

POSTĘPY NAUKI I TECHNOLOGII PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO

t. 77 nr 1-2

Warszawa 2023

Rada Programowa

prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski
dr hab. inż. Piotr Kielczyński, prof. IPPT PAN
prof. dr hab. Agnieszka Kita
prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska
dr hab. inż. Iwona Konopka, prof. UWM
prof. dr hab. Józef Korczak
prof. dr hab. Grażyna Podolska
prof. dr hab. Zdzisław Targoński

Kolegium Redakcyjne

Redaktor Naczelny – dr hab. inż. Marek Roszko, prof. IBPRS-PIB

Z-ca Redaktora Naczelnego – dr hab. inż. Marcin Bryła, prof. IBPRS-PIB

Redaktorzy tematyczni:

dr Beata Bartodziejska
dr inż. Katarzyna Kotarska
dr hab. inż. Dariusz Lisiak, prof. IBPRS-PIB
dr inż. Katarzyna Piasecka-Jóźwiak
dr hab. inż. Stanisław Ptasznik, prof. IBPRS-PIB
dr inż. Sylwia Skąpska
dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS-PIB
dr inż. Anna Szafrńska
dr inż. Elżbieta Wojtowicz

Native speaker: *Christopher Whyatt*, Senior Lecturer (TEFL) at the Adam Mickiewicz University, Poznań

Sekretarz Redakcji

mgr Lila Nabialek

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego –
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa
tel. 22 606 36 99, lila.nabialek@ibprs.pl

Czasopismo wydawane jest w wersji pierwotnej drukowanej

Czasopismo recenzowane

Wydawnictwo Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

im. prof. Wacława Dąbrowskiego

Państwowego Instytutu Badawczego

ISSN 2083-5809

Projekt graficzny okładki – INNOVA

nakład 80 egz.

SPIS TREŚCI

Szczepy <i>Bacillus</i> izolowane ze środowisk naturalnych – identyfikacja gatunkowa i aktywność enzymatyczna Kołtunowicz K., Sokołowska B., Bucka-Kolendo J.	5
Wpływ preparatu mannoprotein izolowanych z drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na tworzenie biofilmu przez wybrane bakterie patogenne i saprofityczne Bzducha-Wróbel A., Chraniuk P., Popielarz D., Dobrowolska A., Pobiega K., Synowiec A.	20
Preferencje konsumentów na temat batonów zbożowych o wysokiej zawartości białka Grabarczyk J., Marciniak-Łukasiak K.	36
Ocena jakości nierafinowanych cukrów trzcinowych dostępnych na krajowym rynku Salamon A., Baryga A., Kowalska H.	47
Profil kwasów tłuszczowych mięsa byków jelenia szlachetnego (<i>Cervus elaphus</i> L.) poddanego dojrzewaniu „na mokro” i zamrażalniczemu przechowywaniu Daszkiewicz T.	66
Certyfikowana żywność regionalna jako ważny element dla zachowania bioróżnorodności zwierząt gospodarskich Bałowska J.	80
Informacje dla autorów	104

CONTENTS

***Bacillus* strains isolated from natural environments – species identifications and enzymatic activity**

Kołtunowicz K., Sokołowska B., Bucka-Kolendo J.5

The influence of the mannoprotein preparation isolated from *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the formation of biofilm by selected pathogenic and saprophytic bacteria

Bzducha-Wróbel A., Chraniuk P., Popielarz D., Dobrowolska A.,
Pobiega K., Synowiec A. 20

Consumers' preferences on high protein cereal

Grabarczyk J., Marciniak-Łukasiak K. 36

Assessment of quality of unrefined cane sugars available on the local market

Salamon A., Baryga A., Kowalska H. 47

The fatty acid profile of meat from male red deer (*Cervus elaphus* L.) subjected to wet aging and freezer storage

Daszkiewicz T. 66

Certified regional food as an important element for preserving the biodiversity of farm animals

Barłowska J. 80

BACILLUS STRAINS ISOLATED FROM NATURAL ENVIRONMENTS – SPECIES IDENTIFICATIONS AND ENZYMATIC ACTIVITY

Karolina Koltunowicz, Barbara Sokółowska, Joanna Bucka-Kolendo

Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology
State Research Institute
Department of Microbiology
36 Rakowiecka Str., 02-532 Warsaw, Poland

karolina.koltunowicz@ibprs.pl

Received: 19 December 2023

Revised: 17 January 2024

Accepted: 18 January 2024

Summary

The emphasis on promoting ecological solutions in agriculture contributes to scientists' search for bacterial species that would demonstrate beneficial properties in terms of improving the growth and quality of plants, soil quality or eliminating harmful odor compounds. One of them is the genus *Bacillus*. These bacteria are characterized interesting physiological and biochemical properties, including the secretion of various types of enzymes that decompose difficult chemical compounds. As part of the research, microorganisms were isolated from various environments such as soil, compost, slurry using. The obtained pure bacterial cultures were genetically identified using two methods: MALDI-TOF MS and molecular PCR. Their enzymatic properties (proteolytic, cellulolytic, lipolytic, chitinolytic, amylolytic) were examined using the plate methods and biochemical properties using API 20 E tests. Of the 26 isolated strains, only 9 belonging to the genus *Bacillus* showed all the enzymatic activities tested.

Keywords: *Bacillus* genus, enzymatic activity, organic materials, identification, MALDI-TOF MS, PCR

SZCZEPY BACILLUS IZOLOWANE ZE ŚRODOWISK NATURALNYCH – IDENTYFIKACJA GATUNKOWA I AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA

Streszczenie

Nacisk na promowanie rozwiązań ekologicznych w rolnictwie, przyczynia się do poszukiwania przez naukowców gatunków bakterii, które wykazywałyby korzystne cechy względem poprawy wzrostu i jakości roślin, jakości gleby czy też niwelowania szkodliwych

związków zapachowych. Jednym z takich rodzajów jest rodzaj *Bacillus*. Bakterie te charakteryzują się ciekawymi właściwościami fizjologicznymi i biochemicznymi, w tym sekrecji różnego rodzaju enzymów rozkładających szkodliwe związki chemiczne. W ramach badań wyizolowano mikroorganizmy z różnych środowisk typu: gleba, kompost oraz gnojowica. Uzyskane czyste kultury bakterii zostały zidentyfikowane genetycznie dwoma metodami: MALDI-TOF MS i molekularną PCR. Zbadano ich właściwości enzymatyczne (proteolityczne, celulolityczne, lipolityczne, chitynolityczne, amylolityczne) metodami płytkowymi oraz biochemiczne za pomocą testów API 20 E. Spośród 26 wyizolowanych szczepów, tylko 9 przynależnych do rodzaju *Bacillus*, wykazało wszystkie badane aktywności enzymatyczne.

Słowa kluczowe: *Bacillus* sp., aktywność enzymatyczna, substancje organiczne, identyfikacja, MALDI-TOF MS, PCR

INTRODUCTION

The genus *Bacillus* consists of gram-positive or gram-variable bacteria widely distributed in nature, belonging to the phylum *Firmicutes*. They are found in soil, fresh and salt water, and in the digestive tract of animals. Their cells have a cylindrical shape and are usually equipped with cilia located peritrichally or polarly. There are known species that are unable to move. Bacteria belonging to this genus are aerobes or relative anaerobes, catalase-positive. A characteristic feature is the large genetic diversity of these bacteria resulting in high variability in terms of physiology and metabolism. Thanks to this, we distinguish psychrophilic and thermophilic, acidophilic and alkaliphilic strains, as well as salinity-resistant and halophilic strains [Pietraszek and Walczak 2014].

Bacteria from the genus *Bacillus* are characterized by the production of endospores. These are structures resistant to harmful environmental factors (unfavorable pH, UV radiation, lack of water and nutrients) and disinfectants. Thanks to these properties, they can survive in unfavorable environmental conditions for a long period of time [Abriouel et al. 2011]. The second characteristic feature of the *Bacillus* genus is rapid growth and an efficient secretion system of biologically active compounds. These include enzymes, antibiotics, bacteriocins, vitamins and biosurfactants. They are very important in industry and biocontrol. The largest group of proteins produced by the *Bacillus* genus are enzymes. They are characterized by thermal stability, resistance to alkaline conditions, and a wide pH range [Abriouel et al. 2011, Danilova and Sharipova 2020]. Among the enzymes produced, we can distinguish: amylases, cellulases, proteases, lipases and chitinases. On the global market we

can observe the presence of preparations containing metabolites produced by these bacteria. They are used in the food, pharmaceutical, chemical, textile and agricultural industries [Diaz-Cornejo et al. 2023].

Due to the previously mentioned properties, bacteria of the *Bacillus* genus are classified as Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB). This is a group of microorganisms that, through secreted enzymes and other compounds, can directly or indirectly promote plant growth, support plant resistance to infections and induce a response to stress [Stoica et al. 2019]. This is an extremely desirable feature of microorganisms, due to the increasing interest in the production and use of biological fertilizers and plant protection products based on the beneficial properties of microorganisms. Through the metabolites it produces, the *Bacillus* genus is able to limit the growth of phytopathogens [Puan et al. 2023]. Very often, due to the secretion of various types of enzymes, these bacteria are used to produce preparations that reduce unpleasant and harmful odor compounds, i.e.: ammonia, hydrogen sulfide [Ma et al. 2021, Nowocien and Sokołowska 2022].

Two methods are commonly used for the genetic identification of microorganisms: polymerase chain reaction (PCR) and MALDI-TOF mass spectrometry. The PCR reaction is a technique that allows to duplicate any DNA fragment with a length ranging to several thousand pairs of nucleotides. It involves carrying out many cyclic DNA synthesis reactions in a thermocycler. The PCR reaction consists of 3 steps. The first step is the denaturation of DNA into two single chains at high temperature (95°C). Then the hybridization process takes place, i.e. the process of attaching a specific pair of primers to the matrix. The temperature for this stage is lower and depends on the type of starters (45-65°C). The third stage is elongation. Increasing the temperature to 72°C causes the attachment of DNA polymerase to the site of association of the primers with the matrix. The new-created complex begins the synthesis of a strand complementary to the matrix. The cycle is repeated most often 35 times [Węgleński 1995, Zhu et al. 2020]. The MALDI-TOF method is based on the analysis of ribosomal proteins that are unique for a family, genus and species, and even strain of a microorganism. This method involves placing a small amount of the tested material and a matrix solution containing α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid in an organic solvent on the analysis plate. The prepared and dried sample is placed in the analyzer chamber, where the laser causes desorption (release) and ionization of matrix molecules and bacterial proteins. The measurement result of these molecules is recorded in the form of a mass spectrum representing the ions detected by the detector. The resulting spectrum is unique and unchanging for each species of the tested microorganism. It is automatically analyzed and

compared with a database containing characteristic spectra of specific microbial species [Cieślik and Wróblewska 2018].

The aim of this study was isolation and identification of bacteria of the genus *Bacillus* from various natural environments using MALDI-TOF MS and 16S rRNA sequencing methods, as well as characterization of their enzymatic activities, that could be used commercially.

MATERIALS AND METHODS

The research material for the isolation of bacteria of the *Bacillus* genus included: cattle manure, pig manure, soil and home compost.

Isolation of pure bacterial cultures from organic materials

Samples of slurries, soil and compost suspended in dilution liquid were subjected to a thermal shock process at 80°C for 10 minutes, and then a series of dilutions were made and spread on the PCA medium. The petri dishes were incubated at 30°C for 48 h. Randomly selected colonies were passaged using the reduction inoculation method on TSA medium and incubated at 30°C for 24-48 hours. Isolated pure cultures of bacteria were identified using 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry, and their enzymatic activity was determined using plate methods and API 20 E tests (bioMérieux). Pure isolates were stored at -20°C using the Protect Microorganism Preservation System - Protect Multipurpose kit TS/80-MX (Technical Service Consultants Ltd.).

Identification by MALDI-TOF mass spectrometry

All isolated strains were identified using a MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) mass spectrometer ID^{plus} Confidence (SHIMADZU, Japan) according to the manufacturer's protocol. Directly before the analysis, the spectrometer was calibrated using an *Escherichia coli* DH5α bacterial preparation. A single colony was taken from a 24-hour culture and transferred to a plate. Then 0.5 µl of 25% formic acid (from POCH) was added and left to dry. Then 1 µl of matrix containing α-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) was added to the plate and left to dry. The obtained mass spectra were analyzed using the SARAMISTM PREMIUM software package. The samples mass spectrum were compared with database, and the sum of peak weights were computed after matching mass signals, transformed into a confidence value and pointed as follows: dark green with 99.9% confidence values or 1,000 to 1,400 points, light green with 90% to 99% confidence values or 900 to 999 points, yellow with 80% to 89.9% confidence values or 800 to 899 points, and white with 75% to 79.9% confidence values or 750 to 799 points.

Identification by 16S rRNA sequencing

Some of the isolated bacterial strains were identified by analyzing the 16S rRNA gene sequence. For this purpose, the ready-made DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (100) (by QIAGEN) was used in accordance with the manufacturer's protocol. The process included the isolation of genomic DNA, PCR (polymerase chain reaction) with specific primers 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 16SR (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT3'), sequencing and analysis of the obtained results. The polymerase chain reaction (PCR) was performed in a SimpliAmp™ Thermal Cycler model A24812 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 51°C for 35 seconds, extension at 72°C for 1 minute and 40 seconds, and final extension at 72°C for 2 minutes. Then, the electrophoresis process was performed in a 1.5% agarose gel in 1xTAE buffer (Tris-Actate-EDTA buffer) and in the presence of the SimplySafe dye (EURx company), which allows visualization of the DNA fragment in the gel under the influence of UV radiation. This process was performed at 120V for 45 min, and the results were documented using GeneSnap version 6.08 (SynGene). The PCR reaction products were sequenced using Genetic Analyzer model 3730 Applied Biosystems™ (Genomed, Warsaw, Poland), and the obtained sequences were assembled using Serial Cloner and compared with the NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program database.

Phylogenetic analysis

A phylogenetic analysis was performed using the CLUSTAL W algorithm based on the 16S rRNA sequences of 11 strains, as a reference the sequences from the NCBI database were used. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method [Tamura et al. 2004] and are in the units of the number of base substitutions per site. There were a total of 1556 positions in the final dataset for the 16S DNA gene. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 [Tamura et al. 2021].

Analysis of the enzymatic activity

Pure bacterial cultures were reductively inoculated onto TSA medium and incubated for 24 hours at 30°C. After this time, the presence of aminopeptidase was determined using the Bactident® Aminopeptidase L-alanine aminopeptidase detection test (Merck Millipore), the presence of cytochrome oxidase using the Bactident® Oxidase test (Merck Millipore), the presence of catalase using the hydrogen peroxide test, and the enzymatic activity using plate methods on differentiation media. From a 24-hour culture, one colony was transferred

pointwise to:

- Starch Agar (STA) for the determination of amylolytic activity. To prepare 1 L of medium, 10g of soluble starch, 3 g of meat extract and 12 g of agar are added. The results were read after pouring Lugol's solution into the culture medium. There was no characteristic dark blue color of the substrate around the starch-degrading colonies;
- medium with skimmed milk powder according to the formula of the ready-made Milk Plate Count Agar medium by Liofilchem for determining proteolytic activity. The appearance of a clear zone around the colony was treated as a positive result;
- medium with colloidal chitin, described in the article by Bedine Boat et al. [2019] for the determination of chitinolytic activity. This medium was modified by changing the final pH to 5.2. Purple zones were observed around colonies showing this activity due to pH changes;
- medium with carboxymethylcellulose and trypan blue, prepared according to the recipe included in the article by Kim et al. [2011] for the determination of cellulolytic activity. In colonies of strains capable of decomposing carboxymethylcellulose, there was a zone of lightening of the medium from dark blue to light blue;
- medium with the addition of Tween 80 described in the book "Food Microbiology" [1983] for determining lipolytic activity. To prepare 1 L of the medium, prepare two separate solutions: 900 ml of solution 1, containing 10 g of peptone K, 5 g of sodium chloride, 0.1 g of calcium chloride, 20 g of agar, and 100 ml of solution 2, which is a 10% Tween 80 solution. Sterilize the solutions separately at 121°C for 20 minutes and mix together before pouring onto plates. A zone of visible bubbles was observed around the colonies that showed this activity, resulting from the decomposition of the Tween 80 reagent.

Analysis of biochemical activity using API 20 E tests

The biochemical characteristics of selected bacterial isolates were determined using API 20 E tests from BioMérieux SA. The assay was performed according to the manufacturer's protocol. The inoculum was biomass collected from a 24-hour culture on TSA medium and suspended in physiological saline. The tests were incubated at 30°C for 3 days.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacteria of the *Bacillus* genus are commonly referred to in the literature as positive microorganisms having many favorable biochemical and morphological features (Pietraszek and Walczak 2014). In the above studies, a total of 26 strains of bacteria identified as the

Bacillus genus, with favorable biochemical and enzymatic properties, were isolated from the tested environmental samples. All 26 isolates were gram-positive, catalase-positive and oxidase-positive, and were subjected to enzymatic activity assays.

All obtained isolates were identified based on MALDI-TOF MS analysis. As a result, five strains were identified as the species *Bacillus subtilis*, ten strains were identified as *Bacillus pumilus*, four isolates belonged to the species *Bacillus licheniformis*, three strains belonged to the species *Bacillus mycoides*, one strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Two strains have not been clearly identified. Identification by PCR was performed on eleven selected strains that showed the widest range of enzymatic activity (Tab.1). Three of them were identified as *Bacillus subtilis*, one as *Bacillus* sp. and one as *Bacillus licheniformis*. The results for the rest of the isolates were inconclusive. Eleven of identified strains were assigned GenBank accession number and were included in Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology – State Research Institute’s Collection of Industrial Microorganisms (pol. KKP).

Table 1. Results of identification by MALDI-TOF MS and 16S rRNA sequencing for isolated strains

Wyniki identyfikacji wyizolowanych szczepów metodami MALDI-TOF MS i sekwencjonowania genu 16S rRNA

KKP number	GenBank accession number	Identification by MALDI-TOF MS	Identification by 16S rRNA sequencing
3893	PP069394	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>
3894	PP069801	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
3895	PP069790	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
3897	PP069821	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>
3898	PP069393	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>
3899	PP069822	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
3900	PP069454	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
3901	PP069832	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens/subtilis</i>
3902	PP069453	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis/aerius/pumilus</i>
3903	PP069947	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus stercoris/subtilis</i>
3904	PP069791	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
4078	-	<i>Bacillus pumilus</i>	-
4079	-	<i>Bacillus pumilus</i>	-
4080	-	<i>Bacillus pumilus</i>	-
4081	-	<i>Bacillus pumilus</i>	-
4082	-	<i>Bacillus pumilus</i>	-
4083	-	<i>Bacillus mycoides</i> (<i>weihenstephanensis</i>)	-
4084	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-

4085	-	<i>Bacillus mycoides</i> (<i>weihenstephanensis</i>)	-
4086	-	<i>Bacillus mycoides</i> (<i>weihenstephanensis</i>)	-
4087	-	<i>Bacillus licheniformis</i>	-
4088	-	<i>Bacillus licheniformis</i>	-
4089	-	<i>Bacillus pumilus</i>	-

For 4 out of 11 isolates, the identification results were the same for both methods used. These were the following strains: *B. subtilis* KKP 3894, *B. licheniformis* KKP 3895, *B. subtilis* KKP 3899, *B. licheniformis* KKP 3904. The results of both identifications overlapped for the remaining 6 strains, however, as a result of identification using 16S rRNA gene sequencing, at least two species showing the same percentage of similarity (100%) were assigned to one strain. This situation may be the result of high homology of the 16S rRNA gene sequence between *Bacillus* species. According to Mohar Lorbeg et al. [2021] and Çevik and Ogutcu [2020], the MALDI-TOF MS method allows for quick identification of bacteria of the *Bacillus* genus and is a reliable alternative to the molecular method. However, this method may contain errors due to the lack of reference mass spectra in the device's database. The proper characterization of the microorganism depends on the resources of the device's databases. Identification by 16S rRNA gene sequencing is a technique with greater differentiation potential compared to the MALDI-TOF MS method. However, the high degree of phenotypic and genotypic diversity among bacteria of the *Bacillus* genus may cause some difficulties in molecular identification.



Figure 1. The phylogenetic tree build based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and represents the evolutionary relationships of tested taxa. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [Saitou and Nei 1987]. The optimal tree is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

Budowa drzewa filogenetycznego opiera się na analizie sekwencji genu 16S rRNA i przedstawia pokrewieństwa ewolucyjne badanych taksonów. Historię ewolucji wywnioskowano stosując metodę łączenia sąsiadów [Saitou i Nei 1987]. Pokazano optymalne drzewo. Drzewo jest narysowane w skali, z długościami gałęzi w tych samych jednostkach, co odległości ewolucyjne używane do określenia drzewa filogenetycznego.

All tested strains showed a small genetic distance based on the topology of the obtained phylogenetic tree (Fig. 1). The analyzed *Bacillus* strains formed a homogeneous clade, together with the sequences of the reference strains, and only the three *B. licheniformis* strains (two studied and one reference) were assigned to separate clade. This may suggest a high similarity of 16S rRNA sequences of the studied strains.

Table 2. Enzymatic activity of isolated *Bacillus* strains
Aktywność enzymatyczna wyizolowanych szczepów Bacillus

Tested strain	Origin of the strain	Lipolytic activity	Proteolytic activity	Cellulolytic activity	Amylolytic activity	Chitinolytic activity
KKP 4078	Cattle slurry	+	+	++	-	nt
KKP 3893	Cattle slurry	+	++	++	-	nt
KKP 3894	Pig slurry	-	+++	+++	++	nt
KKP 3895	Pig slurry	-	-	++	+	nt
KKP 3897	Cattle slurry	+	++	+++	++	+
KKP 3898	Cattle slurry	+	++	++	-	nt
KKP 3899	Cattle slurry	+	+	+++	+++	+
KKP 3900	Cattle slurry	+	++	++	-	+
KKP 4079	Cattle slurry	+	+	++	-	nt
KKP 3901	Cattle slurry	++	++	++	+	-
KKP 3902	Cattle slurry	+	++	+	+	+
KKP 3903	Pig slurry	+	++	+++	++	+
KKP 3904	Cattle slurry	-	-	+	+	nt
KKP 4080	Soil	+	+	+	-	+
KKP 4081	Soil	+	+	++	-	nt
KKP 4082	Soil	-	+	+	-	nt
KKP 4083	Soil	-	-	-	+	nt
KKP 3905	Soil	+	+	++	+++	+
KKP 4084	Compost	-	++	++	+++	nt
KKP 4085	Soil	-	+	-	+	nt
KKP 4086	Soil	+	+++	++	+	nt
KKP 4087	Cattle slurry	+	+	+	+	-
KKP 4088	Cattle slurry	-	-	+	+	-
KKP 4089	Cattle slurry	+	+	+	-	+

+++ high degree of activity; ++ medium level of activity; + low level of activity; - lack of activity; nt – not tested

Sixteen of twenty-six isolated strains showed lipolytic activity. Nine of these strains belonged to the species *B. pumilus*, five to the species *B. subtilis*, one to *B. licheniformis* and one to *B. mycoides*. Most of the isolated strains degraded proteins and carboxymethylcellulose. Strains KKP 3894, KKP 3897, KKP 3899 and KKP 3903 exhibited a high degree of cellulolytic activity. These were mainly strains identified as the species *B. subtilis*. Among the tested isolates, the highest degree of proteolytic activity was observed in strains KKP 3894 and KKP 4086. The results of the determination of amylolytic activity on

STA medium were read after pouring iodine solution into the petri dish. Around seventeen colonies of isolates that decomposed starch, clear zones were observed on the medium colored dark blue. Strains KKP 3899, KKP 3905 and KKP 4084 were characterized by a high degree of amylolytic activity. Chitinolytic activity was only determined in eleven strains. Eight of them degraded the colloidal chitin present in the medium. These were isolates belonging to the species *B. subtilis* and *B. pumilus*, but showing a low level of tested activity.

Among the 26 tested strains, only 5 showed all the tested enzymatic activities, i.e. proteolytic, cellulolytic, amylolytic, lipolytic and chitinolytic. Four of them (KKP 3897, KKP 3899, KKP 3903, KKP 3905) belonged to the species *Bacillus subtilis*, and one (KKP 3902) to *Bacillus pumilus*.

Thirteen selected strains belonging to the species *B. subtilis*, *B. pumilus* and *B. licheniformis* were assayed using API 20 E (BioMérieux) (Tab. 3). All tested strains liquefied gelatin and gave a positive reaction for β -galactosidase (except strain KKP 3901). Most strains decomposed arginine and used citrate. Among the tested strains, the most frequently fermented sugars were: mannitol, sucrose, and amygdalin. Only strains KKP 3895 and KKP 3904, which were identified as *Bacillus licheniformis*, were able to ferment arabinose. Mainly strains of the *Bacillus subtilis* species decomposed urea. Each of the tested strains did not produce hydrogen sulfide (H_2S) and did not ferment rhamnose and melibiose. The main species that were isolated from the environmental samples examined were: *Bacillus subtilis* (5 strains), *Bacillus pumilus* (10 strains) and *Bacillus licheniformis* (4 strains). These are the species that most often inhabit the soil and occur in other natural environments, such as compost or organic fertilizers. Bacteria of the *Bacillus* genus are known for their ability to secrete many different enzymes or other proteins that perform important functions in the ecosystem [Slepecky and Hemphill, 2006]. According to the literature, the exopolysaccharides they produce, including enzymes, can be widely used in industry. Much attention is also focused on finding microorganisms with characteristics that would allow them to be used in the degradation of municipal solid waste, which is a serious problem all over the world [Farias et al. 2021]. Additionally, the advantage of using the *Bacillus* genus is that these are bacteria with fast growth and low nutritional requirements, which can inhabit many different environments [Slepecky and Hemphill 2006].

Table 3. API 20 E test results for isolated strains
Wyniki testu API 20E dla wyizolowanych szczepów

Tested strain	β -galactosidase	Arginine dihydrolase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Use of citrate	H ₂ S production	Urease	Gelatinase	Fermentation of glucose	Fermentation of mannitol	Fermentation of inositol	Fermentation of sorbitol	Fermentation of rhamnose	Fermentation of sucrose	Fermentation of melibiose	Fermentation of amygdalin	Fermentation of arabinose
KKP 4078	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
KKP 3893	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KKP 3894	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
KKP 3895	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
KKP 3897	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
KKP 3898	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
KKP 3899	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
KKP 3900	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
KKP 4079	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
KKP 3901	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
KKP 3902	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KKP 3903	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
KKP 3904	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

+ positive reaction; - negative reaction

Research on cellulolytic activity among bacteria of the *Bacillus* genus was carried out by, among others, Sivakumar et al. [2016] and Kim et al. [2011]. As in the above studies, bacteria belonging to the species *B. subtilis* and *B. licheniformis* showed cellulolytic activity in these two authors' studies. They were also isolated from natural environments, such as compost, soil or slurry. The authors emphasize how important the role of finding bacteria that decompose cellulose and hemicellulose is for the stabilization and sustainable development of society. The ability of bacteria to produce chitinases is of great importance for the production of biological preparations combating plant pathogens. They can inhibit not only the growth of pathogenic fungi, but also bacteria [Danilova and Sharipova 2020]. In the present study, the main species tested for chitinolytic activity were *B. subtilis* and *B. pumilus*. Research on the chitinolytic properties of *Bacillus* sp. bacteria was conducted by Swiontek Brzezinska et al.

[2020]. The results of their research indicate that bacteria of the *Bacillus* genus have the ability to produce not only chitinases, but also other substances that inhibit the growth of pathogenic microorganisms.

Lipolytic and proteolytic activity among *Bacillus* species has been well described by Lee et al. [2015]. In these studies, the main isolated species capable of degrading both fats and proteins were *B. subtilis*, *B. licheniformis*, and *B. amyloliquefaciens*. Compared to the results presented above for 4 isolated *B. licheniformis* strains, only one showed both proteolytic and lipolytic activity. However, one obtained strain of *B. amyloliquefaciens* had the ability only to degrade proteins. Different results may be due to the high genetic variability occurring within representatives of the same species and a different type of environment from which the species were isolated. Bacteria of the *Bacillus* genus are widely known for their ability to decompose starch. Although these are not the only amylolytic microorganisms, mainly *Bacillus* sp. strains are used to produce commercial preparations. Pietraszek and Walczak [2014] and Farias et al. [2021] described in their results that amylases produced mainly by *B. subtilis* and *B. licheniformis* strains were characterized by maintaining biological activity in a wide pH range and at high temperatures.

CONCLUSIONS

Bacteria of the genus *Bacillus* isolated from natural environments, such as compost, slurry or soil, are characterized by a wide range of enzymatic activities that may be of great importance in industry and agriculture. The species that draw the most attention are *B. subtilis*, *B. pumilus* and *B. licheniformis*. In the present research, five isolates identified as the *Bacillus* genus were obtained, which exhibit all the tested enzymatic activities, i.e. proteolytic, cellulolytic, lipolytic, amylolytic and chitinolytic. Further research on the properties of bacteria belonging to the *Bacillus* genus would make it possible to obtain bacterial strains that could be used commercially to produce preparations promoting growth of plants or enabling the reduction of odor compounds escaping from natural organic fertilizers.

REFERENCES

1. Abriouel H., Franz C.M.A.P., Omar N.B., Gálvez A. (2011). Diversity And Applications Of *Bacillus* Bacteriocins, FEMS Microbiology Reviews, 35(1), 201- 232
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2010.00244.X>
2. Baruzii F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. (2011). Antimicrobial Compounds Produced By *Bacillus* Spp. And Applications In Food. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research And Technological Advances, 2, 1102-11
3. Cieślik J., Wróblewska M. (2018). MALDI TOF MS – nowe możliwości w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. Diagnostyka Laboratoryjna, 54 (2), 99-104
<https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.7693>
4. Çevik Y.N., Ogutcu H. (2020). Identification of Bacteria in Soil by MALDI-TOF MS and Analysis of *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. with PCA. Analytical Chemistry Letters, 10(6), 784-797 DOI: 10.1080/22297928.2021.1877194
5. Danilova I., Sharipova M. (2020). The Practical Potential Of Bacilli And Their Enzymes For Industrial Production. Front. Microbiol., 11
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>
6. Díaz-Cornejo S., Otero M.C., Banerjee A., Gordillo-Fuenzalida F. (2023). Biological Properties Of Exopolysaccharides Produced By *Bacillus* Spp. Microbiological Research, 268, 127276, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127276>
7. Dobrzyński J., Jakubowska Z., Kulkova I., Kowalczyk P., Kramkowski K. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. Front Microbiol., 14, 1194606. doi: 10.3389/fmicb.2023.1194606. PMID: 37560520; PMCID: PMC10407110
8. Farias T.C., Kawaguti H.Y., Bello Koblitz M.G. (2021). Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the *Bacillus* genus, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 35, 102054, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102054>
9. Genetyka Molekularna. (1995) Pr. Zbior. pod red. P. Węgleńskiego. Polskie Wydawnictwo Naukowe
10. Kim Y-K., Lee S-C., Cho Y-Y., Oh H-J., Ko Y.H. (2011). Isolation of Cellulolytic *Bacillus subtilis* Strain from Agricultural Environments. ISRN Microbiology, 2012, 1-9 doi:10.5402/2012/650563
11. Ma, H., Li, F., Niyitanga, E., Chai, X., Wang, S., Liu, Y. (2021). The Odor Release Regularity of Livestock and Poultry Manure and the Screening of Deodorizing Strains. Microorganisms. 9, 2488 <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122488>

12. Mohar Lorbeg P., Golob M., Kramer M., Treven P. and Bogovič Matijašić B. (2021). Evaluation of Dietary Supplements Containing Viable Bacteria by Cultivation/MALDI-TOF Mass Spectrometry and PCR Identification. *Front. Microbiol.*, 12, 700138. doi: 10.3389/fmicb.2021.700138
13. Nowocień K., Sokołowska B. (2022). *Bacillus* spp. as a new direction in biocontrol and deodorization of organic fertilizers. *AIMS Environmental Science*, 9, 95-105
14. Pietraszek P., Walczak P. (2014). Charakterystyka Bakterii Z Rodzaju *Bacillus* Wyizolowanych Z Gleby. *Polish Journal Of Agronomy*, 16, 37-44
15. Puan, S.L., Erriah, P., Baharudin, M.M.Aa. *Et Al.* (2023). Antimicrobial Peptides From *Bacillus* Spp. And Strategies To Enhance Their Yield. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 107, 5569–5593 <https://doi.org/10.1007/S00253-023-12651-9>
16. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4,406-425
17. Sivakumar N., Al Zadjali A., Al Bahry S., Elshafie A., Eltayeb E.A. (2016). Isolation and characterization of cellulolytic *Bacillus licheniformis* from compost. *African Journal of Biotechnology*, 15(43), 2434-2446
18. Slepecky R.A., Hemphill H.E. (2006). The Genus *Bacillus* – Nonmedical W: Prokaryotes 4, 530-562
19. Stoica R.M., Moscovici M., Tomulescu C., Cășărică A., Băbeanu N., Popa O., Kahraman H.A. (2019). Antimicrobial Compounds Of The Genus *Bacillus*: A Review. *Rom Biotechnol Lett.*, 24(6), 1111-1119. DOI: 10.25083/Rbl/24.6/1111.1119
20. Swiontek Brzezinska M., Kalwasińska A., Świątczak J., Żero K., Jankiewicz U. (2020). Exploring the properties of chitinolytic *Bacillus* isolates for the pathogens biological control. *Microbial Pathogenesis*, 148, 104462, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104462>
21. Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101,11030-11035
22. Tamura K., Stecher G. and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
23. Zhu H., Zhang H., Xu Y., Laššáková S., Korabečná M., Neužil (2020). PCR past, present and future. *Biotechniques*, 96(4)

WPŁYW PREPARATU MANNOPROTEIN IZOLOWANYCH Z DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA TWORZENIE BIOFILMU PRZEZ WYBRANE BAKTERIE PATOGENNE I SAPROFITYCZNE

**Anna Bzducha-Wróbel, Paulina Chraniuk, Dominika Popielarz, Aleksandra
Dobrowolska, Katarzyna Pobiega, Alicja Synowiec**

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Żywności
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

anna_bzducha-wrobel@sggw.edu.pl

Otrzymano: 17 grudnia 2023

Poprawiono: 18 stycznia 2024

Zaakceptowano: 18 stycznia 2024

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu preparatu mannoprotein wyizolowanych ze ściany komórkowej szczepu drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* na tworzenie biofilmu przez wybrane bakterie mogące występować w łańcuchu produkcji żywności. Tworzenie biofilmu badano z wykorzystaniem mannoprotein w dawkach 2-10% w podłożu Lurii-Bertaniego w odniesieniu do bakterii patogennych i saprofitycznych z rodzajów *Escherichia*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* oraz *Enterococcus*. Do przeprowadzenia oznaczeń wykorzystano mikrohodowle bakterii w płytkach mikrotitracyjnych, z których po procesie 48 godzinowego namnażania komórek, usuwano komórki wolne, a powstałe na dnie płytek biofilmy wybarwiano fioletem krystalicznym, po czym dokonywano pomiaru gęstości optycznej prób. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że mannoproteiny wpływały ograniczająco lub stymulująco na tworzenie biofilmów przez badane bakterie, a efekt ten był zależny od dawki preparatu i szczepu bakterii. Szczep bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 był najbardziej wrażliwy na obecność badanego preparatu mannoprotein, ponieważ okazał się jedyną bakterią spośród badanych, dla której przy wszystkich stężeniach mannoprotein stwierdzano ograniczenie tworzenia biofilmu. Największy procent ograniczenia widoczny był przy 4% preparatu, natomiast najmniejszy dla 10% koncentracji mannoprotein. Uzyskane wyniki skłaniają do podjęcia dalszych badań nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi mannoprotein drożdży.

Słowa kluczowe: mannoproteiny drożdżowe, ograniczanie tworzenia biofilmu, bakterie Gram-dodatnie, bakterie Gram-ujemne

THE INFLUENCE OF THE MANNOPROTEIN PREPARATION ISOLATED FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST ON THE FORMATION OF BIOFILM BY SELECTED PATHOGENIC AND SAPROPHYTIC BACTERIA

Summary

The aim of the study was to determine the effect of mannoproteins isolated from the cell wall of the *Saccharomyces cerevisiae* strain of baker's yeast on the formation of biofilm by selected bacteria that may occur in the food production chain. Biofilm formation was tested using mannoproteins at doses of 2-10% in Luria-Bertani medium in relation to pathogenic and saprophytic bacteria of the genera *Escherichia*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* and *Enterococcus*.

The determinations were carried out using microcultures of bacteria in microtiter plates, from which, after 48 hours of cell multiplication, free cells were removed, and the biofilms formed at the bottom of the plates were stained with crystal violet, and then the optical density of the samples was measured. Based on the results obtained, it was concluded that mannoproteins showed a limiting or stimulating effect on the formation of biofilms by the tested bacteria, and this effect depended on the dose of the preparation and the bacterial strain. The bacterial strain *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was the most sensitive to the presence of the tested mannoprotein preparation, because it turned out to be the only bacterium among those tested for which a reduction in biofilm formation was found at all concentrations of mannoproteins. The highest percentage of reduction was visible at 4% of the preparation, while the lowest at 10% concentration of mannoproteins. The obtained results encourage further research on the antimicrobial properties of yeast mannoproteins.

Keywords: yeast mannoproteins, limiting biofilm formation, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria

WSTĘP

Ściana komórkowa drożdży stanowi od 15 do 30% suchej masy komórki w zależności od środowiska wzrostu i gatunku drożdży [Orlean, 2012]. Zewnętrzną warstwę tego organelum tworzą mannoproteiny, których rodzaj, ilość i charakterystyka chemiczna zmienia się w zależności od warunków wzrostu oraz w czasie hodowli [Klis i wsp., 2002]. Struktura

chemiczna zewnętrznej warstwy mannoprotein może być stosowana jako kryterium taksonomiczne drożdży [Bastos i wsp., 2022]. Związki te pełnią różne funkcje w komórkach drożdży, przykładowo uczestniczą w procesie budowy ściany komórkowej, pełniąc rolę odpowiednich hydrolaz i transglikozydaz, odpowiadają za procesy aglutynacji i flokulacji komórek, stabilność osmotyczną komórek drożdży, a jeszcze inne odpowiadają za połączenia krzyżowe między składnikami budulcowymi ściany komórkowej drożdży [Orlean, 2012, Klis i wsp., 2002, Bastos i wsp., 2022].

Mannoproteiny ściany drożdży z rodzaju *Saccharomyces* są polipeptydami wysoce glikozylowanymi, zawierając wagowo od 50 do 95% węglowodanów. Można je podzielić na N-połączone mannoproteiny, składające się z 10% białka i 90% reszty węglowodanowej, zbudowanej z 50 - 200 jednostek mannozy połączonych wiązaniami ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-, ($\alpha 1 \rightarrow 2$)- i ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-glikozydowymi [Lesage i Bussey, 2006]. Mannoproteiny O-przyłączone mają wyższą zawartość ugrupowania białkowego (50%) połączonego z częścią cukrową za pośrednictwem hydroksylowych łańcuchów bocznych reszt seryny lub treoniny. O-Mannoproteiny charakteryzują się krótkimi łańcuchami mannozy (do pięciu jednostek, z dwoma pierwszymi resztami połączonymi poprzez wiązania ($\alpha 1 \rightarrow 2$)- i kolejnymi poprzez wiązania ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-glikozydowe). W strukturze mannoprotein ściany komórkowej drożdży występują fosforylowane reszty mannozy, co nadaje mannoproteinom ściany komórkowej ładunek ujemny netto, istotny dla zatrzymywania wody oraz flokulacji i ochrony drożdży [Bastos i wsp., 2022].

Mannoproteiny izolowane z drożdży znajdują zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz paszowym. Wykazują szereg właściwości bioaktywnych, w tym wspomagają prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego organizmu ludzkiego oraz zwierzęcego, m.in. poprzez wspomaganie aktywności makrofagów czy cytokin, stymulację wzrostu bakterii mlekowych, w tym szczepów probiotycznych i jednoczesną aktywność przeciwdrobnoustrojową, włączając zdolność ograniczania tworzenia biofilmów przez bakterie zdolne do tego procesu [Fernandez i wsp., 2002, Pietrella i wsp., 2006, Ha i wsp., 2006, Tiago i wsp., 2012, Santovito i wsp., 2019, Saidi i wsp., 2019, Bzducha-Wróbel i wsp. 2022].

Biofilmem nazywany jest zbiór komórek mikroorganizmów otoczonych macierzą zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (z ang. EPS – extracellular polymeric substances), głównie z polisacharydów. Dzięki tej macierzy biofilm jest silnie przytwierdzony do różnych rodzajów powierzchni, np. żywych tkanek organizmów, bądź powierzchni nieożywionych (np., rurociągów przemysłowych, powierzchni produkcyjnych, urządzeń

medycznych, i innych) [Donlan, 2002]. Podstawowym zjawiskiem, który odpowiada za proces tworzenia tej struktury jest adhezja. Biofilm bakteryjny wykazuje odporność na szereg czynników zewnętrznych, w tym na antybiotyki oraz naturalne mechanizmy obronne gospodarza. Odporność ta jest uzależniona od wielu czynników, m.in. budowy zewnętrznych struktur komórek bakteryjnych czy jednorodności omawianej struktury [Singh i wsp., 2017]. Dojrzałe biofilmy charakteryzują się złożoną, trójwymiarową strukturą stanowiącą mikrosrodowiska, różniące się między sobą pod względem osmolarności czy gęstości komórek. Dzięki takiej niejednorodności w obrębie jednego biofilmu tworzą się różne fenotypy komórkowe bakterii, które dodatkowo wzmacniają odporność tej struktury na działanie, m.in. leków lub środków dezynfekcyjnych [Fux i wsp., 2005]. Poszukiwanie rozwiązań ograniczania tworzenia biofilmów bakteryjnych jest stale aktualnym problemem naukowym. Wynika to z faktu, że zdolność tworzenia biofilmów przez różne bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne stanowi jeden z bardzo ważnych czynników wirulencji bakterii. Ponadto w przemyśle spożywczym biofilmy stanowią źródło zanieczyszczeń krzyżowych, dlatego poszukiwane są skuteczne metody ograniczania tworzenia tych struktur przez komórki mikroorganizmów na różnych powierzchniach. Jednym z proponowanych kierunków ograniczania tworzenia biofilmów jest wykorzystanie naturalnych związków powierzchniowo czynnych lub o aktywności enzymatycznej. Wśród tych pierwszych można wyróżnić mannoproteiny pozyskiwane z komórek drożdży. Badania przeprowadzone na zwierzętach przez Kogan i Kochler [2007] wykazały, że preparaty izolowane ze ściany komórkowej drożdży wspierają odporność organizmu poprzez ograniczanie adhezji patogenów do nabłonka śluzowego na drodze blokowania oddziaływania fimbrii bakteryjnych z komórkami nabłonka.

Celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy było określenie, czy mannoproteiny wyizolowane z biomasy drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* wpływają na proces tworzenia biofilmu przez wybrane szczepy bakterii patogennych i saprofitycznych z rodzajów *Escherichia*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, oraz *Enterococcus*.

MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

Namnożenie biomasy drożdży w biofermentorze

Materiałem biologicznym wykorzystanym w badaniach był szczep drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* 102. Drożdże otrzymano z Muzeum Czystych Kultur Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii Żywności Instytutu Nauk o Żywności Szkoły Głównej

Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Hodowlę prowadzono w biofermentorze BioFlo 120 (Eppendorf, Szwecja) w podłożu składającym się z 2% peptonu drożdżowego; 2% glukozy; 1% ekstraktu drożdżowego (YPG, BTL Sp. z o.o.) z dodatkiem jonów magnezu Mg^{2+} 1,25 g/L ($MgSO_4 \times 7 H_2O$). Końcowa objętość hodowli wynosiła 3 L, przy inokulum stanowiącym 10% (48 godzinna hodowla drożdży w podłożu YPG). Podłoże sterylizowano w 121°C przez 45 min (sterylizator parowy HG80 HICLAVE). Hodowlę w bioreaktorze prowadzono przez 48h w temp. 28°C przy prędkości mieszania 200 rpm i natlenieniu 2,0 v/v. Cykl hodowli drożdży wykonywano w dwóch powtórzeniach. Namnożoną biomasę komórkową skolekcjonowano odwirowując hodowlę w jałowych falkonach (3500 rpm/ 10°C/ 10 min, Centrifuge 5804R, Eppendorf, Szwecja). Biomasę wykorzystano bezpośrednio do izolacji mannoprotein.

Izolacja mannoprotein

Izolacja mannoprotein ze ściany komórkowej drożdży *S. cerevisiae* 102 została przeprowadzona zgodnie z metodyką opisaną przez Walencką i wsp. [2007]. Przygotowano 20% zawiesinę komórek drożdży w buforze składającym się z 0,1 M cytrynianu potasu i 0,02 M pirosiarczynu potasu (Avantor Performance Materials, Polska). Końcowe pH buforu ustalono na poziomie 7,0. Przygotowaną w ten sposób zawiesinę biomasy drożdży autoklawowano w temperaturze 121°C przez 2 godziny (sterylizator parowy HG80 HICLAVE). Po autoklawowaniu próby ostudzono i wirowano przez 10 minut przy prędkości 5000 rpm (wirówka Centrifuge 5804R, Eppendorf, Szwecja). Następnie do uzyskanego supernatantu dodawano 3 objętości zimnego 96% etanolu (Avantor Performance Materials, Polska) zawierającego 1% dodatek kwasu octowego (Avantor Performance Materials, Polska). Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze 4°C przez 16 godzin. Precypitat kolekcjonowano na drodze wirowania (10 000 rpm/5 minut), a następnie poddawano dializie i suszeniu liofilizacyjnemu (Liofilizator Christ LCG Gamma 1–16 LSC, Wielka Brytania). Uzyskany preparat poddawano charakterystyce składu chemicznego uwzględniając zawartość białka, cukrów ogółem i β -(1,3/1,6)-glukanu. Zawartość białka oznaczono metodą Kjeldahla po mineralizacji prób w aparacie Buchi Labortechnik AG model K-449 w obecności katalizatora Kjeltabs CT/3.5 i 10 cm³ 96% kwasu siarkowego (Avantor Performance Materials, Polska). Mineralizacja odbywała się w płaszczu grzejmym ok. 5 godzin (Bzducha-Wróbel i wsp. 2022). Po destylacji w aparacie Buchi Kjelflex K-360 (Labortechnik AG) zawartość odbieralnika miareczkowano przy pomocy 0,1M HCl (Avantor Performance Materials, Polska), przy wykorzystaniu aparatu Titroline 5000 (Si Analytics,

Niemcy). Objętość HCl zużytego podczas miareczkowania przeliczono na zawartość azotu w próbce, a ten na zawartość białka, stosując współczynnik przeliczeniowy azotu na białko wynoszący 6,25. Oznaczenie zawartości cukrów redukujących ogółem w otrzymanym preparacie glikoprotein przeprowadzono za pomocą metody kolorymetrycznej z kwasem dinitrosalicylowym (DNS, Sigma-Aldrich) po uprzedniej hydrolizie preparatu z wykorzystaniem kwasu 72% kwasu siarkowego (Bzducha-Wróbel i wsp. 2022). Absorbancję prób mierzono przy 540 nm, wobec próby ślepej (Spektrofotometr UV/VIS Multiskan Sky, ThermoFischer Scientific). Zawartość cukrów w próbkach obliczano na podstawie krzywej wzorcowej dla mannozy ($y = 2,7625 \times 0,0622$ [mg/cm³]). W celu oznaczenia zawartości β -(1,3/1,6)-glukanu w otrzymanym preparacie, który mógł stanowić substancję potencjalnie ekstrahowaną razem z mannoproteinami, a więc zanieczyszczającą preparat, wykorzystano test Enzymatic Yeast Beta Glucan, firmy Megazyme postępując zgodnie z instrukcją producenta.

Ocena wpływu wyizolowanego preparatu mannoprotein na tworzenie biofilmów bakteryjnych

Ocenę wpływu preparatu mannoprotein na tworzenie biofilmów bakteryjnych badano dla stężeń mannoprotein w podłożu hodowlanym z zakresie od 2 do 10%. W tym celu przygotowano podłoże Lurii-Bertaniego, Merck (10 g/L chlorku sodu, 10 g/L tryptonu, 5 g/L ekstraktu drożdżowego; pH = 7,0), do którego dodawano preparat mannoprotein w odpowiednim stężeniu i poddawano sterylizacji w 121°C/ 20 min (sterylizator parowy HG80 HIClave). Do badań wykorzystano następujące szczepy bakterii: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* PCM 543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Szczepy bakterii otrzymano z Muzeum Czystych Kultur Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii Żywności Instytutu Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Hodowlę prowadzono w 96-dółkowych mikropłytkach titracyjnych (300 μ l podłoża hodowlanego + 12 μ l zawiesiny komórek bakteryjnych). Inokulum bakteryjne ustalano na poziomie 10^5 kom/cm³ hodowli. Hodowlę prowadzono przez 48 godzin w temp. 37°C (termostat Q-CELL 240 (POL-LAB, Polska). Po wskazanym czasie inkubacji płyn pohodowlany ostrożnie zbierano znad osadu, a w kolejnym kroku do celek dodawano 100 μ l podłoża, aby wymyć wolne komórki bakterii. Następnie osad przemywano ostrożnie 3 razy buforowaną fosforanem solą fizjologiczną

(bufor PBS, Sigma-Aldrich), każdorazowo po 300 μ l. Kolejnym krokiem było 30 minutowe barwienie biofilmu obecnego na dnie studzienek z zastosowaniem 0,1% fioletu krystalicznego (roztwór przygotowany w 96% etanolu z dodatkiem n-propanolu). Następnie studzienki przemywano kilkakrotnie po 300 μ l buforu PBS, aby usunąć nadmiar barwnika. W następnym kroku do studzienek наносono 100 μ l 96% etanolu i inkubowano 30 min w celu rozpuszczenia i wyekstrahowania fioletu krystalicznego związanego z biofilmem. Następnie dokonywano pomiaru spektrofotometrycznego prób przy długości fali 595 nm w spektrofotometrze UV/VIS Multiskan SkyHigh firmy ThermoFischer Scientific. Zdolność tworzenia biofilmów przez badane bakterie w obecności zastosowanych stężeń mannoprotein (stymulacja lub ograniczenie tego procesu) wyznaczano w odniesieniu do próby kontrolnej (pożywka Lurii-Beratnii bez dodatku preparatu mannoprotein zaszczerpione kulturą bakteryjną), dla której wyniki absorbancji przyjęto jako 100%.

Analiza wyników

Uzyskane wyniki poddano obliczeniom z wykorzystaniem pakietu Microsoft Office 365 wyznaczając średnie i odchylenia standardowe w programie kalkulacyjnym Excel. Wyniki analizowano statystycznie za pomocą programu STATISTICA V.13.1 wykonując analizę wariancji metodą ANOVA (test HSD Tuckey'a) przy poziomie istotności $\alpha = 0.05$.

WYNIKI

Wyizolowany preparat mannoprotein drożdży *S. cerevisiae* 102 składał się z ok. 31,7% białka, 65% cukrów ogółem (tabela 1). Zawierał też śladowe ilości β -glukanu (ok. 0,3%).

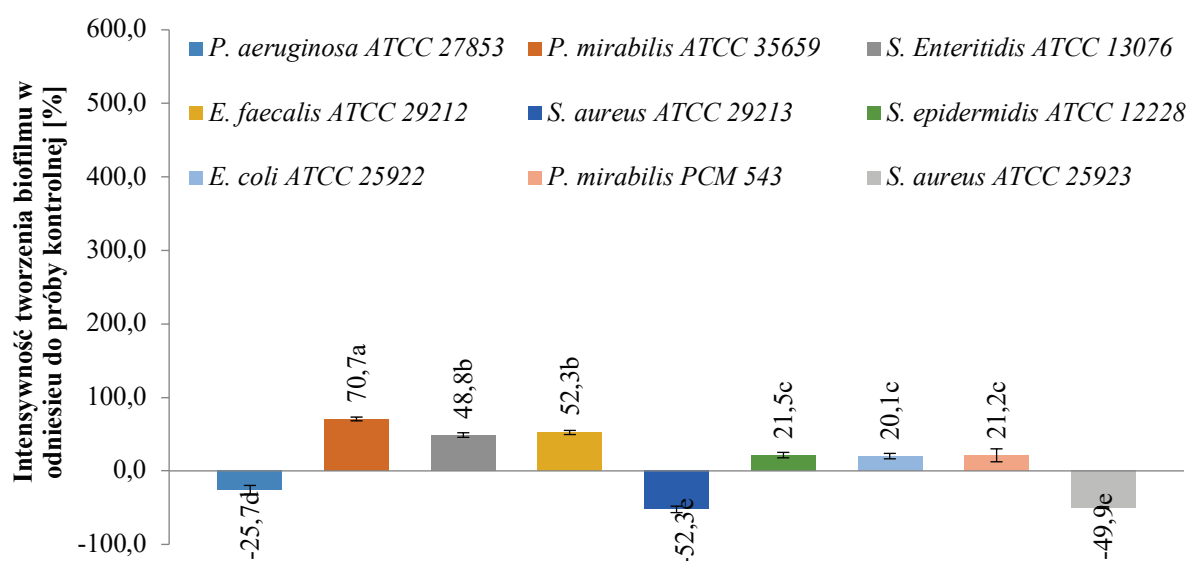
Tabela 1. Charakterystyka składu chemicznego wyizolowanego preparatu mannoprotein ściany komórkowej drożdży *S. cerevisiae* 102
Characteristics of the chemical composition of the isolated preparation of mannoproteins of the cell wall of the yeast S. cerevisiae 102

Składnik	Zawartość [%]
Białko	31,7 $\pm$ 1,0
Cukry ogółem	65,0 $\pm$ 3,3
β (1,3)/(1,6)-glukan	0,3 $\pm$ 0,1

Wpływ preparatu mannoprotein wyizolowanego z biomasy drożdży *S. cerevisiae* na tworzenie biofilmów przez bakterie z rodzajów *Escherichia*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* oraz *Enterococcus* badano stosując preparat w stężeniach od 2 do

10% masowych. Uzyskane wyniki zaprezentowano na rysunkach 1-5. Wyniki wyrażano jako procent stymulacji lub ograniczenia tworzenia biofilmu przez badane bakterie w podłożach modelowych z dodatkiem mannoprotein w odniesieniu do próby kontrolnej, dla której wynik uznawano za 100% wydajności tworzenia biofilmu. Ograniczenie tworzenia biofilmu występowało dla trzech spośród dziewięciu analizowanych bakterii, tj.: *S. aureus* ATCC 29213 i *S. aureus* ATCC 25923 oraz *P. aeruginosa* ATCC 27853 (25,7%), gdy preparat zastosowano w dawce 2%. Istotnie najwyższy stopień ograniczenia tworzenia biofilmu w obecności 2% preparatu odnotowano w odniesieniu do hodowli bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (odpowiednio: 52,3% i 49,9%).

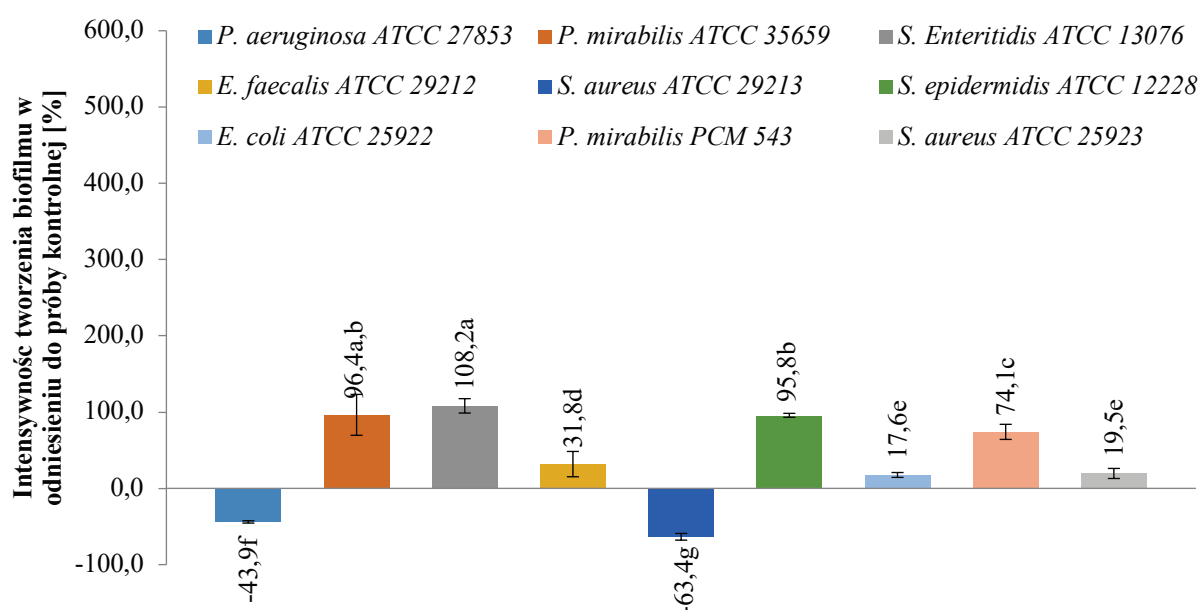
W przypadku bakterii *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *E. faecalis* ATCC 29212 oraz *S. epidermidis* ATCC 12228 odnotowano, że dodatek 2% preparatu mannoprotein wykazywał istotną stymulację procesu tworzenia biofilmu w odniesieniu do próby kontrolnej. Tworzenie biofilmu przy tym stężeniu mannoprotein było w największym stopniu stymulowane w przypadku szczepu *P. mirabilis* ATCC 35659 (ok. 70,7 %).



Rysunek 1. Porównanie tworzenia biofilmu w zależności od szczepu bakterii hodowanych w podłożu Luria-Bertani z dodatkiem 2% preparatu mannoprotein; a,b,c – wyniki oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Comparison of biofilm formation depending on the strain of bacteria grown in Luria-Bertani medium with the addition of 2% mannoprotein preparation; a, b, c – results marked with the same letters do not differ significantly at the significance level of $\alpha = 0.05$

W obecności 4% preparatu mannoprotein, podobnie jak przy stężeniu 2%, istotne ograniczenie procesu tworzenia biofilmu było zauważalne w hodowli bakterii *S. aureus* ATCC 29213 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 (43,9%), przy czym istotnie największy stopień ograniczenia tworzenia biofilmu stwierdzano dla pierwszej z wymienionych szczepów bakterii (63,4%). W przypadku zjawiska stymulacji analiza statystyczna wyników potwierdziła, że najintensywniejsze tworzenie biofilmu było widoczne w hodowli bakterii *S. Enteritidis* ATCC 13076 (108,2%), najmniejszą stymulację, ale również istotną statystycznie obserwowano w przypadku bakterii *E. coli* ATCC 25922 (17,6%). Wyniki przedstawiono na rysunku 2.

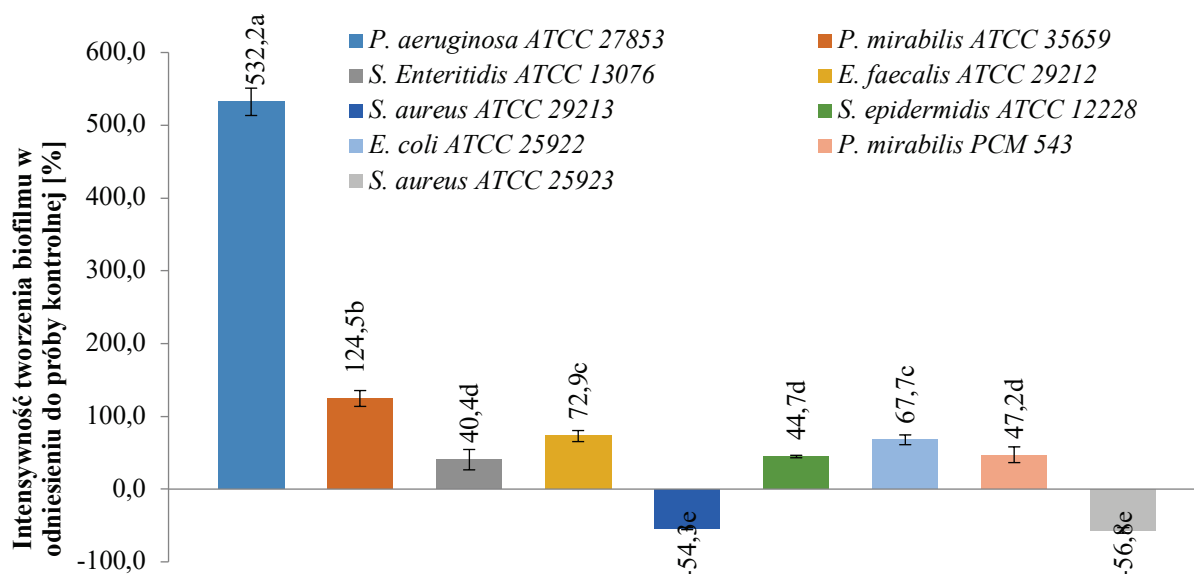


Rysunek 2. Porównanie tworzenia biofilmu w zależności od szczepu bakterii hodowanych w podłożu Luria-Bertani z dodatkiem 4% preparatu mannoprotein; a,b,c – wyniki oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Comparison of biofilm formation depending on the strain of bacteria grown in Luria-Bertani medium with the addition of 4% mannoprotein preparation; a, b, c – results marked with the same letters do not differ significantly at the significance level of $\alpha = 0.05$

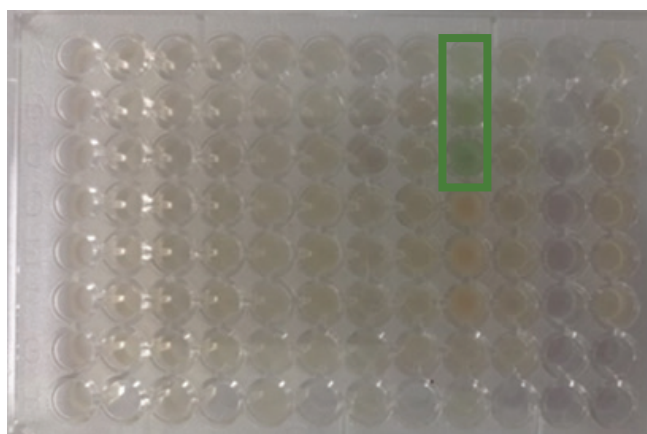
Przy zastosowaniu 6% preparatu mannoprotein istotne ograniczenie tworzenia biofilmu stwierdzono tylko w przypadku dwóch szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (*S. aureus* ATCC 29213 oraz *S. aureus* ATCC 25923, odpowiednio o 54,3% i 56,8%). Uzyskane dane zaprezentowano na rysunku 3. Wśród bakterii, dla których tworzenie biofilmu przy stężeniu 6% mannoprotein uległo istotnej intensyfikacji w odniesieniu do próby kontrolnej, największy procent stymulacji dotyczył bakterii *P. aeruginosa* ATCC 27853 (532,2%), co jest interesujące ze względu na fakt, że przy 2 i 4% stężeniu preparatu zaobserwowano ograniczenie tworzenia

biofilmu przez tę bakterię. Należy zauważyć, że preparat, niezależnie od dawki, zaburzał wytwarzanie zielonego barwnika przez badane bakterie *P. aeruginosa* (rys. 4), bowiem w obecności preparatu komórki go nie wytwarzały.



Rysunek 3. Porównanie tworzenia biofilmu w zależności od szczepu bakterii hodowanych w podłożu Luria-Bertani z dodatkiem 6% preparatu mannoprotein; a,b,c – wyniki oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Comparison of biofilm formation depending on the strain of bacteria grown in Luria-Bertani medium with the addition of 6% mannoprotein preparation; a, b, c – results marked with the same letters do not differ significantly at the significance level of $\alpha = 0.05$

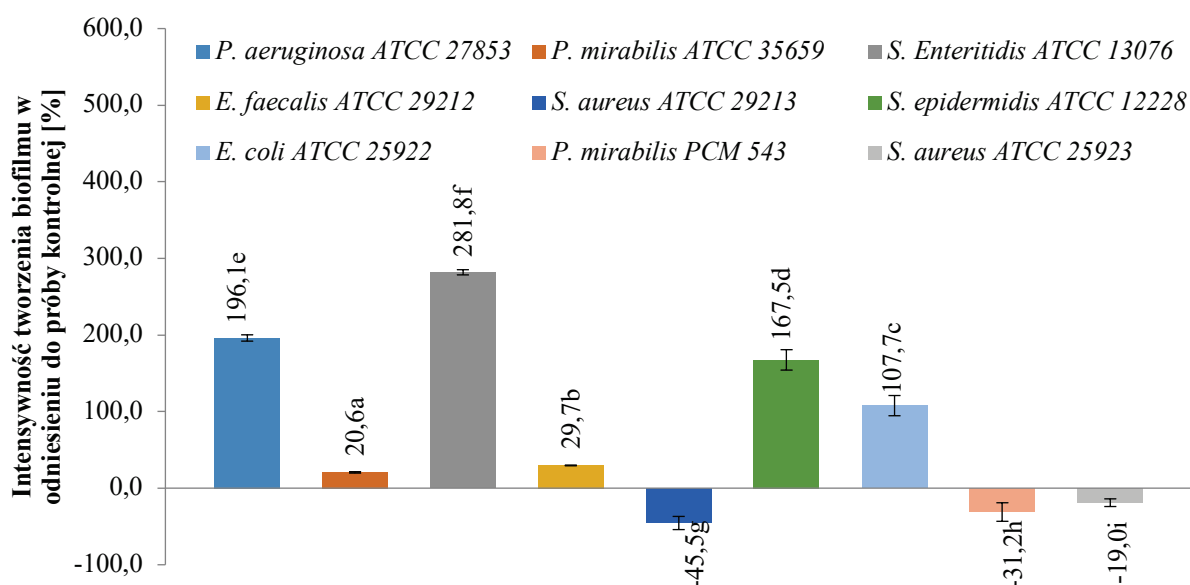


Rysunek 4. Zdjęcie przykładowej płytki z hodowlami bakterii w podłożach kontrolnym i zawierających 4, 6, 8 i 10% preparatu. Zieloną linią zaznaczono hodowle *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 w podłożu kontrolnym oraz kolejno w podłożach z dodatkiem 4 -10% mannoprotein.

*Photo of an example plate with bacterial cultures in control media and media containing 4, 6, 8 and 10% of the preparation. The green line marks the cultures of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in the control medium and subsequently in the medium supplemented with 4-10% mannoproteins.*

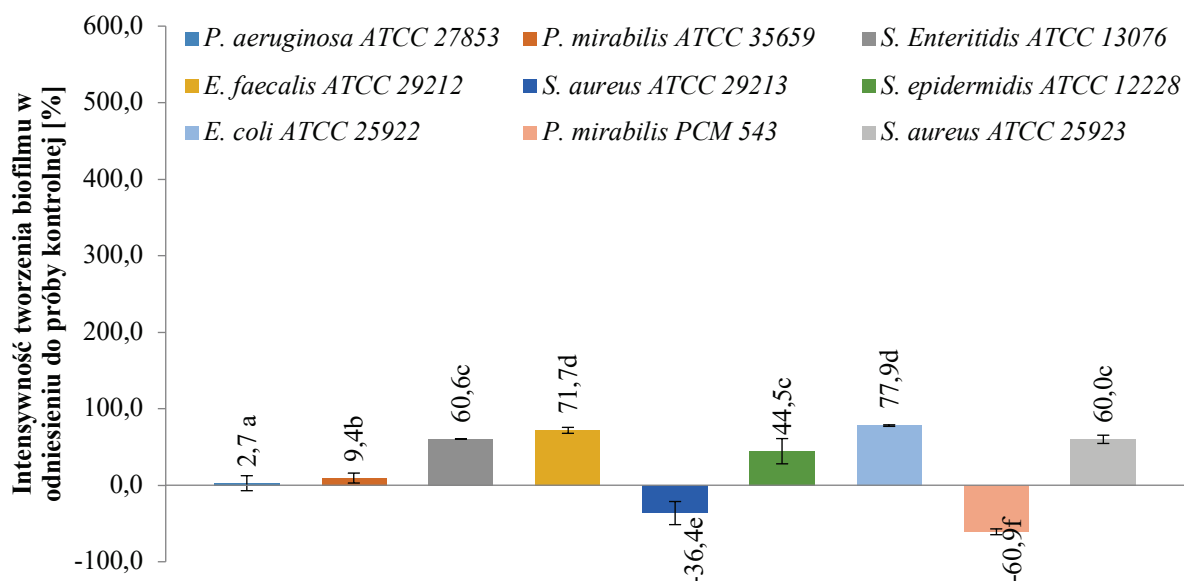
Tworzenie biofilmu przez badane bakterie przy stężeniu preparatu mannoprotein równym 8% było stymulowane w przypadku hodowli siedmiu z dziewięciu analizowanych bakterii. Największą istotną statystycznie stymulację tworzenia biofilmu zauważono dla bakterii *S. Enteritidis* ATCC 13076 (281,8%), a najmniejszą w przypadku *P. mirabilis* ATCC 35659 (20,6%). Bakterią, dla której procent ograniczenia tworzenia biofilmu przez preparat mannoprotein w dawce 8% w podłożu był istotnie najwyższy okazał się szczep *S. aureus* ATCC 29213 (45,5%). Odnotowano także po raz pierwszy istotne statystycznie ograniczenie tworzenia biofilmu dla bakterii *P. mirabilis* PCM 543 (19,0%). Wyniki przedstawiono na rysunku 5.

Wyniki dotyczące stymulacji lub ograniczenia tworzenia biofilmu przez badane bakterie przy stężeniu preparatu mannoprotein równym 10% przedstawiono na rysunku 6. Stężenie to istotnie stymulowało tworzenie biofilmu przez siedem spośród dziewięciu wybranych do badań bakterii w różnym zakresie, przy czym największy statystycznie procent stymulacji dotyczył szczepu *E. faecalis* ATCC 29212 i *E. coli* ATCC 25922 (odpowiednio 71,7% i 77,9%). W przypadku pozostałych dwóch bakterii stwierdzano ograniczenie tworzenia biofilmu.



Rysunek 5. Porównanie tworzenia biofilmu w zależności od szczepu bakterii hodowanych w podłożu Luria-Bertani z dodatkiem 8% preparatu mannoprotein; a,b,c – wyniki oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Comparison of biofilm formation depending on the strain of cultured bacteria in Luria-Bertani medium with the addition of 8% mannoprotein preparation; a, b, c – results marked with the same letters do not differ significantly at the significance level of $\alpha = 0.05$.



Rysunek 6. Porównanie tworzenia biofilmu w zależności od szczepu bakterii hodowanych w podłożu Luria-Bertani z dodatkiem 10% preparatu mannoprotein; a,b,c – wyniki oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Comparison of the biofilm formation depending on the strain of bacteria grown in Luria-Bertani medium with the addition of 10% mannoprotein preparation; a, b, c – results marked with the same letters do not differ significantly at the significance level of $\alpha = 0.05$.

Bakterie *S. aureus* ATCC 29213 były jedynym szczepem spośród badanych, dla którego przy wszystkich stężeniach preparatu mannoprotein stwierdzano ograniczenie tworzenia biofilmu. Istotnie największy procent ograniczenia widoczny był przy 2% stężenia preparatu (63,4%), natomiast najmniejszy przy 10% koncentracji mannoprotein (36,4%).

DYSKUSJA

Właściwości funkcjonalne preparatów mannoprotein pochodzenia drożdżowego, w tym aktywność ograniczania tworzenia biofilmów bakteryjnych, właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz prebiotyczne, zależą od charakterystyki chemicznej tych polimerów. Ta determinowana jest m.in. warunkami i czasem hodowli drożdży oraz ich podłożem genetycznym (Bzducha-Wróbel i wsp. 2022). Preparaty ścian komórkowych drożdży oraz biomasa drożdży są stosowane jako alternatywa dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu w celu poprawy zdrowia i wydajności zwierząt gospodarskich. Polimery ściany drożdży, takie jak mannoproteiny, wykazują zdolność do wiązania bakterii enteropatogennych oraz właściwości immunomodulacyjne [Santovito i wsp., 2019]. Działanie probiotyczne drożdży może wynikać m.in. właśnie z adhezji bakterii chorobotwórczych do powierzchni probiotyków zamiast do receptorów jelitowych, co zapobiega chorobom układu

pokarmowego [Tiago i wsp. 2012]. Można przypuszczać, że taka interakcja zapobiega także tworzeniu biofilmów przed drobnoustroje chorobotwórcze na różnych powierzchniach (ożywionych i nieożywionych), do których struktury komórkowe bakterii prawdopodobnie nie przylegają, wiążąc się natomiast do komórek drożdży lub preparatów polimerów ścian komórkowych tych mikroorganizmów. Według Saidi i wsp. [2019] mannoproteiny są odpowiedzialne za hamowanie powstawania i dyspersję biofilmów bakteryjnych.

Dostępne są nieliczne dane literaturowe dotyczące oceny wpływu preparatów mannoprotein izolowanych z biomasy drożdży na tworzenie biofilmu przez bakterie. Walencka i wsp. [2007] badali wpływ preparatu mannoprotein, wyizolowanych z drożdży *S. cerevisiae* używanych do produkcji wina Tokaj, na tworzenie biofilmu przez wybrane bakterie. Substancją użytą do barwienia wytworzonego przez bakterie biofilmu był formazan, a intensywność jego barwy po połączeniu się z biofilmem mierzono jako absorbancję przy długości fali równej 550 nm. Autorzy odnotowali ograniczenie tworzenia biofilmu przez szczep bakterii *S. aureus* ATCC 29213 (12-87%), gdy komórki namnażano w podłożu hodowlanym z dodatkiem 100 mg/ml mannoprotein, a więc przy stężeniu 10% preparatu. Uzyskane przez cytowanych autorów wyniki dotyczą tego samego szczepu *S. aureus*, który zdecydowano się objąć badaniami również w niniejszej pracy. W przypadku naszych badań, szczep ograniczał wytwarzanie biofilmu w całym zakresie badanych stężeń mannoprotein, w największym stopniu przy dawce 4% preparatu. Jak już wspomniano, preparaty mannoprotein mogą się różnić składem i charakterystyką struktury chemicznej w zależności od rodzaju drożdży oraz warunków hodowli [Bzducha-Wróbel i wsp. 2022], co może determinować różnice w dawce preparatu, która ograniczała wytwarzanie biofilmu. Wykazano, że supernatant i lizat komórek *S. cerevisiae* zmniejszały tworzenie biofilmu bakteryjnego odpowiednio o 48% i 69% [Ghorbani i wsp. 2018]. Tworzenie biofilmu przez bakterie *P. aeruginosa* ATCC 27853 było hamowane obecnością 2% i 4% mannoprotein w podłożu hodowlanym wskazanych bakterii, odpowiednio o 25,7% i 43,9% [Ali i Ali, 2019]. Mahmood [2018] wykazał, że biosurfaktant izolowany z biomasy *S. cerevisiae* wykazał wysoki efekt hamujący wobec *Corynebacterium urelyticum*.

Grupując bakterie pod kątem ich gramowości można zauważyć, że w przypadku testowanych w niniejszej pracy bakterii Gram-ujemnych, wpływ zastosowanych stężeń preparatu mannoprotein na ograniczenie lub stymulację tworzenia biofilmu przez te bakterie był bardziej zmienny w porównaniu z bakteriami Gram-dodatnimi, tzn. występowały większe różnice pomiędzy zakresem stymulacji lub ograniczenia tworzenia biofilmu dla różnych stężeń preparatu mannoprotein (szczególnie w przypadku *P. aeruginosa* ATCC 27853 oraz

S. Enteritidis ATCC 13076). Różnice w aktywności badanego preparatu mannoprotein w odniesieniu do ograniczania tworzenia biofilmów przez testowane bakterie mogły wynikać m.in. z odmiennej budowy ścian komórkowych szczepów oraz zdolności metabolizowania mannoprotein. Analizując wpływ wszystkich badanych w niniejszej pracy stężeń preparatu mannoprotein na tworzenie biofilmu przez testowane bakterie można zauważyć, że w przypadku niektórych szczepów silniej ograniczał wytwarzanie biofilmu preparat obecny w podłożu hodowlanym w mniejszym stężeniu. Mogło być to powiązane z utrudnionym rozpuszczaniem się mannoprotein w podłożu Luria-Bertani przy wyższych stężeniach preparatu (wraz ze zwiększeniem stężenia wzrastała mętność roztworu). Przypuszcza się, że przy większych koncentracjach mannoprotein, cząsteczki preparatu łączą się ze sobą w agregaty, co ogranicza ich interakcję z komórkami bakterii i osłabia oddziaływanie preparatu na tworzenie biofilmu przez bakterie. Obserwowane zależności wymagają dalszych, bardziej szczegółowych badań, które pozwolą zweryfikować postawione hipotezy.

WNIOSKI

1. Preparat mannoprotein wyizolowany z biomasy drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* ograniczał lub intensyfikował tworzenie biofilmu przez badane bakterie patogenne oraz saprofityczne z gatunków *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* i *P. mirabilis*.
2. Efekt stymulacji lub ograniczenia tworzenia przez badane bakterie biofilmu był zależny od dawki preparatu mannoprotein oraz szczepu bakterii.
3. Tworzenie biofilmu przez *S. aureus* ATCC 29213 było ograniczone w obecności wszystkich wykorzystanych w niniejszej pracy stężeń preparatu mannoprotein. W największym stopniu (63,4%) wytwarzanie biofilmu przez omawianą bakterię było ograniczone przez dawkę preparatu równą 4%.
4. Preparat wykazywał największą stymulację tworzenia biofilmu w przypadku bakterii *P. aeruginosa* ATCC 27853, gdy w podłożu hodowlanym znajdowało się 6% preparatu mannoprotein.
5. Uzyskane wyniki skłaniają do kontynuacji badań nad właściwościami mannoprotein drożdży w zakresie ich właściwości ograniczania tworzenia biofilmu przez bakterie patogenne i saprofityczne, np. w układach modelowych uwzględniających powstawanie biofilmu na różnych rodzajach powierzchni, także w odniesieniu do kokultur bakteryjnych. Ciekawe jest także określenie właściwości zapobiegania powstawaniu biofilmów przez preparaty izolowane z biomasy innych gatunków drożdży.

PIŚMIENNICTWO

1. Ali L.H., Ali W.S. (2019). Production and antibacterial activity of biosurfactant from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Phys. Conf. Ser., 1234: Article 012080
2. Bastos R., Oliveira P.G., Gaspar V.M., Mano J.F., Coimbra M.A., Coelho E. (2022). Brewer's yeast polysaccharides - A review of their exquisite structural features and biomedical applications, Carbohydr. Polym., 277:118826
3. Bzducha-Wróbel A., Farkaš P., Chraniuk P., Popielarz D., Synowiec A., Pobiega K., Janowicz M. (2022). Antimicrobial and prebiotic activity of mannoproteins isolated from conventional and nonconventional yeast species - the study on selected microorganisms. World J. Microbiol. Biotechnol., 38(12): 1-14, article no. 256, DOI:10.1007/s11274-022-03448-5
4. Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerg. Infect. Dis., 8 (9): 881-890
5. Fernandez, F., Hinton, M., Van Gils, B. (2002). Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. Avian Pathol., 31: 49–58
6. Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol., 13(1): 34-40
7. Ghorbani Z., Owlia P., Marashi M.A., Saderi H. (2018). Effect of supernatant and cell lysate extracts of *Saccharomyces cerevisiae* on biofilm and alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. Iran J. Med. Microbiol., 12: 189-198
8. Ha C.H., Yun C.W., Paik H.D., Kim S.W., Kang C.W., Hwang H.J., Chang H.I. (2006). Preparation and analysis of yeast cell wall mannoproteins, immune enhancing materials, from cell wall mutant *Saccharomyces cerevisiae*. J. Microbiol. Biotechnol., 16(2), 247-255
9. Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev, 26(3): 239-256
10. Kogan G., Kocher A. (2007). Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. Livest Sci., 109(1-3): 161-165
11. Lesage G., Bussey H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70(2):317-343
12. Li, J., Karboune, S. (2019). Characterization of the composition and the techno-functional properties of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell walls. Food Chem., 297: Article 124867

13. Mahmood N.N. (2018). Effect of biosurfactants purified from *Saccharomyces cerevisiae* against *Corynebacterium urealyticum*. J. Pharm. Sci. Res., 10(3): 481-486
14. Orlean P. (2012). Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Genetics, 192(3): 775 – 818
15. Pietrella D., Bistoni G., Corbucci C., Perito S., Vecchiarelli A. (2006). *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. Cell Microbiol, 8(4): 602–612
16. Saidi N., Owlia P., Marashi S.M.A., Saderi H. (2019). Inhibitory effect of probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* on biofilm formation and expression of α -hemolysin and enterotoxin A genes of *Staphylococcus aureus*. Iran J. Microbiol., 11: 246
17. Santovito E., Greco D., Marquis V., Raspoet R., D’Ascanio V., Logrieco A.F., Avantaggiato G. (2019). Antimicrobial Activity of Yeast Cell Wall Products Against *Clostridium perfringens*. Foodborne Pathog Dis, 16(9): 1-10
18. Singh S., Singh S. K., Chowdhury I., Singh R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. Open Microbiol. J., 11: 53-62
19. Tiago F.C.P., Martins F.S., Souza E.L.S., Pimenta P.F.P., Araujo H.R.C., Castro I.M., Branda R.L., Nicoli J.R. (2012). Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. J. Medical. Microbiol., 61: 1194–1207
20. Walencka E., Wieckowska-Szakiel M., Rozalska S., Sadowska B., Rozalska B.A. (2007). Surface-active agent from *Saccharomyces cerevisiae* influences staphylococcal adhesion and biofilm development. Z Naturforsch C, J. Biosci., 62(5-6): 433-438
21. Zlotnik H., Pilar Fernandez M., Bowers B., Cabib E. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. J. Bacteriol., 159(3): 1018-1026

PREFERENCJE KONSUMENTÓW NA TEMAT BATONÓW ZBOŻOWYCH O WYSOKIEJ ZAWARTOŚCI BIAŁKA

Justyna Grabarczyk¹⁾, Katarzyna Marciniak-Łukasiak²⁾

¹⁾ Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Przetwórstwa Zbóż i Piekarstwa
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

justynagra41@gmail.com

²⁾ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Żywności
Katedra Technologii i Oceny Żywności
Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

katarzyna_marciniak_lukasiak@sggw.edu.pl

Otrzymano: 11 grudnia 2023

Poprawiono: 17 stycznia 2024

Zaakceptowano: 17 stycznia 2024

Streszczenie

Aktywny tryb życia i oczekiwanie konsumentów na żywność funkcjonalną oraz postępy w technologii przetwórstwa spożywczego stają się przyczyną do wzbogacania żywności w dodatkowe surowce. Batonry zbożowe o podwyższonej zawartości białka i dodatkowo wzbogacane w witaminy czy składniki mineralne należą do grupy żywności funkcjonalnej. Takie batony mogą stanowić źródło zdrowej i szybkiej przekąski. Są źródłem cennych składników odżywczych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Przeprowadzono badanie ankietowe na grupie 135 respondentów. Ankieta dotyczyła preferencji konsumentów na temat batonów zbożowych ze zwiększoną zawartością białka. Po przeanalizowaniu odpowiedzi stwierdzono, że batony zbożowe z wyższą zawartością białka zyskują popularność na rynku spożywczym oraz stają się alternatywą dla „tradycyjnych” batonów. Konsumenti podczas wyboru tego produktu najbardziej zwracają uwagę na smak, skład i konsystencję produktu.

Słowa kluczowe: żywność funkcjonalna, surowce białkowe, batony zbożowe

CONSUMERS' PREFERENCES ON HIGH PROTEIN CEREAL

Summary

An active lifestyle and expectancy consumers on a functional food and progress of food processing have become a reason for enriching food in additional raw materials. Cereal bars with increased amount of protein, enriched in vitamins or minerals belongs to the functional foods group. Such bars could be source of health and fast snack. They are a source of necessary mineral components for our body functioning.

A survey was conducted in a group of 135 respondents. The survey concerned consumer preferences about cereal bars with increased amount of protein. After analysis the answers found that high protein, cereal bars are gaining popularity on food market and becoming an alternative to traditional bars. Consumers during selection this product put the most attention on taste, composition and consistency.

Słowa kluczowe: functional food, protein raw material cereal bars

WSTĘP

Batony zbożowe, które w swoim składzie mają zadeklarowaną wyższą zawartość białka stają się popularną formą przekąski. Korzystają z nich między innymi osoby uprawiające sport zawodowo jak i rekreacyjnie oraz osoby prowadzące aktywny tryb życia [Grzebisz 2017]. Osoby, które są bardziej aktywne, powinny mieć wyższe spożycie białka [Całyniuk i in. 2018]. Produkty, w których występuje połączenie białek z węglowodanami (sacharydami) cechują się szybkim wchłanianiem przez organizm, wspomagają regenerację organizmu oraz wzrost mięśni [Kalpakçioğlu 2008].

Batony ze zwiększoną zawartością białka, należą do grupy żywności funkcjonalnej. Jest to żywność, która posiada udokumentowany wpływ na zdrowie człowieka. Producenci, którzy posiadają taki dokument mogą podawać tę informację na etykiecie produktu, a kupujący, spożywając regularnie mogą oczekiwać rezultatów zdrowotnych [Gertrig, Gawęcki 2001]. Producenci w celu pozyskania dokumentu o funkcjonalności żywności muszą skorzystać m.in. z Rozporządzenia (WE) nr 1924/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych dotyczących żywności (Dz.U. L 404 z 30.12.2006 r. s. 9). Do żywności funkcjonalnej zaliczamy produkty zawierające np.: mikrokapsułki z witaminami, żywność probiotyczną (z udziałem bakterii probiotycznych). Przyczynami wzbogacania żywności są m.in.: starzenie się społeczeństwa, wzrost częstości występowania chorób, które mają związek z żywieniem, czy zwiększenie

dostępności nowych bioaktywnych składników żywności [Błaszczak, Grześkiewicz 2014].

Zboża i przetwory zbożowe, będące podstawowym składnikiem diety człowieka, są źródłem cennych węglowodanów. Sacharydy, w tym skrobia w ziarnie zbóż stanowią średnio 43%-65%, białko 8%-14%, tłuszcz 1,5%-3,0%. Ziarno i produkty zbożowe stanowią źródło cennych makroelementów (Fe), mikroelementów (Cu, Mn, Zn) oraz ultramikroelementów (Se). Związki bioaktywne takie jak błonnik pokarmowy w największej ilości znajdują się w zewnętrznej części ziarniaka co wiąże się z zaleceniami aby spożywać produkty niskoprzetworzone zwane pełnoziarnistymi [Wiśniewska, Boros 2019].

Białko pełni rolę materiału budulcowego i energetycznego organizmu. Surowcami, które podnoszą jego zawartość w batonach są np.: białko sojowe, białko serwatkowe mleka czy białko jaja kurzego [Grzebisz 2017]. Białka sojowe są bogatym źródłem aminokwasów egzogennych niezbędnych w prawidłowej pracy organizmu [Singh i in. 2008]. Białko jaja kurzego uważane jest przez FAO (Organizacja Narodów Zjednoczonych do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa) jako białko wzorcowe. Skład aminokwasowy białka jaja kurzego pokrywa w 97% zapotrzebowanie organizmu człowieka na białko [Trziszka 2000]. Białko serwatkowe mleka wykorzystywane jest w postaci izolatów lub koncentratów [Piejko 2018]. Otrzymywane jest w procesie suszenia rozpyłowego [Banach i in. 2010]. Posiada znaczne ilości aminokwasów egzogennych, jest lekkostrawne co powoduje, że chętnie korzystają z niego sportowcy [Melnik i in. 2013].

Błonnik pokarmowy jest surowcem pozyskiwanym z roślin, jest niezbędny w diecie człowieka [Bienkiewicz i in. 2015]. W produktach zbożowych w większej ilości występuje błonnik rozpuszczalny w wodzie, wyjątkiem jest pszenica, która w swoim składzie zawiera więcej błonnika nierozpuszczalnego w wodzie. W owsie czy jęczmieniu znajduje się więcej błonnika rozpuszczalnego. Na zawartość poszczególnych frakcji błonnika, oprócz gatunku zboża ma wpływ stopień jego przetworzenia [Rzedzicki i in. 2016]. Frakcje rozpuszczalne błonnika pokarmowego odpowiadają za regulację poziomu cholesterolu we krwi oraz zapobiegają rozwojowi chorób układu krążenia, zmniejszają wchłanianie tłuszczów i cukrów co przyczynia się do zapobiegania otyłości. Frakcje nierozpuszczalne błonnika mają wpływ na perystaltykę jelit, obniżają ryzyko wystąpienia uchyłkowatości jelit czy raka jelita grubego [Olędzki, Histova 2018]. Poza istotną rolę w diecie człowieka, odgrywa też istotną rolę w technologii. Wpływa na strukturę i poprawia wiązanie się składników poprzez poprawę ich lepkości [Kowalska i in. 2022].

Konsumenci poszukują żywności wygodnej, posiadającej wysoką wartość żywieniową. W ostatnich latach, na całym świecie nastąpiło nasilenie występowania chorób

cywilizacyjnych, takich jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze czy otyłość, które powodują, że producenci żywności projektują żywność, posiadającą obniżoną wartość kaloryczną, o zmniejszonej zawartości soli, tłuszczu czy cukru, zwiększając przy tym zawartość białka czy błonnika pokarmowego [Moczkowska i in. 2014].

W związku z rosnącym zainteresowaniem świadomego i zdrowego odżywiania oraz podążaniem za trendami w stylu życia celem pracy było pozyskanie informacji o preferencjach konsumentów na temat batonów zbożowych o podwyższonej zawartości białka.

MATERIAŁ I METODYKA PRACY

W celu pozyskania opinii konsumentów na temat upodobań dotyczących batonów zbożowych o wysokiej zawartości białka przeprowadzono badanie ankietowe. W autorskim kwestionariuszu znalazły się pytania demograficzne, zasadnicze, jednokrotnego (16 pytań) i wielokrotnego wyboru (4 pytania). Badanie przeprowadzono w sposób pośredni przez formularz internetowy (MS Forms) w miesiącach od marca do maja 2023.

W badaniu wzięło udział 135 respondentów, w tym 53% stanowiły kobiety. Najwięcej osób było w przedziale wiekowym 21-30 lat (58%), mieszkali oni w większości w miastach powyżej 100 tys. mieszkańców (42%). Respondenci (38%) w większości deklarowali wykształcenie średnie. Ankietowani (76%) zadeklarowali, że ich wykształcenie nie jest związane z żywnością, jednak 73% z nich deklaruje zainteresowanie tematem prawidłowej diety i żywienia. Blisko 43% biorących udział w badaniu deklaruje uprawianie sportu regularnie, 2-3 razy w tygodniu. Najczęściej udzielaną odpowiedzią na pytanie dotyczące rodzaju wykonywanego treningu był trening siłowy połączony z treningiem cardio (28%) (Tab. 1).

Tabela 1. Charakterystyka respondentów
Respondece's characteristics

Płeć	Kobieta	53%	Wiek (lata)	<20	10%
				21-30	58%
	Mężczyzna	47%		31-40	23%
				41-50	8%
				>50	1%
Wykształcenie	Podstawowe	3%	Miejsce zamieszkania	Miasto (liczba mieszkańców)	
	Średnie	38%		>100 tys.	42%
	Zawodowe	11%		20-100 tys.	28%
	Niepełne wyższe	21%		<20 tys.	14%
	Wyższe	27%		Wieś	16%
Powiązanie wykształcenia z żywnością	Tak	24%	Zainteresowanie tematem prawidłowej diety i żywienia	Tak	73%
	Nie	76%		Nie	27%
Częstotliwość uprawiania sportu	Codziennie	3,7%	Rodzaj najczęściej wybieranej aktywności fizycznej	Trening cardio	21%
	2-3 razy w tygodniu	42,9%		Trening siłowy	23%
	Kilka razy w miesiącu	35,6%		Trening siłowy + cardio	28%
	Nie uprawiam sportu	17,8%		Nie wykonuje żadnego treningu	21%
				Inne	7%

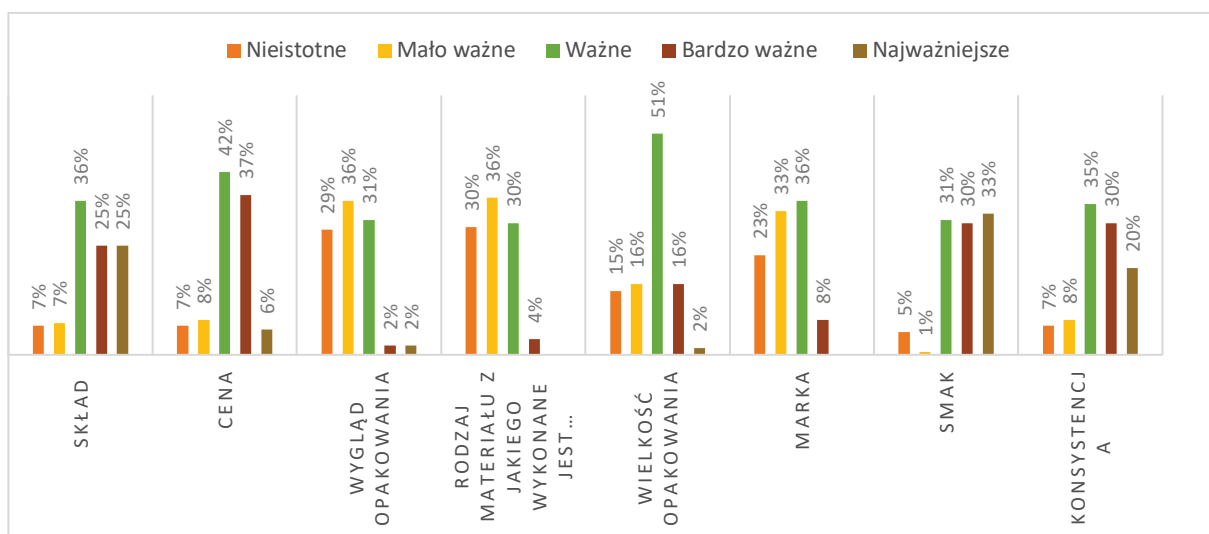
WYNIKI I DYSKUSJA

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że 95% ankietowanych spotkało w sklepie batony zbożowe o wysokiej zawartości białka, jednak 56% z nich deklaruje, że w swojej diecie spożywa je okazjonalnie. Zapytani o cel spożywania tego rodzaju produktu spożywczego 38% ankietowanych odpowiedziało, że korzysta z nich jako alternatywa dla „tradycyjnych” batonów (słodycz powstały w wyniku połączenia masy czekoladowej, cukru, karmelu i dodatków smakowych, zwykle pokryty czekoladą) (Tab. 2).

Tabela 2. Struktura odpowiedzi respondentów na wybrane pytania
Structure of respondents' answers on selected questions

Pytanie	Udział odpowiedzi (%)					
	Tak			Nie		
Czy spotkał Pan/Pani w sklepie batony zbożowe o wysokiej zawartości białka?	95			5		
Jak często Pan/Pani stosuje w swojej diecie batony o wysokiej zawartości białka?	1-2 raz w tygodniu	1-2 razy w miesiącu	Okazjonalnie	Nie kupuję takich batonów		
	9	25	56	10		
W jakim celu stosuje Pan/Pani ten rodzaj produktu?	Stosowanie jako alternatywa dla tradycyjnego batona	Walory smakowe	Uzupełnienie białka w diecie	W celu lepszej regeneracji	Inne	W celu osiągnięcia celów treningowych
	38	28	17	6	6	5

Respondenci zadeklarowali, że przy wyborze batona z wysoką zawartością białka najistotniejszą dla nich cechą jest skład, smak oraz konsystencja takiego wyrobu (rys. 1) mało istotny jest rodzaj i wygląd opakowania.



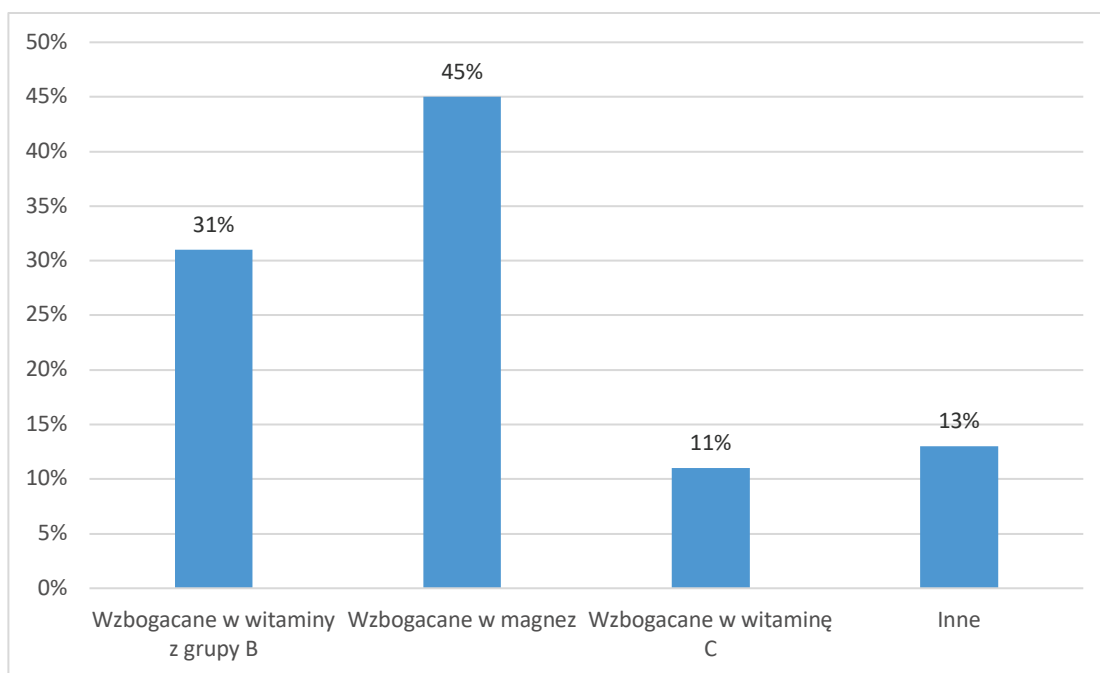
Rysunek 1. Struktura odpowiedzi na pytanie co jest ważne dla Pana/Pani i jak bardzo przy wyborze batona zbożowego z wysoką zawartością białka?
Structure of the answer to the question: what is important to you and how important when choosing a cereal bar with a high protein content?

Większość ankietowanych (66%) wskazała, że obecność oleju palmowego nie zniechęca ich do zakupu batona o wysokiej zawartości białka. Konsumenci (34%), którzy zaznaczyli odpowiedź twierdzącą, musieli uzasadnić swoją niechęć, najczęściej powtarzającą się odpowiedzią, była ta dotycząca artykułu naukowego, o którym słyszeli. Ankietowani wskazywali również względy etyczne, takie jak zanieczyszczenie środowiska, które powstaje podczas pozyskiwania oleju palmowego z niecertyfikowanych źródeł. Ponad połowa ankietowanych (62%) potwierdziła, że słyszała o pojęciu „żywności funkcjonalnej”, wskazali również (73%), że widzieli na półkach sklepowych batony zbożowe o podwyższonej zawartości białka, które dodatkowo wzbogacane są w mieszankę witamin i/lub składników mineralnych (tab. 3).

Tabela 3. Struktura odpowiedzi respondentów na wybrane pytania
Structure of respondents' answers on selected questions

Pytanie	Udział odpowiedzi (%)			
Czy obecność oleju palmowego zniechęca do zakupu batona o wysokiej zawartości białka?	Tak			Nie
	34			66
Jeśli przeszkadza Pani/Panu obecność oleju palmowego uzasadnij dlaczego?	Artykuł naukowy, o którym słyszałem/czytałem	Negatywna opinia konsumentów	Inne	Opinia znajomych, rodziny
	58	18	13	11
Czy kiedykolwiek Pan/Pani słyszała o pojęciu „żywności funkcjonalnej”?	Tak			Nie
	62			38
Czy spotkał Pan/Pani batony zbożowe o wysokiej zawartości białka wzbogacane w dodatkowe składniki, wykazujące pozytywny wpływ na zdrowie?	Tak			Nie
	73			27

Ankietowani (45%) jako najczęściej spotykany dodatek, wskazali wzbogacenie w magnez, najmniej spotykanym wzbogacaniem jest dodatek witaminy C (11%) (rys. 2). W badaniach Kalinowskiej [2017] mamy również potwierdzenie obecności na rynku batonów z podwyższoną zawartością białka, które wzbogacane są w mieszanki witamin i/lub składników mineralnych.



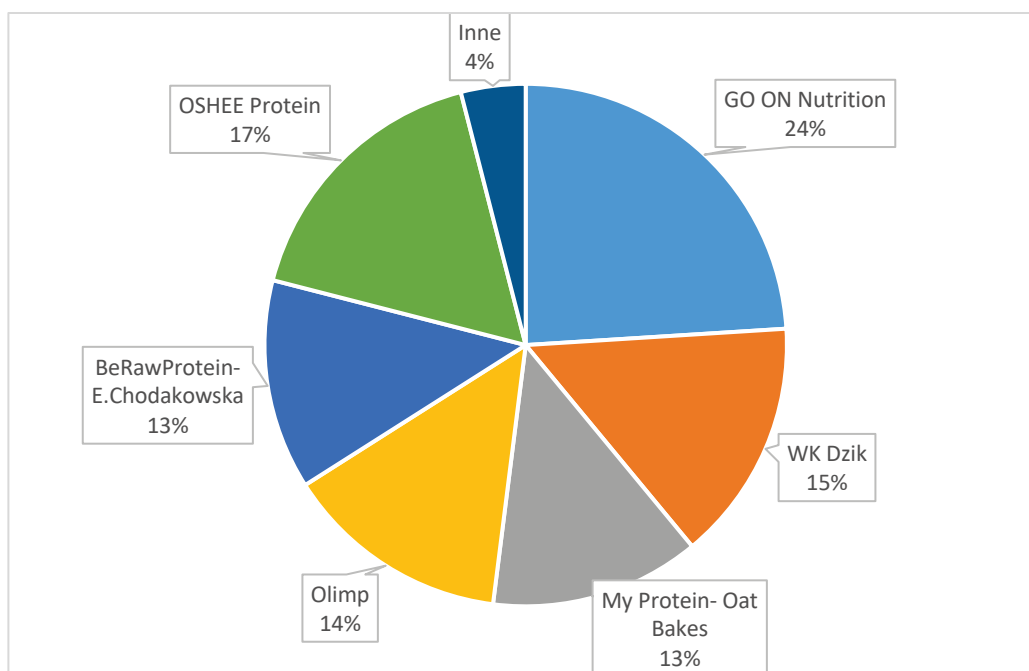
Rysunek 2. Struktura odpowiedzi na pytanie: W jakie składniki wzbogacane są najczęściej batony o podwyższonej zawartości białka?
Structure of the answer to the question: What ingredients are most often enriched with bars with increased protein content?

W pytaniu dotyczącym preferencji obecności słodzików w tego rodzaju artykule spożywczym, większość ankietowanych (70%) zadeklarowała, że nie przeszkadza im taka obecność. Konsumenci w 65% odpowiedzieli, że zauważyli wzrost popularności batonów zbożowych względem „tradycyjnych” (tab. 4).

Tabela 4. Struktura odpowiedzi respondentów na wybrane pytania
Structure of respondents' answers on selected questions

Pytanie	Udział odpowiedzi (%)		
	Tak	Nie	Nie mam zdania
Czy przeszkadza Panu/Pani obecność słodzików w batonach o zwiększonej zawartości białka?	9	70	21
Czy zauważył Pan/Pani wzrost popularności batonów o zwiększonej zawartości białka względem „tradycyjnych”?	65	21	14

Ankietowani jako najczęściej kupowaną markę wskazali batony GO ON Nutrition (24%), w odpowiedzi inne, najczęściej padała marka Vitarella (rys. 3).



Rysunek 3. Struktura odpowiedzi na pytanie: „Jaką markę batonów ceni sobie Pan/Pani najbardziej?”
Structure of the answer to the question: "Which brand of bars do you value the most?"

PODSUMOWANIE

Większość osób biorących udział w ankiecie zauważa powszechną dostępność batonów zbożowych o wysokiej zawartości białka, natomiast ponad połowa (56%) deklaruje spożywanie ich okazjonalnie. Zadowalający jest fakt, że ponad 80% ankietowanych zadeklarowało uprawianie sportu. Większości konsumentów (66%) nie przeszkadza obecność oleju palmowego w składzie tego produktu, jednak 34% ankietowanych wyraża niechęć dotyczącą zakupu produktu, jeśli w składzie występuje ten surowiec. Ponad połowa respondentów (62%) zadeklarowała znajomość pojęcia „żywności funkcjonalnej”. Znacznej większości ankietowanych (70%) nie przeszkadza obecność substancji słodzących w tym produkcie. Ponad połowa respondentów (65%) zauważyła wzrost popularności batonów o wysokiej zawartości białka względem „tradycyjnych” batonów. Powyższa analiza dotycząca upodobań konsumentów na temat batonów zbożowych o wysokiej zawartości białka może stanowić źródło wiedzy dla producentów w jakim celu i jak często konsumenci sięgają po batony ze zwiększoną zawartością białka. Omówione wyniki mogą być wskazówką podczas projektowania nowych produktów szczególnie wyglądu, wielkości i rodzaju materiału z jakiego zostanie wykonane opakowanie.

PIŚMIENNICTWO

1. Banach M., Makara A., Kowalski M. (2010). Otrzymywanie hydrolizatów białkowych i suszonych protein. *Chemia – Czasopismo Techniczne*, 107, 19- 29
2. Bienkiewicz M., Bator E., Bronkowska M. (2015). Błonnik pokarmowy i jego znaczenie w profilaktyce zdrowotnej. *Problemy Higieny Epidemiologii* 96, 57-63
3. Błaszczak A., Grześkiewicz W. (2014). Żywność Funkcjonalna – szansa czy zagrożenie dla zdrowia. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 20, 214-221
4. Całyńiuk B., Teresiński T., i Całyńiuk Z. (2018). Spożycie białka przez osoby aktywne i nieaktywne fizycznie, 10 Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL - „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, Lublin 17-18.03.2018, abstrakty, (red. Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL), 306
5. Gertig H., Gawęcki J. (2001). Słownik terminologii żywieniowych. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa
6. Grzebisz N. (2017). Żywność funkcjonalna w diecie sportowców. *Kwartalnik Naukowy Uczelni Vistula*, 2, 237-246
7. Kalinowska E. (2017). Analiza batonów przeznaczonych dla sportowców. Praca dyplomowa inżynierska, *Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka*, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, 10-74
8. Kalpakçioğlu B. (2008). Nutrition in Sportsmen. Department of Physical Therapy and Rehabilitation, Haydarpasa Numune Training and Research Hospital, Istanbul, Turkey, 23, 24-27
9. Kowalska H., Masiarz E., Ignaczak A., Marzec A., Hać-Szymańczuk E., Salomon A., Cegiełka A., Żbikowska A., Kowalska J., Galus S. (2022). Advances in Multigrain Snack Bar Technology and Consumer Expectations: a Review. *Food Reviews International*, 39, 93-118
10. Melnik BC., Schmitz G., John S., Carrera-Bastos P., Lindeberg S., Cordain L. (2013). Metabolic effects of milk protein intake strongly depend on pre-existing metabolic and exercise status. *Nutrition and Metabolism*, 10, 60
11. Moczowska M., Półtorak A., Wyrwisz J. (2014). Wpływ trendów żywieniowych na projektowanie nadziewanych produktów spożywczych. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2, 136 -142
12. Olędzki R., Hristova A. (2017). Składniki bioaktywne w produktach funkcjonalnych i ich rola w żywieniu człowieka. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 24, 50-53

13. Piejko L. (2018). Mleko, białka mleka a trądzik. *Polish Journal of Cosmetology*, 21, 45-48
14. Rzedzicki Z., Zarzycki P., Wirkijowska A., Sobota A., Sykut-Domaniewska E., Bartoszek K., Kuzawińska E. (2016). Zboża niechlebne źródłem błonnika w profilaktyce i zwalczaniu chorób cywilizacyjnych. *Polish Journal of Agronomy*, 25, 19-26
15. Singh P., Kumar R., Sabapathy S.N., Bawa A.S. (2008). Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 14-28
16. Trziszka T. (2000). Budowa i skład chemiczny jaja. W: *Jajczarstwo, nauka, technologia, praktyka*. (red. T. Trziszka). Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław
17. Wiśniewska M., Boros D. (2019). Ziarno zbóż jako źródło składników odżywczych i prozdrowotnych. Książka abstraktów – 40, Konferencja przetwórstwa zbóż i piekarstwa w Krynicy Morskiej, 22-25.05.2019

OCENA JAKOŚCI NIERAFINOWANYCH CUKRÓW TRZCINOWYCH DOSTĘPNYCH NA KRAJOWYM RYNKU

Agnieszka Salamon¹⁾, Andrzej Baryga²⁾, Hanna Kowalska³⁾

¹⁾ Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Przetwórstwa Zbóż i Piekarstwa
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

²⁾ Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Cukrownictwa i Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności
ul. Wólczańska 171/173, 90-530 Łódź

³⁾ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Żywności
Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji
Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

agnieszka.salamon@ibprs.pl

Otrzymano: 20 grudnia 2023

Poprawiono: 17 stycznia 2024

Zaakceptowano: 18 stycznia 2024

Streszczenie

Ocenie poddano dostępne na krajowym rynku nierafinowane cukry trzcinowe, od Demerara o jasnobrązowej barwie po ciemne Muscovado i Jaggery. W porównaniu do białego cukru buraczanego badane próbki ciemnych cukrów trzcinowych cechowały się niższą polaryzacją i zawartością sacharozy, ciemniejszym zabarwieniem, a także wyższą wilgotnością, zawartością popiołu oznaczonego konduktometrycznie, cukrów redukujących, skrobi, polifenoli ogółem oraz aktywnością antyoksydacyjną. Wykazano statystycznie istotne zależności pomiędzy zabarwieniem cukru, polaryzacją, zawartością popiołu konduktometrycznego i wilgotnością. Na podstawie ocenianych wyróżników jakościowych wybranych próbek, nierafinowane próbki trzcinowego cukru brązowego Demerara wykazywały podobieństwo do próbki odniesienia tj. rafinowanego cukru białego z buraków cukrowych. W przypadku ciemnych cukrów trzcinowych wykazano istotne statystycznie różnice między próbkami z upraw tradycyjnych i ekologicznych, czego nie stwierdzono dla próbek cukrów o jasnobrązowej barwie. Oznaczenie skrobi w cukrach trzcinowych może być

parametrem odróżniającym je od cukru buraczanego, tym samym stanowić kryterium oceny ich autentyczności.

Słowa kluczowe: nierafinowane cukry trzcinowe, jakość, autentyczność, potencjał antyoksydacyjny

ASSESSMENT OF QUALITY OF UNREFINED CANE SUGARS AVAILABLE ON THE LOCAL MARKET

Summary

The assessment covered unrefined cane sugars available on the local market, from light brown Demerara to Dark Muscovado and Jaggery. Compared to white beet sugar, the tested samples of dark cane sugars were characterized by lower polarization and sucrose content, darker color, as well as higher moisture content, conductometric ash, reducing sugars, starch, total polyphenols and antioxidant activity. Statistically significant correlations between sugar color, polarization, conductometric ash and moisture content has been demonstrated. Based on the assessed quality characteristics of selected samples, unrefined Demerara brown cane sugar samples were similar to the reference sample, i.e. refined white sugar from sugar beets. In the case of dark cane sugars, statistically significant differences were found between samples from traditional and organic farming, which was not found for samples of light brown sugars. Determining the starch in cane sugars may be a parameter that distinguishes them from beet sugar, thus constituting a criterion for assessing their authenticity.

Keywords: unrefined cane sugars, quality, authenticity, antioxidant potential

WSTĘP

Cukier jest najpopularniejszym środkiem słodzącym na świecie. Wytwarza się go z roślin bogatych w sacharozę, tj. z trzciny cukrowej i buraków cukrowych. Uprawiany głównie w krajach Azji i Ameryki Południowej, cukier trzcinowy stanowi blisko 80% światowej produkcji cukru [Chmielewski 2021, Hryszko, Szajner 2013].

W Polsce cukier trzcinowy jest ciekawym smakowo, egzotycznym rodzajem cukru, który stosowany jest do bezpośredniego spożycia, słodzenia napojów, potraw, deserów i w cukiernictwie. Asortyment tego cukru na rynku krajowym jest urozmaicony, dostępne są cukry od jasnobrązowych po bardzo ciemne. Ich barwa zależy od stopnia oddzielenia syropu międzykryształowego (melasy) od kryształów cukru, co jest realizowane w drodze wirowania. Cukry trzcinowe można spotkać pod różnymi nazwami, w zależności od kraju pochodzenia,

tj. jaggery, panela, gur, kokuto, rapadura itd. [Zidan, Azlan 2022]. Do nierafinowanych cukrów trzcinowych, które poddaje się wirowaniu lub minimalnej rafinacji, należą cukry demerara, muscovado czy turbinado. W zależności od stopnia rafinacji cukru surowego trzcinowego otrzymuje się cukier biały oraz cukry brązowe o barwie od jasnożółcistej do ciemnobrązowej [Eggleston 2018].

O barwie produktu końcowego decyduje obecność w nim melasy, której barwę kształtują karmel i melanoidyny powstające pod wpływem obróbki cieplnej [Seguí i in. 2015]. Ze zdrowotnego punktu widzenia nieoczyszczone cukry trzcinowe zawierają cenne składniki, jak związki mineralne, witaminy z grupy B i substancje o właściwościach bioaktywnych [Zidan, Azlan 2022, Azlan i in. 2020, Barrera i in. 2020, Seguí i in. 2015]. W badanych przez Seguí i in. [2015] próbkach cukrów trzcinowych, od jasnobrązowych po ciemne jaggery, poza sacharozą (60-94%) obecną w największych ilościach, stwierdzono glukozę (do 8%) i fruktozę (do 7%). Asikin i in. [2017] w składzie handlowych próbek cukrów nierafinowanych wykazali wysoką zawartość potasu (1045-2210 mg/100 g) i wapnia (235-394 mg/100 g), a także magnezu (118-182 mg/100 g), sodu (77-213 mg/100 g) i żelaza (1,9-9,2 mg/100 g) oraz pierwiastków śladowych, tj. manganu, cynku i miedzi. Zawartość aminokwasów kształtowała się w przedziale 205-805 mg/100 g, a dominującymi były asparagina, kwas asparaginowy, fenyloalanina i alanina.

Ważnym aspektem oceny produktów z trzciny cukrowej jest ich autentyczność. Analiza rynku cukrów trzcinowych [Salamon i in. 2021] wykazała, że asortyment produktów dostępny na sklepowych półkach jest znacznie droższy od cukru białego (buraczanego), a za produkty ekologiczne trzeba zapłacić nawet dwa razy więcej niż za produkty tradycyjne. Oznaczenie polaryzacji i zabarwienia cukru może stanowić kryterium oceny autentyczności cukrów trzcinowych. Polaryzacja wskazuje na stopień oczyszczenia cukru trzcinowego z melasy, która kształtuje jego barwę. Zatem ciemniejsze zabarwienie i niższa polaryzacja cukru trzcinowego niż rafinowanego cukru białego (min. 99,7°Z) mogą świadczyć o jego autentyczności [Monakhova, Diehl 2016]. Zależność ta może być wykorzystana do kontroli zafałszowań cukrów trzcinowych w przypadku praktyki dodatku do cukru białego barwników, np. karmelu, który zmienia barwę cukru, lecz nie obniża jego polaryzacji. Wojtczak i in. [2014] podali, że choć jakość i właściwości funkcjonalne białego rafinowanego cukru trzcinowego są podobne do odpowiednika produkowanego z buraków cukrowych, różnią się one obecnością skrobi, która naturalnie występuje tylko w cukrze trzcinowym. Dlatego zawartość skrobi w produktach z trzciny cukrowej może być kryterium w ocenie autentyczności cukrów dostępnych na rynku.

Przedmiotem wielu badań [Molina-Cortés i in. 2023, Sharifi-Rad i in. 2023, Azlan i in. 2020, Jaffé 2015, Seguí i in. 2015] były właściwości antyoksydacyjne produktów z trzciny cukrowej. Zawarte w melasie związki polifenolowe i produkty reakcji Maillarda – melanoidyny, wpływają na potencjał antyoksydacyjny cukrów [Molina-Cortés i in. 2023, Schlumbach i in. 2017]. Z badań Barrera i in. [2020] wynika, że największą zdolnością zmiatania wolnych rodników cechowały się miód trzcinowy i cukier jaggery. Zawartość polifenoli ogółem w analizowanych cukrach trzcinowych wynosiła od 58,7 mg / 100 g w przeliczeniu na kwas galusowy (GAE) w cukrze brązowym do 364 mg GAE / 100 g granulowanego jaggery. Na podstawie analizy profilu związków fenolowych zidentyfikowane zostały kwasy fenolowe jak cynamonowy, chlorogenowy, kawowy, synapowy, kumarowy i ferulowy, jak też flawonoidy, tj. apigenina, trycyna i luteolina, które uznawane są za nutraceutyki [Zidan, Azlan 2022]. Singh i in. [2015] podali, że na podstawie analizy porównawczej związków polifenolowych zawartych w różnych produktach z trzciny cukrowej melasa jest najbogatszym źródłem kwasów fenolowych, w porównaniu do soków i syropów pozyskanych z tej rośliny. Dane zebrane przez Sharifi-Rad i in. [2023] wskazują na wysokie działanie terapeutyczne cukru jaggery, zwłaszcza ze względu na zawartość niezbędnych aminokwasów, związków mineralnych i witamin oraz wysokiego potencjału przeciwutleniającego, jak i innych właściwości biologicznych, tj. przeciwbakteryjnych, przeciwnowotworowych i nefroprotektoryjnych.

Pomimo że nierafinowane cukry trzcinowe o ciemnej barwie uznaje się za naturalne źródło nutraceutyków, należy mieć na uwadze ograniczenia terapeutyczne wynikające ze spożycia nadmiernych ich ilości. Bowiem w opinii społecznej panuje przekonanie, że za występowanie chorób dietozależnych odpowiada nadkonsumpcja węglowodanów obecnych w żywności. Nieprawidłowa dieta i styl życia są istotnymi czynnikami w etiologii wielu przewlekłych chorób niezakaźnych, jak otyłość i nadwaga, insulinooporność, cukrzyca typu II, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, zespół metaboliczny, niealkoholowe stłuszczenie wątroby, niektóre nowotwory oraz próchnica zębów [EFSA 2022, Przygoda i in. 2020, Stanhope 2016].

Wbrew powszechnie przyjętym przekonaniom o „złym” oddziaływaniu cukru na zdrowie i wprowadzonych regulacjach prawnych ograniczających jego spożycie [Dz.U. 2015 poz. 1916], nie należy zapominać o funkcjach fizjologicznych, jakie pełnią węglowodany w organizmie. Obecne w codziennej diecie są źródłem energii, pod wpływem enzymów trawiennych są rozkładane do cukrów prostych. Glukoza zaopatruje komórki w energię potrzebną do utrzymania ciepłoty ciała, pracy narządów wewnętrznych i aktywności

ruchowej. Stanowi cukier fizjologiczny niezbędny do prawidłowej pracy mózgu, układu nerwowego i krwionośnego, mięśni i serca [Przygoda i in. 2020, Eggleston 2018, Stanhope 2016].

W świetle niniejszych informacji, konsumenci sięgając po cukry spożywcze lub żywność z dużą zawartością węglowodanów, muszą świadomie dokonywać wyborów zakupowych oraz mieć na uwadze konsekwencje wynikające ze spożywania ich w nadmiarze.

Nierafinowane cukry trzcinowe wykazują wyższą wartość żywieniową, gdyż są źródłem makro- i mikroelementów, witamin i wielu naturalnych związków o właściwościach przeciwutleniających [Cervera-Chiner i in. 2021, Lee i in. 2019], dlatego mogą stanowić zamiennik cukru białego, który zawiera min. 99,7% sacharozy [Rozp. UE Nr 1308/2013]. Badania ankietowe [Salamon i in. 2021] wskazały, że ok. 80% dostępnych na rynku produktów z trzciny cukrowej stanowiły cukry, z czego ok. 52% było reprezentowane przez cukry Demerara, zaś ok. 30% rynku cukrów trzcinowych stanowiły produkty z deklaracją o pochodzeniu z rolnictwa ekologicznego.

Celem pracy była ocena wybranych parametrów jakościowych i autentyczności oraz potencjału antyoksydacyjnego dostępnych na krajowym rynku nierafinowanych cukrów trzcinowych z upraw tradycyjnych i ekologicznych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał badawczy stanowiły próbki cukru trzcinowego nierafinowanego z upraw tradycyjnych ($n = 6$) i ekologicznych ($n = 5$), które zakupiono w sklepach internetowych (www.allegro.pl, www.biosklep.com.pl, www.biogo.pl, www.bioboo.pl). Próbką odniesienia był rafinowany cukier biały (buraczany). Na podstawie informacji podanych przez producentów na opakowaniach, w tabeli 1 zamieszczono zestawienie próbek cukrów wykorzystanych w niniejszym badaniu. Należy nadmienić, że kraj pochodzenia ocenianych próbek cukru trzcinowego (tabela 1) nie jest jednoznaczny z ich producentem. Większość próbek wyprodukowano w krajach Unii Europejskiej, co wynika z wymogów UE [Rozp. UE Nr 1308/2013], jak też zobowiązań handlowych z krajami rozwijającymi się, na podstawie których państwa członkowskie importują surowy cukier trzcinowy, a rafinację realizują w okresie pomiędzy kampaniami [Hryszko, Szajner 2013].

Tabela 1. Zestawienie próbek cukru trzcinowego i cukru buraczanego użytych do badań
List of cane sugar and beet sugar samples used for testing

Kod próbki	Nazwa handlowa	Kraj pochodzenia	Rodzaj opakowania / masa netto [g]
B0	Cukier biały (buraczany)	Polska	torebka papierowa / 1000
T1	Cukier trzcinowy brązowy Demerara	Mauritius	pudełko kartonowe / 500
T2	Cukier trzcinowy typ Demerara nierafinowany	brak danych	pudełko kartonowe / 500
T3	Cukier trzcinowy nierafinowany Dark Muscovado	brak danych	pudełko kartonowe / 500
T4	Nierafinowany cukier trzcinowy Muscovado Ciemny	Mauritius	pudełko kartonowe / 500
T5	Nierafinowany cukier trzcinowy z melasami	Mauritius	pudełko kartonowe / 500
T6	Cukier trzcinowy Jaggery	Indie	pojemnik plastikowy / 500
E7	Cukier BIO trzcinowy nierafinowany	spoza UE	pudełko kartonowe / 500
E8	Ekologiczny cukier trzcinowy nierafinowany typ Demerara	Paragwaj	torebka foliowa / 500
E9	Cukier trzcinowy BIO Rapadura	spoza UE	torebka foliowa / 500
E10	Cukier trzcinowy Mascobado BIO nierafinowany	Filipiny	torebka foliowa / 500
E11	Cukier trzcinowy Jaggery BIO	spoza UE	torebka foliowa / 400

Objaśnienia: B – cukier buraczany, T – cukier trzcinowy tradycyjny, E – cukier trzcinowy ekologiczny

Do oznaczenia podstawowych parametrów cukru trzcinowego i białego buraczanego stosowano międzynarodowe metody analityczne obowiązujące w cukrownictwie (ICUMSA – International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis).

Wilgotność (W) próbek cukru oznaczono metodą wagową jako ubytek masy po suszeniu wg ICUMSA GS2/1/3/9-15 [2007]. Pozostałe analizy wykonano w roztworach cukru. Zawartość popiołu (Pk) w cukrze białym oznaczono metodą konduktometryczną wg ICUMSA GS2/3/9-17 [2011], a w cukrze trzcinowym wg ICUMSA GS1/3/4/7/8-13 [1994]. Zabarwienie roztworu (Br) cukru trzcinowego wykonano metodą spektrofotometryczną wg ICUMSA GS1/3-7 [2011], a cukru białego wg ICUMSA GS2/3-10 [2011]. Polaryzację cukru białego (Pol) oznaczono metodą podaną przez Instytut Cukrownictwa w Brunszwiku wg ICUMSA GS2/3-1 [2011], a cukrów trzcinowych wg ICUMSA GS1/2/3/9-1 [2011]. Oznaczenie zawartości skrobi (S) w cukrze wykonano metodą spektrofotometryczną wg ICUMSA GS1-16 [2013]. Do wyznaczenia krzywej wzorcowej stosowano rozpuszczalną skrobię ziemniaczaną (ChemPur, Polska).

Metodą chromatografii cieczowej z detekcją refraktometryczną (HPLC/RID) w badanych próbkach cukru oznaczono zawartość sacharozy (Sach) oraz sumy fruktozy i glukozy, jako cukru inwertowanego (Inw). Analizie poddano roztwór cukru (5%) po filtracji przez sącze membranowy 0,45 µm (PVDF). Do ilościowego oznaczenia profilu cukrowego stosowano metodę wzorca zewnętrznego. Wzorce roztworów cukrów, tj. sacharozy, glukozy i fruktozy

(Sigma, USA) przygotowano na pięciu poziomach stężeń. Cukry identyfikowano po czasie retencji w określonych warunkach analizy. W skład aparatury badawczej wchodziły: chromatograf cieczowy (Waters, USA) wyposażony w moduł separacyjny Alliance 2695, detektor refraktometryczny 2414, piec i kolumna chromatograficzna Sugar Pak 1 z przedkolumną (Waters, USA). Eluent stanowił roztwór wodny wersenianu di-sodu (0,1 mM). Rozdział prowadzono w warunkach izokratycznych w temperaturze 90°C przy przepływie 0,5 cm³/min. Integrację pików i obliczenia ilościowe wykonano za pomocą programu Empower 2 (Waters, USA). Obliczenia przeprowadzono w oparciu o standardowe krzywe wzorcowe sacharozy, glukozy i fruktozy. Wyniki zawartości sacharozy oraz sumy glukozy i fruktozy (cukru inwertowanego, tzw. inwertu) wyrażono w g/100 g s.m. cukru.

Zawartość polifenoli ogółem (PO) w próbkach cukru oznaczono zmodyfikowaną metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem Folin-Ciocalteu (ChemPur, Polska) [Azlan i in. 2020, Lee i in. 2019, Seguí i in. 2015]. W tym celu do probówek o pojemności 15 cm³ dodawano kolejno: wodę dejonizowaną (8,9 cm³), 15% roztwór węgla sodu (0,5 cm³), 10% roztwór cukru (0,5 cm³) i odczynnik Folin-Ciocalteu (0,1 cm³). Po dokładnym wymieszaniu, próbki inkubowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Pomiar absorbancji wykonano przy użyciu spektrofotometru BECKMAN DU-530 (Wielka Brytania) przy długości fali 765 nm wobec próby odczynnikowej (ślepej). Zawartość polifenoli ogółem obliczono na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej dla kwasu galusowego w zakresie do 60 mg/dm³. Wyniki wyrażono w mg/100 g s.m. cukru w przeliczeniu na kwas galusowy (POL-AURA, Polska).

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej (DPPH) w próbkach cukru oznaczono metodą spektrofotometryczną z rodnikiem DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; TCI, Japonia) wg modyfikacji [Urbańska i in. 2020]. Do probówek o pojemności 10 cm³ dodawano w następnym kolejności: 2,4 cm³ roztworu rodnika DPPH (60 µM) w metanolu i 0,1 cm³ 10% roztworu cukru. Po wymieszaniu, próbki inkubowano w ciemności przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mierzono absorbancję przy użyciu spektrofotometru BECKMAN DU-530 (Wielka Brytania) przy długości fali 515 nm wobec wody dejonizowanej jako próby ślepej. Próbkę kontrolną stanowiła mieszanina wody dejonizowanej (0,1 cm³) z roztworem DPPH w metanolu (2,4 cm³). Aktywność antyoksydacyjną przy użyciu rodnika DPPH obliczono ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = [(A_0 - A_1) / A_0] \cdot 100$$

gdzie: A_1 – absorbancja rodnika DPPH z roztworem wodnym próbki,
 A_0 – absorbancja rodnika DPPH z wodą (tzw. próba kontrolna).

Aktywność antyoksydacyjną (DPPH) jako zdolność próbki do wychwytywania wolnych rodników DPPH wyrażono w μM Trolox (Sigma-Aldrich, Szwajcaria) na 100 g s.m. cukru.

Pomiar barwy próbek cukru wykonano przy użyciu kolorymetru Color Quest XE (HunterLab, USA) wyposażonego w ksenonową lampę błyskową w szklanych kuwetach o drodze optycznej 1 cm. Pomiary przeprowadzono w systemie CIE $L^*a^*b^*$ z zastosowaniem luminatu D65 i obserwatora 10° . Wyniki wyrażono jako parametry barwy: L^* (jasność/ciemność barwy), a^* (barwa czerwona/zielona) i b^* (barwa żółta/niebieska).

Oznaczenia wykonano w dwóch równoległych powtórzeniach dla każdej próbki cukru. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym. Analizę statystyczną uzyskanych wyników badań przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA 13 PL. W celu wyznaczenia grup jednorodnych wykonano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test NIR, przy poziomie istotności $p = 0,05$. W celu zbadania zależności pomiędzy ocenianymi wskaźnikami wyznaczono korelację Pearsona. Wyniki poddano też analizie składowych głównych (PCA).

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki cech fizykochemicznych ocenianych próbek cukru trzcinowego w odniesieniu do próbki kontrolnej (cukier biały buraczany) zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne próbek cukru trzcinowego i buraczanego
Physicochemical properties of cane sugar and beet sugar samples

Kod próbki	Wilgotność [%]	Zawartość popiołu [%]	Polaryzacja [$^\circ\text{Z}$]	Zawartość sacharozy [g/100 g s.m.]	Zawartość inwertu [g/100 g s.m.]	Zawartość skrobi [mg/kg]
B0	$0,01 \pm 0,00^a$	$0,02 \pm 0,00^a$	$100,0 \pm 0,1^f$	$99,7 \pm 0,3^k$	$< 0,01^a$	ns
T1	$0,06 \pm 0,01^a$	$0,71 \pm 0,01^d$	$99,2 \pm 0,1^{ef}$	$98,2 \pm 0,4^j$	$0,51 \pm 0,01^d$	$48,7 \pm 1,0^c$
T2	$0,05 \pm 0,01^a$	$0,18 \pm 0,01^c$	$99,3 \pm 0,5^{ef}$	$98,2 \pm 0,1^j$	$0,43 \pm 0,00^c$	$37,1 \pm 1,9^b$
T3	$2,24 \pm 0,00^e$	$2,61 \pm 0,02^h$	$90,8 \pm 0,7^d$	$87,5 \pm 0,1^e$	$1,97 \pm 0,01^h$	$27,0 \pm 1,0^{ab}$
T4	$1,96 \pm 0,02^d$	$2,60 \pm 0,01^h$	$93,6 \pm 1,5^c$	$88,0 \pm 0,2^f$	$1,39 \pm 0,01^f$	$31,0 \pm 1,0^{ab}$
T5	$2,50 \pm 0,02^f$	$2,68 \pm 0,05^i$	$90,9 \pm 0,2^d$	$86,2 \pm 0,4^c$	$1,52 \pm 0,01^g$	$20,9 \pm 1,9^a$
T6	$5,77 \pm 0,09^h$	$3,34 \pm 0,04^j$	$74,8 \pm 0,9^a$	$74,0 \pm 0,1^a$	$8,33 \pm 0,01^l$	$353,1 \pm 16,4^c$
E7	$0,04 \pm 0,00^a$	$0,12 \pm 0,00^b$	$99,7 \pm 0,0^f$	$97,2 \pm 0,2^i$	$0,40 \pm 0,01^b$	$50,4 \pm 2,4^c$
E8	$0,17 \pm 0,03^b$	$0,14 \pm 0,00^{bc}$	$97,9 \pm 0,0^e$	$96,5 \pm 0,2^h$	$0,88 \pm 0,01^e$	$88,7 \pm 3,8^d$
E9	$2,80 \pm 0,01^g$	$2,20 \pm 0,02^g$	$85,3 \pm 1,4^b$	$84,6 \pm 0,1^b$	$4,30 \pm 0,01^k$	$21,5 \pm 2,9^a$
E10	$1,69 \pm 0,02^c$	$1,18 \pm 0,01^e$	$92,0 \pm 0,1^{cd}$	$88,7 \pm 0,1^g$	$3,02 \pm 0,01^i$	$34,8 \pm 1,4^b$
E11	$1,67 \pm 0,01^c$	$1,29 \pm 0,00^f$	$87,3 \pm 0,0^b$	$86,9 \pm 0,2^d$	$3,96 \pm 0,00^j$	$30,4 \pm 2,9^{ab}$

Objaśnienia: B – cukier buraczany, T – cukier trzcinowy tradycyjny, E – cukier trzcinowy ekologiczny; ns – nie stwierdzono; a,b,c... – wielkości w kolumnach oznaczone różnymi literami dotyczą różnic istotnych statystycznie ($p \leq 0,05$).

Wilgotność cukru decyduje o jego jakości i stabilności podczas przechowywania. Wzrost higroskopijności powodują cukier inwertowany i melasa pokrywające kryształki cukru [Seguí i in. 2015]. Wilgotność próbki kontrolnej (tabela 2) spełniała wymagania stawiane dla cukru białego (max. 0,06%) [Rozp. UE Nr 1308/2013]. Trzy spośród ocenianych próbek cukrów trzcinowych, tj. próbki cukru nierafinowanego Demerara (T1, T2 i E7) wykazywały niską wilgotność (0,04-0,06%), która odpowiadała wymaganiom stawianym dla cukru białego. Ww. próbki nie różniły się istotnie statystycznie w poziomie wilgotności. Wilgotność pozostałych próbek kształtowała się w zakresie od 0,17% dla ekologicznej próbki cukru Demerara (E8) do 5,77% dla próbki cukru Jaggery (T6).

Obecność substancji mineralnych w cukrze wskazuje na pozostałości melasy w kryształach po procesie rafinacji. Zawartość popiołu konduktometrycznego jest miarą stężenia soli zdysocjowanych w roztworze, które przewodzą prąd elektryczny. Najniższe zawartości popiołu w przedziale od 0,12 do 0,18% (tabela 2) oznaczono w trzech nierafinowanych próbkach cukru brązowego Demerara (T2, E7 i E8). Zbieżne wyniki uzyskali Wojtczak i in. [2014] w konsumpcyjnych próbkach cukru trzcinowego brązowego, tj. od 0,05 do 0,42% popiołu konduktometrycznego. Istotnie wyższe zawartości popiołu oznaczono w pozostałych badanych próbkach, przy czym najwyższe ilości popiołu zawierała próbka cukru Jaggery (T6; 3,34%), a najniższe – próbka cukru brązowego Demerara (T1; 0,71%).

Polaryzacja zależy od stopnia rafinacji i odzwierciedla stężenie sacharozy w roztworze cukru. Wartości polaryzacji próbki kontrolnej B0 i E7 (tabela 2) były porównywalne z normatywami określonymi dla cukru białego, tj. min. 99,7°Z [Rozp. UE Nr 1308/2013]. Różnice te były statystycznie nieistotne. Jedna z próbek ekologicznych (E8) o polaryzacji na poziomie 97,9°Z nie różniła się istotnie od próbek T1 i T2. Pozostałe próbki cukru cechowały się niższą polaryzacją, tj. od 74,8°Z (próbka T6) do 93,6°Z (próbka T4). Oznaczona chromatograficznie zawartość sacharozy (Sach) w cukrze była bardzo silnie skorelowana z polaryzacją (Pol) ($r = 0,97$; tabela 4). Ponadto, analiza HPLC wykazała obecność cukrów redukujących w badanych próbkach cukrów tradycyjnych (średnio 2,36 g/100 g s.m.) i ekologicznych (średnio 2,51 g/100 g s.m.), przy czym najwyższe ilości cukru inwertowanego oznaczono w próbce T6 (8,33 g/100 g s.m.), a najniższe – w próbce E7 (0,40 g/100 g s.m.).

Ważnym wyróżnikiem oceny jakości cukru trzcinowego jest oznaczenie zawartości skrobi – polisacharydu, który nie występuje w cukrze z buraków cukrowych. W próbce cukru rafinowanego białego buraczanego (B0) nie stwierdzono skrobi. Według australijskich

i południowoafrykańskich standardów [Wojtczak i in. 2014], w zależności od gatunku cukru trzcinowego klasyfikowanego na podstawie polaryzacji, zawartość skrobi powinna wynosić od 40 do 110 mg/kg. W cukrach o bardzo wysokiej polaryzacji (V-VHP), normy brazylijskie dopuszczają zawartość skrobi do 250 mg/kg [Wojtczak i in. 2014]. W badanych próbkach cukru trzcinowego (tabela 2) zawartość skrobi kształtowała się od 20,9 mg/kg w próbce cukru z melasą (T5) do 88,7 mg/kg w próbce cukru Demerara z upraw ekologicznych (E8), a nawet do 353,1 mg/kg w próbce cukru Jaggery (T6). W badaniach Wojtczaka i in. [2014] uzyskano znacznie wyższe zawartości skrobi (165,1-306,3 mg/kg) w próbkach cukru brązowego o barwie powyżej 1000 IU. Badana przez tych autorów próbka rafinowanego trzcinowego cukru białego zawierała skrobię w ilości 51 mg/kg. W związku z powyższym, oznaczenie zawartości skrobi w cukrze może stanowić specyficzny wyróżnik jakości cukru trzcinowego jako kryterium oceny jego autentyczności.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki zabarwienia cukru w roztworze i parametrów barwy cukru oznaczone w systemie CIE $L^*a^*b^*$ oraz potencjału antyoksydacyjnego analizowanych próbek cukru trzcinowego w porównaniu z próbą cukru białego buraczanego (B0).

Tabela 3. Zabarwienie, parametry barwy i potencjał antyoksydacyjny próbek cukru trzcinowego i buraczanego

Color parameters and antioxidant potential of cane sugar and beet sugar samples

Kod próbki	Zabarwienie [IU]	Jasność barwy L^*	Parametr barwy a^*	Parametr barwy b^*	Zawartość polifenoli ogółem [mg GAE/100 g s.m.]	DPPH [μ M Trolox/100 g s.m.]
B0	37 ± 0^a	$87,7 \pm 0,6^g$	$-0,34 \pm 0,0^a$	$5,3 \pm 0,3^a$	ns	ns
T1	1566 ± 10^{ab}	$58,6 \pm 0,7^c$	$6,7 \pm 0,2^c$	$26,1 \pm 0,5^f$	$11,2 \pm 0,3^c$	$1,93 \pm 0,11^d$
T2	1764 ± 120^{ab}	$61,2 \pm 0,3^c$	$7,0 \pm 0,1^c$	$27,4 \pm 0,4^{fg}$	$8,4 \pm 0,0^b$	$1,74 \pm 0,02^c$
T3	33358 ± 1091^e	$25,3 \pm 1,8^a$	$8,5 \pm 1,0^d$	$11,7 \pm 1,7^c$	$139,5 \pm 1,4^i$	$3,46 \pm 0,05^g$
T4	28577 ± 2067^d	$28,0 \pm 1,2^a$	$10,8 \pm 0,3^e$	$16,9 \pm 0,7^d$	$123,2 \pm 0,9^g$	$3,00 \pm 0,02^f$
T5	45443 ± 5656^f	$23,3 \pm 2,8^a$	$7,1 \pm 0,4^c$	$9,3 \pm 0,9^b$	$147,5 \pm 0,8^j$	$3,70 \pm 0,08^h$
T6	53981 ± 1504^g	$43,1 \pm 3,8^{bc}$	$13,9 \pm 0,4^g$	$33,4 \pm 2,3^h$	$31,9 \pm 0,0^d$	$3,08 \pm 0,05^f$
E7	1227 ± 286^{ab}	$66,9 \pm 3,4^f$	$4,3 \pm 0,3^b$	$21,8 \pm 1,1^e$	$5,3 \pm 0,1^a$	$0,52 \pm 0,07^a$
E8	4562 ± 680^b	$45,0 \pm 1,6^c$	$9,9 \pm 0,3^e$	$27,7 \pm 0,6^{fg}$	$67,5 \pm 0,0^e$	$1,05 \pm 0,10^b$
E9	37197 ± 2362^e	$47,1 \pm 3,6^c$	$12,0 \pm 0,0^f$	$28,5 \pm 1,2^g$	$154,4 \pm 0,6^k$	$4,00 \pm 0,03^i$
E10	25644 ± 1468^d	$39,3 \pm 1,4^b$	$8,8 \pm 0,1^d$	$20,4 \pm 0,3^e$	$91,0 \pm 0,6^f$	$2,45 \pm 0,02^e$
E11	18937 ± 108^c	$52,7 \pm 1,4^d$	$11,8 \pm 0,6^f$	$32,2 \pm 0,7^h$	$129,5 \pm 1,3^h$	$3,34 \pm 0,01^g$

Objaśnienia: B – cukier buraczany, T – cukier trzcinowy tradycyjny, E – cukier trzcinowy ekologiczny; ns – nie stwierdzono; a,b,c... – wielkości w kolumnach oznaczone różnymi literami dotyczą różnic istotnych statystycznie ($p \leq 0,05$).

Barwa jest najważniejszą cechą fizyczną produktów spożywczych, która wpływa na percepcję konsumentów. Stopień rafinacji cukru trzcinowego, czyli jego oczyszczenia ze związków niecukrowych, decyduje o zabarwieniu roztworów cukru (Br). Produkty nierafinowane mogą przybierać barwę od jasno do ciemnobrązowej, która zależy od zawartej w cukrze melasy, polifenoli i naturalnych pigmentów pochodzących z trzciny cukrowej. Brązowanie cukrów mogą powodować melanoidyny, tj. produkty reakcji cukrów redukujących z aminokwasami, które mogą tworzyć się podczas ogrzewania soku surowego [Lee i in. 2019]. Wskaźnik zabarwienia jest jednym z kryteriów klasyfikacji cukru trzcinowego, podobnie jak polaryzacja.

Barwa próbki cukru białego buraczanego B0 (37 IU) spełniała wymagania stawiane dla cukru białego [FAO/WHO 2019]. Zabarwienie (Br) badanych cukrów trzcinowych (tabela 3) kształtowało się od 1227 IU dla ekologicznej próbki cukru nierafinowanego (E7) do 53981 IU dla próbki cukru Jaggery (T6). Analiza statystyczna wykazała statystycznie istotne różnice między zabarwieniem próbki kontrolnej (B0) a pozostałych próbek. Zabarwienie badanych przez Eggleston i in. [2021] wirowanych produktów z trzciny cukrowej wahało się od 17 IU (rafinowany cukier biały trzcinowy) do 18073 IU (ekologiczny ciemny cukier trzcinowy). Z kolei zabarwienie próbek cukrów niewirowanych kształtowało się od 14370 IU (jasny cukier trzcinowy panela) do 32832 IU (ekologiczny puder jaggery). W badaniach Seguí i in. [2015], najciemniejszym zabarwieniem, spośród analizowanych cukrów nierafinowanych, cechowały się cukry jaggery (15142-16606 IU), jednakże największe wartości wykazywał miód trzcinowy (18715 IU).

Analiza danych z tabeli 2 i 3 wskazuje, że w porównaniu do pozostałych próbek, cukry trzcinowe (T1, T2 i E7), poza jaśniejszym zabarwieniem (1227-1764 IU), charakteryzowały się wyższym stopniem polaryzacji ($99,2-99,7^{\circ}Z$) i niższą wilgotnością (0,04-0,06%). Pomimo, że analiza wykazała istotną statystycznie korelację Pearsona ($r = -0,87$) między polaryzacją (Pol) i zabarwieniem cukru (Br) (tabela 4), oznaczenie omawianych wskaźników jakości w przypadku ww. próbek cukru trzcinowego może nie być jednoznaczne w ocenie zafałszowania cukru białego buraczanego, np. karmelem. Mając na uwadze, że w ww. próbkach stwierdzono obecność skrobi (tabela 2), nasuwa się przypuszczenie, że mogą to być próbki rafinowanego białego cukru trzcinowego zmieszane z karmelizowanymi, brązowymi produktami ubocznymi przetwarzania trzciny cukrowej, tj. melasą lub syropami odciekowymi [Wojtczak i in. 2012].

Oceniane próbki cukrów trzcinowych zostały poddane także analizie parametrów barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$ (tabela 3). Parametr L^* opisujący jasność barwy wykazywał

najwyższą wartość 87,7 dla próbki cukru białego (B0). Spośród próbek cukrów trzcinowych, najjaśniejszą barwą o wartości 66,9 cechowała się próbka nierafinowanego cukru ekologicznego (E7). Z kolei, najciemniejszą barwą odznaczały się próbki cukrów ciemnych Muscovado i cukru z melasą o wartości parametru L^* od 23,3 (dla próbki T5) do 28,0 (dla próbki T4). Stwierdzono istotną statystycznie ujemną korelację ($r = -0,72$) między zabarwieniem cukru (Br) a parametrem barwy L^* (tabela 4). Wartości parametru a^* badanych próbek cukrów trzcinowych mieściły się w zakresie barwy czerwonej od 4,3 do 13,9, zaś parametru b^* – w zakresie barwy żółtej od 9,3 do 33,4. Najwyższe wartości parametrów barwy a^* i b^* zmierzono dla próbki cukru Jaggery (T6).

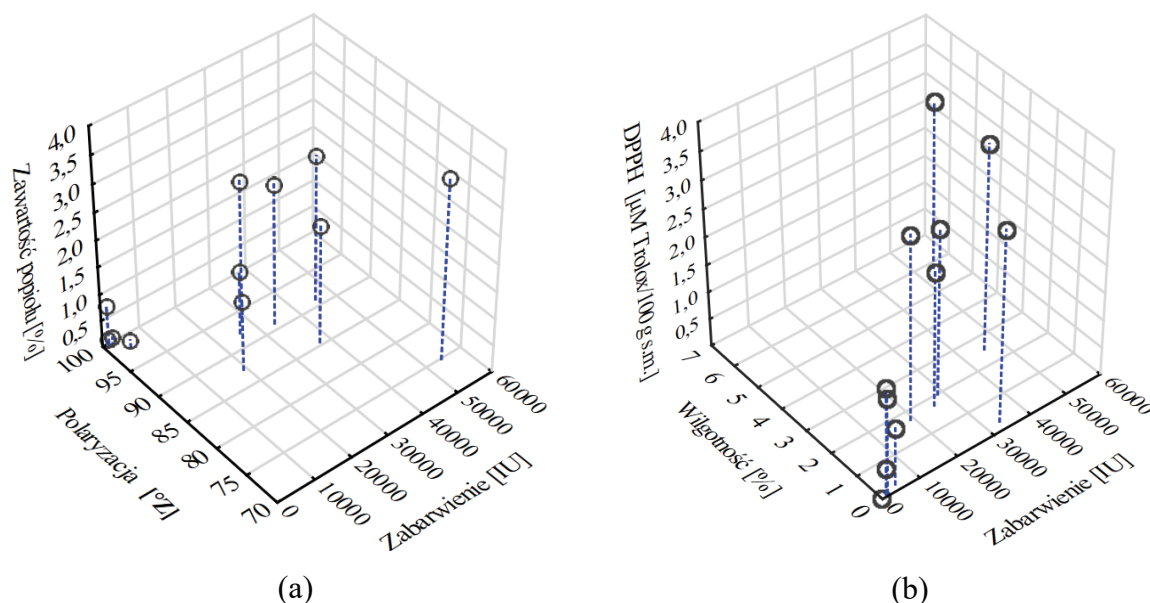
Stopień rafinacji cukru trzcinowego, poza kształtowaniem barwy, wpływa na zawartość polifenoli i flawonoidów występujących w melasie oraz właściwości przeciwutleniające [Azlan i in. 2020, Barrera i in. 2020, Lee i in. 2019, Asikin i in. 2017]. W analizowanych próbkach cukru trzcinowego zawartość polifenoli ogółem (tabela 3) mieściła się w przedziale od 5,3 do 154,4 mg/100 g s.m. w przeliczeniu na kwas galusowy (GAE), przy czym najniższe zawartości polifenoli ogółem oznaczono w próbce cukru ekologicznego (E7), zaś najwyższe – w próbce cukru ekologicznego Rapadura (E9). W próbce kontrolnej (B0) nie stwierdzono obecności związków polifenolowych (tabela 3). Analiza statystyczna (tabela 4) wykazała dodatnią istotną zależność pomiędzy zawartością polifenoli ogółem (PO) a zabarwieniem (Br) cukru ($r = 0,64$). Zawartość polifenoli w cukrach trzcinowych brązowych będących przedmiotem badań Seguí i in. [2015] kształtowała się od 37,2 do 81,0 mg GAE/100 g, zaś próbka rafinowanego cukru trzcinowego zawierała 0,4 mg GAE/100 g.

Aktywność antyoksydacyjna cukrów trzcinowych oznaczona przy użyciu rodnika DPPH (tabela 3) mieściła się w zakresie od 0,52 do 4,00 μM Troloxu/100 g s.m. produktu. Podobnie jak w przypadku zawartości polifenoli ogółem, największą zdolność zmiatania wolnych rodników wykazywała próbka ekologicznego cukru Rapadura (E9), a najmniejszą próbka cukru BIO trzcinowego nierafinowanego (E7). Wykazano silne statystycznie istotne korelacje pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną (DPPH) a zabarwieniem (Br) próbek ($r = 0,82$), jak również pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną a zawartością polifenoli ogółem (PO) ($r = 0,83$) i popiołu konduktometrycznego (Pk; $r = 0,85$) (tabela 4).

Na rysunku 1 w układzie 3D zobrazowano oddziaływanie wybranych wyróżników jakościowych ocenianych próbek na zabarwienie cukru.

Prezentacja danych na rysunku 1a obrazuje silne statystycznie istotne korelacje wskaźnika zabarwienia (Br) cukru z zawartością popiołu konduktometrycznego (Pk; $r = 0,95$) oraz wskaźnikiem polaryzacji ($r = -0,87$). Zabarwienie cukru korelowało silnie dodatnio

z wilgotnością (W; $r = 0,94$) oraz aktywnością antyoksydacyjną (DPPH; $r = 0,82$), co zobrazowano na rysunku 1b.



Rysunek 1. Wpływ wybranych wskaźników i zabarwienia na właściwości próbek cukrów w układzie 3D: (a) zawartości popiołu konduktometrycznego od polaryzacji i zabarwienia, (b) zależność aktywności przeciwutleniającej od wilgotności i zabarwienia.

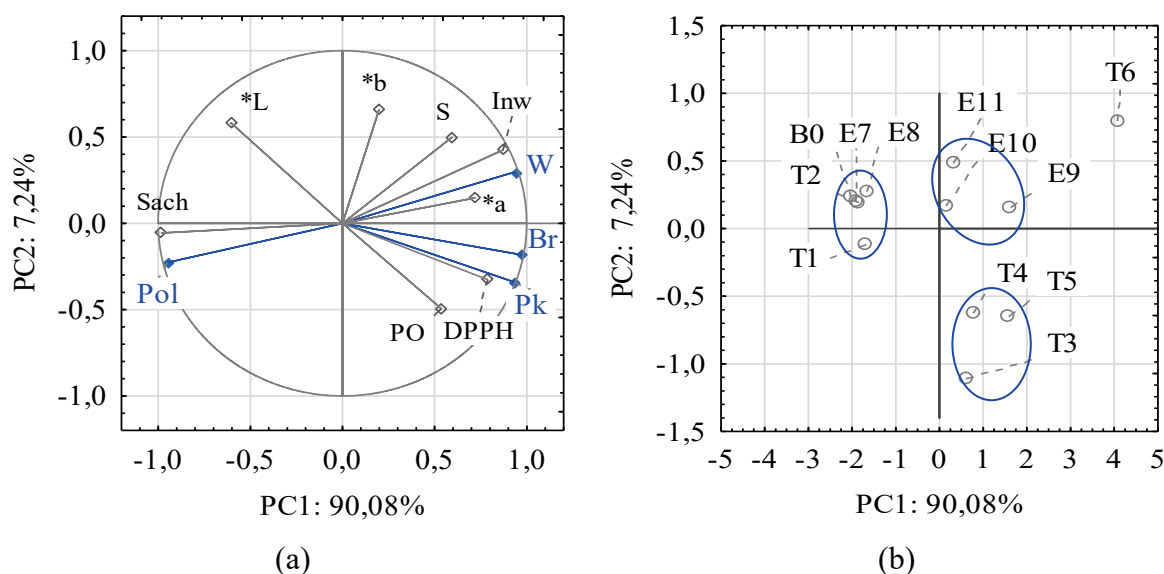
The influence of selected indicators and color on the properties of sugar samples in a 3D system: (a) conductometric ash content on polarization and color; (b) dependence of antioxidant activity on moisture content and color.

Tabela 4. Współczynniki korelacji Pearsona między ocenianymi parametrami próbek cukrów
Pearson's correlation coefficients between the assessed parameters of sugar samples

Parametr	W	Pk	Pol	Sach	Inw	S	Br	L*	a*	b*	PO	DPPH
W	1											
Pk	0,90*	1										
Pol	-0,96*	-0,81*	1									
Sach	-0,98*	-0,90*	0,97*	1								
Inw	0,91*	0,67*	-0,97*	-0,91*	1							
S	0,70*	0,41*	-0,66*	-0,61*	0,76*	1						
Br	0,94*	0,95*	-0,87*	-0,95*	0,76*	0,45*	1					
L*	-0,54*	-0,76*	0,46*	0,61*	-0,31	-0,11	-0,72*	1				
a*	0,69*	0,64*	-0,76*	-0,77*	0,75*	0,50*	0,64*	-0,63*	1			
b*	0,23	-0,01	-0,39	-0,27	0,53*	0,51*	0,03	0,04	0,68*	1		
PO	0,42*	0,64*	-0,45*	-0,54*	0,27	-0,26	0,64*	-0,76*	0,53*	-0,11	1	
DPPH	0,70*	0,85*	-0,72*	-0,78*	0,58*	0,11	0,82*	-0,77*	0,74*	0,18	0,83*	1

Objaśnienia: W – wilgotność, Pk – zawartość popiołu konduktometrycznego, Pol – polaryzacja, Sach – zawartość sacharozy, Inw – zawartość cukru inwertowanego, S – zawartość skrobi, Br – zabarwienie, L* – parametr barwy L, a* – parametr barwy a, b* – parametr barwy b, PO – zawartość polifenoli ogółem, DPPH – aktywność antyoksydacyjna, * – współczynniki korelacji istotne statystycznie ($p \leq 0,05$).

Silne i statystycznie istotne korelacje (tabela 4) pomiędzy wskaźnikami jakościowymi pozwoliły na przeprowadzenie analizy składowych głównych (PCA), której celem było ułatwienie oceny jakości i zobrazowania różnic pomiędzy poszczególnymi rodzajami badanych próbek cukrów trzcinowych. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 2.



Rysunek 2. Analiza składowych głównych (PCA) dla wyróżników jakościowych i potencjału antyoksydacyjnego próbek cukrów: (a) wykres PCA głównych składowych PC1 i PC2, (b) wykres punktowy badanych próbek na płaszczyźnie PC1 vs. PC2. Niebieskie linie na rysunku 2a wskazują aktywne dane uwzględnione w analizie PCA, a na rysunku 2b dotyczą wydzielenia grup próbek cukru o podobnych właściwościach.

Principal component analysis (PCA) for the qualitative characteristics and antioxidant potential of sugar samples: (a) PCA plot of two principal components PC1 and PC2, (b) score plot presenting analyzed samples in terms of PC1 vs. PC2. The blue lines in figure 2a indicate the active data included in the PCA analysis, and in figure 2b they refer to the separation of a group of sugar samples with similar properties.

Główne składowe PC1 i PC2 wyjaśniły 97,32% zmienności, czyli odpowiednio 90,08% i 7,24%. Pierwszą składową (PC1) z uwzględnieniem współrzędnych czynnikowych (r) wyznaczonych na podstawie korelacji stanowiły następujące zmienne aktywne: zabarwienie cukru (Br; $r = 0,97$), wilgotność (W; $r = 0,94$), polaryzacja (Pol; $r = -0,95$) i zawartość popiołu konduktometrycznego (Pk; $r = 0,93$) oraz zawartość sacharozy (Sach; $r = -0,99$) i cukru inwertowanego (Inw; $r = 0,87$) oraz aktywność antyoksydacyjna (DPPH; $r = 0,79$). Drugą główną składową (PC2) tworzyły przede wszystkim parametry barwy b^* ($r = 0,66$) i L^* ($r = 0,58$). Na kształtowanie jakości badanych próbek cukru trzcinowego i białego (buraczanego) duży wpływ miały zmienne charakteryzujące się dłuższymi liniami

wychodzącymi ze środka okręgu (rysunek 1a).

Analiza składowych głównych (PCA) pozwoliła na wyznaczenie zmiennych (wyróżników jakości) mających wpływ na tworzenie jednorodnych grup. Na podstawie uzyskanych wyników badane próbki cukrów trzcinowych podzielono na cztery grupy (rysunek 2b). Pierwszą grupę stanowiły próbki B0, T1, T2, E7 i E8, tj. cukier biały buraczany (próbka odniesienia) oraz nierafinowane cukry trzcinowe tradycyjne i ekologiczne zadeklarowane przez producentów jako cukry Demerara i brązowe, które na tle pozostałych cukrów wyróżniały się jasnobrązową barwą, wysoką polaryzacją i niską wilgotnością. W drugiej grupie znalazły się tradycyjne nierafinowane cukry trzcinowe ciemne Muscovado i cukier z melasami (T3, T4 i T5), które cechowało ciemne zabarwienie roztworu (średnio 35793 IU), wysoka wilgotność (średnio 2,23%) i zawartość popiołu konduktometrycznego (średnio 2,63%), stosunkowo wysoka zawartość polifenoli ogółem (średnio 136,7 mg GA/100 g s.m.) i aktywność antyoksydacyjna (średnio 3,39 μ M Troloxu/100 g s.m.). Poza tym próbki te w porównaniu z innymi, wykazywały niską wartość parametru jasności barwy L*. Na kolejną grupę nierafinowanych cukrów trzcinowych składały się ekologiczne próbki Rapadura, Mascobado i Jaggery (E9, E10 i E11). Próbki te, w porównaniu z wcześniej omawianą grupą cukrów, wykazywały nieznacznie niższe wartości wskaźnika zabarwienia, niższą wilgotność, zawartość popiołu konduktometrycznego, polifenoli ogółem oraz aktywność antyoksydacyjną. Na tle ww. próbek najbardziej wyróżniała się próbka cukru trzcinowego Jaggery (T6). Cukier ten charakteryzował się najniższą polaryzacją, ale najwyższą wilgotnością, zawartością popiołu konduktometrycznego, cukru inwertowanego i skrobi oraz wartością parametrów barwy a* i b*, co wskazuje na niski stopień rafinacji tego produktu.

Wyniki uzyskane w analizie składowych głównych (PCA) są potwierdzeniem opisanych wcześniej danych i pozwalają na wskazanie rodzajów nierafinowanych cukrów trzcinowych o zbliżonych cechach. Analiza PCA wykazała różnice między próbkami z upraw ekologicznych i tradycyjnych wyłącznie dla asortymentu ciemnych cukrów trzcinowych. Próbki nierafinowanych cukrów brązowych Demerara (T1, T2, E7 i E8) były podobne do próbki odniesienia (B0), czyli cukru białego z buraków cukrowych, zarówno pod względem ocenianych wskaźników jakościowych jak i pochodzenia uprawy trzciny cukrowej.

Trudno przyjąć argumentację, że cukier biały wyprodukowany z buraków cukrowych jest zbliżony jakościowo (pod względem badanych w niniejszej pracy wyróżników jakościowych) do nierafinowanego cukru brązowego trzcinowego. W przedstawionych badaniach cukier biały stanowił jedynie próbkę odniesienia dla analizowanych próbek cukrów trzcinowych

i wraz z nimi został objęty analizą statystyczną. W rezultacie stanowi jedną grupę z próbkami cukrów trzcinowych brązowych Demerara (T1, T2, E7 i E8). Być może takie przyporządkowanie było spowodowane niedostateczną liczbą ocenianych próbek. Niemniej jednak, w oparciu o powyższe sformułowano poniższe spostrzeżenia i wnioski.

WNIOSKI

1. Wykazano podobieństwo próbek nierafinowanego cukru trzcinowego brązowego Demerara z rafinowanym cukrem buraczanym, co potwierdziła analiza statystyczna i analiza składowych głównych (PCA). Próbkę tę nie różniły się poziomem wilgotności, polaryzacji i zabarwienia cukru. Istnieje prawdopodobieństwo, że oceniane próbki cukru Demerara stanowiły rafinowany biały cukier trzcinowy wtórnie zmieszany z melasą lub syropami odciekowymi.
2. Próbkę ciemnych cukrów trzcinowych, w porównaniu do białego cukru buraczanego, cechowały się niższą polaryzacją i zawartością sacharozy, ale ciemniejszym zabarwieniem, wyższą wilgotnością, zawartością popiołu konduktometrycznego, cukrów redukujących i skrobi oraz aktywnością antyoksydacyjną (DPPH), wynikającą głównie z obecności polifenoli.
3. W przypadku ciemnych cukrów trzcinowych wykazano różnice istotne statystycznie między próbkami z upraw tradycyjnych i ekologicznych, czego nie stwierdzono dla próbek cukrów o jasnobrązowej barwie.
4. Najwyższą jakością pod względem większości ocenianych parametrów, wskazujących na niski stopień rafinacji, cechowała się próbka tradycyjnego cukru trzcinowego Jaggery. Na tle ocenianych próbek, cukier ten wyróżniał się najniższą polaryzacją, ale najwyższą wilgotnością, zawartością popiołu, cukru inwertowanego oraz skrobi. Jednocześnie charakteryzował się najciemniejszym zabarwieniem, które prawdopodobnie wpłynęło na najwyższe wartości wskaźników parametrów barwy czerwonej i żółtej (a^* i b^*).
5. Oznaczenie skrobi w cukrach trzcinowych może być parametrem odróżniającym je od cukru buraczanego, a tym samym stanowić kryterium oceny ich autentyczności.

PIŚMIENNICTWO

1. Asikin Y., Takahara W., Takahashi M., Hirose N., Ito S., Wada K. (2017). Compositional and Electronic Discrimination Analyses of Taste and Aroma Profiles of Non-Centrifugal Cane Brown Sugars. *Food Anal. Methods* 10 (6), 1844-1856

- <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0746-5>
2. Azlan A., Khoo H.E., Sajak A.A.B., Kadir N.A.A.A., Yusof B.N.M., Mahmood Z., Sultana S. (2020). Antioxidant activity, nutritional and physicochemical characteristics, and toxicity of minimally refined brown sugar and other sugars. *Food Sci. Nutr.* 8, 5048-5062. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1803>
 3. Barrera C., Betoret N., Seguí L. (2020). Phenolic Profile of Cane Sugar Derivatives Exhibiting Antioxidant and Antibacterial Properties. *Sugar Tech* 22 (3) <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00817-y>
 4. Cervera-Chiner L., Barrera C., Betoret N., Seguí L. (2021). Impact of sugar replacement by non-centrifugal sugar on physicochemical, antioxidant and sensory properties of strawberry and kiwifruit functional jams. *Heliyon* 7 (1). e05963 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05963>
 5. Chmielewski Ł. (2021). Supply and demand situation and proces on the global and polish sugar market. *Zagadnienia Ekonomiki Rolnej* 4 (369), 95-115 <https://doi.org/10.30858/zer/142755>
 6. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens); Turck D., Bohn T., Castenmiller J., de Henauw S., Hirsch-Ernst K.I., Knutsen H.K., Maciuk A., Mangelsdorf I., McArdle H.J., Naska A., Peláez C., Pentieva K., Siani A., Thies F., Tsabouri S., Adan R., Emmett P., Galli C., Kersting M., Moynihan P., Tappy L., Ciccolallo L., de Sesmaisons-Lecarré A., Fabiani L., Horvath Z., Martino L., Muñoz Guajardo I., Valtueña Martínez S., Vinceti M. (2022). Tolerable upper intake level for dietary sugars (Scientific Opinion). *EFSA J.* 20 (2), 7074 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
 7. Eggleston G. (2018). Positive Aspects of Cane Sugar and Sugar Cane Derived Products in Food and Nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 66 (16), 4007-4012 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05734>
 8. Eggleston G., Aita G., Triplett A. (2021). Circular Sustainability of Sugarcane: Natural, Nutritious, and Functional Unrefined Sweeteners That Meet New Consumer Demands. *Sugar Tech* 23, 964-973. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-00994-4>
 9. FAO/WHO. (2019). Standard for sugars. *Codex Alimentarius CXS* 212-1999
 10. Hryszko K., Szajner P. (2013). Sytuacja na światowym rynku cukru i jej wpływ na możliwości uprawy buraków cukrowych w Polsce. W: *Program Wieloletni 2011-2014*, Warszawa: IERiGŻ-PIB

11. ICUMSA GS1/3/4/7/8-13. (1994). Oznaczanie zawartości popiołu konduktometrycznego w cukrze surowym – oficjalna. Wyd. Bartens Sp. z o. o., Słubice
12. ICUMSA GS1/3-7. (2011). Oznaczanie zabarwienia roztworu cukru surowego, cukru brązowego i ciemnych syropów przy pH 7,0 – oficjalna. Wyd. Bartens Sp. z o. o., Słubice
13. ICUMSA GS1-16. (2013). Oznaczenie zawartości skrobi w cukrze surowym metodą BSES – oficjalna. Wyd. Bartens Sp. z o. o., Słubice
14. ICUMSA GS2/1/3/9-15. (2007). Oznaczanie wilgotności cukru jako ubytek masy przy suszeniu – oficjalna. Wyd. Bartens Sp. z o. o., Słubice
15. ICUMSA GS2/3/9-17. (2011). Oznaczanie popiołu konduktometrycznego w produktach wysokiej czystości – oficjalna. Wyd. Bartens Sp. z o. o., Słubice
16. ICUMSA GS2/3-1. (2011). Oznaczanie polaryzacji cukru białego metodą Instytutu Cukrownictwa w Brunszwiku – oficjalna (referencyjna). Wyd. Bartens Sp. z o.o., Słubice
17. ICUMSA GS2/3-10. (2011). Oznaczanie zabarwienia roztworu cukru białego – oficjalna. Wyd. Bartens Sp. z o. o., Słubice
18. Jaffé W.R. (2015). Nutritional and functional components of non centrifugal cane sugar: A compilation of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* 43, 194-202. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.06.007>
19. Lee J.S., Ramalingam S., Jo I.G., Kwon Y.S., Bahuguna A., Oh Y.S., Kwon O.J., Kim M. (2019). Comparative study of the physicochemical, nutritional, and antioxidant properties of some commercial refined and non-centrifugal sugars. *Food Res. Int.* 10, 614-625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.047>
20. Molina-Cortés A., Quimbaya M., Toro-Gomez A., Tobar-Tosse F. (2023). Bioactive compounds as an alternative for the sugarcane industry: Towards an integrative approach. *Heliyon* 9, e13276. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13276>
21. Monakhova Y.B., Diehl B.W.K. (2016). Authentication of the origin of sucrose-based sugar products using quantitative natural abundance ¹³C NMR. *J. Sci. Food Agric.* 96, 2861-2866. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7456>
22. Przygoda B., Jarosz M., Sajór I. (2020). Węglowodany. W: Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie. Pr. zbior. pod red. M. Jarosz, E. Rychlik, K. Stoś, J. Charzewskiej. Warszawa: NIZP-PZH
23. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) Nr 1308/2013 z dnia 17 grudnia 2013 r. ustanawiające wspólną organizację rynków rolnych oraz uchylające rozporządzenia Rady (EWG) nr 922/72, (EWG) nr 234/79, (WE) nr 1037/2001 i (WE) nr 1234/2007 (Dz.U. L 347 z 20.12.2013 z późn. zm.)

24. Salamon A., Piecyk M., Napiórkowski M., Kowalska H. (2021). Characteristics of the properties of cane sugar and the assessment of its availability on the local market of Warsaw. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* 31/58, 1, 35-41
25. Schlumbach K., Pautov A., Flöter E. (2017). Crystallization and analysis of beet and cane sugar blends. *J. Food Eng.* 196, 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.026>
26. Seguí L., Calabuig-Jiménez L., Betoret N., Fito P. (2015). Physicochemical and antioxidant properties of non-refined sugarcane alternatives to white sugar. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50 (12), 2579-2588. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12926>
27. Sharifi-Rad J., Painuli S., Sener B., Kılıç M., Kumar N.V.A., Semwal P., Docea A.O., Suleria H.A.R., Calina D. (2023). Revisiting the nutraceutical profile, chemical composition, and health benefits of jaggery: Updates from recent decade. *eFood*, 4 (2), e75. <https://doi.org/10.1002/efd2.75>
28. Singh A., Lal U.R., Mukhtar H.M., Singh P.S., Shah G., Dhawan R.K. (2015). Phytochemical profile of sugarcane and its potential health aspects. *Phcog Rev.* 9 (17), 45-54. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156340>
29. Stanhope K.L. (2016). Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 53 (1), 52-67
<https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1084990>
30. Urbańska B., Szafranski T., Kowalska H., Kowalska J. (2020). Study of Polyphenol Content and Antioxidant Properties of Various Mix of Chocolate Milk Masses with Different Protein Content. *Antioxidants* 9 (4), 299. <https://doi.org/10.3390/antiox9040299>
31. Ustawa z dnia 11 września 2015 roku o zdrowiu publicznym. (Dz.U. 2015 r. poz. 1916 z późn. zm.)
32. Wojtczak M., Antczak A., Lisik K. (2014). Starch Content in Various Types of Cane Sugars as a Criterion of Quality and Authenticity. *Int. J. Food Prop.* 17 (3), 610-616. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.654565>
33. Wojtczak M., Biernasiak J., Papiewska A. (2012). Evaluation of microbiological purity of raw and refined white cane sugar. *Food Control* 25, 136-139
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.031>
34. Zidan D., Azlan A. (2022). Non-Centrifugal Sugar (NCS) and Health: A Review on Functional Components and Health Benefits. *Appl. Sci.* 12, 460
<https://doi.org/10.3390/app12010460>

PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH MIĘSA BYKÓW JELENIA SZLACHETNEGO (*CERVUS ELAPHUS* L.) PODDANEGO DOJRZEWANIU „NA MOKRO” I ZAMRAŻALNICZEMU PRZECHOWYWANIU

Tomasz Daszkiewicz

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Katedra Towaroznawstwa i Przetwórstwa Surowców Zwierzęcych
ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn

tomasz.daszkiewicz@uwm.edu.pl

Otrzymano: 11 grudnia 2023

Poprawiono: 9 stycznia 2024

Zaakceptowano: 10 stycznia 2024

Streszczenie

Celem badań była analiza wpływu dojrzewania na „mokro” i długotrwałego zamrażalniczego przechowywania mięsa (*Longissimus thoracis et lumborum*, LTL) byków jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus* L.) na jego profil kwasów tłuszczowych. W tłuszczu śródmięśniowym próbek nieprzechowywanych, po dojrzewaniu (10 dni) i zamrażalniczym przechowywaniu (9 miesięcy) przeanalizowano profil kwasów tłuszczowych. Stwierdzono, że próbki poddane zamrażalniczemu przechowywaniu po dojrzewaniu charakteryzowały się korzystniejszym ($P \leq 0,05$) stosunkiem udziału kwasów tłuszczowych nienasyconych i jednonienasyconych do kwasów tłuszczowych nasyconych (odpowiednio 0,92 i 0,68) w porównaniu z próbkami analizowanymi bezpośrednio po dojrzewaniu (odpowiednio 0,76 i 0,59) oraz próbkami zamrożonymi z pominięciem procesu dojrzewania (odpowiednio 0,82 i 0,61). Stwierdzony brak niekorzystnych zmian profilu kwasów tłuszczowych w mięsie jelenia szlachetnego przechowywanym zamrażalniczo po zastosowaniu dojrzewania „na mokro” wskazuje, że technologia ta może być alternatywą dla tradycyjnej technologii mrożenia dziczyzny po uprzednim przeprowadzeniu dojrzewania w tuszach.

Słowa kluczowe: dziczyzna, dojrzewanie, mrożenie, profil kwasów tłuszczowych

THE FATTY ACID PROFILE OF MEAT FROM MALE RED DEER (*CERVUS ELAPHUS* L.) SUBJECTED TO WET AGING AND FREEZER STORAGE

Summary

The aim of this study was to analyze the effect of “wet” aging and long-term freezer storage of meat (*Longissimus thoracis et lumborum*, *LTL*) from male red deer (*Cervus elaphus* L.) on its fatty acid profile. The fatty acid profile of intramuscular fat was determined in unstored, aged (10 days) and freezer-stored (9 months) samples. It was found that samples subjected to freezer storage after wet aging were characterized by a more favorable ($P \leq 0,05$) ratio of unsaturated and monounsaturated fatty acids to saturated fatty acids (0.92 and 0.68, respectively) than samples analyzed directly after aging (0.76 and 0.59, respectively) and samples that were frozen without aging (0.82 and 0.61, respectively). No undesirable changes in the fatty acid profile of red deer meat that was wet-aged and freezer-stored indicate that this technology can offer an alternative to conventional freezing of game meat after carcass aging.

Keywords: game meat, ageing, freezing, fatty acid profile

WSTĘP

Podaż mięsa zwierząt łownych na rynku pozostaje w związku z kalendarzem polowań (okresami ochronnymi) ustanowionym prawem, którego muszą przestrzegać myśliwi [Rozporządzenie Ministra Środowiska 2005]. Produkt ten musi być zatem utrwalany w okresie zwiększonej dostępności w celu jej zapewnienia także poza sezonem łowieckim. Jest to koniecznością również ze względu na właściwości mięsa (duża zawartość składników odżywczych i wody, stosunkowo wysoka wartość pH), które czynią go doskonałym środowiskiem dla rozwoju drobnoustrojów, a tym samym nietrwałym [Albrecht, Correa Dresch 2021]. Metodą konserwacji żywności umożliwiającą ich długotrwałe przechowywanie, a jednocześnie mało destrukcyjną jest zamrażanie [Zhang i in. 2023].

Mięso pełni swoich walorów technologicznych i kulinarnych uzyskuje w wyniku prawidłowo przeprowadzonego procesu dojrzewania. W tym czasie, w wyniku ukierunkowanych przemian biochemicznych zachodzących w odpowiednich warunkach (temperatura, wilgotność), poprawiają się jego cechy organoleptyczne i strawność składników [Dashdorj i in. 2016]. Proces dojrzewania mięsa może być realizowany zarówno przed, jak i po mrożeniu [da Silva Bernardo i in. 2020], z wykorzystaniem jednej z dwóch metod. Są nimi dojrzewanie „suche” i „mokre” [Kim i in. 2022].

W czasie tradycyjnego dojrzewania „suchego”, któremu poddaje się tusze wołowe lub jej

wyręby, przetrzymuje się je (21-35 dni) w powietrzu o określonej wilgotności względnej (75-85%) i temperaturze (1-4°C) oraz jego ustalonym przepływie (0,5-2,5 m/s) [EFSA BIOHAZ Panel i in. 2023]. Wyniki badań [Pogorzelski i in. 2021] wskazują, że konsumenci wyżej oceniają jakość mięsa dojrzewającego na „sucho”. Ze względu na straty zachodzące podczas tego dojrzewania, wpływające na ekonomikę produkcji, wykorzystanie tej metody w praktyce produkcyjnej jest jednak ograniczone [Kim i in. 2020]. W zmodyfikowanej wersji dojrzewania „suchego” prowadzi się je po uprzednim zapakowaniu mięsa w folię o dużej przepuszczalności wilgoci [Setyabrata i in. 2022]. Zabieg ten umożliwia zwiększenie wydajności procesu dojrzewania oraz ogranicza rozwój mikroflory.

W trakcie dojrzewania „mokrego” wołowiny, wieprzowiny i jagnięciny przetrzymuje się je chłodniczo (wołowina 0-4°C przez 14-49 dni, wieprzowina 0-4°C przez 4-6 dni, jagnięcina od -1 do 5°C przez 7-77 dni) po uprzednim zapakowaniu próżniowym w opakowanie z folii o właściwościach barierowych [EFSA BIOHAZ Panel i in. 2023]. W odróżnieniu od dojrzewania „suchego”, w metodzie „mokrej” wilgotność i przepływ powietrza nie mają praktycznie znaczenia [Hulánková i in. 2018]. Negatywnym aspektem „mokrego” dojrzewania mięsa jest powstawanie niekorzystnych wrażeń smakowo-zapachowych związanych z nagromadzeniem metabolitów bakterii fermentacji mlekowej [Li i in. 2021].

Niska temperatura nie zatrzymuje procesów biofizykochemicznych w produkcji i mogą w nim postępować niepożądane zmiany. Do istotnych zmian jakościowych zachodzących w tłuszczu w trakcie chłodniczego i zamrażalniczego przechowywania należą zmiany wywołane reakcjami ich hydrolizy i oksydacji [Al-Dalali i in. 2022]. Utlenianie tłuszczu prowadzi do niekorzystnych zmian sensorycznych produktu, zmniejszenia jego wartości odżywczej, rozkładu rozpuszczonych w tłuszczu związków (w tym witamin) i nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz tworzenia się związków toksycznych [Geng i in. 2023]. Ze względu na znaczenie biologiczne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [Harayama, Shimizu 2020], a jednocześnie ich podatność na utlenianie, ze szczególną uwagą należy podchodzić do kwestii właściwego utrwalania produktów zawierających dużo tych związków. Do takich produktów należy dziczyzna, która dodatkowo zawiera dużo żelaza hemowego mogącego pełnić rolę prooksydanta [Florek, Drozd 2013].

Zmiany jakości tłuszczu w trakcie chłodniczego i zamrażalniczego przechowywania mogą pozostawać m.in. w związku z czasem i warunkami przechowywania [Flavia i in. 2014]. W dostępnej literaturze dostępne są liczne wyniki badań jakości mięsa zwierząt gospodarskich poddanego dojrzewaniu na „mokra” i mrożeniu. Brakuje natomiast informacji na ten temat w odniesieniu do dziczyzny, w tym pochodzącej od jeleniowatych, którą zamraża

się po uprzednim dojrzewaniu prowadzonym w szerokim zakresie temperatury (4–10°C) i czasu (1–4 dni), stosując różne metody (dojrzewanie mięsa w tuszach oskórowanych lub nieoskórowanych) [Soriano i in. 2016]. W związku z tym przeprowadzono badania, których celem była analiza wpływu dojrzewania na „mokro” i długotrwałego zamrażalniczego przechowywania mięsa (*Longissimus thoracis et lumborum*) byków jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus* L.) na jego profil kwasów tłuszczowych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły mięśnie najdłuższe grzbietu (*Longissimus thoracis at lumborum*, *LTL*) byków (4 szt.) jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus* L.) w wieku 4-6 lat, odstrzelonych przez myśliwych w lasach północno-wschodniej Polski w tym samym sezonie łowieckim. Wiek byków określono na podstawie informacji uzyskanych od myśliwych, którzy dokonali odstrzału. W trakcie rozbioru tusz w zakładzie przetwórstwa mięsnego (ok. 48-54 h od momentu odstrzelenia jeleni), z combra wycięto prawy mięsień *LTL*. Mięśnie zapakowano w worki polietylenowe i przewieziono w pojemnikach z wkładem lodowym do laboratorium.

Przygotowanie próbek mięsa do badań

Mięsień z każdej tuszy podzielono na 2 części (A i B) o zbliżonej masie. Część A mięśnia podzielono na 2 próbki, które oznaczono jako 0 i 9M. Próbki 0 (n=4) poddano badaniom laboratoryjnym, natomiast próbki 9M (n=4) zapakowano próżniowo, a następnie zamrożono w temperaturze -26°C i przechowywano je w tej temperaturze przez 9 miesięcy. Część B mięśnia zapakowano próżniowo, a następnie przechowywano ją w temperaturze 2°C przez 10 dni. Po upływie tego czasu mięsień wypakowano, osuszono i podzielono na 2 próbki, oznaczone następnie jako 10D (n=4) oraz 9MD (n=4), z którymi postępowano analogicznie jak z próbkami odpowiednio 0 i 9M. W przeprowadzonych badaniach do pakowania próbek mięśnia użyto woreczków z EVOH (przepuszczalność: $O_2 = 1 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h/bar}/23^\circ\text{C}$; $N_2 < 0,1 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h/bar}/23^\circ\text{C}$; $CO_2 = 1,6 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h/bar}/23^\circ\text{C}$; $H_2O = 3 \text{ g/m}^2/24 \text{ h}/23^\circ\text{C}$) i pakowarki próżniowej PP-5MG (015) firmy TEPRO S.A. Do chłodniczego przechowywania próbek oraz ich zamrażania i przechowywania w stanie zamrożenia zastosowano odpowiednio komorę wychładzalniczą oraz komorę zamrażalniczą (bez nadmuchu powietrza), w obu przypadkach z elektronicznym systemem kontroli temperatury.

Metody badawcze

Próbki mięśnia nie poddane procesowi przechowywania oraz po upływie założonych okresów chłodniczego i zamrażalniczego składowania, kierowano do badań laboratoryjnych w celu określenia profilu kwasów tłuszczowych w tłuszczu śródmięśniowym (ang. intramuscular fat, IMF). Ekstrakcję tłuszczu z próbek mięsa przeprowadzono metodą Soxhleta w aparacie Soxtec™ Avanti 2050 firmy FOSS Tecator, stosując eter dietylowy jako rozpuszczalnik. Próbki wyekstrahowanego tłuszczu poddano metylacji zmodyfikowaną metodą Peiskera [Żegarska i in. 1991], aby uzyskać estry metylowe kwasów tłuszczowych. W zestryfikowanych próbkach określono profil kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej. Proces rozdziału kwasów tłuszczowych przeprowadzono wykorzystując chromatograf gazowy Agilent 6890N (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), z detektorem FID płomieniowo-jonizacyjnym i kolumnę kapilarną (długość 30 m, średnica wewnętrzna 0,32 mm, faza ciekła Supelcowax™ 10, grubość filmu fazy ciekłej 0,25 µm). Temperatura detektora wynosiła 250°C, iniektora 225°C, a kolumny 180°C. Gazem nośnym był hel (przepływ 1 cm³/min, współczynnik podziału 1:50). Kwasy tłuszczowe identyfikowano na podstawie porównania względnego czasu retencji estrów metylowych badanych próbek i standardów (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Wyniki przedstawiono w postaci procentowego udziału poszczególnych kwasów tłuszczowych w całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych w IMF. W oparciu o wyniki przeprowadzonych oznaczeń kwasów tłuszczowych obliczono wskaźniki charakteryzujące wartość odżywczą IMF.

Obliczenia statystyczne

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie w programie komputerowym STATISTICA, wersja 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA 2017). W analizie wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Statystyczną istotność różnic między średnimi grup ustalono przy zastosowaniu testu Tukey'a na poziomie ufności $P \leq 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego ($P > 0,05$) zróżnicowania udziału kwasów tłuszczowych nasyconych (ang. saturated fatty acids, SFA) w IMF byków jelenia szlachetnego wyekstrahowanym z próbek przed mrożeniem (0 i 10D) i po 9 miesiącach zamrażalniczego przechowywania (9M i 9MD) (Tabela 1). Niemniej zaobserwowano pewne charakterystyczne tendencje w zakresie zmian udziału SFA o różnej długości łańcucha węglowego w próbkach 9M. Stwierdzono bowiem, że zmniejszała się w nich zawartość

kwasów tłuszczowych o krótszym łańcuchu węglowym, tzn. zawierającym 14-16 atomów węgla, a zwiększał udział kwasów posiadających w łańcuchu węglowym 18 i 20 atomów węgla. W efekcie tych zmian, całkowita zawartość SFA w IMF uzyskanym z próbek 9M była nieco większa od stwierdzonej w tłuszczu z próbek 0 (różnica między średnimi grup wynosiła 0,59 punktu procentowego). Z kolei w próbkach 9MD zawartość SFA (z wyjątkiem kwasów mirystynowego - C14:0 i arachidowego - C20:0) wykazywała tendencję spadkową. W następstwie tego, całkowita zawartość SFA w tych próbkach była istotnie ($P \leq 0,05$) większa od stwierdzonej w próbkach 10D, a różnica między średnimi grup wyniosła 4,89 punktu procentowego.

Tabela 1. Procentowy udział kwasów tłuszczowych nasyconych w całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych tłuszczu śródmięśniowego byków jelenia szlachetnego (średnia arytmetyczna $\pm$ SE)
Percentages of saturated fatty acids in the total fatty acid pool in intramuscular fat red deer bulls (means $\pm$ SEM)

Wyszczególnienie	Czas dojrzewania mięsa (dni)	Czas zamrażalniczego przechowywania mięsa (miesiące)	
		0	9
C14:0	0	9,05 $\pm$ 0,45	8,53 $\pm$ 0,68
	10	8,32 $\pm$ 1,29	8,54 $\pm$ 0,68
C15:0	0	0,99 $\pm$ 0,21	0,83 $\pm$ 0,05
	10	0,86 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,03
C16:0	0	30,64 $\pm$ 0,91	29,61 $\pm$ 0,78
	10	31,04 $\pm$ 1,48	29,14 $\pm$ 0,68
C17:0	0	0,73 $\pm$ 0,09	0,74 $\pm$ 0,08
	10	0,85 $\pm$ 0,16	0,65 $\pm$ 0,07
C18:0	0	12,91 $\pm$ 0,48	15,09 $\pm$ 1,21
	10	15,76 $\pm$ 2,10	12,73 $\pm$ 1,09
C20:0	0	0,00 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,06
	10	0,04 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,06
SFA	0	54,31 $\pm$ 1,63	54,90 ^x $\pm$ 0,74
	10	56,87 ^a $\pm$ 1,38	51,98 ^{by} $\pm$ 0,29

SFA (ang. saturated fatty acids) - kwasy tłuszczowe nasycone.

Wartości oznaczone w wierszach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie, ^{ab} - $P \leq 0,05$. Wartości oznaczone w kolumnach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie, ^{xy} - $P \leq 0,05$.

Tłuszcz śródmięśniowy uzyskany z próbek 0 i 10D odznaczał się zbliżonym ($P > 0,05$) udziałem poszczególnych SFA. Nieistotna ($P > 0,05$) okazała się również różnica między całkowitą zawartością tych kwasów. Niemniej, na nieco wyższym poziomie kształtowała się ona w próbkach 10D (różnica 2,56 punktu procentowego), co wynikało ze zwiększonego udziału w nich kwasu stearynowego (C18:0).

Na zbliżonym poziomie ($P>0,05$) kształtowała się średnia zawartość oznaczonych SFA w próbkach 9M i 9MD. Niemniej, stwierdzone różnice między średnimi grup spowodowały, że IMF z próbek 9MD charakteryzował się istotnie ($P\leq 0,05$) mniejszą całkowitą zawartością tych kwasów tłuszczowych. Różnica wynosiła 2,92 punktu procentowego i w głównej mierze była wynikiem spadku zawartości kwasu C18:0.

Wyniki przeprowadzonej w badaniach analizy kwasów tłuszczowych nienasyconych (ang. unsaturated fatty acid, UFA) zestawiono w tabeli 2. Porównanie ich zawartości w próbkach

Tabela 2. Procentowy udział kwasów tłuszczowych nienasyconych w całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych tłuszczu śródmięśniowego byków jelenia szlachetnego (średnia arytmetyczna $\pm$ SE)
Percentages of unsaturated fatty acids in the total fatty acid pool in intramuscular fat red deer bulls (means $\pm$ SEM)

Wyszczególnienie	Czas dojrzewania mięsa (dni)	Czas zamrażalniczego przechowywania mięsa (miesiące)	
		0	9
C14:1	0	4,21 $\pm$ 0,10	3,91 $\pm$ 0,44
	10	3,15 $\pm$ 0,72	4,30 $\pm$ 0,44
C16:1	0	12,95 $\pm$ 0,33	11,48 $\pm$ 0,76
	10	10,83 $\pm$ 1,24	12,26 $\pm$ 0,67
C17:1	0	0,56 ^a $\pm$,007	0,24 ^b $\pm$ 0,08
	10	0,87 $\pm$ 0,26	0,35 $\pm$ 0,03
C18:1	0	15,78 ^b $\pm$ 0,31	17,82 ^a $\pm$ 0,50
	10	18,24 $\pm$ 1,48	18,19 $\pm$ 0,92
C18:2	0	8,35 $\pm$ 0,60	7,63 $\pm$ 0,79
	10	7,16 $\pm$ 0,61	8,35 $\pm$ 0,38
C18:3	0	1,58 $\pm$,028	1,70 $\pm$ 0,30
	10	1,26 $\pm$ 0,22	1,54 $\pm$ 0,45
C20:1	0	0,00 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,07
	10	0,11 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,08
C20:4	0	2,26 $\pm$ 0,25	2,27 $\pm$ 0,56
	10	1,53 ^b $\pm$ 0,20	2,51 ^a $\pm$ 0,07
MUFA	0	33,51 $\pm$ 0,66	33,51 $\pm$ 1,03
	10	33,20 $\pm$ 0,82	35,31 $\pm$ 0,29
PUFA	0	12,18 $\pm$ 1,07	11,60 $\pm$ 1,62
	10	9,95 $\pm$ 0,96	12,39 $\pm$ 0,57
UFA	0	45,68 $\pm$ 1,63	45,11 ^y $\pm$ 0,74
	10	43,14 ^b $\pm$ 1,38	47,71 ^{ax} $\pm$ 0,59

MUFA (ang. monounsaturated fatty acids) - kwasy tłuszczowe jednonasycone.

PUFA (ang. polyunsaturated fatty acid) - kwasy tłuszczowe wielonienasycone.

UFA (ang. unsaturated fatty acid; MUFA + PUFA) - kwasy tłuszczowe nienasycone.

Wartości oznaczone w wierszach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie, ^{ab} - $P\leq 0,05$. Wartości oznaczone w kolumnach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie, ^{xy} - $P\leq 0,05$.

9M z zawartością w próbkach 0 nie wykazało dla większości z nich istotnych ($P>0,05$) różnic między średnimi grup. Jedynie w przypadku kwasów margarynooleinowego (C17:1) oraz oleinowego (C18:1) było ich odpowiednio istotnie mniej ($P\leq 0,05$) i więcej ($P\leq 0,05$) w IMF pochodzącym z próbek 9M. W efekcie nie stwierdzono zróżnicowania całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych jednonienasyconych (ang. monounsaturated fatty acids, MUFA) w próbkach 0 i 9M. W obrębie PUFA przeważały tendencje ($P>0,05$) spadkowe procentowego udziału poszczególnych kwasów, co wpłynęło na nieznacznie ($P>0,05$) mniejszą ich całkowitą zawartość (różnica 0,57 punktu procentowego).

Zawartość większości UFA w próbkach 9MD wzrosła w porównaniu z próbkami 10D. Statystyczną istotność różnicy ($P\leq 0,01$) potwierdzono jednak tylko dla kwasu arachidonowego (C20:4). Tendencji wzrostowej po przechowywaniu próbek 9MD nie stwierdzono w odniesieniu do kwasów C17:1 i C18:1. W efekcie próbki 9MD, w zestawieniu z próbkami 10D, charakteryzowały się większym całkowitym udziałem MUFA (o 2,11 punktu procentowego) i PUFA (o 2,44 punktu procentowego), a także całkowitą zawartością UFA (o 4,57 punktu procentowego). W przypadku ostatniego z wymienionych wskaźników różnica między średnimi grup była istotna ($P\leq 0,05$).

Nie stwierdzono istotnych ($P>0,05$) różnic między średnim udziałem analizowanych UFA w próbkach 0 i 10D. Zauważalna była jednak tendencja ($P>0,05$) do mniejszej całkowitej zawartości PUFA (o 2,23 punktu procentowego) oraz całkowitej zawartości UFA (o 2,54 punktu procentowego) w IMF pochodzącym z próbek 10D. Porównanie próbek 9M i 9MD wykazało odwrócenie tej tendencji. Pomimo braku istotnych różnic w średniej zawartości analizowanych UFA między próbkami z tych grup, IMF z próbek 9MD wykazywał tendencję ($P>0,05$) do większej całkowitej zawartości MUFA (o 1,8 punktu procentowego), PUFA (o 0,79 punktu procentowego) oraz UFA (o 2,6 punktu procentowego).

Analiza obliczonych wskaźników wartości odżywczej IMF (Tabela 3) wykazała, że próbki 9MD charakteryzowały się korzystniejszym ($P\leq 0,05$) stosunkiem MUFA, PUFA i UFA do SFA w porównaniu z próbkami 10D. Porównanie średnich wartości tych wskaźników w próbkach 0 i 9M nie wykazało między nimi istotnych ($P>0,05$) różnic.

Na zbliżonym poziomie kształtowały się wskaźniki wartości odżywczej IMF z próbek 0 i 10D. Po procesie ich zamrażalniczego przechowywania, w próbkach 9MD stwierdzono wyższe ($P\leq 0,05$) wartości stosunku MUFA i UFA do SFA niż w próbkach 9M. Różnice między średnimi grup były jednak małe, a ich statystyczna istotność mogła wynikać z małej zmienności cech.

Tabela 3. Wskaźniki charakteryzujące wartość odżywczą tłuszczu śródmięśniowego byków jelenia szlachetnego (średnia arytmetyczna $\pm$ SE)
Indicators of the nutritional value of intramuscular fat from red deer bulls (means $\pm$ SEM)

Wyszczególnienie	Czas dojrzewania mięsa (dni)	Czas zamrażalniczego przechowywania mięsa (miesiące)	
		0	9
UFA/SFA	0	0,85 $\pm$ 0,06	0,82 ^y $\pm$ 0,02
	10	0,76 ^b $\pm$ 0,04	0,92 ^{ax} $\pm$ 0,02
MUFA/SFA	0	0,62 $\pm$ 0,03	0,61 ^y $\pm$ 0,01
	10	0,59 ^b $\pm$ 0,03	0,68 ^{ax} $\pm$ 0,01
PUFA/SFA	0	0,23 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,03
	10	0,18 ^b $\pm$ 0,02	0,24 ^a $\pm$ 0,01
DFA	0	58,59 $\pm$ 1,64	60,19 $\pm$ 1,38
	10	58,90 $\pm$ 2,65	60,43 $\pm$ 1,52
OFA	0	41,40 $\pm$ 1,64	39,82 $\pm$ 1,38
	10	41,11 $\pm$ 2,66	39,25 $\pm$ 1,24
DFA/OFA	0	1,43 $\pm$ 0,10	1,52 $\pm$ 0,09
	10	1,47 $\pm$ 0,17	1,55 $\pm$ 0,09
EFA	0	9,92 $\pm$ 0,84	9,33 $\pm$ 1,07
	10	8,41 $\pm$ 0,78	9,89 $\pm$ 0,57
Wskaźnik wartości odżywczej	0	0,94 $\pm$ 0,04	1,12 $\pm$ 0,08
	10	1,12 $\pm$ 0,17	1,07 $\pm$ 0,09

SFA (ang. saturated fatty acids) - kwasy tłuszczowe nasycone.

MUFA (ang. monounsaturated fatty acids) - kwasy tłuszczowe jednonasycone.

PUFA (ang. polyunsaturated fatty acid) - kwasy tłuszczowe wielonienasycone.

UFA (ang. unsaturated fatty acid; MUFA + PUFA) - kwasy tłuszczowe nienasycone.

DFA (ang. desirable fatty acids; UFA + C 18:0) - kwasy tłuszczowe o działaniu hipocholesterolemicznym.

OFA - kwasy tłuszczowe o działaniu hipercholesterolemicznym (SFA - C 18:0).

EFA (ang. essential fatty acids; C 18:2 + C 18:3) - niezbędne kwasy tłuszczowe

Wskaźnik wartości odżywczej (ang. nutritive value; (C 18:0 + C 18:1) / C 16:0).

Wartości oznaczone w wierszach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie, ^{ab} - $P \leq 0,05$.

Wartości oznaczone w kolumnach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie, ^{xy} - $P \leq 0,05$.

Stwierdzony w badaniach brak istotnych zmian zawartości SFA i UFA, w tym PUFA w mięsie po dojrzewaniu nie jest ewenementem w zestawieniu z wynikami innych badań. Wpływu dojrzewania (14 dni, 4°C) na skład kwasów tłuszczowych trzech różnych mięśni wołowych nie odnotowali Gruffat i in. [2021]. Z kolei Di Paolo i in. [2023] stwierdzili, zarówno po dojrzewaniu „suchym” (1 $\pm$ 1°C, 0,5 m/s, wilgotność względna 78 $\pm$ 10%, do 60 dni), jak i „mokrym” (4 $\pm$ 1°C, do 60 dni) wołowiny, jedynie nieznaczne tendencje do spadku udziału w niej MUFA i PUFA. Wyniki uzyskane w prezentowanych badaniach własnych można tłumaczyć zastosowanymi warunkami przechowywania (dojrzewania) próbek. Wysoka barierowość folii, z której wykonano woreczki do pakowania i prawidłowo przeprowadzone pakowanie próżniowe ograniczyły ilość tlenu w opakowaniu, co w połączeniu z niską

temperaturą przechowywania wpłynęło na przebieg reakcji oksydacji lipidów. Horcada i in. [2020], na podstawie wyników badań przeprowadzonych na wołowinie wskazują, że czynnikiem, który zapobiegł istotnym zmianom zawartości UFA w czasie jej 7-dniowego dojrzewania mogła być zawartość naturalnych przeciwutleniaczy. Ponieważ ich bogatym, naturalnym źródłem są rośliny [Brewer 2011], można się spodziewać, że będzie się to przekładać na większą stabilność oksydacyjną mięsa zwierząt, których dieta obfituje w takie rośliny oraz ich części, owoce i nasiona. Dowodów na mniejszą podatność mięsa przeżuwaczy żywionych pastwiskowo na zmiany oksydacyjne dostarczają wyniki badań naukowych [Krusinski i in. 2022, Prache i in. 2022]. Niestety nie ma badań, które charakteryzowałyby zawartość naturalnych przeciwutleniaczy w mięsie zwierząt z populacji dziko żyjących w powiązaniu z ich dietą, która w oczywisty sposób obfituje w pokarm mogący zawierać te związki.

Utlenianie lipidów i białek wskazuje się jako główne przyczyny pogarszania się jakości mięsa podczas zamrażalniczego przechowywania. Nie zawsze znajduje to jednak odzwierciedlenie w wynikach badań, czego przykładem są wyniki prezentowanych badań własnych, ale również i innych badaczy. Coombs i in. [2018] stwierdzili, że różny czas (do 8 tygodni) chłodniczego przechowywania jagnięciny zapakowanej próżniowo, a następnie jej różny czas przechowywania zamrażalniczego (do 52 tygodni, -12°C i -18°C) nie miał wpływu na udział kwasów EPA i DHA oraz PUFA n-3. Badania Popovej [2014] wykazały, że próbki jagnięcych mięśni *Semimembranosus* po zamrażalniczym przechowywaniu (3 i 6 miesięcy, -20°C) zawierały mniej SFA i jednocześnie więcej MUFA, PUFA oraz charakteryzowały się wyższą wartością PUFA/SFA. Z kolei w badaniach Zymon i in. [2007] stwierdzono tendencję do większej zawartości PUFA o 18 atomach węgla (C18:1, C18:2, linolenowego - C18:3) w mięsie cielęcym przechowywanym zamrażalniczo (-18°C) przez 3 miesiące.

Tempo i zakres zmian oksydacyjnych w mięsie mrożonym, w tym w obrębie lipidów, pozostają w związku m.in. z temperaturą (szybkością zamrażania), a następnie temperaturą zamrażalniczego przechowywania oraz obecnością tlenu w opakowaniu. Mając to na uwadze można sądzić, że na wyniki uzyskane w prezentowanych badaniach własnych mogło wpłynąć zastosowanie dużo niższej temperatury (-26°C) do zamrożenia i przechowywania próbek od tej, która jest zwykle podawana jako najczęściej stosowana w praktyce (-18°C). Efektem tego mogło być stworzenie mniej korzystnych warunków do zachodzenia reakcji oksydacji w obrębie UFA, a szczególnie PUFA.

Od temperatury zamrażania zależy ilość wymrożonej wody, a tym samym także aktywność wody (a_w). Dostępność wody jest istotna z punktu widzenia przebiegu wielu

reakcji (w tym oksydacji lipidów), ponieważ może ona być środowiskiem, w którym zachodzą lub stanowić ich substrat [Barden, Decker 2016]. Ponadto zamrażaniu mięsa w niższej temperaturze (szybszemu zamrażaniu) towarzyszy tworzenie się małych, równomiernie rozmieszczonych wewnątrzkomórkowych kryształków lodu. W efekcie ogranicza to uszkodzenia włókien mięśniowych prowadzących do uwalniania enzymów mitochondrialnych i lizosomalnych oraz utleniania niestabilnych białek i lipidów [Sun i in. 2023]. Z kolei znaczenie temperatury zamrażalniczego przechowywania dla procesów utleniania wynika z tego, że jej wzrost sprzyja im, podobnie jak innym reakcjom chemicznym [Domínguez i in. 2019]. Potwierdzeniem tego są wyniki badań m.in. Chang i in. [2022], którzy stwierdzili, że zmiany oksydacyjne wyrażone wartością TBARS w wołowinie przechowywanej 173 dni w temperaturze -40 i -60°C były istotnie mniejsze niż w mięsie przechowywanym w temperaturze -18°C.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania nie wykazały niepożądanych zmian profilu kwasów tłuszczowych w próbkach mięśnia *Longissimus thoracis et lumborum* jelenia szlachetnego przechowywanych zamrażalniczo po zastosowaniu dojrzewania „na mokro”. Tym samym sugerują one, że technologia ta może być alternatywą dla tradycyjnej technologii mrożenia dziczyzny, w której jest ono poprzedzone jej dojrzewaniem w tuszach. Wymaga to jednak potwierdzenia w dalszych badaniach z uwzględnieniem liczniejszego materiału doświadczalnego oraz innych cech jakościowych mięsa.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht A., Correa Dresch L. (2021). Identification of influence factors on the quality and shelf life of fresh meat throughout the supply chain. In: Kreyenschmidt J., Dohlen S., editors. Living Handbook of Perishable Food Supply Chains. PUBLISSO: Cologne 2016. <https://doi.org/10.5680/lhpfsc000003>
2. Al-Dalali S., Li C., Xu B. (2022). Effect of frozen storage on the lipid oxidation, protein oxidation, and flavor profile of marinated raw beef meat. Food Chem., 376, 131881. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131881>
3. Barden L., Decker E.A. (2016). Lipid Oxidation in Low-moisture Food: A Review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 56(15), 2467-2482, <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.848833>

4. Brewer M.S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 10, 221-247. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
5. Chang Y.; Liu Y.; Bai Y.; Teng S.; Guo Y.; Dou H.; Ye K. (2022). Effect of Different Degrees of Deep Freezing on the Quality of Snowflake Beef during Storage. *Foods*, 11, 2175. <https://doi.org/10.3390/foods11152175>
6. Coombs C.E.O., Holman B.W.B., Ponnampalam E.N., Morris S., Friend M.A., Hopkins D.L. (2018). Effects of chilled and frozen storage conditions on the lamb *M. longissimus lumborum* fatty acid and lipid oxidation parameters. *Meat Sci.*, 136, 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.10.013>
7. da Silva Bernardo A.P., da Silva A.C.M., Francisco V.C., Ribeiro F.A., Tieko Nassu R., Calkins C.R., da Silva do Nascimento M., Bertelli Pflanzner S. (2020). Effects of freezing and thawing on microbiological and physical-chemical properties of dry-aged beef. *Meat Sci.*, 161, 108003. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108003>
8. Dashdorj D., Tripathi V.K., Cho S., Kim Y., Hwang I. (2016). Dry aging of beef. Review. *J. Anim. Sci. Technol.*, 58, 20. <https://doi.org/10.1186/s40781-016-0101-9>
9. Di Paolo M., Ambrosio R.L., Lambiase C., Vuoso V., Salzano A., Bifulco G., Barone C.M.A., Marrone R. (2023). Effects of the Aging Period and Method on the Physicochemical, Microbiological and Rheological Characteristics of Two Cuts of Charolais Beef. *Foods*, 12(3), 531. <https://doi.org/10.3390/foods12030531>
10. Domínguez R., Pateiro M., Gagaoua M., Barba F.J., Zhang W., Lorenzo J.M. (2019). A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants (Basel)*, 8(10), 429. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
11. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordóñez A., Bover-Cid S., Chemaly M., De Cesare A., Herman L., Hilbert F., Lindqvist R., Nauta M., Peixe L., Ru G., Simmons M., Skandamis P., Suffredini E., Blagojevic B., Van Damme I., Hempen M., Messens W., Bolton D. (2023). Scientific Opinion on the microbiological safety of aged meat. *EFSA Journal*, 2023;21(1):7745. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7745>
12. Flavia P., Zorica V., Delia B. (2014). Effects of temperature and storage time on the quality of alimentary animal fats. *Int. Food Res. J.*, 21(4), 1507-1514
13. Florek M., Drozd M. 2013. Związki bioaktywne w mięsie jeleniowatych. *Medycyna Weter.*, 69(9): 535-539

14. Geng L., Liu K., Zhang H. (2023). Lipid oxidation in foods and its implications on proteins. *Front. Nutr.*, 10, 1192199. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1192199>
15. Gruffat D., Bauchart D., Thomas A., Parafita E., Durand D. (2021). Fatty acid composition and oxidation in beef muscles as affected by ageing times and cooking methods. *Food Chem.*, 343, 128476, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128476>
16. Harayama T., Shimizu T. (2020). Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *J. Lipid Res.*, 61(8), 1150-1160. <https://doi.org/10.1194/jlr.R120000800>
17. Hulánková R., Kameník J., Saláková A., Závodský D., Borilova G. 2018. The effect of dry aging on instrumental, chemical and microbiological parameters of organic beef loin muscle. *LWT - Food Sci. Technol.*, 89, 559-565 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.014>
18. Kim J.H., Kim T.K., Shin D.M., Kim H.W., Kim Y.B., Choi Y.S. (2020). Comparative effects of dry-aging and wet-aging on physicochemical properties and digestibility of Hanwoo beef. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 33(3), 501-505 <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0031>
19. Kim S.J., Kim G.H., Moon C., Ko K.B., Choi Y.M., Choe J.H., Ryu Y.C. (2022). Effects of Aging Methods and Periods on Quality Characteristics of Beef. *Food Sci. Anim. Resour.*, 42(6), 953-967. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e63>
20. Krusinski L., Sergin S., Jambunathan V., Rowntree J.E., Fenton J.I. (2022). Attention to the Details: How Variations in U.S. Grass-Fed Cattle-Feed Supplementation and Finishing Date Influence Human Health. *Front. Sustain. Food Syst.*, 6, 851494. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.851494>
21. Li Z., Ha M., Frank D., McGilchrist P., Warner R.D. (2021). Volatile Profile of Dry and Wet Aged Beef Loin and Its Relationship with Consumer Flavour Liking. *Foods*, 10(12), 3113. <https://doi.org/10.3390/foods10123113>
22. Pogorzelski G., Polkinghorne R., Tarr G., Półtorak A., Wierzbicka A. Effect of “dry aging” or “wet aging” of beef on eating quality. (2021). *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 39(3), 237-249
23. Popova T. (2014). Fatty acid composition of *Longissimus dorsi* and *Semimembranosus* muscle during storage in lambs reared indoors and on pasture. *Emir. J. Food Agric.*, 26(3), 302-308. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i3.16771>
24. Prache S., Schreurs N., Guillier L. (2022). Review: Factors affecting sheep carcass and meat quality attributes, *Animal*, 16, Supplement 1, 100330 <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100330>

25. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 16 marca 2005 r. w sprawie określenia okresów polowań na zwierzęta łowne. Dz.U.2023.99 t.j.
26. Setyabrata D., Xue S., Vierck K., Legako J., Ebner P., Zuelly S., Kim Y.H. (2022). Impact of Various Dry-Aging Methods on Meat Quality and Palatability Attributes of Beef Loins (*M. longissimus lumborum*) from Cull Cow. Meat and Muscle Biology, 6(1), 13025. <https://doi.org/10.22175/mmb.13025>
27. Soriano A., Montoro V., Vicente J., Sánchez-Migallón B.F., Benítez S., Utrilla M.C., García Ruiz A. (2016). Influence of evisceration time and carcass ageing conditions on wild venison quality. Preliminary study. Meat Sci., 114, 130-136
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.021>
28. Sun L., Zhu Z., Sun D.-W. (2023). Regulating ice formation for enhancing frozen food quality: Materials, mechanisms and challenges. Trends Food Sci. Technol., 139, 104116, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.013>
29. Zhang R., Realini C.E., Kim Y.H.B., Farouk M.M. (2023). Challenges and processing strategies to produce high quality frozen meat. Meat Sci., 205, 109311. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109311>
30. Zymon M., Strzetelski J., Postkowiak H., Sosin E. (2007). Effect of freezing and frozen storage on fatty acid profile of calves' meat. Pol. J. Food Nutr. Sci., 57, 4(C), 647-650.
31. Żegarska Z., Jaworski J., Borejszo Z. (1991). Evaluation of the Peisker modified method for extracting methyl esters from fatty acids Acta Acad. Agric. Tech. Olst. Agric., 24, 25-33

CERTYFIKOWANA ŻYWNOSĆ REGIONALNA JAKO WAŻNY ELEMENT DLA ZACHOWANIA BIORÓŻNORODNOŚCI ZWIERZĄT GOSPODARSKICH

Joanna Barłowska

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Katedra Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

joanna.barlowska@up.lublin.pl

Otrzymano: 2 stycznia 2024

Poprawiono: 11 stycznia 2024

Zaakceptowano: 11 stycznia 2024

Streszczenie

Współczesny konsument otwarty jest na poznawanie regionów, w tym potraw i produktów dla nich charakterystycznych, zarówno w skali lokalnej, krajowej, jak i świata. Aktualne potrzeby rynku wspiera polityka jakości w Unii Europejskiej, w celu promowania ich unikalnych cech związanych z pochodzeniem geograficznym oraz tradycyjną wiedzą specjalistyczną. Wiele rodzimych ras zwierząt jest zagrożona wyginięciem. Rasy lokalne zachowały wiele pierwotnych kombinacji genowych, przez co wykazują lepszą zdrowotność i płodność, a pozyskiwane od nich surowce charakteryzują się wysoką jakością. Rasy te uzyskują jednak z reguły niższą produktywność, co wpływa na niższą efektywność ekonomiczną ich chowu. Jedną z form podniesienia rentowności utrzymania rodzimych ras jest rejestrowanie pozyskanych surowców lub produktów pochodzących od tych zwierząt na europejskiej liście środków spożywczych związanych z pochodzeniem geograficznym. Opisane systemy chowu lokalnych ras zwierząt gospodarskich i produktów żywnościowych z nimi związanych, dla których opracowano standardy utrzymania i żywienia zwierząt, przetwórstwa, certyfikacji i dystrybucji z jednoczesną dbałością o ich identyfikowalność wskazują, że jest to dobra strategia w kierunku zwiększenia rentowności ich utrzymania, a w konsekwencji ochrony tych ras przed wyginięciem.

Słowa kluczowe: produkty regionalne, lokalne rasy zwierząt

CERTIFIED REGIONAL FOOD AS AN IMPORTANT ELEMENT FOR PRESERVING THE BIODIVERSITY OF FARM ANIMALS

Summary

A modern consumer is open to getting to know regions, including dishes and products typical of them, both on a local, national and global scale. Current market needs are supported by quality policy in the European Union, in order to promote their unique characteristics related to geographical origin and traditional expertise. Many native animal breeds are at risk of extinction. Local breeds have retained many of their original gene combinations, which means they show better health and fertility, and the raw materials obtained from them are of high quality. However, these breeds usually have lower productivity, which translates into lower economic efficiency of their breeding. One way to increase the profitability of maintaining native breeds is to register raw materials or products derived from these animals on the European list of foodstuffs related to geographical origin. The described systems of breeding local breeds of farm animals and food products related to them, for which standards of animal keeping and feeding, processing, certification and distribution have been developed with simultaneous care for their traceability, indicate that this is a good strategy towards increasing the profitability of their keeping and, consequently, protecting these breeds from extinction.

Keywords: regional products, local animal breeds

WSTĘP

Rynek żywnościowy zdominowany jest obecnie przez produkty wytwarzane masowo, pochodzące z produkcji przemysłowej oraz żywność typu fast-food [Gulbicka 2014]. Produkty z masowej produkcji przemysłowej zawierają zwykle wiele substancji dodatkowych, dopuszczonych do stosowania przez prawo żywnościowe, których zadaniem jest poprawa ich smaku, zapachu, barwy, tekstury oraz przedłużenie trwałości. Konsumenci są jednak coraz częściej znużeni ofertą artykułów żywnościowych z masowego rynku i poszukują wartościowych produktów o unikatowych atrybutach [Batyk, Smoczyński 2011, Tarcza 2015, Goryńska-Goldmann, Gazdecki 2016, Kuźniar, Kawa 2018, Grębowiec 2017]. Współczesny konsument otwarty jest ponadto na poznawanie regionów, w tym potraw i produktów dla nich charakterystycznych, zarówno w skali lokalnej, krajowej, jak i świata [Goryńska-Goldmann, Gazdecki 2016]. Aktualne potrzeby rynku wspiera polityka jakości w Unii Europejskiej, która od ponad trzech dekad uwzględnia ochronę nazw konkretnych

produktów, w celu promowania ich unikalnych cech związanych z pochodzeniem geograficznym oraz tradycyjną wiedzą specjalistyczną. W ramach unijnego systemu praw własności intelektualnej nazwy produktów zarejestrowanych są chronione prawem przed podrabianiem i nadużywaniem na terytorium UE i w krajach spoza UE, z którymi podpisano specjalną umowę o ochronie [Komisja Europejska 2023a]. Europejski system ochrony jakości produktów rolnych i środków spożywczych uwzględnia trzy znaki jakości (Chroniona Nazwa Pochodzenia – ChNP, Chronione Oznaczenie Geograficzne – ChOG i Gwarantowana Tradycyjna Specjalność – GTS). System ten ma na celu dawać producentom unijnym przewagę konkurencyjną, stwarzać możliwość różnicowania zatrudnienia, otrzymywania godziwego wynagrodzenia, zapobiegania wyludnieniu z terenów oddalonych i o niekorzystnych warunkach gospodarowania, przez co wpływa na zrównoważony rozwój obszarów wiejskich. Ponadto ma przyczyniać się do utrzymania żywego dziedzictwa kulturalnego i kulinarnego Unii [Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady 2012, MRiRW 2023]. Rejestracja produktów pochodzenia zwierzęcego, związanych z obszarem geograficznym, wspiera również działania zmierzające do zachowania bioróżnorodności zwierząt gospodarskich [Gandini i in. 2007, Barłowska 2011, Barłowska, Król 2017, Florek i in. 2017].

Lokalne rasy zwierząt jako element strategii zachowania bioróżnorodności

Zasoby genetyczne zwierząt gospodarskich (AnGR - Animal Genetic Resources) definiowane są jako zasadniczy element światowego bezpieczeństwa żywnościowego [FAO 2007]. Hoffman [2010] oraz Pilling i in. [2020] wskazują, że zrównoważona produkcja zwierzęca oraz przyszłe bezpieczeństwo żywnościowe wymagają dostępu do szerokiej gamy zasobów genetycznych zwierząt.

Działania FAO nad opracowaniem wszechstronnego programu mającego na celu zrównoważone zarządzanie zasobami genetycznymi zwierząt na poziomie globalnym rozpoczęto w 1990 r. W czerwcu 1992 r. w Rio de Janeiro, Organizacja Narodów Zjednoczonych przyjęła tekst konwencji o różnorodności biologicznej, a w 1993 r. FAO opracowało Światową Strategię Zachowania Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich oraz powołała międzynarodową Komisję FAO ds. Zasobów Genetycznych dla Wyżywienia i Rolnictwa. Jednym z głównych celów tej komisji było przygotowanie opracowania Raportu o Stanie Zasobów Genetycznych Zwierząt [Krupiński, 2011]. Z najnowszego Raportu „Status and Trends of Animal Genetic Resources” [FAO 2023], wynika, że w 2022 r. zarejestrowanych było na całym świecie łącznie 8 859 ras, w tym 7 739 to lokalne. Najwięcej

z nich występowało na terenie Europy i Kaukazu (2 154 ras ssaków i 1 168 ras ptaków). Jako zagrożone wyginięciem sklasyfikowano ogółem 2 360 ras (27% wszystkich, łącznie z rasami wymarłymi). Europa i Kaukaz oraz Ameryka Północna są regionami o największym odsetku ras sklasyfikowanych jako zagrożone, zarówno w przypadku ssaków (odpowiednio 49 i 54%), jak i ptaków (odpowiednio: 39 i 60%). W Polsce programem ochrony zasobów genetycznych objętych jest: 4 rasy bydła, 3 – świń, 17 – owiec, 3 – kóz, 7 – koni, 8 ras/rodów kur, 14 ras/odmian gęsi, 10 ras/rodów/linii kaczek, 7 ras i linii ryb, 5 linii pszczół i 6 ras zwierząt futerkowych [Instytut Zootechniki 2023]. Fakty te mobilizują różne instytucje na poziomie światowym i poszczególnych krajów do podejmowania wszelkiego rodzaju działań aby te rasy uchronić przed wyginięciem.

Istotnym argumentem podkreślającym celowość ochrony ras rodzimych jest fakt, że pomimo niższej produktywności zachowały wyjątkowe kombinacje genów, przez co cechują się wieloma cennymi cechami funkcjonalnymi. Zwierzęta te przystosowały się bowiem do lokalnych warunków środowiskowych, w tym do tradycyjnych systemów produkcji rolnej i środowiska. Są też bardziej odporne na choroby, charakteryzują się długowiecznością [FAO, 2012; Ovaska i in. 2021], a pozyskiwane od nich surowce charakteryzują się wysoką jakością [Litwińczuk, Barłowska 2014].

Oprócz tradycyjnej roli w zakresie zaopatrzenia i bezpieczeństwa żywności, rasy rodzime stały się źródłem utrzymania na obszarach wiejskich w ramach różnych usług, takich jak agroturystyka, powrót do tradycyjnego wypasu oraz ich wykorzystanie do wytwarzania specjalnych produktów niszowych (np. rękodzieło lub regionalne przysmaki) (Barłowska 2011, Chabuz, 2011, Ovaska, Soini 2016, Barłowska, Król 2017, Ovaska i in. 2021).

Zgodnie z przepisami Unii Europejskiej oraz na podstawie Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady Europy [2013] uruchomiono Program Rozwoju Obszarów Wiejskich. W ramach tych funduszy hodowcy lokalnych ras zwierząt gospodarskich mogą liczyć na wsparcie finansowe, które jednak często nie jest w pełni satysfakcjonujące dla tych hodowców, gdyż nie rekompensuje dochodów w stosunku do ras międzynarodowych użytkowanych w intensywnych systemach produkcji [Gandini i in. 2007, Pretto i in. 2009, Chabuz i in. 2013, Chabuz, Teter 2016, Barłowska, Król 2017]. Dlatego też jedną z form podniesienia rentowności utrzymania rodzimych ras jest rejestrowanie surowców pozyskanych od tych zwierząt lub produktów z nich wytworzonych na europejskiej liście środków spożywczych związanych z pochodzeniem geograficznym oraz tradycyjną wiedzą specjalistyczną. Potwierdzeniem efektywności ekonomicznej takich działań są wyniki badań przeprowadzonych ponad 15 lat temu przez zespół włoskich naukowców [Gandini i in. 2007].

Analizowali oni efektywność utrzymywania lokalnej rasy reggiano (wydajność laktacyjna 5 360 kg mleka) i rasy międzynarodowej – holsztyńskiej (wydajność – 7 870 kg). Wykazali, że jeśli mleko krów rasy reggiana było sprzedawane do standardowej wytwórni sera, dochód uzyskiwany od jednej krowy w ciągu roku był prawie o 460 € niższy w porównaniu do krów rasy holsztyńskiej. Nawet po doliczeniu dotacji ekonomicznej nadal dochód ten był niższy o około 360 €. Jednak, gdy mleko to sprzedawano do wytwórni markowego sera „Parmigiano-Reggiano” – dochód od jednej krowy rasy reggiana był o ponad 1 950 € wyższy w porównaniu do rasy holsztyńskiej. Podobne analizy prowadzili Pretto i in. [2009] dla krów lokalnej włoskiej rasy burlina z mleka której wytwarzano ser „Morlacco-Burlina”. W Polsce efektywność chowu bydła w gospodarstwach utrzymujących rasy objęte programem ochrony zasobów genetycznych, tzn. białogrzbiętą i polską czerwoną, oceniali Chabuz i in. [2013]. Stwierdzili, że dochód z chowu bydła bez dopłat z UE, w przeliczeniu na jedną krowę mleczną, wynosił dla rodzimych ras odpowiednio: polska czerwona – 50,43 PLN, białogrzbieta – 414,84 PLN, a dla wysoko produkcyjnej rasy (polska holsztyńsko-fryzyjska) – 1 615,27 PLN. Po doliczeniu jednak dopłat z UE dochód ten wzrósł odpowiednio do: 2 118,72; 2 518,84 i 2 725,05 PLN. Na unijnej liście jest niewiele produktów spożywczych związanych z polskimi rodzimymi rasami bydła. Jedynie mleko od krów rasy polskiej czerwonej wpisano w dniu 14.12.2012 r. i wołowinę z krowy rasy polskiej czerwono-białej 27.06.2013 r. na krajową listę produktów tradycyjnych, prowadzoną przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi [MRiRW 2023].

Jakość produktów pozyskiwanych od lokalnych ras zwierząt

Produkty pochodzące od zwierząt ras lokalnych, które utrzymywane są w tradycyjnych systemach chowu (korzystają z wypasu na użytkach zielonych lub mają możliwość swobodnego wyszukiwania pokarmu) wyróżniają się wyższą jakością w porównaniu do pozyskiwanych od ras wysoko produkcyjnych, utrzymywanych w intensywnych systemach chowu. Badania wykazały, że charakteryzują się one lepszą smakowitością [Moreno-Indiasa i in. 2011, Afolabi 2013, Czarniecka-Skubina, Pielak 2017, Babicz i in. 2020]. Ze względu na tradycyjny system chowu tych zwierząt, mleko zawierało więcej substancji biologicznie czynnych (wyższy udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym n-3, większa zawartość białek serwatkowych i witamin lipofilnych) [Litwińczuk i in. 2012, Król i in. 2010, 2013, Brodziak i in. 2020] – tab. 1. Mleko krów ras lokalnych charakteryzowało się także korzystniejszymi parametrami krzepliwości mleka i tekstury skrzepów podpuszczkowych, co jest istotne przy produkcji serów [Chiofalo i in. 2000, Barłowska, Litwińczuk 2006, De

Marchi i in. 2007, Bittante i in. 2012, Litwińczuk i in. 2012, Wolanciuk i in. 2016, Barłowska, Król 2017, Teter i in. 2019, Weerasingha i in. 2022] – tab. 2. Podobnie jest w przypadku mięsa (m.in. korzystniejszy profil kwasów tłuszczowych) [Pugliese i in. 2007, Xie i in. 2012, Poklugar i in. 2020] i jaj (wyższa zawartość witaminy A i niższa proporcja n-6/n-3 PUFA) [Sokołowicz i in. 2019]. Mięso pozyskiwane od ras lokalnych cechuje się ponadto dobrymi właściwościami fizykochemicznymi [Monteiro i in. 2013, Litwińczuk i in. 2016, Domaradzki i in. 2017, Luković i in. 2023] – tab. 3.

Dlatego istotne jest aby surowce pozyskiwane od lokalnych ras zwierząt gospodarskich oraz wytwarzane z nich produkty były oznaczane w UE specjalnymi znakami jakości, jako wyróżniające się artykuły spożywcze związane z konkretnym obszarem geograficznym.

Tabela 1. Zawartość składników prozdrowotnych w mleku krów ras lokalnych w odniesieniu do polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej [Litwińczuk i in. 2012¹, Brodziak i in. 2020²]
The contents of health-promoting in milk of local cow breeds in relation to Polish Holstein-Friesian breed [Litwińczuk et al. 2012, Brodziak et al. 2020¹]

Składniki mleka	Rasy lokalne		Rasa wysoko produkcyjna (międzynarodowa)
	Polska czerwona	Białogrzbieta	Polska holsztyńsko-fryzyjska
Tłuszcz (%)	4,35 ^{B1} – 4,71 ^{C2}	3,95 ^{A1} – 4,03 ^{A2}	4,16 ^{B2} - 4,37 ^{B1}
CLA ¹	2,24 ^C	1,61 ^B	0,34 ^A
SFA ¹	60,73 ^A	63,15 ^B	66,87 ^C
SFAsmc ¹	12,77 ^A	17,21 ^B	16,22 ^B
SFAlc ¹	48,76 ^B	45,94 ^A	50,65 ^B
UFA ¹	38,78 ^B	36,59 ^{AB}	33,10 ^A
MUFA ¹	33,48 ^B	32,31 ^B	30,12 ^A
PUFA ¹	5,30 ^C	4,27 ^B	2,98 ^A
β-karoten (mg/l) ²	0,256 ^B	0,219 ^B	0,190 ^A
Witamina A (mg/l) ²	0,556 ^B	0,539 ^B	0,352 ^A
Witamina D ₃ (mg/l) ²	1,212 ^B	1,205 ^B	0,700 ^A
Witamina E (mg/l) ²	1,709 ^C	1,656 ^B	1,117 ^A
Białko ogólne (%) ²	3,49 ^B	3,46 ^B	3,34 ^A
Białka serwatkowe (%) ²	0,78 ^B	0,74 ^B	0,67 ^A
Albuminy ogółem (g/l) ²	5,17 ^C	5,12 ^B	4,65 ^A
β-laktoglobulina (g/l) ²	3,58 ^B	3,54 ^B	3,07 ^A
α-laktoalbumina (g/l) ²	1,17 ^b	1,13 ^b	1,08 ^a
Laktoferyna (mg/l) ²	130,62 ^C	118,34 ^B	95,09 ^A
Lysozyme (μg/l) ¹	11,05 ^C	8,85 ^B	5,94 ^A

Objaśnienia: CLA – skoniugowany kwas linolowy, SFA – nasycone kwasy tłuszczowe, SFAsmc – krótko- i średniołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe, SFAlc – długołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe, UFA – nienasycone kwasy tłuszczowe, MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe; A,B, C – wartości różnią się istotnie przy p≤0,01, a,b – przy p≤0,05

Tabela 2. Parametry krzepliwości mleka krów różnych ras [Chiofalo i in. 2000², De Marchi i in. 2007¹, Teter i in. 2019³]

Coagulation parameters coagulation parameters of milk from cows of different breeds [Chiofalo et al. 2000², De Marchi et al. 2007¹, Teter et al. 2019³]

Rasa krów	Parametry krzepliwości mleka		
	RCT (min)	k ₂₀ (min)	a ₃₀ (mm)
Rasy międzynarodowe			
Holsztyńsko-fryzyjska ¹	18,0	8,2	17,5
Holsztyńska ²	15,4	7,9	28,5
Polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej ³	20,16	5,55	21,94
Brown swiss ¹	16,1	6,4	24,1
Simentalska ¹	16,2	7,1	21,9
Simentalska ³	19,25	6,51	23,06
Rasy lokalne			
Rendena ¹	13,5	5,9	27,0
Szara alpejska ¹	16,0	7,6	21,2
Modicana ²	10,5	3,7	42,8
Polska czerwona ³	16,31	4,51	28,04
Białogrzbieta ³	19,29	5,19	25,44

Objaśnienia: RCT – czas krzepnięcia enzymatycznego, k₂₀ – Czas tworzenia skrzepu, a₃₀ - jędrność skrzepu

Tabela 3. Właściwości fizykochemiczne mięśnia *longissimus lumborum* buhajków po 7-dniowym okresie dojrzewania [Monteiro i in. 2013¹] i po 14-dniowym okresie dojrzewania [Domaradzki i in. 2017²]
Physicochemical properties of the longissimus lumborum muscle of bulls after a 7-day maturation period [Monteiro et al. 2013¹] and after a 14-day maturation period [Domaradzki et al. 2017²]

Rasa	pH	Przewodność (mS/cm)	Wyciek naturalny (%)	Wyciek termiczny (%)	Woda wolna G-H (mg)	Siła cięcia WBSF (N)	Energia cięcia (J)	Barwa CIE		
								L* – jasność metryczna	a* – barwa czerwona	b* – barwa żółta
Mertolenga ¹	5,40	-	-	30,5	35,6	-	-	34,80	19,00	6,71
Polska holsztyńsko- fryzyjska ²	5,66	14,43	4,52	28,28	30,01	65,3	0,33	37,17	25,02	5,3
Simentalska ²	5,55	12,95	6,89	27,81	48,47	65,7	0,29	39,54	27,46	4,73
Polska czerwona ²	5,74	11,14	6,47	29,20	60,36	61,7	0,27	38,75	25,96	2,60
Białogrzbieta ²	5,58	12,59	4,14	27,79	36,54	56,3	0,28	37,02	24,86	5,29
Polska czarno- biała ²	5,61	12,40	4,61	28,27	37,71	59,0	0,30	37,55	25,00	5,49

Produkty regionalne i związane z rodzimymi rasami zwierząt gospodarskich

W rejestrze prowadzonym przez Komisję Europejską, ze znakiem Chroniona Nazwa Pochodzenia lub Chronione Oznaczenie Geograficzne zarejestrowane są obecnie 1 674 produkty rolne i środki spożywcze, w tym 1 466 pochodzi z krajów członkowskich UE [Komisja Europejska 2023b]. Polska ma zarejestrowanych 35 produktów z oznaczeniami geograficznymi. W kategoriach: 1.1. „Mięso świeże” kraje członkowskie zarejestrowały łącznie 164 produkty, w 1.2. „Produkty wytworzone na bazie mięsa (podgotowanego, solonego, wędzonego itd.) – 190, w 1.3. „Sery” – 242 i 1.4. „Inne produkty pochodzenia zwierzęcego (jaja, miód, różne produkty mleczne z wyjątkiem masła” – 56. Najwięcej produktów zarejestrowanych w trzech pierwszych wymienionych kategoriach mają Włochy (6/43/55), Francja (79/24/56), Hiszpania (24/16/30) i Portugalia (32/42/12). Polska ma zarejestrowanych zdecydowanie mniej takich produktów (1/4/5). Lista produktów ze znakiem Gwarantowana Tradycyjna Specjalność jest znacznie krótsza, bowiem łącznie zarejestrowanych ich jest 87, w tym z UE – 57 [Komisja Europejska 2023c]. Polska ma takich produktów 11.

Należy zaznaczyć, że wiele produktów żywnościowych związanych z obszarem geograficznym w swoich specyfikacjach (opisach produktu) ma zaznaczone, że muszą one pochodzić (surowce) od konkretnej rasy/ras zwierząt gospodarskich i głównie dotyczy to lokalnie występujących (tab. 4 i 5). W przypadku Polski, dotyczy to 4 produktów, tzn. serów: „Bryndzy podhalańskiej”, „Oscypka” i „Redykołki”, wytwarzanych z mleka owiec lokalnej rasy polska owca górska z ewentualnym dodatkiem (do 40%) mleka krów rasy polskiej czerwonej oraz mięsa świeżego – „Jagnięciny podhalańskiej” pozyskiwanej od jagniąt ras: polska owca górska, polska owca górska odmiany barwnej lub cakiel podhalański. O rejestrację tych produktów złożył wniosek Regionalny Związek Hodowców Owiec i Kóz z siedzibą w Nowym Targu [Komisja Europejska 2023b].

Zwierzęta ras rodzimych nie mają dużych wymagań żywieniowych i z reguły utrzymywane są w systemach ekstensywnych, gdzie korzystają z trwałych użytków zielonych lub terenów leśnych, gdzie same wyszukują pokarm. Większość specyfikacji produktów żywnościowych związanych z konkretną rasą ma odpowiednie zapisy uwzględniające takie wymagania w zakresie żywienia tych zwierząt. Jak już wspomniano wcześniej, strategia taka pozwala zwiększyć rentowność utrzymania ras rodzimych (niższa produkcyjność), a tym samym zachęcić rolników do ich użytkowania, co w konsekwencji chroni je przed wyginięciem.

Dobrym przykładem są już kilkudziesięcioletnie działania w kierunku zwiększenia

populacji bydła rodzimej rasy reggiana, która od wieków związana jest z terenami prowincji Reggio Emilia i Parma we Włoszech. Przodkowie tego bydła przybyli na tereny północnych Włoch w VI wieku naszej ery. Z mleka tych krów w opactwach mnichów benedyktyńskich już osiem wieków temu wytwarzano włoski ser „Parmigiano-Reggiano”. W latach 50-tych XX wieku populacja tego bydła osiągnęła maksymalną liczebność (ok. 140 tys. krów). Jednak od lat 70-tych rozpoczął się intensywny proces zastępowania tego bydła kosmopolitycznymi rasami, wysoko produkcyjnymi. Doprowadziło to do drastycznego zmniejszenia w latach 80-tych populacji krów tej rasy do zaledwie 450 sztuk. Fakt ten zmobilizował na początku lat 90-tych hodowców tej rasy do utworzenia Krajowego Stowarzyszenia Hodowców Bydła Reggiana (Associazione Nazionale Allevatori Bovini di Razza Reggiana – ANABoRaRe) i podjęcia działań mających na celu odbudowę populacji tych krów. Podjęli również decyzję o powrocie do produkcji sera „Parmigiano-Reggiano” (ChNP) wyłącznie z mleka krów tej rasy. Obecnie ANABoRaRe nadzoruje cały proces produkcji, regulowany ścisłymi przepisami, które przewidują stosowanie czystego mleka rasy reggiana do produkcji sera „Parmigiano Reggiano”. Wiąże się to z obowiązkiem żywienia krów zieloną lub sianem w okresie zimowym, stosowaniem paszy pochodzącej w ponad 90% z tego obszaru i zakazem stosowania pasz GMO. Dopiero po 24 miesiącach dojrzewania ser staje się "Parmigiano Reggiano delle Vacche Rosse". Stowarzyszenie chroni produkt i związek między rasą a Parmigiano Reggiano delle Vacche Rosse za pomocą zarejestrowanego wspólnego znaku towarowego, którego jest właścicielem, składającego się ze słów "Vacche Rosse", ułożonych w promienisty wzór na płycie koła, oraz napisu "ANABoRaRe – Associazione Nazionale Bovini Razza Reggiana" odcisniętego w kształcie okręgu wewnątrz samego radiała. W okrągłej przestrzeni, która tworzy się na tabliczce w centrum znaku wspólnego, mogą być umieszczane znaki towarowe firm produkcyjnych upoważnionych uchwałą Zarządu Stowarzyszenia. Jedynymi obecnie autoryzowanymi markami firmy są marka stowarzyszenia ANABoRaRe oraz marka farmy Grana d'Oro, przedstawione na rycinie 1.

Dobre efekty finansowe ze sprzedaży mleka krów tej rasy do wytwórni markowego sera przyczyniły się do sukcesywnego wzrostu populacji tego bydła. W wyniku tych działań w 2021 r. populacja krów tej rasy wzrosła do 4 445 sztuk, które są utrzymywane w 108 gospodarstwach na terenie prowincji Reggio Emilia i Parma, a produkcją sera zajmuje się obecnie 46 przetwórni [Bertolini i in. 2020, ANABoRaRe 2023, Consorzio Vacche Rosse 2023].



Marka ANABoRaRe



Marka Grana d'Oro

Rysunek. 1. Autoryzowane marki firmy stowarzyszenia ANABoRaRe dla sera „Parmigiano Reggiano” [<https://www.razzareggiana.it/parmigiano-reggiano-vacche-rosse/parmigiano-reggiano-vacche-rosse/>]
Authorized company brands of the ANABoRaRe association for 'Parmigiano Reggiano' cheese [<https://www.razzareggiana.it/parmigiano-reggiano-vacche-rosse/parmigiano-reggiano-vacche-rosse/>]

Tabela 4. Wybrane produkty zarejestrowane w klasie mięso świeże i podroby pochodzące od lokalnych ras zwierząt (wg specyfikacji) [Komisja Europejska 2023b]
Selected products registered in the class of fresh meat and offal from local animal breeds (according to specifications) [European Commission 2023b]

Produkt	Gatunek	Rasa	Oznaczenie
Włochy			
„Vitellone Bianco Dell'appennino Centrale	bydło	Chianina, Marchigiana, Romagnola	ChOG
„Cinta Senese”	świnie	Cinta Senese	ChNP
Hiszpania			
„Carne de Ávila”	bydło	Avileña-Negra Ibérica	ChOG
„Carne de La Sierra de Guadarrama”	bydło	Avileña-Negra Ibérica	ChOG
„Ternera de Navarra, Nafarroako Aratztea”	bydło	Pirenaica, Parda Alpina	ChOG
„Carne de Vacuno del País Vasco/Euskal Okela”	bydło	Pirenaica	ChOG
„Ternera Gallega”	bydło	Rubia Gallega i Morenas del Noroeste, crossbreed z Frisona i Pardo Alpina	ChOG
„Carne de Ávila”	bydło	Avila-Iberian	ChOG
„Carne de Morucha de Salamanca”	bydło	Morucha	ChOG
„Cordero de Navarra” lub „Nafarroako Arkumea”	owce	Navarra i Lacha	ChOG
„Cordero Segureño”	owce	Segureña	ChOG

Francja			
„Maine-Anjou”	bydło	Rouge des Prés	ChNP
„Orkney Beef”	bydło	Aubrac	ChOG
„Boeuf de Bazas”	bydło	Bazadaise, Blonde d'Aquitaine	ChOG
„Génisse Fleur d'Aubrac”	bydło	krzyżówki ras Aubrac i Charolais	ChOG
Portugalia			
„Carne Marinhoa”	bydło	Marinhoa	ChNP
„Carne Barrosã”	bydło	Barrosa	ChNP
„Carne Mirandesa”	bydło	Mirandesa	ChNP
„Carne Mertolenga”	bydło	Mertolenga	ChNP
„Vitela de Lafões”	bydło	Arouquesa i Mirandesa	ChOG
„Carne de Porco Alentejano”	świnie	Alentejano	ChNP
„Carne de Bísaro Transmontano” lub „Carne de Porco Transmontano”	świnie	Bísaro	ChNP
„Cordeiro Mirandês” lub „Canhono Mirandês”	owce	Churra Galega Mirandesa	ChNP
Polska			
„Jagnięcina podhalańska”	owce	Polska owca górska, Polska owca górska odmiany barwnej, Cakiel podhalański	ChOG

Tabela 5. Wybrane regionalne produkty zarejestrowane w klasie sery produkowane na bazie mleka lokalnych ras zwierząt (wg specyfikacji) [Komisja Europejska 2023b]
Selected regional products registered in the class of cheeses made from milk of local animal breeds (according to specifications) [European Commission 2023b]

Ser	Gatunek	Rasa	Oznaczenie
Hiszpania			
„Queso Casín”	bydło	Asturiana de la Montaña o Casina, Asturiana de los Valles oraz Frisona i krzyżówki	ChNP
„Arzúa-Ulloa”	bydło	Rubia Gallega, Pardo Alpina i Frisona	ChNP
„San Simón da Costa”	bydło	Rubia Gallega, Pardo Alpina” i Frisona	ChNP
„Cebreiro”	bydło	Rubia Gallega, Pardo Alpina i Frisona	ChNP
„Picón Bejes-Tresviso”	bydło	Tudanca, Brown Alpine and Friesian	ChNP

„Queso Tetilla”	bydło	Friesian, Brown Alpine and Rubia Gallega	ChNP
Francja			
„Mont d'Or” lub „Vacherin du Haut-Doubs”	bydło	Montbéliarde and Pie Rouge de l'Est	ChNP
„Abondance”	bydło	Tarine, Abondance, Montbéliarde	ChNP
„Beaufort”, „Tome des Bauges”, „Reblochon”, „Abondance”	bydło	Tarantais	ChNP
„Tomme”, „Emmental de Savoie”	bydło	Tarantais	ChOG
„Munster”, „Bargkass”	bydło	Vosgienne	ChNP
„Bleu du Vercors-Sassenage”	bydło	Villard de Lans	ChNP
Włochy			
„Piave”	bydło	Bruna Italiana, Pezzata Rossa Italiana i Frisona Italiana	ChNP
„Parmigiano-Reggiano”	bydło	Reggiana i Bianca Val Padana	ChNP
„Casatella Trevigiana”	bydło	Pezzata Rossa i Brunna	ChNP
„Fontina”	bydło	Valdostana Pezzata Nera, Valdostana Pezzata Rossa, Valdostana Castana	ChNP
Ragusano – „Ragusa”	bydło	Modicana	ChNP
Ossolano	bydło	Bruna, Pezzata Rossa	ChNP
Strachitunt	bydło	Bruna	ChNP
Casatella Trevigiana	bydło	Pezzata Rossa, Brunna	ChNP
„Formaggio di Fossa di Sogliano ”	bydło, owce	Rasy krów: Frisona Italiana, Brunna Alpina, Pezzata Rossa i ich krzyżówki Rasy owiec: o Sarda, Comisana, Massese, Vissana, Cornella Bianca, Fabrianese delle Langhe i Pinzirita oraz ich krzyżówki	ChNP
Polska			
„Bryndza podhalańska”	owce, bydło	Owca - Polska owca górska, krowa - Polska czerwona	ChNP
„Oscypek”	owce, bydło	Owca - Polska owca górska, krowa - Polska czerwona	ChNP
„Redykoła”	owce, bydło	Owca - Polska owca górska, krowa - Polska czerwona	ChNP

Innym bardzo dobrym przykładem są świnię rasy iberyjskiej, które od wieków były utrzymywane w dużych stadach pasących się w rzadkich lasach dębowych i korkowych na południowym zachodzie Półwyspu Iberyjskiego. Do połowy XX wieku świnię iberyjskie były główną rasą świń hodowanych w Hiszpanii. Na początku tego wieku szacowano, że liczba macior reprodukcyjnych przekraczała 500 tys. szt. i były one rozprzestrzenione w całym kraju. Od tego czasu populacja tych świń zaczęła się sukcesywnie zmniejszać na skutek m.in. wybuchu afrykańskiego pomoru świń, zmiany nawyków żywieniowych (ograniczenie spożycia tłuszczów przez konsumentów) i masowego wprowadzania bardziej wydajnych ras obcych. Najbardziej krytycznym momentem dla populacji tych świń były lata 60-te XX wieku. Wówczas niektóre odmiany zniknęły, a inne były zagrożone wyginięciem. Spowodowało to konieczność opracowania nowego programu ochrony zasobów genetycznych tych zwierząt. W 1985 r. powstało Hiszpańskie Stowarzyszenie Hodowców Świń Iberyjskich (Asociación Española de Criadores de Cerdo Ibérico) [AECERIBER 2023], którego głównym zadaniem była odbudowa populacji świń tej rasy. Obecnie w skład tego stowarzyszenia wchodzi ok. 1 450 członków i 5 500 hodowców rasy świń iberyjskich, a jego głównym celem jest zarządzanie procesem certyfikacji, ochrony i promocji świń iberyjskich [Diéguez 2006, Bottos 2020]. W 2021 r. zarejestrowanych w księgach stadnych było 423 445 macior [Moreno 2022]. Obecnie świnię iberyjskie utrzymywane są w południowo-zachodniej części półwyspu: w Zachodniej Andaluzji, Estremadurze i prowincji Salamanki. Produkcja iberyjskiej świni jest głęboko związana z ekosystemem śródziemnomorskim. Jest to rzadki przypadek w świecie produkcji trzody chlewnej, w którym świnia znacznie współpracuje w zakresie ochrony ekosystemu [Bottos 2020]. Według hiszpańskiego ustawodawstwa określono ściśle dwa pojęcia:

- Dehesa – inaczej łąka, pastwisko lub obszar geograficzny, na którym stosowane są techniki rolno-leśne i zagospodarowanie terenu, oparte głównie na obecności zwierząt na użytkach zielonych i w lasach, gdzie występują głównie dęby. Na tym terenie konieczna jest działalność człowieka, aby zapewnić ochronę i trwałość tych dębów. Wymagana jest obecność co najmniej 10 drzew na obszarze 1 hektara.
- „Montanera” – to dieta zwierzęca oparta na wykorzystaniu żołądź i pastwisk dehesa w Hiszpanii i Portugalii [Szyndler-Nędzia i in. 2019].

Określono również główne systemy produkcji świń iberyjskich. Są to:

- „Montanera” – typowy system chowu świń iberyjskich na wolnym wybiegu ze strategią żywieniową opartą na żołądź i trawie;
- „Recebo” – chów na wolnym wybiegu z żywieniem opartym na połączeniu żołądź, trawy

i zbóż;

- *Intensywny* – system zamknięty z żywieniem mieszankami paszowymi [Tejerina i in., 2012].

Mięso świń iberyjskich charakteryzuje się nieco odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi w porównaniu do ras białych, co ma istotny wpływ na jakość szynek iberyjskich, długodojrzewających. W dużej mierze wynika to faktu, że zwierzęta te swobodnie się poruszają (dłuższa i smuklejsza noga) oraz specyficznego żywienia (trawa, bulwy, żołądziej). Z badań Serra i in. [1998] wynika, że świni iberyjskie (IB) miały wyższą wydajność rzeźną (78,6 vs. 72,4%) i grubość słoniny (48,1 vs. 20,7 mm) niż świni landrace (LR). Ponadto mięso świń IB miało wyższą zawartość barwnika hemowego niż LR. Mięsień Longissimus lumborum świń IB charakteryzował się także wyższym udziałem tłuszczu śródmięśniowego (3,91 vs. 0,66), a w słoninie było więcej kwasów tłuszczowych nasyconych i jednonienasyconych przy niższym stężeniu C18:2 i C18:3 niż u świń LR. W mięśniach świń IB udział włókien typu 1 był wyższy (12,09 vs. 9,09%), przy większej ich średnicy (44,37 vs. 40,83 μm) niż u świń LR, natomiast odwrotna sytuacja była w przypadku włókien typu 2B (proporcja i średnica). Badania wskazują, że zarówno linia świń iberyjskich, jaki i system żywienia mają również wpływ na jakość mięsa [Muriel i in. 2004, Rey i in. 2006, Tejerina i in. 2012, Ayuso i in. 2020] – tab. 6-7.

Tabela 6. Właściwości fizykochemiczne mięsa świń iberyjskich z uwzględnieniem systemu ich produkcji i rodzaju mięśnia (Longissimus dorsi i *Serratus ventralis*) [Tejerina i in. 2012]
Physicochemical properties of Iberian pig meat, including its production system and muscle type (Longissimus dorsi and Serratus ventralis) [Tejerina i in. 2012]

Wyszczególnienie	System produkcji			Rodzaj mięśnia	
	<i>Montanera</i>	<i>Recebo</i>	<i>Intensywny</i>	<i>L. dorsi</i>	<i>S. ventralis</i>
Skład przybliżony (g/100 g):					
- zawartość wody	67,9	66,3	66,9	67,3	66,8
- tłuszcz śródmięśniowy	7,2	6,8	6,9	6,4	7,8
Wodochłonność (% wody wolnej)	64,3	54,5	56,5	59,3	58,2
Straty wody (g wody/100 g mięsa):					
- wyciek swobodny	3,1	2,8	2,8	2,5	2,7
- wyciek zamrażalniczy	15,6	16,3	21,1	17,8	21,7
- wyciek cieplny	21,3	21,8	20,9	19,1	23,3
pH ₂₄	5,83	5,81	5,75	5,72	5,93

Objaśnienia: pH₂₄ – pH mierzone po 24 godzinach po uboju

Tabela 7. Profil kwasów tłuszczowych mięśnia Longissimus dorsi różnych linii świń iberyjskich (g/kg całkowitego FAME) [Muriel i in. 2004]
Fatty acid profile of Longissimus dorsi muscle from different lines of Iberian pigs (g/kg of total FAMES) [Muriel i in. 2004]

Kwas tłuszczowy	Linia świń iberyjskich			
	Entrepelado	Lampião	Retinto	Torbbiscal
SFA	342,40	339,21	332,02	338,22
MUFA	569,44	570,66	576,07	566,47
PUFA	88,16	90,14	91,91	95,31
$\sum$ n-6	83,23	85,90	86,50	91,18
$\sum$ n-3	5,47	4,24	5,40	4,13
n-6/n-3	17,05	20,61	17,29	23,01

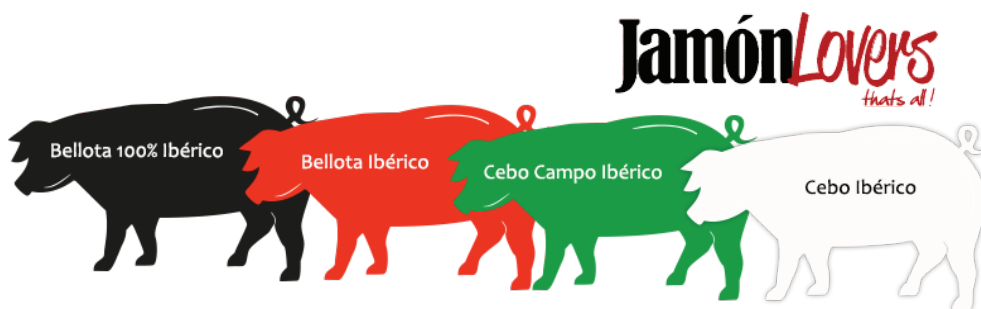
Objaśnienia: *FAME* (ang. Fatty Acid Methyl Esters) – estry metylowe kwasów *tłuszczowych*

W ramach strategii ochrony świń iberyjskich przed wyginieciem, opracowano system certyfikacji i promocji iberyjskich produktów suszonych, w tym szynki, których tradycja wytwarzania sięga setek lat wstecz. Szynki iberyjskie (Jamon Iberico) to jedne z najbardziej znanych hiszpańskich produktów w Europie [Villanueva i in. 2021]. W ramach iberyjskiego sektora wieprzowiny istnieją dwa równoległe systemy certyfikacji szynki i innych produktów mięsnych, tzn. krajowy, scentralizowany, oparty na „Norma de Calidad del Ib'rico” (Krajowy Standard Jakości) oraz związany z oznaczeniami Chroniona Nazwa Pochodzenia dla każdego z rejonu dehesa (Dehesa de Extremadura, Los Pedroches, Gui). Etykietowanie w ramach obu systemów jest zharmonizowane i zgodne z tym samym schematem kolorów (ryc. 2):

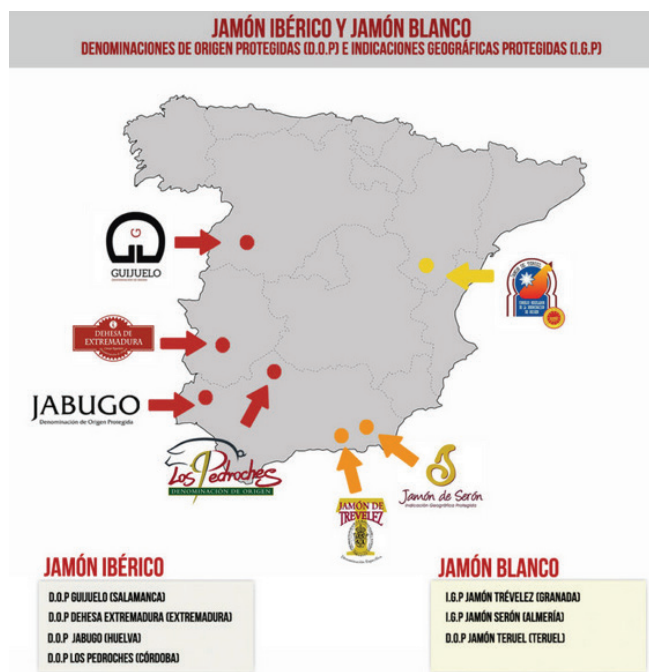
- czarna etykieta – oznacza żywienie świń wyłącznie żołądkami w okresie przebywania na dehesie, świnie 100% rasy ibérico (De Bellota, 100% Ibérico);
- czerwona etykieta – oznacza żywienie żołądkami, świnie są krzyżówkami z rasą Ibérico (De bellota, Ibérico);
- zielona etykieta – oznacza karmienie komercyjnymi mieszankami paszowymi, jednak zwierzęta mogą korzystać z pastwiska, świnie są krzyżówkami z rasą ibérico (De Cebo de Campo, Ibérico);
- biała etykieta – oznacza, że zwierzęta karmione są komercyjnymi mieszankami paszowymi, utrzymywane w budynkach z dostępem do małych wybiegów, świnie są krzyżówkami z rasą ibérico (De Cebo, Ibérico) [Real Decreto 2014, Szyndler-Nędzia i in. 2019].

W ramach europejskiego systemu ochrony jakości produktów rolnych i środków

spożywczych zarejestrowano 4 szynki (Jamón Ibérico) ze znakiem Chroniona Nazwa Pochodzenia: Guijuelo (Salamanka), Dehesa de Extremadura (Extremadura), Jabugo (Huelva) i Los Pedroches (Kordoba). Ze znakiem Chronione Oznaczenie Geograficzne zarejestrowane są 2 szynki (Jamón Blanco), wytwarzane z białych świń. Są to: Jamón de Trévelez (Granada) i Jamón de Serón (Almería) – rys. 3.



Rysunek 2. Etykiety szynki iberyjskich [<https://www.jamonlovers.es/clasificacion-jamon/>] *Iberian ham labels* [<https://www.jamonlovers.es/clasificacion-jamon/>]



Rysunek 3. Mapa rozmieszczenia hiszpańskich certyfikowanych (ChNP, ChOG) szynki długodojrzewających [Jamón Lovers 2023] *Map of the distribution of Spanish certified (PDO, PGI) long-maturing hams* [Jamón Lovers 2023]

PODSUMOWANIE

Przedstawione systemy chowu lokalnych ras zwierząt gospodarskich i produktów żywnościowych z nimi związanych, dla których opracowano standardy utrzymania i żywienia

zwierząt, przetwórstwa, certyfikacji i dystrybucji z jednoczesną dbałością o ich identyfikalność wskazują, że jest to dobra strategia w kierunku zwiększenia rentowności ich utrzymania, a w konsekwencji ochrony tych ras przed wyginięciem. Mierzalne efekty mogą być jednak widoczne tylko wtedy, gdy hodowcy tych ras i producenci żywności zrzeszają się i podejmują wspólne działania. Konsumenci coraz częściej sięgają po taką żywność, gdyż mają pewność, że jest ona unikatowa, smaczniejsza, zawierająca z reguły mniej substancji dodatkowych i jednocześnie powtarzalna, pomimo, że muszą zapłacić za nią więcej niż za produkowaną masowo.

PIŚMIENNICTWO

1. AECERIBER (2023). Asociación Española de Criadores de Cerdo Ibérico. <https://autenticoiberico.com/los-ganaderos/>
2. Afolabi K.D. (2013). Local or indigenous chicken production: A key to food security, poverty alleviation, disease mitigation and socio-cultural fulfilment in Africa. Chapter 14. [in:] Sustainable Food Security in the Era of Local and Global Environmental Change (ed.) Behnassi M., Pollmann O., Kissinger G. Springer, 217–229
3. ANABoRaRe – Associazione Nazionale Allevatori Bovini di Razza Reggiana (2023). Dostępne online: <https://www.consortiovaccherosse.it/la-razza/le-vacche-rosse-di-razza-reggiana/>
4. Ayuso D., González A., Peña F., Hernández-García F., Izquierdo M. (2020). Effect of fattening period length on intramuscular and subcutaneous fatty acid profiles in Iberian pigs finished in the Montanera sustainable system. *Sustainability*, 12, 7937
5. Babicz M., Kropiwek-Domańska K., Skrzypczak E., Szyndler-Nęcza M., Szulc K. (2020). Analysis of technological and consumption quality of offal and offal products obtained from Pulawska and Polish Landrace pigs. *Animals*, 10(6), 964
6. Barłowska J. (2011). Rodzime rasy zwierząt podstawą żywności regionalnej i tradycyjnej. W: Ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich i dziko żyjących, Z. Litwińczuk (red.), PWRiL, Warszawa, ss. 295
7. Barłowska J., Król J. (2017). Mleko zwierząt ras lokalnych jako cenny surowiec do produkcji markowych produktów regionalnych. *Wiadomości Zootechniczne*, LV(5), 134-144
8. Barłowska J., Litwińczuk Z. (2006). Technological usefulness of milk from two local breeds maintained in the regions with great grassland share. *Archiv Tierzucht*, 49, 207-213

9. Batyk I.M., Smoczyński S.S. (2011). Determinanty wpływające na zakup żywności regionalnej i tradycyjnej. *Zeszyty Naukowe / Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*, 206, 123-131
10. Bertolini F., Schiavo G., Bovo S., Sardina M.T., Mastrangelo S., Dall'Olio S., Portolano B., Fontanesi L. (2020). Comparative selection signature analyses identify genomic footprints in Reggiana cattle, the traditional breed of the Parmigiano-Reggiano cheese production system. *Animal*, 14(5), 921-932
11. Bittante G., Penasa M., Cecchinato A. (2012). Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.*, 95, 6843-6870
12. Bottos L.C. (2019). Race and Process: Certifying Iberian Pigs and Invisibilising Humans. *Norsk Antropologisk Tidsskrift | Årgang 30(3-4)*, 258-274
13. Brodziak A., Król J., Barłowska J., Litwińczuk Z., Teter A., Kędzierska-Matysek M. (2020). Differences in bioactive protein and vitamin status of milk obtained from Polish local breeds of cows. *Ann. Anim. Sci.*, 20, 287-298
14. Chabuz W., Teter W. (2016). Efektywność produkcji w gospodarstwach utrzymujących zwierzęta ras lokalnych. W: *Wytwarzanie produktów regionalnych jako szansa aktywizacji gospodarstw utrzymujących lokalne rasy zwierząt i promocji zrównoważonego rozwoju obszarów wiejskich*. J. Barłowska (red.). Wyd. Joanna Dejko Studium Doskonalenia Zdolności Poznawczych, Lublin, 141-148
15. Chabuz W., Teter W., Stanek P., Litwińczuk Z. (2013). Ocena efektywności chowu bydła w gospodarstwach utrzymujących rodzime rasy objęte programem ochrony zasobów genetycznych. *Rocz. Nauk. PTZ*, 9(1), 19-28
16. Chabuz. W. (2011). Rola rodzimych ras zwierząt trawożnych w kształtowaniu krajobrazu i zachowaniu regionów o dużym znaczeniu przyrodniczym. W: *Ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich i dziko żyjących*, Z. Litwińczuk (red.), PWRiL, Warszawa, ss. 295
17. Chiofalo V., Maldonato R., Martin B., Dupont D., Coulon J. B. (2000). Chemical composition and coagulation properties of Modicana and Holstein cows' milk. *Ann. Zootech.*, 49, 497-503
18. Consorzio Vacche Rosse (2023). Dostępne online: <https://www.razzareggiana.it/>
19. Czarniecka-Skubina E., Pielak M., 2017. Traditional foods versus foods produced using modern technology. *Zeszyty Naukowe Uczelni Vistula*, 54(3), 165-178
20. De Marchi M., Dal Zotto R., Cassandro M., Bittante G. (2007). Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. *J Dairy Sci.*, 2007, 90 (8), 3986-3992

21. Diéguez E. (2006). El cerdo ibérico. Una imagen de calidad. Revista computadorizada de producción porcina el cerdo Ibérico en España y en la Unión Europea/The Iberian pig in Spain and the European Union. 13(supl. 2), 11-15. [po hiszpańsku]
22. Domaradzki P., Litwińczuk Z., Florek M., Żółkiewski P. (2017). Effect of ageing on the physicochemical properties of musculus longissimus lumborum of young bulls of five breeds. *Med. Weter.*, 73 (12), 802-810
23. FAO (2007). The state of the world's. Animal genetic resources for food and agriculture. Commission on genetic resources for food and agriculture food and agriculture organization of the united nations, Rome, ss. 512
24. FAO (2012). Report of a consultation on the definition of breed categories; Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture: Rome, Italy, 2012; Dostępne online: <http://www.fao.org/docrep/meeting/026/me588e.pdf>
25. FAO (2023). Status and Trends of Animal Genetic Resources – 2022. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, Italy
26. Florek M., Litwińczuk Z., Domaradzki P., Chabuz W., Żółkiewski P., Jankowski P. (2017). Rodzime rasy bydła podstawą produktów regionalnych z wołowiny. *Wiadomości Zootechniczne*, LV(5), 123-133
27. Gandini G., Maltecca C., Pizzi F., Bagnato A., Rizzi R. (2007). Comparing local and commercial breeds on functional traits and profitability: The case of Reggiana dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 90(4), 2004–2011
28. Goryńska-Goldmann E., Gazdecki M. (2016). Kryteria wyboru jako podstawa innowacyjności na rynku produktów regionalnych i tradycyjnych. *Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu. Roczniki Naukowe*, 18(6), 35-41
29. Grębowiec M. (2017). Produkty regionalne i tradycyjne jako element budowania konkurencyjnej oferty produktów żywnościowych w Polsce i innych krajach Europy. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Problemy Rolnictwa Światowego*, 17(2), 65-80
30. Gulbicka B. (2014). Żywność tradycyjna i regionalna w Polsce. Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki żywnościowej – Państwowy Instytut Badawczy
31. Hoffmann I. (2010). Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41, 32-46
32. Instytut Zootechniki (2023). Dostępne online: <https://iz.edu.pl/wspolpraca-z-praktyka/bioroznorodnosc/>
33. Jamón Lovers (2023). Dostępne online: <https://www.jamonlovers.es/las-denominaciones->

- de-origen-e-indicaciones-geograficas-del-jamon/
34. Komisja Europejska (2023b). Rejestry produktów chronionych oznaczeniem geograficznym. Rejestr chronionych oznaczeń geograficznych. Dostępne online: <https://ec.europa.eu/agriculture/eambrosia/geographical-indications-register/>
 35. Komisja Europejska (2023c). Rejestry produktów chronionych oznaczeniem geograficznym. Gwarantowana Tradycyjna specjalność. Dostępne online: <https://ec.europa.eu/agriculture/eambrosia/geographical-indications-register/tsg>
 36. Komisja Europejska. (2023a). https://agriculture.ec.europa.eu/farming/geographical-indications-and-quality-schemes_pl
 37. Król J., Brodziak A., Litwińczuk Z., Litwińczuk A. (2013). Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds. *Pol. J. Vet. Sci.*, 16(2), 395-397
 38. Król J., Litwińczuk Z., Brodziak A., Sawicka-Zugaj W. (2010). Bioactive protein content in milk from local breeds of cows included in the genetic resources conservation programme. *Ann. Anim. Sci.*, 10(3), 213-221
 39. Krupiński J. (2011). Światowy plan działań na rzecz zasobów genetycznych. W: Ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich i dziko żyjących, Z. Litwińczuk (red.), PWRiL, Warszawa, ss. 295
 40. Kuźniar W., Kawa M. (2018). Konsumenci wobec regionalnych produktów tradycyjnych w kontekście ogólnoswiatowych zmian w zachowaniach konsumentów na rynku żywności. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Problemy Rolnictwa Światowego*, 18(4), 304-312
 41. Litwińczuk Z., Barłowska J. (2014). Zwierzęta w życiu człowieka. *Medycyna Weterynaryjna*, 70 (4), 248-253
 42. Litwińczuk Z., Barłowska J., Chabuz W., Brodziak A. (2012). The nutritional value and technological suitability of milk from cows of 3 Polish breeds included in the programme of genetic resources conservation. *Ann. Anim. Sci.*, 12(3), 423-432
 43. Litwińczuk Z., Domaradzki P., Florek M., Żółkiewski P. (2016). Chemical composition, fatty acid profile, including health indices of intramuscular fat, and technological suitability of the meat of young bulls of three breeds included in a genetic resources conservation programme fattened within a low-input system. *Animal Science Papers and Reports* 34(4), 387-397
 44. Luković Z., Škorput D., Karolyi D., Kaić A. (2023). Prospects for sustainable production of the Banija spotted pig in relation to fattening, carcass, and meat quality traits: A

- preliminary study. *Sustainability*, 15, 3288
45. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Produkty regionalne i tradycyjne. (2023). Dostępne online: <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/produkty-regionalne-i-tradycyjne>
 46. Monteiro A.C.G., Gomes E., Barreto A.S., Silva M.F., Fontes M.A., Bessa R.J.B., Lemos, J.P.C. (2013). Eating quality of "Vitela Tradicional do Montado" – PGI veal and Mertolenga-PDO veal and beef. *Meat Sci.*, 94(1), 63-68
 47. Moreno A.P. (2020). Estudio del sector porcino Ibérico en España y análisis de sus vías de crecimiento. Trabajo fin de grado. Curso académico [2021-2022]. Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. Universidad de Sevilla, ss. 58. [po hiszpańsku]
 48. Moreno-Indias I., Hernández-Castellano L.E., Morales-delaunueza A., Castroa N., Capoteb J., Mendoza-Grimóna V., Riveroaand M.A., Argüello A. (2011). Differences on meat quality of local cattle breed from outermost EU zone vs. commercial. *J. Appl. Anim. Res.*, 39(4), 328-333
 49. Muriel E., Ruiz J., Ventanas J., Petró M.J., Antequera T. (2004). Meat quality characteristics in different lines of Iberian pigs. *Meat Sci.*, 67, 299-307
 50. Ovaska U., Bläuer A., Kroløkke Ch., Kjetså M., Kantanen J., Honkatukia M. (2021). The conservation of native domestic animal breeds in Nordic Countries: From genetic resources to cultural heritage and good governance. *Animals*, 11(9), 2730
 51. Ovaska U., Soini K. (2016). Local breeds – Rural heritage or new market opportunities? Colliding views on the conservation and sustainable use of Landraces. *Sociologia Ruralis*, 57, 709-729
 52. Pilling D., Bélanger J., Diulgheroff S., Koskela J., Leroy G., Mair G., Hoffmann I. (2020). Global status of genetic resources for food and agriculture: challenges and research needs. *Genetic Resources*, 1(1), 4-16
 53. Poklukar K., Čandek-Potokar M., Lukač N.B., Tomažin U., Škrlep M. (2020). Lipid deposition and metabolism in local and modern pig breeds: A review. *Animals*, 10, 424
 54. Pretto D., De Marchi M., Dalvit Ch., Cassandro M. (2009). Comparing profitability of Burlina and Holstein Friesian cattle breeds. *Ital. J. Anim. Sci.* vol. 8 (Suppl. 3), 65-67
 55. Pugliese C., Pianaccioli L., Sirtori F., Acciaioli A., Bozzi R., Franci O. (2007). Effect of pasture on chestnut woods on meat quality and fatty acid composition of fat in Cinta Senese pigs. *Options Méditerranéennes, Series A*, 76, 263-267
 56. Real Decreto (2014). BOE-A-2014-318. Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico

[po hiszpańsku]

57. Rey A., Daza A., López-Carrasco C., López-Bote C. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in *Longissimus dorsi* muscle and backfat. *Meat Sci.*, 73(1), 66-74
58. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1151/2012 z dnia 21 listopada 2012 r. w sprawie systemów jakości produktów rolnych i środków spożywczych
59. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1305/2013 z dnia 17 grudnia 2013 r. w sprawie wsparcia rozwoju obszarów wiejskich przez Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich (EFRROW) i uchylające rozporządzenie Rady (WE) nr 1698/2005 (Dz.U.UE L z dnia 20 grudnia 2013 r.)
60. Serra X., Gil F., Perez-Enciso M., Oliver M.A., Vazquez J.M., Gispert M., Díaz I., Moreno F., Latorre R., Noguera J.L. (1998). A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyerbass line) and Landrace pigs. *Livest. Prod. Sci.*, 56, 215–223
61. Sokołowicz Z., Magdalena Dykiel M., Krawczyk J., Augustyńska-Prejsnar A. (2019). Effect of layer genotype on physical characteristics and nutritive value of organic eggs. *CyTA-J Food*, 17(1), 11-19
62. Szyndler-Nędzia M., Jacek Nowicki J., Małopolska M. (2019). The production system of high quality pork products – an example. *Warsaw Univ. of Life Sci. – SGGW, Anim. Sci.* 58 (2), 182-198
63. Tarcza Teodora Mihaela. (2015). “Quantitative benchmarks on traditional food products market in Romania”. *Annals of the University of Oradea. Economic Science Series*, 24(2), 605-614
64. Tejerina D., García-Torres S., Cava R. (2012). Water-holding capacity and instrumental texture properties of m. *Longissimus dorsi* and m. *Serratus ventralis* from Iberian pigs as affected by the production system. *Livest. Sci.*, 148, 46-51
65. Teter A., Barłowska J., Florek M., Kędzierska-Matysek M., Król J., Brodziak A., Litwińczuk Z. (2019). Coagulation capacity of milk of local Polish and Holstein-Friesian cattle breeds. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 37(3), 259-268
66. Villanueva A.J., Salazar-Ordoñez M., Granado-Díaz R., Rodríguez-Entrena M. (2021). Consumers’ preferences for traditional meat products: production system and objective quality cues in Iberian ham. *Ital. J. Anim. Sci.*, 20(1), 1987-2001
67. Weerasingha V., Priyashantha H., Ranadheera C.S., Prasanna P., Silva P., Vidanarachchi

- J.K. Johansson M. (2022). Milk coagulation properties: A study on milk protein profile of native and improved cattle breeds/types in Sri Lanka. *Dairy*, 3, 710-772
68. Wolanciuk A., Barłowska J., Litwińczuk Z., Florek M. (2016). Suitability of the milk of native breeds of cows from low-input farms for cheese production, including rennet curd texture. *Int. J. Dairy Technol.*, 69(4), 585-591
69. Xie X., Meng Q., Cui Z., Ren L. (2012). Effect of cattle breed on meat quality, muscle fiber characteristics, lipid oxidation and fatty acids in China. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 25(6), 824-831

Informacje dla autorów

„Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego” są wydawnictwem ciągłym (kwartalnikiem) publikowanym przez Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy (IBPRS-PIB).

Prace kwalifikowane są do druku na podstawie recenzji. Artykuły powinny być napisane w sposób zwięzły i rzeczowy oraz zgodnie z zasadami pisowni polskiej.

Objętość prac nie powinna przekraczać 15 stron maszynopisu formatu A4. Tekst należy napisać czcionką Times New Roman 12 pkt (tytuł pracy – 14 pkt) z zachowaniem odstępu pomiędzy wierszami 1,5, marginesy 2,5 cm i wcięcia akapitów 0,75 cm i zapisać w formacie Word for Windows 97-2003. Tekst powinien być wyjustowany z numeracją na dole strony. Tabele, rysunki i wykresy należy umieścić w tekście. Tytuły tabel należy umieszczać nad tabelami, a rysunków pod rysunkami. Numeracja powinna odpowiadać chronologii ich pojawiania się w tekście (np. tabela 1, rysunek 1). Skróty jednostek miar i wyniki oznaczeń powinny być zgodne z Międzynarodowym Układem Jednostek SI. Tytuły tabel (nagłówki) i rysunków należy podać w języku polskimi i angielskim (*kursywą*). Kursywą należy wyróżnić: symbole i wielkości fizyczne, jedno- i wieloliterowe skróty wyrazów w indeksach oraz nazwy łacińskie.

W treści cytowane powinny być tylko dokumenty publikowane np.

- [Kowalski 2002]
- [Kowalski, Szewczyk 2003]
- [Kowalski 2002; Szewczyk 2000; Słowik 1999]
- [Kowalski i in. 2004] – jeżeli jest więcej niż dwóch autorów

Nie powinno się jednorazowo cytować więcej niż pięć pozycji literatury.

Układ pracy (wszystkie tytuły wypośrodkowane i wytłuszczone)

TYTUŁ PRACY (14 pkt)

Autorzy (**Imię i Nazwisko**) 12 pkt

Miejsce pracy (nazwa instytucji, adres, e-mail pierwszego autora)

Streszczenie (do 20 wierszy)

Słowa kluczowe (do 6 słów)

TYTUŁ PRACY W J. ANGIELSKIM 12 pkt

Streszczenie w j. angielskim (**Summary**)

Słowa kluczowe w j. angielskim (**Keywords**)

WPROWADZENIE lub WSTĘP

Tekst uwzględniający podział na ułatwiające lekturę rozdziały i podrozdziały oraz ilustracje graficzne i tabelaryczne.

PIŚMIENNICTWO (spis ułożony alfabetycznie, numerowany) tylko dokumenty publikowane

W przypadku prac doświadczalnych układ powinien zawierać dodatkowo:

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

WYNIKI I DYSKUSJA (wyniki z badań w syntetycznym zestawieniu)

WNIOSKI

Przykłady:

- artykuł z czasopisma

Funk P. (2004). Soki owocowe. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 48, 8-9

- wydawnictwa zwarte

Ball S. (2001). *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*. Warszawa: Medyk Sp. z o.o.

Żywność wygodna i żywność funkcjonalna. (1999). Pr. zbior. pod red. F. Świderskiego. Warszawa: WNT

- rozdział w książce

Brusiło J. (2008). *Żywność modyfikowana genetycznie – Ocena etyczna globalnego eksperymentu*. W: *Zrównoważone rolnictwo a bezpieczna żywność*. Kraków: PTTŻ

- czasopismo elektroniczne

Komorowska A., Sieliwanowicz B., Mrówka E., Stecka K., Hałasinska A. (2003). Studies on yeast extracts enriched in 5'nucleotides flavour enhancers obtained from spent brewery yeast. *Electr. J. Pol. Agricult. Univ., Biotechnol.*, 6, 1. <http://www.ejpan.media.pl/series/volume6/issue1/biotechnology/index.html>

- materiały z konferencji

Górniak W. (2003). Grupy jakościowe ziarna pszenicy a kierunki jego wykorzystania. W: *Ogólnopolska Konferencja Naukowa – Jakość a wykorzystanie ziarna zbóż*. 15–16 października 2003. Puławy: JUNG [CD-ROM]

Redakcja zastrzega sobie prawo do dokonywania w tekście poprawek redakcyjnych niewpływających na treść merytoryczną artykułu bez porozumienia z Autorami.

Artykuł należy przesłać e-mailem na adres Sekretarza Redakcji.

Redakcja

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława
Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy

ul. Rakowiecka 36,

02-532 Warszawa

Sekretarz – Lila Nabiałek, tel. 22 606 36 99, e-mail: lila.nabialek@ibprs.pl