu potrzebują składników mineralnych, światła i dwutlenku węgla. Szacuje się, że około 50% produkowanego na świecie tlenu wytwarzane jest przez algi w oceanach. Grupa tych organizmów jest bardzo zróżnicowana. Podstawowym kryterium jest zdolność do przeprowadzania procesu fotosyntezy. Algi dzielone są na mikro- i makroalgi, z których pierwsze osiągają niewielkie rozmiary i występują w postaci pojedynczych komórek lub niewielkich struktur. Makroalgi tworzą, tak zwane plechy, których długość osiągać może nawet kilkadziesiąt metrów, jednak tworzące te struktury komórki nie są w żadnym stopniu wyspecjalizowane do pełnienia określonych funkcji. Algi dzielone są również na te należące do Królestwa Procaryota (cyjanobakterie) oraz Eucaryota (algi eukariotyczne).

Algi zawierają w swoim składzie znaczną liczbę składników bioaktywnych. Szacuje się, że większości z nich dotychczas nie zidentyfikowano i nie opisano. Biomasa alg stanowi jedno z bogatszych źródeł związków bioaktywnych, mających szerokie spektrum zastosowania w różnych gałęziach przemysłu. Ze względu na właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz przeciwnowotworowe, algi mogą być stosowane w leczeniu wielu jednostek chorobowych. Skład chemiczny alg nie jest stały. Zależy w dużej mierze

od czynników środowiskowych takich jak temperatura, oświetlenie, wartość pH, zawartość minerałów w pożywce, stężenie dwutlenku węgla itp. [Becker, 2004]. Organizmy te zawierają w swoim składzie między innymi, węglowodany - polisacharydy, mukopolisacharydy (glikozaminoglukany). Z najbardziej znanych glikozaminoglukanów wyróżnia się kwas hialuronowy i siarczan chondroityny, kwas alginowy i jego sole (szczególnie alginiany sodowe i wapniowe), a także fukany (laminaryna i fukoidyna), mannitol i sorbitol, karageniny i agar. Z grupy białek i aminokwasów w glonach występują: glikoproteiny i metaloproteiny oraz aminokwasy egzogenne (alanina, asparagina, glicyna, lizyna, seryna, izoleucyna, leucyna, metionina, fenyloalanina, treonina, tryptofan i walina). Wśród lipidów w glonach występują: niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT): arachidonowy, eikozapentenowy i rzadko spotykany – γ -linolenowy (GLA). Z grupy witamin w glonach zidentyfikowano: karotenoidy, np. β -karoten (źródło witaminy A), witaminy z grupy B (B1, B2, B5, B6, B12) oraz witaminy: E (tokoferol), C (kwas askorbinowy) i D. Algi są bogate w mikroskładniki: brom, cynk, jod, magnez, mangan, miedź, żelazo. Występują one w szczególnie dobrze przyswajalnej postaci – jako związki metaloorganiczne lub kompleksowe [Godlewska i in., 2014].

Algi w żywieniu człowieka

Składniki zawarte w bioasie mikroalg pozytywnie wpływają na zdrowie ludzi i zwierząt oraz są wykorzystywane w celu zwiększenia wartości odżywczej konwencjonalnych preparatów żywnościowych. Preparaty zawierające w swoim składzie biomasę alg sprzedawane są w postaci kapsułek, a także są dostępne w produktach żywieniowych, między innymi jako składnik makaronów i gum do żucia. Algi są źródłem naturalnego barwnika spożywczego, jak na przykład chlorofile i fitocyjanina.

Wysoka zawartość białka u różnych gatunków mikroalg była jednym z powodów uznania tych organizmów jako niekonwencjonalnego źródła białka. *Chlorella* i *Spirulina* były pierwszymi gatunkami mikroalg, które zostały skomercjalizowane i używane jako zdrowa żywność w Japonii, na Tajwanie i w Meksyku [Cuellar-Bermudez i in., 2015].

Algi z rodziny *Chlorella* charakteryzują się wysoką zawartością białka, ze zbalansowaną kompozycją aminokwasów, a także są źródłem witamin, minerałów i pigmentów oraz krótko-łańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym kwasu oleinowego i linolowego. Niektóre szczepy są również dobrym źródłem luteiny. Badania *in vivo* stwierdzające jej wykorzystanie w żywności, a także jako źródło białka zostały przeprowadzone w przeszłości, gdy przepisy dotyczące badań, w których uczestniczą ludzie, nie były tak restrykcyjne. *Chlorella* wykorzystywana jest jako barwnik do ciastek maślanych, jako dodatek do sfermentowanego mleka i jogurtu, w celu zwiększenia wartości odżywczej tych produktów [Guccione i in., 2014].

Niektóre gatunki sinic, zwłaszcza *Nostoc commune* i *Nostoc flagelliforme*, są tradycyjnym składnikiem diety mieszkańców Syberii, południowo-wschodniej Azji i Japonii. W Stanach Zjednoczonych, Australii, a obecnie także w Europie coraz bardziej popularne stają się preparaty i odżywki otrzymywane z sinic z rodzaju *Arthrospira* (znane pod potoczną nazwą *Spirulina*) [Głowacka i in., 2007]. W 1981 sinice te zostały uznane za organizmy o statusie GRAS (Generally Recognized As Safe). Agencja Żywności i Leków (ang. FDA - Food Drug Administration) stwierdziła, że *Spirulina* może być legalnie

wprowadzona do obrotu jako żywność lub suplement diety bez ryzyka dla zdrowia człowieka. Sinice z rodzaju *Arthrospira* mają wysoką zawartość białka o wysokiej strawności, a także zawierają znaczne ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i związki fenolowe. Zawartość białka w *Spirulinie* waha się od 50% do 70% (w/w) w suchej masie, zawartość węglowodanów od 10% do 20% (w/w), a zawartość tłuszczu od 5% do 10% (w/w).

Wykorzystanie alg w medycynie

Lecznicze właściwości alg znane są od wieków, szczególnie na Dalekim Wschodzie. W innych rejonach świata, zainteresowano się nimi stosunkowo niedawno. Z powodzeniem stosowano je w odchudzaniu, leczeniu: zapalenia oskrzeli, przeziębień, chronicznego kaszlu, chorób wenerycznych, nadczynności tarczycy, dnie moczanowej, a także jako maści i środki znieczulające [Sithranga Boopathy i in., 2010]. Dzięki właściwościom przeciwzapalnym, przeciwnowotworowym, przeciwbakteryjnym mogą być stosowane w medycynie, gdy na świecie obserwuje się coraz większe zainteresowanie farmaceutykami pochodzenia naturalnego, które są postrzegane jako bardziej bezpieczne dla człowieka.

Właściwości przeciwnowotworowe

Liczba zachorowań na nowotwory ustawicznie się zwiększa. Związane to jest ze zmianą stylu życia człowieka, diety i zanieczyszczeniem środowiska. Poszukuje się nowych leków o właściwościach przeciwnowotworowych, które zastąpią obecne, charakteryzujące się wieloma poważnymi skutkami ubocznymi ich stosowania. Doskonałym źródłem takich substancji wydają się być algi. Wykazano, że karotenoidy, flawonoidy oraz związki fenolowe wyizolowane z alg wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Hamowanie powstawania komórek nowotworowych wymaga inhibicji wzrostu i podziałów tych komórek. Dochodzi do tego poprzez immunostymulację, indukcję apoptozy, tłumienie angiotensyny nowotworu czy zatrzymanie cyklu komórkowego [Sheih i in., 2010].

Scytonemin jest inhibitorem kinazy białek seryna/treonina wyizolowanym z cyjanobakterii *Stigonema sp.*, reguluje tworzenie wrzeciona mitotycznego, a także kinaz biorących udział w regulacji cyklu komórkowego. Związek ten hamuje proliferację ludzkich fibroblastów i komórek śródbłonna. Scytonemin może zostać wykorzystany jako inhibitor kinazy białkowej o działaniu antyproliferacyjnym i przeciwzapalnym [Stevenson i in., 2002].

Związek kuracyna-A, wyizolowany u wybrzeża Curacao z organicznych ekstraktów alg z gatunku *Lyngbya majuscula*, jest silnym środkiem proliferacyjnym, ponieważ hamuje polimerazę tubulin, a także wykazuje działanie selektywnie hamujące rozwój nowotworowych linii komórkowych pochodzących z okrężnicy, nerek oraz piersi. Koibamid A jest związkiem pochodzącym z gatunku *Leptolyngbya* i wykazuje znaczną cytotoksyczność wobec komórek nowotworu płuc (NCI H460 - ang. human non small cell lung carcinoma). W ostatnich latach, najważniejszymi związkami, które zostały odkryte są boroficyna, kryptoficyna 1 i 8 oraz cyjanowiryna.

Boroficyna jest metabolitem zawierającym bor, wyizolowanym z morskich szczepów sinic *Nostoc linckia* i *Nostoc spongiaeforme var. tenue*. Związek wykazuje cytotoksyczność

wobec linii komórkowych ludzkiego nowotworu złośliwego naskórka (LoVo) oraz ludzkiego gruczolaka jelita grubego [Sithranga Boopathy i in., 2010].

Właściwości antybakteryjne i przeciwwirusowe

W ciągu ostatnich kilku lat zaobserwowano wzrastającą oporność bakterii na antybiotyki. Dąży się do poszukiwania i pozyskiwania z naturalnych źródeł nowych substancji aktywnych biologicznie o właściwościach antybakteryjnych.

Przeprowadzono badania dotyczące właściwości przeciwbakteryjnych ekstraktów z alg wyizolowanych u wybrzeża Jeddah, Morza Czerwonego w Arabii Saudyjskiej. Stwierdzono wysoką aktywność ekstraktów powstały na bazie biomasy gatunków: *Ulva reticulate*, *Caulerpa occidentalis*, *Cladophora socialis*, *Dictyota ciliolate* i *Gracilaria dendroides*. Cztery wyciągi z alg przygotowane w etanolu i chloroformie zawierają substancje czynne, które mogą hamować wzrost testowanych bakterii (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*) z wyjątkiem alkoholowego ekstraktu *C. occidentalis*, który hamował wzrost wyłącznie *Enterococcus faecalis*. Wodny ekstrakt *C. occidentalis* nie wykazał właściwości antybakteryjnych przeciw wszystkim badanym bakteriom. Wnioskuje się, że wykorzystanie ekstrakcji z użyciem etanolu i chloroformu pozwala na otrzymanie z biomasy alg substancji o silnym działaniu inhibującym wzrost bakterii [Abdu-llah Al-Saif i in., 2013].

Lee i współpracownicy [Lee i in., 1999; Lee i in., 2004] donieśli, że siarczany polisacharydów wyizolowane z *Monostroma latissimum* wykazują silne działanie hamujące na replikację wirusa opryszczki pospolitej typu 1. Przeciwwirusowe działanie polisacharydów, składających się z ramnozy (metylopentozy) i siarczanów, polega na hamowaniu adsorpcji wirusa. Wyniki późniejszych badań wykazują silne działanie hamujące aktywność wirusa HSV-1 (ang. Herpes Simplex Virus type 1) o 50% w stężeniu 0,38 - 8,5 µg/ml, a także niską cytotoksyczność w stosunku do komórek gospodarza.

Z krasnorostów *Bostrychia montagnei* [Duarte i in., 2001] wyizolowano siarczanowe galaktany, które mogą być wykorzystane w leczeniu wirusa opryszczki pospolitej typu 1.

Właściwości przeciwzapalne

Stan zapalny to reakcja obronna organizmu mająca na celu przeciwdziałanie szkodliwym czynnikom, takim jak: bakterie czy wirusy. W leczeniu chorób, które mogą wywoływać stan zapalny, stosowane są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), które wywołują szereg skutków ubocznych. Najczęstszymi z nich jest uszkodzenie lub podrażnienie błony śluzowej żołądka. Alternatywą dla tych leków wydają się być produkty pochodzenia naturalnego, które wykazują działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe. W przypadku ich stosowania istnieje niskie prawdopodobieństwo pojawienia się skutków ubocznych dla człowieka [Vázquez, 2011].

Cavalcante-Silva wraz ze współpracownikami [Cavalcante-Silva i in., 2012] stwierdzili, że alga z gatunku *Bryothamnion triquetrum* zawiera metabolity zdolne do łagodzenia stanów zapalnych. Przeprowadzono badania na myszach, u których wywoływano skurcze mięśni brzucha przez podanie dootrzewnowe kwasu octowego. Zwierzętom podawano 40 minut wcześniej ekstrakt *Bryothamnion triquetrum* (100mg/kg;

doustnie) lub metamazol sodowy - lek przeciwbólowy z grupy NLPZ (33,3mg/kg; doustnie). Zaobserwowano, że zwierzęta, którym został podany ekstrakt *Bryothamnion triquetrum* wykazywały mniejsze oznaki bólu.

Krasnorosty są potencjalnym źródłem nowych związków, które mogą być wykorzystywane w leczeniu stanów zapalnych i uśmierzaniu bólu. Główną cechą metabolitów wtórnych pochodzących z tych organizmów jest obecność chlorowców, takich jak neorogioltriolu - trzycykliczny diterpenoid bromowy, wyizolowany z krasnorostu *Laurencia glandulifera*. Neorogioltriol działa przeciwbólowo, poprzez blokowanie aktywności mediatorów reakcji, przez mechanizm zależny od aktywacji receptorów opioidowych i ma właściwości przeciwzapalne, które wymagają hamowania czynnika transtryptynowego. Inne związki halogenowe jak vidalol A i B, bromofenol wyizolowane z krasnorostu *Vidalia obtusiloba* mają silne działanie przeciwzapalne. [Silva i in., 2010].

Kang wraz z współpracownikami [Kang i in., 2012] badano brunatnice *Ecklonia cava*, których etanolowe ekstrakty hamują powstawanie obrzęku ucha u myszy. Badania prowadzono na myszach, którym podawano etanolowe ekstrakty tych alg w dawce 0,4mg/mlucho myszy. Podanie tych ekstraktów skutecznie zmniejszyło obrzęk ucha i rumień. Zaobserwowano również silne działanie przeciwbólowe, przy podaniu doustnym (5mg/kg) nie zaobserwowano toksyczności.

Właściwości przeciwutleniające

Antyoksydanty to związki, które przeciwdziałają procesom utleniania. W wyniku przeprowadzania procesów katabolicznych przez organizmy żywe powstają wolne rodniki, które mogą uszkadzać między innymi kwasy nukleinowe: RNA i DNA.

Działanie antyoksydacyjne odnotowano u wielu rodzajów alg morskich w tym *Ahnfeltiopsis*, *Colpomenia*, *Gracilaria*, *Halymenia*, *Hydroclathrus*, *Laurencia*, *Padina*, *Polysiphonia* i *Turbinaria*. Naturalne antyoksydanty mogą odgrywać istotną rolę w różnych chorobach i procesach starzenia się. Posiadają zdolność równoważenia szkodliwego działania procesów utleniających zachodzących w organizmie. Hamują aktywność chemiczną wolnych rodników.

Przebadano ekstrakty alg z gatunku *Turbinaria ornata* pod kątem zawartości substancji bioaktywnych. Wykazały one silne działanie antyoksydacyjne. W wyniku oczyszczania ekstraktów *T. ornata* otrzymano frakcje zawierające polisacharydy siarczanowe, które okazały się doskonałym przeciwutleniaczem. Prócz właściwości antyoksydacyjnych, stwierdzono działanie przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe ekstraktów alg *T. ornata*. Polisacharydy siarczanowe odpowiedzialne za działanie przeciwutleniające *T. conoides* zostały wyizolowane i zidentyfikowane jako fukoidany, laminarany i alginiany [Chattopadhyay i in., 2010]. W badaniu szczepów *T. ornata* pochodzących z wybrzeża Hawajów, głównym przeciwutleniaczem jest karotenoid fukoksantyna [Kelman i in., 2012]. Fukoksantyna jest jednym z najbardziej powszechnie znanych karotenoidów o znanym działaniu biologicznym. Ten unikalny karotenoid ma znacznie wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z innymi antyoksydantami, w tym witaminą E. Fukoksantyna została wyizolowana z brunatnych alg [Sachindra i in., 2007].

Podsumowanie

Algi wydają się być cennym, a zarazem tanim źródłem wielu substancji bioaktywnych, mogących znaleźć szerokie wykorzystanie w medycynie i żywieniu człowieka. Mogą być wykorzystywane w leczeniu chorób nowotworowych, stanów zapalnych oraz bólu. Stosowane mogą być jako naturalne antyoksydanty, a także w leczeniu chorób bakteryjnych i wirusowych. Algi wykorzystywane w przemyśle spożywczym są dobrym źródłem pełnowartościowego białka, a także węglowodanów i lipidów w tym wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a także źródłem witamin, mikro- i makroelementów. Przykłady przytoczone w pracy potwierdzają, że algi są tanim, naturalnym i dostępnym źródłem substancji bioaktywnych.

Literatura

- Abdu-llah Al-Saif S.S., Abdel-Raouf N., El-Wazanani H.A., Aref I.A., Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2013, 21, 57-64.
- Becker W., *Microalgae in Human and Animal Nutrition*. W: Richmond A. (red.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Publishing, 2004, 313.
- Cavalcante-Silva L.H.A., Brito da Matta C.B., Vital de Araújo M., Barbosa-Filho J.M., Pereira de Lira D., de Oliveira Santos B.V., de Miranda G.E.C., Alexandre-Moreira M.S., Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Crude Methanolic Extract of Red Alga *Bryothamnion triquetrum*, *Marine Drugs*, 2012, 10, 1979-1986.
- Chattopadhyay, N., Ghosh, T., Sinha, S., Chattopadhyay, K., Karmakar, P., Ray, B. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity, *Food Chemistry*, 2010, 118, 823–829.
- Cuellar-Bermundez S., Aquilar-Hernandez I., Cardenas-Chavez D., Ornelas-Soto N., Romero-Ogawa M., and Parra-Saldivar R., Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins, *Microbial Biotechnology*, 2015, 8 (2), 190-209.
- de Jesus Raposo M., de Moraes R., de Moraes A., Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae, *Marine Drugs*, 2013, 11 (1), 233-252.
- Duarte M.E.R., Nosedá D.G., Nosedá M.D., Tulio S., Pujol C.A., Damonte E.B., Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro, *Phytomedicine*, 2001, 8, 53-58.
- Głowacka J., Waleron M., Szelef-Markowska M., Łojkowska E., Waleron K., Cyanobacteria - źródło związków biologicznie czynnych, *Biotechnologia*, 4 (79), 95-112.
- Godlewska K., Michalak I., Chojnacka K., Glony na zdrowie, *Wiadomości Chemiczne*, 2014, 68, 836-837.

- Greque de Morais M., da Silva Vaz B., Greque de Morais E., Vieira Costa J., Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae, BioMed Research International, 2015, 1-15.
- Guccione A., Biondi N., Sampietro G., Rodolfi L., Bassi N. and Tredici M., Chlorella for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor, Biotechnology for Biofuels, 2014, 7 (74), 1-12.
- Kang J.-Y., Choi J.-S., Park N.G., Ahn D.-H., Hong Y.-K., In Vivo Antipyretic, Analgesic, and Anti-inflammatory Activities of the Brown Alga *Ecklonia cava* Extracts in Mice, Fisheries and Aquatic Sciences, 2012, 15, 73-76.
- Kelman D., Kromkowski Posner E., McDermid K.J., Tabandera N.K., Wright P.R., Wright A.D., Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae, Marine Drugs, 2012, 10, 404-411.
- Lee J.B., Hayashi K., Hayashi T., Sankawa U., Maeda M., Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*, Planta Medica, 1999, 65, 439-441.
- Lee J.B., Hayashi K., Maeda M., Hayashi T., Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae, Planta Medica, 2004, 70, 813-817.
- Sachindra N.M., Sato E., Maeda H., Hosokawa M., Niwano Y., Kohno M., Miyashita K., Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55, 8516-8522.
- Sheih IC, Fang TJ, Wu TK, Lin PH., Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (2), 1202-1207.
- Silva L.M., Lima V., Holanda M.L., Pinheiro P.G., Rodrigues J.A., Lima M.E., Benevides N.M., Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2010, 33, 830-835.
- Sithranga Boopathy N. and Kathiresan K., Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview, Hindawi Publishing Corporation Journal of Oncology, 2010, 2010, 1-12.
- Stevenson C. S., Capper E. A., Roshak A. K. i in. , The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002, 303 (2), 858-866.
- Tomaselli L., The Microalgal Cell. W: Richmond A. (red.), Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing, 2004, 3.
- Vázquez A.I.F., Sánchez C.M.D., Delgado N.G., Alfonso A.M.S., Ortega Y.S., Sánchez H.C., Anti-inflammatory and analgesic activities of red seaweed *Dichotomaria obtusata*, The Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 47, 1-11.
- Zubia M., Robledo D., Freile-Pelegrin Y., Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. Journal of Applied Physiology, 2007, 19, 449-458.

PRZEMYSŁAW PIOTR OLEJNIK

Koło Naukowe Studentów Biotechnologii "Operon"

Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

e-mail: ppolejnik@gmail.com

WOJCIECH JUZWA

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ DO IZOLACJI NOWYCH SZCZEPÓW ALG

Streszczenie

Cytometria przepływowa jest narzędziem diagnostycznym pozwalającym na ocenę parametrów fizjologicznych i cech strukturalnych komórek. Metoda ta pozwala na analizę pojedynczych komórek w sposób zautomatyzowany, z szybkością kilku do kilkudziesięciu tysięcy komórek na sekundę. Od kilkunastu lat możliwa stała się analiza bardzo małych obiektów, takich jak mikroorganizmy, w tym mikroalgi. Te ostatnie cechują się naturalną fluorescencją, która uwarunkowana jest posiadaniem przez nie chlorofilu, karotenów i fikobilin. Ponadto wszystkie rodzaje komórek badanych przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej mogą być znakowane barwnikami fluorescencyjnymi, przeciwciałami i oligonukleotydami. Procedury barwienia mają na celu możliwość charakteryzowania komórek pod kątem różnych cech: aktywności enzymatycznej, składu komórki, zawartości kwasów nukleinowych, ciągłości błony komórkowej, zawartości białek oraz tłuszczu, a także obecności specyficznych metabolitów. Sprzężenie cytometru przepływowego z sorterem komórkowym umożliwia izolację populacji komórek, na przykład pochodzących z prób środowiskowych, o interesujących cechach, takich jak wysoka zawartość tłuszczu lub fikocyjanin, a także pozwala na oczyszczenia kultur mikroalg z zanieczyszczeń innymi organizmami, na przykład bakteriami.

Słowa kluczowe: cytometria przepływowa, izolacja alg

Wprowadzenie

Algi wydają się być organizmami o idealnych cechach produkcyjnych. Charakteryzują się stosunkowo szybkim wzrostem, wymagają podłoży składających się głównie z substancji nieorganicznych, a energię do wzrostu i przeprowadzania procesów metabolicznych pozyskują w procesie fotosyntezy. Obecnie poszukuje się nowych zastosowań istniejących metod analitycznych w badaniach nad tymi organizmami, które w szybki sposób pozwolą na analizę dużej liczby komórek, czy szczepów. Metodą taką

wydaje się być cytometria przepływowa, która pozwala na analizę nawet kilku tysięcy komórek na sekundę. Cytometria przepływowa umożliwia analizę morfologii komórek, ocenę ich składu (zawartość lipidów, kwasów nukleinowych, niektórych węglowodanów), ocenę aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych i żywotności. Możliwa jest izolacja pojedynczych komórek o interesujących parametrach i otrzymanie z nich czystych szczepów.

Algi - mikro- i makroalgi

Algi charakteryzują się zdolnością do przeprowadzania fotosyntezy i występują głównie w środowiskach wodnych, zarówno słodkich jak i słonych, a także na lądzie, w środowiskach o dużej wilgotności. Szacuje się, że około 50% produkowanego w procesie fotosyntezy tlenu, wytwarzana jest przez te organizmy, a większość wytwarzana jest w oceanach, które zajmują około 71% powierzchni Ziemi [Richmont, 2004].

Algi dzielone są zwykle na makro- i mikroalgi. Pierwszy z nich tworzą tak zwane plechy, które przypominają mogą różne struktury, na przykład liście, jednak komórki je tworzące nie są wyspecjalizowane i nie pełnią określonych funkcji [Lee, 2008]. Do tej grupy organizmów zaliczane są między innymi niektóre krasnorosty, które formować mogą plechy o długości nawet 100 metrów. Mikroalgi są natomiast organizmami jednokomórkowymi, które niekiedy występują w postaci luźnej grupy komórek, łańcuszków lub dwoinek. Ponadto organizmy te dzieli się na te, które należą do Królestwa *Prokaryota* lub *Eukaryota*. Pierwsze z nich nazywane są cyjanobakteriami lub sinicami, których nadmierny rozwój w zbiornikach wodnych skutkuje zakwitami wód, w trakcie których przez niektóre gatunki produkowane mogą być cyjanotoksyny. Związki te są silnie toksyczne i szkodliwe dla człowieka i zwierząt [Paerl i Paul, 2012]. Cyjanobakterie znajdują zastosowanie w żywieniu człowieka, a przykładem jest *Spirulina sp.*, powszechnie stosowana w żywieniu człowieka, jako suplement diety, a także w przemyśle kosmetycznym i akwarystyce [Li i Qi, 1997]. Mikroalgi eukariotyczne znajdują szerokie zastosowanie w biotechnologii gdzie do najczęściej wykorzystywanych gatunków należy *Chlorella sp.* czy *Nanochloropsis sp.* [Mata i in., 2010; Draaisma i in., 2013].

Metody wykorzystywane w badaniach alg

W badaniach mikroalg i cyjanotoksyn wykorzystywanych jest wiele standartowych technik badawczych. Algi izolowane są z wykorzystaniem między innymi metod płytkowych i cytometrii przepływowej. Analiza gatunkowa fitoplanktonu możliwa jest z wykorzystaniem różnych technik mikroskopowych.

Do kontroli wzrostu hodowli mikroalg wykorzystywana jest między innym spektrofotometria - wyznaczania OD hodowli, czy też pomiar absorbancji światła lub fluorescencji barwników fluorescencyjnych. Opracowano szereg typów bioreaktorów do hodowli tych organizmów, znane są optymalne warunki ich hodowli oraz podłoża [Freitas i in., 2012; Więclaw-Solny i in., 2012; Singh i Singh 2014].

Z powodzeniem stosowane są techniki molekularne, a także inżynieria genetyczna. Algi z gatunku *Chlamydomonas reinhardtii* są organizmem modelowym nad badaniami związanymi z przebiegiem fotosyntezy.

Cały czas techniki te są dopracowywane i poszukuje się ich nowych zastosowań. Szczególnie ważnym jest osiągnięcie dużej przepustowości stosowanych metod. Jedną z takich technik wydaje się być cytometria przepływowa, która pozwala na szybką analizę tysięcy komórek, pod kątem parametrów fizjologicznych i cech, przydatnych w produkcji przemysłowej [Richmont, 2004; Andersen, 2005].

Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa jest narzędziem diagnostycznym pozwalającym na badania właściwości optycznych komórek. Metoda ta pozwala na analizę pojedynczych komórek w sposób zautomatyzowany z szybkością kilku do kilkudziesięciu tysięcy komórek na sekundę. Mierzony jest stopień rozproszenia wiązki światła emitowanego przez laser oraz intensywności emitowanej fluorescencji przez komórki przepływające przez wiązkę światła lasera o określonej długości fali. Pomiary te odbywają się z wykorzystaniem detektorów światła, w które wyposażony jest cytometr przepływowy. Warunkiem analizy prób z wykorzystaniem tej techniki jest zawieszenie komórek w roztworze [Collier, 2000; Brussaard i in., 2001; Stauber, Franklin i Adams, 2002].

Tradycyjne cytometry przepływowe wykorzystują tak zwane ogniskowanie hydrodynamiczne do pozycjonowania komórek w strumieniu i uzyskaniu uporządkowanego ruchu komórek. W komorze przepływowej rdzeniem jest strumień przepływającej próbki, a otacza ją tak zwany płyn osłonowy, który przepływa przez komorę w sposób laminarny. W drugim typie, który dostępny jest od kilku lat, układ ciśnieniowo-cieczowy został uproszczony. System ten nazywany jest mikrokapilarnym, a zasada jego działania polega na przepływie badanej próby w kapilarze i to bezpośrednio w niej odbywa się pomiar, w systemie tym brak płynu osłonowego.

Uproszczona budowa cytometru mikrokapilarnego pozwoliła na znaczne zmniejszenie jego rozmiarów, przez co urządzenie jest bardziej „mobilne”, wyeliminowano również konieczność wykorzystywania znacznych objętości płynu osłonowego, który po wykorzystaniu stanowi kłopotliwy odpad biohazard, wymagający specjalnego traktowania. Konstrukcja ta pozwoliła również na obniżenie kosztów analiz, a także kosztów budowy urządzenia. Wadą zastosowanych uproszczeń jest jednak brak możliwości pozycjonowania komórek przepływających w świetle lasera i dokładność pomiaru, szczególnie w przypadku pomiaru komórek mikroorganizmów, które są mają niewielkie rozmiary [Andersen, 2005]

Wykorzystanie cytometrii przepływowej w badaniach mikroalg

Cytometr przepływowy pozwala na analizę pojedynczych komórek, bądź niewielkich agregatów, stąd narzędzie to wykorzystywane jest głównie do badania komórek mikroalg. Wraz ze wzrostem zainteresowania naukowców mikroalgami i dużymi możliwościami wykorzystania ich w gospodarce, opracowano szereg procedur pozwalających na ich identyfikację, izolację czy charakteryzowanie. W ostatnich latach zaproponowano szereg aplikacji cytometrii przepływowej w badaniach mikroalg [Collier, 2000; Stauber i in., 2002].

Z uwagi na wysoką autofluorescencję komórek fitoplanktonu w przedziale od 600 nm wzwyż, znacznie ograniczona jest możliwość wykorzystania komercyjnie dostępnych barwników fluorescencyjnych. Co prawda zaproponowano procedury, które wykorzystują na przykład barwnik Czerwień Nilu (emisja światła o długości 590 nm, kiedy barwnik wiąże się z tłuszczami obojętnymi) i jodek propidyny (emisja światła długości 600 nm), jednak dokładność pomiarów i powtarzalność tych wyników jest zwykle bardzo niska.

Morfologia komórek. Dzięki wykorzystaniu pomiarów rozproszenia światła lasera przez komórki alg (detektory forward scatter i side scatter) możliwa jest ogólna ocena morfologii komórek, ich wielkości i gęstości optycznej, warunkowanej między innymi przez obecność różnych struktur komórkowych i substancji zapasowych. Z wykorzystaniem tych detektorów i detektora czerwonej fluorescencji po wzbudzeniu światłem niebieskim (autofluorescencja chlorofilu a) możliwa jest wstępna ocena składu gatunkowego fitoplanktonu [Becker i in., 2002].

Możliwa jest ocena wielkości komórek po wcześniejszym wykonaniu krzywej wzorcowej. Kalibracja polega na pomiarze sygnału pochodzącego z analizy różnych żelowych kulek dekstranowych o znanych średnicach. Dodatkowo wykorzystując analizę obrazów mikroskopowych i modele geometryczne opracowano procedury przydatne do określenia objętości komórek, na przykład dla mikroalgi *Cryptocodinium cohnii* [Sun i Liu, 2003].

Autofluorescencja barwników komórkowych. Pigmentami obecnymi w komórkach alg są między innymi chlorofile, karotenoidy i fikobiliny. Chlorofil a jest jedynym barwnikiem występującym konстыtutywnie. Obecność pozostałych rodzajów chlorofilu (b, c i d) i innych barwników fotosyntetycznych jest uwarunkowana gatunkowo, a także jest zależna od warunków środowiskowych, takich jak pH, temperatura, czy intensywność światła [Richmont, 2004]. Pełnią one w procesie fotosyntezy funkcje pomocnicze w stosunku do chlorofilu a.

Chlorofil a emituje światło niebieskie (<450nm) oraz daleką czerwień (>650nm). Pomiar intensywności autofluorescencji wykorzystywany jest między innymi do oceny ilości biomasy w próbce, a także wstępnej oceny składu fitoplanktonu. Pewne składniki komórki, takie jak flawonoidy, tryptofan, zredukowane zasady pirymidynowe i elastyna, mogą emitować światło w podobnym zakresie fal. Konieczna jest standaryzacja metody pomiaru z wykorzystaniem komórek pozbawionych barwników fluorescencyjnych poprzez ekstrakcję 90% acetonem [Lee, 2008; Taylor i in., 2014].

Ocena stanu fizjologicznego komórek. Wykorzystanie autofluorescencji alg może zostać wykorzystane do oceny stanu fizjologicznego komórek. Intensywność tego parametru z prób pochodzących na przykład z hodowli bioreaktorowych świadczyć może o stanie komórek. Wskazane jest użycie dodatkowego parametru pozwalającego na pomiar integralności błony komórkowej, z wykorzystaniem takich barwników jak SYTOX Green czy PicoGreen. Fluorochromy te wnikają do komórki tylko w przypadku przerwania ciągłości błony komórkowej i wiążąc się do kwasów nukleinowych, nabywają właściwości fluorescencyjnych. Jednoczesny wysoki sygnał pochodzący z autofluorescencji i brak lub bardzo niska wartość fluorescencji wymienionych barwników, świadczy o dobrej kondycji badanych komórek [Jochem, 1999; Michels i Goot, 2010; Taylor i in., 2014].

Wykrywanie tłuszczu. Z wykorzystaniem odpowiednich barwników, możliwa jest charakteryzowanie komórek pod kątem ich zawartości i produktywności. Ograniczone są możliwości w wykorzystaniu do tych celów Czerwieni Nilu. Możliwe jest wykorzystanie innej substancji – BODIPY 505/515, która to wykazuje emisję światła o długości 515 nm po związaniu się z tłuszczami [Franklin i in., 2004; Hyka i in., 2013]. Brak jednak wielu doniesień na temat procedur stosowania tego barwnika w badaniach mikroalg.

Pomiar zawartości kwasów nukleinowych. Możliwe jest badanie zawartości kwasów nukleinowych w komórkach. W zależności od przynależności do Królestwa (*Prokaryota* lub *Eukaryota*) oraz rodzaju i gatunku, a także fazy cyklu rozwojowego komórki ilość kwasów nukleinowych w komórce jest różna. Możliwe jest niespecyficzne wybarwienie DNA i RNA z wykorzystaniem takich barwników jak PICO green, SYBR Green I i II, SYTO 9, SYTO 13, SYTOX-green, TOTO-1, TO-PRO-1, YOYO-1 czy YO-PRO-1, które emitują światło zielone. Barwniki te wykorzystane zostały w badaniach nad różnymi gatunkami mikroalg, jednak wciąż brak odpowiedniej procedury uniwersalnej dla całej grupy tych organizmów [Richmont, 2004; Andersen, 2005; Hyka i in., 2013]. Część z wymienionych barwników (na przykład SYTOX-Green czy TOTO-1) przeniknąć do komórki może wyłącznie wtedy, gdy przerwana została ciągłość błony komórkowej. Zwykle oznacza to śmierć komórki, a procedury takie wykorzystywane mogą być do detekcji komórek żywych i martwych w próbie.

Pomiar zawartości węglowodanów. Głównymi cukrami zapasowymi w komórkach alg są skrobia, celuloza, hemiceluloza i cukry proste. Określenie zawartości skrobi, która jest głównym materiałem zapasowym w komórkach między innymi *Chlorella vulgaris* i *Chlamydomonas reinhardtii*, nie jest możliwe z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych. Możliwe jest jedynie szacowanie zawartości tego polisacharydu poprzez pomiar rozproszenia światła, którego stopień zwiększa się wraz ze wzrostem liczby granул skrobi w komórce. Dostępny jest barwnik Calcofluor White M2R (CFW), specyficznie wiążący się z celulozą oraz chityną, ograniczeniem w jego stosowaniu jest konieczność wzbudzenia go z wykorzystaniem światła ultrafioletowego, a cytometry przepływowe są rzadko wyposażone w laser UV [Kwok i Wong, 2005; Kwok i Wong, 2010].

Aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych. Pomiar aktywności komórkowej może się odbywać z wykorzystaniem wewnątrzkomórkowych esteraz, których aktywność świadczyć może o ogólnej kondycji komórek. W tym celu wykorzystywany jest diocetan fluoresceiny (FDA) lub ester acetylometylokalceiny (Calcein-AM). Substancje te wnikać do komórek ulegają hydrolizie, a produktem jest polarny związek wykazujący fluorescencję. Procedury z wykorzystaniem tych substancji zostały opracowane dla szeregu gatunków mikroalg i z powodzeniem stosowane są na przykład do monitoringu hodowli tych organizmów [Jochem, 1999; Richmont, 2004; Hyka i in., 2013; Taylor i in., 2014].

Innym sposobem określenia aktywności enzymów komórkowych jest wykorzystanie barwników Rodamina 123 lub chlorek 5-cyjano-2,3-dietylotrazolowy (CTC). Są one wrażliwe na zmiany potencjału błonowego. W komórkach żywych obserwowana jest wysoki poziom emisji światła przez te barwniki [Lee, 2008].

Przygotowywanie aksenicznych kultur i ich identyfikacja. Często wymagane jest otrzymanie czystych (aksenicznych) szczepów alg, które wykorzystywane są w badaniach, czy też w przemyśle. Tradycyjne metody izolacji, oparte na posiewach płytkowych,

mikropipetowaniu czy izolacji pojedynczych kolonii, nie pozwalają zwykle na izolację czystych kultur alg. Otrzymywane hodowle są zwykle skażone przez bakterie. Ze względu na dużo szybszy wzrost bakterii niż alg, uzyskanie akseńicznych kultur jest niezwykle pracochłonne. Wykorzystanie sortera komórkowego sprzężonego z cytometrem przepływowym pozwala na izolację czystych kultur, dużo wydajniej niż z użyciem tradycyjnych metod. Zwykle wybór komórek odbywa się na podstawie sygnału mierzącego autofluorescencję barwników fotosyntetycznych i parametrów morfologicznych (z użyciem detektorów FSC i SSC). Możliwe jest wykorzystanie barwników fluorescencyjnych, na przykład pozwalających określić aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych [Crosbie i in., 2003; Richmond 2004; Cellamare i in., 2010; Taylor i in., 2014].

Cytometria przepływowa pozwala również na sprawdzenie czystości posiadanych, czy wyizolowanych kultur. Z wykorzystaniem pomiaru rozproszenia wiązki światła lasera oraz poziomu autofluorescencji możliwy jest podział zbadanych komórek na komórki alg (o wysokim poziomie autofluorescencji i charakteryzujących się zdolnością do większego rozproszenia światła) i zakażających je bakterii [Lee, 2008; Mendoza i in., 2008; Cellamare i in., 2010].

Izolacja wydajnych producentów. Możliwa jest izolacja pojedynczych komórek o interesujących cechach, takich jak wysoka aktywność komórkowa, wysoka zawartość barwników fluorescencyjnych, lipidów, czy węglowodanów itd. Z wykorzystaniem cytometru przepływowego sprzężonego z sorterem komórek wyizolowano szczepy charakteryzujące się wysoką produkcją fikocyjaniny. Widmo absorpcji i emisji światła przez ten barwnik jest przesunięte w stosunku do chlorofilu, dlatego z użyciem światła lasera o długości 633nm, zidentyfikowano komórki o ponadprzeciętnej zawartości fikocyjaniny [Lee, 2008; Mendoza i in., 2008].

Podsumowanie

Niewątpliwą zaletą aplikacji cytometrii przepływowej jest możliwość analizy pojedynczych komórek i izolacja tych, o pożądanym cechach. Czynnikiem limitującym wykorzystanie tej metody jest konieczność standaryzacji. Często wyniki, pochodzące z różnych laboratoriów, są rozbieżne. Ponadto przeprowadzone dotychczas eksperymenty zwykle nie proponują uniwersalnych metod przygotowywania, barwienia i analizy prób, a dotyczą zwykle pojedynczych gatunków alg. Koniecznym wydaje się prowadzenie dalszych badań nad wykorzystaniem cytometrii przepływowej w badaniach alg, w celu opracowania uniwersalnych i powtarzalnych procedur.

Literatura

- Andersen R.A., Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005.
- Becker A., Meister A., Wilhelm C., Flow cytometric discrimination of various phycobilin-containing phytoplankton groups in a hypertrophic reservoir. *Cytometry*, 2002, 57, 45–57.
- Brussaard C., Marie D., Thyrhaug R., Bratbak G., Flow cytometric analysis of phytoplankton viability following viral infection. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, 26 (2), 157–66.

- Cellamare M., Rolland A., Jacquet S., Flow Cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *Applied Phycology*, 2010, 20, 87–100.
- Collier J. L. Flow cytometry and the single cell in phycology. *Journal of Phycology*, 2010, 36 (4), 628–644.
- Crosbie N. D., Po M., Weisse T., Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *Journal of Microbiology Methods*, 2003, 55, 361–370.
- Draaisma R. B. Food commodities from microalgae. *current opinion in biotechnology*, 2013, 24 (2), 169–177.
- Franklin N. M., Stauber J., Lim R., Development of multispecies algal bioassays using flow cytometry. *environmental toxicology and chemistry*, 2004, 23 (6), 1452–1462.
- Freitas A. C., Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnology Advances*, 2002 30(6), 1506–1515.
- Hyka P., Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances*, 2013, 31 (1), 2–16.
- Jochem F J., dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with uorescein diacetate. *Marine Biology*, 1999, 135, 721–728.
- Kwok A., Wong J., lipid biosynthesis and its coordination with cell cycle progression. *Plant Cell Physiology*, 2005, 46 (12), 1973–1986.
- Kwok A., Wong J., the activity of a wall-bound cellulase is required for and is coupled to cell cycle progression in the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Plant Cell Physiology*, 2010, 22, 1281–1298.
- Lee R. (red.), *Phycology*. wydanie czwarte, Cambridge University Press, Cambridge, 2008.
- Li D., Qi Y., *Spirulina* industry in china: present status and future prospects. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 2, 25–28.
- Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14 (1), 217–232.
- Mendoza H., Freijanes K., Carmona L., Ramos A. A., Characterization of *dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Journal of Biotechnology*, 2008, 11, 1-13.
- Michels M., Van Der Goot J., Effects of shear stress on the microalgae *Chaetoceros muelleri*. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 2010, 33, 921–927.
- Paerl H. W., Paul V. W., Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, 2012, 46 (5), 1349–1363.
- Richmont, A. (red.), *Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology*. Blackwell Publishing, Carlton, 2004.

Singh S.P., Singh P., Effect of CO₂ concentration on algal growth: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2004, 38, 172–79.

Stauber J. L., Franklin N. M., Adams M. S., Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20 (4), 141–143.

Sun, J., Liu D., Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 2003, 25, 1331-1346.

Taylor, P., Differences in responses to darkness between *microcystis aeruginosa* and *chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Freshwater Ecology*, 2007, 22, 93-99.

Więclaw-Solny L., Dotzymanie kroku polityce energetyczno-klimatycznej UE – postęp badań procesów usuwania CO₂ z gazów spalinowych - wprowadzenie. *Polityka Energetyczna*, 2012, 15 (4), 111–123.

SPONSORZY – PAKIET ZŁOTY



Unilever



Zeelandia

SPONSORZY – PAKIET SREBRNY



SPONSORZY – PAKIET BRĄZOWY

Colian™



ISBN 978-83-7160-835-3



9 788371 608353

