Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

BADANIE ZMIAN SKŁADU FITOKOMPLEKSU I WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCYCH OWOCÓW ARONII CZARNOOWOCOWEJ (*ARONIA MELANOCARPA* (MICHX.) ELLIOTT) I WICIOKRZEWU SINEGO (*LONICERA CAERULEA* L.) POD WPŁYWEM PRZETWARZANIA

mgr inż. Anita Piasek

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Gdańsk 2010

Składam serdeczne podziękowania

Panu prof. dr hab. inż. JACKOWI NAMIEŚNIKOWI
za wszelką pomoc, nieustanną mobilizację do pracy, a także cenne uwagi i wskazówki udzielane podczas pisania pracy

Pani dr inż. AGNIESZCE BARTOSZEK-PĄCZKOWSKIEJ
za opiekę, zaangażowanie, pomoc merytoryczną i poświęcony czas przy redagowaniu pracy

Dziękuję także

Pani dr inż. BARBARZE KUSZNIEREWICZ
za życzliwość, cenne rady i koleżeńską pomoc przy wykonywaniu badań

Panu prof. ANDREW COLLINSOWI oraz dr AMAII AZQUETA OSCOZ
z Uniwersytetu w Oslo
za opiekę, wskazówki, a także poświęcony czas przy wykonywaniu badań biologicznych

Pani dr inż. EDYCIE MALINOWSKIEJ-PAŃCZYK
za pomoc w realizacji badań mikrobiologicznych

Dziękuję również za owocną współpracę

Zespołowi firmy ENBIO TECHNOLOGY Sp. z o.o.
Pracownikom firmy FUNGOPOL Sp. j.

Pragnę podziękować także

PRACOWNIKOM i DOKTORANTOM
Katedry Chemii Analitycznej
PRACOWNIKOM
zespołu badawczego pana prof. Andrew Collinsa z Uniwersytetu z Oslo
za stworzenie miłej i niezapomnianej atmosfery pracy

Składam podziękowania

DYPLOMANTKOM
mgr inż. IWONIE GRZYBOWSKIEJ oraz mgr inż. BARBARZE MRUGALSKIEJ
za pomoc w realizacji badań,
a także wszystkim osobom, które przyczyniły się do zgromadzenia próbek owoców do badań objętych rozprawą doktorską

Podziękowania kieruję również do

MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEG0 oraz
UNII EUROPEJSKIEJ
za wsparcie finansowe w trakcie realizacji badań

Szczególnie dziękuję

RODZICOM, a także HANI oraz PRZEMKOWI
za cierpliwość, wyrozumiałość i wsparcie duchowe

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW 4

I CZĘŚĆ TEORETYCZNA 5

1. WPŁYW SPOSOBU ODŻYWIANIA NA ZAPOBIEGANIE CHOROBOM CYWILIZACYJNYM 5
2. OWOCE JAGODOWE 7
3. ARONIA CZARNOOWOCOWA – OPIS BOTANICZNY, ZAWARTOŚĆ ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH 12
   3.1. Właściwości biologiczne owoców aronii czarnoowocowej 15
      3.1.1. Epidemiologia i profilaktyka chorób układu krążenia 15
         3.1.1.1. Rola owoców aronii czarnoowocowej w profilaktyce chorób układu krążenia – badania z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od zwierząt 16
         3.1.1.2. Rola owoców aronii czarnoowocowej w profilaktyce chorób układu krążenia – badania w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od ludzi 17
         3.1.1.3. Rola owoców aronii czarnoowocowej w profilaktyce i terapii chorób układu krążenia u ochotników 19
      3.1.2. Epidemiologia i profilaktyka chorób nowotworowych 21
         3.1.2.1. Aktywność chemoprewencyjna owoców aronii czarnoowocowej w warunkach *in vitro* 23
         3.1.2.2. Aktywność przeciwrakotwórcza owoców aronii czarnoowocowej w trakcie badań *in vivo* 26
         3.1.2.3. Aktywność przeciwrakotwórcza owoców aronii czarnoowocowej u ochotników 27
      3.1.3. Inne właściwości biologiczne owoców aronii czarnoowocowej 28
4. WICIOKRZEW SINY – ODMIANY, OPIS BOTANICZNY, ZAWARTOŚĆ ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH 30
   4.1. Właściwości biologiczne owoców wiciokrzewu sinego 33
5. WPŁYW WARUNKÓW PRZETWARZANIA ROŚLIN JADALNYCH NA ZAWARTOŚĆ ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH 36
   5.1. Przetwarzanie owoców jagodowych 37
      5.1.2. Czynniki wpływające na zawartość związków polifenolowych podczas produkcji przetworów z owoców jagodowych 37
         5.1.2.1. Wybór surowca 37
         5.1.2.2. Dojrzewanie, czas zbioru, oczyszczanie i pakowanie owoców jagodowych 38
         5.1.2.3. Przechowywanie owoców jagodowych 38
         5.1.2.4. Przetwarzanie owoców jagodowych 39
   5.2. Przetwarzanie owoców aronii czarnoowocowej 40

II CEL I ZAKRES PRACY 42

III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA 44

1. APARATURA I ODCZYNNIKI 44
   1.1. Odczynniki chemiczne i biochemiczne 44
   1.2. Odczynniki stosowane do przygotowania podłoża mikrobiologicznego 45
   1.3. Aparatura i materiały pomocnicze 46
   1.4. Charakterystyka sterylizatora kompaktowego EnbioJet 47
   1.5. Przygotowanie roztworów do oznaczeń prowadzonych za pomocą testu kometowego 48
   1.6. Przygotowanie podłoża mikrobiologicznego 49
   1.7. Materiały użyte do prowadzenia hodowli komórkowej 49
   1.8. Materiał badawczy 49
2. OPIS STOSOWANYCH PROCEDUR ANALITYCZNYCH 52
   2.1. Przygotowanie próbek do badań 52
   2.2. Procedury wykorzystywane na etapie oznaczania zawartości związków polifenolowych w badanych próbkach żywności otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego 53
   2.3. Procedury wykorzystywane podczas oznaczania całkowitej aktywności przeciwutleniającej składników obecnych w badanych próbkach produktów 56
      2.3.1. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem kationorodnika $ABTS^{\bullet+}$ 56
      2.3.2. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem rodnika $DPPH^{\bullet}$ 57
      2.3.3. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem odczynnika *Folina-Ciocalteu'a* 59
   2.4. Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do monitorowania profili przeciwutleniaczy występujących w badanych próbkach 61
   2.5. Wykorzystanie derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny w celu uzyskania profili przeciwutleniaczy oraz monitorowania aktywności przeciwutleniającej związków występujących w próbkach ekstraktów rozpuszczalnikowych oraz soków otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego 61
   2.6. Oznaczanie drobnoustrojów w sokach 62

2.7. Oznaczanie cytotoksyczności ekstraktów etanolowych oraz soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 ... 63
2.7.1. Inkubacja komórek z badanymi próbkami owoców ... 63
2.7.2. Określenie stopnia zahamowania wzrostu komórek przez ekstrakty etanolowe oraz soki otrzymane z owoców aronii i wiciokrzewu sinego ... 63
2.8. Oznaczanie genotoksyczności ekstraktów etanolowych oraz soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 ... 64
2.9. Sprawdzenie ochrony ludzkich komórek limfoblastycznych TK6, poddanych stresowi oksydacyjnemu, przez preparaty otrzymane z owoców aronii i wiciokrzewu sinego ... 65
2.10. Test kometowy – etapy procedury [124] ... 66
2.10.1. Pokrycie szkiełek mikroskopowych warstwą agarozy NMP ... 66
2.10.2. Naniesienie komórek na szkiełka mikroskopowe ... 66
2.10.3. Liza komórek ... 66
2.10.4. Traktowanie komórek roztworem enzymu FPG ... 67
2.10.5. Rozwijanie DNA i elektroforeza w warunkach alkalicznych ... 67
2.10.6. Barwienie DNA i analiza mikroskopowa ... 67
3. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW ... 69
3.1. Wybór sposobu przygotowania próbek do badań ... 70
3.1.1. Porównanie zawartości bioaktywnych fitozwiązków w różnych ekstraktach wybranej próbki otrzymanej z owoców aronii ... 70
3.1.2. Porównanie całkowitej aktywności przeciwutleniającej różnych ekstraktów wybranej próbki owoców aronii ... 74
3.2. Porównanie zawartości bioaktywnych fitozwiązków w różnych produktach spożywczych otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego ... 75
3.2.1. Porównanie zawartości bioaktywnych fitozwiązków w próbkach świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego ... 77
3.2.2. Zmiany zawartości bioaktywnych fitozwiązków w próbkach owoców aronii pobranych podczas produkcji dżemów ... 80
3.2.3. Zawartość bioaktywnych fitozwiązków w próbkach soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych tradycyjnej obróbce termicznej ... 84
3.2.4. Zawartość bioaktywnych fitozwiązków w próbkach soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet* ... 87
3.3. Porównanie całkowitej aktywności przeciwutleniającej produktów żywnościowych otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego ... 89
3.3.1. Porównanie właściwości przeciwutleniających próbek świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego ... 90
3.3.2. Zmiany całkowitej aktywności przeciwutleniającej owoców aronii podczas ich przetwarzania w celu otrzymania dżemów ... 92
3.3.3. Właściwości przeciwutleniające soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych tradycyjnej obróbce termicznej ... 94
3.3.4. Całkowita aktywność przeciwutleniająca soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych obróbce termicznej za pomocą urządzenia *EnbioJet* ... 96
3.4. Porównanie profili bioaktywnych fitozwiązków w produktach żywnościowych otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego ... 98
3.4.1. Porównanie profili antocyjanów w próbkach świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego ... 98
3.4.2. Zmiany profili fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy w próbkach owoców aronii w trakcie procesu produkcji dżemów ... 99
3.4.3. Zmiany profili polifenoli o właściwościach przeciwutleniających w sokach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych tradycyjnej obróbce termicznej ... 101
3.4.4. Porównanie profili polifenoli o właściwościach przeciwutleniających w sokach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet* ... 102
3.5. Wykorzystanie procesu derywatyzacji w wycieku z kolumny do porównania profili przeciwutleniaczy w produktach żywnościowych otrzymanych na bazie owoców aronii i wiciokrzewu sinego ... 104
3.5.1. Profile przeciwutleniaczy obecnych w próbkach świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego ... 106
3.5.2. Porównanie profili fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy w wybranych próbkach owoców aronii pobranych podczas produkcji dżemu ... 108
3.5.3. Wpływ tradycyjnej obróbki termicznej soków otrzymanych z owoców aronii na zmiany profili związków wykazujących aktywność przeciwutleniającą ... 110
3.5.4. Wpływ ogrzewania soków otrzymanych z owoców aronii za pomocą urządzenia *EnbioJet* na przemiany profili związków wykazujących aktywność przeciwutleniającą ... 112
3.6. Żywotność naturalnej mikroflory soków otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego po obróbce termicznej za pomocą sterylizatora kompaktowego EnbioJet ... 114
3.7. Ocena próbek owoców aronii i wiciokrzewu sinego pod względem wybranych właściwości biologicznych w warunkach in vitro ... 116
3.7.1. Oznaczanie cytotoksyczności wybranych próbek owoców aronii i wiciokrzewu sinego w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 ... 116

3.7.2. Oznaczanie genotoksyczności wybranych próbek owoców aronii i wiciokrzewu sinego w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 119
3.7.3. Ochrona ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 poddanych stresowi oksydacyjnemu przez wybrane próbki owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego 126
3.8. Określenie wpływu zawartości bioaktywnych fitozwiązków na potencjał przeciwutleniający próbek owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego 130

IV PODSUMOWANIE 134

V STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM 138

VI STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM 140

VI LITERATURA 141

VII DOROBEK NAUKOWY 153

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

akronim/skrót	pełna nazwa	
	termin w języku angielskim	termin w języku polskim
A	*absorbtion*	absorbancja
ABTS	*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*	2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)
BER	*base excision repair*	naprawa przez wycinanie zasady
DAD	*diode array detector*	detektor z matryca fotodiodową
DET	*Direct Energy Transfer*	bezpośredni transfer energii
DNA	*deoxyribonucleic acid*	kwas deoksyrybonukleinowy
DPPH	*2,2'-diphenylo-1-picrylhydrazyl*	2,2'-difenylo-1-pirylohydrazyl
F-C	*Folin-Ciocalteu*	Folin-Ciocalteu
FPG	*formamidopyrimidine-DNA-glycosylase*	formamidopirymidyno-DNA-glikozylaza
ICAM	*intracellular adhesion molecule*	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna
ICAM-1	*intracellular adhesion molekule-1*	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1
IL	*interleukin*	interleukina
IL-6	*interleukin-6*	interleukina-6
8-izo $PGF_{2\alpha}$	*8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$*	8-izo-prostaglandyna $F_{2\alpha}$
HDL	*high density lipoproteins*	lipoproteiny wysokiej gęstości
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*	wysokosprawna chromatografia cieczowa
hsIL-6	*high-sensitivity interleukin-6*	wysokiej swoistości interleukina-6
hsCRP	*high-sensitivity C-reactive protein*	wysokiej czułości białko C-reaktywne
HUVEC	*human umbilical vein endothelial cells*	komórki śródbłonka naczyń żylnych ludzkiej pępowiny
LDL	*low density lipoproteins*	lipoproteiny niskiej gęstości
LMP	*low melting point*	niska temperatura topnienia
MCP	*monocyte chemotactic protein*	białko chemotaksji monocytów
MCP-1	*monocyte chemotactic protein-1*	białko chemotaksji monocytów-1
m.m.	*wet weight (w.w.)*	mokra masa
NMP	*normal melting point*	standardowa temperatura topnienia
OLD	*total bacteria count (TBC)*	ogólna liczba drobnoustrojów
ox-LDL	*oxidized low-density lipoprotein*	utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości
PBS	*phosphate buffered saline*	bufor fosforanowy
RFT	*reactive oxygen species (ROS)*	reaktywne formy tlenu
RNS	*reactive nitrogen species*	reaktywne formy azotu
SCE	*sister chromatyd exchanges*	wymiany chromatyd siostrzanych
SD	*standard deviation*	odchylenie standardowe
s.m.	*dry weight (d.w.)*	sucha masa
TEAC	*Trolox equivalent antioxidant capacity*	zdolność przeciwutleniająca wyrażona w równoważnikach Troloxu
TK6	*human lymphoblastoid cell line*	linia ludzkich komórek limfoblastycznych
TLC	*thin layer chromatography*	chromatografia cienkowarstwowa
TNF-α	*tumor necrosis factor α*	czynnik nekrozy nowotworów α
UVA	*ultrafiolet radiation A*	promieniowanie ultrafiletowe A
UVB	*ultrafiolet radiation B*	promieniowanie ultrafiletowe B
VCAM	*vascular cell adhesion molecule*	cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych
VCAM-1	*vascular cell adhesion molecule-1*	cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych-1
WCRF/AICR	*World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research*	Światowy Fundusz Badań nad Rakiem / Amerykański Instytut Badań nad Rakiem
$x_{śr.}$	*mean*	wartość średnia

I CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wpływ sposobu odżywiania na zapobieganie chorobom cywilizacyjnym

Wraz ze wzrostem liczby ludności na świecie zwiększa się również zapotrzebowanie na produkty spożywcze. Specjaliści z zakresu żywności i żywienia dokładają wszelkich starań, by polepszyć wydajność upraw roślin jadalnych i przez to też uzyskać większą ilość artykułów spożywczych. Niestety wzrost zapotrzebowania na produkty żywnościowe i rozwój przemysłu spożywczego nie przekłada się na poprawę jakości wytwarzanej żywności.

Problemem społecznym zarówno w Polsce, jak i na świecie, stały się choroby układu krążenia oraz nowotworowe. Ich występowanie związane jest z nieodpowiednim stylem życia, a w szczególności z nieprawidłowym sposobem odżywiania. Wzrasta liczba osób borykających się z otyłością czy nadwagą – dolegliwościami, które mogą prowadzić m.in. do występowania chorób sercowo-naczyniowych. Ponadto szacuje się, że czynniki żywieniowe są przyczyną około 30 % przypadków nowotworów [1].

W świetle powyższych informacji bardzo istotne staje się przestrzeganie odpowiednio zbilansowanej diety dostarczającej organizmowi niezbędnych składników, zarówno odżywczych, jak i nieodżywczych, zapewniających jego prawidłowe funkcjonowanie. Należy jednak podkreślić, że obecnie odchodzi się od podawania dużych dawek witamin oraz suplementów diety wzbogaconych w celowo dodawane bioaktywne fitozwiązki. Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach nie potwierdziły korzyści płynących z takiego postępowania. Również konsumenci wydają się tracić zainteresowanie żywnością o działaniu leczniczym (ang. *medicalized foods*). Zatem, właściwa dieta, bogata w owoce i warzywa, mogłaby wpłynąć na zmniejszenie niebezpieczeństwa wystąpienia wielu chorób, ale także przyczynić się do zmniejszenia liczby zgonów [2].

Na to, że właściwe zaprojektowanie diety może być bardzo skutecznym sposobem ograniczenia zagrożeń zdrowotnych wskazuje spadająca zachorowalność na choroby układu krążenia obserwowana w krajach rozwiniętych. W wyniku równoczesnego wprowadzenia odpowiedniej profilaktyki oraz szczegółowych rekomendacji żywieniowych uzyskano wymierny spadek zagrożenia. Przykładem mogą być wyniki badań, którymi objęto mężczyzn i kobiety poniżej 85 roku życia. W 1975 roku amerykańscy naukowcy odnotowali 320 zgonów wywołanych przez te choroby wśród 100 000 badanych osób, natomiast 24 lata później śmiertelność z tego powodu spadła do 180 na 100 000 osób [3]. Wiadomo, że u podłoża wielu chorób, w tym też chorób układu sercowo-naczyniowego, mogą leżeć

reaktywne formy tlenu (RFT). Zatem, obserwacje tych naukowców przyczyniły się do poszukiwania nowych składników diety – roślin o wysokiej aktywności przeciwutleniającej. Pojawił się nawet nowy termin „*superowoce*" (od anglojęzycznego terminu „*superfruits*") odnoszący się do owoców zawierających w swym składzie związki charakteryzujące się wysoką aktywnością przeciwutleniającą, mniej istotne natomiast są walory smakowe. „*Superowoce*" zdominowały rynek spożywczy w Stanach Zjednoczonych. Ich popularność nieustannie wzrasta także w Europie [4].

Do związków występujących w „*superowocach*" i jednocześnie chroniących organizm przed działaniem RFT zaliczane są m.in. flawonoidy. Wykazują one również szereg innych korzystnych właściwości, w tym aktywność przeciwzapalną, przeciwwirusową, zdolność modulacji aktywności enzymów, które powodują, że owoce o ich wysokiej zawartości są cennymi prozdrowotnymi składnikami żywności [4].

W ostatnim czasie fitozwiązki zaczęto określać mianem „*fitamin*" lub inaczej „witamin nowego Millenium". Do najważniejszych „*fitamin*" zaliczane są polifenole [5].

W Polsce również prowadzone są badania mające na celu wyłonienie fitozwiązków o wysokiej aktywności przeciwutleniającej. Najszerzej zostały one przebadane w ramach projektu pt. „Weryfikacja zasad technologii wytwarzania i wykorzystania żywności bogatej w naturalne antyoksydanty pod względem jej działania prozdrowotnego" koordynowanego przez W. Grajka z Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Członkowie interdyscyplinarnego zespołu badawczego z Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej także prowadzą badania potencjału przeciwutleniającego roślin jadalnych (np. kapusty białej, owoców jagodowych) oraz identyfikacji obecnych w nich polifenoli odpowiedzialnych m.in. za unieszkodliwianie RFT.

Warto wspomnieć, że usuwanie wolnych rodników przez składniki diety ważne jest nie tylko z punktu widzenia profilaktyki, lecz odgrywa również istotną rolę w trakcie leczenia wielu chorób. Przykładowo, przeciwutleniacze mogą przyczyniać się do łagodzenia skutków ubocznych działania leków podczas chemioterapii przeciwnowotworowej poprzez ochronny wpływ w stosunku do mięśnia sercowego [6].

Istnieje wiele doniesień literaturowych wskazujących, że do roślin bogatych w fitaminy i tym samym o bardzo korzystnych właściwościach, należą cieszące się rosnącą popularnością w Polsce i na świecie owoce aronii (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), zaliczane do owoców jagodowych. Swoją aktywność biologiczną zawdzięczają one w dużym stopniu obecności związków znanych jako „antocyjany" zaliczanych do polifenoli. Owoce te charakteryzują się dużym potencjałem przeciwutleniającym, co wpłynęło na wzrost

zainteresowania nimi ze strony przemysłu spożywczego [5]. Z powyższych względów możnaby określić je mianem „*superowoców*”. Innymi owocami jagodowymi, bogatymi w polifenole są owoce wiciokrzewu sinego (*Lonicera caerulea* L.) [7]. Wiciokrzew nie jest rośliną uprawianą na szeroką skalę, niemniej jednak jego owoce stają się coraz bardziej popularnym surowcem poszukiwanym przez konsumentów. Wysoka zawartość antocyjanów powoduje, że owoce wiciokrzewu mogą się także stać istotne z punktu widzenia zdrowotnego, tym bardziej ich uprawa jest warta rozpropagowania wśród rolników i producentów żywności.

Właściwości owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego szerzej opisano w kolejnych rozdziałach.

2. Owoce jagodowe

W terminologii botanicznej za jagodę uważa się mięsisty owoc zawierający wewnątrz nasiona (rzadko jedno nasiono). Powstaje on z jednej zalążni. Jego cechą charakterystyczną jest to, że nie posiada pestki. Podstawowe informacje o takich owocach przedstawiono w tabeli I 1.

Tabela I 1. Przykłady roślin, których owoce należą pod względem botanicznym do owoców jagodowych.

nazwa zwyczajowa	gatunek	wygląd
czarna porzeczka (ang. *blackcurrant*)	*Ribes nigrum* L.	
czerwnona porzeczka (ang. *red currant*)	*Ribes rubrum* L.	
biała porzeczka (ang. *white currant*)	*Ribes glandulosum*	

Tabela I 1. c.d.

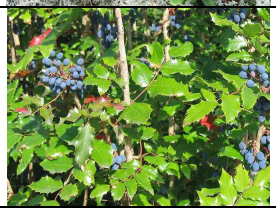
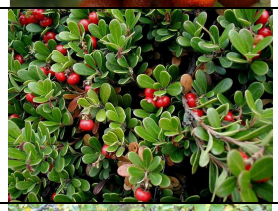
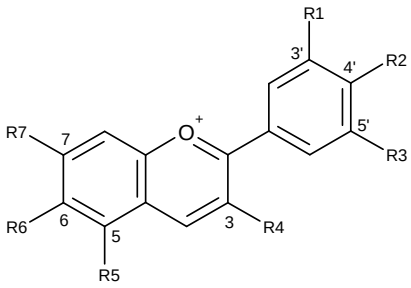
borówka czarna (ang. *Blueberry*)	*Vaccinium myrtillus* L.	
agrest (ang. *Gooseberry*)	*Ribes uva-crispa* L.	
czarny bez (ang. *Elderberry*)	*Sambucus nigra* L.	
winorośl właściwa (ang. *Grape-vine*)	*Vitis vinifera* L.	
aronia czarnoowocowa (ang. *Aronia*)	*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott	
wiciokrzew siny (ang. *Blueberry honeysuckle / sweetberry honeysuckle*)	*Lonicera caerulea* L.	
borówka brusznica (ang. *Lingonberry / cowberry*)	*Vaccinium vitis-idaea* L.	
mahonia ostrolista (ang. *Oregon-grape*)	*Mahonia aquifolium*	

Tabela I 1. c.d.

rokitnik zwyczajny (ang. *sea-buckthorn*)	*Hippophae rhamnoides*	
mącznica lekarska (ang. *bearberry*)	*Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng	
bażyna czarna (ang. *black crowberry*)	*Empatrum nigrum* L.	
chruścina jagodna (ang. *strawberry tree*)	*Arbutus unedo* L.	
pomidor (ang. *tomato*)	*Solanum lycopersicum* L.	

Charakterystyczną cechą wielu owoców jagodowych jest ich intensywna barwa (np. czerwona, niebieska, czarna), za której występowanie odpowiedzialne są fitozwiązki z grupy antocyjanów.

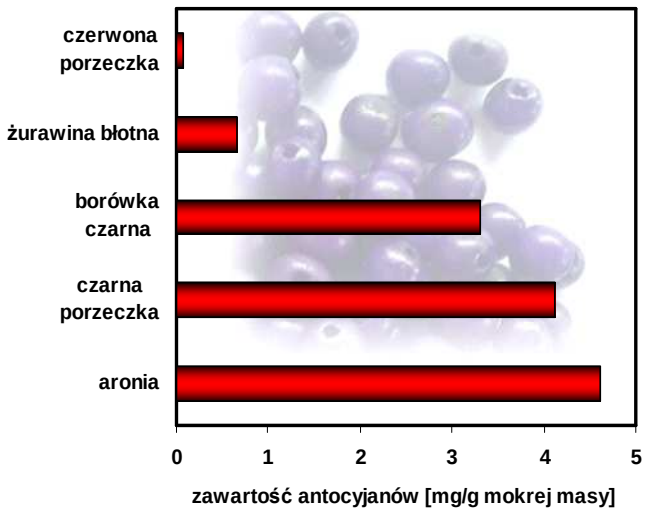
Antocyjany (rysunek I 1) to związki z grupy barwników (o kolorze czerwonym, purpurowym lub niebieskim), które występują w kwiatach, owocach, warzywach i ziarnach. Są one substancjami zawierającymi w swej strukturze cukier, zaś ich aglikony noszą nazwę antocyjanidyn. Do najbardziej znanych antocyjanidyn należą: pelargonina, cyjanidyna, peonidyna, delfinidyna, petunidyna, malwidyna. Związki te różnią się między sobą rodzajem cukrów występujących w ich strukturze (w pozycjach 3 i 5). Najbardziej znaną substancją spośród omawianych związków jest cyjanidyno-3-glukozyd, zawierający w swej strukturze glukozę w pozycji 3. Różnorodność tych substancji zwiększa się po uwzględnieniu możliwych kombinacji chemicznych cukrów z kwasami organicznymi (np. octowym, bursztynowym). Antocyjany mogą również występować w formie polimerów [8].



Rysunek I 1. Struktury chemiczne antocyjanidyn najczęściej występujących w roślinach.

antocyjanidyna	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
cyjanidyna	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
pelargonina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
peonidyna	$-OCH_3$	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
delfinidyna	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
petunidyna	$-OCH_3$	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
malwidyna	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-OH	-OH	-H	-OH

Antocyjany wystepują w stosunkowo dużych ilościach m.in. w owocach aronii, borówki czarnej, wiciokrzewu sinego, czarnej porzeczki. Informacje o zawartości tych związków w niektórych owocach roślin jagodowych przedstawiono na rysunku I 2.



Rysunek I 2. Zawartość antocyjanów w wybranych, świeżych owocach roślin jagodowych [9].

Antocyjany zaliczane są do związków naturalnych, które pomagają chronić organizm człowieka przed rozwojem różnych chorób. Substancje te wykazują szereg aktywności

biologicznych, niemniej jednak jedną z ich ważniejszych działań prozdrowotnych jest zapobieganie powstawaniu chorób układu krążenia. Przykładowo, dzięki silnym właściwościom przeciwutleniającym, barwniki te mogą przyczyniać się do zmniejszenia stężenia utlenionego cholesterolu – LDL (działanie przeciwmiażdżycowe). Poza tym wykazują one zdolność hamowania powstawania wolnych rodników w procesie reperfuzji oraz mogą wpływać na obniżenie ciśnienia krwi [10]. Właściwości ochronne tych fitozwiązków w stosunku do układu sercowo-naczyniowego omówiono szerzej (na przykładzie antocyjanów obecnych w owocach aronii) w rozdziale 3.1.

Antocyjany są bardzo cennym składnikiem diety, który może również przyczyniać się do przeciwdziałania powstawaniu nowotworów [11]. Informacje o stwierdzonym efekcie hamowania wzrostu ludzkich komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*, dotyczące cyjanidyn, zestawiono w tabeli I 2.

Tabela I 2. Informacje o stwierdzonym efekcie zahamowania wzrostu ludzkich linii komórek nowotworowych przez wybrane antocyjany.

związek	rodzaj komórek	literatura
cyjanidyny	U937 – linia komórek ludzkiej białaczki monocytarnej	[12]
	HT-29 – linia komórek ludzkiego raka jelita grubego	[13], [14]
	HCT-116 – linia komórek ludzkiego raka jelita grubego	[13], [15]
	LXFL529L – linia komórek ludzkiego raka płuc	[16]
	A431 – linia komórek ludzkiego raka łuskowatokomórkowego	[16]
	MCF-7 – linia komórek ludzkiego raka sutka	[17]
	HL60 – linia komórek ludzkiej białaczki promielocytarnej	[13]
cyjanidyno-3-galaktozyd	LXFL529L – linia komórek ludzkiego raka płuc	[16]
	A431 – linia komórek ludzkiego raka łuskowatokomórkowego	[16]
cyjanidyno-3-glukozyd	HT-29 – linia komórek ludzkiego raka jelita grubego	[18]
	MCF-7 linia komórek ludzkiego raka sutka	[18]
	HL60 – linia komórek ludzkiej białaczki promielocytarnej	[19]

Ponadto antocyjany mogą ingerować w komórkowe szlaki biochemiczne prowadzące do powstawania nowotworów [11]. W tabeli I 3 zestawiono informacje o mechanizmach działania tych związków na przykładzie cyjanidyn, które mogą mieć istotne znaczenie w chemoprewencji nowotworowej.

Ponadto antocyjany mogą wykazywać takie właściwości, jak:

- aktywność przeciwzapalna,
- zmniejszanie zagrożenia chorobami metabolicznymi (np. cukrzycą, otyłością),
- działanie ochronne przed chorobami neurodegeneracyjnymi,

- wpływ na poprawę ostrości wzroku [20],
- aktywność przeciwbakteryjna,
- ochrona komórek wątroby przed żółtaczką A i B oraz przed zatruciem wywołanym przez paracetamol,
- łagodzenie zmian chorobowych trzustki oraz wywołanych nimi objawów klinicznych,
- działanie ochronne przed skutkami promieniowania UV [10].

Tabela I 3. Przykłady mechanizmów działania wybranych antocyjanów, istotnych z punktu widzenia profilaktyki przeciwnowotworowej.

związek	rodzaj komórek	mechanizm działania	literatura
cyjanidyny	HL60	indukcja apoptozy	[21]
	A431	hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej EGFR	[16]
	HT-29	hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej EGFR	[14]
	U937	hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, indukcja apoptozy	[12]
	błona komórkowa króliczych erytrocytów	aktywność przeciwutleniająca	[22]
cyjanidyno-3-glukozyd	HL60	indukcja apoptozy, hamowanie bcl-2	[19]

A431 – linia komórek ludzkiego raka łuskowatokomórkowego; HT-29 – linia komórek ludzkiego raka jelita grubego; HL60 – linia komórek ludzkiej białaczki promielocytarnej; U937 – linia komórek ludzkiej białaczki monocytarnej; EGFR – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu; bcl-2 – białko hamujące proces apoptozy

Właściwości prozdrowotne antocyjanów omówiono bardziej szczegółowo na przykładzie owoców aronii czarnoowocowej oraz wiciokrzewu sinego odpowiednio w rozdziałach I 3.1 oraz I 4.1.

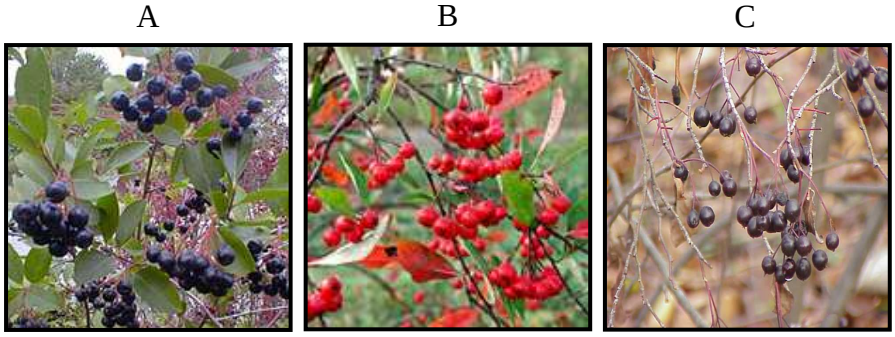
3. Aronia czarnoowocowa – opis botaniczny, zawartość związków bioaktywnych

Aronia należąca do rodziny różowatych (*Rosaceae*) to krzew pochodzący z Ameryki Północnej. Pod względem botanicznym do roślin z rodzaju aronia zalicza się dwa gatunki, a mianowicie:

- aronię czarnoowocową (*Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliot),
- aronię czerwoną (*Aronia arbutifolia* [L.] Pers).

Roślinę o łacińskiej nazwie *Aronia prunifolia* klasyfikuje się jako trzeci gatunek lub też jako hybrydę powstałą z dwóch pozostałych roślin [23]. Wygląd owoców tych gatunków przedstawiono na rysunku I 4.

W XX wieku uprawa roślin z gatunku *Aronia melanocarpa* [Michx.] E. stała się popularna w Rosji oraz w krajach Europy Wschodniej [24], w tym również w Polsce [25]. Obecnie jest ona najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem na wszystkich plantacjach aronii [24]. (Dalsza część rozprawy doktorskiej, dotycząca owoców aronii, odnosić się będzie tylko do rośliny z gatunku *Aronia melanocarpa* [Michx.] E. i dlatego będzie ona nazywana krótko – aronią.)



Rysunek I 4. Wygląd owoców roślin z rodzaju aronia: A - *Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliot, B - *Aronia arbutifolia* [L.] Pers, C - *Aronia prunifolia*.

Aronia jest krzewem osiągającym wysokość od 2 do 3 metrów. Jest rośliną bardzo odporną na choroby, a także rzadko atakowaną przez szkodniki [24]. Jej ciemnozielone liście o długości 3 – 7 cm ułożone są naprzemianlegle [23]. Kwiaty tej rośliny kwitną od maja do czerwca. Czas zbioru owoców aronii o czarnej barwie (o średnicy 6 – 13 mm i wadze 0,5 – 2 g) przypada na miesiąc sierpień lub wrzesień [24]. Owoce aronii stanowią doskonały surowiec wykorzystywany do produkcji soków, dżemów, win. Ze względu na swój charakterystyczny, cierpki smak często stanowią, obok innych owoców, jeden ze składników gotowych wyrobów spożywczych. Owoce aronii sa również stosowane jako źródło naturalnych barwników w przemyśle spożywczym [23].

Według danych opublikowanych przez Główny Urząd Satystyczny plantacje aronii w Polsce zajmują powierzchnię ponad 6 tys. ha. Rocznie otrzymuje się z nich od 35 tys. do 40 tys. ton owoców, z czego 90 % zbiorów przeznaczone jest na eksport. Taka sytuacja sprawia, że Polska jest największym eksporterem owoców aronii na świecie.

Przez ostatnie kilkanaście lat jej owoce oraz znajdujące się w nich składniki bioaktywne stały się przedmiotem badań w wielu ośrodkach naukowych zarówno na świecie, jak również w Polsce. Ich wyniki dowiodły, że aronia stanowi jedno z najbogatszych źródeł polifenoli, z których ponad połowa to antocyjany [26]. Do najważniejszych związków z grupy antocyjanów zidentyfikowanych w owocach aronii, należą [27]:

- cyjanidyno-3-galaktozyd,
- cyjanidyno-3-arabinozyd,
- cyjanidyno-3-ksylozyd,
- cyjanidyno-3-glukozyd,
- pelargonidyno-3-arabinozyd,
- pelargonidyno-3-galaktozyd.

Do pozostałych, głównych polifenoli znajdujących się w tych owocach można zaliczyć następujące związki [28]:

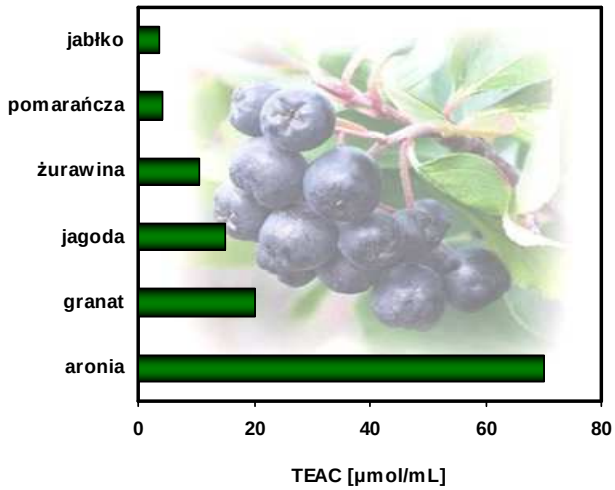
1. procyjanidyny,
2. flawonole:
   - kwercetyno-3-galaktozyd,
   - kwercetyno-3-glukozyd,
   - kwercetyno-3-rutynozyd i inne pochodne kwercetyny,
3. flawan-3-ole:
   - (-)-epikatechina,
4. kwasy fenolowe:
   - kwas chlorogenowy,
   - kwas neochlorogenowy.

Owoce aronii są również źródłem witamin takich, jak: witamina C, B1, B2, B6, niacyna, kwas pantotenowy, a także makroelementów: sodu, potasu, wapnia, magnezu, oraz mikroelementów: żelaza i cynku [29].

Ze względu na charakterystyczny skład fitozwiązków, jak również znaczne stężenie tych substancji (zwłaszcza antocyjanów), owoce aronii charakteryzują się bardzo silnymi właściwościami przeciwutleniającymi w porównaniu do innych owoców. Porównanie całkowitego potencjału przeciwutleniającego próbek kilku soków uzyskanych z różnych owoców przedstawiono na rysunku I 5.

Aronia, wyróżniająca się dużą zawartością antocyjanów w porównaniu do innych owoców dostępnych handlowo, a także charakteryzująca się wysokim potencjałem

przeciwutleniającym, wydaje się być doskonałym składnikiem diety, który może wpływać na zmniejszenie ryzyka powstawania wielu chorób, np. chorób układu krążenia czy nowotworów [24].

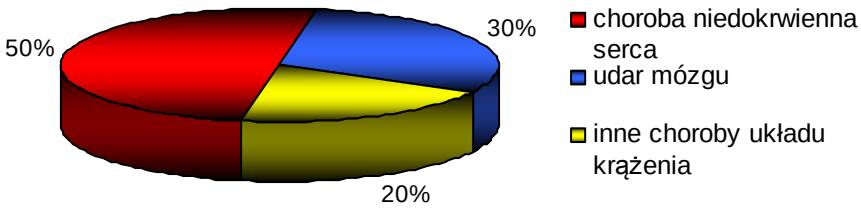


Rysunek I 5. Właściwości przeciwutleniające wybranych soków owocowych.
Wartości wyrażono jako stężenie równoważników Troloxu (TEAC) na mililitr soku [µmol/mL] [24].

3.1. Właściwości biologiczne owoców aronii czarnoowocowej

3.1.1. Epidemiologia i profilaktyka chorób układu krążenia

Choroby sercowo-naczyniowe są główną przyczyną zgonów na świecie, w tym również w Polsce [30]. Szacuje się, że w Europie są one odpowiedzialne za 55 % zgonów wśród kobiet oraz za 43 % zgonów wśród mężczyzn. Spośród wszystkich chorób układu krążenia najczęstszą przyczyną zgonów w Europie jest choroba niedokrwienna serca (rysunek I 6).



Rysunek I 6. Procentowy udział zgonów wywołanych chorobami układu krążenia w Europie w ogólnej liczbie zgonów [31].

Choroby układu krążenia są przyczyną niepełnosprawności i pogorszenia jakości życia. Głównymi czynnikami decydującymi o powstaniu tych chorób są [32]:

- palenie tytoniu,
- podwyższone ciśnienie krwi,
- podwyższony poziom cholesterolu we krwi,
- złe nawyki żywieniowe i nadmierne spożycie alkoholu,
- brak aktywności fizycznej,
- nadwaga i otyłość,
- cukrzyca,
- stres psychospołeczny.

Bezpośrednią przyczyną rozwoju chorób sercowo-naczyniowych może być podwyższony poziom RFT i RNS (reaktywnych form azotu), zmniejszona biodostępność tlenku azotu (odpowiadającego za obniżenie ciśnienia krwi), jak również obniżona zdolność biomolekuł do usuwania wolnych rodników w układzie krwionośnym i nerkach [33].

Głównymi metodami leczenia chorób układu krążenia są tzw. metody zachowawcze, do których zalicza się przede wszystkim farmakoterapię za pomocą różnych klas leków. Przykładowo, w przypadku miażdżycy naczyń krwionośnych stosuje się najczęściej leki z grupy statyn, np. lowastatynę, fluwastatynę, prawastatynę [34]. Jednak w ostatnich latach w przypadku leczenia chorób sercowo-naczyniowych podkreśla się znaczenie postępowania niefarmakologicznego, związanego np. z odpowiednim sposobem odżywiania. Co wiecej, kładzie się nacisk na profilaktykę, tzn. na przestrzeganie właściwego stylu życia, zbilansowanej diety, jak również na konieczność wykonywania ćwiczeń fizycznych. Jak wskazują liczne dane literaturowe, wzbogacenie diety w naturalne składniki takie, jak np. flawonoidy, kwasy tłuszczowe n-3, likopen, resweratrol może przyczynić się do przeciwdziałania chorobom układu krążenia [35, 36, 37, 38].

Poniżej opisano badania dotyczące wpływu polifenoli obecnych w owocach aronii na zapobieganie powstawaniu chorób układu krążenia oraz na łagodzenie skutków tych chorób. Doświadczenia podzielono na eksperymenty wykorzystujące materiał biologiczny pobrany od zwierząt, od ochotników ludzkich oraz badania z udziałem pacjentów dotkniętych chorobami sercowo-naczyniowymi.

3.1.1.1. Rola owoców aronii czarnoowocowej w profilaktyce chorób układu krążenia – badania z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od zwierząt

Doniesienia literaturowe wskazują, że owoce aronii mogą przeciwdziałać chorobom układu krążenia poprzez zapobieganie zmniejszeniu się tzw. relaksacji naczyń wieńcowych

(rozkurczu/rozszerzenia naczyń wieńcowych). Jak wiadomo, obniżenie rozkurczu może być wywołane m.in. podwyższonym poziomem RFT. Mając na uwadze powyższe dane, w opisanych doświadczeniach zbadano wpływ ekstraktu z owoców aronii na niwelowanie działania RFT w wyizolowanych naczyniach wieńcowych pochodzących od świń. Odpowiednio przygotowane naczynia wieńcowe zwierząt poddawano działaniu egzogennego źródła anionorodnika ponadtlenkowego. Tak przygotowane próbki traktowano również ekstraktem otrzymanym z owoców aronii. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że fitokompleks pochodzący z owoców aronii może ochraniać naczynia wieńcowe przed atakiem RFT, przez co może zapobiegać zmniejszeniu rozkurczu naczyń wieńcowych, a tym samym – chorobom układu krążenia [39].

Podczas badań z wykorzystaniem szczurów również wykazano, że polifenole obecne w owocach aronii mogą przyczyniać się do zapobiegania chorobom układu sercowo-naczyniowego. Działanie to może objawiać się poprzez:

- zmniejszenie poziomu cholesterolu całkowitego [40, 41, 42, 43],
- obniżenie stężenia cholesterolu LDL [41, 42],
- spadek zawartości triacylogliceroli we krwi [41, 42, 43].

3.1.1.2. Rola owoców aronii czarnoowocowej w profilaktyce chorób układu krążenia – badania w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od ludzi

Kilka lat temu zbadano wpływ bogatego w związki polifenolowe ekstraktu z aronii w postaci handlowo dostępnego preparatu pod nazwą *Aronox* (zawierającego w swym składzie ponad 20 % antocyjanów, w/w) na produkcję rodnika ponadtlenkowego oraz agregację płytek krwi u ludzi [44]. Badania te były podyktowane przesłankami, jakie pojawiły się w opublikowanych wcześniej czasopismach naukowych. Wskazywały one na to, że anionorodnik ponadtlenkowy produkowany przez płytki krwi odpowiada za ich aktywację i agregację, co z kolei może odgrywać istotną rolę w patogenezie miażdżycy naczyń krwionośnych [45].

Doświadczenia z wykorzystaniem preparatu *Aronox* przeprowadzono w warunkach *in vitro*. W trakcie tych badań od ochotników zdrowych oraz od ochotników obciążonych czynnikami, które mogły przyczyniać się do rozwoju miażdżycy, pobierano materiał badawczy w postaci próbek krwi. Następnie z próbek otrzymanych od obu grup izolowano płytki krwi, które inkubowano w obecności lub pod nieobecność preparatu *Aronox*, po czym

poddano je badaniom biomedycznym. Przeprowadzone badania wskazywały, że składniki ekstraktu otrzymanego na bazie owoców aronii przyczyniały się do zmniejszenia produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez płytki krwi u osób obciążonych ryzykiem wystąpienia chorób układu krążenia. Efektu tego nie zaobserwowano w przypadku grupy ochotników zdrowych. Ponadto, polifenole obecne w owocach aronii wpływały na zahamowanie agregacji płytek krwi w obu grupach osób objętych badaniami. Jak sugerują autorzy badań, także za ten ostatni efekt częściowo może być odpowiedzialne zahamowanie produkcji rodnika ponadtlenkowego w płytkach krwi. Otrzymane wyniki wskazują, że fitozwiązki zawarte w owocach aronii mogą skutecznie chronić organizm przed wystąpieniem miażdżycy naczyń krwionośnych [44].

Również inne z doniesień literaturowych pokazują, że polifenole obecne w owocach aronii mają znaczący wpływ na ochronę płytek krwi przed niekorzystnymi skutkami wywołanymi przez wolne rodniki tlenowe [46]. W trakcie tych badań od ochotników pobrano próbki krwi obwodowej, z której wyizolowano frakcje zawierające płytki krwi. Następnie frakcje te inkubowano z komercyjnie dostępnym ekstraktem *Aronox*, otrzymanym z owoców aronii (próbki określone jako kontrolne) albo z nadtlenkiem wodoru (jako źródłem wolnych rodników tlenowych), bądź też z ekstraktem z owoców aronii w połaczeniu z nadtlenkiem wodoru. Po inkubacji wykonano oznaczenia biochemiczne, sprowadzające się do ustalenia [46]:

- zawartości zredukowanej postaci glutationu (endogennego przeciwutleniacza) w płytkach krwi,
- stężenia izoprostanu 8-izo $PGF_{2\alpha}$, stanowiącego marker procesu peroksydacji lipidów i stresu oksydacyjnego,
- poziomu ekspresji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ (odpowiedzialnej za aktywację płytek krwi).

Dla porównania, te same oznaczenia biochemiczne przeprowadzono równolegle dla resweratrolu, którego korzystne właściwości biologiczne zostały szeroko opisane w literaturze światowej [47, 48, 49, 50, 51, 52].

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że fitokompleks owoców aronii może przyczyniać się do zmniejszenia produkcji izoprostanu 8-izo $PGF_{2\alpha}$, zarówno w próbkach kontrolnych, jak i tych traktowanych nadtlenkiem wodoru. Ponadto, zauważono znaczący wzrost poziomu zredukowanej formy glutationu w płytkach krwi poddanych działaniu RFT w kombinacji z ekstraktem z owoców aronii w porównaniu z płytkami krwi traktowanymi tylko nadtlenkiem wodoru. Co więcej, odnotowano również zahamowanie ekspresji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$. Interesującym jest również fakt, że polifenole obecne w ekstrakcie

z owoców aronii są zdolne do wywoływania znacznie bardziej korzystnych efektów biologicznych niż znany ze swych cennych, zdrowotnych właściwości resweratrol [46].

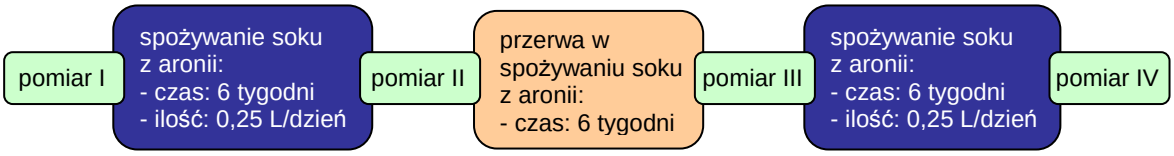
Składniki owoców aronii nie tylko przyczyniają się do ochrony struktur komórkowych przed działaniem RFT. Fitozwiązki te mogą również zabezpieczać komórki przed atakiem RNS, w tym także przed wysoce toksycznym nadtlenoazotynem ($ONOO^-$). Ten ochronny efekt wykazano w trakcie badań wykonanych w warunkach *in vitro*, wykorzystując w tym celu próbki krwi pobrane od zdrowych osób. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdziły, że polifenole zawarte w owocach aronii mogą ochraniać płytki krwi przed atakiem nadtlenoazotynu, a tym samym ograniczać zmiany w ich czynności hemostatycznej [53].

3.1.1.3. Rola owoców aronii czarnoowocowej w profilaktyce i terapii chorób układu krążenia u ochotników

Kilka lat temu podjęto próbę określenia wpływu polifenoli zawartych w soku z owoców aronii na kondycję układu krwionośnego osób, u których zdiagnozowano podwyższony poziom cholesterolu we krwi. W tym celu od pacjentów objętych badaniami i przyjmujących 100 % sok z owoców aronii, pochodzących z upraw ekologicznych (w dwóch okresach czasowych przez 6 tygodni każdy), pobierano krew na początku i na końcu każdego okresu przyjmowania soku. Następnie wykonano szereg oznaczeń biochemicznych obejmujących pomiary:

- ciśnienia krwi,
- stężenia cholesterolu,
- poziomu markerów stanu zapalnego,
- stężenia witamin o właściwościach przeciwutleniających.

Schemat doświadczenia przedstawiono na rysunku I 7.



Rysunek I 7. Schemat prowadzenia badań interwencyjnych z użyciem soku z aronii z udziałem pacjentów ze zdiagnozowanym podwyższonym poziomem cholesterolu we krwi [54].

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że regularne spożywanie soku otrzymanego z owoców aronii może przyczynić się do:

- obniżenia ciśnienia krwi,
- obniżenia całkowitego poziomu cholesterolu oraz cholesterolu LDL, jak również do podwyższenia stężenia cholesterolu HDL we krwi,
- wzrostu stężenia witaminy A oraz E we krwi,
- spadku ilości glukozy, homocysteiny (określanej jako czynnik ryzyka rozwoju m.in. zmian miażdżycowych) oraz fibrynogenu (którego podwyższony poziom obserwowany jest m.in. w ostrych stanach zapalnych i chorobie wieńcowej).

Te korzystne metaboliczne zmiany wynikające ze spożywania soku z owoców aronii mogą stanowić podstawę do tezy, że polifenole obecne w tych owocach stanowią doskonały fitokompleks przyczyniający się do zmniejszenia ryzyka występowania chorób układu krążenia [54].

Podobne wnioski wyciągnięto po przeprowadzeniu badań z udziałem pacjentów cierpiących na tzw. zespół metaboliczny [55]. Zespół ten określany jest jako zbiór wzajemnie powiązanych czynników zwiększających ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Obejmuje on kilka podstawowych objawów [56]:

- otyłość brzuszną,
- podwyższony poziom triacylogliceroli i cholesterolu LDL oraz obniżony poziom cholesterolu HDL
- podwyższone ciśnienie krwi,
- insulinooporność i nieprawidłowe przyswajanie glukozy,
- tendencję do występowania stanów zapalnych oraz do podwyższonego poziomu czynników krzepnięcia krwi (np. fibrynogenu).

W trakcie badań pacjentom z zespołem metabolicznym podawano antocyjany pochodzące z owoców aronii (3 razy w dawce 100 mg/dzień) przez 2 miesiące. Po przeprowadzeniu analiz okazało się, że podawany preparat może powodować m.in. do obniżenie ciśnienia krwi, spadek poziomu cholesterolu LDL i triacylogliceroli. Takie wyniki stanowiły podstawę do stwierdzenia, że antocyjany zawarte w owocach aronii przyczyniają się do zmniejszania wpływu czynników mogących prowadzić do rozwoju chorób układu krążenia, a w szczególności miażdżycy naczyń krwionośnych [55].

Dane literaturowe wskazują również na to, że połączenie terapii z użyciem statyn z przyjmowaniem ekstraktu z aronii przez pacjentów po przebytym zawale mięśnia sercowego

może zwiększać redukcję markerów wskazujących na dysfunkcję układu krążenia [57]. Przed przystąpieniem do badań pacjentów podzielono na dwie grupy. Jednej z nich podawano statyny (grupa traktowana jako kontrolna), zaś drugiej – lek w połączeniu z komercyjnie dostępnym produktem (preparat *Aronox*) zawierającym antocyjany pochodzące z owoców aronii (3 razy dziennie w dawce 85 mg/dzień) przez okres 6 miesięcy. Przed rozpoczęciem terapii oraz po jej zakończeniu od pacjentów pobierano krew, w której oznaczano zawartości ważniejszych markerów chorób układu krążenia [57]. Należały do nich wyróżniki procesów zapalnych [58], w tym:

- utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości (ox-LDL),
- interleukina-6 (hsIL-6),
- białko C-reaktywne (hsCRP),
- molekuły adhezji (ICAM oraz VCAM),
- białko chemotaksji monocytów (MCP-1) [57].

Oprócz tego we krwi oznaczono zawartość:

- izoprostanu 8-izo $PGF_{2\alpha}$ [57], którego podwyższone stężenie w organizmie świadczy o uszkodzeniach oksydacyjnych towarzyszących różnym chorobom, a w szczególności chorobom układu krążenia [59],
- adiponektyny [57] – białka hormonalnego odpowiedzialnego za regulację metabolizmu kwasów tłuszczowych i glukozy; wysoki poziom tego białka we krwi może przyczyniać się do zmniejszenia ryzyka zawału mięśnia sercowego [60].

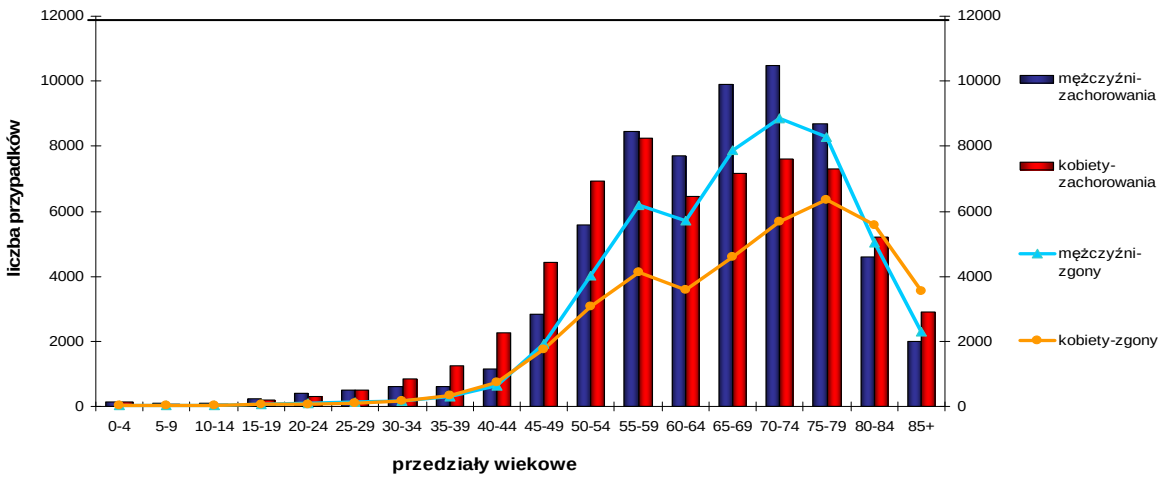
Pacjentom mierzono również ciśnienie krwi [57]. Po zakończeniu terapii z wykorzystaniem statyn, podawanych równolegle z preparatem *Aronox*, u ochotników objętych badaniami zaobserwowano znaczny spadek poziomu markerów procesów zapalnych (ox-LDL, hsIL-6, hsCRP, ICAM, VCAM, MCP-1), jak również izoprostanu 8-izo $PGF_{2\alpha}$ oraz wzrost stężenia adiponektyny. U osób tych odnotowano także obniżenie ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi. Tak korzystnych efektów nie zaobserwowano w grupie pacjentów, którym podawano tylko statyny. Wyniki tych badań dowodzą, że polifenole obecne w owocach aronii mogą chronić organizm przed wystąpieniem kolejnych schorzeń układu sercowo-naczyniowego po przebytym wcześniej zawale mięśnia sercowego [57].

3.1.2. Epidemiologia i profilaktyka chorób nowotworowych

Na początku XX wieku badania w zakresie nauk o żywności były ukierunkowane m.in. na identyfikację chorób, których przyczyną może być brak określonych składników

odżywczych w diecie człowieka, a co za tym idzie na możliwości zapobiegania tym chorobom. W późniejszym okresie naukowcy skupili swoją uwagę na ustaleniu zapotrzebowania na poszczególne składniki pokarmowe w prawidłowej diecie. Ostatnio natomiast kładzie się nacisk na określenie roli diety w utrzymaniu dobrego stanu zdrowia oraz w zmniejszaniu ryzyka powstawania takich chorób jak np. choroby nowotworowe [61].

Nowotwory należą do jednych z najistotniejszych problemów zdrowotnych na świecie, w tym także w Polsce. Nasz kraj należy do państw o średniej zachorowalności i wysokiej umieralności z powodu chorób nowotworowych. Według raportów sporządzonych na podstawie danych Centrum Onkologii w Warszawie ogólna liczba zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 roku wynosiła około 126000, zaś liczba zgonów ponad 91500, co stanowi ponad 72 % przypadków zarejestrowanych zachorowań. Na rysunku I 8 przedstawiono informacje o liczbie zachorowań oraz zgonów na nowotwory złośliwe w zależności od grupy wiekowej dla kobiet i mężczyzn w roku 2006 [62].



Rysunek I 8. Liczba zachorowań oraz zgonów na nowotwory złośliwe w podziale na grupy wiekowe dla mężczyzn i kobiet w Polsce w roku 2006 (na podstawie danych Centrum Onkologii w Warszawie) [62].

Przytoczone powyżej dane statystyczne są alarmujące i wskazują, że bardzo ważnym celem działań medycznych musi stać się nie tylko wykrycie choroby w jej wczesnym stadium rozwoju, ale również zapobieganie powstawaniu i rozwojowi chorób nowotworowych, czyli chemoprewencja. Według danych zawartych w raporcie WCRF/AICR istotną rolę w zakresie profilaktyki przeciwnowotworowej odgrywa właściwa dieta bogata w owoce i warzywa [63].

Szczególną rolę w tym zakresie pełnią składniki diety bogate w antocyjany. Jak już wspomniano, jednym z najbogatszych źródeł tych związków są owoce aronii. Ze względu na

wysoką zawartość antocyjanów owoce aronii stały się przedmiotem wielu prac badawczych. Wyniki badań prowadzonych przez kilkanaście lat dowodzą, że fitokompleks tych owoców wykazuje szereg korzystnych właściwości prozdrowotnych, w tym także aktywność przeciwrakotwórczą [26]. Poniżej zebrano opisane w literaturze informacje na temat aktywności chemoprewencyjnych owoców aronii czarnoowocowej w warunkach *in vitro*, *in vivo* oraz z udziałem ochotników.

3.1.2.1. Aktywność chemoprewencyjna owoców aronii czarnoowocowej w warunkach *in vitro*

Wyniki licznych badań wskazują, że przyczyną wielu chorób, w tym również chorób nowotworowych, może być atak RFT na ważne struktury komórkowe. Z tego względu istotna jest wiedza na temat niwelowania działania RFT przez związki o charakterze przeciwutleniaczy, będące składnikami owoców i warzyw. W literaturze światowej dostępnych jest wiele danych na temat właściwości przeciwutleniających antocyjanów, także tych bedących składnikami fitokompleksu owoców aronii. Wyniki badań z wykorzystaniem testów DPPH i ABTS wskazują, że aktywność przeciwutleniająca owoców aronii w przeliczeniu na równoważniki Troloxu może przekraczać 500 μmoli/g s.m. [28]. Ten wynik stanowi kolejne potwierdzenie dla opinii, że owoce aronii charakteryzują się jednym z najwyższych potencjałów przeciwutleniających spośród wszystkich przebadanych dotychczas owoców [24].

Powszechnie wiadomo, że naturalne związki o charakterze przeciwutleniaczy występujące w różnych składnikach diety muszą po spożyciu być wchłaniane do krwioobiegu, aby mogły oddziaływać na układ przeciwutleniający osocza krwi. Działanie to może się objawiać poprzez:

- neutralizowanie wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu, azotu i chloru,
- przerywanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych,
- chelatowanie jonów metali katalizujących reakcje redoksowe,
- hamowanie szybkości enzymatycznych reakcji redoksowych.

Te właściwości naturalnych przeciwutleniaczy są bardzo istotne z tego względu, że jednymi z głównych źródeł RFT w organizmie człowieka są pobudzone granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) występujące we krwi. Zwiększona produkcja RFT prowadzi do niepełnej detoksykacji tych indywiduów chemicznych przez systemy przeciwutleniające występujące w ustroju, co z kolei może skutkować inicjacją procesu kancerogenezy. Aby nie

doszło do takiej sytuacji, potencjalnie niebezpieczne granulocyty mogą przejść proces apoptozy, czyli fizjologicznej programowanej śmierci komórki. Kluczowymi enzymami w procesie apoptozy są kaspazy. Aktywność kaspazy 3 w badaniach wpływu soku z aronii na metabolizm tlenowy i apoptozę ludzkich granulocytów pochodzących od zdrowych ochotników posłużyła jako biomarker śmierci komórkowej. W tym samym cyklu doświadczeń sprawdzono wpływ soku z aronii na produkcję RFT. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że sok z aronii czarnoowocowej indukuje aktywność kaspazy 3 w granulocytach, a także przyczynia się do zahamowania produkcji RFT przez neutrofile. Otrzymane dane mogą stanowić jedno z kryteriów kwalifikujących te składniki żywności jako zalecane w chemoprewencji chorób nowotworowych [64].

Wyniki innych badań dowodzą, że antocyjany zawarte w owocach aronii hamują produkcję i uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego przez ludzkie granulocyty. Co więcej, wykorzystując test *Amesa*, wykazano, że antocyjany pochodzące z aronii są silnymi inhibtorami mutagennej aktywności benzo[*a*]pirenu należącego do grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Dodatkowo wykonano test wymiany chromatyd siostrzanych (SCE), stosowany powszechnie do wykrywania związków chemicznych o działaniu genotoksycznym [65]. W wyniku przeprowadzonego testu SCE z użyciem ludzkich limfocytów okazało się, że obecność antocyjanów pochodzących z owoców aronii może doprowadzić do zmniejszenia częstotliwości wymiany chromatyd siostrzanych pod wpływem benzo[*a*]pirenu. Doświadczenia te dowodzą, że antocyjany występujące w owocach aronii mogą wykazywać właściwości antymutagenne oraz antykancerogenne. Zdaniem autorów powyższych badań, tak korzystne właściwości tych związków wynikają głównie ze zdolności do niwelowania działania wolnych rodników, jak również do hamowania działania enzymów przyczyniających się do powstawania uszkodzeń DNA w obecności substancji mutagennych [65].

Także wyniki badań przeprowadzonych w innym ośrodku naukowym [66] potwierdziły tezę, że fitozwiązki obecne w owocach aronii mogą przyczyniać się do zmniejszenia produkcji anionorodnika ponadtlenkowego. W doświadczeniach tych inkubowano ekstrakt z owoców aronii z płytkami krwi wyizolowanymi od pacjentek chorujacych na nowotwór piersi oraz od kobiet zdrowych. Po przeprowadzeniu oznaczeń biochemicznych, okazało się, że poziom anionorodnika ponadtlenkowego zmniejszył się nie tylko w przypadku płytek krwi pochodzących od osób zdrowych, lecz także – pochodzących od pacjentek chorych. Przypuszczalnie, w opisywanym doświadczeniu właściwości przeciwutleniające polifenoli pochodzących z owoców aronii objawiają się zdolnością do

stymulacji aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, enzymu odpowiadającego za dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego [66].

Kolejnym sposobem zapobiegania rozwojowi choroby nowotworowej jest zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych. Przykładowo, w warunkach *in vitro* ekstrakt z aronii może hamować wzrost mysiej białaczki L1210 [67]. Kilka lat temu podjęto próby określenia wpływu soku z aronii na wzrost ludzkich komórek raka jelita grubego Caco-2. Komórki te poddano inkubacji z sokiem przez okres 2 godzin przez 4 kolejne dni. Takie traktowanie komórek Caco-2 sokiem z aronii skutecznie wpływało na hamowanie ich proliferacji. Jak udowodniono, było to spowodowane zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M, a tym samym uniemożliwieniem podziału komórek. Ponadto, poprzez analizę ekspresji genów wykryto zmiany w poziomie mRNA kodujących biomarkery typowe dla raka jelita oraz kodujących białka biorące udział w proliferacji komórek. Jednym z tych biomarkerów jest białko CEACAM1, którego ekspresja ulega zmniejszeniu we wczesnych stadiach większości chorób nowotworowych [68]. Potraktowanie komórek Caco-2 sokiem z aronii przyczynia się do przywrócenia prawidłowego poziomu tego biomarkera, jak i prawidłowego poziomu kodującego go mRNA. Wyniki powyższch badań świadczą, że białko CEACAM1 może być potencjalnym celem chemoprewencyjnego działania składników diety, w tym owoców aronii [68].

Inne doniesienia literaturowe wskazują, że ekstrakt otrzymany z owoców aronii hamował wzrost komórek linii raka jelita grubego HT-29. Zahamowanie proliferacji tych komórek było zmniejszone o 60 %. Ponadto w traktowanych nim komórkach następowało zablokowanie cyklu komórkowego nie tylko w fazie G2/M, lecz także w fazie G1/G0. Jednocześnie zauważono, że ekspresja niektórych genów kodujących białka regulujące procesy podziałów komórkowych uległa modyfikacji w kierunku inhibicji podziałów komórkowych. Dla porównania podobne doświadczenia przeprowadzono dla linii normalnych komórek jelita grubego NCM460. Okazało się, że ekstrakt z owoców aronii tylko w niewielkim stopniu hamował wzrost komórek nierasowych [69]. Nieznana jest przyczyna tak różnej podatności komórek raka jelita grubego oraz komórek nierakowych na zahamowanie proliferacji. Jednakże przypuszcza się, że rozbieżności te mogą być związane z różnicami w ekspresji wspomnianych genów pomiędzy tymi dwoma rodzajami linii komórkowych. Sugeruje się, że za tak korzystne aktywności biologiczne zastosowanego ekstraktu z owoców aronii odpowiedzialne są w dużej mierze antocyjany. Z tego względu produkty zawierające duże stężenie tych związków, zdaniem autorów, powinny stać się

oczywistą alternatywą dla sztucznych barwników stosowanych w przemyśle spożywczym [70].

Komórek ludzkiej linii raka jelita grubego (HT-29) użyto również do określenia wewnątrzkomórkowego oraz zewnątrzkomórkowego potencjału przeciwutleniającego owoców aronii z zastosowaniem testu kometowego. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że fitokompleks owoców aronii wykazuje bardzo słabą ochronę przeciwko wewnątrzkomórkowym oksydacyjnym uszkodzeniom DNA, co może wynikać z niskiej biodostepności antocyjanów. Niemniej jednak, w warunkach *in vitro* owoce te przyczyniają się do zmniejszania uszkodzeń DNA zaindukowanych w tych komórkach przez czynniki zewnętrzne, takie jak nadtlenek wodoru [71].

3.1.2.2. Aktywność przeciwrakotwórcza owoców aronii czarnoowocowej w trakcie badań *in vivo*

Mówiąc o właściwościach przeciwrakotwórczych składników diety należy pamiętać, że większe znaczenie niż badania w hodowlach komórkowych mają badania realizowane w warunkach *in vivo*. W przypadku fitokompleksu owoców aronii dostępne są wyniki dotyczące różnych aspektów kancerogenezy. Na przykład przy użyciu szczurów sprawdzono czy owoce te mogą być inhibitorem powstawania N-nitrozamin, związków o działaniu mutagennym i rakotwórczym, które mogą powstawać w przewodzie pokarmowym zwierząt i ludzi z niekancerogennych prekursorów – amin i azotanów(III). W omawianym modelu doświadczalnym jako prekursory endogennych N-nitrozamin u zwierząt zastosowano aminopirynę oraz azotan(III) sodu. Związki kancerogenne powstałe w organizmach szczurów z grupy kontrolnej przyczyniły się do wystąpienia zmian histopatologicznych obserwowanych w wątrobie zwierząt. U szczurów, którym jednocześnie podawano sok z aronii czarnoowocowej (przez 3 kolejne dni w dawce 1 mL/100 g masy ciała), nie stwierdzono uszkodzeń wątroby, co było wystarczającym dowodem na to, że badany sok ochrania komórki tego organu przed toksycznym wpływem N-nitrozamin [72].

Jak wspomniano wcześniej, jednymi z najlepiej poznanych właściwości owoców aronii jest ich duży potencjał przeciwutleniający. Jednakże właściwości te zostały szczegółowo opisane w literaturze dla testów *in vitro*, zaś dla warunków *in vivo* można znaleźć tylko nieliczne przykłady badań potwierdzających wysoką aktywność przeciwutleniającą fitokompleksu owoców aronii. Ale nawet te nieliczne dane wskazują, że składniki tych owoców mogą przyczyniać się do przywrócenia prawidłowego poziomu

glutationu, obniżonego wskutek próby wysiłkowej u szczurów. Także stwierdzony u tych samych zwierząt, poddanych intensywnym ćwiczeniom, wzrost peroksydacji lipidów został skutecznie zniwelowany w grupie szczurów otrzymujących ekstrakt z aronii w dawce 0,7 mg/kg masy ciała przez 4 kolejne dni [73, 74].

Okazało się, że ekstrakt z owoców aronii może odgrywać także ochronną rolę w stosunku do komórek jelita grubego u szczurów narażonych na działanie kancerogennego azoksymetanu. Chemoprewencyjne działanie substancji obecnych w owocach aronii uwidacznia się w tym przypadku m.in. poprzez niedopuszczanie do transformacji nowotworowej, hamowanie aktywności czynników odpowiedzialnych za stany zapalne, jak również poprzez działanie przeciwutleniające oraz zmniejszenie uszkodzeń wywoływanych przez RFT. Wyniki tych badań sugerują, że owoce aronii bogate w antocyjany mogą zajmować istotne miejsce wśród składników diety o działaniu przeciwrakotwórczym [75].

Kolejną pozycję potwierdzającą korzystne właściwości prozdrowotne antocyjanów jest publikacja naukowców z *John Innes Centre* w Wielkiej Brytanii [76]. Poprzez wprowadzenie genów kodujących enzymy odpowiedzialne za syntezę antocyjanów, pobranych z materiału genetycznego wyżlinu większego (*Antirrhinum majus*), uzyskali oni odmianę genetycznie zmodyfikowanego pomidora, bogatego w te naturalne barwniki. Osiągnięty poziom syntezy antocyjanów znacznie przewyższa nawet syntezę przeciwutleniaczy wytwarzanych naturalnie przez owoce pomidora, w tym też likopenu występującego w pomidorze w wysokich stężeniach. Kolejnym zadaniem było potwierdzenie właściwości prozdrowotnych uzyskanych pomidorów. W tym celu wykorzystano myszy szczepu C57B16, podatne na rozwój chorób nowotworowych (z brakiem aktywności genu supresji nowotworowej – *Trp53*$^{-/-}$). W doświadczeniach tych zwierzęta karmiono pomidorami zmodyfikowanymi (grupa właściwa myszy) oraz niezmodyfikowanymi (grupa kontrolna). Badania przeżyciowe pokazały, że obecność antocyjanów w pomidorach zmodyfikowanych genetycznie przyczyniła się do znacznego wydłużenia życia zwierząt w porównaniu do myszy karmionych niezmodyfikowanymi pomidorami. Kolejnym krokiem, jaki planują naukowcy, jest sprawdzenie wpływu „udoskonalonych" pomidorów na organizm człowieka [76].

3.1.2.3. Aktywność przeciwrakotwórcza owoców aronii czarnoowocowej u ochotników

W literaturze można znaleźć tylko nieliczne informacje na temat aktywności chemoprewencyjnej fitokompleksu owoców aronii u ludzi. Przykładem danych z tego zakresu są wyniki badań przeprowadzonych kilka lat temu z udziałem zdrowych ochotników pijących

sok będący mieszaniną soków z jabłek, mango, pomarańczy, aronii oraz jagód. Związkiem polifenolowym, którego zawartość w soku była w znaczącej przewadze w stosunku do innych substancji nieodżywczych, okazał się cyjanidyno-3-glukozyd – składnik owoców jagodowych. Po kilkutygodniowym okresie picia soku u ochotników zauważono szereg zmian fizjologicznych. Dotyczyły one m.in.:

- spadku stopnia peroksydacji lipidów,
- stymulacji mechanizmów odpowiedzialnych za unieszkodliwianie wolnych rodników,
- redukcji uszkodzeń DNA limfocytów,
- stymulacji funkcji immunologicznych komórek organizmu.

Zdaniem autorów badań trudno jest ocenić biologiczne znaczenie zachodzących zmian fizjologicznych. Niemniej jednak rodzaj obserwowanych aktywności jest uważany za istotny z punktu widzenia chemoprewencji nowotowrowej. Można zatem spekulować, że regularne spożywanie badanych soków, w tym także soku z aronii, mogłoby zmniejszyć ryzyko rozwoju chorób nowotworowych [77]. Z najświeższych danych literaturowych wynika, że wzbogacenie diety o sok z aronii może przeciwdziałać oksydatywnym uszkodzeniom erytrocytów, indukowanym przez intensywne ćwiczenia w grupie rowerzystów objętej badaniami [78].

Powyższe dane sugerują, że produkty żywnościowe uzyskane na bazie owoców aronii mogłyby stać się doskonałym składnikiem diety zalecanym w profilaktyce przeciwnowotworowej, jednakże należy w tym zakresie przeprowadzić szersze badania z udziałem ochotników.

3.1.3. Inne właściwości biologiczne owoców aronii czarnoowocowej

Oprócz aktywności związanych z działaniem przeciwrakotwórczym i kardioprotekcyjnym, fitozwiązki zawarte w owocach aronii charakteryzują szeregiem innych, korzystnych właściwości. Wykazano bowiem, że polifenole te mogą przyczyniać się do obniżenia poziomu glukozy we krwi, co jest bardzo istotne z punktu widzenia profilaktyki cukrzycy. Właściwość tę wykazano w kilku doświadczeniach przeprowadzonych z wykorzystaniem szczurów rasy *Wistar*, u których chorobę tę wywołano poprzez dootrzewnowe podanie streptozotocyny. Jak sugerują autorzy badań, łagodzenie objawów cukrzycy u tych zwierząt przypuszczalnie mogło być rezultatem wpływu fitokompleksu owoców aronii na [40, 79]:

- obniżenie aktywności maltazy w błonie śluzowej jelita cienkiego,

- stymulację wchłaniania glukozy,
- zwiększenie intensywności wydzielania insuliny,
- obniżenie poziomu stresu oksydacyjnego.

Analogiczne badania przeprowadzono z udziałem osób chorujących na insulinoniezależną postać cukrzycy. Spożywanie przez pacjentów soku z owoców aronii w ilości 200 mL przez okres 3 miesięcy okazało się być efektywnym sposobem obniżenia poziomu glukozy we krwi. Oznacza to, że fitozwiązki zawarte w owocach aronii mogą wspomagać terapię cukrzycy [80].

W ostatnich latach pojawiły się również doniesienia o tym, że owoce aronii mogą odgrywać pomocną rolę w leczeniu otyłości u ludzi [81].

Z kolei wyniki badań, podczas których indukowano uszkodzenia tkanki wątroby u szczurów za pomocą tetrachlorometanu [82] lub aminopirydyny i azotanu(III) sodu [72], albo kadmu [83], wykazały, że wzbogacenie diety tych zwierząt w polifenole obecne w owocach aronii zmniejsza histopatologiczne zmiany w komórkach wątroby[72, 82, 83].

Według innych doniesień literaturowych polifenole obecne w owocach aronii, a zwłaszcza antocyjany, mogą łagodzić skutki promieniowania jonizującego (gamma) u królików i myszy. To korzystne działanie fitozwiązków objawia się m.in. zmniejszeniem poziomu anionorodnika ponadtlenkowego oraz normalizacją liczby leukocytów [84]. Podobne, korzystne właściwości łagodzenia choroby popromiennej zaobserwowano również u szczurów [85, 86]. Ponadto udowodniono, że antocyjany pochodzące z owoców aronii aplikowane w postaci żelu mogą efektywnie chronić skórę szczurów przed dawkami promieniowania ultrafioletowego, znacznie przekraczającymi tzw. dawkę rumieniową [87]. Można zatem wnioskować, że produkty otrzymane na bazie tych owoców powinny być polecane osobom narażonym na niekorzystne czynniki ryzyka środowiskowego.

Podczas kolejnych eksperymentów z wykorzystaniem szczurów udowodniono, że wzbogacenie diety w składniki owoców aronii może przyczyniać się do zmniejszenia uszkodzeń błony śluzowej żołądka (owrzodzeń). Efekt ten świadczy o tym, że fitozwiązki obecne w tych owocach charakteryzują się właściwościami przeciwwrzodowymi [74, 88, 89].

Z innych prozdrowotnych właściwości warto wspomnieć, że składniki owoców aronii w warunkach *in vitro* wykazują aktywność bakteriostatyczną w stosunku do bakterii *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* oraz przeciwwirusową w stosunku do wirusa grypy typu A [26]. Ponadto fitokompleks owoców aronii w połączeniu z pektynami pochodzącymi z jabłek ma aktywność immunomodulacyjną. Właściwość tę wykazano podczas badań

przeprowadzonych z udziałem kobiet poddanych radioterapii po operacyjnym leczeniu raka piersi. Okazało się, że u tych kobiet, które przyjmowały koncentrat otrzymany z owoców aronii oraz pektyny otrzymane z jabłek, znacząco wzrósł poziom limfocytów T, co jest korzystnym efektem z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej [90]. Sugeruje się również, że antocyjany obecne w tych owocach mogą poprawiać ostrość wzroku oraz prawdopodobnie przyczyniają się do przeciwdziałania innym chorobom oczu [5].

Podsumowując, można stwierdzić, że owoce aronii są nieocenionym źródłem fitozwiązków, których korzystny i wielokierunkowy wpływ na organizm ludzki jest już w pewnym stopniu poznany. Niemniej jednak naukowcy zdają sobie sprawę z konieczności przeprowadzania dalszych, bardziej szczegółowych badań z udziałem ludzi.

4. Wiciokrzew siny – odmiany, opis botaniczny, zawartość związków bioaktywnych

Wiciokrzew siny (*Lonicera caerulea* L.), należący do rodziny przewiertniowatych (*Caprifoliaceae*), jest krzewem pochodzącym z północno-wschodniej Azji [7]. Bywa też nazywany suchodrzewem jadalnym lub suchodrzewem sinym. Rysunek I 9 przedstawia wygląd jego kwiatów oraz owoców.

W Polsce do najbardziej znanych odmian wiciokrzewu sinego należą [91]:

- *Lonicera caerulea* L. var. *edulis* Turcz. ex Herder – suchodrzew jadalny,
- *Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast. – suchodrzew kamczacki.

A B

Rysunek I 9. Wygląd kwiatów (A) oraz owoców (B) wiciokrzewu sinego.

Oprócz prawidłowej botanicznej nazwy (wiciokrzew siny) roślina ta nazywana jest popularnie jagodą kamczacką, bez rozróżnienia na krzewy pochodzące od suchodrzewu jadalnego czy kamczackiego. Do najbardziej znanych roślin z tego gatunku, które uprawiane są w Rosji, zaliczyć można odmiany o nazwach [91, 92, 93]:

- Dlinnopłodna,

- Czelabinka,
- Czerniczka,
- Izjuminka,
- Smolińska,
- Wołoszebnica,
- Sinigłaska.

W Polsce roślina ta uprawiana jest od niedawna. Niemniej jednak już wyselekcjonowano tu nowe odmiany wiciokrzewu sinego nadające się do zakładania plantacji. Do odmian, które wyprowadzono w naszym kraju należą [91, 93, 94]:

- „Wojtek” (odmiana nr 3),
- „Jolanta” (odmiana nr 2),
- „Brązowa” (odmiana nr 30),
- „Zielona” (odmiana nr 46),
- „Czarna”,
- „Atut”,
- „Duet”,
- „Warszawa”,
- odmiany o numerach 15, 38, 44.

Krzewy wiciokrzewu sinego wzrastają do około 1 – 3 m wysokości [95]. W przypadku tej rośliny istotny jest fakt, że może ona rosnąć na glebach niskiej klasy. Ponadto, jest odporna na mrozy i suszę [91]. Jej liście są ciemnozielone, drobne lub średniej wielkości, miękkie i mają wygięte blaszki. Okres kwitnienia wiciokrzewu sinego przypada na bardzo wczesną wiosnę [92], zaś owoce pojawiają się na przełomie maja i czerwca [91]. Owoce o kształcie walcowato – elipsoidalnym mogą osiągać długość do 30 mm i średnicę do 10 mm. Mają barwę granatową i pokryte są nalotem [92].

Owoce wiciokrzewu sinego są bogatym źródłem antocyjanów, a zwłaszcza cyjanidyno-3-glukozydu. W mniejszych ilościach obecne są w nich również inne związki polifenolowe [7]. Listę najważniejszych fitozwiązków obecnych w owocach wiciokrzewu sinego zestawiono w tabeli I 4. Owoce te są również źródłem witaminy C oraz występujących w mniejszych ilościach witamin z grupy B, a także makroelementów takich, jak: potas, fosfor, wapń, magnez [7].

Owoce wiciokrzewu sinego były do tej pory przedmiotem tylko nielicznych badań naukowych. Przyjmuje się, że swoje właściwości prozdrowotne, a w szczególności

przeciwutleniające, owoce te zawdzięczają m.in. wysokiej zawartości antocyjanów. Można zatem oczekiwać, że aktywności chemoprewencyjne, wykazywane przez te związki, będą również obserwowane w tym przypadku. Dzięki zdolności wychwytywania wolnych rodników owoce te mogą przeciwdziałać np. powstawaniu nowotworów czy chorobom serca [96]. Właściwości prozdrowotne wiciokrzewu sinego bardziej szczegółowo omówiono w kolejnym rozdziale (4.1).

Tabela I 4. Najważniejsze związki polifenolowe zidentyfikowane w owocach wiciokrzewu sinego [7].

GRUPA POLIFENOLI	ZIDENTYFIKOWANE ZWIĄZKI
antocyjany	**cyjanidyno-3-glukozyd**
	cyjanidyno-3,5-diglukozyd
	peonidyno-3,5-diglukozyd
	cyjanidyno-3-rutynozyd
	peonidyno-3-glukozyd
	pelargonidyno-3-glukozyd
	delfinidyno-3-rutynozyd
	delfinidyno-3-glukozyd
	pelargonidyno-3,5-diglukozyd
	peonidyno-3-rutynozyd
	pelargonidyno-3-rutynozyd
flawonole	kwercetyna
	kwercetyno-3-glukozyd
	kwercetyno-3-rutynozyd
flawan-3-ole	epikatchina
flawony	apigenina
kwasy fenolowe	**kwas chlorogenowy**
	kwas kawowy
	kwas ferulowy
	kwas gentyzynowy
	kwas rozmarynowy
	kwas wanilinowy
	kwas *m*-kumarowy i *p*-kumarowy

Podsumowując, należy podkreślić, że konsumpcja owoców wiciokrzewu sinego jest mało popularna w Europie. Jednakże, zainteresowanie tymi owocami wciąż wzrasta zarówno w ośrodkach naukowych, jak i wśród konsumentów. Sytuacja taka spowodowana jest nie tylko obecnością związków biologicznie aktywnych w tych owocach, ale również ich walorami smakowymi.

4.1. Właściwości biologiczne owoców wiciokrzewu sinego

Jak już wspomniano, wyniki badań ostatnich lat dowodzą, że owoce wiciokrzewu sinego, mogą być cennym źródłem związków (zwłaszcza antocyjanów) o działaniu prozdrowotnym [7]. Fitokompleks tych owoców charakteryzuje się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi [97]. Przykładowo, w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem mikrosomów pochodzących z wątroby szczurów oraz przy użyciu komórek śródbłonka naczyń żylnych ludzkiej pępowiny (HUVEC), które traktowano ekstraktem otrzymanym z owoców wiciokrzewu sinego, stwierdzono korzystne zmiany w wyróżnikach stresu oksydacyjnego (tabela I 5) [98].

Tabela I 5. Wpływ ekstraktu z owoców wiciokrzewu sinego na zmiany poziomu markerów stresu oksydacyjnego w mikrosomach wątroby szczurów oraz komórkach śródbłonka naczyń żylnych ludzkiej pępowiny [98].

MATERIAŁ BIOLOGICZNY	EFEKT OCHRONNY EKSTRAKTU Z OWOCÓW WICIOKRZEWU SINEGO
mikrosomy wątroby szczurów	zahamowanie peroksydacji mikrosomów
	zapobieganie utlenieniu frakcji cholesterolu LDL
komórki śródbłonka naczyń żylnych ludzkiej pępowiny	obniżenie poziomu dehydrogenazy mleczanowej (biorącej udział w peroksydacji lipidów)
	zapobieganie utlenieniu frakcji cholesterolu LDL
	spadek stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (produktów peroksydacji lipidów)

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują możliwość wykorzystania owoców wiciokrzewu w profilaktyce chorób o etiologii wolnorodnikowej [98]. Wykazano również, że fitozwiązki obecne w owocach wiciokrzewu sinego mogą pełnić rolę naturalnego czynnika przeciwdrobnoustrojowego w przypadku takich mikroorganizmów, jak:

- *Candida parapsilosis*,
- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Escherichia coli*,
- *Enterococcus faecalis*,
- *Streptococcus mutans*.

Powyższe dane mogą stanowić istotne informacje o potencjalnych możliwościach wykorzystania tych owoców zarówno w przemyśle spożywczym, jak i w medycynie [97].

Podobnie jak to ma miejsce w przypadku aronii, fitozwiązki zawarte w owocach wiciokrzewu sinego mogą przyczyniać się do złagodzenia ostrych stanów zapalnych oczu. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano szczury, u których zaindukowano stan zapalny naczyniówki oka, po czym dożylnie wstrzykiwano zwierzętom ekstrakt z owoców. Po okresie 24 godzin od momentu rozpoczęcia eksperymentu zwierzęta uśmiercono i z ich gałek ocznych pobrano ciecz wodnistą, w której oznaczono m.in. poziom tlenku azotu, czynnika nekrozy nowotworów α (TNF-α) i prostaglandyn, będących markerami stanu zapalnego. Analogiczne badania przeprowadzono dla linii komórkowej mysich makrofagów (RAW264.7). W komórkach tych wywołano stan zapalny i inkubowano je w obecności lub pod nieobecność ekstraktu z owoców wiciokrzewu sinego. Dla porównania komórki traktowano również roztworami najważniejszych związków z grupy polifenoli, występujących w tych owocach, a minowicie: cyjanidyno-3-glukozydu, cyjanidyno-3-rutynozydu i kwasu chlorogenowego. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń okazało się, że ekstrakt z owoców wiciokrzewu sinego przyczynia się do redukcji poziomu markerów stanu zapalnego zarówno w cieczy wodnistej gałek ocznych, jak i w komórkach mysich makrofagów. Co ciekawe, tego efektu praktycznie nie zaobserwowano w przypadku komórek traktowanych za pomocą roztworów związków polifenolowych (cyjanidyno-3-glukozydu, cyjanidyno-3-rutynozydu i kwasu chlorogenowego). Wyniki tych badań dowiodły, że działanie przeciwzapalne jest spowodowane nie przez wyizolowane fitozwiązki występujące w owocach wiciokrzewu sinego, lecz przez jego cały fitokompleks [99]. Podobnie, aktywność przeciwzapalną, obok właściwości przeciwutleniających polifenoli występujących w tych owocach, potwierdzono z użyciem jako modelu ludzkich fibroblastów dziąseł w warunkach *in vitro*. Jak sugerują autorzy badań, jest to informacja istotna z punktu widzenia profilaktyki chorób jamy ustnej o etiologii bakteryjnej [100].

Frakcja fenolowa pochodząca z owoców wiciokrzewu sinego może pełnić funkcję ochronną przeciwko promieniowaniu UVA [101] oraz UVB [110], co wykazano na przykładzie ludzkich keratynocytów HaCaT. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że polifenole obecne w tych owocach przyczyniają się do ochrony keratynocytów przed promieniowaniem UVA poprzez zahamowanie powstawania RFT, co skutkuje obniżeniem poziomu peroksydacji lipidów wewnątrz komórek oraz wzrostem stężenia zredukowanej formy glutationu [101]. Natomiast w wyniku przeprowadzenia

doświadczeń, w których ludzkie keratynocyty poddano działaniu promieniowania UVB zauważono, że fitozwiązki pochodzące z owoców wiciokrzewu sinego mają wpływ na [102]:

- redukcję stopnia uszkodzeń DNA,
- zmniejszenie aktywności kaspazy-3 oraz kaspazy-9 (enzymów odpowiedzialnych za stymulację czy hamowanie programowanej śmierci komórki – apoptozę),
- zahamowanie tworzenia RFT i RNS,
- częściowe zahamowanie ekspresji interleukiny IL-6 będącej czynnikiem antyapoptotycznym,
- ograniczenie proliferacji keratynocytów.

Rezultaty tych badań pokazują, że fitokompleks pochodzący z owoców wiciokrzewu jadalnego może ochraniać ludzkie keratynocyty przed szkodliwym promieniowaniem. Jednakże autorzy doświadczeń zdają sobie sprawę z tego, że powyższą tezę należy również udowodnić przeprowadzając kolejne eksperymenty w warunkach *in vivo* [102].

W wyniku badań ukierunkowanych na chemoprewencję nowotworową wykazano, że wodny ekstrakt z owoców wiciokrzewu sinego przyczynia się do zredukowania objętości guza nowotworowego podczas jego stadium wzrostu u szczurów [103]. W doświadczeniach tych podawanie zwierzętom ekstraktu z tych owoców przez 3 tygodnie przed domięśniową implantacją guza powodowało jego powiększenie. Taka sytuacja sugeruje, że fitozwiązki owoców wiciokrzewu sinego nie zapewniają długoterminowego efektu ochronnego. U zwierząt, którym podawanie ekstraktu z owoców rozpoczęto w momencie implantacji guza, również obserwowano nasilenie wzrostu. W tym przypadku jednak powiększenie jego objętości było mniejsze niż w grupie kontrolnej szczurów (nieotrzymującej ekstraktu z owoców). Przedłużenie czasu podawania ekstraktu skutkowało również indukcją przeciwrodnikowych mechanizmów obronnych w komórkach tkanki guza nowotworowego oraz, co zaskakujące, przyczyniało się do zwiększenia poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach tkanek otaczających go. Według autorów badań, spożywanie naturalnych składników diety takich, jak owoce wiciokrzewu sinego, może przyczynić się do zmniejszenia ryzyka powstawania nowotworów oraz do łagodzenia skutków ubocznych chemioterapii przeciwnowotworowej. Niemniej jednak, warto jest dokładniej rozważyć zarówno okres podawania, jak i ilość owoców tak, by podczas leczenia uniknąć nadmiernej produkcji RFT [103].

Istnieją przypuszczenia, że ze względu na charakterystyczną zawartość polifenoli (zwłaszcza antocyjanów), owoce wiciokrzewu sinego mogą stanowić nowy składnik diety o

właściwościach kardioprotekcyjnych, przeciwdziałających miażdżycy, nadciśnieniu, obniżających poziom glukozy we krwi, poprawiających ostrość widzenia [97]. Niemniej jednak istnieje potrzeba przeprowadzenia dogłębnych badań naukowych, aby możliwe było potwierdzenie i udokumentowanie powyższych przypuszczeń. Taka sytuacja stwarza duże pole do popisu nie tylko zespołom badawczym z różnych środowisk naukowych, ale również jednostkom z otoczenia gospodarczego. Owoce wiciokrzewu sinego, ze względu na swój skład fitozwiązków oraz walory smakowe, mogłyby stać się doskonałym surowcem wykorzystywanym do wyrobu nowych produktów spożywczych, docierających do konsumentów coraz bardziej skłonnych świadomie komponować zestaw spożywanych wyrobów.

5. Wpływ warunków przetwarzania roślin jadalnych na zawartość związków polifenolowych

Jak już wcześniej wspomniano, ogromne znaczenie w patologii wielu chorób, w tym chorób układu krążenia oraz nowotworów, ma stan przewlekłego stresu oksydacyjnego. Niekorzystnemu zjawisku zwiększenia intensywności produkcji RFT mogą zapobiegać naturalne przeciwutleniacze pochodzenia roślinnego. Należy tutaj podkreślić, że część tych związków jest dostarczana do organizmu w postaci przetworów warzywnych lub owocowych. Istotny jest jednak fakt, że procesy produkcji mogą przyczyniać się do obniżenia jakości zdrowotnej produktów finalnych w stosunku do surowców wyjściowych. Jak pokazują wyniki badań naukowych, wpływ warunków przetwarzania na właściwości finalne produktów żywnościowych może dotyczyć:

- składu flawonoidów, czego przykładem są wyniki badań przeprowadzonych przez zespół profesora Jana Oszmiańskiego z Akademii Rolniczej we Wrocławiu, które wskazują na obniżenie zawartości związków fenolowych w klarowanym soku z jabłek w porównaniu z sokiem mętnym [104];
- profilu przeciwutleniaczy – dowodem może być całkowita zmiana składu przeciwutleniaczy w trakcie procesów kiszenia i ogrzewania kapusty [105];
- zmiany aktywności biologicznej – przykładem mogą być m. in. wyniki badań przeprowadzonych na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, dotyczące porównania przeciwutleniających właściwości soku z buraka z innymi dostępnymi handlowo produktami zawierającymi to warzywo, które pokazały, że wszystkie przebadane dostępne handlowo produkty wykazywały znacznie obniżoną lub wręcz

traciły aktywność biologiczną w stosunku do tej, jaką wykazuje świeży sok z buraka [106].

Te obserwacje wskazują jak istotny dla zachowania wartości zdrowotnych roślin jadalnych jest sposób ich przetwarzania, a co za tym idzie, niezbędne staje się przeprowadzenie badań weryfikujących wpływ obecnie stosowanych technologii wytwarzania przetworów.

5.1. Przetwarzanie owoców jagodowych

Ważną pozycję wśród substancji o charakterze przeciwutleniaczy zajmują fitozwiązki znajdujące się w owocach jagodowych. Jak wiadomo, znaczna część z tych owoców dociera do konsumentów w formie przetworzonej – w postaci gotowych wyrobów takich, jak np. soki, dżemy, konfitury. Niestety często podczas otrzymywania różnych form produktów, w których wykorzystuje się owoce jagodowe, część fitozwiązków znajdujących się w surowcu (zwłaszcza antocyjanów) ulega degradacji, co jest powodem obniżenia właściwości przeciwutleniających wyrobów finalnych [107]. Stąd też poważnym wyzwaniem dla przemysłu żywnościowego jest konieczność zachowania cennych właściwości biologicznych surowców w trakcie procesów obróbki technologicznej. Postępowanie to powinno stać się tym ważniejsze, że w ostatnich latach zdecydowanie podniosła się świadomość konsumentów w odniesieniu do jakości żywności oraz jej walorów zdrowotnych.

Kluczowym zadaniem stojącym przed zakładami przemysłu spożywczego jest zatem opracowanie i wdrożenie odpowiednich technologii przetwarzania tak, aby w końcowym efekcie uzyskać produkt o jak najmniej zmienionym składzie w stosunku do surowca wyjściowego, co pozwoliłoby na zachowanie cennych właściwości biologicznych owoców jagodowych.

5.1.2. Czynniki wpływające na zawartość związków polifenolowych podczas produkcji przetworów z owoców jagodowych

5.1.2.1. Wybór surowca

Podczas wyboru surowców do produkcji przetworów owocowych trzeba brać pod uwagę to, że na stabilność fitozwiązków w nich obecnych mają wpływ charakterystyczne cechy tych owoców takie, jak:

- budowa cząsteczek fitozwiązków w nich obecnych oraz interakcje pomiędzy nimi – stwierdzono, że procesy glikozylacji antocyjanidyn oraz ich acylacji są czynnikami

odpowiedzialnymi za utrzymanie stabilnej konformacji antocyjanów oraz tworzenie kompleksów między sobą oraz z innymi polifenolami, co dodatkowo wpływa na ich trwałość [108];

- obecność enzymów w owocach – wykazano, że enzymem, który może przyczyniać się do degradacji zarówno antocyjanów, jak i innych związków z grupy polfenoli jest m.in. polifenolooksydaza [109],
- zawartość witaminy C, która wykazuje ochronne działanie w stosunku do antocyjanów (poprzez redukcję ich wcześniej utlenionych form), jednakże w obecności tlenu może powodować degradację tych fitozwiązków [110].

5.1.2.2. Dojrzewanie, czas zbioru, oczyszczanie i pakowanie owoców jagodowych

Kolor jest jednym z głównych wyznaczników dojrzałości, jak i świeżości owoców. Podczas ich dojrzewania obserwuje się zmiany w stężeniach barwników. Początkowo owoce mają kolor zielony, co jest wynikiem obecności chlorofilu jako głównego pigmentu. Następnie jego stężenie spada, podczas gdy zwiększa się zawartość karotenoidów i antocyjanów, które nadają owocom barwy od żółtej, poprzez czerwoną i niebieską, aż do prawie czarnej. Owoce zebrane przed osiągnięciem dojrzałości, charakteryzują się mniejszą zawartością barwników, a co za tym idzie słabszymi właściwościami prozdrowotnymi. Przedwcześnie zebrane owoce mogą uzyskać intensywniejszy kolor w trakcie przechowywania w temperaturze pokojowej i w warunkach odpowiedniego nasłonecznienia [111].

Oczyszczanie owoców jagodowych oraz ich sortowanie, ważenie i pakowanie musi być wykonane w sposób zapewniający uniknięcie stłuczeń prowadzących do utraty barwnika w miejscach tych uszkodzeń [111].

5.1.2.3. Przechowywanie owoców jagodowych

Jednymi z najważniejszych parametrów przechowywania owoców jagodowych są optymalna temperatura i okres magazynowania. W warunkach chłodniczych (w temperaturze około 0 ºC) świeże owoce mogą być przechowywane nawet przez okres kilku tygodni (w zależności od owocu) praktycznie bez utraty związków o charakterze przeciwutleniaczy [112]. Podwyższenie temperatury do kilku stopni lub też do około 20 ºC skutkuje utratą antocyjanów odpowiednio do 20 % oraz ponad 60 % [111]. Należy również dodać, że niskie

temperatury przechowywania oraz mrożenie i rozmrażanie owoców jagodowych nie powodują znaczących ubytków antocyjanów [113].

Obok odpowiedniej temperatury przechowywania owoców jagodowych, nie bez znaczenia jest również odpowiednio dobrany skład atmosfery w komorze przechowalniczej. Przechowywanie owoców w kontrolowanych warunkach, zwłaszcza o niskiej zawartości tlenu (rzędu kilku procent) oraz ditlenku węgla (nie wyższej zawartości niż 15 %), może powodować wzrost zawartości związków polifenolowych [114].

5.1.2.4. Przetwarzanie owoców jagodowych

Drobne owoce jagodowe powinno się przetwarzać w przeciągu kilku godzin po zbiorze [110]. Podczas obróbki wstępnej stosuje się szereg operacji mechanicznych, które przyczyniają się niekiedy do drastycznych strat cennych związków biologicznie aktywnych. Przykładem tych zabiegów może być [115]:

- obieranie (usuwanie skórek) owoców zawierających duże ilości związków polifenolowych,
- usuwanie nasion, będących źródłem nienasyconych kwasów tłuszczowych,
- krojenie, siekanie, miażdżenie, które mogą powodować utlenianie fitozwiązków występujących w owocach.

W celu zwiększenia wydobycia cennych składników z owoców często stosuje się obróbkę enzymatyczną surowca z zastosowaniem np. enzymów pektynolitycznych czy też celulolitycznych. Ich dodatek podczas produkcji soków ma wpływ na:

- upłynnienie owoców i zwiększenie wydajności uzysku soku,
- uniknięcie wytworzenia warstwy żelowej,
- poprawę koloru i słodkości.

Niewłaściwie dobrane enzymy mogą jednakże powodować hydrolizę wiązań glikozydowych antocyjanów, co znacząco wpływa na zmianę barwy produktów [116].

Do produktów uzyskiwanych na bazie owoców jagodowych dodaje się bardzo często cukier [110] i inne dodatki takie, jak np. ditlenek siarki, kwas rozmarynowy [117], a także niewielki dodatek pektyn, które mają znaczenie dla stabilności antocyjanów [118]. W przypadku dżemów uzyskanych na bazie owoców jagodowych obniżenie stabilności może spowodować dodatek kwasu askorbinowego, który przyczynia się do degradacji antocyjanów [111].

Najbardziej jednak destruktywnym czynnikiem w procesie przetwarzania owoców jagodowych jest wysoka temperatura. Przykładowo zawartość antocyjanów w pasteryzowanym soku z borówki amerykańskiej stanowi zaledwie 32 % tych związków obecnych w świeżych owocach. Choć poddanie owoców termicznej obróbce poprawia np. kolor, smak i zapach, jak również zapewnia bezpieczeństwo mikrobiologiczne, to jednak przyczynia się też do znaczącej utraty antocyjanów. Z drugiej strony, krótkotrwałe ogrzewanie może powodować inaktywację enzymów występujących w tych owocach, co wpływa ochronnie na zawartość polifenoli w produkcie finalnym. Z powyższych względów podczas procesu obróbki ważna jest optymalizacja i kontrola temperatury [111].

Straty związków polifenolowych również obserwowane są również np. podczas procesu zagęszczania soków przez odparowanie. Lepszym sposobem okazała się być metoda kriokoncentracji, która polega na wymrażaniu wody, a następnie oddzieleniu jej od roztworu [110].

Podczas przechowywania produktów otrzymanych na bazie owoców jagodowych degradację antocyjanów może powodować [111]:

- narażenie wyrobu na światło widzialne i promieniowanie UV,
- okres przechowywania tych produktów – przykładowo w przypadku soków przechowywanych w temperaturze 4 ºC przez 3 miesiące straty antocyjanów wynosiły około 15 %.

Mając na uwadze powyższe informacje, można stwierdzić, że odpowiednia kontrola procesów obróbki owoców jagodowych powinna stać się ważnym celem dla producentów przetworów owocowych. Zabiegi z tym związane doprowadziłyby do zmniejszenia strat związków o charakterze przeciwutleniaczy w produktach finalnych, co podniosłoby jakość zdrowotną tych wyrobów i przez co stanowiłyby one atrakcyjną ofertę dla coraz bardziej wymagających konsumentów.

5.2. Przetwarzanie owoców aronii czarnoowocowej

Jak już wcześniej wspomniano, owoce aronii wykazują szczególne właściwości prozdrowotne, głównie dzięki wysokiej zawartości antocyjanów [25]. Są one doskonałym surowcem do przetwarzania, a gotowe wyroby stanowią w naszym kraju ważny produkt eksportowy. Wiadomo jednak, że podczas procesów obróbki owoców niezmiernie ważny jest dobór odpowiednich metod przetwarzania surowca tak, by zmniejszyć straty znajdujących się w nim związków aktywnych biologicznie.

W literaturze światowej można znaleźć tylko nieliczne wzmianki na temat wpływu procesu przetwarzania owoców aronii na zawartość polifenoli w wyprodukowanych wyrobach. Te dostępne dane wskazują, że podczas produkcji dżemu na bazie tych owoców pasteryzacja produktu przez 5 minut wywołuje utratę około 15 % całkowitej zawartości antocyjanów. Co więcej, przedłużenie czasu tej operacji do 15 minut powoduje, że ten spadek osiąga poziom rzędu 40 % początkowej zawartości tych związków. Okazało się również, że czas ogrzewania ma mniejszy wpływ na zawartość flawonoli, ponieważ w obydwu przypadkach następuje utrata 35 % całkowitej zawartości związków z tej grupy. Bardziej stabilne okazują się być kwasy fenolowe, gdyż ogrzewanie przyczynia się do zmniejszenia zawartości tych związków w produkcie zaledwie o 5 %. W sokach otrzymanych z owoców aronii odnotowano aż 75 – 80 % spadek zawartości polifenoli. Szczególnie niska okazuje się być zawartość związków z grupy procyjanidyn, odpowiadająca zaledwie 10 – 15 % ilości tych substancji występującej w surowcu. Nieznacznie wyższy poziom polifenoli podczas produkcji soku uzyskano poprzez dodatek enzymów (pektynazy i celulazy), które przyczyniają się do zwiększenia uzysku soku z miazgi [119].

Podsumowując, należy podkreślić, że specjaliści z zakresu wiedzy o żywności i technologii wytwarzania produktów żywnościowych dysponują stosunkowo dużym zasobem informacji zarówno na temat właściwości prozdrowotnych fitozwiązków obecnych w owocach jagodowych [120], jak i przetwarzania tych owoców [111]. Niemniej jednak, obecny stan wiedzy, obejmujący informacje na temat aktywności związków występujących w owocach aronii oraz ich obróbki, dotyczy głównie owoców nieprzetworzonych, natomiast praktycznie brak jest danych na temat wpływu procesu przetwarzania na ich właściwości biologiczne.

Jeśli zaś chodzi o owoce wiciokrzewu sinego, to dostępne są tylko nieliczne dane literaturowe na temat właściwości prozdrowotnych ich fitokompleksu. Całkowicie brak jest informacji dotyczących wpływu obróbki tych owoców na aktywność biologiczną obecnych w nich związków z grupy polifenoli.

II CEL I ZAKRES PRACY

Sposób odżywiania należy do najważniejszych czynników wpływających na zdrowie społeczeństwa. Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich kilkudziesięciu latach wskazują na to, że szczególne znaczenie w tym zakresie ma żywność pochodzenia roślinnego, będąca źródłem substancji odżywczych, nieodżywczych oraz fitozwiązków o korzystnym wpływie na organizm człowieka. Doniesienia naukowe dotyczące prozdrowotnych składników żywności pokazują, że jednym z najcenniejszych źródeł związków o działaniu biologicznym są owoce jagodowe. Stanowią one doskonały składnik diety, ważny z punktu widzenia profilaktyki chorób nowotworowych oraz chorób układu krążenia. Zazwyczaj są one spożywane w postaci świeżych owoców lub w formie przetworzonej takiej, jak soki czy konfitury [111].

W literaturze światowej pojawia się coraz więcej prac poświęconych przemianom związków polifenolowych w trakcie przetwarzania żywności, w tym również owoców jagodowych. Z doniesień tych wynika, że przetwórstwo może przyczyniać się zarówno do obniżenia, jak i podwyższenia zawartości określonych substancji w produkcie finalnym, a także do powstania nowych związków [111].

W ostatnich latach na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej również prowadzone są prace badawcze mające na celu sprawdzenie wpływu przetwarzania na zawartość fitozwiązków w wybranych roślinach jadalnych [105]. Ich kontynuacją są doświadczenia zaplanowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

Badaniami objęto dwa gatunki roślin, których owoce zaliczane są do jagodowych, a mianowicie – aronię czarnoowocową oraz wiciokrzew siny. Podjęto prace, które mają na celu sprawdzenie wpływu sposobu przetwarzania na skład i właściwości biologiczne tych owoców. Badania te są przede wszystkim ukierunkowane na identyfikację głównych przeciwutleniaczy w surowcu i produktach otrzymanych na bazie owoców aronii i wiciokrzewu. Takie podejście pozwoli na uszczegółowienie informacji na temat składu wybranych fitozwiązków w różnych produktach spożywczych otrzymanych z tych owoców.

Wyniki prac badawczych będą mogły być wykorzystane przez zakłady przemysłu spożywczego do monitorowania zachowawczości procesów produkcyjnych. Umożliwi to dobór odpowiednich warunków obróbki, a mianowicie takich, które pozwolą na zachowanie cennych właściwości prozdrowotnych owoców aronii i wiciokrzewu w końcowych produktach. Wyniki zaplanowanych badań będą mogły również przyczynić się do dostarczenia informacji pomocnych w opracowaniu nowych, „inspirowanych biologicznie”

(tzn. biorąc za podstawę znajomość biologicznie istotnych aktywności) produktów spożywczych na bazie owoców aronii i wiciokrzewu.

Podsumowując, nadrzędnym celem pracy doktorskiej realizowanej w ramach Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym jest określenie wpływu zmiany składu fitokompleksu na właściwości przeciwutleniające owoców aronii czarnoowocowej oraz wiciokrzewu sinego w trakcie przetwarzania. Prace badawcze będą wykonywane w dwóch ośrodkach naukowych, a mianowicie na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej oraz na Uniwersytecie w Oslo.

W ramach rozprawy planuje się wykonanie następujących zadań:

- opracowanie procedury oznaczania substancji o działaniu biologicznym w próbkach świeżych owoców aronii czarnoowocowej i wiciokrzewu sinego oraz produktów z nich otrzymanych,
- porównanie składu polifenoli, profilu związków o charakterze przeciwutleniaczy oraz właściwości przeciwutleniających próbek świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego pochodzących z różnych upraw zlokalizowanych na terenie Polski oraz w przypadku owoców aronii ze zbiorów z różnych lat,
- ocena zmian składu polifenoli, profilu związków o charakterze przeciwutleniaczy oraz właściwości przeciwutleniających próbek owoców aronii lub wiciokrzewu podczas przetwarzania,
- ocena aktywności cytotoksycznej i genotoksycznej wybranych próbek świeżych owoców aronii i wiciokrzewu oraz produktów z nich otrzymanych,
- sprawdzenie ochrony wybranej linii komórkowej przed stresem oksydacyjnym na poziomie genotoksyczności przez próbki świeżych owoców aronii i wiciokrzewu oraz produktów z nich otrzymanych,
- ocena wpływu procesu przetwarzania na skład fitozwiązków i właściwości biologiczne badanych próbek owoców.

III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Aparatura i odczynniki

1.1. Odczynniki chemiczne i biochemiczne

- metanol (cz.d.a.), *CHEMPUR*;
- metanol (HPLC), *CHEMPUR*;
- etanol (96 %), P.P.H. „*STANLAB*" Sp.j.;
- aceton (cz.d.a.), *CHEMPUR*;
- woda demineralizowana – Millipore, $Q_{PLUS}185$;
- Trolox – kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy (97 %), *Sigma Aldrich*;
- ABTS – 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian) (98 %), *Sigma Aldrich*;
- DPPH – 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazyl, *Sigma Aldrich*;
- odczynnik *Folina-Ciocalteu'a – Merck*;
- nadtlenosiarczan sodu, odczynnik otrzymany z Katedry Chemii Nieorganicznej;
- octan sodu, *Merck*;
- PBS – bufor fosforanowy, *Sigma*;
- kwas mrówkowy (98 % – 100 %), *Merck*;
- octan etylu, *CHEMPUR*;
- kwas chlorogenowy, *Extrasynthese*;
- kwas kawowy, *Sigma*;
- kwas protokatechinowy, *Sigma*;
- kwercetyna, *Sigma*;
- rutyna, *Sigma*;
- hyperozyd, *Extrasynthese*;
- cyjanidyno-3-glukozyd, *Fluka*;
- cyjanidyno-3-galaktozyd, *Extrasynthese*;
- kwas cynamonowy, *Sigma*;
- (-)-epikatechina, *Extrasynthese*;
- płytki do analitycznej chromatografii cienkowarstwowej – żel krzemionkowy 60 F_{254}, grubość warstwy 0,25 mm, 10 x 20 cm, *Merck*;
- chlorek sodu, *Merck*;

- wodorotlenek sodu, *Merck*;
- Tris-base – 2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diol, *Merck*;
- Tris-HCl – chlorowodorek 2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diolu, *Merck*;
- EDTA – sól trisodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego, *AnalaR NORMAPUR*;
- DMSO – dimetylosulfotlenek, *Sigma-Aldrich*;
- propano-1,2,3-triol (glicerol), *Sigma*;
- Triton X-100 – 26-(4-(2,4,4-trimetylopentan-2-ylo)fenoksy)-3,6,9,12,15,18,21,24-oktaoksaheksakozan-1-ol, *Sigma*;
- wodorotlenek potasu, *Merck*;
- nadtlenek wodoru (30 %), *Sigma-Aldrich*;
- HEPES – kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyn-1-ylo]etanosulfonowy (99,5 %), *Sigma*;
- BSA – albumina z surowicy bydlęcej (96 %), *Sigma*;
- agaroza NMP, *Invitrogen*^{TM};
- agaroza LMP, *Sigma*;
- pożywka RPMI-1640 do hodowli komórek (bez dodatku L-glutaminy), *Sigma*;
- L-glutamina (200 mM), *Sigma*;
- antybiotyki: penicylina (10000 U/L) i streptomycyna (10 mg/L) w 0,9 % roztworze chlorku sodu, *Sigma*;
- FBS – płodowa surowica cielęca, *Sigma*;
- pirogronian sodu (100 mM), *Sigma*;
- FPG – formamidopirymidyno-DNA-glikozylaza, roztwór enzymu otrzymany z organizacji *CEA Life Sciences Division* (Francja);
- SYBR® Gold nucleic acid gel stain, *Invitrogen*^{TM}.

1.2. Odczynniki stosowane do przygotowania podłoża mikrobiologicznego

Podłoże z firmy *BTL Sp. z o.o.* do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów o składzie:

- ekstrakt drożdżowy,
- pepton K,
- glukoza,
- odtłuszczone mleko w proszku,
- agar,

- woda demineralizowana.

Odczynniki stosowane do przygotowania podłoża Y-G do oznaczania liczby bakterii kwasolubnych oraz drożdży i pleśni:

- ekstrakt maltozowy, *Merck*;
- ekstrakt drożdżowy, *Merck*;
- pepton K, *Merck*;
- dekstroza, *Merck*;
- agar, *Merck*;
- kwas cytrynowy *Merck*.

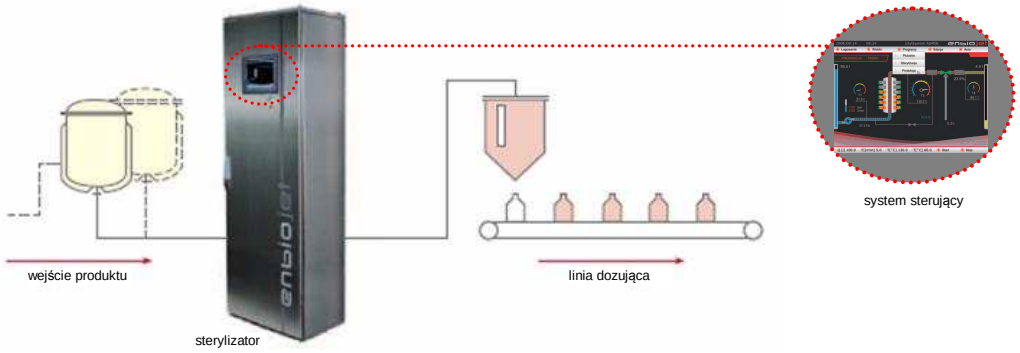
1.3. Aparatura i materiały pomocnicze

- liofilizator, model *LABCONCO;*
- spektrofotometr UV/VIS, model TECAN infinite M200;
- pH / jonometr CI-316 *ELMETRON*;
- pH-metr, model ORION 330 firmy *ORION Research, Inc.*;
- wirówka, Eppendorf Centrifuge 5702;
- wirówka, BIOFUGE fresco firmy *Heraeus*;
- sonifikator, model BANDELIN *SONOREX*;
- waga analityczna METTLER TOLEDO;
- waga analityczna METTLER AE 100;
- chromatograf cieczowy, model 1200 *Agilent*, wyposażony w detektory DAD i UV-Vis;
- urządzenie do derywatyzacji analitów, *Pinnacle PCX* firmy *Pickering*;
- kolumna chromatograficzna Agilent Eclipse XDB-C18; 4,6 x 150 mm (5 μm);
- kompaktowy sterylizator *EnbioJet* firmy *Enbio Technology* (charakterystykę urządzenia podano w rozdziale 1.4);
- zasilacz do aparatu do elektroforezy, model EPS 600 firmy *Pharmacia Biotech*;
- zestaw do elektroforezy firmy *Thistle Scientific*;
- wytrząsarka kołowa IKA-VIBRAX-VXR firmy *IKA-WERKE*;
- łaźnia wodna HAAKE S;
- łaźnia wodna Julabo, model ED firmy *Julabo Labortechnik GMBH*;
- inkubator laboratoryjny firmy *Termaks*;

- inkubator laboratoryjny, model 3111firmy *Forma Scientific, Inc.*;
- mieszadło magnetyczne, model RCT basic firmy *IKA-WERKE*;
- komora laminarna, model KR-125 SAFETY firmy *KOJAIR*;
- mikroskop fluorescencyjny Nikon eclipse TS100;
- mikroskop świetlny PhotoZoom^{TM} firmy *Cambridge Instruments*;
- hemocytometr Brüker firmy *Assistent*;
- naczynia do hodowli komórkowej (75 cm^2) BD Falcon^{TM} firmy *BD Biosciences*;
- płytki 12-dołkowe BD Falcon^{TM} firmy *BD Biosciences*;
- płytki 48-dołkowe BD Falcon^{TM} firmy *BD Biosciences*;
- szkiełka mikroskopowe, 76 x 26 mm, firmy *Menzel-Gläser*;
- szkiełka nakrywkowe, 20 x 20, 22 x 22, firmy *Assistent*.

1.4. Charakterystyka sterylizatora kompaktowego EnbioJet

Technologia określana skrótem *DET* (ang. *Direct Energy Transfer*) jest innowacyjnym sposobem obróbki termicznej żywności występującej w postaci roztworu lub zawiesiny w wodzie. Pozwala ona na błyskawiczne, bezpośrednie dostarczenie energii mikrofalowej do płynącego medium bez kontaktu z elementami grzewczymi urządzenia, które pracuje w oparciu o zasadę *DET*. Przykładem takiego urządzenia jest sterylizator kompaktowy *EnbioJet* produkowany przez firmę Enbio Technology Sp. z o.o. z Kosakowa (rysunek III 1).



Rysunek III 1. Schematyczny obraz linii procesowej sterylizatora kompaktowego *EnbioJet* [121].

Podstawowym elementem jego budowy jest moduł grzewczy, na który składa się komora rezonansowa i magnetrony. Przez komorę przebiega rura wykonana z teflonu. Proces sterylizacji polega na tym, że za pomocą pompy pobierana jest ciecz, która następnie

przepływa przez teflonową rurę. W tym miejscu do płynącego medium, równomiernie w całej objętości, dostarczana jest energia, której źródłem są mikrofale. Na skutek tego ciecz zostaje podgrzana do zadanej temperatury i w przeciągu kilku sekund można osiągnąć efekt sterylności. Sterylna ciecz płynie następnie do układu dozowania, gdzie możliwe jest jej rozlewanie do naczyń. Kontrolę parametrów procesu sterylizacji zapewnia automatyczny system sterujący. Kompaktowy sterylizator *EnbioJet* może osiągnąć wydajność od 90 L/h do 390 L/h [121].

1.5. Przygotowanie roztworów do oznaczeń prowadzonych za pomocą testu kometowego

– bufor lizujący	0,1 M EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris-base, pH 10; przechowywano w temp. 4 °C; bezpośrednio przed użyciem dodawano 1 % [v/v] odczynnika Triton X-100
– bufor elektroforetyczny	0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13,3; przygotowywano przed użyciem i schładzano do temp. 4 °C
– bufor reakcyjny F	40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA, pH 8; przygotowywano przed użyciem i schładzano do temp. 4 °C
– bufor TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8; przechowywano w temp. 4 °C
– roztwór agarozy NMP	1 % [w/v] roztwór agarozy NMP w wodzie demineralizowanej; przechowywano w temp. 4 °C i podgrzewano przed użyciem do temp. 55 °C
– roztwór agarozy LMP	1 % [w/v] roztwór agarozy LMP w buforze PBS; przechowywano w temp. 4 °C i podgrzewano przed użyciem do temp. 80 °C w celu upłynnienia, a następnie schładzano do temp. 37 °C
– roztwór barwnika SYBR® Gold	odczynnik rozcieńczano za pomocą rozpuszczalnika DMSO w stosunku 1 : 9; przechowywano w temp. -20 °C; bezpośrednio przed użyciem roztwór rozcieńczano za pomocą buforu TE w stosunku 1 : 1250

– roztwór zawierający enzym formamidopirymidyno-DNA--glikozylazę (FPG)	wyjściowy roztwór enzymu FPG rozcieńczano w stosunku 1 : 99 za pomocą buforu reakcyjnego F z dodatkiem 10 % [v/v] glicerolu; przechowywano w temp. -80 °C; bezpośrednio przed użyciem roztwór rozcieńczano za pomocą buforu reakcyjnego F w stosunku 1 : 29
– roztwór nadtlenku wodoru (H_2O_2)	50 μM roztwór nadtlenku wodoru w buforze PBS; przygotowywano przed użyciem i schładzano do temp. 4 °C
– roztwór soli fizjologicznej	0,85 % [w/v] roztwór chlorku sodu w wodzie demineralizowanej

1.6. Przygotowanie podłoża mikrobiologicznego

– podłoże Y-G	ekstrakt maltozowy (3 g), ekstrakt drożdżowy (3 g), pepton K (5 g), dekstroza (10 g), agar (20 g), woda demineralizowana (1 L), kwas cytrynowy do ustalenia pH (20 % [v/v]); pH 3-4; sterylizacja w 121 °C przez 15 min.

1.7. Materiały użyte do prowadzenia hodowli komórkowej

W doświadczeniach użyto linii ludzkich komórek limfoblastycznych TK6. Komórki hodowano w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 10 % [v/v] płodowej surowicy cielęcej, antybiotyków: penicyliny (100 U/mL) i streptomycyny (100 μg/mL), L-glutaminy (2 μmol/mL) oraz pirogronianu sodu (200 μg/mL) w inkubatorze zapewniającym stałe i kontrolowane warunki środowiska (5 % CO_2, 95 % powietrza, 95 % wilgotności, temperaturę 37 °C).

1.8. Materiał badawczy

Materiał do badań stanowiły:

- partie świeżych owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego pochodzące z różnych upraw zlokalizowanych na terenie Polski i zebranych w różnych latach z obszarów tych upraw,
- wyroby otrzymane z owoców aronii (soki oraz dżemy), a także próbki pobrane na głównych etapach procesu technologicznego w trakcie produkcji jednego z dżemów,

- wyroby otrzymane z owoców wiciokrzewu sinego (soki).

W tabeli III 1 zestawiono produkty objęte badaniami oraz podano ich charakterystykę.

Tabela III 1. Zestawienie i charakterystyka produktów (otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego) będących przedmiotem badań opisanych w rozprawie doktorskiej.

próbka (nr)	oznaczenie	opis produktu otrzymanego z owoców aronii i wiciokrzewu sinego
1	1S	świeże owoce aronii poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2006 roku z Tranówki (woj. kujawsko-pomorskie)
2	2S	świeże owoce aronii poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2007 roku z Tranówki (woj. kujawsko-pomorskie)
3	3S	świeże owoce aronii poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2007 roku z terenu woj. lubuskiego (miejscowość Ojerzyce k/Świebodzina)
4	4S	świeże owoce aronii poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2007 roku z firmy „Agropharm” (woj. łódzkie)
5	5S	świeże owoce aronii poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły z 2008 r. z uprawy położonej w ogródkach działkowych na terenie Gdańska
6	6S	świeże owoce aronii poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły z 2008 r. z uprawy położonej w ogródkach działkowych na terenie Gdańsk – Osowa
7	7S	świeże owoce aronii poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z początku miesiąca września 2008 roku z firmy „Fungopol” (Brusy, woj. pomorskie)
8	8S	świeże owoce aronii poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbioru z 30.09.2008 roku z firmy „Fungopol” (Brusy, woj. pomorskie)
9	1D	dżem otrzymany z próby 7S poddany procesowi liofilizacji („Fungopol”, Brusy, woj. pomorskie)
10	1DM	umyte owoce aronii 8S poddane procesowi liofilizacji („Fungopol”, Brusy, woj. pomorskie)
11	2DM	rozdrobnione owoce aronii 1DM poddane procesowi liofilizacji („Fungopol”, Brusy, woj. pomorskie)
12	3DM	rozdrobnione owoce aronii 2DM gotowane z cukrem poddane procesowi liofilizacji; na 1 kg owoców zużyto 0,45 kg cukru („Fungopol”, Brusy, woj. pomorskie)
13	4DM	dżem otrzymany z próby 3DM poddany procesowi liofilizacji; dżem był uprzednio poddany procesowi pasteryzacji w autoklawie w temperaturze 95 ºC przez 35 min. („Fungopol”, Brusy, woj. pomorskie, data produkcji 30.09.2008 r.)

Tabela III 1. c.d.

14	KON	świeży sok z owoców aronii; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z firmy „Fungopol" (Brusy, woj. pomorskie); sok rozcieńczono 3,7 razy za pomocą wody mineralnej
15	1h	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany przez 1 godzinę w temp. 100 ºC
16	2h	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany przez 2 godziny w temp. 100 ºC
17	3h	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany przez 3 godziny w temp. 100 ºC
18	4h	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany przez 4 godziny w temp. 100 ºC
19	5h	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany przez 5 godzin w temp. 100 ºC
20	90 ºC	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany w temp. 90 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
21	100 ºC	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany w temp. 100 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
22	110 ºC	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany w temp. 110 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
23	120 ºC	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany w temp. 120 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
24	130 ºC	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany w temp. 130 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
25	135 ºC	sok z owoców aronii (KON) ogrzewany w temp. 135 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
26	W	świeże owoce wiciokrzewu sinego (odmiana „Wojtek") poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z Lęborka (woj. pomorskie)
27	B	świeże owoce wiciokrzewu sinego (odmiana „Brązowa") poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z Lęborka (woj. pomorskie)
28	Z	świeże owoce wiciokrzewu sinego (odmiana „Zielona") poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z Lęborka (woj. pomorskie)
29	WK	świeże owoce wiciokrzewu sinego (odmiana „Wojtek") poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z Osielska (woj. kujawsko-pomorskie)
30	BR	świeże owoce wiciokrzewu sinego (odmiana „Brązowa") poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z Osielska (woj. kujawsko-pomorskie)
31	ZL	świeże owoce wiciokrzewu sinego (odmiana „Zielona") poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z Osielska (woj. kujawsko-pomorskie)
32	J	świeże owoce wiciokrzewu sinego (odmiana „Jolanta") poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z Osielska (woj. kujawsko-pomorskie)

Tabela III 1. c.d.

33	44	świeże owoce wiciokrzewu sinego (odmiana 44) poddane procesowi liofilizacji; owoce pochodziły ze zbiorów z 2008 roku z Osielska (woj. kujawsko-pomorskie)
34	J-KON	świeży sok otrzymany z połączenia soków otrzymanych z różnych odmian owoców wiciokrzewu sinego; sok rozcieńczono 4,8 razy za pomocą wody mineralnej
35	J-1h	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany przez 1 godzinę w temp. 100 ºC
36	J-2h	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany przez 2 godziny w temp. 100 ºC
37	J-3h	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany przez 3 godziny w temp. 100 ºC
38	J-4h	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany przez 4 godziny w temp. 100 ºC
39	J-5h	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany przez 5 godzin w temp. 100 ºC
40	J80 ºC	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany w temp. 80 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
41	J90 ºC	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany w temp. 90 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
42	J100 ºC	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany w temp. 100 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
43	J110 ºC	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany w temp. 110 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
44	J120 ºC	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany w temp. 120 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
45	J130 ºC	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany w temp. 130 ºC w urządzeniu *EnbioJet*
46	J135 ºC	sok z owoców wiciokrzewu sinego (J-KON) ogrzewany w temp. 135 ºC w urządzeniu *EnbioJet*

2. Opis stosowanych procedur analitycznych

2.1. Przygotowanie próbek do badań

Wszystkie badane próbki w postaci liofilizatów otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego w ilości około 1 g ekstrahowano za pomocą 4 mL metanolu. Dodatkowo, w przypadku liofilizatu otrzymanego z owoców aronii oznaczonych jako 6S (według opisu w tabeli III 1), ekstrakcję prowadzono za pomocą innych rozpuszczalników takich, jak: etanol, aceton, 70 % roztwór metanolu, 70 % roztwór etanolu, 70 % roztwór acetonu. W przypadku liofilizatów, wykorzystywanych w badaniach z użyciem komórek TK6, jako ekstrahent stosowano 70 % roztwór etanolu. W kolejnym etapie próbki poddawano sonifikacji przez

okres 10 min., odwirowano (5 min., 520 g), po czym delikatnie zbierano roztwór znad osadu. Ekstrakcję powtarzano 3 razy. Ekstrakty przechowywano w temperaturze -20 ºC. Tak przygotowane próbki poddawano analizom chemicznym oraz biochemicznym. Soki z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego przechowywano w temperaturze -20 ºC i poddawano analizom bezpośrednio, tzn. bez dodatkowych etapów przygotowania próbek do badań.

2.2. Procedury wykorzystywane na etapie oznaczania zawartości związków polifenolowych w badanych próbkach żywności otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego

Pomiar zawartości związków polifenolowych w badanych próbkach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego prowadzono z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC-DAD. W trakcie badań zastosowano kolumnę chromatograficzną Agilent Eclipse XDB-C18. Początkowo fazę ruchomą stanowiła mieszanina: A – woda z dodatkiem 0,1 % (v/v) kwasu mrówkowego, B – metanol. Jednakże lepszą selektywność rozdzielania uzyskano stosują fazę ruchomą o następującym składzie: A – woda z dodatkiem 4,8% (v/v) kwasu mrówkowego, B – metanol. Pozostałe parametry toku postępowania analitycznego na etapie oznaczania związków polifenolowych w próbkach produktów otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego pozostawiono bez zmian. W tabeli III 2 zestawiono parametry toku postępowania oraz parametry pracy układu HPLC-DAD w trakcie prowadzenia badań chromatograficznych próbek otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego.

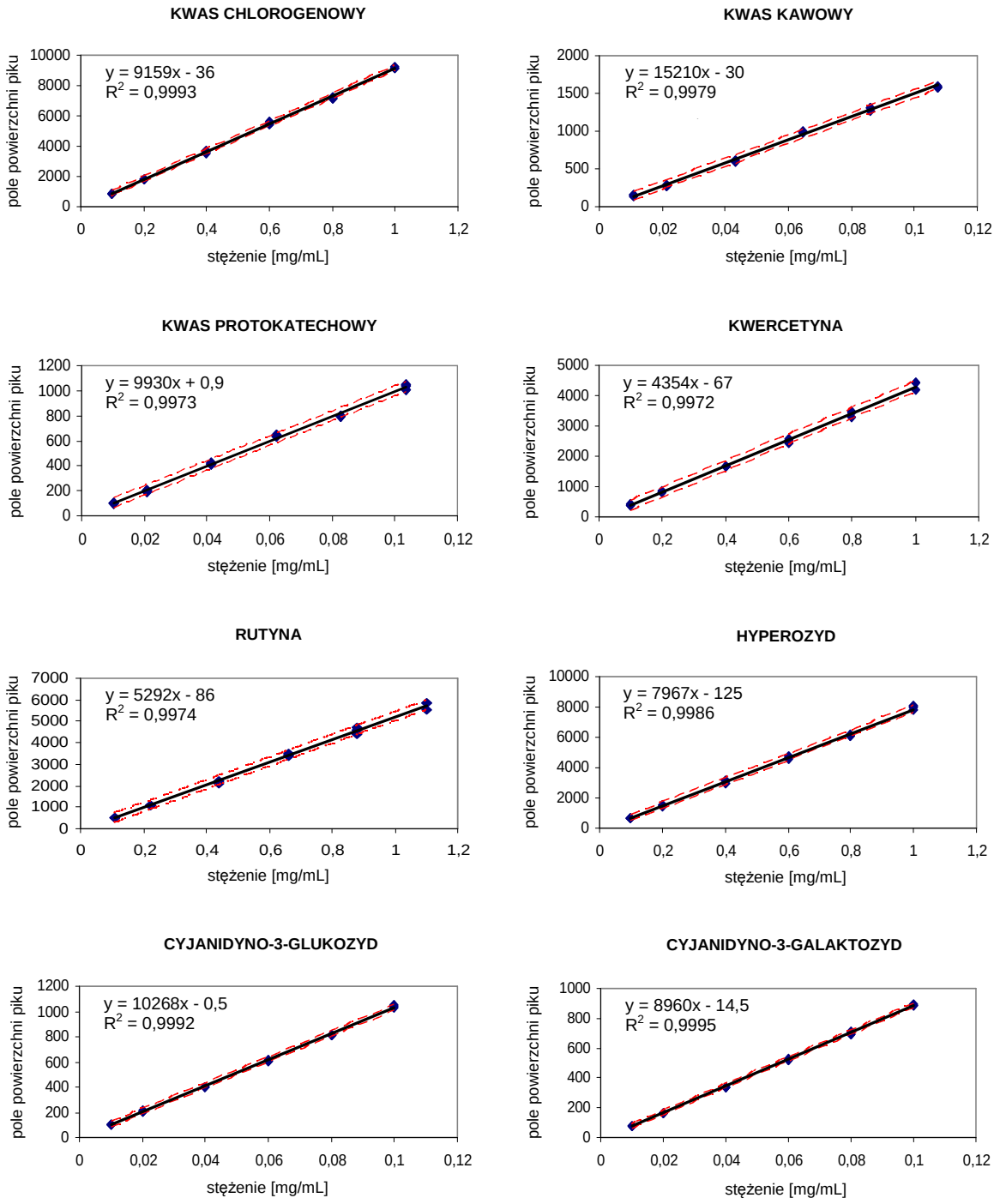
Tabela III 2. Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznego oznaczania polifenoli w próbkach produktów otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego oraz na etapie analizy chromatograficznej roztworów substancji wzorcowych.

Parametr	Wartość
Objętość dozowanych próbek	2 µL
Skład fazy ruchomej	A – woda z dodatkiem 4,8% v/v HCOOH; B - metanol
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,7 mL/min.
Program elucji	0 min. → 10 % składnika B; 0 min. – 50 min. → 10-65 % składnika B; 50 min. – 60 min. → 65-100 % składnika B; 60 min. – 70 min. → 100 % składnika B;
Długość fali	260 nm, 300 nm, 325 nm, 525nm

Zawartości poszczególnych związków w badanych próbkach obliczano korzystając z równań krzywych kalibracyjnych wyznaczonych na podstawie wyników analizy próbek

metanolowych roztworów substancji wzorcowych. Przykłady wyznaczonych krzywych kalibracyjnych zebrano na rysunku III 2.

Dla opracowanej metodyki oznaczania związków polifenolowych w badanych próbkach wyznaczono niektóre parametry walidacyjne, które zestawiono w tabeli III 3.



Rysunek III 2. Krzywe kalibracyjne wraz z wyznaczonymi przedziałami ufności (oznaczonymi linią przerywaną) uzyskane w wyniku analizy próbek metanolowych roztworów substancji wzorcowych za pomocą techniki HPLC-DAD.

Tabela III 3. Parametry walidacyjne opracowanej metodyki oznaczania związków polifenolowych w próbkach ekstraktów oraz soków uzyskanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD.

substancja wzorcowa	powierzchnia piku	stężenie wzorca [mg/mL]	równanie krzywej kalibracyjnej	współczynnik regresji r	próbki ciekłe (soki)		próbki stałe (liofilizaty)	
					granica wykrywalności [mg/mL]	granica oznaczalności [mg/mL]	granica wykrywalności [mg/g s.m.]	granica oznaczalności [mg/g s.m.]
kwas chlorogenowy	872÷9181	0,1÷1	y=9159x-36	0,9997	0,00096	0,0029	0,012	0,035
	75÷872	0,01÷0,1	y=8981x-17,8	0,9981				
kwas kawowy	145÷1586	0,01076÷0,1076	y=15210x-30	0,9990	0,00074	0,0022	0,0089	0,026
	98÷145	0,00108÷0,01076	y=4981x+91,8	0,9917				
	5,7÷98	0,00086÷0,00108	y=12279x+4,4	0,8114				
kwas protokatechowy	100÷1033	0,01034÷0,1034	y=9930x+0,9	0,9987	0,0010	0,0030	0,012	0,036
	22÷100	0,00103÷0,01034	y=8149x+17,4	0,9903				
kwercetyna	392÷4340	0,1÷1	y=4354x-67	0,9986	0,00062	0,0019	0,0074	0,023
	36÷392	0,01÷0,1	y=3823x-1,3	0,9961				
	13÷36	0,004÷0,01	y=3895x-2,81	0,9970				
rutyna	521÷5749	0,11÷1	y=5292x-86	0,9987	0,00027	0,00082	0,0032	0,0098
	57÷521	0,011÷0,11	y=4745x+5,4	0,9992				
hyperozyd	681÷7936	0,1÷1	y=7967x-125	0,9993	0,00080	0,0024	0,0096	0,029
	75÷681	0,01÷0,1	y=6519x+29	0,9940				
cyjanidyno-3-glukozyd	105÷1037	0,01÷0,1	y=10268x-0,5	0,9996	0,00016	0,00047	0,0019	0,0056
	11,2÷105	0,001÷0,01	y=10046x-0,7	0,9933				
cyjanidyno-3-galaktozyd	4616÷66094	0,5÷7,5	y=8877x+413	0,9997	0,00019	0,00056	0,0023	0,0067
	886÷4616	0,1÷0,5	y=9428x-62	0,9990				
	80÷886	0,01÷0,1	y=8960x-14,5	0,9998				
	10÷80	0,0005÷0,01	y=7059x+7,3	0,9940				

2.3. Procedury wykorzystywane podczas oznaczania całkowitej aktywności przeciwutleniającej składników obecnych w badanych próbkach produktów

2.3.1. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem kationorodnika ABTS•$^{+}$

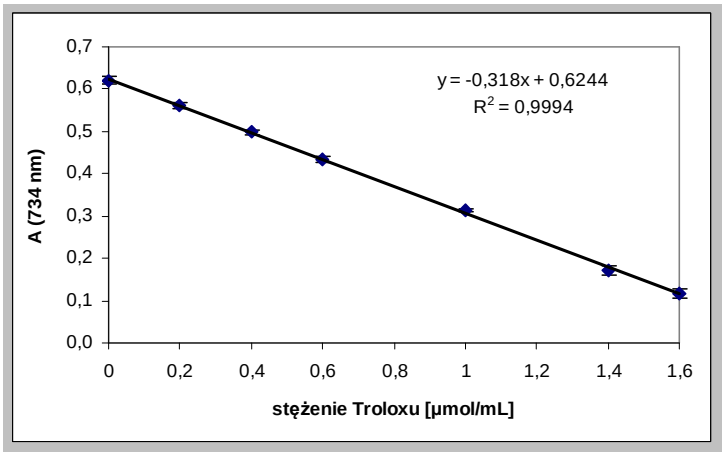
W przypadku tego testu oznaczenie zdolności wychwytywania rodników polega na spektrofotometrycznym pomiarze spadku absorbancji barwnego kationorodnika ABTS•$^{+}$ wywołanego działaniem przeciwutleniacza.

Do przeprowadzenia pomiaru absorbancji niezbędny jest etap wytworzenia kationorodnika ABTS•$^{+}$. W tym celu wykorzystuje się nadtlenosiarczan sodu. Utlenienie związku ABTS następuje natychmiast, natomiast maksymalną wartość absorbancji i pełną stabilność rodnik uzyskuje po upływie 6 – 48 godzin, dlatego roztwór kationorodnika wykorzystywany do oznaczeń sporządza się z 24-godzinnym wyprzedzeniem. Pomiar wartości absorbancji prowadzi się przy długości fali 734 nm. Aktywność przeciwutleniającą poszczególnych próbek przelicza się na podstawie krzywej kalibracyjnej (rysunek III 3) na ilość równoważników Troloxu przypadających na próbkę o objętości 1 mL [122].

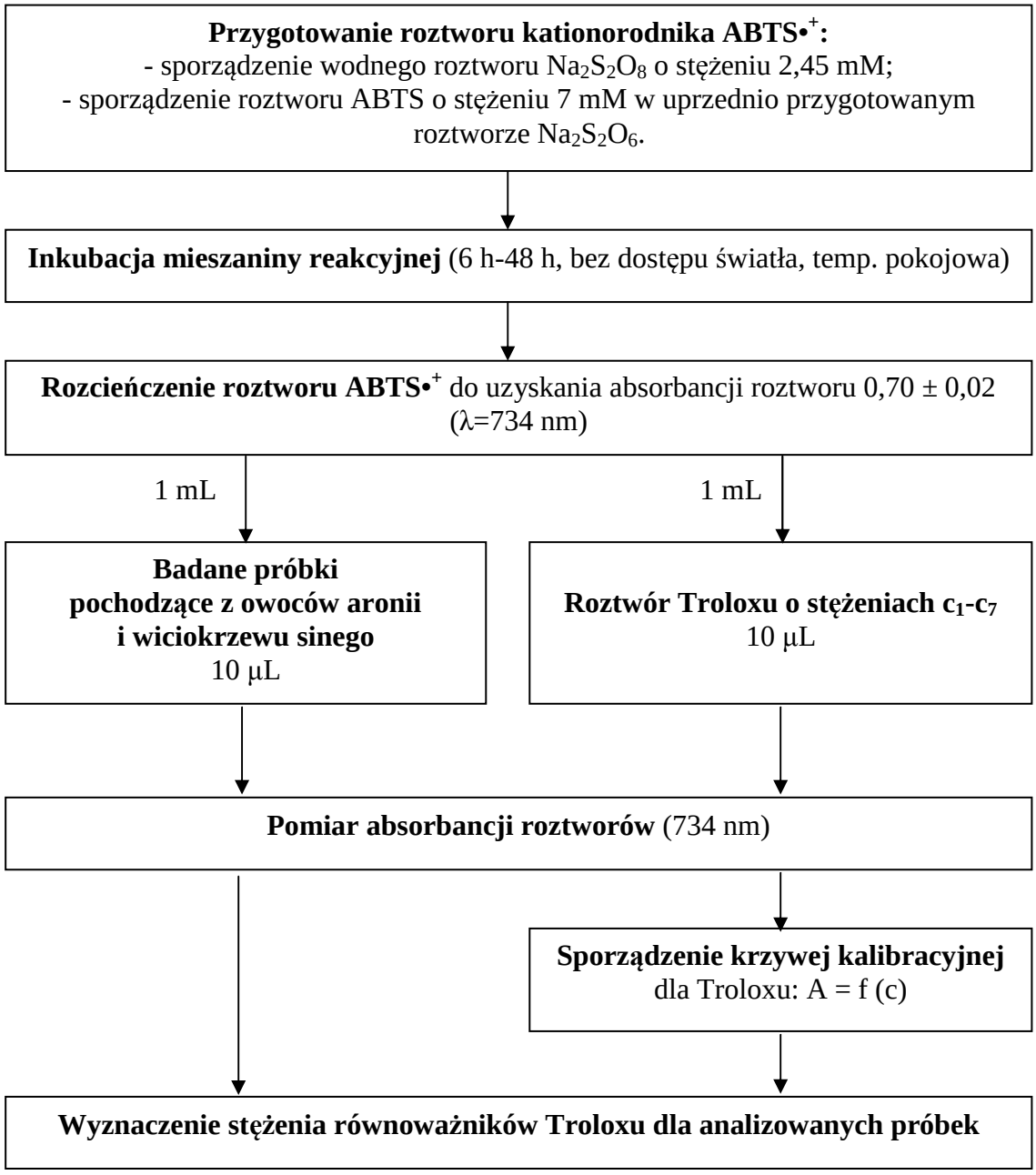
Na rysunku III 4 przedstawiono poszczególne etapy procedury analitycznej opartej na wykorzystaniu tego testu.

Sporządzanie krzywej wzorcowej

W celu ilościowego oznaczenia zdolności przeciwutleniającej próbek sporządzono krzywą wzorcową opisującą zależność wartości absorbancji od stężenia Troloxu (rysunek III 3).



Rysunek III 3. Krzywa kalibracyjna uzyskana w wyniku oznaczeń prowadzonych dla próbek wzorcowego roztworu Troloxu (w metanolu) z wykorzystaniem testu ABTS.

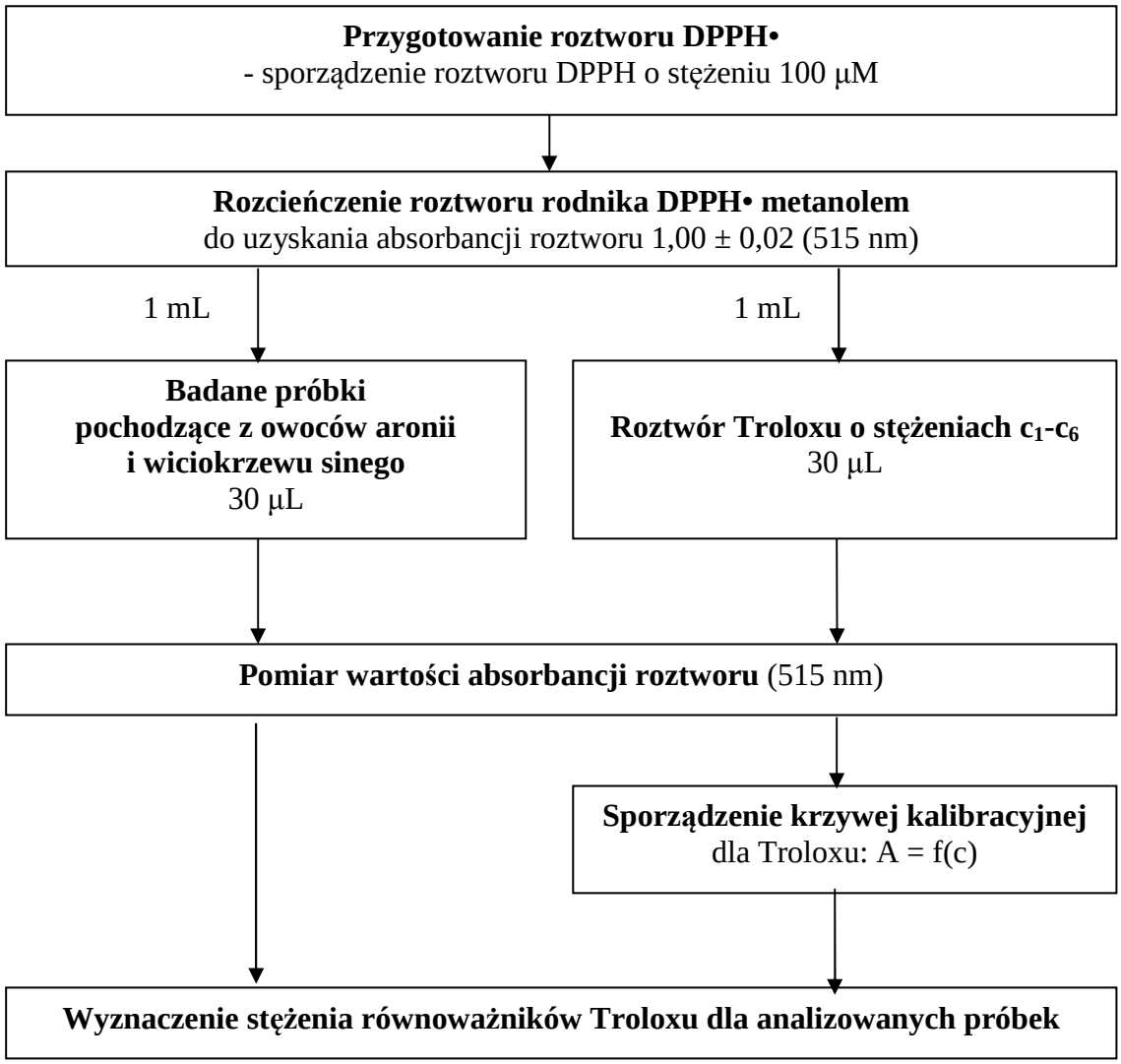


Rysunek III 4. Schemat postępowania analitycznego podczas oznaczeń aktywności przeciwutleniającej próbek otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego przy użyciu testu ABTS.

2.3.2. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem rodnika DPPH•

W przypadku tego testu oznaczenie zdolności przeciwutleniającej polega na spektrofotometrycznym pomiarze spadku absorbancji barwnego rodnika azowego DPPH• wywołanego działaniem przeciwutleniacza. Postęp reakcji redukcji, a zarazem odbarwiania roztworu rodnika można śledzić spektrofotometrycznie przy długości fali λ=515 nm. Jest to

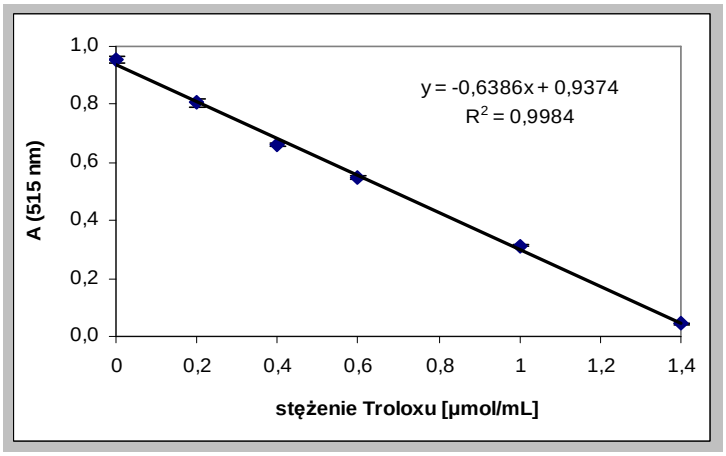
długość fali, przy której występuje maksimum absorbancji roztworów rodnika [122]. Schemat postępowania podczas oznaczeń aktywności przeciwutleniającej próbek przy użyciu testu DPPH przedstawiono na rysunku III 5.



Rysunek III 5. Tok postępowania analitycznego podczas oznaczeń aktywności przeciwutleniającej analizowanych próbek przy użyciu testu DPPH.

Sporządzanie krzywej wzorcowej

W celu ilościowego oznaczenia zdolności przeciwutleniającej próbek sporządzono krzywą wzorcową opisującą zależność wartości absorbancji od stężenia Troloxu (rysunek III 6).



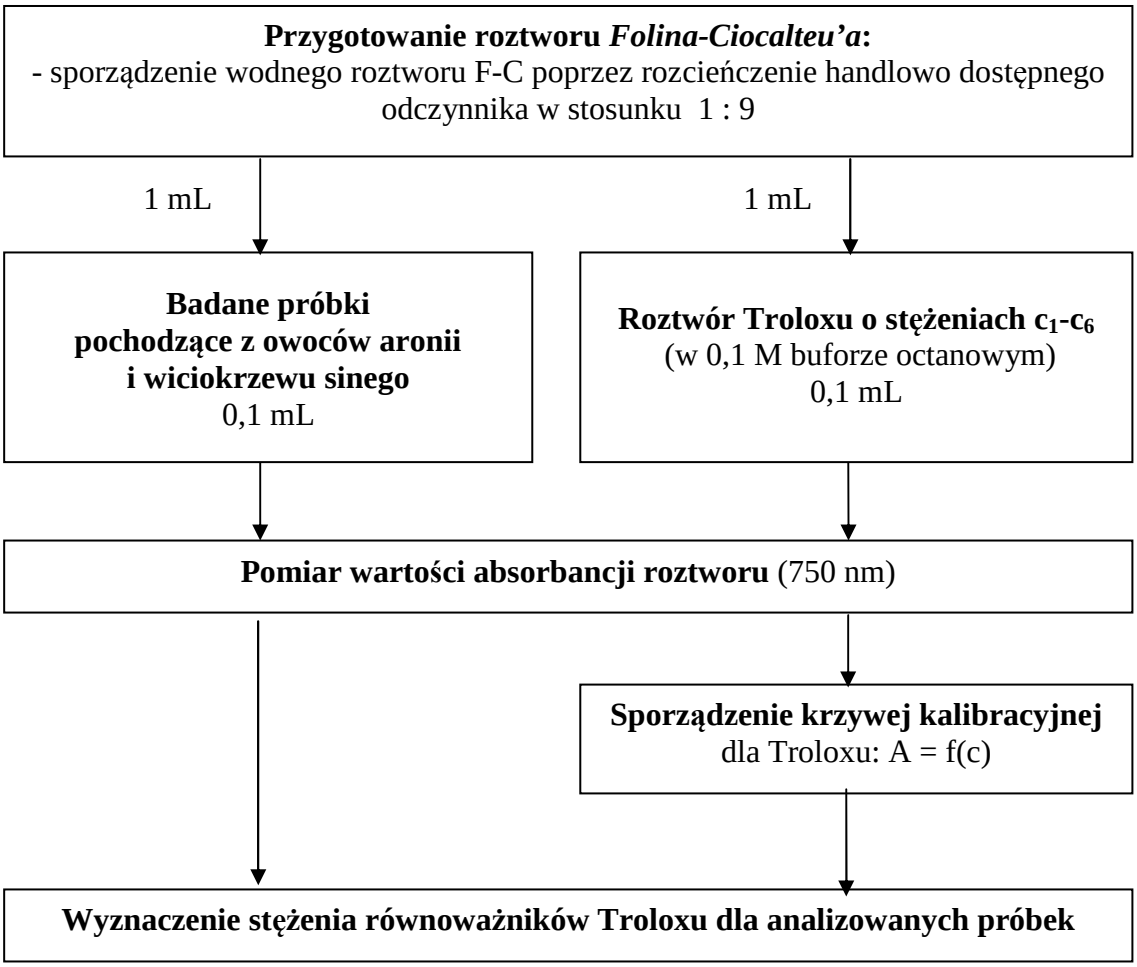
Rysunek III 6. Krzywa kalibracyjna uzyskana w wyniku oznaczeń przeprowadzonych dla próbek wzorcowego roztworu Troloxu (w metanolu) z wykorzystaniem testu DPPH.

2.3.3. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu'a

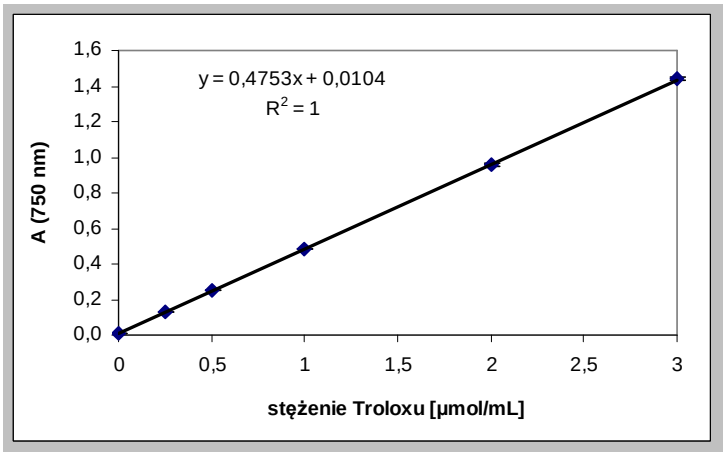
Chemiczne podłoże tego testu, podobnie jak testów ABTS i DPPH, oparte jest na wykorzystaniu mechanizmu przeniesienia elektronu z przeciwutleniacza na barwny utleniacz, który podczas tego procesu (redukcji) zmienia kolor próbki w sposób proporcjonalny do stężenia przeciwutleniacza. Oznaczenie zdolności przeciwutleniającej polega w tym przypadku na spektrofotometrycznym pomiarze wzrostu absorbancji barwnego odczynnika *Folina-Ciocalteu'a* (F-C) wywołanego działaniem przeciwutleniacza. Postęp reakcji można śledzić spektrofotometrycznie przy długości fali λ=750 nm [122]. Schemat postępowania podczas oznaczeń aktywności przeciwutleniającej próbek przy użyciu testu wykorzystującego odczynnik F-C przedstawiono na rysunku III 7.

Sporządzanie krzywej wzorcowej

W celu ilościowego oznaczenia zdolności przeciwutleniającej próbek sporządzono krzywą wzorcową opisującą zależność wartości absorbancji od stężenia Troloxu (rysunek III 8).



Rysunek III 7. Schemat postępowania analitycznego podczas oznaczeń zdolności przeciwutleniającej próbek otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego przy użyciu testu z zastosowaniem odczynnika *Folina-Ciocalteu'a*.



Rysunek III 8. Krzywa kalibracyjna uzyskana w wyniku oznaczeń przeprowadzonych dla próbek wzorcowego roztworu Troloxu (w buforze octanowym) przy użyciu testu wykorzystującego odczynnik *Folina-Ciocalteu'a*.

2.4. Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do monitorowania profili przeciwutleniaczy występujących w badanych próbkach

Próbki soków lub metanolowych ekstraktów liofilizatów otrzymanych z owoców aronii bądź wiciokrzewu sinego nakładano w postaci pasm o długości około 1 cm za pomocą szklanej kapilary na płytki do TLC. Czynność tę powtarzano kilka razy. Chromatogramy rozwijano w fazie ruchomej o składzie: octan etylu, kwas mrówkowy i woda w stosunku 6 : 1 : 1 (v/v/v). W celu wizualizacji związków o charakterze przeciwutleniaczy płytki spryskiwano metanolowym roztworem reagenta ABTS. Chromatogramy dokumentowano za pomocą skanera laserowego.

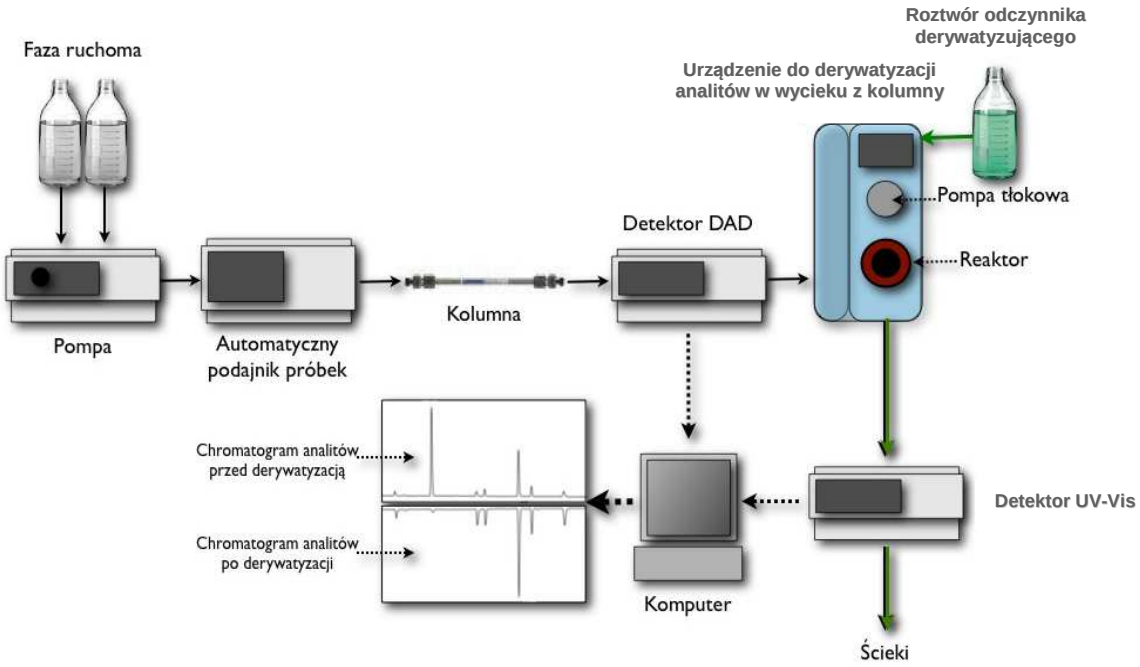
2.5. Wykorzystanie derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny w celu uzyskania profili przeciwutleniaczy oraz monitorowania aktywności przeciwutleniającej związków występujących w próbkach ekstraktów rozpuszczalnikowych oraz soków otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego

W celu otrzymania profili przeciwutleniaczy metanolowe ekstrakty próbek lub soki otrzymane z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddano analizie z wykorzystaniem techniki HPLC oraz dodatkowo procesowi derywatyzacji w wycieku z kolumny przy użyciu kationorodnika ABTS•+ oraz odczynnika *Folina-Ciocalteu'a*. Wykorzystany na tym etapie badań zestaw aparatury przedstawiono na rysunku III 9.

Odczynniki do derywatyzacji (kationorodnik ABTS•+ oraz odczynnik *Folina-Ciocalteu'a*) dostarczano do układu reakcyjnego za pomocą urządzenia do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny *Pinnacle PCX*. Jego najważniejszymi elementami są pompa tłokowa oraz reaktor umożliwiający prowadzenie procesu derywatyzacji w zakresie temperatur od 5 °C wyższej niż temperatura otoczenia do 130 °C [123].

Roztwory odczynników derywatyzujących sporządzono w następujący sposób:

- odczynnik ABTS rozpuszczano w wodnym roztworze nadtlenosiarczanu sodu (2,45 mmol/L) tak, aby uzyskać roztwór o stężeniu 7 mmol/L; otrzymaną mieszaninę reakcyjną inkubowano bez dostępu światła przez okres 12 godzin w temperaturze pokojowej; bezpośrednio przed użyciem przygotowywano 30 % [v/v] roztwór kationorodnika ABTS•+ w metanolu;
- handlowo dostępny odczynnik *Folina-Ciocalteu'a* rozcieńczano wodą do uzyskania stężenia 40 % [v/v].



Rysunek III 9. Schemat budowy zestawu aparaturowego wykorzystanego do otrzymywania chromatograficznych profili przeciwutleniaczy w próbkach metanolowych ekstraktów i soków uzyskanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego.

Podczas analiz natężenie przepływu strumienia reagentów wynosiło 0,1 mL/min. Proces derywatyzacji prowadzono w temperaturze reaktora równej 130 °C. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali 734 nm w przypadku odczynnika ABTS oraz przy długości fali 750 nm w przypadku odczynnika *Folina-Ciocalteu*, tj. przy długościach fal odpowiadających maksimum absorbancji dla tych reagentów [123].

Analizy próbek ekstraktów metanolowych lub soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego prowadzono w warunkach przedstawionych w rozdziale III 2.2.

2.6. Oznaczanie drobnoustrojów w sokach

W celu określenia skuteczności inaktywacji mikroorganizmów w sokach z owoców aronii i wiciokrzewu sinego poddanych sterylizacji za pomocą urządzenia *EnbioJet* przygotowywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych badanych próbek w soli fizjologicznej. Tak przygotowane próbki o objętości 1 mL przenoszono do płytek Petriego. Do każdej płytki wlewano około 15 mL pożywki (do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów lub pożywki Y-G do oznaczania liczby bakterii kwasolubnych oraz drożdży i pleśni) o temperaturze około 45 °C, całość dokładnie mieszano i pozostawiano do zestalenia. Płytki inkubowano w

temperaturze 30 °C przez 48 godzin w przypadku oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów lub bakterii kwasolubnych oraz w 20 °C przez 7 dni w przypadku oznaczania liczby drożdży i pleśni.

2.7. Oznaczanie cytotoksyczności ekstraktów etanolowych oraz soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6

2.7.1. Inkubacja komórek z badanymi próbkami owoców

Komórki TK6 w ilości około 0,2 mln/mL pożywki szczepiono w naczyniu hodowlanym o powierzchni 75 cm^2. Po 2 dniach hodowli zawiesinę komórkową w ilości 0,9 mL (w przypadku oznaczania cytotoksyczności ekstraktów etanolowych) lub 0,8 mL (w przypadku oznaczania cytotoksyczności soków) przenoszono do studzienek płytki 12-dołkowej. Gęstość zawiesiny komórkowej w każdej studzience ustalano na 1 mln komórek/mL pożywki. Następnie komórki traktowano badanymi próbkami (otrzymanymi z owoców) o różnym stopniu rozcieńczenia. Roztwory ekstraktów o różnym stopniu rozcieńczenia przygotowywano w etanolu, natomiast roztwory soków o różnym stopniu rozcieńczenia – w buforze PBS tak, aby objętość każdej z dodawanych próbek wynosiła 0,1 mL w przypadku ekstraktów (stężenie końcowe etanolu podczas inkubacji wynosiło 1 % [v/v]) oraz 0,2 mL w przypadku soków. Próbkę kontrolną stanowiła zawiesina komórkowa (w pożywce) z dodatkiem etanolu o końcowym stężeniu 1 % [v/v] (dla próbek ekstraktów) lub z dodatkiem buforu PBS (dla próbek soków). Inkubację komórek z badanymi próbkami prowadzono przez 3 godziny w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu inkubacji zawartość każdej studzienki przenoszono do probówek i wirowano przez okres 3 minut przy 720 g w temperaturze 4 °C. Roztwór znad osadu zlewano, a osad komórkowy dwukrotnie przemywano za pomocą buforu PBS (1 mL).

2.7.2. Określenie stopnia zahamowania wzrostu komórek przez ekstrakty etanolowe oraz soki otrzymane z owoców aronii i wiciokrzewu sinego

Oznaczenie cytotoksyczności ekstraktów oraz soków uzyskanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego w stosunku do komórek TK6 prowadzono za pomocą metody opartej na liczeniu komórek w komorze hemocytometru. W tym celu z każdej z przygotowanych wcześniej próbek (według procedury opisanej w rozdziale III 2.7.1) pobierano określoną

objętość zawiesiny komórkowej (taką, aby ilość komórek w niej obecnych wynosiła 0,5 mln) i przenoszono ją do następnej probówki. Przeniesioną zawiesinę wirowano (3 min., 720 g, 4 °C), zlewano roztwór znad osadu , zaś osad komórek zawieszano w 1 mL pożywki i całość przenoszono do studzienek płytki 12-dołkowej. Tak przygotowane próbki inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37 °C, przy czym komórki liczono po upływie 24 i 48 godzin od momentu rozpoczęcia traktowania komórek badanymi próbkami otrzymanymi z owoców aronii lub wiciokrzewu sinego. W przypadku gdy gęstość zawiesiny komórkowej po 24-godzinnej inkubacji była wyższa niż 0,8 mln/mL, komórki rozszczepiano w ten sposób, by gęstość zawiesiny wynosiła 0,4 mln/mL i inkubowano przez kolejne 24 godziny.

Na tej podstawie wyliczano aktywność cytotoksyczną badanych próbek, a dokładniej – procent zahamowania wzrostu komórek w obecności badanego ekstraktu etanolowego lub soku otrzymanego z owoców aronii bądź wiciokrzewu sinego w porównaniu do komórek nietraktowanych (badanymi próbkami otrzymanymi z owoców aronii lub wiciokrzewu sinego). Obliczenia wykonywano w następujący sposób:

- dla próbek, których nie rozszczepiano po 24 godzinach inkubacji:

$$x = \frac{próbka\ (2)}{kontrola\ (2)} * 100\ \%, \qquad 1/$$

- dla próbek, które rozszczepiano po 24 godzinach inkubacji:

$$x = \frac{próbka\ (1)}{kontrola\ (1)} * \frac{próbka\ (2)}{kontrola\ (2)} * 100\ \%, \qquad 2/$$

gdzie:
x – procent zahamowania wzrostu komórek (% kontroli),
próbka (1) – gęstość zawiesiny komórkowej po 24-godzinnej inkubacji z badanymi próbkami owoców,
próbka (2) – gęstość zawiesiny komórkowej po 48-godzinnej inkubacji z badanymi próbkami owoców,
kontrola (1) – gęstość zawiesiny komórkowej po 24-godzinnej inkubacji z buforem PBS,
kontrola (2) – gęstość zawiesiny komórkowej po 48-godzinnej inkubacji z buforem PBS.

Wykorzystując obliczone wartości aktywności cytotoksycznej badanych próbek, sporządzano wykresy zależności zahamowania wzrostu komórek (% kontroli) od stężenia badanych próbek otrzymanych z owoców aronii lub wiciokrzewu sinego.

2.8. Oznaczanie genotoksyczności ekstraktów etanolowych oraz soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6

Przygotowanie komórek TK6 do oceny genotoksyczności oraz ich traktowanie badanymi próbkami przeprowadzano według procedury opisanej w punkcie III 2.7.1.

Po policzeniu komórek za pomocą hemocytometru z każdej z przygotowanych wcześniej próbek pobierano taką objętość zawiesiny komórkowej, aby ilość komórek w niej obecnych wynosiła 0,12 mln i przenoszono ją do następnej probówki. Przeniesioną zawiesinę wirowano (3 min., 720 g, 4 °C), zlewano roztwór znad osadu i tak przygotowaną próbkę poddawano analizie za pomocą testu kometowego (ang. *comet assay*). Badanie to obejmowało następujące etapy:

- naniesienie komórek na szkiełka (opisane w rozdziale III 2.10.2),
- lizę komórek (opisaną w rozdziale III 2.10.3),
- traktowanie komórek roztworem enzymu FPG (opisane w rozdziale III 2.10.4),
- rozwijanie DNA i elektroforezę w warunkach alkalicznych (opisane w rozdziale III 2.10.5),
- barwienie DNA i analizę mikroskopową (opisane w rozdziale III 2.10.6).

2.9. Sprawdzenie ochrony ludzkich komórek limfoblastycznych TK6, poddanych stresowi oksydacyjnemu, przez preparaty otrzymane z owoców aronii i wiciokrzewu sinego

Przygotowanie komórek TK6 do sprawdzenia ochronnego działania badanych preparatów otrzymanych z owoców przed reaktywnymi formami tlenu przeprowadzano według procedury opisanej w punkcie III 2.7.1.

Po policzeniu komórek za pomocą hemocytometru z każdej z przygotowanych próbek pobierano taką objętość zawiesiny komórkowej, aby ilość komórek w niej obecnych wynosiła 0,04 mln i przenoszono ją do następnej probówki. Przeniesioną zawiesinę wirowano (3 min., 720 g, 4 °C), zlewano roztwór znad osadu i tak przygotowaną próbkę poddawano analizie za pomocą testu kometowego. Pierwszym etapem tego eksperymentu było naniesienie komórek zawieszonych w agarozie LMP na szkiełka podstawowe (według procedury opisanej w rozdziale III 2.10.2). Przygotowane preparaty mikroskopowe umieszczano w szklanym pojemniku pionowym do barwienia, po czym wlewano do niego 50 μM roztwór nadtlenku wodoru w ilości umożliwiającej całkowite zanurzenie agarozy LMP (około 50 mL). Celem tego etapu było wywołanie uszkodzeń DNA. Inkubację komórek TK6 w roztworze H_2O_2 prowadzono przez okres 5 min. w temperaturze 4 °C, po czym wylewano go z pojemnika, a preparaty mikroskopowe płukano za pomocą buforu PBS (dwukrotnie przez okres 5 min. w temperaturze 4 °C). Kolejne etapy testu kometowego obejmowały:

- lizę komórek (opisaną w rozdziale III 2.10.3),

- rozwijanie DNA i elektroforezę w warunkach alkalicznych (opisane w rozdziale III 2.10.5),
- barwienie DNA i analizę mikroskopową (opisane w rozdziale III 2.10.6).

2.10. Test kometowy – etapy procedury [124]

2.10.1. Pokrycie szkiełek mikroskopowych warstwą agarozy NMP

Szkiełka mikroskopowe zanurzano w przygotowanym (zgodnie z opisem w rozdziale III 1.5) roztworze agarozy NMP. Następnie jedną stronę szkiełka wycierano, zaś drugą pozostawiano do wyschnięcia. Na tę ostatnią nanoszono zawiesinę komórek TK6 w agarozie LMP w dalszych etapach doświadczenia.

2.10.2. Naniesienie komórek na szkiełka mikroskopowe

Do probówek ze zwirowanymi komórkami (przygotowanymi według procedur opisanych w rozdziale III 2.8 lub III 2.9) dodawano roztworu agarozy LMP w ilości równej:

- 420 μL w badaniu służącym do oznaczania genotoksyczności,
- 140 μL w przypadku sprawdzania ochrony komórek TK6 przed działaniem nadtlenku wodoru przez preparaty otrzymane z owoców aronii i wiciokrzewu sinego.

W kolejnym etapie całość dokładnie rozpipetowano. Z tak przygotowanej próbki pobierano zawiesinę i nakładano na dwa oddzielne miejsca na szkiełku podstawowym (przygotowanym do przeprowadzenia testu kometowego według opisu w rozdziale III 2.10.1) w ilości 70 μL na każdą. Naniesioną zawiesinę przykrywano szkiełkiem nakrywkowym (20 x 20 mm), po czym pozostawiano przez okres 5 min. w temperaturze 4 °C. Po zastygnięciu warstwy agarozy LMP szkiełko nakrywkowe zsuwano ze szkiełka podstawowego.

2.10.3. Liza komórek

Szkiełka mikroskopowe z naniesionymi próbkami układano w pionowym pojemniku do barwienia, zalewano buforem lizującym i pozostawiano je przez okres 1 godziny w temperaturze 4 °C bez dostępu światła. Celem tego etapu było przeprowadzenie łagodnej lizy komórek i oddzielenie DNA od białek chromatyny. Po zakończeniu tego etapu bufor lizujący wylewano.

2.10.4. Traktowanie komórek roztworem enzymu FPG

Po zakończeniu etapu lizy szkiełka mikroskopowe z naniesionymi próbkami płukano za pomocą buforu reakcyjnego F trzykrotnie po 5 min. w temperaturze 4 °C bez dostępu światła. Etap ten umożliwiał nie tylko zneutralizowanie próbek do pH ≈ 8, ale też zapewniał odpowiednie warunki dla aktywności enzymu FPG. Następnie próbki przenoszono do łaźni lodowej, po czym nanoszono na nie:

- bufor reakcyjny F w ilości 50 μL na każdą pozycję szkiełka stanowiącego odniesienie w stosunku do próbki traktowanej enzymem FPG,
- roztwór zawierający enzym FPG w ilości 50 μL na każdą właściwą pozycję szkiełka.

Każdą pozycję szkiełka podstawowego przykrywano za pomocą szkiełka nakrywkowego (22 x 22 mm). Przygotowane próbki przenoszono do pojemnika zapewniającego odpowiednią wilgotność. Szkiełka inkubowano w nim przez okres 30 min. w temperaturze 37 °C bez dostępu światła. Te parametry inkubacji stwarzały optymalne warunki dla umożliwienia działania enzymu FPG.

2.10.5. Rozwijanie DNA i elektroforeza w warunkach alkalicznych

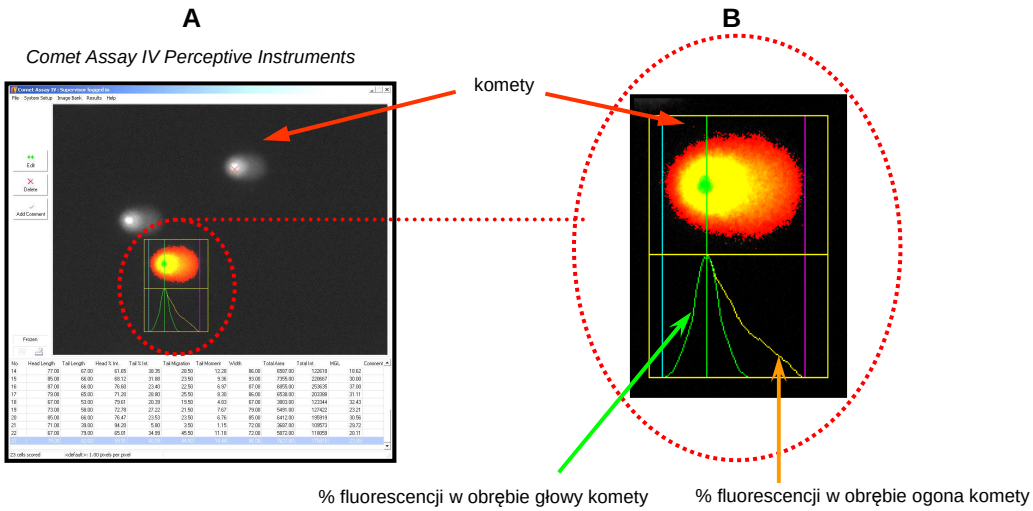
Szkiełka mikroskopowe z naniesionymi próbkami przenoszono do aparatu do elektroforezy i zalewano buforem elektroforetycznym. Etap ten, powodujący relaksację nadkręconego DNA w chromatynie, prowadzono przez 40 min. w temperaturze 4 °C bez dostępu światła. Po upływie tego czasu aparat do elektroforezy podłączano do zasilacza i prowadzono elektroforezę przez 30 min. przy napięciu 25 V i natężeniu 300 mA.

Po zakończeniu tego etapu szkiełka przenoszono do pionowego pojemnika do barwienia, zalewano je buforem PBS i pozostawiano w nim na okres 10 min. Na zakończenie szkiełka przemywano wodą demineralizowaną (10 min.), a następnie wyjmowano z pojemnika i pozostawiano do wyschnięcia.

2.10.6. Barwienie DNA i analiza mikroskopowa

Szkiełka mikroskopowe układano w poziomym pojemniku i zalewano roztworem barwnika SYBR® Gold. Pojemnik przenoszono następnie na wytrząsarkę kołową na okres 40 min. (4 °C, bez dostępu światła). Następnie roztwór SYBR® Gold wylewano, a próbki z wybarwionym DNA przemywano dwukrotnie wodą demineralizowaną i pozostawiono do wyschnięcia. Bezpośrednio przed przeprowadzaniem analizy mikroskopowej na każdy

preparat nanoszono 20 µL wody demineralizowanej i przykrywano go szkiełkiem nakrywkowym (22 x 22 mm). Próbki oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym sprzężonym z kamerą rejestrującą obraz przy powiększeniu 200x (10x okular x 20x soczewka). Oceny stopnia uszkodzenia materiału genetycznego dokonywano przy pomocy programu *Comet Assay IV Perceptive Instruments*. Umożliwia on pomiar intensywności fluorescencji kompleksu barwnika SYBR® Gold – DNA (proporcjonalnej do ilości DNA) znajdującego się w obrębie głowy i ogona komet (rysunek III 10), powstałych na skutek przeprowadzenia poszczególnych etapów testu kometowego.



Rysunek III 10. A - wygląd komet odzwierciedlających stopień uszkodzenia DNA uzyskanych w wyniku przeprowadzenia testu kometowego z użyciem komórek TK6.
B - rozkład intensywności fluorescencji kompleksu barwnika SYBR® Gold – DNA (proporcjonalnej do ilości DNA) znajdującego się w obrębie głowy i ogona komety uwidoczniony przy użyciu programu *Comet Assay IV Perceptive Instruments*.

Na każdym z preparatów mikroskopowych analizowano po 50 jąder komórkowych z każdej pozycji szkiełka. Z otrzymanych wyników dla 100 jąder (pochodzących z jednej próbki, czyli dwóch pozycji szkiełka mikroskopowego) wyznaczano medianę (osobno dla każdego z 3 powtórzeń doświadczenia) z wartości, jakie otrzymywano dla intensywności fluorescencji w obrębie ogonów komet. Wyniki przedstawiano jako wartość średnią (obliczoną z przynajmniej trzech otrzymanych wartości mediany) ± SD (odchylenie standardowe). Na podstawie uzyskanych rezultatów rysowano wykresy zależności intensywności fluorescencji w obrębie ogonów komet odzwierciedlającej uszkodzenia DNA (% DNA w ogonie) od stężenia badanych próbek otrzymanych na bazie owoców aronii i

wiciokrzewu sinego. Im większa była ilość materiału genetycznego znajdującego się w ogonie komety, tym uszkodzenie DNA było większe.

3. Omówienie i dyskusja wyników

W literaturze pojawia się coraz więcej prac poświęconych badaniom i opisom przemian wybranych grup fitozwiązków w trakcie przetwarzania żywności. Na ich podstawie można stwierdzić, że proces technologiczny może przyczyniać się do obniżenia lub podwyższenia zawartości określonych substancji w finalnym produkcie, jak i spowodować powstanie nowych substancji o pozytywnym lub negatywnym działaniu. Badania takie są również prowadzone na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. W przypadku obróbki kulinarnej kapusty białej wykazano, że zarówno ogrzewanie jak i kiszenie podnosi potencjał przeciwutleniający tego warzywa [105]. Z kolei badania zdolności produktów z buraka czerwonego do ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym dowiodły, że żaden z poddanych ocenie produktów dostępnych handlowo nie zachował pozytywnych aktywności obserwowanych w przypadku nieprzetworzonego soku z tego warzywa [125]. Oczywistym jest zatem, że w produkcji żywności funkcjonalnej o potwierdzonym prozdrowotnym działaniu, czyli żywności, która projektowana i produkowana jest w oparciu o wiedzę na temat oddziaływania jej składników na organizm ludzki, niezbędna jest ścisła kontrola procesu produkcyjnego [126].

W badaniach objętych rozprawą doktorską, obok techniki HPLC-DAD umożliwiającej oznaczenie zawartości bioaktywnych fitozwiązków, zastosowano technikę „odcisku palca" przeciwutleniaczy w wybranych próbkach otrzymanych na bazie owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego jako uzupełnienia testów spektrofotometrycznych oraz techniki TLC. Jak już wcześniej wspomniano, reaktywne formy tlenu (RFT), generując stan stresu oksydacyjnego w organizmie ludzkim, przyczyniają się do rozwoju nowotworów, chorób serca, chorób neurodegeneracyjnych, leżą u podłoża procesów starzenia, a nawet szkodliwości zanieczyszczeń środowiskowych [107; 127; 128]. Obecność substancji o charakterze przeciwutleniaczy w żywności jest jedną z najważniejszych obecnie sugerowanych strategii żywieniowych służących ochronie przed toksycznością wywołana przez RFT. Wybór właściwości przeciwutleniających jako markera ma jeszcze dodatkowe uzasadnienie. Jak wskazują na to liczne badania, substancje wykazujące różne cenne ze zdrowotnego punktu widzenia aktywności biologiczne mają często chemicznie charakter przeciwutleniaczy [129].

3.1. Wybór sposobu przygotowania próbek do badań

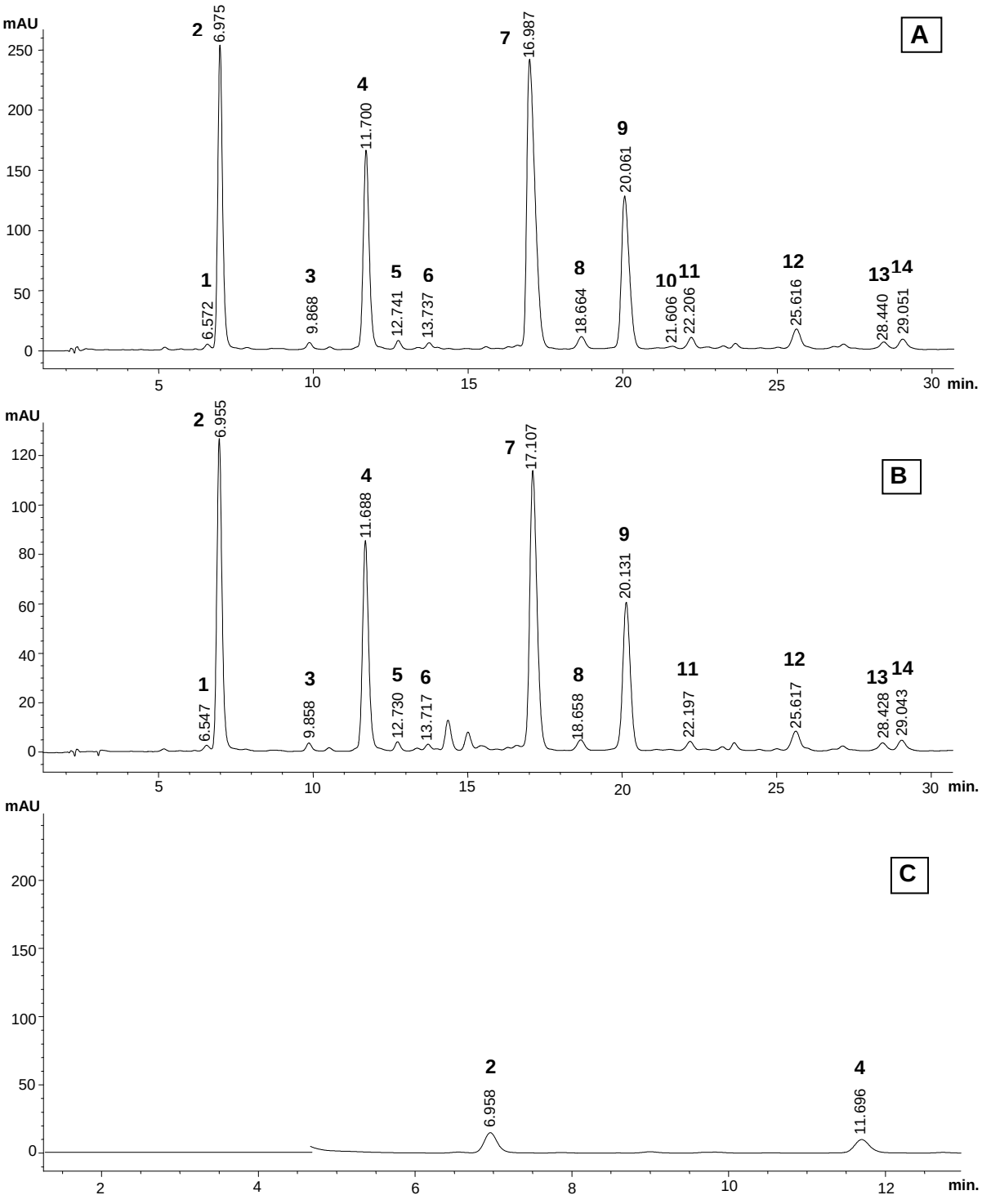
Biorąc pod uwagę fakt, że fitozwiązki, w tym również antocyjany, mogą być w różnym stopniu ekstrahowane z badanych próbek za pomocą poszczególnych rozpuszczalników [130], podjęto próbę wyboru odpowiedniego rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji liofilizatów otrzymanych ze świeżych owoców oraz z produktów uzyskanych z owoców aronii. W tym celu zliofilizowaną próbkę świeżych owoców aronii (określaną jako 6S według oznaczeń produktów zawartych w tabeli III 1) ekstrahowano za pomocą rozpuszczalników takich, jak:

- metanol,
- etanol,
- aceton,
- roztwór metanolu w wodzie (70 %),
- roztwór etanolu w wodzie (70 %),
- roztwór acetonu w wodzie (70 %).

Otrzymane ekstrakty poddano analizie w celu porównania wydajności ekstrakcji pod względem zawartości zidentyfikowanych fitozwiązków oraz całkowitej aktywności przeciwutleniającej. W ten sposób uzyskano wyniki, które były podstawą do doboru rozpuszczalnika służącego do ekstrakcji wszystkich próbek liofilizatów otrzymanych z owoców aronii.

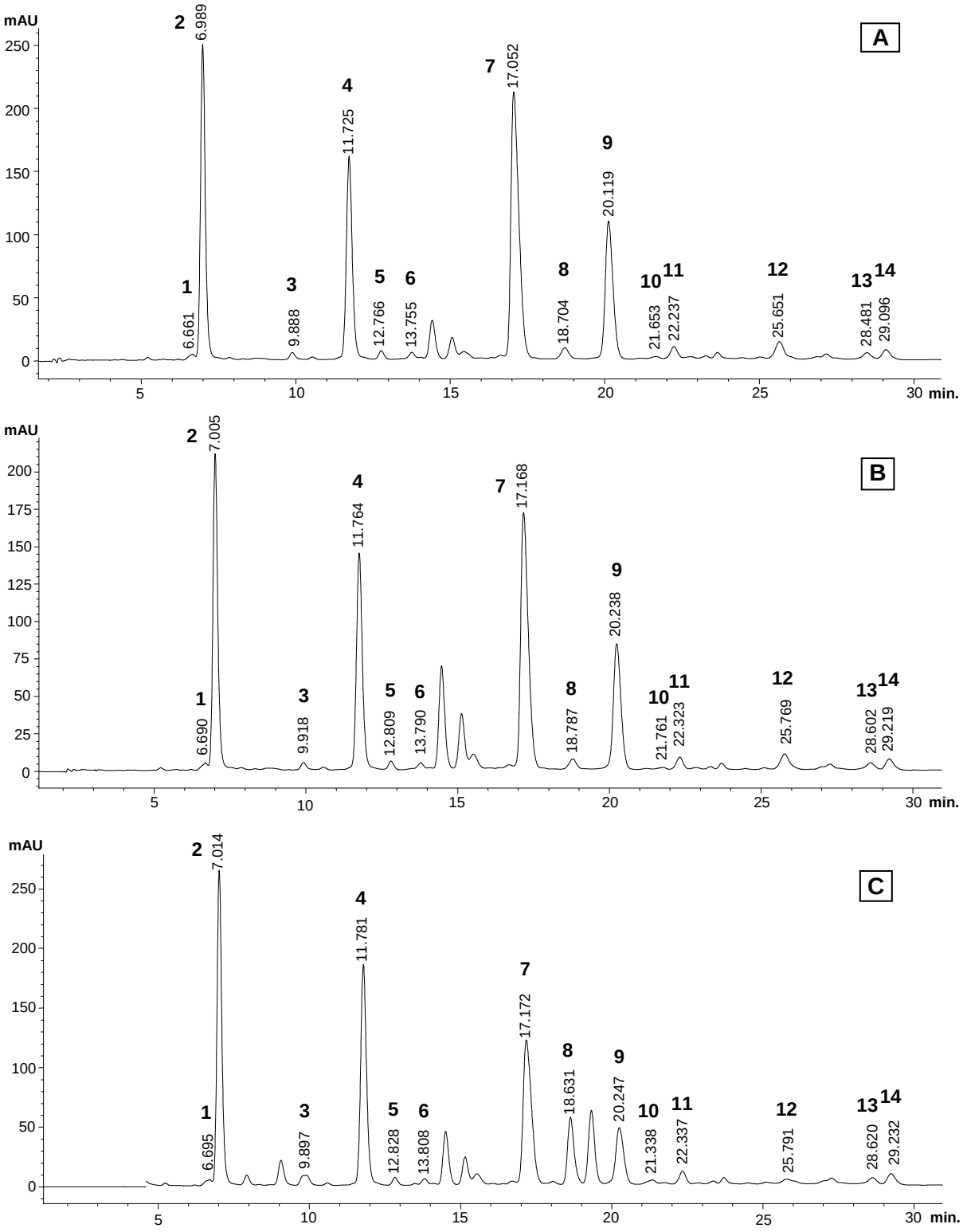
3.1.1. Porównanie zawartości bioaktywnych fitozwiązków w różnych ekstraktach wybranej próbki otrzymanej z owoców aronii

Do oznaczenia zawartości fitozwiązków w otrzymanych ekstraktach wykorzystano technikę HPLC-DAD. Identyfikacji poszczególnych fitozwiązków dokonywano na podstawie czasów retencji oraz widm UV substancji wzorcowych: kwasu chlorogenowego, kwasu kawowego, kwasu protokatechowego, kwasu cynamonowego, kwercetyny, hyperozydu, rutyny, cyjanidyno-3-glukozydu oraz cyjanidyno-3-galaktozydu. Przykładowe chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek odpowiednich ekstraktów przedstawiono na rysunkach III 11 oraz III 12.



Rysunek III 11. Przykładowe chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek ekstraktów otrzymanych z owoców aronii przy użyciu techniki HPLC-DAD. A – ekstrakt metanolowy, B – ekstrakt etanolowy, C – ekstrakt acetonowy.

1 – kwas protokatechowy, 2 – pochodna kwasu chlorogenowego, 3 – pochodna kwasu cynamonowego, 4 – kwas chlorogenowy, 5 – pochodna kwasu kawowego, 6 – kwas kawowy, 7 – cyjanidyno-3-galaktozyd, 8 – cyjanidyno-3-glukozyd, 9 – pochodna cyjanidyny, 10 – związek z grupy antocyjanów, 11 – związek z grupy antocyjanów, 12 – pochodna cyjanidyny, 13 – hyperozyd, 14 – rutyna.



Rysunek III 12. Przykładowe chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek ekstraktów otrzymanych z owoców aronii przy użyciu techniki HPLC-DAD. Ekstrakty otrzymane za pomocą 70 % roztworów wodnych: A – metanolu, B – etanolu, C – acetonu.

1 – kwas protokatechowy, 2 – pochodna kwasu chlorogenowego, 3 – pochodna kwasu cynamonowego, 4 – kwas chlorogenowy, 5 – pochodna kwasu kawowego, 6 – kwas kawowy, 7 – cyjanidyno-3-galaktozyd, 8 – cyjanidyno-3-glukozyd, 9 – pochodna cyjanidyny, 10 – związek z grupy antocyjanów, 11 – związek z grupy antocyjanów, 12 – pochodna cyjanidyny, 13 – hyperozyd, 14 – rutyna.

Tabela III 4. Zawartości zidentyfikowanych związków w ekstraktach otrzymanych z próbki owoców aronii 6S.

związek	ekstrakty otrzymane za pomocą:			ekstrakty otrzymane za pomocą 70 % wodnych roztworów:		
	metanolu	etanolu	acetonu	metanolu	etanolu	acetonu
kwas protokatechowy [mg/g s.m.]	0,0366 ± 0,0068	s	-	0,106 ± 0,016	0,127 ± 0,017	0,160 ± 0,017
kwas chlorogenowy [mg/g s.m.]	2,96 ± 0,25	1,91 ± 0,21	0,234 ± 0,012	3,022 ± 0,089	2,88 ± 0,16	3,45 ± 0,18
kwas kawowy [mg/g s.m.]	0,0599 ± 0,0056	0,0336 ± 0,0047	-	0,0577 ± 0,0021	0,0482 ± 0,0028	0,0631 ± 0,0043
hyperozyd [mg/g s.m.]	0,556 ± 0,067	0,333 ± 0,038	-	0,540 ± 0,055	0,471 ± 0,026	0,522 ± 0,024
rutyna [mg/g s.m.]	0,667 ± 0,038	0,421 ± 0,072	-	0,755 ± 0,025	0,688 ± 0,038	0,747 ± 0,067
kwercetyna [mg/g s.m.]	-	-	-	0,07449 ± 0,00073	-	-
cyjanidyno-3-galaktozyd [mg/g s.m.]	19,7 ± 2,0	10,0 ± 1,1	0,032 ± 0,012	17,15 ± 0,98	14,2 ± 1,0	4,49 ± 0,47
cyjanidyno-3-glukozyd [mg/g s.m.]	0,576 ± 0,058	0,308 ± 0,031	-	0,501 ± 0,025	0,413 ± 0,028	0,148 ± 0,027

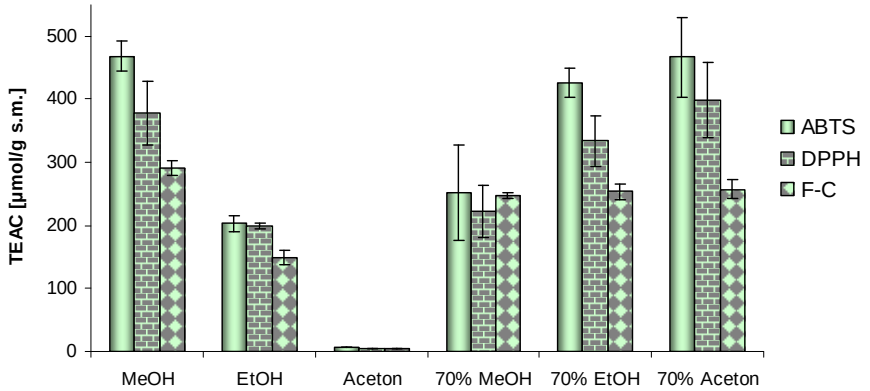
s, ilości śladowe

Przedstawione wyniki są średnią z 3 niezależnych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD). Kolorem czerwonym oznaczono najwyższe stężenia poszczególnych fitozwiązków zidentyfikowanych w badanych ekstraktach.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że oznaczane związki w największych stężeniach występują w ekstraktach otrzymanych za pomocą metanolu oraz za pomocą 70 % roztworu metanolu lub acetonu w wodzie. Zawartość kwasu chlorogenowego, kawowego i protokatechowego okazała się być największa w ekstrakcie otrzymanym za pomocą 70 % wodnego roztworu acetonu. Stężenie rutyny oraz kwercetyny było największe w ekstrakcie otrzymanym za pomocą 70 % roztworu metanolu w wodzie. Niemniej jednak zawartość zarówno hyperozydu, jak i dwóch zidentyfikowanych związków z grupy antocyjanów (cyjanidyno-3-glukozydu oraz cyjanidyno-3-galaktozydu) okazała się być największa w ekstrakcie uzyskanym w wyniku zastosowania metanolu jako czynnika ekstrahującego. Pozostałe rozpuszczalniki (etanol, aceton oraz roztwór wodny etanolu) okazały się być mniej efektywnymi ekstrahentami dla próbki liofilizatu otrzymanego z owoców aronii.

3.1.2. Porównanie całkowitej aktywności przeciwutleniającej różnych ekstraktów wybranej próbki owoców aronii

W celu oznaczenia właściwości przeciwutleniających poszczególnych ekstraktów posłużono się testami: ABTS, DPPH oraz testem opartym na wykorzystaniu odczynnika *Folina-Ciocalteu'a* (F-C). Aktywność przeciwutleniającą wyznaczono na podstawie sporządzonych krzywych wzorcowych uzyskanych w wyniku oznaczeń przeprowadzonych dla próbek wzorcowego roztworu Troloxu (w metanolu). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku III 13.



Rysunek III 13. Właściwości przeciwutleniające próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych otrzymanych z owoców aronii określone za pomocą testów ABTS, DPPH oraz testu, w którym wykorzystuje się odczynnik F-C w przeliczeniu na równoważniki Troloxu [µmol/g s.m.]. Przedstawione wyniki są średnią z 3 niezależnych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD).

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że próbka owoców aronii (określana jako 6S według oznaczeń produktów zawartych w tabeli III 1) ekstrahowana za pomocą metanolu wykazuje największą aktywność przeciwutleniającą w przypadku stosowania testu ABTS oraz testu wykorzystującego odczynnik F-C w porównaniu z innymi próbkami. W teście DPPH największy potencjał przeciwutleniający obserwowany był dla próbki ekstrahowanej za pomocą 70 % roztworu acetonu w wodzie. W przypadku pozostałych próbek stwierdzono mniejszą aktywność przeciwutleniającą.

Wybór rozpuszczalnika do ekstrakcji próbek liofilizatów ze świeżych owoców oraz produktów otrzymanych z owoców aronii

Przedstawione powyżej wyniki oznaczeń zawartości poszczególnych fitozwiązków oraz aktywności przeciwutleniającej próbki owoców aronii (próbka 6S) dowiodły, że spośród

wszystkich przebadanych ekstrahentów najbardziej efektywnym rozpuszczalnikiem jest metanol. Zatem rozpuszczalnik ten postanowiono stosować w kolejnych etapach badań.

Wybór rozpuszczalnika do ekstrakcji próbek liofilizatów ze świeżych owoców wiciokrzewu sinego

Analogiczne badania do tych, które przedstawiono powyżej (dotyczące wyboru rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji liofilizatów otrzymanych z owoców aronii), przeprowadzono na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w roku 2009 dla próbek liofilizatów otrzymanych z owoców wiciokrzewu sinego. Eksperymenty te objęły m.in. porównanie efektywności ekstrakcji liofilizatów otrzymanych z różnych odmian owoców wiciokrzewu sinego za pomocą tych samych rozpuszczalników, co w przypadku liofilizatu otrzymanego z owoców aronii (próbka 5S), pod kątem całkowitej aktywności przeciwutleniającej. Przeprowadzono również analizę chromatograficzną (z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD) badanych próbek, zaś wyniki przedstawiono w postaci chromatogramów typu „odcisk palca". Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najbardziej efektywnym rozpuszczalnikiem użytym do ekstrakcji liofilizatów otrzymanych z owoców różnych odmian wiciokrzewu sinego był metanol [131]. Zatem ekstrahent ten zastosowano również w eksperymentach (na etapie przygotowywania liofilizatów otrzymanych na bazie owoców wiciokrzewu sinego do badań) wykonywanych w ramach rozprawy doktorskiej.

Jak wspomniano w rozdziale III 2.1, w przypadku liofilizatów otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego wykorzystywanych w badaniach z użyciem komórek TK6, jako rozpuszczalnik do ekstrakcji stosowano 70 % roztwór etanolu. Wynikało to ze zbyt dużej toksyczności metanolu w stosunku do komórek eukariotycznych.

3.2. Porównanie zawartości bioaktywnych fitozwiązków w różnych produktach spożywczych otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego

Mając na uwadze fakt, że zawartość substancji występujących w owocach może zmieniać się w trakcie przetwarzania surowca [132], podjęto próbę identyfikacji oraz oznaczenia stężeń poszczególnych bioaktywnych fitozwiązków zarówno w świeżych owocach, jak i w produktach spożywczych otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego. W tym celu zgromadzone próbki podzielono na cztery grupy:

- próbki świeżych owoców aronii (określone jako 1S – 8S według oznaczeń zawartych w tabeli III 1) pochodzące z różnych upraw zlokalizowanych na terenie Polski (woj. pomorskie, kujawsko-pomorskie, łódzkie, lubuskie), otrzymane ze zbiorów z różnych lat (z roku 2006, 2007, 2008) oraz próbki owoców różnych odmian wiciokrzewu sinego (określone jako W, B, Z,. WK, BR, J, ZL, 44 według oznaczeń zawartych w tabeli III 1) pochodzące z dwóch lokalizacji (woj. pomorskie oraz kujawsko-pomorskie) i zebrane w 2008 roku;
- próbka dżemu (określana jako 1D) otrzymanego z owoców aronii (7S) oraz próbki pobrane podczas kolejnych etapów produkcji dżemu (określone jako 1DM – 4DM) wraz z surowcem wyjściowym (próbka świeżych owoców aronii oznaczona jako 8S);
- próbki soków otrzymanych z owoców aronii (1h – 5h) oraz wiciokrzewu sinego (J-1h – J-5h) ogrzewane w temperaturze 100 °C przez okres 1 – 5 godzin;
- próbki soków otrzymane z owoców aronii i wiciokrzewu sinego ogrzewane za pomocą urządzenia *EnbioJet* (oznaczenia próbek są odpowiednikiem temperatury prowadzenia procesu obróbki soków w zakresie 90 °C – 135 °C i dodatkowo w temperaturze 80 °C dla soku z wiciokrzewu sinego).

Oznaczenie składu fitokompleksu próbek soków i metanolowych ekstraktów otrzymanych ze zliofilizowanych owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego przeprowadzono za pomocą metodyki, w której na etapie oznaczeń końcowych wykorzystuje się technikę HPLC-DAD. Wykonane badania umożliwiły zidentyfikowanie oraz oznaczenie zawartości następujących ośmiu bioaktywnych fitozwiązków w analizowanych próbkach:

- kwas protokatechowy,
- kwas chlorogenowy,
- kwas kawowy,
- hyperozyd,
- rutyna,
- kwercetyna,
- cyjanidyno-3-galaktozyd,
- cyjanidyno-3-glukozyd.

3.2.1. Porównanie zawartości bioaktywnych fitozwiązków w próbkach świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego

W kształtowaniu właściwości prozdrowotnych owoców, w tym też właściwości przeciwutleniających, ważną rolę odgrywają polifenole. Jak jednak wiadomo, w obrębie tego samego gatunku można zidentyfikować fitozwiązki, których zawartość w owocach różni się w zależności od miejsca i warunków uprawy rośliny, z której zostały one zebrane, a także od toku postępowania z owocami do momentu ich konsumpcji w postaci surowej lub przetworzonej. Toteż kolejne doświadczenia służyły wyodrębnieniu owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego o najkorzystniejszym składzie substancji bioaktywnych. W tym celu we wszystkich próbkach metanolowych ekstraktów liofilizatów otrzymanych ze świeżych owoców oznaczono zawartość polifenoli. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli III 5.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że owoce aronii charakteryzują się bardzo dużą zawartością cyjanidyno-3-galaktozydu. Spośród wszystkich zgromadzonych próbek świeżych owoców aronii największymi zawartościami tego związku charakteryzowała się próbka owoców zebranych w 2008 roku z uprawy położonej w ogródkach działkowych na terenie Gdańska (określona jako 5S według oznaczeń zawartych w tabeli III 1). Nieznacznie mniejsze stężenia cyjanidyno-3-galaktozydu zaobserwowano dla próbek, które również pochodziły ze zbiorów z 2008 roku, a mianowicie – dla owoców oznaczonych jako 6S (miejsce uprawy: Gdańsk-Osowa) oraz 8S (miejsce uprawy: Brusy, firma „Fungopol”). Porównywalny poziom tego fitozwiązku zauważono w przypadku próbki 4S zebranej w 2007 roku (pochodzenie: firma „Agropharm”). Najmniejszą zawartością cyjanidyno-3-galaktozydu charakteryzowała się próbka 1S zebrana w Tarnówce w 2006 roku. Stężenie drugiego związku z grupy antocyjanów, cyjanidyno-3-glukozydu, okazało się być dużo mniejsze w porównaniu do zawartości cyjanidyno-3-galaktozydu w badanych próbkach świeżych owoców aronii. Zawartość tego pierwszego była największa w przypadku próbki 4S, zaś najmniejsza dla 1S. Owoce aronii charakteryzują się stosunkowo wysokim poziomem stężenia kwasu chlorogenowego, najwyższym dla próbki oznaczonej jako 6S (miejsce uprawy: Gdańsk-Osowa, rok zbioru: 2008), zaś najniższym – dla 7S (miejsce uprawy: Brusy, firma „Fungopol”, rok zbioru: 2008). Zawartość hyperozydu oraz rutyny była mniejsza niż ilość kwasu chlorogenowego w tych owocach. Największym stężeniem tych dwóch fitozwiązków charakteryzowała się próbka 8S, zaś próbka 1S – najmniejszym.

Tabela III 5. Zawartość bioaktywnych fitozwiązków w próbkach świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego oznaczona w ekstraktach rozpuszczalnikowych przy zastosowaniu techniki HPLC-DAD.

owoc	próbka	STĘŻENIA ZWIĄZKÓW [mg/g s.m.]							
		kwas protokatechowy	kwas chlorogenowy	kwas kawowy	hyperozyd	rutyna	kwercetyna	cyjanidyno-3-galaktozyd	cyjanidyno-3-glukozyd
aronia	1S	0,08766 ± 0,00094	2,106 ± 0,027	s	0,582 ± 0,050	0,913 ± 0,050	nw	13,12 ± 0,31	0,3981 ± 0,0074
	2S	0,0657 ± 0,0010	2,8736 ± 0,0018	nw	0,727 ± 0,058	1,2418 ± 0,0071	nw	19,26 ± 0,12	0,6779 ± 0,0016
	3S	nw	3,251 ± 0,056	s	0,665 ± 0,088	1,108 ± 0,023	nw	17,23 ± 0,22	0,6244 ± 0,0096
	4S	0,048 ± 0,044	2,762 ± 0,022	s	0,902 ± 0,054	1,218 ± 0,012	nw	20,16 ± 0,11	0,755 ± 0,030
	5S	s	3,266 ± 0,013	s	0,688 ± 0,070	0,938 ± 0,042	nw	21,8537 ± 0,0095	0,6406 ± 0,0015
	6S	s	4,919 ± 0,051	0,0999 ± 0,0037	1,011 ± 0,076	1,579 ± 0,040	nw	20,57 ± 0,14	0,6665 ± 0,0063
	7S	s	1,854 ± 0,033	0,029 ± 0,011	0,928 ± 0,030	1,271 ± 0,030	nw	16,281 ± 0,081	0,5999 ± 0,0053
	8S	0,064 ± 0,046	3,788 ± 0,019	s	1,204 ± 0,052	1,65 ± 0,12	nw	20,39 ± 0,13	0,71315 ± 0,00085
wiciokrzew siny	W	nw	3,8284 ± 0,0028	nw	nw	2,849 ± 0,076	nw	nw	22,31 ± 0,12
	B	nw	2,288 ± 0,050	s	nw	1,832 ± 0,048	0,152 ± 0,011	nw	21,95 ± 0,33
	Z	0,0689 ± 0,0025	2,2900 ± 0,0028	s	nw	2,486 ± 0,011	0,515 ± 0,020	nw	17,238 ± 0,022
	WK	nw	2,016 ± 0,014	nw	nw	1,6691 ± 0,0079	nw	nw	17,64 ± 0,26
	BR	nw	2,324 ± 0,020	nw	nw	1,600 ± 0,097	nw	nw	15,49 ± 0,18
	ZL	nw	1,416 ± 0,020	s	nw	2,132 ± 0,072	0,6197 ± 0,0089	nw	16,74 ± 0,28
	J	0,196 ± 0,012	3,4505 ± 0,0090	0,080 ± 0,013	nw	2,88 ± 0,11	1,058 ± 0,032	nw	26,36 ± 0,20
	44	nw	2,376 ± 0,032	nw	nw	1,527 ± 0,018	nw	nw	16,68 ± 0,15

s, ilości śladowe; nw, nie wykryto

Przedstawione wyniki są średnią z 3 równoległych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD).

Kolorem czerwonym oznaczono najwyższe stężenia badanych substancji w próbkach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego.

Ilość kwasów: protokatechowego oraz kawowego w próbkach owoców aronii okazała się być nieznaczna. Ponadto w żadnej z próbek świeżych owoców aronii nie wykryto kwercetyny.

Co ciekawe, porównując próbki świeżych owoców aronii (1S oraz 2S) pochodzących z tej samej lokalizacji (Tarnówka), ale ze zbiorów z różnych lat (z roku 2006 i 2007) pod kątem ilości znajdujących się w nich bioaktywnych związków, zaobserwowano większą zawartość prawie wszystkich oznaczanych substancji w próbkach zebranych w 2007 roku. Wyjątkiem w tym przypadku była zawartość kwasu protokatechowego oraz kawowego, która okazała się być większa dla próbki pochodzącej ze zbiorów w 2006 roku. Analizując otrzymane wyniki oznaczeń warto również zwrócić uwagę na to, że wpływ na zawartość poszczególnych związków (obok roku zbioru) miał również czas zbioru owoców aronii w danym sezonie. Różnice w tym zakresie można było dostrzec na przykładzie próbek świeżych owoców aronii oznaczonych jako 7S oraz 8S. Obie partie owoców pochodziły z tej samej plantacji, jednakże zebrane zostały w różnym czasie – pierwsza partia świeżych owoców (próbka 7S) została zebrana na początku września, zaś druga partia (próbka 8S) pod koniec września 2008 roku. Zawartości wszystkich oznaczonych fitozwiązków (za wyjątkiem kwasu kawowego) w próbce 7S okazały się być mniejsze niż stężenia tych związków w próbce 8S. Najbardziej wyraźną różnicę było widać na przykładzie cyjanidyno-3-galaktozydu, którego stężenie w próbce owoców zebranych pod koniec września było o około 25 % większe niż w próbce pochodzącej ze zbiorów z początku tego samego miesiąca. Co więcej, zawartość kwasu chlorogenowego w próbce 8S okazała się być 2-krotnie większa niż ilość tej substancji w próbce owoców aronii oznaczonej jako 7S. Obserwacje te potwierdzają opisaną także dla innych gatunków roślin zależność, że im dłuższy jest czas dojrzewania owoców aronii w danym sezonie, tym większa jest zawartość bioaktywnych fitozwiązków w tych owocach.

Owoce wiciokrzewu sinego w porównaniu do aronii charakteryzowały się mniejszą zawartością polifenoli. Należy jednak podkreślić, że stężenie cyjanidyno-3-glukozydu w próbkach świeżych owoców wiciokrzewu sinego okazało się być bardzo duże (znacznie większe niż w przypadku owoców aronii). Największa ilość tego związku występowała w próbce owoców wiciokrzewu sinego odmiany „Jolanta” (określona symbolem „J” według oznaczeń w tabeli III 1). Najmniejszą zawartość tego związku odnotowano w przypadku owoców odmiany o nazwie „Brązowa” (BR), pochodzącej z Osielska. Natomiast w owocach żadnej z odmian wiciokrzewu sinego nie wykryto cyjanidyno-3-galaktozydu ani hyperozydu. Niemniej jednak, podobnie jak w przypadku owoców aronii, we wszystkich próbkach owoców wiciokrzewu sinego stwierdzono obecność znacznych ilości kwasu chlorogenowego. Największą zawartością tego związku charakteryzowały się owoce odmiany „Wojtek” (W)

pochodzącej z Lęborka, natomiast najmniejszą – owoce odmiany „Zielona" (ZL) zebranej w Osielsku. Porównując stężenia rutyny w obrębie zgromadzonych próbek wiciokrzewu sinego stwierdzono, że największa ilość tej substancji występowała w przypadku owoców odmiany „Jolanta" (J), zaś najmniejszą odnotowano dla owoców odmiany o numerze 44 (pochodzącej z Osielska). Najwyższym poziomem stężenia kwasu kawowego wśród wszystkich próbek świeżych owoców wiciokrzewu sinego charakteryzowały się owoce odmiany „Jolanta". Kwas protokatechowy oraz kwercetynę wykryto w owocach odmian: „Jolanta" (w największym stężeniu w porównaniu z innymi próbkami owoców wiciokrzewu sinego) i „Zielona" (pochodząca z Lęborka) oraz dodatkowo ten ostatni związek znaleziono w owocach odmiany „Brązowa" z Lęborka i „Zielona" z Osielska.

Analizując otrzymane wyniki dla tych samych odmian owoców wiciokrzewu sinego („Wojtek", „Brązowa", „Zielona") pochodzących z dwóch różnych lokalizacji, tj. Lęborka oraz Osielska, stwierdzono, że stężenie prawie wszystkich oznaczonych fitozwiązków było większe w owocach zebranych w Lęborku. Wyjątek stanowiły jedynie owoce odmiany „Zielona" (ZL) z Osielska, w których zawartość kwercetyny była większa niż w przypadku owoców tej samej odmiany pochodzącej z Lęborka. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zarówno odmiana, jak i miejsce pochodzenia owoców mają istotne znaczenie w przemyśle spożywczym. Podczas procesów obróbki surowca część związków polifenolowych może zostać utracona, dlatego ważne jest, aby owoce użyte do produkcji artykułów żywnościowych charakteryzowały się jak największą zawartością bioaktywnych fitozwiązków.

Podsumowując, należy podkreślić, że otrzymane wyniki mogą stanowić dowód na to, że ze względu na skład fitokompleksu owoce aronii zaleca się zbierać w danym sezonie począwszy od ostatniej dekady miesiąca września. Ponadto, warto dodać, że ze zdrowotnego punktu widzenia najlepszymi owocami wiciokrzewu sinego są owoce odmiany „Jolanta".

3.2.2. Zmiany zawartości bioaktywnych fitozwiązków w próbkach owoców aronii pobranych podczas produkcji dżemów

Jak już wcześniej wspomniano, sposób przetwarzania owoców może mieć istotny wpływ na zawartość substancji bioaktywnych w produkcie końcowym. Tym samym ważna staje się wiedza na temat zmian stężenia związków polifenolowych w surowcu podczas kolejnych etapów produkcji artykułów spożywczych. Pozwala ona na wskazanie etapów, w

których zachodzą największe zmiany w składzie fitokompleksu owoców, co tym samym może grozić utratą właściwości prozdrowotnych.

W celu wyodrębnienia etapów obróbki surowca, które mogą mieć kluczowe znaczenie w tym zakresie podczas otrzymywania produktów spożywczych, prześledzono zawartość polifenoli w owocach aronii w trakcie produkcji dżemów. W doświadczeniach tych metanolowy ekstrakt liofilizatu otrzymanego ze świeżych owoców określonych jako 7S (według oznaczeń w tabeli III 1) porównano pod kątem zawartości fitozwiązków z metanolowym ekstraktem liofilizatu otrzymanym z próbki dżemu – 1D. Analogiczny eksperyment przeprowadzono dla próbki owoców aronii określonej jako 8S i dla próbki dżemu określonej jako 4DM oraz dla próbek pobranych na poszczególnych etapach produkcji tego artykułu spożywczego (próbki oznaczone jako 1DM – 3DM). Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli III 6.

W wyniku przeprowadzonych badań okazało się, że próbka dżemu określana jako 1D charakteryzowała się mniejszą zawartością wszystkich oznaczanych fitozwiązków za wyjątkiem kwasu protokatechowego, którego ilość w produkcie była większa w porównaniu z surowcem wyjściowym (7S). Największą różnicę odnotowano w przypadku dwóch związków z grupy antocyjanów, a mianowicie: cyjanidyno-3-galaktozydu oraz cyjanidyno-3-glukozydu, których zawartość okazała się być 50-krotnie mniejsza w próbce dżemu 1D w porównaniu z surowcem (owoce 7S). Ilość kwasu kawowego w próbce tego produktu (1D) również drastycznie różniła się od jego stężenia w owocach (7S). W dżemie bowiem zauważono obecność tej substancji tylko w ilościach śladowych. Zawartość pozostałych związków (kwasu chlorogenowego, hyperozydu, rutyny) także okazała się być mniejsza w próbce dżemu (1D) w porównaniu do stężenia tych substancji w próbce świeżych owoców aronii (7S). Różnica ta była mniejsza niż w przypadku pozostałych związków, niemniej jednak, podobnie jak dla reszty oznaczonych polifenoli, również statystycznie istotna.

Spadek zawartości fitozwiązków pod wpływem obróbki zauważono również dla poszczególnych próbek pobieranych podczas kolejnych etapów produkcji dżemu określonego symbolem 4DM (według oznaczeń w tabeli III 1). Surowiec użyty do jego produkcji (owoce aronii 8S) charakteryzował się największą zawartością oznaczanych substancji za wyjątkiem kwasu protokatechowego. Ilość tego ostatniego związku na każdym etapie produkcji dżemu nieznacznie wzrastała. W próbce umytych owoców (1DM) odnotowano prawie identyczne stężenia wszystkich oznaczonych związków w porównaniu z surowcem (8S). Statystycznie istotny spadek zawartości polifenoli takich, jak: cyjanidyno-3-galaktozyd, cyjanidyno-3-glukozyd, kwas chlorogenowy i kawowy zaobserwowano dla próbki pobranej po

rozdrobnieniu owoców (próbka 2DM) w porównaniu ze świeżymi owocami (8S). Jednakże etapem przetwarzania, w którym stężenia wszystkich związków, za wyjątkiem wspomnianego wcześniej kwasu protokatechowego, zmalały w największym stopniu, okazało się gotowanie rozdrobnionych owoców z cukrem (pobrana próbka oznaczona jako 3DM). Podczas tego etapu produkcji dżemu zawartości oznaczanych substancji w pobranej próbce były od około 3 (dla kwasu chlorogenowego) do 6 razy mniejsze (dla cyjanidyno-3-galaktozydu) w porównaniu z surowcem (świeżymi owocami aronii – próbką 8S). Podczas procesu pasteryzacji stężenie tych związków nie spadło już tak silnie. Niemniej jednak ilości fitozwiązków w produkcie końcowym po pasteryzacji (4DM) były znacząco mniejsze niż w surowcu wyjściowym (8S). Zawartość kwasu chlorogenowego w próbce dżemu (4DM) obniżyła się ponad 3-krotnie, stężenie hyperozydu i rutyny zmalało 5-krotnie, zaś ilość antocyjanów – około 20-krotnie w porównaniu z próbką owoców 8S. Należy jednak dodać, że obserwowana wyższa zawartość fitozwiązków w próbce dżemu 4DM, w porównaniu z ich ilością w próbce produktu 1D, wynika z większego stężenia tych substancji w surowcu wyjściowym (w próbce owoców 8S w porównaniu z 7S).

Warto podkreślić, że w przypadku produkcji obu dżemów (próbka 1D oraz 4DM) otrzymanych na bazie owoców aronii (oznaczonych odpowiednio: 7S oraz 8S) zaobserwowano podobne zależności w stosunku do zawartości poszczególnych fitozwiązków. Zawartość polifenoli zarówno w jednym, jak i drugim produkcie znacząco spadła (najbardziej drastycznie w przypadku antocyjanów) w porównaniu ze świeżymi owocami. Wyjątek stanowił jedynie kwas protokatechowy, którego ilość wzrosła nieznacznie w próbce 4DM, zaś znacząco w próbce 1D. Przyczyną takiej sytuacji mogło być powstawanie tego kwasu podczas rozpadu innych fitozwiązków w trakcie przetwarzania.

Mając na uwadze powyższe wyniki, można stwierdzić, że największe straty substancji bioaktywnych następowały podczas poddania surowca działaniu wysokiej temperatury, mniejsze zaś w trakcie operacji rozdrabniania owoców. Ograniczenie czasu trwania obróbki termicznej to najważniejszy parametr technologiczny wymagający zoptymalizowania w przypadku produkcji żywności o wysokiej jakości zdrowotnej.

Tabela III 6. Zawartość bioaktywnych fitozwiązków w próbkach produktów otrzymanych z owoców aronii oznaczona przy zastosowaniu techniki HPLC-DAD.

owoc	próbka	STĘŻENIA ZWIĄZKÓW [mg/g s.m.]																	
		kwas protokatechowy		kwas chlorogenowy		kwas kawowy	hyperozyd		rutyna		kwercetyna	cyjanidyno-3-galaktozyd		cyjanidyno-3-glukozyd	
aronia	7S	s		1,854 ± 0,033		0,029 ± 0,011	0,928 ± 0,030		1,271 ± 0,030		nw	16,281 ± 0,081		0,5999 ± 0,0053	
	1D	0,1262 ± 0,0017		0,68870 ± 0,00063	*	s	0,1378 ± 0,0017	*	0,2341 ± 0,0047	*	nw	0,3277 ± 0,0019	**	0,0120 ± 0,0017	**
	8S	0,064 ± 0,046		3,788 ± 0,019		s	1,204 ± 0,052		1,65 ± 0,12		nw	20,39 ± 0,13		0,71315 ± 0,00085	
	1DM	0,063 ± 0,055	ns	3,803 ± 0,046	ns	s	1,131 ± 0,042	ns	1,5291 ± 0,0018	ns	nw	20,53 ± 0,33	ns	0,7078 ± 0,0092	ns
	2DM	0,098 ± 0,043	ns	3,205 ± 0,072	*	nw	1,0220 ± 0,0069	ns	1,297 ± 0,011	ns	nw	15,52 ± 0,18	**	0,6140 ± 0,0095	*
	3DM	0,101 ± 0,040	ns	1,182 ± 0,040	***	nw	0,279 ± 0,037	**	0,3141 ± 0,0042	*	nw	3,46 ± 0,10	***	0,1360 ± 0,0058	**
	4DM	0,1256 ± 0,0084	ns	1,122 ± 0,020	***	nw	0,2400 ± 0,0050	***	0,3177 ± 0,0068	*	nw	0,9850 ± 0,0096	**	0,0388 ± 0,0013	***

s, ilości śladowe; nw, nie wykryto

Przedstawione wyniki są średnią z 3 równoległych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD). Analizę statystyczną pomiędzy próbkami świeżych owoców (7S lub 8S) oraz próbkami owoców poddanych przetwarzaniu (odpowiednio: 1D lub 1DM – 4DM) prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns – statystycznie nieistotne).

Kolorem czerwonym oznaczono najwyższe stężenia badanych substancji w próbkach otrzymanych z owoców aronii na etapie otrzymywania dwóch partii dżemów (z owoców oznaczonych jako 7S oraz 8S).

3.2.3. Zawartość bioaktywnych fitozwiązków w próbkach soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych tradycyjnej obróbce termicznej

Jednym z obecnych trendów na rynku spożywczym jest żywność o wysokiej jakości zdrowotnej. Konsumenci znają ten termin i coraz chętniej sięgają po produkty przygotowane w sposób tradycyjny, bez syntetycznych dodatków. Powszechną gamę takich artykułów spożywczych stanowią wyroby otrzymywane z owoców poddanych obróbce termicznej w temperaturze 100 °C. Ten kulinarny zabieg często może trwać nawet kilka godzin (np. podczas produkcji niektórych dżemów). Jak już wcześniej wykazano na przykładzie owoców aronii (w rozdziale III 3.2.2), obróbka termiczna może wywołać duże straty związków polifenolowych w czasie krótszym niż 1 godzina. W ramach pracy doktorskiej postanowiono sprawdzić jakie zmiany zachodzą w poziomie zawartości fitozwiązków pod wpływem dłuższego czasu ogrzewania. W tym celu próbki soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego ogrzewano w temperaturze 100 °C przez okres od 1 do 5 godzin. Otrzymane wyniki zawartości oznaczonych polifenoli w badanych próbkach soków zestawiono w tabeli III 7.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że stężenie związku występującego w próbce soku z aronii w najwyższym stężeniu, cyjanidyno-3-galaktozydu, po 1 godzinie ogrzewania było 3-krotnie mniejsze w porównaniu z jego ilością w próbce niepoddanej temu zabiegowi (próbka oznaczona jako KON według opisu w tabeli III 1). Dłuższy czas ogrzewania (do 5 godzin) wywołał znaczny ubytek tej substancji. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku drugiego związku z grupy antocyjanów – cyjanidyno-3-glukozydu, ponieważ po poddaniu soku działaniu temperatury 100 °C przez 1 godzinę jego ilość zmalała 2-krotnie. Jego stężenie zmniejszało się wraz z długością czasu ogrzewania. Po 5 godzinach obróbki termicznej w próbce wykryto tylko śladowe ilości tego fitozwiązku. Próbka soku z owoców aronii charakteryzowała się stosunkowo dużą zawartością kwasu chlorogenowego, którego stężenie nieznacznie spadło po 2 godzinach ogrzewania i następnie pozostawało na podobnym poziomie do końca prowadzenia doświadczenia. Z kolei zawartość rutyny w próbce soku z owoców aronii nie ulegała zmianie w ciągu 4 godzin termicznej obróbki. Przedłużenie czasu ogrzewania o kolejną godzinę skutkowało tym, że odnotowano znaczną (statystycznie istotną) różnicę pomiędzy poziomem stężenia tego związku w próbce kontrolnej (KON) i ogrzewanej przez 5 godzin. W przeciwieństwie do zmian w zawartości rutyny, stężenie hyperozydu pozostawało na tym samym poziomie przez cały czas ogrzewania.

Tabela III 7. Zawartość bioaktywnych fitozwiązków w próbkach soków z owoców aronii i wiciokrzewu sinego poddanych obróbce termicznej oznaczona przy zastosowaniu techniki HPLC-DAD.

owoc	próbka	STĘŻENIA ZWIĄZKÓW [mg/mL]																					
		kwas protokatechowy		kwas chlorogenowy		kwas kawowy		hyperozyd		rutyna		kwercetyna		cyjanidyno-3-galaktozyd		cyjanidyno-3-glukozyd	
aronia	KON	0,01432 ± 0,00033		0,449 ± 0,019		s		0,0896 ± 0,0065		0,1339 ± 0,0056		nw		0,616 ± 0,077		0,0251 ± 0,0034	
	1h	0,06904 ± 0,00093	**	0,4313 ± 0,0010	ns	s		0,0767 ± 0,0014	ns	0,1417 ± 0,0059	ns	0,0194 ± 0,0011		0,212 ± 0,011	ns	0,01144 ± 0,00069	ns
	2h	0,0846 ± 0,0043	*	0,39495 ± 0,00085	ns	s		0,07772 ± 0,00071	ns	0,13348 ± 0,00094	ns	0,02387 ± 0,00074		0,0558 ± 0,0042	ns	0,00380 ± 0,00035	ns
	3h	0,0937 ± 0,0014	***	0,3857 ± 0,0055	ns	s		0,0948 ± 0,0014	ns	0,1183 ± 0,0019	ns	0,02649 ± 0,00074		0,0200 ± 0,0022	ns	0,001710 ± 0,000070	ns
	4h	0,09970 ± 0,00028	***	0,3631 ± 0,0019	ns	s		0,0865 ± 0,0015	ns	0,1001 ± 0,0013	ns	0,02688 ± 0,00092		0,00534 ± 0,00080	ns	0,000615 ± 0,000070	ns
	5h	0,1036 ± 0,0016	***	0,3616 ± 0,0061	ns	s		0,0834 ± 0,0017	ns	0,0936 ± 0,0019	*	0,0265 ± 0,0011		0,00187 ± 0,00050	ns	s	
wiciokrzew siny	J-KON	nw		0,26293 ± 0,00038		s		nw		0,1814 ± 0,0072		nw		nw		0,442 ± 0,020	
	J-1h	nw		0,2758 ± 0,0052	ns	0,00717 ± 0,00071		nw		0,02741 ± 0,00045	*	0,0879 ± 0,0059		nw		0,3875 ± 0,0021	ns
	J-2h	nw		0,2687 ± 0,0076	ns	0,00717 ± 0,00071		nw		0,0290 ± 0,0012	*	0,0733 ± 0,0037		nw		0,3549 ± 0,0094	ns
	J-3h	nw		0,2765 ± 0,0035	ns	0,00617 ± 0,00071		nw		0,0266 ± 0,0010	*	0,0772 ± 0,0011		nw		0,308 ± 0,012	*
	J-4h	nw		0,2780 ± 0,0050	ns	0,00537 ± 0,00099		nw		0,02425 ± 0,00015	*	0,0810 ± 0,0024		nw		0,2548 ± 0,0027	*
	J-5h	nw		0,2677 ± 0,0037	ns	0,00507 ± 0,00028		nw		0,02583 ± 0,00060	*	0,0810 ± 0,0013		nw		0,2181 ± 0,0013	*

s, ilości śladowe; nw, nie wykryto

Nazwy próbek (1h, 2h, 3h, 4h, 5h) odnoszą się do czasu ogrzewania próbek (odpowiednio od 1 do 5 godzin) w temperaturze 100 °C. Przedstawione wyniki są średnią z 3 równoległych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD). Analizę statystyczną pomiędzy próbkami kontrolnymi oraz próbkami soków poddanych ogrzewaniu prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns – statystycznie nieistotne).

Kolorem czerwonym oznaczono najwyższe stężenia badanych substancji w próbkach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego.

Zmianie nie ulegała też zawartość kwasu kawowego, występującego w próbce soku z aronii tylko w śladowych ilościach. W przeciwieństwie do pozostałych fitozwiązków, stężenie kwasu chlorogenowego znacząco wzrastało po każdej godzinie ogrzewania próbki tego soku (w porównaniu do próbki niepoddanej ogrzewaniu). Co więcej, w próbce poddanej ogrzewaniu odnotowano pojawienie się kwercetyny, która nie była obecna w próbce oznaczonej jako kontrolna (KON).

W przypadku soku otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego ogrzewanie przez czas dłuższy niż 3 godziny w temperaturze 100 ºC wywołało znaczący spadek zawartości cyjanidyno-3-glukozydu. Stężenie tego związku po 5 godzinnej obróbce termicznej było 2-krotnie mniejsze niż w próbce niepoddanej temu zabiegowi (próbka oznaczona jako J-KON według opisu w tabeli III 1). Znacząco zmalała również ilość rutyny po 1 godzinie ogrzewania. Następnie, przez pozostały czas prowadzenia eksperymentu, zawartość tej substancji w próbce soku otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego pozostawała na tym samym poziomie stężeń. Zawartość kwasu chlorogenowego w badanym soku okazała się być podobna zarówno w próbce oznaczonej jako kontrolna, jak i próbkach poddanych ogrzewaniu w czasie od 1 do 5 godzin. Obróbka termiczna soku otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego wywołała pojawienie się w nim niewielkich ilości kwasu kawowego. W próbce kontrolnej zaś związek ten występował jedynie na poziomie śladów. Ponadto, podobnie jak w przypadku soku z owoców aronii, w ogrzewanych próbkach soku otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego zaobserwowano pojawienie się kwercetyny. Zarówno w próbce kontrolnej (J-KON), jak i tych ogrzewanych, nie wykryto cyjanidyno-3-galaktozydu, kwasu protokatechowego oraz hyperozydu.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki można stwierdzić, że ogrzewanie (od 1 do 5 godzin w temperaturze 100 ºC) soków otrzymanych z owoców jagodowych w odniesieniu do zawartości oznaczonych fitozwiązków może przyczyniać się do:

- spadku ich stężenia, co uwidacznia się na przykładzie związków z grupy antocyjanów oraz rutyny;
- wzrostu ich ilości, co wykazano podczas oznaczania stężenia kwasu protokatechowego;
- powstania nowych substancji, czego przykładem może być kwercetyna.

Z drugiej strony, tradycyjny sposób przetwarzania nie powodował znaczącej degradacji substancji takich, jak np. kwas chlorogenowy i hyperozyd. Niemniej jednak, zmiany składu fitokompleksu zawartego zarówno w soku otrzymanym z owoców aronii, jak i wiciokrzewu sinego, wywoływane przez wysoką temperaturę, są dość istotne.

3.2.4. Zawartość bioaktywnych fitozwiązków w próbkach soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych ogrzewaniu za pomocą urządzenia EnbioJet

Jak to poprzednio wykazano, tradycyjna obróbka termiczna (w temperaturze 100 ºC) powoduje zmiany zawartości fitozwiązków. Czasami obserwuje się niemal całkowitą ich utratę. Zależność ta widoczna jest nawet w przypadku roślin bogatych w polifenole, do których należą m.in. owoce jagodowe. W ciągu wielu lat powstawały nowe technologie przetwarzania żywności, w tym też owoców, pozwalające np. na otrzymywanie produktów o przedłużonym okresie przydatności do spożycia. Jednym z innowacyjnych rozwiązań ostatnich lat w zakresie procesów sterylizacji i pasteryzacji jest technologia mikrofalowa wykorzystywana w urządzeniu *EnbioJet* (jego charakterystykę przedstawiono w rozdziale III 1.4).

W celu sprawdzenia skuteczności tego sposobu konserwacji żywności pod kątem zachowania substancji bioaktywnych, te same partie soków (otrzymane z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego), które wykorzystano podczas doświadczeń symulujących tradycyjną obróbkę termiczną, poddano ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet*. Proces obróbki obu soków mieścił się w zakresie temperatur 90 °C – 135 °C i dodatkowo dla temperatury 80 °C dla soku z owoców wiciokrzewu sinego. Otrzymane wyniki zawartości poszczególnych fitozwiązków w badanych próbkach żywności poddanych ogrzewaniu za pomocą kompaktowego pasteryzatora przepływowego *EnbioJet* przedstawiono w tabeli III 8.

Wyniki uzyskane w trakcie badań próbek soków aronii wskazują na to, że stężenie związków z grupy antocyjanów (cyjanidyno-3-galaktozydu oraz cyjanidyno-3-glukozydu) zmalało nieznacznie podczas ogrzewania w temperaturze 90 °C oraz 100 °C w porównaniu do ilości tych substancji w próbce kontrolnej (KON). Podwyższenie temperatury procesu nie wywoływało dalszego spadku zawartości tych związków w badanych próbkach. Okazało się również, że stężenia kwasu chlorogenowego, hyperozydu oraz rutyny utrzymywały się na podobnym poziomie w całym zakresie temperatur podczas ogrzewania soku z owoców aronii w porównaniu do zawartości tych związków w próbce niepoddanej temu zabiegowi. W wyniku eksperymentu prowadzonego za pomocą urządzenia *EnbioJet* w pobranych próbkach soków z owoców aronii zaobserwowano znaczący wzrost zawartości kwasu protokatechowego w zakresie temperatur od 90 °C do 130 °C. Natomiast stężenie tego związku w próbce poddanej ogrzewaniu w najwyższej temperaturze było podobne do jego ilości w próbce kontrolnej.

Tabela III 8. Zawartość bioaktywnych fitozwiązków w próbkach soków z owoców aronii i wiciokrzewu sinego poddanych ogrzewaniu (w zakresie temperatur 80 °C – 135 °C za pomocą urządzenia *EnbioJet*) oznaczona przy zastosowaniu techniki HPLC-DAD.

owoc	próbka	STĘŻENIA ZWIĄZKÓW [mg/mL]															
		kwas protokatechowy		kwas chlorogenowy		kwas kawowy		hyperozyd		rutyna		kwercetyna		cyjanidyno-3-galaktozyd		cyjanidyno-3-glukozyd	
aronia	KON	0,01432 ± 0,00033		0,449 ± 0,019		s		0,0896 ± 0,0065		0,1339 ± 0,0056		nw		0,616 ± 0,077		0,0251 ± 0,0034	
	90 ℃	0,01846 ± 0,00098	*	0,42725 ± 0,00087	ns	s		0,0818 ± 0,0053	ns	0,1248 ± 0,0017	ns	nw		0,385 ± 0,030	ns	0,0146 ± 0,0013	ns
	100 ℃	0,0233 ± 0,0013	*	0,4385 ± 0,0093	ns	s		0,078 ± 0,016	ns	0,1288 ± 0,0028	ns	nw		0,309 ± 0,016	ns	0,01144 ± 0,00053	ns
	110 ℃	0,0210 ± 0,0013	*	0,42357 ± 0,00029	ns	s		0,076 ± 0,011	ns	0,1252 ± 0,0011	ns	nw		0,317 ± 0,017	ns	0,01200 ± 0,00079	ns
	120 ℃	0,0224 ± 0,0013	*	0,42377 ± 0,00058	ns	s		0,0787 ± 0,0089	ns	0,1225 ± 0,0017	ns	nw		0,303 ± 0,022	ns	0,0114 ± 0,0016	ns
	130 ℃	0,02535 ± 0,00033	**	0,4217 ± 0,0035	ns	s		0,0769 ± 0,0081	ns	0,12246 ± 0,00056	ns	nw		0,256 ± 0,020	ns	0,00939 ± 0,00079	ns
	135 ℃	0,0148 ± 0,0049	ns	0,41416 ± 0,00029	ns	s		0,0781 ± 0,0049	ns	0,1205 ± 0,0011	ns	nw		0,303 ± 0,017	ns	0,01163 ± 0,00079	ns
wiciokrzew siny	J-KON	nw		0,26293 ± 0,00038		s		nw		0,1814 ± 0,0072		nw		nw		0,442 ± 0,020	
	J80 ℃	nw		0,29504 ± 0,00076	*	0,002967 ± 0,000079		nw		0,1660 ± 0,0014	ns	nw		nw		0,760 ± 0,033	*
	J90 ℃	nw		0,2948 ± 0,0011	*	0,00341 ± 0,00016		nw		0,1609 ± 0,0058	ns	nw		nw		0,935 ± 0,044	*
	J100 ℃	nw		0,2945 ± 0,0023	*	0,00277 ± 0,00012		nw		0,1671 ± 0,0014	ns	nw		nw		0,728 ± 0,035	*
	J110 ℃	nw		0,2961 ± 0,0023	*	0,00302 ± 0,00016		nw		0,1686 ± 0,0022	ns	nw		nw		0,809 ± 0,040	*
	J120 ℃	nw		0,2980 ± 0,0011	*	0,002855 ± 0,000080		nw		0,16961 ± 0,00072	ns	nw		nw		0,754 ± 0,029	**
	J130 ℃	nw		0,2940 ± 0,0023	*	0,002883 ± 0,000039		nw		0,1660 ± 0,0014	ns	nw		nw		0,749 ± 0,030	*
	J135 ℃	nw		0,29504 ± 0,00076	*	0,002855 ± 0,000079		nw		0,1671 ± 0,0029	ns	nw		nw		0,739 ± 0,026	**

s, ilości śladowe; nw, nie wykryto

Przedstawione wyniki są średnią z 3 równoległych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD). Analizę statystyczną pomiędzy próbkami kontrolnymi oraz próbkami soków poddanych ogrzewaniu prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05; ns – statystycznie nieistotne).

Kolorem czerwonym oznaczono najwyższe stężenia badanych substancji w próbkach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego.

Na podstawie uzyskanych wyników dla soku z aronii stwierdzono, że trwający zaledwie kilka sekund proces obróbki z wykorzystaniem energii mikrofalowej nie wywoływał zmian w poziomie stężenia kwasu kawowego. We wszystkich próbkach bowiem związek ten występował w ilościach śladowych. Ponadto w żadnej z nich nie wykryto kwercetyny.

W przypadku soku otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego proces obróbki termicznej w całym zakresie temperatur (od 80 °C oraz 135 °C) powodował wzrost stężenia cyjanidyno-3-glukozydu, kwasu chlorogenowego oraz kawowego w porównaniu do zawartości tych związków w próbce niepoddanej obróbce w takich warunkach (oznaczonej jako J-KON). Proces obróbki z wykorzystaniem energii mikrofalowej przyczynił się tylko do nieznacznego spadku zawartości rutyny w próbce soku otrzymanego z owoców wiciokrzewu. Pozostałych oznaczanych polifenoli, a mianowicie: cyjanidyno-3-galaktozydu, kwasu protokatechowego, hyperozydu oraz kwercetyny nie wykryto w żadnej z analizowanych próbek tego soku.

Otrzymane wyniki pokazały, że ogrzewanie soków z owoców aronii i wiciokrzewu sinego za pomocą urządzenia *EnbioJet* nie przyczynia się do tak znacznego spadku zawartości fitozwiązków (obecnych tych próbkach), jaki zaobserwowano dla soków poddanych tradycyjnej obróbce termicznej. Ponadto należy podkreślić, że ta innowacyjna metoda konserwacji, w przeciwieństwie do tradycyjnej metody ogrzewania badanych próbek w temperaturze 100 °C, nie powoduje powstawania nowych związków (takich, które nie występowały w próbkach niepoddanych przetwarzaniu).

3.3. Porównanie całkowitej aktywności przeciwutleniającej produktów żywnościowych otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego

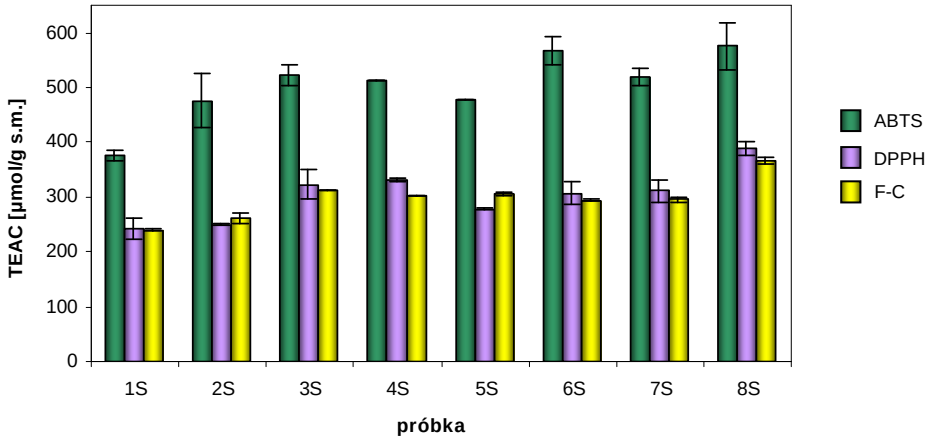
Już w XIX wieku niektórzy badacze wskazywali na związek diety z ryzykiem występowania wielu niekorzystnych dolegliwości zdrowotnych. Jednak dopiero w XX wieku zaczęto prowadzić bardziej systematyczne badania nad wpływem pożywienia na organizm człowieka. Ważną pozycję w tym zakresie obecnie zajmuje wiedza dotycząca sposobów zapobiegania czy też łagodzenia skutków ubocznych różnych chorób, zwłaszcza tych o etiologii wolnorodnikowej. Wiadomo już, że naturalne przeciwutleniacze zawarte w owocach, warzywach czy ziołach odgrywają istotną rolę w ich profilaktyce oraz leczeniu. Dotyczy to głównie tzw. chorób cywilizacyjnych [133]. Jak już wspomniano, bogatym źródłem tych związków są owoce jagodowe, do których należą m.in. aronia oraz wiciokrzew siny, dlatego też te dwa stosunkowo nowe w przypadku Polski składniki diety, a ponadto produkty z nich

otrzymane, zostały poddane badaniom w celu oznaczenia właściwości przeciwutleniających. Podczas oznaczeń posłużono się testami ABTS, DPPH oraz testem opartym na wykorzystaniu odczynnika *Folina-Ciocalteu'a*.

3.3.1. Porównanie właściwości przeciwutleniających próbek świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego

Owoce aronii i wiciokrzewu sinego są spożywane w postaci surowej bądź też częściej – w formie przetworzonej. Niemniej jednak, w świetle wyników wskazujących na niekorzystny wpływ obróbki termicznej na zawartość bioaktywnych fitozwiązków, można oczekiwać, że świeże owoce, jako składniki diety, których nie poddano obróbce kulinarnej, będą należały do produktów żywnościowych o wyższym potencjale przeciwutleniającym niż wyroby z nich otrzymane. Wiadomo też, że różne proporcje związków polifenolowych występujące w owocach tego samego gatunku, mogą być przyczyną różnic w całkowitej aktywności przeciwutleniającej.

W ramach rozprawy doktorskiej porównano różne próbki świeżych owoców aronii oraz owoców różnych odmian wiciokrzewu sinego pod kątem potencjału przeciwutleniającego. Uzyskane rezultaty dla badanych próbek owoców obu roślin przedstawiono odpowiednio na rysunku III 14 (dla aronii) oraz III 15 (dla wiciokrzewu sinego).



Rysunek III 14. Właściwości przeciwutleniające próbek świeżych owoców aronii określone za pomocą testów ABTS, DPPH oraz testu, w którym wykorzystuje się odczynnik F-C (w przeliczeniu na stężenie równoważników Troloxu [µmol/g s.m.]).
Przedstawione wyniki stanowią średnią z 3 niezależnych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD).

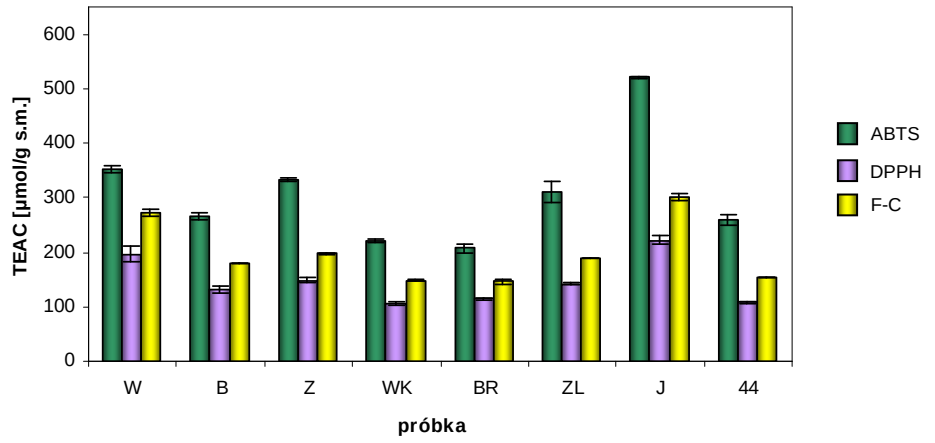
W wyniku przeprowadzonych oznaczeń właściwości przeciwutleniających zauważono większą czułość testu ABTS w stosunku do związków obecnych w badanych próbkach owoców dwóch roślin w porównaniu z wynikami uzyskanymi w trakcie przeprowadzenia pozostałych testów. Natomiast potencjał przeciwutleniający w przypadku zastosowania testów spektrofotometrycznych, w których stosuje się rodnik DPPH oraz odczynnik F-C (*Folina-Ciocalteu'a*) oznaczony był na tym samym poziomie.

Spośród wszystkich zgromadzonych próbek świeżych owoców aronii największą całkowitą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowała się próbka oznaczona jako 8S (według opisu w tabeli III 1), zaś najniższą – próbka 1S. Prawidłowość tę wykazano we wszystkich trzech wykonanych testach (wykorzystujących odczynniki ABTS, DPPH, F-C). Dość duży okazał się również potencjał przeciwutleniający próbki 6S w porównaniu do innych próbek świeżych owoców aronii.

Porównując próbki świeżych owoców pochodzących z tej samej lokalizacji, ale ze zbiorów z różnych lat (próbkę 1S z 2006 roku oraz próbkę 2S z 2007 roku) pod kątem właściwości przeciwutleniających, zaobserwowano większą aktywność w próbce zebranej w 2007 roku (2S). Ponadto, dla próbek owoców aronii 7S oraz 8S pochodzących z tej samej plantacji, ale zebranych w różnym czasie w tym samym sezonie (na początku września oraz pod koniec tego miesiąca w 2008 roku) można zauważyć, że aktywność przeciwutleniająca dla owoców zebranych wcześniej (próbka 7S) była mniejsza niż dla owoców zebranych w późniejszym okresie (próbka 8S). Zaobserwowane zależności wynikają z różnic w zawartości związków polifenolowych o charakterze przeciwutleniaczy w badanych próbkach, omówionych w poprzednim rozdziale.

Przeprowadzone badania pokazują, że owoce wiciokrzewu sinego wykazywały mniejszą aktywność przeciwutleniającą niż owoce aronii (rysunek III 15). Wśród wszystkich odmian wiciokrzewu sinego największym potencjałem przeciwutleniającym charakteryzowały się owoce odmiany „Jolanta" (oznaczone jako „J" zgodnie z opisem w tabeli III 1), co wykazano we wszystkich przeprowadzonych testach (wykorzystujących odczynniki ABTS, DPPH oraz F-C). Najmniejszy potencjał przeciwutleniający wykazywały owoce odmiany „Brązowa" (BR) oraz „Wojtek" (WK) pochodzące z uprawy w Osielsku. Co ciekawe, w każdym z zastosowanych testów całkowita aktywność przeciwutleniająca próbek owoców odmiany „Wojtek" (W), „Brązowa" (B) i „Zielona" (Z) pochodzących z uprawy w Lęborku okazała się być większa niż potencjał przeciwutleniający odpowiadających im owoców odmiany „Wojtek" (WK), „Brązowa" (BR), „Zielona" (ZL) zebranych na plantacji w

Osielsku. Wyniki te były spójne z zawartością oznaczonych fitozwiązków w analizowanych próbkach owoców wiciokrzewu sinego.



Rysunek III 15. Właściwości przeciwutleniające próbek świeżych owoców wiciokrzewu sinego określone za pomocą testów ABTS, DPPH oraz testu, w którym wykorzystuje się odczynnik F-C (w przeliczeniu na stężenie równoważników Troloxu [µmol/g s.m.]).
Przedstawione wyniki stanowią średnią z 3 niezależnych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD).

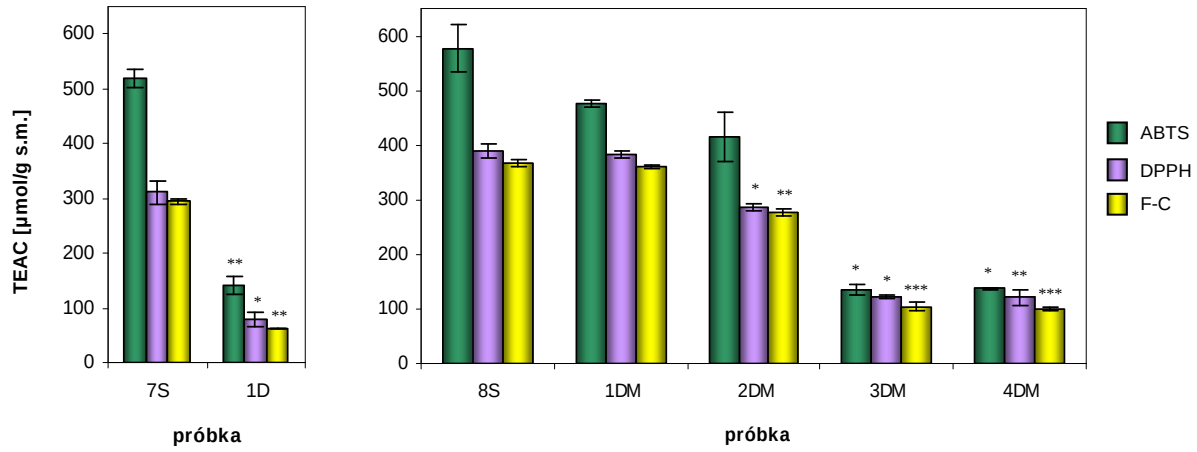
3.3.2. Zmiany całkowitej aktywności przeciwutleniającej owoców aronii podczas ich przetwarzania w celu otrzymania dżemów

Podczas obróbki technologicznej owoce mogą tracić cenne związki odpowiedzialne za ich właściwości przeciwutleniające. Dlatego postanowiono również oznaczyć całkowitą aktywność przeciwutleniającą próbek pobranych na kolejnych etapach produkcji dżemów (oznaczonych jako 1D oraz 4DM) otrzymanych na bazie owoców aronii (odpowiednio 7S oraz 8S). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku III 16.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że właściwości przeciwutleniające próbki dżemu, określanej jako 1D, znacząco różniły się (statystycznie istotnie) od potencjału przeciwutleniającego surowca (owoców aronii 7S). Próbka 1D charakteryzowała się bowiem ponad 4-krotnie mniejszą całkowitą aktywnością przeciwutleniającą w porównaniu do świeżych owoców (7S), z których otrzymano dżem.

W przypadku produkcji dżemu, oznaczonego jako 4DM, stwierdzono, że mycie surowca przeznaczonego do jego produkcji (owoce aronii 8S) nie powodowało istotnych zmian właściwości przeciwutleniających. W przypadku stosowania testów DPPH i testu, w którym wykorzystuje się odczynnik F-C, okazało się, że potencjał przeciwutleniający zmalał znacząco (w porównaniu do świeżych owoców – próbki 8S) po etapie rozdrabniania surowca

(próbka 2DM) oraz po etapie gotowania z cukrem (próbka 3DM). Następnie, podczas kolejnych etapów produkcji dżemu utrzymywał się na stałym poziomie. W przypadku badań z wykorzystaniem testu ABTS statystycznie istotne różnice pomiędzy całkowitą aktywnością przeciwutleniającą surowca (próbki 8S) a próbkami poddanymi obróbce (1DM – 4DM) ujawniają się dopiero po obróbce termicznej (w przypadku próbki 3DM). Wyrób końcowy (oznaczony jako 4DM), podobnie jak w przypadku produktu 1D, charakteryzował się około 4-krotnie mniejszym potencjałem przeciwutleniającym w porównaniu do świeżych owoców (8S).



Rysunek III 16. Właściwości przeciwutleniające produktów otrzymanych z owoców aronii określone za pomocą testów ABTS, DPPH oraz testu, w którym wykorzystuje się odczynnik F-C (w przeliczeniu na stężenie równoważników Troloxu [µmol/g s.m.]).
Przedstawione wyniki stanowią średnią z 3 niezależnych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD). Analizę statystyczną pomiędzy próbkami świeżych owoców (7S lub 8S) oraz próbkami owoców poddanych przetwarzaniu (odpowiednio: 1D lub 1DM – 4DM) prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Otrzymane wyniki potwierdzają uprzednio opisaną obserwację (rozdział III 3.2), że proces obróbki odgrywa kluczową rolę dla przemian związków o charakterze przeciwutleniaczy występujących w surowcach objętych doświadczeniami. Zatem oczywistą przyczyną niskiej aktywności przeciwutleniającej produktów finalnych w porównaniu z surowcem wyjściowym były duże straty tych substancji w trakcie poszczególnych etapów produkcji.

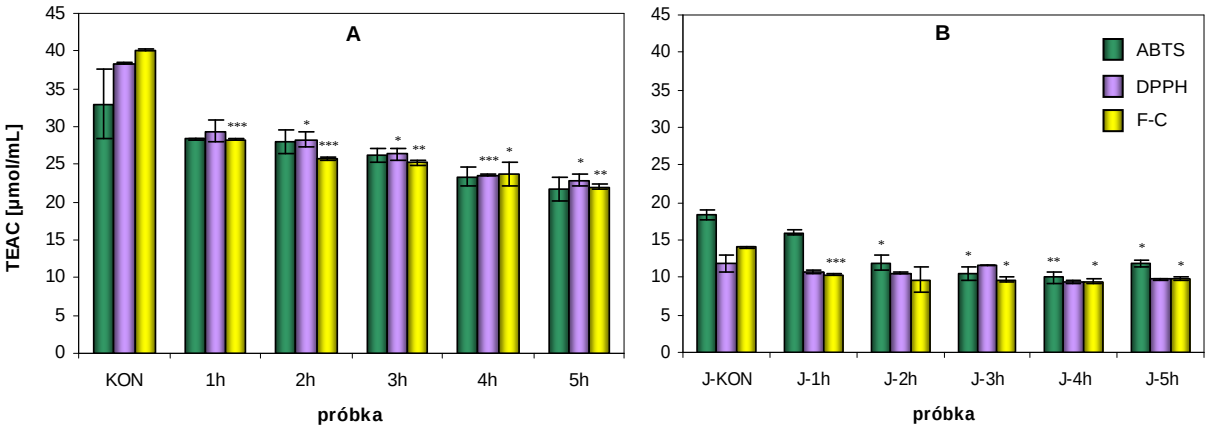
3.3.3. Właściwości przeciwutleniające soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych tradycyjnej obróbce termicznej

Dużą grupę produktów spożywczych otrzymywanych z owoców stanowią soki oraz napoje, w tym również soki z owoców jagodowych. Te ostatnie są wyrobami o tyle ważnymi, że pozyskiwane surowce do ich produkcji są w naszym klimacie artykułem spożywczym występującym sezonowo. Zatem znaczna część owoców jagodowych jest konsumowana w postaci przetworzonej. Ze zdrowotnego punktu widzenia istotną kwestią podczas obróbki technologicznej jest uzyskanie takiego soku, który swoimi właściwościami prozdrowotnymi (w tym przeciwutleniającymi) najbardziej przypominałby świeży produkt. Jak wiadomo, tradycyjną metodą przedłużania trwałości mikrobiologicznej różnych wyrobów spożywczych jest poddanie ich działaniu wysokiej temperatury.

W celu sprawdzenia wpływu obróbki termicznej na właściwości prozdrowotne owoców jagodowych porównano świeże soki otrzymane z owoców aronii (oznaczone jako KON według opisu w tabeli III 1) oraz wiciokrzewu sinego (J-KON) z próbkami tych samych partii soków ogrzewanych w temperaturze 100 °C przez okres od 1 do 5 godzin pod kątem właściwości przeciwutleniających. Tak długi czas ogrzewania miał symulować etap sterylizacji termicznej (1 godzina) oraz dalsze przyspieszone przemiany zachodzące w trakcie przechowywania. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku III 17.

W wyniku przeprowadzonych oznaczeń okazało się, że potencjał przeciwutleniający próbek soków otrzymanych z owoców aronii znacząco zmalał po 1 godzinie ogrzewania w porównaniu do próbki niepoddanej temu zabiegowi (KON), co wykazano stosując test spektrofotometryczny z odczynnikiem F-C. Przedłużenie czasu ogrzewania nie powodowało już tak dużego spadku całkowitej aktywności przeciwutleniającej. Niemniej jednak po 5 godzinach obróbki termicznej właściwości przeciwutleniające określone z wykorzystaniem reagenta F-C były około 2-krotnie mniejsze w porównaniu z potencjałem przeciwutleniającym próbki kontrolnej (KON). W przypadku stosowania testu DPPH statystycznie istotną różnicę pomiędzy całkowitą aktywnością przeciwutleniającą próbek poddanych ogrzewaniu a próbką kontrolną (KON) zauważono po 2 godzinach obróbki termicznej. Wyniki uzyskane za pomocą tego testu wskazywały, że dalsze wydłużenie czasu ogrzewania powodowało już tylko niewielki spadek potencjału przeciwutleniającego. W teście ABTS również widoczne było obniżanie całkowitej aktywności przeciwutleniającej wraz z wydłużaniem okresu ogrzewania soku, lecz otrzymane różnice jeśli chodzi o poziom

potencjału przeciwutleniającego pomiędzy próbką KON oraz poszczególnymi próbkami poddanymi obróbce termicznej nie były statystycznie istotne.



Rysunek III 17. Właściwości przeciwutleniające soków otrzymanych z (A) – owoców aronii i (B) – wiciokrzewu sinego poddanych obróbce termicznej w temperaturze 100 °C przez czas 1 – 5 godzin określone za pomocą testów ABTS, DPPH oraz testu, w którym wykorzystuje się odczynnik F-C (w przeliczeniu na stężenie równoważników Troloxu [µmol/mL]).
Przedstawione wyniki stanowią średnią z 3 niezależnych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD). Analizę statystyczną pomiędzy próbkami kontrolnymi oraz próbkami soków poddanych ogrzewaniu prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05).

Podobnie, w przypadku stosowania testu wykorzystującego odczynnik F-C całkowita aktywność przeciwutleniająca soków otrzymanych z owoców wiciokrzewu sinego znacząco zmalała po 1 godzinie ogrzewania, natomiast w przypadku stosowania testu ABTS – po 2 godzinach obróbki termicznej. Po kolejnych okresach ogrzewania aktywność ta utrzymywała się na podobnym poziomie, co wykazano zarówno w przypadku stosowania pierwszego, jak i drugiego testu (z wykorzystaniem odczynnika F-C oraz kationorodnika $ABTS^{\bullet+}$). Wartość potencjału przeciwutleniającego oznaczona za pomocą testu DPPH, nie zmieniała się znacząco w trakcie ogrzewania w porównaniu z próbką oznaczoną jako kontrolna (J-KON) – niepoddaną działaniu temperatury 100 °C.

Podsumowując, statystycznie istotne różnice pomiędzy oznaczanymi aktywnościami przeciwutleniającymi soku z owoców aronii poddanego obróbce termicznej i soku oznaczonego jako kontrolny (KON) wykazane w trakcie badań z wykorzystaniem przynajmniej dwóch spośród stosowanych testów zauważono po 2 godzinach obróbki termicznej. W przypadku soku otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego prawidłowość tę odnotowano po 3 godzinach ogrzewania. A zatem czas ogrzewania nieprzekraczający 1

godziny może być uznany za okres niepowodujący znaczącej degradacji związków charakterze przeciwutleniaczy w próbkach owoców jagodowych. Otrzymane wyniki są dość spójne z wynikami oznaczeń zawartości bioaktywnych fitozwiązków.

3.3.4. Całkowita aktywność przeciwutleniająca soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych obróbce termicznej za pomocą urządzenia EnbioJet

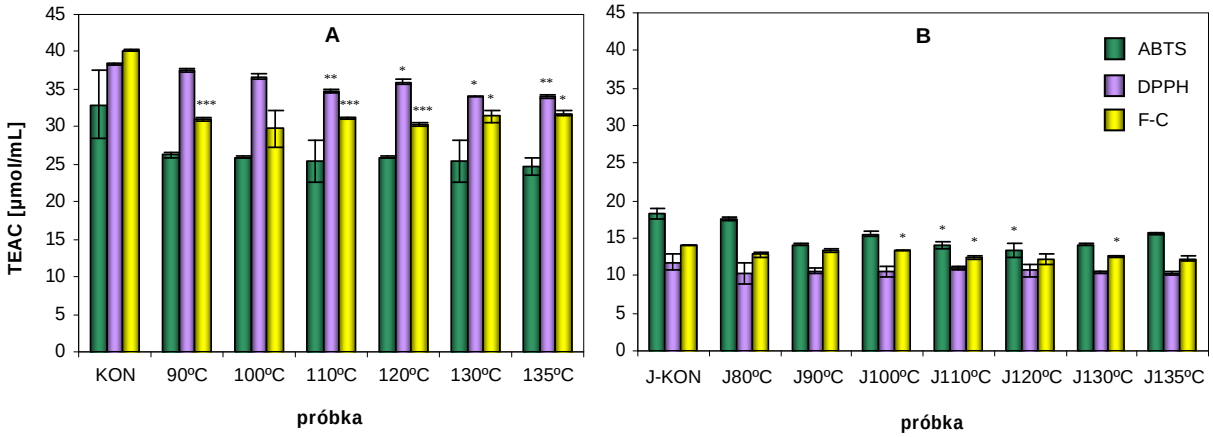
Jak wykazano (w rozdziale III 3.3.3) potencjał przeciwutleniający soków otrzymanych z owoców jagodowych poddanych tradycyjnej obróbce termicznej (w temperaturze 100 °C) zmienia się znacząco w czasie. Sugeruje się zatem, że skrócenie okresu trwania procesu ogrzewania może przyczynić się do zmniejszenia strat bioaktywnych fitozwiązków, w tym tych będących przeciwutleniaczami, a w konsekwencji do redukcji obniżenia całkowitej aktywności przeciwutleniającej.

W ramach rozprawy doktorskiej postanowiono zatem oznaczyć właściwości przeciwutleniające soków otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych procesowi obróbki termicznej przez zaledwie kilka sekund w zakresie temperatur od 90 °C do 135 °C i dodatkowo w 80 °C dla soków z owoców wiciokrzewu sinego. W tym celu wykorzystano urządzenie *EnbioJet*, którego charakterystykę oraz zasadę działania podano w rozdziale III 1.4. Uzyskane wyniki całkowitej aktywności przeciwutleniającej dla opisywanych dwóch rodzajów soków świeżych oraz po obróbce technologicznej za pomocą wspomnianego urządzenia przedstawiono na rysunku III 18.

Wyniki otrzymane w trakcie badań soku z owoców aronii wskazują, że w przypadku testów wykorzystujących odczynniki DPPH oraz F-C znaczący spadek właściwości przeciwutleniających następował w trakcie ogrzewania w zakresie temperatur od 110 °C do 135 °C. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku stosowania tego ostatniego testu do badań próbek poddanych procesowi obróbki w 90 °C. Natomiast w przypadku stosowania testu ABTS wykazano, że różnice potencjału przeciwutleniającego pomiędzy próbką KON oraz poszczególnymi próbkami poddanymi ogrzewaniu nie były statystycznie istotne.

Właściwości przeciwutleniające ogrzewanych próbek soków otrzymanych z owoców wiciokrzewu sinego okazały się być nieznacznie mniejsze w porównaniu do potencjału przeciwutleniającego próbki niepoddanej temu zabiegowi. Wyjątek w tym zakresie stanowiła obróbka w temperaturach: 110 °C i 120 °C, co wykazano stosując test ABTS oraz 100 °C, 110 °C i 130 °C w wyniku stosowania testu wykorzystującego odczynnik F-C. Różnice pomiędzy potencjałem przeciwutleniającym tych próbek a właściwościami

przeciwutleniającymi próbki oznaczonej jako kontrolna były bowiem statystycznie istotne. Ponadto, stosując test z wykorzystaniem rodnika DPPH wykazano, że różnice pomiędzy całkowitą aktywnością przeciwutleniającą próbki KON oraz potencjałem przeciwutleniającym poszczególnych próbek poddanych obróbce termicznej były niewielkie (statystycznie nieistotne).



Rysunek III 18. Właściwości przeciwutleniające soków otrzymanych z (A) – owoców aronii i (B) – wiciokrzewu sinego (poddanych ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet* w zakresie temperatur 80 °C – 135 °C) określone za pomocą testów ABTS, DPPH oraz testu, w którym wykorzystuje się odczynnik F-C (w przeliczeniu na stężenie równoważników Troloxu [µmol/mL]).
Przedstawione wyniki stanowią średnią z 3 niezależnych oznaczeń ($x_{śr.}$ ± SD). Porównanie pomiędzy próbkami kontrolnymi oraz próbkami soków poddanych sterylizacji prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki, można stwierdzić, że zakresy temperatur obróbki termicznej: od 90 °C dla soku otrzymanego z owoców aronii oraz od 80 °C dla soku uzyskanego z owoców wiciokrzewu sinego do 100 °C w przypadku obu produktów okazały się być warunkami przetwarzania, które nie powodowały znaczącej utraty właściwości przeciwutleniających, a tym samym walorów prozdrowotnych soków otrzymanych z tych owoców. Prawidłowości te wykazano dla dwóch spośród wszystkich wykonanych testów, które posłużyły do oceny potencjału przeciwutleniającego w tym doświadczeniu.

Przedstawione dane wskazywały, że innowacyjny sposób przetwarzania surowca (za pomocą urządzenia *EnbioJet*) nie wywoływał niekorzystnych zmian w składzie związków odpowiedzialnych za właściwości przeciwutleniające soków otrzymanych z owoców jagodowych nawet podczas prowadzenia procesu obróbki w temperaturze 100 °C.

3.4. Porównanie profili bioaktywnych fitozwiązków w produktach żywnościowych otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego

Prześledzenie profili polifenoli możliwe jest dzięki zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Jest to technika rozdzielania, która jest bardzo rozpowszechniona w praktyce analitycznej. Zapewnia możliwość wizualnego monitoringu składu związków występujących w badanych próbkach [134, 135].

Ta technika analityczna została wykorzystana w ramach programu badawczego rozprawy doktorskiej w celu porównania składu antocyjanów w świeżych owocach aronii i wiciokrzewu sinego oraz śledzenia zmian profili substancji o charakterze przeciwutleniaczy wskutek przetwarzania tych owoców. Takie podejście zostało z sukcesem wykorzystane wcześniej w badaniach nad wpływem obróbki kulinarnej na skład fitokompleksu kapusty białej [105].

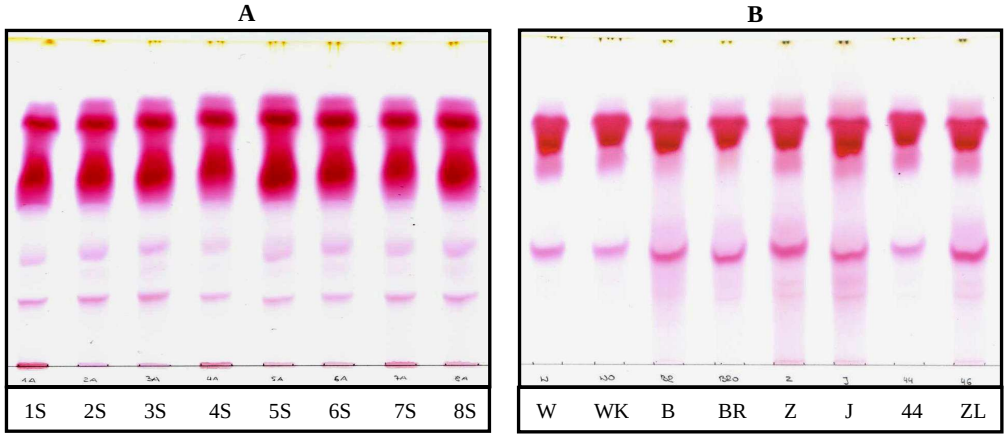
3.4.1. Porównanie profili antocyjanów w próbkach świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego

Świeże owoce aronii oraz wiciokrzewu sinego charakteryzują się bardzo dużymi zawartościami substancji barwnych z grupy antocyjanów. Z tej przyczyny, wykorzystując technikę TLC, bardzo łatwo można uzyskać profil tych związków, które uwidaczniają się w postaci prążków na otrzymanych chromatogramach. Technika ta pozwala na wskazanie różnic pomiędzy gatunkami oraz odmianami owoców, jak również na prześledzenie wpływu warunków uprawy na zawartość fitozwiązków w analizowanym materiale roślinnym.

Analizie za pomocą techniki chromatografii cienkowarstwowej poddano próbki ekstraktów metanolowych otrzymanych z liofilizatów zgromadzonych próbek świeżych owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego. Otrzymane chromatogramy przedstawiono na rysunku III 19.

Otrzymane wyniki wskazują na jakościowe i ilościowe różnice w składzie związków z grupy antocyjanów pomiędzy próbkami aronii oraz wiciokrzewu sinego. Duże rozbieżności w zawartości tych związków były widoczne również pomiędzy próbkami owoców należących do różnych odmian wiciokrzewu sinego. Zauważono bowiem znaczne różnice pomiędzy profilami chromatograficznymi uzyskanymi dla owoców odmiany wiciokrzewu sinego o nazwie „Wojtek” (oznaczonych jako W i WK według opisu w tabeli III 1) oraz odmian „Brązowa” (B oraz BR) i „Zielona” (Z i ZL). Odmienne okazały się również wyniki uzyskane dla próbek owoców odmiany o numerze 44, jak również dla próbek owoców odmiany

„Jolanta”. Natomiast, jak należało oczekiwać, uzyskane chromatogramy pokazały wyraźne podobieństwo profilu antocyjanów w owocach wiciokrzewu sinego należących do tej samej odmiany, lecz pochodzących z innych plantacji. Przykładowo, owoce odmiany „Wojtek” (W) pochodzące z Lęborka były odpowiednikiem owoców odmiany „Wojtek” (WK) zebranych z uprawy w Osielsku. Analizując zaś chromatogramy uzyskane dla różnych próbek świeżych owoców aronii, stwierdzono, że podobne profile chromatograficzne pod względem jakościowym świadczą o tym, że zgromadzone materiały roślinne (próbki 1S – 8S) należały do owoców tej samej odmiany.

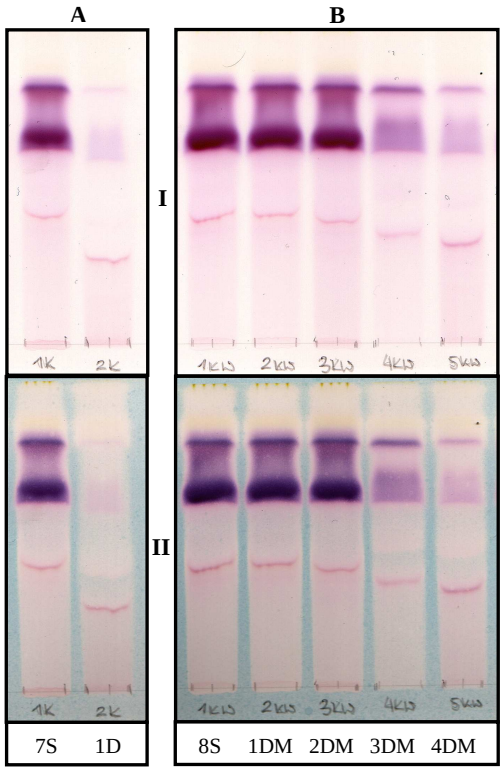


Rysunek III 19. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy metanolowych ekstraktów otrzymanych ze zliofilizowanych próbek świeżych owoców aronii (A) oraz owoców różnych odmian wiciokrzewu sinego (B) z wykorzystaniem techniki TLC.

3.4.2. Zmiany profili fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy w próbkach owoców aronii w trakcie procesu produkcji dżemów

Technika chromatografii cienkowarstwowej umożliwia nie tylko uzyskanie profili barwnych fitozwiązków występujących w danej roślinie, ale również, wykorzystując dodatkowo odpowiednie odczynniki, stwarza również możliwość identyfikacji substancji o charakterze przeciwutleniaczy. Jednym z powszechnie stosowanych reagentów do detekcji związków będących przeciwutleniaczami jest kationorodnik ABTS•+. Technikę TLC z wizualizacją za pomocą reagenta ABTS wykorzystano do śledzenia przemian przeciwutleniaczy w próbkach pobranych podczas kolejnych etapów produkcji dżemów (oznaczonych jako 1D oraz 4DM według opisu zawartego w tabeli III 1) otrzymanych na bazie owoców aronii (odpowiednio 7S oraz 8S). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku III 20.

Profile chromatograficzne sporządzane dla kolejnych etapów produkcji dżemu oznaczonego jako 1D wskazują na to, że zawartość polifenoli o charakterze przeciwutleniaczy uległa znacznym przemianom. Porównując rezultaty otrzymane dla tej partii dżemu z profilem chromatograficznym próbki owoców aronii (7S), z których go wyprodukowano, stwierdzono, że zawartość substancji barwnych – antocyjanów – drastycznie zmalała po obróbce.



Rysunek III 20. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy metanolowych ekstraktów uzyskanych ze zliofilizowanych próbek dwóch partii dżemów ([A] – 1D oraz [B] – 4DM) otrzymanych z owoców aronii (odpowiednio 7S oraz 8S) z wykorzystaniem techniki TLC (przed wizualizacją [I] i po wizualizacji [II] za pomocą roztworu kationorodnika ABTS•+).

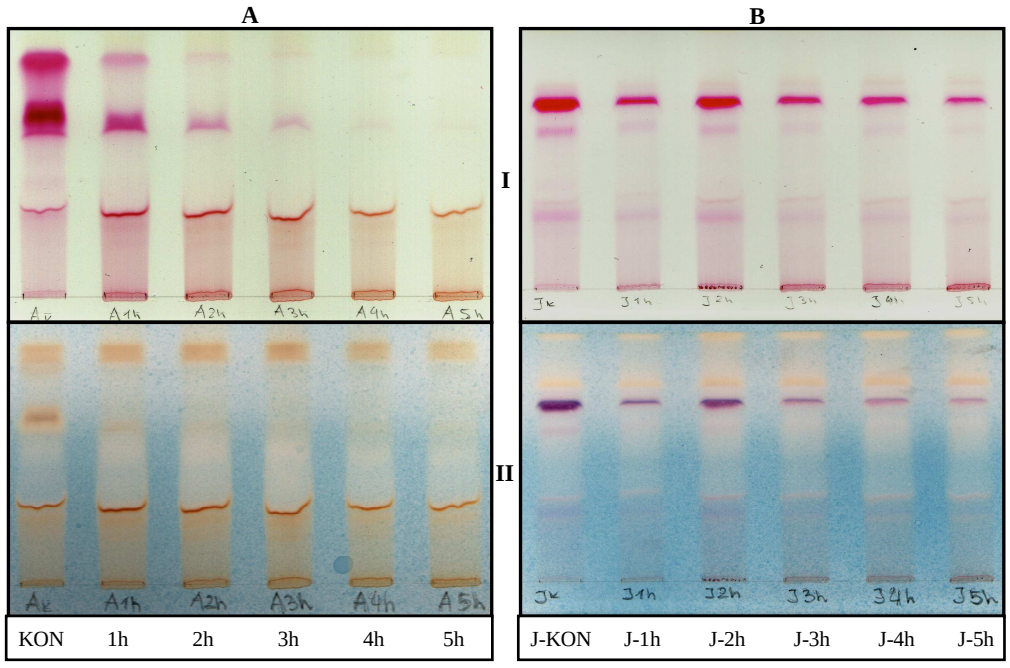
Chromatogramy otrzymane w trakcie analizy próbek pobranych podczas kolejnych etapów przetwarzania owoców oznaczonych jako 8S w celu otrzymania dżemu 4DM świadczyły o tym, że najbardziej gwałtowny spadek zawartości przeciwutleniaczy nastąpił w trakcie gotowania owoców. Efekt ten na uzyskanym profilu chromatograficznym objawił się zmniejszeniem intensywności barwy prążków charakterystycznych dla antocyjanów.

Obserwowane rezultaty tego doświadczenia są spójne z opisanymi wcześniej wynikami oznaczeń zawartości bioaktywnych fitozwiązków (rozdział III 3.2.2) oraz wynikami pomiarów całkowitej aktywności przeciwutleniającej w trakcie badań tych próbek

za pomocą testów wykorzystujących kationorodnik ABTS•+, rodnik DPPH oraz testu wykorzystującego odczynnik F-C (rozdział III 3.3.2) .

3.4.3. Zmiany profili polifenoli o właściwościach przeciwutleniających w sokach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych tradycyjnej obróbce termicznej

Dieta bogata w polifenole o charakterze przeciwutleniaczy uważana jest za czynnik istotny dla zdrowotności. Tradycyjna obróbka termiczna może jednak przyczyniać się do obniżenia poziomu tych korzystnych dla ludzkiego organizmu związków. Do takich wniosków również można było dojść śledząc zmiany zawartości wybranych polifenoli za pomocą techniki HPLC-DAD (rozdział III 3.2.3). W ramach pracy doktorskiej dla tych samych próbek soków z aronii oraz wiciokrzewu sinego postanowiono ponadto sprawdzić wpływ ogrzewania w temperaturze 100 ºC przez okres czasu od 1 do 5 godzin na profile przeciwutleniaczy. W tym celu posłużono się techniką TLC, zaś otrzymane chromatogramy poddano wizualizacji za pomocą odczynnika ABTS w celu identyfikacji substancji zdolnych do neutralizacji wolnych rodników. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku III 21.

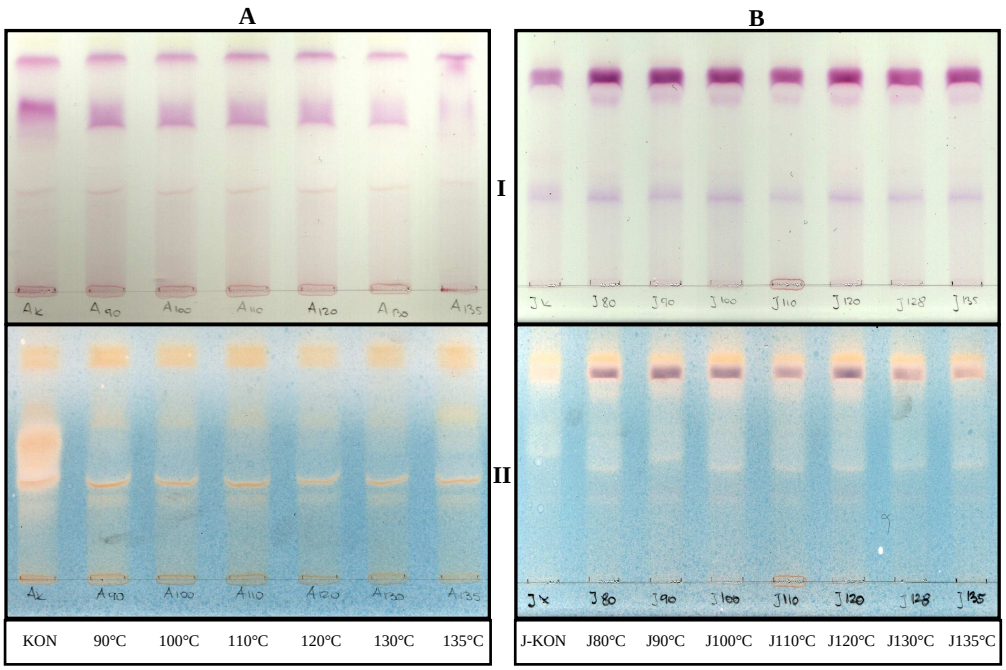


Rysunek III 21. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek soków z owoców aronii (A) i wiciokrzewu sinego (B) ogrzewanych (w temperaturze 100 °C) z wykorzystaniem techniki TLC (przed wizualizacją [I] i po wizualizacji [II] za pomocą roztworu kationorodnika ABTS•+).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na to, że wraz ze wzrostem czasu ogrzewania zmniejszała się intensywność prążków (zwłaszcza tych charakterystycznych dla związków z grupy antocyjanów) w otrzymanych profilach chromatograficznych dla obu soków otrzymanych z owoców roślin jagodowych. Prawidłowość tę zaobserwowano zarówno przed, jak i po wizualizacji z wykorzystaniem kationorodnika ABTS•+. Świadczy to o tym, że wzrost czasu obróbki termicznej spowodował spadek zawartości fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy. Wyniki te pokrywały się z rezultatami otrzymanymi w trakcie pomiaru właściwości przeciwutleniających, gdzie wraz ze zwiększeniem czasu obróbki widoczne było zmniejszenie wartości liczbowej TEAC. Zauważono również spójność otrzymanych wyników z rezultatami oznaczeń zawartości bioaktywnych fitozwiązków (za pomocą techniki HPLC-DAD), gdzie przedłużanie czasu ogrzewania w temperaturze 100 ºC powodowało spadek ilości antocyjanów w badanych próbkach soków, natomiast stosunkowo stała okazała się być zawartość pozostałych oznaczonych polifenoli (rozdział III 3.2.3).

3.4.4. Porównanie profili polifenoli o właściwościach przeciwutleniających w sokach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddanych ogrzewaniu za pomocą urządzenia EnbioJet

Procesy oksydacyjne zachodzące podczas obróbki termicznej produktów spożywczych powodują obniżenie zawartości fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy, a tym samym spadek jakości żywności. Jak już to uprzednio sugerowano, właściwie zaprojektowany proces przetwarzania mógłby przyczynić się do zmniejszenia strat tych substancji w produktach spożywczych. Rozwiązaniem technologicznym, które postanowiono sprawdzić w tym zakresie, była obróbka, wykorzystująca energię mikrofalową, przeprowadzona za pomocą urządzenia *EnbioJet*. Proces ten prowadzono w warunkach, jakich można oczekiwać w zakładzie przetwórstwa żywności. W doświadczeniu tym soki otrzymane z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego poddano ogrzewaniu w zakresie temperatur od 90 ºC do 135 ºC w przypadku soku z aronii oraz od 80 ºC do 135 ºC dla soku z owoców wiciokrzewu sinego z wykorzystaniem wspomnianego urządzenia. Soki pochodziły z tej samej szarży, co te poddane wcześniej opisanym badaniom. Próbki soków ogrzewane za pomocą urządzenia *EnbioJet* poddano analizom w celu prześledzenia przemian profili fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy za pomocą techniki TLC. Otrzymane chromatogramy przed i po wizualizacji za pomocą odczynnika ABTS przedstawiono na rysunku III 22.



Rysunek III 22. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek soków z owoców aronii (A) i wiciokrzewu sinego (B) ogrzewanych za pomocą urządzenia *EnbioJet* z wykorzystaniem techniki TLC (przed wizualizacją [I] i po wizualizacji [II] za pomocą roztworu kationorodnika ABTS•+).

Uzyskane wyniki pokazały, że zawartość antocyjanów w przypadku obu przetwarzanych soków nie ulegała zauważalnym zmianom wraz ze wzrostem temperatury ogrzewania. Poziom tych związków w przypadku soku z aronii był niższy dopiero po procesie obróbki w temperaturze 135 ºC (rysunek III 22A-[I]). Dla próbki soku oznaczonego jako J-KON (według oznaczenia w tabeli III 1) otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego uzyskane prążki profilu chromatograficznego charakteryzowały się nieco mniejszą intensywnością barwy w porównaniu do prążków odpowiadających próbkom poddanym sterylizacji (rysunek III 22B-[I]). Sugeruje to nieznacznie niższą zawartość antocyjanów w próbce kontrolnej tego soku. Tę tezę potwierdzają wyniki oznaczeń zawartości bioaktywnych fitozwiązków omówione w rozdziale III 3.2.4. Taki rezultat może być wynikiem przemian inicjowanych przez drobnoustroje obecne w niesterylnym soku (J-KON).

Wizualizacja za pomocą odczynnika ABTS ujawniła dodatkową, obok fitozwiązków z grupy antocyjanów, substancję o aktywności przeciwutleniającej dla próbki soku z owoców aronii określanej jako kontrolna (KON). Prążek obrazujący obecność tego związku w profilu chromatograficznym zanikał w próbkach poddanych sterylizacji (rysunek III 22A-[II]). Porównując profil przeciwutleniaczy uzyskany dla soku oznaczonego jako J-KON (otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego) z profilami pozostałych próbek tego soku

stwierdzono brak prążka odpowiadającego za obecność antocyjanów w próbce J-KON. Ponadto barwa tego prążka okazała się być mniej intensywna dla próbki sterylizowanej w temperaturze 135 ºC w porównaniu do pozostałych próbek soków poddanych sterylizacji (rysunek III 22B-[II]).

Uzyskane wyniki wskazują na występowanie niewielkich różnic w profilu przeciwutleniaczy analizowanych próbek. Niemniej jednak obróbka termiczna soków z owoców jagodowych za pomocą sterylizatora *EnbioJet* wydaje się być procesem bardziej zachowawczym niż ogrzewanie tradycyjnym sposobem w temperaturze 100 ºC.

3.5. Wykorzystanie procesu derywatyzacji w wycieku z kolumny do porównania profili przeciwutleniaczy w produktach żywnościowych otrzymanych na bazie owoców aronii i wiciokrzewu sinego

Kontrola jakości surowca podczas obróbki technologicznej wymaga zastosowania odpowiednich narzędzi i metod umożliwiających śledzenie zmian jakościowych i ilościowych substancji bioaktywnych. Studia literaturowe prowadzą do wniosku, że większość badań nad wpływem obróbki owoców i warzyw skupia się głównie na monitorowaniu jednej lub kilku substancji bioaktywnych. Wyniki takich badań dostarczają cennych informacji, jednak nie przedstawiają pełnego obrazu właściwości badanego materiału determinujących jego jakość. Dlatego np. w przypadku ziół światowa Organizacja Zdrowia w 1991 roku zaakceptowała stosowanie tzw. chromatograficznego profilu (ang. *fingerprint chromatography*) jako techniki oceny jakości roślin [*WHO, Guidelines for the Assessment of Herbal Medicine, World Health Organization, Munich, Germany, 1991, p. 2.*]. Również Europejska Agencja Medyczna (EMEA) rekomenduje chrmatograficzne profile do badań stabilności materiału roślinnego [*CHMP, Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. Committee for medicinal products for human use (CHMP), European Medicines Agency Inspections, July 21, 2005, CPMP/QWP/2819/00 Rev 1, EMEA/CVMP/814/00*]. Technika chromatograficznego „odcisku palca” znalazła wiele zastosowań:

- w sprawdzaniu oryginalności pochodzenia materiału roślinnego;
- w badaniach wpływu różnych warunków uprawy na substancje bioaktywne rośliny;
- w detekcji obcych, nienaturalnie występujących substancji w materiale roślinnym (zafałszowań);
- podczas śledzenia zmian jakościowych i ilościowych substancji bioaktywnych w trakcie obróbki technologicznej materiału roślinnego.

Zastosowanie zestawu HPLC sprzężonego z urządzeniem do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny umożliwia detekcję w układzie *on-line* składników obecnych w złożonej mieszaninie posiadających zdolność do wychwytywania rodników [123]. Na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej opracowano i zweryfikowano możliwość użycia do tego celu urządzenia *Pinnacle PCX* [123] w miejsce dotychczas stosowanych zestawów własnej konstrukcji.

Można wymienić następujące etapy tej metodyki analitycznej:

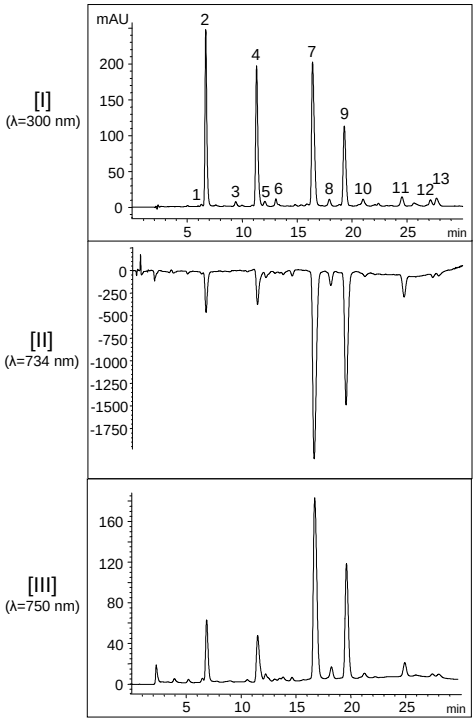
- rozdzielenie składników mieszaniny za pomocą zestawu HPLC pracującego w układzie faz odwróconych,
- detekcję rozdzielonych analitów przy pomocy detektora DAD (detektor z matrycą fotodiodową),
- wprowadzenie strumienia reagenta (metanolowego roztworu kationorodnika $ABTS^{\bullet+}$ lub wodnego roztworu odczynnika F-C) w strumień eluatu wypływającego z detektora DAD i wprowadzenie go poprzez pętlę reakcyjną urządzenia *Pinnacle PCX* do kolejnego detektora (UV-Vis).

W rezultacie otrzymywane są dwa chromatogramy uzyskiwane w trakcie analizy próbek za pomocą zarówno pierwszego, jak i drugiego detektora. Pierwszy z nich przedstawia standardowy profil rozdzielonych analitów, natomiast drugi profil, rejestrowany jest przy maksimum absorbancji charakterystycznym dla stosowanego reagenta o charakterze prooksydanta. Drugi chromatogram wskazuje wyłącznie ujemne piki, pochodzące od rozdzielonych substancji posiadających właściwości przeciwutleniające, w przypadku zastosowania metanolowego roztworu kationorodnika $ABTS^{\bullet+}$ ulegającego odbarwieniu lub jedynie dodatnie piki, w przypadku zastosowania wodnego roztworu odczynnika F-C zmieniającego barwę wskutek redukcji przez przeciwutleniacze obecne w badanej próbce [123].

Zastosowanie takiego rozwiązania aparaturowego w odróżnieniu od powszechnie stosowanych testów spektrofotometrycznych oraz techniki TLC, umożliwia identyfikację pojedynczych związków mających udział w całkowitej aktywności przeciwutleniającej. Rezultatem przeprowadzonych badań w ramach pracy doktorskiej są profile przeciwutleniaczy (zarówno znanych jak i niezidentyfikowanych) charakterystyczne dla poszczególnych próbek otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego. Ponadto, śledzenie zmian w takich profilach surowca wyjściowego oraz finalnego produktu umożliwia określenie wpływu obróbki na właściwości przeciwutleniające owoców.

3.5.1. Profile przeciwutleniaczy obecnych w próbkach świeżych owoców aronii i wiciokrzewu sinego

W celu przedstawienia profili przeciwutleniaczy charakterystycznych dla świeżych owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego do badań (wykonanych za pomocą zestawu HPLC sprzężonego z urządzeniem do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny) wybrano próbki oznaczone odpowiednio jako 6S oraz J (owoce odmiany „Jolanta") według opisu w tabeli III 1. Chromatogramy otrzymane podczas analizy próbki ekstraktu metanolowego otrzymanego z liofilizatów owoców aronii (6S) przedstawiono na rysunku III 23.



Rysunek III 23. Chromatogramy uzyskane podczas analiz próbek metanolowego ekstraktu z liofilizatów owoców aronii (próbka 6S) z wykorzystaniem zestawu HPLC sprzężonego z urządzeniem do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny. [I] – chromatogram analitów przed derywatyzacją; [II] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika ABTS; [III] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika F-C.

1 – kwas protokatechowy, 2 – pochodna kwasu chlorogenowego, 3 – pochodna kwasu cynamonowego, 4 – kwas chlorogenowy, 5 – pochodna kwasu kawowego, 6 – kwas kawowy, 7 – cyjanidyno-3-galaktozyd, 8 – cyjanidyno-3-glukozyd, 9 – pochodna cyjanidyny, 10 – związek z grupy antocyjanów, 11 – pochodna cyjanidyny, 12 – hyperozyd, 13 – rutyna

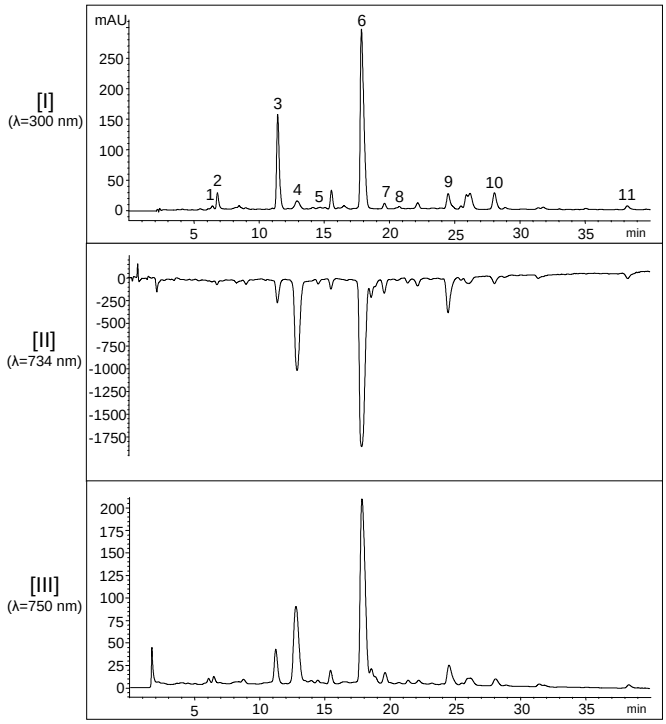
Chromatogram analitów przed procesem derywatyzacji (rysunek III 23 [I]) przedstawia standardowy profil związków fenolowych ekstraktu otrzymanego na bazie owoców aronii. Charakteryzuje się on obecnością 13 głównych pików. Na chromatogramach

uzyskanych po derywatyzacji (rysunek III 23 [II] i [III]) widoczne są piki wskazujące na substancje o aktywności przeciwutleniającej. W wyniku przeprowadzonych analiz okazało się, że wszystkie zidentyfikowane związki wykazywały aktywność przeciwutleniającą, co widoczne było po procesie derywatyzacji zarówno za pomocą roztworu kationorodnika $ABTS^{\bullet+}$, jak i roztworu odczynnika F-C. Ponadto, proces ten ujawnił różnice w potencjale przeciwutleniającym fitozwiązków. Stwierdzono, że najwyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się związki z grupy antocyjanów, a zwłaszcza cyjanidyno-3-galaktozyd i pochodna cyjanidyny oznaczona numerem 9 (rysunek III 23), jak również w mniejszym stopniu, pomimo dużej zawartości, kwas chlorogenowy i jego pochodna. Sytuacja taka była spowodowana tym, że w badanej próbce substancje te występowały w znacznych ilościach. Pozostałe fitozwiązki miały mniejszy wkład do całkowitej aktywności przeciwutleniającej badanych owoców.

Analogiczne badania przeprowadzono dla próbki ekstraktu metanolowego otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego odmiany „Jolanta" (J). Chromatogramy uzyskane podczas analiz próbek ekstraktów wykonanych za pomocą zestawu HPLC/PCX przedstawiono na rysunku III 24.

Otrzymane rezultaty wskazywały na obecność 11 pików charakterystycznych dla tego owocu. Wszystkie zidentyfikowane bioaktywne substancje występujące w tej odmianie wiciokrzewu sinego wykazywały aktywność przeciwutleniającą. Podobnie jak w przypadku próbki owoców aronii, do fitozwiązków mających największy wkład do potencjału przeciwutleniającego tych owoców (J) należały antocyjany (zwłaszcza cyjanidyno-3-glukozyd), jak również kwas chlorogenowy, a zatem przede wszystkim substancje znacznie przewyższające pozostałe polifenole ze względu na ich zawartość w tej próbce owoców.

Te wstępne oznaczenia wyraźnie pokazały, że zastosowanie podejścia analitycznego wykorzystującego technikę chromatograficznego „odcisku palca" może być znakomitym narzędziem pozwalającym śledzić przemiany przeciwutleniaczy w trakcie przetwarzania zarówno owoców aronii, jaki i owoców wiciokrzewu sinego.



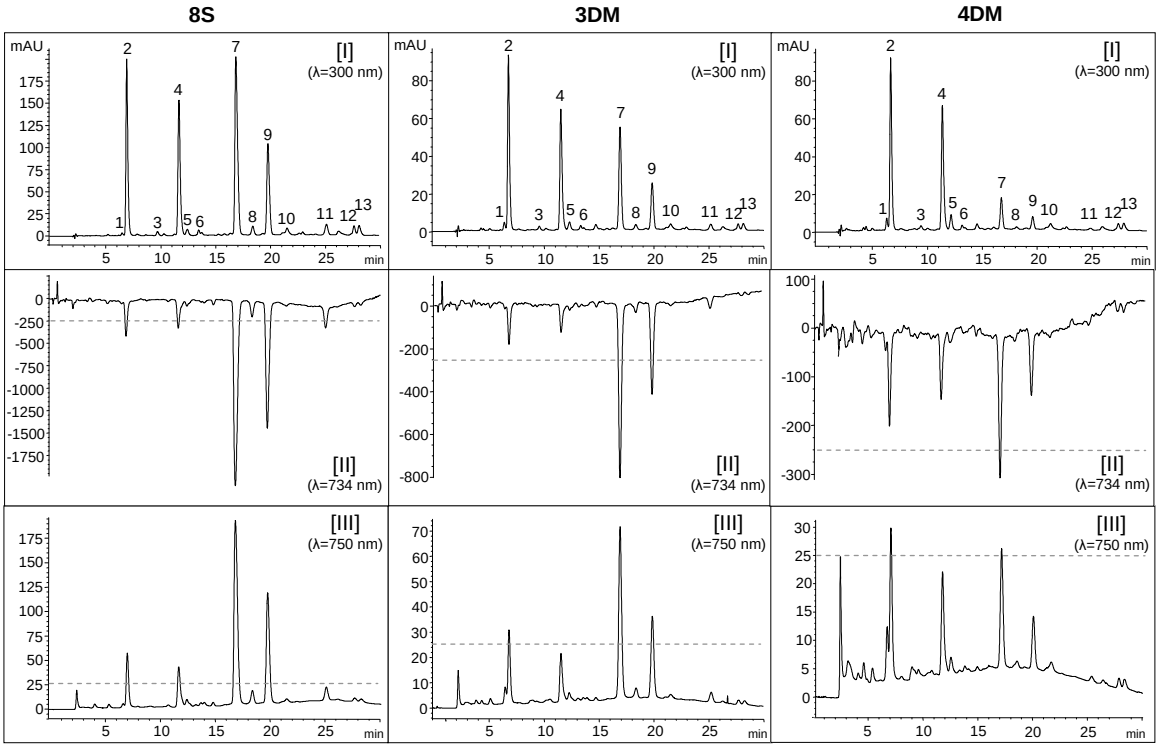
Rysunek III 24. Chromatogramy uzyskane podczas analiz próbek metanolowego ekstraktu z liofilizatów owoców wiciokrzewu sinego (odmiana „Jolanta") z wykorzystaniem zestawu HPLC sprzężonego z urządzeniem do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny. [I] – chromatogram analitów przed derywatyzacją; [II] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika ABTS; [III] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika F-C.

1 – kwas protokatechowy, 2 – pochodna kwasu chlorogenowego, 3 – kwas chlorogenowy, 4 – pochodna cyjanidyny, 5 – kwas kawowy, 6 – cyjanidyno-3-glukozyd, 7 – pochodna cyjanidyny, 8 – związek z grupy antocyjanów, 9 – pochodna cyjanidyny, 10 – rutyna, 11 – kwercetyna

3.5.2. Porównanie profili fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy w wybranych próbkach owoców aronii pobranych podczas produkcji dżemu

Zestaw HPLC sprzężony z urządzeniem do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny wykorzystano do śledzenia zmian profilu przeciwutleniaczy owoców aronii (8S) podczas produkcji dżemu (4DM). Postępowanie to miało umożliwić określenie wpływu obróbki technologicznej na aktywność przeciwutleniającą polifenoli występujących w surowcu wyjściowym. Do przeprowadzenia badań, obok świeżych owoców (8S) i wyrobu finalnego (dżem 4DM), wybrano również próbkę określaną jako 3DM. W niej bowiem zaobserwowano największy spadek właściwości przeciwutleniających w porównaniu z surowcem wyjściowym, co wykazano w trakcie badań prowadzonych z użyciem metod spektrofotometrycznych: ABTS, DPPH oraz testu wykorzystującego odczynnik F-C. Chromatogramy uzyskane podczas analiz ekstraktów metanolowych otrzymanych z próbek

owoców aronii 8S, 3DM oraz 4DM za pomocą zestawu HPLC/PCX przedstawiono na rysunku III 25.



Rysunek III 25. Chromatogramy uzyskane podczas analiz metanolowych ekstraktów z liofilizatów próbek 3DM oraz 4DM pobranych w trakcie produkcji dżemu z owoców aronii (8S) z wykorzystaniem zestawu HPLC sprzężonego z urządzeniem do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny. [I] – chromatogram analitów przed derywatyzacją; [II] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika ABTS; [III] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika F-C.

1 – kwas protokatechowy, 2 – pochodna kwasu chlorogenowego, 3 – pochodna kwasu cynamonowego, 4 – kwas chlorogenowy, 5 – pochodna kwasu kawowego, 6 – kwas kawowy, 7 – cyjanidyno-3-galaktozyd, 8 – cyjanidyno-3-glukozyd, 9 – pochodna cyjanidyny, 10 – związek z grupy antocyjanów, 11 – pochodna cyjanidyny, 12 – hyperozyd, 13 – rutyna

Otrzymane chromatogramy wskazują na obniżanie się aktywności przeciwutleniającej wnoszonej przez poszczególne fitozwiązki podczas ogrzewania surowca z cukrem (próbka 3DM), jak również na dalszy spadek tych właściwości na etapie procesu pasteryzacji w autoklawie (próbka 4DM). Zależności te widoczne były na uzyskanych chromatogramach w postaci zmniejszającej się wysokości pików zarówno po derywatyzacji za pomocą roztworu kationorodnika $ABTS^{\bullet+}$ (rysunek III 25 [II]), jak i odczynnika F-C (rysunek III 25 [III]). Ponadto zauważono, że w przypadku obydwóch użytych reagentów spadek ten następował w podobnym stopniu. Obniżanie aktywności przeciwutleniającej poszczególnych fitozwiązków

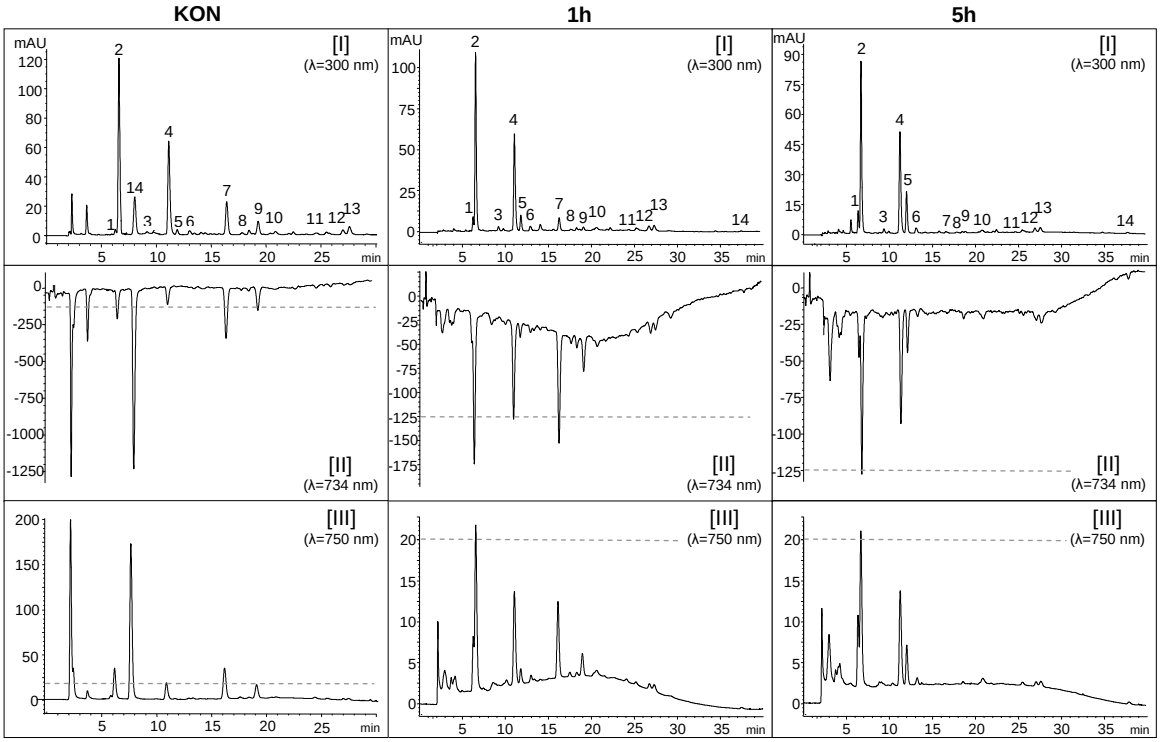
najbardziej widoczne było na przykładzie substancji występujących w najwyższych stężeniach w próbkach surowca, a mianowicie: cyjanidyno-3-galaktozydu i związku należącego do grupy cyjanidyn oznaczonego numerem 9 (rysunek III 25) oraz kwasu chlorogenowego i jego pochodnej. Wysokość piku wskazującego na aktywność przeciwutleniającą cyjanidyno-3-galaktozydu po ogrzewania z cukrem zmalała około 2-krotnie w porównaniu do jego wysokości w próbce świeżych owoców aronii. Proces pasteryzacji wywołał dalszy (około 3-krotny) spadek wysokości tego piku w stosunku do jego wysokości w próbce pobranej w poprzednim etapie obróbki technologicznej. Podobną sytuację zauważono dla pochodnej związków z grupy cyjanidyn (oznaczonej numerem 9), ponieważ wysokość piku odpowiadającego za jej aktywność przeciwutleniającą zmalała około 3-krotnie po ogrzewaniu surowca z cukrem w porównaniu do jego wysokości w próbce świeżych owoców aronii. Proces pasteryzacji przyczynił się do dalszego, około 3-krotnego, spadku wysokości tego piku. Ponadto w próbce oznaczonej jako 3DM odnotowano prawie 2-krotne zmniejszenie wysokości pików odpowiadających za aktywności przeciwutleniające kwasu chlorogenowego oraz jego pochodnej w porównaniu do ich wysokości w surowcu wyjściowym. Po kolejnym etapie przetwarzania (próbka 4DM) nie zauważono dalszego spadku aktywności przeciwutleniających tych związków. W przypadku pozostałych polifenoli zmiany tych właściwości nie były już tak widoczne.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań można stwierdzić, że ogrzewanie surowca z cukrem przyczyniło się do zmniejszenia aktywności przeciwutleniającej głównych grup polifenoli zidentyfikowanych w przetwarzanych owocach aronii. Dalsza obróbka termiczna (proces pasteryzacji) wywołała kolejny, znaczący spadek tej aktywności dla związków z grupy antocyjanów. Te niekorzystne zmiany spowodowały, że uzyskany produkt końcowy (dżem) mógł mieć obniżone właściwości prozdrowotne w porównaniu z tymi, jakie mogłyby być osiągnięte przy pełnym zachowaniu fitokompleksu surowca wyjściowego.

3.5.3. Wpływ tradycyjnej obróbki termicznej soków otrzymanych z owoców aronii na zmiany profili związków wykazujących aktywność przeciwutleniającą

Zestaw HPLC/PCX wykorzystano również do śledzenia zmian profilu przeciwutleniaczy w soku otrzymanym z owoców aronii podczas tradycyjnej obróbki termicznej w temperaturze 100 ^{o}C. Do przeprowadzenia badań wybrano próbki soków ogrzewane przez 1 i 5 godzin, jak również próbkę niepoddaną temu zabiegowi (określaną

jako KON zgodnie z opisem w tabeli III 1). Chromatogramy uzyskane podczas analiz tych soków za pomocą wspomnianego zestawu przedstawiono na rysunku III 26.



Rysunek III 26. Chromatogramy uzyskane podczas analiz próbek soków z aronii (KON oraz próbek soków 1h i 5h poddanych tradycyjnej obróbce termicznej) z wykorzystaniem zestawu HPLC sprzężonego z urządzeniem do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny. [I] – chromatogram analitów przed derywatyzacją; [II] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika ABTS; [III] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika F-C.

1 – kwas protokatechowy, 2 – pochodna kwasu chlorogenowego, 3 – pochodna kwasu cynamonowego, 4 – kwas chlorogenowy, 5 – pochodna kwasu kawowego, 6 – kwas kawowy, 7 – cyjanidyno-3-galaktozyd, 8 – cyjanidyno-3-glukozyd, 9 – pochodna cyjanidyny, 10 – związek z grupy antocyjanów, 11 – pochodna cyjanidyny, 12 – hyperozyd, 13 – rutyna, 14 – pochodna (-)-epikatechiny

W wyniku przeprowadzonych analiz dla próbki soku niepoddanego obróbce termicznej w przedniej części chromatogramu zauważono obecność 2 niezidentyfikowanych pików dających silne sygnały po derywatyzacji (zwłaszcza w przypadku piku charakteryzującego się krótszym czasem retencji). Piki te nie były obecne na chromatogramach uzyskanych przed oraz po derywatyzacji ani po 1, ani po 5 godzinach ogrzewania soku otrzymanego z owoców aronii. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku związku będącego pochodną (-)-epikatechiny (sygnał oznaczony numerem 14). Substancja ta widoczna była na chromatogramie otrzymanym przed derywatyzacją tylko dla próbki określanej jako kontrolna (rysunek III 26; KON [I]). Piki tej substancji, wskazujące na

silną aktywność przeciwutleniającą (wykazaną za pomocą reagentów ABTS i F-C), nie występowały w badanych próbkach ogrzewanych przez czas 1 i 5 godzin w temperaturze 100 ºC. Z kolei kwas chlorogenowy, jak i jego pochodna, były stabilne po 1 godzinie ogrzewania, co uwidocznione było na obu chromatogramach po derywatyzacji (za pomocą roztworu odczynnika ABTS oraz F-C) poprzez występowanie pików o podobnej wysokości, a tym samym o zbliżonej aktywności przeciwutleniającej, co w próbce oznaczonej jako KON. Nieznacznie niższe piki tych fitozwiązków, w porównaniu do pików chromatograficznych uzyskanych w trakcie analizy próbki kontrolnej, uzyskano dla soku poddanego ogrzewaniu przez 5 godzin. W przeciwieństwie do kwasu chlorogenowego i jego pochodnej, po derywatyzacji piki związków z grupy antocyjanów – cyjanidyno-3-galaktozydu oraz pochodnej cyjanidyny oznaczonej na chromatogramach jako nr 9 okazały się być 3-krotnie niższe w próbce poddanej ogrzewaniu przez 1 godzinę w porównaniu do odpowiadających im pików w próbce KON. Co więcej, na chromatogramach uzyskanych po derywatyzacji nie zauważono występowania tych pików w próbce ogrzewanej przez 5 godzin. Oznacza to, że obróbka termiczna przyczyniła się do drastycznego spadku aktywności przeciwutleniającej omawianych związków z grupy antocyjanów.

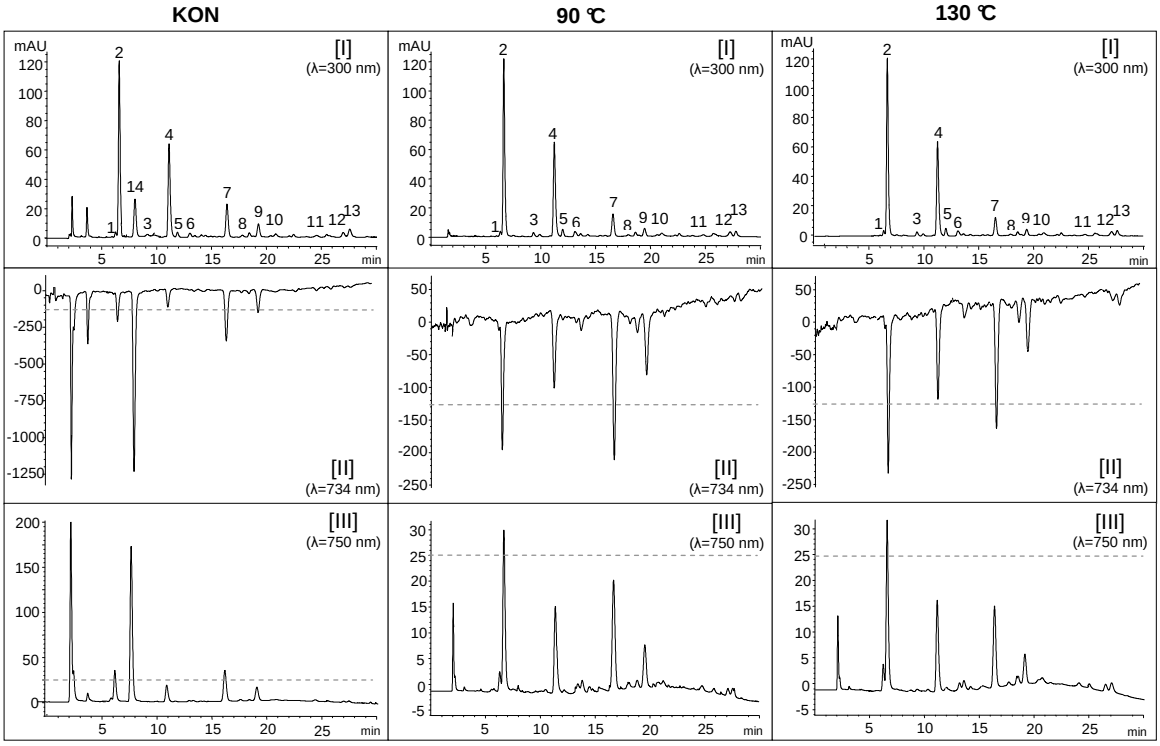
Otrzymane wyniki wskazują na to, że tradycyjna metoda ogrzewania wpływa bardzo niekorzystnie na aktywność przeciwutleniającą soku otrzymanego z owoców aronii, który należy do dość często przygotowywanych wyrobów zarówno w warunkach przemysłowych, jak i domowych.

3.5.4. Wpływ ogrzewania soków otrzymanych z owoców aronii za pomocą urządzenia EnbioJet na przemiany profili związków wykazujących aktywność przeciwutleniającą

W celu określenia wpływu ogrzewania soków uzyskanych z owoców aronii za pomocą urządzenia *EnbioJet* na zmiany profili związków o charakterze przeciwutleniaczy wykorzystano zestaw HPLC/PCX. Do przeprowadzenia badań wybrano próbki soków ogrzewane w temperaturze 90 ºC i 130 ºC oraz próbkę określaną jako KON zgodnie z opisem w tabeli III 1. Chromatogramy uzyskane podczas tych analiz przedstawiono na rysunku III 27.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że w przypadku próbek ogrzewanych za pomocą urządzenia *EnbioJet* (w temperaturze 90 ºC i 130 ºC), w przeciwieństwie do próbek poddanych tradycyjnej obróbce termicznej, na chromatogramach po derywatyzacji za pomocą odczynnika F-C widoczne były niewielkie piki wskazujące na

aktywność przeciwutleniającą odpowiadającą związkowi o najniższym czasie retencji w próbce KON. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku próbek ogrzewanych w temperaturze 100 ºC przez 1 lub 5 godzin, w próbkach poddanych obróbce za pomocą wspomnianego urządzenia nie pojawiały się piki odzwierciedlające aktywność przeciwutleniającą związku będącego pochodną (-)-epikatechiny.



Rysunek III 27. Chromatogramy uzyskane podczas analiz próbek soków z aronii (KON oraz próbek soków poddanych ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet* w temperaturze 90 °C oraz 130 °C) z wykorzystaniem zestawu HPLC sprzężonego z urządzeniem do derywatyzacji analitów w wycieku z kolumny. [I] – chromatogram analitów przed derywatyzacją; [II] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika ABTS; [III] – chromatogram analitów po derywatyzacji za pomocą odczynnika F-C.

1 – kwas protokatechowy, 2 – pochodna kwasu chlorogenowego, 3 – pochodna kwasu cynamonowego, 4 – kwas chlorogenowy, 5 – pochodna kwasu kawowego, 6 – kwas kawowy, 7 – cyjanidyno-3-galaktozyd, 8 – cyjanidyno-3-glukozyd, 9 – pochodna cyjanidyny, 10 – związek z grupy antocyjanów, 11 – pochodna cyjanidyny, 12 – hyperozyd, 13 – rutyna, 14 – pochodna (-)-epikatechiny

Otrzymane rezultaty wskazywały, że aktywność przeciwutleniająca kwasu chlorogenowego i jego pochodnej nie ulegała zmianie pod wpływem ogrzewania za pomocą urządzenia *EnbioJet* zarówno w temperaturze 90 ºC, jak i w 130 ºC w porównaniu z próbką kontrolną. Ponadto, na chromatogramach uzyskanych po derywatyzacji wysokości pików: cyjanidyno-3-galaktozydu oraz pochodnej cyjanidyny oznaczonej numerem 9 (rysunek III 27)

były tylko nieznacznie niższe w próbkach poddanych obróbce za pomocą urządzenia *EnbioJet* w porównaniu z uzyskanymi sygnałami tych związków w próbce niepoddanej temu zabiegowi. Oznaczało to, że ten sposób przetwarzania soku nie przyczyniał się do znaczącego obniżenia aktywności przeciwutleniających wspomnianych antocyjanów.

Wyniki badań sugerują, że ogrzewanie za pomocą urządzenia *EnbioJet* nie powodowało tak dużych zmian w profilu przeciwutleniaczy, jak to miało miejsce w przypadku tradycyjnej obróbki termicznej. Należy również podkreślić, że ogrzewanie w tym urządzeniu (nawet w temperaturze 130 ºC) nie przyczyniało się do znaczącej utraty aktywności przeciwutleniającej pochodzącej od związków z grupy antocyjanów. Do podobnych wniosków prowadziły wyniki analogicznych analiz przeprowadzonych dla soków otrzymanych z owoców wiciokrzewu sinego: J-KON, J90 °C oraz J130 °C. Zatem również monitorowanie przemian fitokompleksu soków z owoców jagodowych za pomocą śledzenia zmian w profilu przeciwutleniaczy wskazuje na zachowawczość procesu ogrzewania przy użyciu technologii mikrofalowej.

3.6. Żywotność naturalnej mikroflory soków otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego po obróbce termicznej za pomocą sterylizatora kompaktowego EnbioJet

Jednym z głównych celów obróbki cieplnej żywności jest jej wyjaławianie. Wiadomo, że najbardziej skutecznym i najczęściej stosowanym sposobem uzyskania czystości mikrobiologicznej utrwalanego produktu żywnościowego jest jego termiczna sterylizacja [136]. W ramach rozprawy doktorskiej postanowiono zatem określić skuteczność inaktywacji drobnoustrojów w sokach otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego za pomocą przepływowego sterylizatora *EnbioJet*. Soki ogrzewano w temperaturze od 80 °C do 135 °C z wykorzystaniem wspomnianego urządzenia. Po zakończonym procesie obróbki termicznej poszczególne próbki soków poddano analizie w celu oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD), liczby bakterii kwasolubnych oraz drożdży i pleśni. Wyniki uzyskane dzięki współpracy z dr inż. Edytą Malinowską-Pańczyk z Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej przedstawiono w tabeli III 9.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że dla wyjściowego soku otrzymanego z owoców aronii (kontrola) ogólna liczba drobnoustrojów wynosiła 3,7 x 10^2 kolonii w 1 mL soku. Natomiast nie wykryto w nim bakterii kwasolubnych oraz drożdży i pleśni. W pozostałych próbkach soku uzyskanego z owoców aronii (poddanych obróbce za pomocą urządzenia *EnbioJet*) nie wykryto żadnych spośród oznaczanych mikroorganizmów.

Otrzymane wyniki sugerowały, że temperatura ogrzewania 90 ºC wystarczała do całkowitej inaktywacji wszystkich drobnoustrojów występujących w soku z aronii.

Tabela III 9. Wyniki analizy mikrobiologicznej soków z aronii i wiciokrzewu sinego poddanych ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet* w zakresie temperatur 80 °C – 135 °C.

owoc	temperatura ogrzewania [℃]	ogólna liczba drobnoustrojów [liczba kolonii/mL]	bakterie kwasolubne [liczba kolonii/mL]	drożdże i pleśnie [liczba kolonii/mL]
aronia	kontrola	$3,7 \times 10^2$	nw	nw
	90	nw	nw	nw
	100	nw	nw	nw
	110	nw	nw	nw
	120	nw	nw	nw
	130	nw	nw	nw
	135	nw	nw	nw
wiciokrzew siny	kontrola	$4,56 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$1,056 \times 10^2$
	80	< 10	nw	nw
	90	nw	nw	nw
	100	nw	nw	nw
	110	nw	nw	nw
	120	nw	nw	nw
	130	nw	nw	nw
	135	nw	nw	nw

nw, nie wykryto

Wyniki wyrażono jako liczbę kolonii przeliczoną na mL soku [liczba kolonii/mL].

W przypadku soku z owoców wiciokrzewu sinego obserwacje mikrobiologiczne wykazały, że dla soku oznaczonego jako kontrolny OLD wynosiła $4,56 \times 10^2$ kolonii/mL, liczba bakterii kwasolubnych była równa $1,2 \times 10^3$ kolonii/mL, zaś liczba drożdży i pleśni stanowiła $1,056 \times 10^2$ kolonii/mL soku. Najniższa temperatura ogrzewania w urządzeniu *EnbioJet* w przypadku tego soku (80 ºC) nie powodowała całkowitej inaktywacji wszystkich mikroorganizmów, natomiast temperatura 90 ºC okazała się być wystarczającą do zapewnienia czystości mikrobiologicznej badanego soku.

Uzyskane wyniki wskazywały, że ogrzewanie soku w temperaturze 90 ºC za pomocą urządzenia *EnbioJet* wystarczało by zredukować liczbę drobnoustrojów do poziomu, który nie zagrażał trwałości mikrobiologicznej soku, a przy tym zapewnione było zachowanie bioaktywnych fitozwiązków występujących w obu surowcach.

3.7. Ocena próbek owoców aronii i wiciokrzewu sinego pod względem wybranych właściwości biologicznych w warunkach in vitro

3.7.1. Oznaczanie cytotoksyczności wybranych próbek owoców aronii i wiciokrzewu sinego w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6

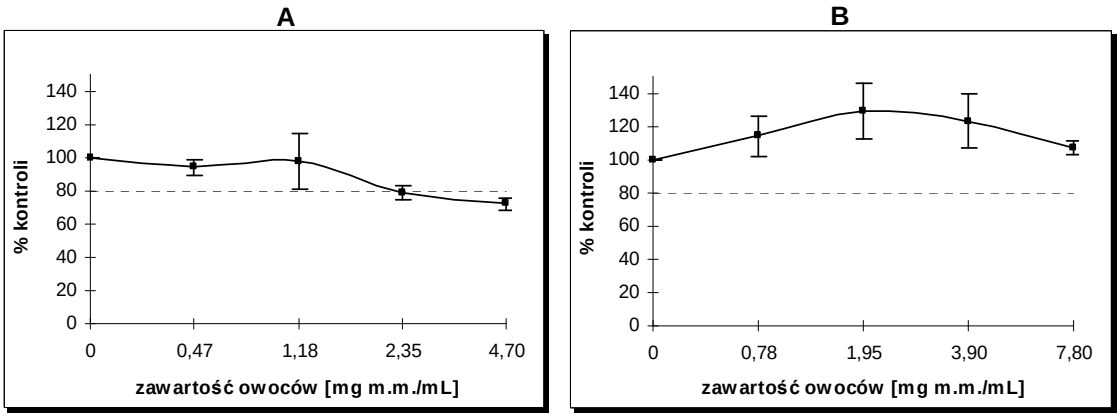
Oznaczanie aktywności cytotoksycznej wykonywano w celu oceny działania biologicznego fitokompleksów owoców aronii i wiciokrzewu sinego na komórki eukariotyczne, a także w celu doboru odpowiedniego zakresu stężeń (niepowodującego zahamowania wzrostu komórek większego niż 20 %) badanych próbek owoców, który wykorzystany zostanie przy ocenie ochrony komórek przed uszkodzeniami DNA wywołanymi przez RFT. W przeprowadzanych doświadczeniach wykorzystano linię ludzkich komórek limfoblastycznych TK6, które mogą stanowić model komórek ludzkiego układu krwionośnego. Zatem obserwacje poczynione w trakcie badań mogą odzwierciedlać wpływ składników owoców oraz produktów otrzymanych z aronii i wiciokrzewu sinego na organizm ludzki. Do przeprowadzenia badań wybrano próbki świeżych owoców aronii oznaczone jako 6S (według opisu w tabeli III 1) i owoców wiciokrzewu sinego odmiany „Jolanta", jak również soki otrzymane z owoców aronii:

- sok poddany tradycyjnej obróbce termicznej przez okres 1 godziny (określany jako 1h),
- sok ogrzewany za pomocą urządzenia *EnbioJet* w temperaturze 130 ºC (oznaczony jako 130 ºC),
- sok niepoddany wyżej wymienionym zabiegom (KON).

Komórki TK6 traktowano badanymi próbkami przez okres 3 godzin. Ocenę cytotoksyczności prowadzono z wykorzystaniem metody, która polega na liczeniu komórek w komorze hemocytometru.

Uzyskane wyniki odnośnie wpływu próbek etanolowych ekstraktów otrzymanych ze zliofilizowanych świeżych owoców aronii (6S) oraz owoców wiciokrzewu sinego (odmiana „Jolanta") na komórki TK6 przedstawiono na rysunku III 28 w postaci zależności stopnia zahamowania wzrostu tych komórek (inkubowanych z badanymi próbkami owoców przez okres 3 godzin) od zawartości badanego materiału roślinnego w zawiesinie komórkowej. Zawartość tę podano w postaci odpowiadającej ilości mokrej masy (m.m.) świeżych owoców przypadającej na 1 mL pożywki zawierającej komórki TK6. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zauważono nieznaczną toksyczność owoców aronii przy zawartości 0,47 oraz 1,18 [mg m.m. owoców/mL pożywki] w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych.

W przypadku kolejnych próbek, dla których zawartość mokrej masy owoców w pożywce była większa, cytotoksyczność wzrastała w miarę zwiększania się ilości tej próbki owoców w pożywce podczas inkubacji z komórkami TK6. Powodowała ona bowiem zahamowanie wzrostu komórek o ponad 20 % (około 21 % w przypadku próbki owoców aronii o zawartości 2,35 [mg m.m. owoców/mL pożywki] oraz około 28 % dla próbki o zawartości 4,7 [mg m.m. owoców/mL pożywki]). Pomimo znacznego (przekraczającego poziom 20 %) stopnia zahamowania wzrostu komórek TK6 przy ostatnich dwóch wspomnianych próbkach owoców aronii, w dalszych badaniach postanowiono wykorzystać cały badany zakres rozcieńczeń tej próbki owoców, w tym także próbki rozcieńczone do zawartości 2,35 oraz 4,7 [mg m.m. owoców/mL pożywki]. Zdecydowano się bowiem sprawdzić czy mimo dość wysokiego stopnia zahamowania wzrostu ludzkich komórek limfoblastycznych pod wpływem badanych próbek, zauważalny będzie ochronny ich wpływ w stosunku do komórek TK6 narażonych na działanie RFT.



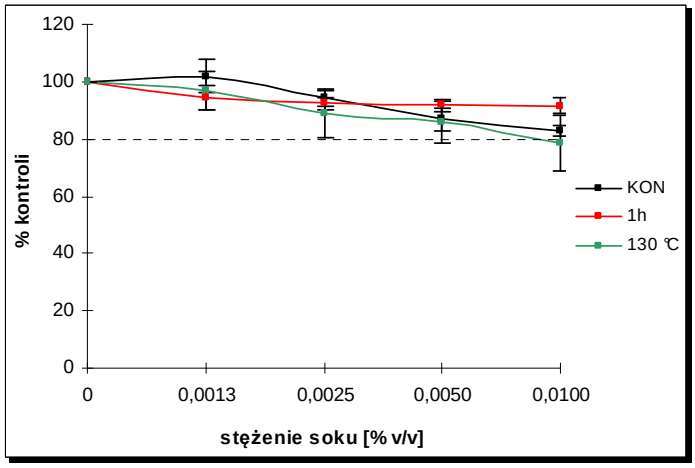
Rysunek III 28. Zahamowanie wzrostu ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 przez etanolowe ekstrakty otrzymane ze zliofilizowanych próbek owoców:

[A] – aronii oznaczonej jako 6S (według opisu w tabeli III 1), [B] – wiciokrzewu sinego (odmiany „Jolanta"). Komórki inkubowano z badanymi próbkami przez okres 3 godzin. Stężenie ekstraktów przeliczono na mokrą masę [m.m.] materiału roślinnego znajdującą się w 1 mL pożywki. Przedstawione wyniki są średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD.

W przypadku owoców wiciokrzewu sinego odmiany „Jolanta" okazało się, że próbka tego materiału roślinnego w badanym zakresie zawartości mokrej masy owoców w 1 mL zawiesiny komórkowej (od 0,78 [mg m.m./mL] do 7,8 [mg m.m./mL]) nie wykazywała toksyczności w stosunku do komórek TK6. Przeciwnie, wydaje się, że przyczyniała się ona do stymulacji wzrostu komórek (nawet o około 30 % dla komórek inkubowanych z badaną próbką o zawartości 1,95 [mg m.m. owoców/mL pożywki]). Do przeprowadzenia kolejnych

doświadczeń z wykorzystaniem komórek TK6 użyto zatem całego badanego zakresu rozcieńczeń tej próbki owoców.

Jak już wspomniano, oznaczenie aktywności cytotoksycznej wykonano również dla próbek soków otrzymanych z owoców aronii. Uzyskane wyniki dotyczące wpływu tych soków (określonych jako KON, 1h, 130 ºC) w zakresie stężeń od 0 do 0,01 % [v/v] na wzrost komórek TK6 podczas 3-godzinnej inkubacji przedstawiono na rysunku III 29.



Rysunek III 29. Zahamowanie wzrostu ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 przez soki otrzymane z owoców aronii (oznaczone jako KON, 1h, 130 °C według opisu w tabeli III 1).

Komórki inkubowano z sokami przez okres 3 godzin. Przedstawione wyniki są średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że cytotoksyczność wszystkich badanych soków w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych jest dość podobna i rośnie w miarę wzrostu ich stężenia. W przypadku komórek traktowanych za pomocą badanego zakresu stężeń soku niepoddanego obróbce (KON) nie zauważono zahamowania wzrostu ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 większego niż 20 %. Inkubacja komórek TK6 z sokiem ogrzewanym przez okres 1 godziny w temperaturze 100 ºC przyczyniała się do spadku ilości komórek w pożywce nieprzekraczającego 10 %. Natomiast sok poddany ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet* powodował zahamowanie wzrostu komórek o ponad 20 % tylko podczas inkubacji komórek z sokiem o najwyższym spośród badanych stężeń (0,01 % [v/v]). Wynika z tego, że sposób obróbki pozwalający zachować fitokompleks owoców aronii, zapewniał także zachowanie aktywności biologicznej soku.

Ze względu na niewielką toksyczność soków do przeprowadzenia dalszych doświadczeń, podobnie jak w przypadku pozostałych próbek owoców, postanowiono wykorzystać cały badany zakres stężeń tych soków (od 0 do 0,01 % [v/v]).

3.7.2. Oznaczanie genotoksyczności wybranych próbek owoców aronii i wiciokrzewu sinego w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6

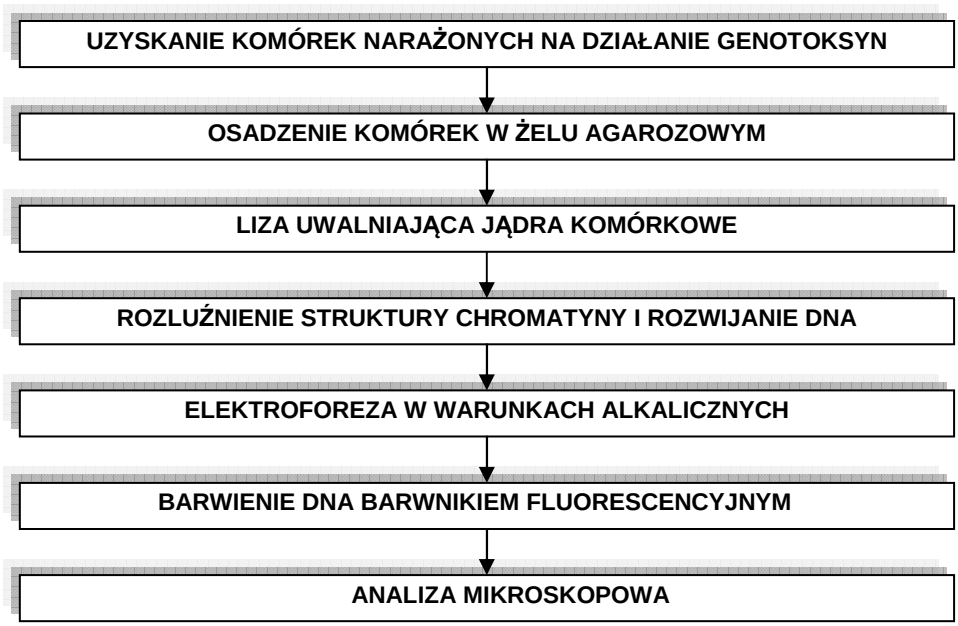
Reaktywne formy tlenu są odpowiedzialne za tzw. stres oksydacyjny prowadzący do wielu niekorzystnych efektów zarówno na poziomie pojedynczej komórki, jak i organizmu jako całości. Celem molekularnym dla RFT w komórce są białka, jak również lipidy wchodzące w skład błon komórkowych. Najgroźniejszymi jednak uszkodzeniami spowodowanymi przez nie są uszkodzenia DNA [137]. Skutkiem reakcji wolnych rodników i innych aktywnych form tlenu z występującymi w materiale genetycznym zasadami azotowymi (purynowymi lub pirymidynowymi) są różnorodnie zmodyfikowane produkty, które nie pozwalają na właściwe parowanie się zasad. Uniemożliwia to prawidłowy przebieg replikacji DNA, co może prowadzić do mutacji, które z kolei mogą zainicjować proces kancerogenezy. Ponadto, modyfikacji pod wpływem RFT mogą ulegać również fragmenty cukrowe w materiale genetycznym, toteż organizmy musiały rozwinąć mechanizmy naprawcze, chroniące materiał genetyczny przed tego typu modyfikacjami [138]. Jednym ze sposobów naprawy uszkodzonego DNA jest mechanizm opierający się na wycinaniu zasad materiału genetycznego – BER (ang. *base excision repair*) [139]. Pierwszym etapem działania tego systemu naprawy DNA jest rozpoznanie uszkodzonych zasad oraz usunięcie ich przez glikozylazy [140]. Do tej grupy enzymów należy m.in. wyizolowana z komórek bakteryjnych formamidopirymidyno-DNA-glikozylaza (FPG), która powszechnie używana jest w warunkach laboratoryjnych do detekcji oksydatywnych uszkodzeń zasad purynowych materiału genetycznego, w tym 8-oksoguaniny [141].

Jedną z powszechnie stosowanych metod służących do oznaczenia poziomu uszkodzeń DNA jest test kometowy (ang. *comet assay*). Znany jest on również jako „elektroforeza pojedynczych komórek w żelu agarozowym" (ang. *single cell gel electrophoresis*). Po raz pierwszy przedstawiony on został przez Östlinga i Johansona w 1984 roku jako metoda wizualizacji uszkodzeń DNA w pojedynczej komórce [142]. Głównymi zaletami testu są:

- łatwość aplikacji do badań różnych tkanek,
- jednoczesna detekcja wielu rodzajów uszkodzeń DNA,
- otrzymywanie danych na poziomie pojedynczej komórki.

Badania z wykorzystaniem testu kometowego mogą być prowadzone na komórkach pochodzących z roślin, zwierząt i co najważniejsze – na komórkach ludzkich [143, 144]. W teście kometowym niewielka liczba komórek, które mogą być uprzednio narażone na

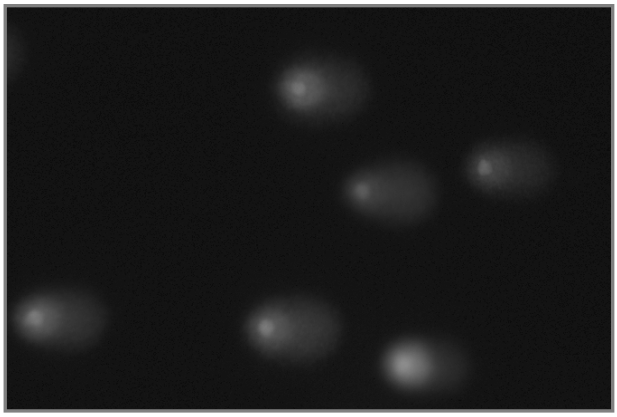
działanie czynnika zdolnego do uszkadzania materiału genetycznego, zawieszana jest w cienkiej warstwie żelu agarozowego nałożonego na szkiełko mikroskopowe, poddana lizie, a następnie elektroforezie. Podczas elektroforezy w warunkach alkalicznych następuje migracja pofragmentowanego, czyli uszkodzonego DNA (o ładunku ujemnym) w kierunku bieguna dodatniego (anody) [145]. Główne etapy testu kometowego przedstawione zostały na rysunku III 30. Jądro komórki narażonej na czynniki uszkadzające DNA, poddane testowi, po wybarwieniu fluorochromami uwidacznia się pod mikroskopem jako kometa z głową (zarys jądra) oraz ogonem (pofragmentowany DNA). Łańcuch kwasu deoksyrybonukleinowego pocięty wskutek uszkodzenia migruje podczas elektroforezy dalej niż nieuszkodzony DNA, stąd też im dłuższy jest ogon komety (czyli im wyższy poziom intensywności fluorescencji w obrębie ogona komety podczas analizy mikroskopowej), tym bardziej jest uszkodzony materiał genetyczny [146]. Przykładowy obraz mikroskopowy komet uzyskanych w wyniku przeprowadzenia testu kometowego przedstawiono na rysunku III 31.



Rysunek III 30. Główne etapy prowadzenia testu kometowego w warunkach alkalicznych [145].

Test kometowy przeprowadzany jest w warunkach alkalicznych (pH = 13,3) w celu identyfikacji pęknięć nici DNA w tzw. miejscach AP (apurynowych/apirymidynowych – pozbawionych zasady purynowej/pirymidynowej) i innych miejscach wrażliwych na środowisko alkaliczne. Modyfikowane zasady materiału genetycznego, niewrażliwe na środowisko alkaliczne, nie są bezpośrednio identyfikowane w zwykłym teście kometowym, dlatego też w miarę potrzeb test może być modyfikowany. Przykładem takiej modyfikacji jest

wariant testu zapewniający możliwość wykrycia utlenionych zasad azotowych DNA poprzez dodanie w odpowiednim momencie (po etapie lizy uwalniającej jądra komórkowe) roztworu enzymu, w tym wspomnianej już formamidopirymidyno-DNA-glikozylazy [124].

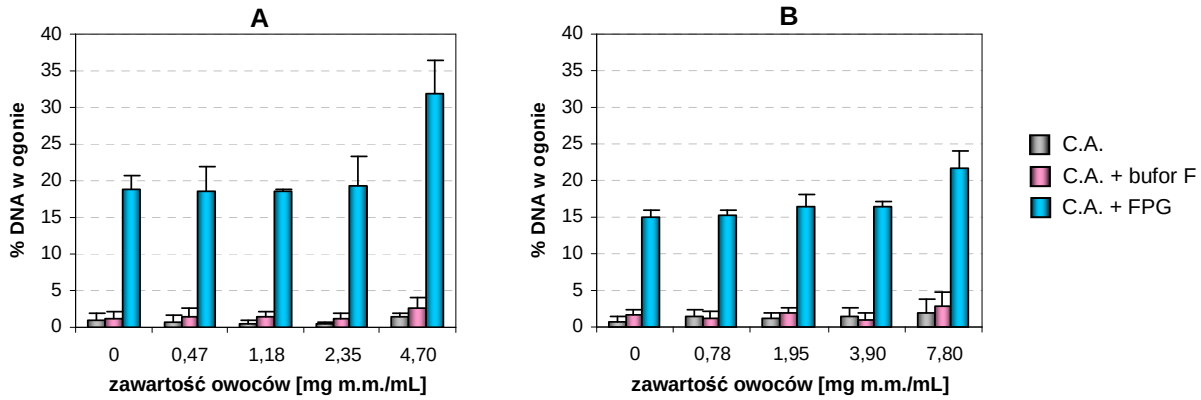


Rysunek III 31. Obraz mikroskopowy uszkodzonego DNA (w postaci komet) komórek TK6 otrzymany po przeprowadzeniu testu kometowego.

To ostatnie podejście zastosowano w badaniach objętych rozprawą doktorską w celu oznaczenia genotoksyczności wybranych próbek owoców aronii i wiciokrzewu sinego w stosunku do komórek TK6. W doświadczeniach tych komórki inkubowane z badanymi próbkami owoców dzielono na 3 grupy:

- pierwszą stanowiły komórki poddane badaniom z wykorzystaniem standardowej wersji testu kometowego (oznaczonej jako „C.A.”), po przeprowadzeniu której uzyskiwany podczas analiz mikroskopowych obraz odzwierciedlał pęknięcia nici DNA wrażliwe na środowisko alkaliczne;
- kolejną stanowiły komórki, które poddano analizie za pomocą zmodyfikowanego testu kometowego z użyciem enzymu FPG w celu wykrycia oksydatywnych uszkodzeń zasad purynowych w materiale genetycznym; preparat ten oznaczono jako „C.A. + FPG”;
- ostatnią grupę, tak jak poprzednią, stanowiły komórki, które również poddano analizie z wykorzystaniem zmodyfikowanego testu kometowego, ale w tym przypadku po etapie lizy uwalniającej jądra komórkowe preparaty traktowano buforem (oznaczonym jako „bufor F”) służącym do przygotowania roztworu enzymu FPG; tak przygotowana próbka (określana jako „C.A. + bufor F”) stanowiła odniesienie w stosunku do preparatu komórkowego traktowanego za pomocą roztworu enzymu FPG.

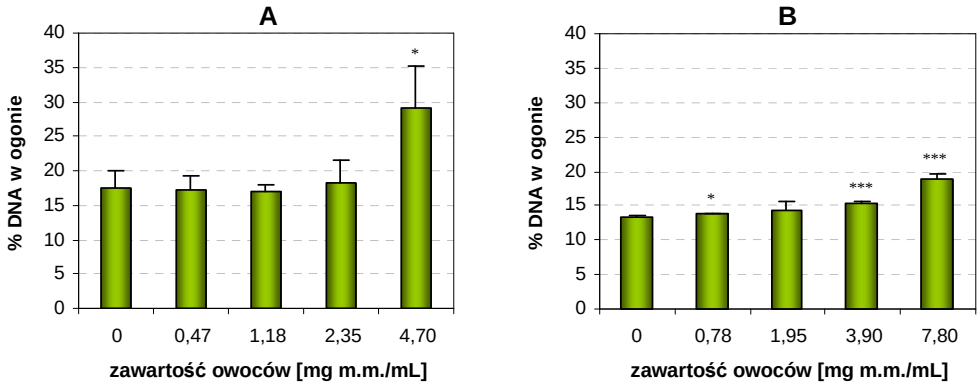
Wyniki testu kometowego dla próbek świeżych owoców aronii (oznaczonych jako 6S według opisu w tabeli III 1) oraz wiciokrzewu sinego (odmiany „Jolanta") w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 przedstawiono na rysunku III 32.



Rysunek III 32. Stopień uszkodzenia DNA ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 traktowanych za pomocą etanolowych ekstraktów otrzymanych ze zliofilizowanych próbek owoców:
[A] – aronii oznaczonej jako 6S (według opisu w tabeli III 1), [B] – wiciokrzewu sinego (odmiany „Jolanta"). Komórki inkubowano z badanymi próbkami przez okres 3 godzin. Stężenie ekstraktów przeliczono na mokrą masę [m.m.] materiału roślinnego znajdującą się w 1 mL pożywki. Przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że zarówno owoce aronii, jak i wiciokrzewu sinego nie przyczyniały się do wzrostu pęknięć nici DNA w komórkach TK6 poddanych badaniom z wykorzystaniem standardowej wersji testu kometowego (wersja „C.A."). Świadczył o tym podobny poziom uszkodzeń materiału genetycznego uzyskany dla komórek traktowanych za pomocą etanolowego ekstraktu otrzymanego z owoców aronii/wiciokrzewu sinego w porównaniu ze stopniem uszkodzenia DNA w komórkach niepoddanych temu zabiegowi. Natomiast po przeprowadzeniu zmodyfikowanego testu kometowego z wykorzystaniem enzymu FPG dla wspomnianych populacji komórek zauważono zwiększenie zawartości materiału genetycznego w obrębie ogonów komet uzyskanych z DNA komórek inkubowanych z etanolowymi ekstraktami owoców w porównaniu do ilości materiału genetycznego zawartego w ogonach komet otrzymanych dla preparatów komórek kontrolnych. Aby dokonać dokładniejszej wizualizacji otrzymanych różnic poziomu uszkodzeń DNA po przeprowadzeniu badań z wykorzystaniem zmodyfikowanej wersji testu kometowego, uzyskane dane poddano dalszemu przetwarzaniu tak, by możliwe było zobrazowanie zależności wartości odpowiadających uszkodzeniom oksydatywnym zasad purynowych w DNA od zawartości badanych próbek owoców aronii/wiciokrzewu sinego w

zawiesinie komórkowej. W tym celu uzyskaną wartość mediany odpowiadającą zawartości DNA w ogonie komet (wyrażonej jako procentowy udział DNA w ogonie; % DNA w ogonie) dla preparatów komórkowych traktowanych za pomocą buforu F („C.A. + bufor F") odjęto od wartości mediany odpowiadającej ilości DNA w ogonie komet dla preparatów komórkowych traktowanych za pomocą roztworu enzymu FPG („C.A. + FPG"). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku III 33.



Rysunek III 33. Poziom uszkodzenia DNA w obrębie zasad purynowych ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 traktowanych za pomocą etanolowych ekstraktów otrzymanych ze zliofilizowanych próbek owoców:

[A] – aronii oznaczonej jako 6S (według opisu w tabeli III 1), [B] – wiciokrzewu sinego (odmiany „Jolanta"). Komórki inkubowano z badanymi próbkami przez okres 3 godzin. Stężenie ekstraktów przeliczono na mokrą masę [m.m.] materiału roślinnego znajdującą się w 1 mL pożywki. Przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD. Analizę statystyczną pomiędzy poziomem uszkodzenia DNA komórek kontrolnych (nietraktowanych) oraz komórek traktowanych za pomocą ekstraktów prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

W wyniku przeprowadzonych badań okazało się, że inkubacja komórek TK6 z próbką owoców aronii (w ilości 4,7 mg m.m. owoców/mL pożywki) wywołała statystycznie istotny wzrost poziomu uszkodzeń zasad purynowych DNA w porównaniu do stopnia tych uszkodzeń w preparacie kontrolnym, nietraktowanym za pomocą wspomnianej próbki owoców (rysunek III 33 A). Natomiast inkubacja komórek z próbkami owoców aronii (określanych jako 6S według opisu w tabeli III 1) o zawartości od 0,47 do 2,35 [mg m.m. owoców/mL pożywki] nie powodowała tego niekorzystnego efektu ponieważ materiał genetyczny przygotowanych preparatów komórkowych uszkodzony był w tym samym stopniu, co preparat kontrolny.

W przypadku owoców wiciokrzewu sinego zauważono statystycznie istotny wzrost poziomu uszkodzeń w obrębie zasad purynowych DNA komórek TK6 traktowanych za

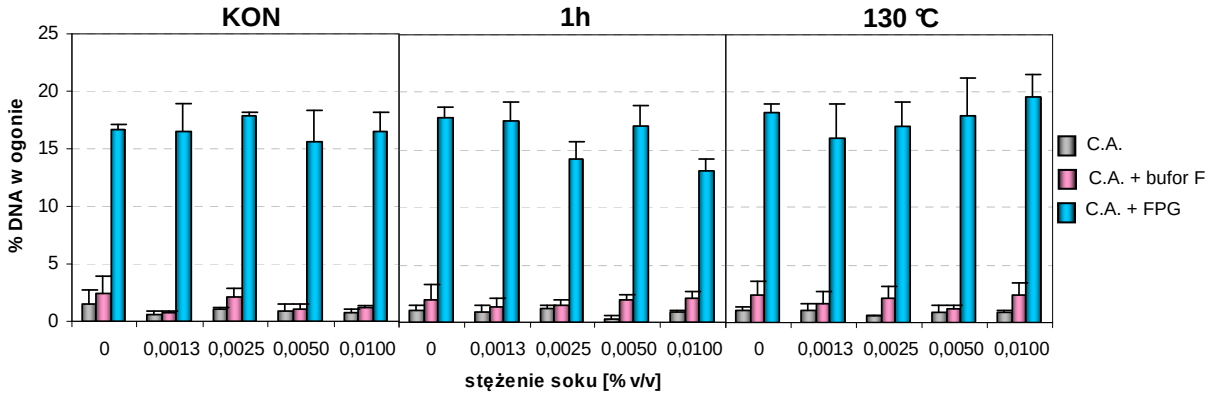
pomocą próbki tego materiału roślinnego o zawartości 0,78; 3,9 oraz 7,8 [mg m.m. owoców/mL pożywki] w porównaniu ze stopniem tych uszkodzeń w komórkach kontrolnych, które nie były traktowane badaną próbką (rysunek III 33 B). Jednakże z punktu widzenia biologicznego stopień uszkodzenia DNA komórek inkubowanych z badaną próbką o najniższej zawartości owoców (0,78 [mg m.m./mL]) tylko nieznacznie różnił się od poziomu tych uszkodzeń otrzymanego dla kontrolnego preparatu komórkowego.

Podsumowując, poziom genotoksyczności próbek świeżych owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego nie okazał się być wysoki. Zawartość DNA w ogonach komet w przypadku wszystkich przygotowanych preparatów komórkowych traktowanych za pomocą badanych próbek (o różnej zawartości mokrej masy owoców w pożywce) była mniejsza niż 30 %. Zatem do dalszych analiz wykorzystano cały badany zakres rozcieńczeń próbek owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego.

Oznaczenie genotoksyczności wykonano również dla próbek soków otrzymanych z owoców aronii:

- ogrzewanego przez okres 1 godziny w temperaturze 100 ºC,
- przetwarzanego za pomocą urządzenia *EnbioJet* w temperaturze 130 ºC,
- soku niepoddanego żadnym zabiegom technologicznym (oznaczonego jako KON według opisu w tabeli III 1).

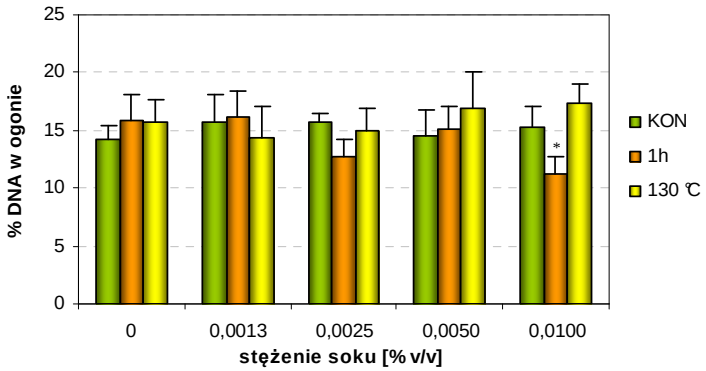
Otrzymane wyniki pomiarów aktywności genotoksycznej dla wymienionych próbek soków z owoców aronii w stosunku do ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 przedstawiono na rysunku III 34.



Rysunek III 34. Stopień uszkodzenia DNA ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 traktowanych za pomocą soków otrzymanych z owoców aronii (oznaczonych jako KON, 1h, 130 °C według opisu w tabeli III 1).

Komórki inkubowano z sokami przez okres 3 godzin. Przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD.

Wyniki przeprowadzonych badań (rysunek III 34), otrzymane w przypadku stosowania standardowej wersji testu kometowego (wersja „C.A"), świadczyły o tym, że stopień uszkodzenia DNA (pęknięcia nici) w komórkach traktowanych za pomocą poszczególnych rozcieńczeń próbek soków z owoców aronii był podobny do poziomu tych uszkodzeń w komórkach kontrolnych (niepoddanych inkubacji z tymi sokami). Zatem badane próbki soków nie przyczyniały się do wzrostu pęknięć nici materiału genetycznego. Natomiast po przeprowadzeniu doświadczeń z wykorzystaniem zmodyfikowanej wersji testu kometowego, w której wykorzystuje się roztwór enzymu FPG („C.A. + FPG") zauważono różnice pomiędzy poziomem uszkodzenia DNA (zawartością materiału genetycznego w obrębie ogonów komet) preparatów komórkowych inkubowanych z badanymi sokami a poziomem uszkodzenia DNA (zawartością materiału genetycznego w obrębie ogonów komet) preparatów komórek kontrolnych. W celu dokładniejszej wizualizacji wspomnianych różnic, podobnie jak tego dokonano w przypadku próbek świeżych owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego, uzyskaną wartość mediany odpowiadającą zawartości DNA w ogonie komet (% DNA w ogonie) dla preparatów komórkowych traktowanych za pomocą buforu F („C.A. + bufor F") odjęto od wartości mediany odpowiadającej ilości DNA w ogonie komet dla preparatów komórkowych traktowanych za pomocą roztworu enzymu FPG („C.A. + FPG"). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku III 35.



Rysunek III 35. Poziom uszkodzenia DNA w obrębie zasad purynowych ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 traktowanych za pomocą soków otrzymanych z owoców aronii (oznaczonych jako KON, 1h, 130 °C według opisu w tabeli III 1).

Komórki inkubowano z badanymi sokami przez okres 3 godzin. Przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD. Analizę statystyczną pomiędzy poziomem uszkodzenia DNA komórek kontrolnych (nietraktowanych) oraz komórek traktowanych sokami prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że największe różnice (statystycznie istotne) w stopniu uszkodzenia DNA w obrębie zasad purynowych występowały pomiędzy preparatem komórkowym kontrolnym oznaczonym jako 1h – nieinkubowanym z sokiem (stężenie soku 1h w pożywce równe 0 % v/v) a preparatem komórkowym traktowanym za pomocą tego soku o stężeniu 0,01 % v/v. Wyniki uzyskane w trakcie badań wskazują bowiem, że ten ostatni preparat charakteryzował się znacznie mniejszym poziomem uszkodzenia materiału genetycznego niż odpowiadający mu preparat kontrolny. W przypadku komórek inkubowanych z sokiem ogrzewanym za pomocą urządzenia *EnbioJet* w temperaturze 130 ºC okazało się, że wraz ze zwiększaniem się jego stężenia zawartość DNA w ogonach komet badanych preparatów nieznacznie wzrastała. Jak można było oczekiwać, najmniejsze różnice w poziomie uszkodzeń materiału genetycznego odnotowano pomiędzy preparatami komórkowymi traktowanymi za pomocą poszczególnych stężeń soku kontrolnego (KON).

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że poziom uszkodzeń DNA wyrażony za pomocą zawartości materiału genetycznego w ogonie komet (% DNA w ogonie) w przypadku wszystkich przygotowanych preparatów komórkowych inkubowanych z badanymi próbkami soków otrzymanych z owoców aronii był mniejszy niż 20 % (DNA w ogonie). Ze względu na tak niewielką genotoksyczność tych próbek w stosunku do komórek TK6, do dalszych analiz użyto całego badanego zakresu stężeń soków.

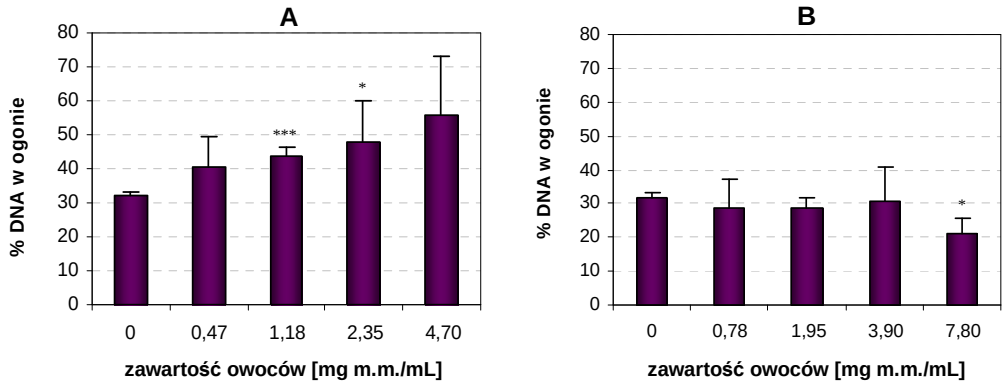
Ponadto, porównując wyniki uszkodzeń DNA w obrębie zasad purynowych komórek TK6 traktowanych za pomocą etanolowych ekstraktów otrzymanych ze zliofilizowanych próbek owoców aronii oraz traktowanych za pomocą soków z owoców aronii, zauważono, że w ekstrakcie etanolowym mogły znaleźć się substancje o działaniu genotoksycznym, które nie występują w sokach.

3.7.3. Ochrona ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 poddanych stresowi oksydacyjnemu przez wybrane próbki owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego

Test kometowy posłużył również do oceny wybranych próbek owoców pod kątem ochrony DNA komórek przed atakiem reaktywnych form tlenu. Jako źródło RFT wykorzystano nadtlenek wodoru (H_2O_2). Otrzymane wyniki pomiarów stopnia uszkodzeń materiału genetycznego ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 inkubowanych z próbkami świeżych owoców aronii (oznaczonych jako 6S według opisu w tabeli III 1) oraz

wiciokrzewu sinego (odmiany „Jolanta”), a następnie traktowanych roztworem H_2O_2 i poddanych testowi kometowemu przedstawiono na rysunku III 36.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń okazało się, że wraz ze wzrostem zawartości badanych próbek owoców aronii w zawiesinie komórkowej zwiększał się poziom uszkodzeń DNA komórek TK6 (rysunek III 36 A). W przypadku preparatu stanowiącego próbkę odniesienia, tj. przygotowanego z komórek traktowanych za pomocą nadtlenku wodoru, ale niepoddanych inkubacji ze wspomnianą próbką owoców (o zawartości owoców równej 0 [mg m.m./mL pożywki]), zawartość materiału genetycznego w ogonach komet wynosiła około 30 % (DNA w ogonie). Natomiast dodatek etanolowego ekstraktu otrzymanego z owoców aronii przyczyniał się do zwiększania ilości DNA w ogonach komet preparatów komórkowych. Statystycznie istotną różnicę w uszkodzeniu materiału genetycznego zauważono pomiędzy preparatem stanowiącym próbkę odniesienia a preparatami inkubowanymi z próbką owoców aronii rozcieńczoną do zawartości 1,18 oraz 2,35 [mg m.m. owoców/mL zawiesiny komórkowej]. Zatem można mówić, że związki zawarte w owocach aronii mogą wzmagać działanie nadtlenku wodoru wywołującego stres oksydacyjny, a zatem wykazywać aktywność prooksydacyjną.



Rysunek III 36. Ochrona DNA ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 przed stresem oksydacyjnym (wywołanym przez 50 μM roztwór nadtlenku wodoru) za pomocą etanolowych ekstraktów otrzymanych ze zliofilizowanych próbek owoców:

[A] – aronii oznaczonej jako 6S (według opisu w tabeli III 1), [B] – wiciokrzewu sinego (odmiany „Jolanta”). Komórki inkubowano z badanymi próbkami owoców przez okres 3 godzin. Stężenie ekstraktów przeliczono na mokrą masę [m.m.] materiału roślinnego znajdującą się w 1 mL pożywki. Przedstawione wyniki stanowią średnią z czterech niezależnych oznaczeń ± SD. Analizę statystyczną pomiędzy stopniem ochrony DNA komórek kontrolnych (nietraktowanych) oraz komórek traktowanych za pomocą ekstraktów prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Natomiast w przypadku preparatów komórkowych traktowanych za pomocą roztworu nadtlenku wodoru oraz inkubowanych z próbką etanolowego ekstraktu otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego poziom uszkodzeń DNA komórek TK6 okazał się być podobny w całym badanym zakresie zawartości tej próbki owoców w pożywce (od 0,78 do 7,8 mg m.m./mL]), z wyjątkiem próbki o zawartości 7,8 [mg m.m. owoców/mL pożywki]. Ta ostatnia zawartość owoców wiciokrzewu sinego w pożywce podczas przygotowywania preparatu komórkowego przyczyniła się do spadku (statystycznie istotnego) uszkodzeń materiału genetycznego w komórkach TK6 w porównaniu do tych uszkodzeń w preparacie stanowiącym próbkę odniesienia – traktowanym za pomocą roztworu H_2O_2, ale niepoddanym inkubacji z badaną próbką owoców (zawartość owoców równa 0 [mg m.m./mL pożywki]). Można zatem na tej podstawie wnioskować, że substancje zawarte w owocach wiciokrzewu sinego mogą przyczyniać się do ochrony ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 przed stresem oksydacyjnym.

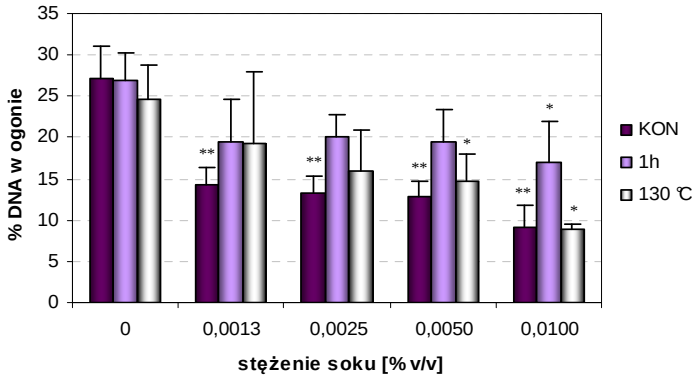
Ochronny wpływ przed stresem oksydacyjnym wywołanym w komórkach TK6 (za pomocą nadtlenku wodoru) sprawdzono również dla soków otrzymanych z owoców aronii, a mianowicie dla:

- soku określanego jako „KON” (według opisu w tabeli III 1) – niepoddanego obróbce technologicznej;
- soku oznaczonego jako „1h” – poddanego tradycyjnej obróbce termicznej przez okres 1 godziny w temperaturze 100 °C;
- soku określonego jako „130 °C” – ogrzewanego za pomocą urządzenia *EnbioJet* w temperaturze 130 °C.

Uzyskane wyniki tych oznaczeń wykonanych za pomocą standardowej wersji testu kometowego przedstawiono na rysunku III 37.

Biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonych badań można stwierdzić, że wraz ze wzrostem stężenia próbki soku określonej jako KON poziom uszkodzeń DNA w komórkach TK6 zmniejsza się. Różnice pomiędzy zawartością materiału genetycznego w ogonach komet (% DNA w ogonie) dla preparatu komórkowego stanowiącego odniesienie (traktowanego za pomocą roztworu H_2O_2, ale niepoddanego inkubacji z badaną próbką soku) a ilością DNA w ogonach komet preparatów komórkowych traktowanych roztworem nadtlenku wodoru i poddanych inkubacji z sokiem KON okazały się być statystycznie istotne. Zatem sok ten może przyczyniać się do ochrony komórek TK6 przed stresem oksydacyjnym. Uzyskane wyniki mogą być również podstawą do stwierdzenia, że stopień uszkodzenia DNA (wywołanego przez nadtlenek wodoru) także spada w przypadku preparatów komórkowych

inkubowanych z sokiem poddanym tradycyjnej obróbce termicznej (1h). Dlatego można wnioskować, że próbka ta również przyczynia się do ochrony DNA komórek TK6 przed działaniem reaktywnych form tlenu. Jednak w tym przypadku statystycznie istotną różnicę pomiędzy poziomem uszkodzenia materiału genetycznego preparatu komórkowego stanowiącego próbkę odniesienia a stopniem uszkodzenia DNA w preparatach komórkowych poddanych inkubacji z sokiem (1h) obserwuje się dopiero przy najwyższym spośród zastosowanych stężeń tego soku (0,01 % v/v). Uzyskane wyniki wskazują, że do ochrony DNA przed działaniem RFT przyczynia się także sok poddany ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet* w temperaturze 130 °C. Zauważono bowiem, że zawartość DNA w ogonach komet uzyskanych dla preparatów komórkowych traktowanych za pomocą nadtlenku wodoru i inkubowanych ze wspomnianą próbką soku jest mniejsza w porównaniu do ilości DNA w ogonach komet otrzymanych dla preparatu komórkowego będącego próbką odniesienia (traktowanego tylko za pomocą roztworu H_2O_2). Statystycznie istotne różnice zauważono pomiędzy poziomem uszkodzenia DNA w preparacie komórkowym stanowiącym próbkę odniesienia a stopniem uszkodzenia materiału genetycznego w preparatach komórkowych inkubowanych z sokiem (poddanym ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet*) o stężeniu 0,005 oraz 0,01 % v/v.



Rysunek III 37. Ochrona DNA ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 przed stresem oksydacyjnym (wywołanym przez 50 μM roztwór nadtlenku wodoru) za pomocą soków otrzymanych z owoców aronii (oznaczonych jako KON, 1h, 130 °C według opisu w tabeli III 1).

Komórki inkubowano z badanymi sokami przez okres 3 godzin. Przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD. Analizę statystyczną pomiędzy stopniem ochrony DNA komórek kontrolnych (nietraktowanych) oraz komórek traktowanych sokami prowadzono za pomocą testu t-Studenta (oznaczenia poziomu istotności: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Analizując otrzymane wyniki można stwierdzić, że spośród wszystkich badanych próbek soków otrzymanych z owoców aronii w największym stopniu do ochrony DNA

ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 przed stresem oksydacyjnym przyczyniał się sok KON. Nieznacznie mniejszy efekt ochronny w stosunku do DNA komórek TK6 wykazywał sok ogrzewany za pomocą urządzenia *EnbioJet*. Natomiast sok poddany tradycyjnej obróbce termicznej (1h) okazał się chronić DNA komórek TK6 przed stresem oksydacyjnym w mniejszym stopniu w porównaniu do ochrony materiału genetycznego tych komórek przed działaniem RFT przez pozostałe badane soki.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na to, że urządzenie *EnbioJet,* wykorzystujące energię mikrofalową podczas obróbki termicznej soków, nie wpływa w sposób istotny na modyfikacje właściwości biologicznych badanej próbki soku. Przeciwnie, wydaje się być znacznie lepszym rozwiązaniem technologicznym, niż tradycyjna metoda obróbki termicznej. Sugeruje się bowiem, że nawet ogrzewanie soków w temperaturze 130 °C za pomocą tego nowoczesnego urządzenia nie wpływa na występowanie znaczących zmian w składzie związków biologicznie aktywnych.

3.8. Określenie wpływu zawartości bioaktywnych fitozwiązków na potencjał przeciwutleniający próbek owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego

Jak wiadomo substancjami, które w wielu owocach jagodowych występują na najwyższym poziomie stężeń są związki z grupy antocyjanów [147]. W wyniku przeprowadzonych badań wykonanych w ramach rozprawy doktorskiej okazało się, że fitozwiązkiem, który występuje w największej ilości (spośród zidentyfikowanych polifenoli) w owocach i niemal wszystkich próbkach produktów otrzymanych z owoców aronii jest cyjanidyno-3-galaktozyd. W przypadku owoców i produktów otrzymanych z owoców wiciokrzewu sinego okazało się, że związkiem, którego zawartość w badanych próbkach jest dominująca okazał się cyjanidyno-3-glukozyd. Dlatego też postanowiono sprawdzić wpływ zawartości wyżej wymienionych polifenoli na całkowitą aktywność przeciwutleniającą owoców aronii i wiciokrzewu sinego oraz produktów z nich otrzymanych. Przyjmuje się bowiem, że właściwości przeciwutleniające należą do bardzo istotnych spośród prozdrowotnych aktywności tych owoców jagodowych [148]. Aby dokonać weryfikacji istnienia zależności pomiędzy stężeniem cyjanidyno-3-galaktozydu a potencjałem przeciwutleniającym owoców aronii uzyskane wyniki oznaczeń zawartości tego związku dla próbek świeżych owoców skorelowano z wynikami oznaczeń całkowitej aktywności przeciwutleniającej. Analogiczne korelacje wyznaczono dla próbek poddanych przetwarzaniu, a mianowicie dla próbek tych owoców pobranych na kolejnych etapach produkcji dżemu

określanego jako 4DM (według opisu w tabeli III 1), a także dla próbek soków poddanych tradycyjnej obróbce termicznej (KON, 1h – 5h) oraz ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet* (KON, 90 °C – 135 °C). W tym celu wyznaczono współczynniki korelacji Pearsona (r). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli III 10.

Tabela III 10. Wartości liczbowe współczynników korelacji Pearsona dla wyników oznaczeń zawartości cyjanidyno-3-galaktozydu przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD oraz dla wyników oznaczeń aktywności przeciwutleniającej wykonanych za pomocą testów ABTS, DPPH oraz testu z wykorzystaniem odczynnika F-C dla próbek owoców aronii.

PRÓBKA	KORELACJA		
	cyjanidyno-3-galaktozyd / ABTS	cyjanidyno-3-galaktozyd / DPPH	cyjanidyno-3-galaktozyd / F-C
świeże owoce (1S – 8S)	0,6364	0,3956	0,5699
dżem (8S, 1DM – 4DM)	0,9792	0,9912	0,9949
sok poddany tradycyjnej obróbce termicznej (KON, 1h – 5h)	0,8707	0,9609	0,9880
sok ogrzewany za pomocą urządzenia *EnbioJet* (KON, 90 °C – 135 °C)	0,9646	0,7791	0,9248

Kolorami oznaczono: - bardzo silną korelację (r = 0,9 ÷ 1,0); - silną korelację (r = 0,7 ÷ 0,9); - występującą korelację z występującymi dość silnymi innymi wpływami (r = 0,4 ÷ 0,7); - korelację słabą (r = 0,2 ÷ 0,4); - korelację praktycznie nieistotną (r = 0 ÷ 0,2).

Okazało się, że aktywność przeciwutleniająca dla świeżych owoców aronii (1S – 8S) jest skorelowana w różnym stopniu z zawartością cyjanidyno-3-galaktozydu. Może to być dowodem na to, że związek ten jest jedną z wielu substancji występujących w owocach aronii, która może odpowiadać za właściwości przeciwutleniające. Tezę tę potwierdzają wyniki badań uzyskane podczas identyfikacji fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy za pomocą techniki wykorzystującej zestaw HPLC/PCX.

Natomiast w przypadku próbek pobranych podczas kolejnych etapów produkcji dżemu (8S, 1DM – 4DM) potencjał przeciwutleniający tych próbek okazał się być silnie skorelowany ze stężeniem cyjanidyno-3-galaktozydu. Taki wynik sugeruje, że obróbka surowca odgrywa kluczową rolę w przemianach tego związku, zaś jego duże straty w trakcie poszczególnych etapów produkcji mogą być przyczyną niskiej aktywności przeciwutleniającej produktów finalnych w porównaniu z surowcem wyjściowym.

Właściwości przeciwutleniające próbek soków poddanych tradycyjnej obróbce termicznej (KON, 1h – 5h), a także ogrzewanych za pomocą urządzenia *EnbioJet* (KON, 90

°C – 135 °C) również okazały się być silnie skorelowane ze stężeniem cyjanidyno-3-galaktozydu. Oznacza to, że o ile przetwarzanie soków, zarówno jednym, jak i drugim sposobem, przyczynia się do spadku potencjału przeciwutleniającego, to jest to spowodowane spadkiem zawartości tego fitozwiązku w trakcie obróbki. Należy jednak pamiętać, że ogrzewanie soku z aronii za pomocą urządzenia *EnbioJet* okazało się być bardziej zachowawczym sposobem przetwarzania niż tradycyjna obróbka termiczna w temperaturze 100 °C.

Jak już wspomniano wcześniej, sprawdzono również wpływ zawartości cyjanidyno-3-glukozydu na całkowitą aktywność przeciwutleniającą owoców wiciokrzewu sinego oraz próbek produktów z nich otrzymanych. W tym celu wyznaczono współczynniki korelacji Pearsona dla wyników oznaczeń zawartości cyjanidyno-3-glukozydu oraz dla rezultatów oznaczeń aktywności przeciwutleniającej zarówno dla świeżych owoców różnych odmian wiciokrzewu sinego (oznaczonych jako W, B, Z, WK, BR, ZL, J, 44 według opisu w tabeli III 1), jak i dla soków otrzymanych z tych owoców poddanych tradycyjnej obróbce termicznej (J-KON, J-1h – J-5h) i ogrzewanych za pomocą urządzenia *EnbioJet* (J-KON, J80 °C – J135 °C). Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli III 11.

Tabela III 11. Wartości liczbowe współczynników korelacji Pearsona dla wyników oznaczeń zawartości cyjanidyno-3-glukozydu przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD oraz dla wyników oznaczeń aktywności przeciwutleniającej wykonanych za pomocą testów ABTS, DPPH oraz testu z wykorzystaniem odczynnika F-C dla próbek owoców wiciokrzewu sinego.

PRÓBKA	KORELACJA		
	cyjanidyno-3-glukozyd / ABTS	cyjanidyno-3-glukozyd / DPPH	cyjanidyno-3-glukozyd / F-C
świeże owoce (W, B, Z, WK, BR, ZL, J, 44)	0,7975	0,8333	0,8549
sok poddany tradycyjnej obróbce termicznej (J-KON, J-1h – J-5h)	0,8280	0,7553	0,7358
sok ogrzewany za pomocą urządzenia *EnbioJet* (J-KON, J80 °C – J135 °C)	-0,6980	-0,6858	-0,4708

Kolorami oznaczono: - bardzo silną korelację (r = 0,9 ÷ 1,0); - silną korelację (r = 0,7 ÷ 0,9); - występującą korelację z występującymi dość silnymi innymi wpływami (r = 0,4 ÷ 0,7); - korelację słabą (r = 0,2 ÷ 0,4); - korelację praktycznie nieistotną (r = 0 ÷ 0,2).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że pomiędzy zawartością cyjanidyno-3-glukozydu a potencjałem przeciwutleniającym badanych próbek owoców wiciokrzewu sinego (W, B, Z, WK, BR, ZL, J, 44) występuje silna korelacja. Oznacza to, że fitozwiązek ten ma istotny wpływ na właściwości biologiczne tych owoców.

Podobnie, silną zależność między stężeniem tego związku z grupy antocyjanów a całkowitą aktywnością przeciwutleniającą zauważono dla próbki soku poddanego tradycyjnej obróbce termicznej (J-KON, J-1h – J-5h). Zatem również w tym przypadku, podobnie jak to miało miejsce dla soku otrzymanego z owoców aronii, poddanego ogrzewaniu w temperaturze 100 °C, tradycyjna metoda przetwarzania przyczyniała się do zmniejszenia potencjału przeciwutleniającego będącego wynikiem spadku zawartości związku z grupy antocyjanów, obecnego w badanej próbce soku wyjściowego (J-KON) w największej ilości spośród zidentyfikowanych fitozwiązków. Tak znacznego wpływu sposobu obróbki nie odnotowano natomiast dla soku otrzymanego z owoców wiciokrzewu sinego, poddanego ogrzewaniu za pomocą urządzenia *EnbioJet*. Przypuszczalnie za taki wynik może odpowiadać długi czas przechowywania próbek soków J-KON oraz J80 °C – J135 °C od momentu ich obróbki technologicznej do czasu przeprowadzenia oznaczenia zawartości fitozwiązków (w tym cyjanidyno-3-glukozydu) oraz potencjału przeciwutleniającego.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że istnieje dość silna zależność pomiędzy zawartością antocyjanów a właściwościami przeciwutleniającymi badanych próbek produktów otrzymanych z owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego. Jak się więc okazuje, związki te mają duży wkład w całkowitą aktywność przeciwutleniającą badanych próbek, ale niestety w znacznym stopniu ulegają degradacji podczas obróbki termicznej. Podobnie, jak wskazują na to dane literaturowe, negatywny wpływ podwyższonej temperatury na zawartość antocyjanów, jak również właściwości przeciwutleniające, zauważono w przypadku koncentratów otrzymanych z owoców aronii. Inkubacja tego produktu w temperaturze 60 °C przez okres 8 godzin przyczyniała się bowiem do zmniejszenia zawartości antocyjanów o 35 % oraz spadku potencjału przeciwutleniającego o 56 % w stosunku do wartości wyjściowych [149].

Zatem podczas wyboru lub wprowadzania modyfikacji już istniejących technologii obróbki surowca, a także projektowania technologii wytwarzania nowych produktów otrzymanych na bazie owoców aronii i wiciokrzewu sinego należy uwzględnić takie warunki przetwarzania, które nie powodowałyby dużych strat fitozwiązków (w szczególności antocyjanów) w finalnym produkcie. Taką technologią, która nie wpływa na zmiany poziomu związków polifenolowych w trakcie obróbki termicznej, może być ogrzewanie za pomocą energii mikrofalowej wykorzystywane w urządzeniu *EnbioJet*. Uzyskane wyniki wskazują, że metoda ta nie powoduje znaczących strat fitozwiązków. Jest to znacznie lepsze rozwiązanie technologiczne w porównaniu do tradycyjnych technologii przetwarzania owoców.

IV PODSUMOWANIE

Coraz szersze kręgi społecznościowe zwracają uwagę na prowadzenie tzw. zdrowego stylu życia, którego jednym z kluczowych elementów jest właściwa dieta, dostarczająca organizmowi zarówno niezbędnych substancji odżywczych, jak i nieodżywczych. Szczególnego znaczenia w tym zakresie nabrała żywność bogata w fitozwiązki, o których wiadomo, że charakteryzują się właściwościami prozdrowotnymi [150]. Wykorzystanie tych naturalnych substancji jest w chwili obecnej dominującą tendencją w światowej produkcji żywności funkcjonalnej, której skład ma korzystnie wpływać na stan zdrowia człowieka. Ponadto, odchodzi się już od suplementacji, ponieważ najkorzystniejsze dla organizmu w świetle ostatnich badań jest spożywanie składników diety w naturalnej postaci [151]. Kładzie się również nacisk na prowadzenie badań nad składem i wartością odżywczą nowych wyrobów oraz ich uzasadnionym żywieniowo włączaniem do diety. Wiadomo jednak, że przetwórstwo może przyczyniać się do częściowego zniszczenia związków o właściwościach prozdrowotnych albo też do mało efektywnego ich odzysku z surowca. Toteż ważny jest dobór takich warunków obróbki technologicznej, aby końcowy produkt miał jak najmniej zmieniony skład prozdrowotnych substancji obecnych w surowcu wyjściowym [152].

Bardzo ciekawym materiałem badawczym są owoce aronii oraz wiciokrzewu sinego. Krzewy aronii są w Polsce uprawiane od lat, a jej owoce stanowią źródło fitozwiązków (głównie antocyjanów) o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych [24]. Wiciokrzew siny również może być uprawiany w naszym klimacie na szeroką skalę. Ponadto, przypuszcza się, że związki obecne w jego owocach mogą wykazywać zbliżone aktywności biologiczne do substancji występujących w owocach aronii. Kolejną wspólną cechą obu owoców jest to, że spożywa się je przeważnie dopiero po przetworzeniu – w postaci soków, dżemów itp. Potencjalne korzyści zrowotne spowodowały, że w ramach prac związanych z realizacją rozprawy doktorskiej podjęto badania mające na celu przede wszystkim sprawdzenie wpływu sposobu przetwarzania na skład i właściwości biologiczne owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego, ponieważ na ten temat w literaturze światowej dostępnych jest jeszcze bardzo mało danych. Badania te miały służyć kilku celom:

1. Wskazaniu technologii, która zapewni możliwość zachowania cennych składników owoców aronii i wiciokrzewu sinego w wyrobach finalnych.
2. Dostarczeniu informacji pomocnych w opracowaniu nowych produktów spożywczych na bazie owoców aronii i wiciokrzewu sinego, co może przyczynić się do rozszerzenia oferty lokalnych producentów przetworów owocowych.

3. Dostarczeniu podstaw naukowych, umożliwiających producentom odpowiednich produktów żywnościowych (np. soków, dżemów) otrzymanych na bazie owoców aronii i wiciokrzewu sinego, zamieszczanie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych na etykietach produktów, podnosząc tym samym konkurencyjność oferty. (Oświadczenia takie, według Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r., powinny znaleźć się na wprowadzanych na rynek produktach dla zapewnienia „(…) wysokiego poziomu ochrony konsumentów i ułatwienia im wyboru (…)".)
4. Zachęceniu plantatorów do podjęcia uprawy roślin o cennej zawartości fitozwiązków, a w szczególności wiciokrzewu sinego, którego uprawa jeszcze nie jest rozpowszechniona w naszym kraju.

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły szeregu informacji o znaczeniu technologicznym w kontekście działania biologicznego.

1. W przypadku świeżych owoców aronii stwierdzono, że:
   - fitozwiązkiem, który występuje w największej ilości (spośród zidentyfikowanych substancji) w tych owocach jest cyjanidyno-3-galaktozyd; dość duża okazuje się być również zawartość kwasu chlorogenowego,
   - za wysoki potencjał przeciwutleniający odpowiedzialne są w głównej mierze antocyjany (a w szczególności cyjanidyno-3-galaktozyd) oraz kwas chlorogenowy i jego pochodna,
   - związki zawarte w tych owocach mogą wzmagać działanie czynników wywołujących stres oksydacyjny w komórkach eukariotycznych.
2. W przypadku świeżych owoców wiciokrzewu sinego wykazano, że:
   - bioaktywną substancją, która występuje w tych owocach na najwyższym poziomie stężeń (wśród zidentyfikowanych fitozwiązków) jest cyjanidyno-3-glukozyd oraz kwas chlorogenowy,
   - za wysoką całkowitą aktywność przeciwutleniającą odpowiedzialne są przede wszystkim wspomniane dwa związki występujące w tych owocach,
   - substancje obecne w tych owocach mają zdolność ochrony komórek eukariotycznych przed stresem oksydacyjnym,
   - odmianą, której owoce charakteryzują się najkorzystniejszymi właściwościami biologicznymi okazała się być odmiana „Jolanta".
3. Na przykładzie próbek pobranych podczas kolejnych etapów produkcji dżemu z owoców aronii udowodniono, że:

- obróbka termiczna wywołuje duże straty fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy.

4. W przypadku próbek soków otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego, dla których prześledzono wpływ temperatury, a także czasu ogrzewania, stwierdzono, że:
   - tradycyjny sposób ogrzewania (w temperaturze 100 °C) przyczynia się do znacznej utraty antocyjanów stanowiących najważniejszą grupę fitozwiązków występujących w tych sokach, co pociąga za sobą również spadek potencjału przeciwutleniającego,
   - składniki soku otrzymanego z owoców aronii, poddanego tradycyjnej metodzie obróbki termicznej przez okres 1 godziny, w mniejszym stopniu przyczyniały się do ochrony komórek eukariotycznych przed stresem oksydacyjnym niż związki zawarte w soku nieogrzewanym.
5. W przypadku nowoczesnej technologii konserwacji soków za pomocą urządzenia *EnbioJet* wykazano, że:
   - ogrzewanie za pomocą energii mikrofalowej przyczynia się do występowania mniejszych strat antocyjanów oraz mniejszego spadku właściwości przeciwutleniających soków w porównaniu do tradycyjnej obróbki termicznej,
   - substancje obecne w soku przetwarzanym za pomocą tej technologii mają zdolność ochrony komórek eukariotycznych przed stresem oksydacyjnym w większym stopniu niż związki występujące w soku poddanym tradycyjnej obróbce termicznej, co wykazano na przykładzie soku otrzymanego z owoców aronii.

Ze względu na istotny wpływ temperatury na przemiany składu/profilu fitozwiązków o korzystnych właściwościach prozdrowotnych w owocach aronii oraz wiciokrzewu sinego bardzo ważnym aspektem staje się odpowiedni dobór warunków przetwarzania tych owoców, tzn. takich, które powodują jak najmniejsze straty substancji bioaktywnych. Proponowaną technologią obróbki termicznej, która nie powoduje znaczących, niekorzystnych zmian składu tych związków jest omawiana w ramach rozprawy doktorskiej technologia wykorzystująca urządzenie *EnbioJet*. Wydaje się być ona doskonałym rozwiązaniem służącym konserwacji oraz zapewnieniu bezpieczeństwa mikrobiologicznego nie tylko w przypadku soków otrzymanych z owoców jagodowych, lecz także innych soków owocowych. Dlatego też szczególnie ciekawym kierunkiem badań naukowych mogą stać się dalsze prace poświęcone zagadnieniu procesu sterylizacji/pasteryzacji soków owocowych, w tym również soków otrzymanych z owoców jagodowych, za pomocą wspomnianego urządzenia w celu dostarczenia kolejnych, cennych informacji pomocnych podczas udoskonalania technologii przetwórstwa tych artykułów spożywczych.

W tym miejscu trzeba też podkreślić, że kolejne prace eksperymentalne warto byłoby ukierunkować również na dalsze badania nad aktywnościami biologicznymi owoców oraz produktów otrzymanych z owoców aronii i wiciokrzewu sinego. Szczególnie godne uwagi są owoce wiciokrzewu sinego, będące do tej pory przedmiotem stosunkowo niewielu badań naukowych. Poza tym owoce te mają doskonałe walory smakowe, zatem mogłyby stać się popularnym składnikiem diety, po który konsumenci sięgaliby chętniej niż to się obecnie dzieje w przypadku owoców aronii o charakterystycznym cierpkim smaku.

V STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

W ostatnich latach coraz większą uwagę przywiązuje się do poszukiwania naturalnych składników diety, których regularne spożywanie może mieć znaczenie dla ochrony organizmu ludzkiego przed różnymi chorobami. Wysokimi właściwościami prozdrowotnymi charakteryzują się owoce bogate w antocyjany, do których należą m.in. aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) i wiciokrzew siny (*Lonicera caerulea* L.), zwany także jagodą kamczacką. Należą one do składników diety o dużym potencjale przeciwutleniającym. Owoce charakteryzujące się wysokim poziomem zawartości substancji bioaktywnych cieszą się zainteresowaniem przemysłu spożywczego. Jednakże w trakcie procesów przerobu i przetwórstwa owoców fitozwiązki o właściwościach prozdrowotnych mogą ulegać częściowemu zniszczeniu lub być mało efektywnie odzyskiwane z surowca. Zatem ważne jest zapewnienie takich warunków obróbki, które nie wpływałyby na występowanie znaczących zmian w składzie fitokompleksu surowca. Z tą myślą podjęto prace mające na celu określenie wpływu sposobu przetwarzania na skład i właściwości biologiczne owoców aronii i wiciokrzewu sinego.

Badaniami objęto próbki świeżych owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego, próbki pobrane podczas kolejnych etapów otrzymywania dżemu z owoców aronii, a także próbki soków z owoców aronii i wiciokrzewu sinego, poddane tradycyjnej obróbce termicznej w temperaturze 100 °C oraz ogrzewane za pomocą mikrofalowego sterylizatora przepływowego *EnbioJet*.

Przeprowadzono badania polegające na oznaczeniu zawartości fitozwiązków, oznaczeniu całkowitej aktywności przeciwutleniającej, określeniu profilu przeciwutleniaczy, przeprowadzeniu analizy mikrobiologicznej soków ogrzewanych za pomocą urządzenia *EnbioJet*, sprawdzeniu zdolności wybranych próbek owoców do ochrony komórek TK6 przed stresem oksydacyjnym.

Otrzymane wyniki pokazują, że istotny wkład do całkowitej aktywności przeciwutleniającej próbek owoców aronii oraz wiciokrzewu sinego mają związki z grupy antocyjanów oraz kwas chlorogenowy i jego pochodna. Podczas badań zauważono także istotny wpływ temperatury procesu przetwarzania na zawartość fitozwiązków (zwłaszcza antocyjanów) o korzystnych właściwościach prozdrowotnych w badanych owocach. Uzyskane wyniki sugerują, że ogrzewanie soków z aronii oraz wiciokrzewu sinego za pomocą urządzenia *EnbioJet* jest procesem bardziej zachowawczym w porównaniu z tradycyjną obróbką termiczną w temperaturze 100 °C. Stosunkowo niewielkie zmiany obserwowano w składzie i zawartości bioaktywnych fitozwiązków; zachowane zostały też właściwości

biologiczne badanych soków. Wykorzystane w doświadczeniach urządzenie okazało się być również skutecznym sposobem eliminacji mikroorganizmów w badanych próbkach. Można zatem oczekiwać, że technologia przetwarzania z wykorzystaniem mikrofalowego sterylizatora przepływowego *EnbioJet* okaże się być również zachowawczym procesem dla soków otrzymanych z innych owoców niż te, które zostały użyte w obecnych doświadczeniach.

VI STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Recently, prevention of various diseases by dietary means has become a hot field of research. Aronia (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) and blueberry honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.), have received much attention in this regard, owing to their high antioxidant potential attributed to polyphenolic compounds, mainly anthocyanins. Such beneficial properties of these fruits provide health-promoting options for food industry. It is expected, however, that processing may influence the anthocyanins content of final aronia and blueberry honeysuckle products reaching consumers. That is why, it is required from modern food processing technologies that such compounds are not lost. With that in mind, this study aimed at determining how processing influences polyphenolic composition and biological activity of aronia and blueberry honeysuckle.

The analyzed samples included fresh fruits, samples collected during subsequent steps of aronia jam production, aronia and blueberry honeysuckle juices submitted to conventional thermal processing (at the temperature of 100 °C) and heated with microwave flow sterylizer *EnbioJet*.

The parameters examined included the quantitative determinations of bioactive phytochemicals, total antioxidant activity, changes in profiles of antioxidants, inactivation of microorganisms (in the case of juices heated with *EnbioJet*), verification of protective effect of selected samples of fruits against oxidative stress in the TK6 human lymphoblastoid cell line.

The obtained results show that the total antioxidant activity of examined samples depends on the presence of anthocyanin and the content of chlorogenic acid and its derivative. It was concluded that the high temperature used in food processing leads to a significant degradation of phytochemicals (mainly anthocyanins). The results also suggested that the thermal preservation with microwave flow sterilizer (*EnbioJet*) is superior to the conventional thermal processing technology (at 100 ºC) with regards to the conservation of bioactive polyphenols and biological activity. Moreover, it was revealed the compact sterilizer (*EnbioJet*) used in experiments, proves to be very effective in eliminating all microorganisms thus guarantees a high quality product without any potential risks to human health. It can be expected that conclusions with regards to microwave flow sterilizer will hold true for other fruits rich in bioactive phytochemicals.

VI LITERATURA

[1] Key1 T.J., Schatzkin A., Willett W.C., Allen1 N.E., Spencer E.A., Travis R.C.: Diet, nutrition and the prevention of cancer. Pub. Health Nutr., 7: 187-200, 2004

[2] Kok F., Bouwman L., Desiere F.: Personalized nutrition. Principles and applications. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007

[3] Jemal A., Murray T., Ward E., Samuels A., Tiwari R.C., Ghafoor A., Feuer E.J., Thun M.J.: Cancer Statistics, 2005, CA Cancer J. Clin., 55: 10-30, 2005

[4] Gruenwald J.: Novel botanical ingredients for beverages. Clin. Dermatol., 27: 210-216, 2009

[5] Wawer I.: Aronia Polski Paradoks. Agropharm S.A., Warszawa, 2005

[6] Piasek A., Bartoszek A., Namieśnik J.: Substancje pochodzenia roślinnego przeciwdziałające kardiotoksyczności towarzyszącej chemioterapii nowotworów. Postepy Hig. Med. Dosw., 63: 142-158, 2009

[7] Svarcova I., Heinrich J., Valentova K.: Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of *Lonicera caerulea*. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub., 151: 163-174, 2007

[8] Lee J.: Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. J. AOAC Int., 88: 1269-1278, 2005

[9] Szajdek A., Borowska E.J.: Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. Plant Foods Hum. Nutr., 63: 147-156, 2008

[10] Kowalczyk E., Krzesiński P., Kura M., Szmigiel B., Błaszczyk J.: Antocyjany w medycynie. Pol. J. Pharmacol., 55: 699-702, 2003

[11] Cooke D., Steward W.P., Gescher A.J., Marczylo T.: Anthocyans from fruits and vegetables – does bright colour signal cancer chemopreventive activity? Eur. J. Cancer, 41: 1931-1940, 2005

[12] Hyun J.W., Chung H.S.: Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G(2)/M phase and induction of apoptosis. J. Agric. Food Chem., 52: 2213-2217, 2004

[13] Kang S.Y., Seeram N.P., Nair M.G., Bourquin L.D.: Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc (Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. Cancer Lett., 194: 13-19, 2003

[14] Marko D., Puppel N., Tjaden Z., Jakobs S., Pahlke G.: The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. Mol. Nutr. Food Res., 48: 318-325, 2004

[15] Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K., Kobori M.: Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. J. Agric. Food Chem., 51: 68-75, 2003

[16] Meiers S., Kemeny M., Weyand U., Gastpar R., Angerer E., Marko D.: The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. J. Agric. Food Chem., 49: 958-962, 2001

[17] Zhang Y., Vareed S.K., Nair M.G.: Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. Life Sci., 76: 1465-1472, 2005

[18] Olsson M.E., Gustavsson K.E., Andersson S., Nilsson A., Duan R.D.: Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. J. Agric. Food Chem., 52: 7264-7271, 2004

[19] Fimognari C., Berti F., Nusse M., Cantelli-Forti G., Hrelia P.: Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. Biochem. Pharmacol., 67: 2047-2056, 2004

[20] Lila M.A.: Anthocyanins and human health: an *in vitro* investigative approach. J. Biomed. Biotech., 5: 306-313, 2004

[21] Hou D.X., Ose T., Lin S., Harazor K.: Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. Int. J. Oncol., 23: 705-712, 2003

[22] Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norindou S., Choi S.W., Kawakishi S.: Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin-3-O-beta-D-glucoside and cyanidin. J. Agric. Food Chem., 42: 2407-2410, 1994

[23] Kokotkiewicz A., Jeremicz Z., Luczkiewicz M.: Aronia plants: a review of traditional use, biological activities and perspectives for modern medicine. J. Med. Food, 13: 255-269, 2010

[24] Kulling S.E., Rawel H.M.: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – a review on the characteristic components and potential health effects. Planta Med., 74: 1625-1634, 2008

[25] Naruszewicz M., Daniewski M., Łaniewska I., Pikto-Pietkiewicz W., Millo B., Zapolska-Downar D., Effect of anthocyanins from chokeberry (*Aronia melanocarpa*) on blood pressure, inflammatory mediators and cell adhesion molecules in patients with a history of myocardial infarction (MI). Atherosclerosis Supp., 4: 143, 2003

[26] Valcheva-Kuzmanova S.V., Belcheva A.: Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. Folia Med. (Plovdiv), 48: 7-11, 2006

[27] Wu X.L., Gu L.W., Prior R.L., McKay S.: Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of ribes, aronia and sambucus and their antioxidant capacity. J. Agric. Food Chem., 52: 7846-7856, 2004

[28] Oszmianski J., Wojdylo A.: *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. Eur. Food Res. Technol., 221: 809-813, 2005

[29] Tanaka T., Tanaka A.: Chemical components and characteristics of black chokeberry. J. Jpn Soc. Food Sci. Techno., 48: 606-610, 2001

[30] Kornacewicz-Jach Z., Podolec P., Kopeć G., Pająk A., Zdrojewski T., Naruszewicz M., Stańczyk J., Undas A., Kozek E., Tykarski A., Opala G., Windak A., Torbicki A., Musiał J.: Wytyczne Polskiego Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia dotyczące profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych u kobiet. Kardiol. Pol., 65: 334-337, 2007

[31] Majewicz A., Marcinkowski J.T.: Epidemiologia chorób układu krążenia. Dlaczego w Polsce jest tak małe zainteresowanie istniejącymi programami profilaktycznymi? Probl. Hig. Epidemiol., 89: 322-325, 2008

[32] Epidemiologia i Prewencja. Europejska deklaracja na rzecz zdrowia serca. Kardiol. Pol., 66: 356-360, 2008

[33] Briones A.M., Touyz R.M.: Oxidative stress and hypertension: current concepts. Curr. Hypertens. Rep., 12: 135-142, 2010

[34] Weng T.C., Kao Yang Y.H., Lin S.J., Tai S.H.: A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins. J. Clin. Pharm. Ther., 35: 139-151, 2010

[35] Sato M., Maulik N., Das D.K.: Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants. Ann. N Y Acad. Sci., 957: 122-135, 2002

[36] Von Schacky C.: The role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. Curr. Atherosclerosis Rep., 5: 139-145, 2003

[37] Willcox J.K., Catignani G.L., Lazarus S.: Tomatoes and cardiovascular health. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 43: 1-18, 2003

[38] Shukla S.K., Gupta S., Ojha S.K., Sharma S.B.: Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. Nat. Prod. Res., 24: 873-898, 2010

[39] Bell D.R., Gochenaur K.: Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. J. Appl. Physiol., 100: 1164-1170, 2006

[40] Jurgoński A., Juśkiewicz J., Zduńczyk Z.: Ingestion of black chokeberry fruit extracts leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. Plant Foods Hum. Nutr., 4: 176-182, 2008

[41] Valcheva-Kuzmanova S., Kuzmanov K., Mihova V., Krasnaliev I., Borisova P., Belcheva A.: Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high cholesterol diet. Plant Foods Hum. Nutr., 62: 19-24, 2007

[42] Valcheva-Kuzmanova S., Kuzmanov K., Tsanova-Savova S., Mihova V., Krasnaliev I., Borisova P., Belcheva A.: Lipid-lowering effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed cholesterol containing diets. J. Food Biochem., 31: 589-602, 2007

[43] Wróblewska M., Juśkiewicz J., Frejnagel S., Oszmiański J., Zduńczyk Z.: Physiological influence of chokeberry phenolics in model diet. Acta Aliment. Hung., 37: 221-232, 2008

[44] Ryszawa N., Kawczyńska-Dróżdż A., Pryjma J., Czesnikiewicz-Guzik M., Adamek-Guzik T., Naruszewicz M., Korbut R., Guzik T.J.: Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. J. Physiol. Pharmacol., 57: 611-626, 2006

[45] Krötz F., Sohn H.Y., Gloe T., Zahler S., Rexinger T., Schiele T.S., Becker B.F., Theisen K., Klauss V., Pohl U.: NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. Blood, 100: 917-924, 2002

[46] Olas B., Kedzierska M., Wachowicz B., Stochmal A., Oleszek W.: Effects of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* on the markers of oxidative stress and blood platelet activation. Platelets, 21: 274-281, 2010

[47] Fischer-Posovszky P., Kukulus V., Tews D., Unterkircher T., Debatin K.M., Fulda S., Wabitsch M.: Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. Am. J. Clin. Nutr., 92: 5-15, 2010

[48] Liu P.L., Tsai J.R., Charles A.L., Hwang J.J., Chou S.H., Ping Y.H., Lin F.Y., Chen Y.L., Hung C.Y., Chen W.C., Chen Y.H., Chong I.W.: Resveratrol inhibits human lung adenocarcinoma cell metastasis by suppressing heme oxygenase 1-mediated nuclear factor-jB pathway and subsequently downregulating expression of matrix metalloproteinases. Mol. Nutr. Food Res., 54: 1-9, 2010

[49] Baur J.A., Sinclair D.A.: Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. Nat. Rev. Drug Disc., 5: 493-506, 2006

[50] Kraft T.E, Parisotto D., Schempp C., Efferth T.: Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 49: 782-799, 2009

[51] Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y.J., Li H.B.: Biological activities of polyphenols from grapes. Int. J. Mol. Sci., 11: 622-646, 2010

[52] Das D.K., Mukherjee S., Ray D.: Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. Heart Fail. Rev., 15: 467-477, 2010

[53] Olas B., Wachowicz B., Nowak P., Kedzierska M., Tomczak A., Stochmal A., Oleszek W., Jeziorski A., Piekarski J.: Studies on antioxidant properties of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* in blood platelets. J. Physiol. Pharmacol., 59: 823-835, 2008

[54] Skoczyńska A., Jędrychowska I., Poręba R., Affelska-Jercha A., Turczyn B., Wojakowska A., Andrzejak R.: Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. Pharmacol. Rep., 59: 177-182, 2007

[55] Broncel M., Koziróg-Kołacińska M., Andryskowski G., Duchnowicz P., Koter-Michalak M., Owczarczyk A., Chojnowska-Jezierska J.: Effect of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on blood pressure, concentration of endothelin-1 and lipids in patients with metabolic syndrome. Pol. Merkuriusz Lek., 13: 116-119, 2007

[56] Grundy S.M., Brewer H.B., Cleeman J.I., Smith S.C., Lenfant C.: Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart

Association conference on scientific issues related to definition. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 24: 1-6, 2004

[57] Naruszewicz M., Łaniewska I., Millo B., Dłużniewski M.: Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). Atherosclerosis, 194: e179-e184, 2007

[58] Blake G.J., Ridker P.M.: Novel clinical markers of vascular wall inflammation. Circ. Res., 89: 763-771, 2001

[59] Kumar A., Kingdon E., Norman J.: The isoprostane 8-iso-PGF2a suppresses monocyte adhesion to microvascular endothelial cells: a role in limiting inflammation and fibrosis? Int. J. Exp. Pathol., 85: A30-A31, 2004

[60] Matsuzawa Y., Funahashi T., Kihara S., Shimomura I.: Adiponectin and metabolic syndrome. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 24: 29-33, 2004

[61] Vainio H., Weiderpass E.: Fruit and vegetables in cancer prevention. Nutr. Cancer, 54: 111-142, 2006

[62] Raporty na podstawie danych Centrum Onkologii. http://85.128.14.124/krn/index.asp (06.04.2009)

[63] Raport WCRF/AICR. http://www.aicr.org/site/PageServer?pagename=dc_home_guides (06.04.2009)

[64] Zielińska-Przyjemska M., Olejnik A., Grajek W.: Wpływ soku buraka ćwikłowego i aronii *in vitro* na metabolizm tlenowy i apoptozę ludzkich granulocytów obojętnochłonnych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2: 174-186, 2007

[65] Gąsiorowski K., Szyba K., Brokos B., Kołaczyńska B., Jankowiak-Włodarczyk M., Oszmiański J.: Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. Cancer Lett., 119: 37-46, 1997

[66] Kedzierska M., Olas B., Wachowicz B., Stochmal A., Oleszek W., Jeziorski A., Piekarski J., Głowacki R.: An extract from berries of *Aronia melanocarpa* modulates the generation of superoxide anion radicals in blood platelets from breast cancer patients. Planta Med., 75: 1405-1409, 2009

[67] Sueiro L., Yousef G.G., Seigler D., De Meija E.G., Grace M.H., Lila M.A.: Chemopreventive potential of flavonoid extracts from plantation-bred and wild *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) fruits. J. Food Sci., 71: 480-488, 2006

[68] Bermúdez-Soto M., Larossa M., Garcia-Cantalejo J.M., Espin J.C., Tomás-Barberan F.A., Garcia-Conesa M.T.: Up-regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenols-rich chokeberry juice. J. Nutr. Biochem., 18: 259-271, 2007

[69] Malik M., Zhao C., Schoene N., Guisti M.M., Moyer M.P., Magnuson B.A.: Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* E. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. Nutr. Cancer, 46: 186-196, 2003

[70] Zhao C.M., Giusti M., Malik M., Moyer M.P., Magnuson B.A.: Effects of commercial anthocyanin – rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. J. Agric. Food Chem., 52: 6122-6128, 2004

[71] Pool-Zobel B.L., Bub A., Schröder N., Rechkemmer G.: Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. Eur. J. Nutr., 389: 227-234, 1999

[72] Atanasova-Goranova V.K., Dimova P.I., Pevicharova G.T.: Effect of food products on endogenous generation of N-nitrosamines in rats. Br. J. Nutr., 78: 335-345, 1997

[73] Faff J., Frankiewicz-Jóźko A.: Effect of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on the exercise-induced oxidative stress in rat tissues. Biol. Sport, 20: 15-23, 2003

[74] Valcheva-Kuzmanova S.V., Marazova K., Krasnaliev I., Galunska B., Borisova P., Belcheva A.: Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats, Exp. Toxicol. Pathol., 56: 385-392, 2005

[75] Lala G., Malik M., Zhao C., He J., Kwon Y., Giusti M.M., Magnuson B.A.: Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. Nutr. Cancer, 54: 84-93, 2006

[76] Butelli E., Titta L., Giorgio M., Mock H.P., Matros A., Peterek S., Schijlen E.G.W.M., Hall R.D., Bovy A.G., Luo J., Martin C.: Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. Nat. Biotechnol., 26: 1301-1308, 2008

[77] Bub A., Bernhard W., Blockhaus M., Briviba K., Liegibel U., Müller H., Pool-Zobel B.L., Rechkemmer G.: Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. J. Nutr. Biochem., 14: 90-98, 2003

[78] Pilaczyńska-Szczesniak L., Skarpańska-Steinborn A., Deskur E., Basta P., Goroszkiewicz-Hassan M.: The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resultiong from an incremental rowing ergometer exercise. Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab., 15: 48-58, 2005

[79] Valcheva-Kuzmanova S., Kuzmanov K., Tancheva S., Belcheva A.: Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 29: 101-105, 2007

[80] Simeonov S.B., Botushanov N.P., Karahanian E.B., Pavlova M.B., Husianitis H.K., Troev D.M.: Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. Folia Med. (Plovdiv), 44: 20-23, 2002

[81] Zielinska-Przyjemska M., Olejnik A., Dobrowolska-Zachwieja A., Grajek W.: Effects of *Aronia melanocarpa* polyphenols on oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils from obese and non-obese individuals. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., 6: 75-87, 2007

[82] Valcheva-Kuzmanova S., Borisova P., Galunska B., Krasnaliev I., Belcheva A.: Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. Exp. Toxicol. Pathol., 56: 195-201, 2004

[83] Kowalczyk E., Kopff A., Fijalkowski P., Kopff M., Niedworok J., Blaszczyk J.: Effect of anthocyanins on selected biochemical parameters in rats exposed to cadmium. Acta Biochim. Pol., 50: 543-548, 2003

[84] Andryskowski G., Niedworok J., Grześków J., Maziarz Z., Małkowski B., Tryniszewski W., Rożej A.: Naturalne antocyjany w ochronie radiologicznej. Współcz. Onkol., 4: 269-272, 2000

[85] Andryskowski G., Niedworok J., Maziarz Z., Małkowski B.: The effect of natural anthocyanin dye on experimental radiation sickness. Acta Pol. Toxicol., 6: 155, 1998

[86] Andryskowski G., Niedworok J., Maziarz Z., Małkowski B.: The effect of natural anthocyanin dye on superoxide radical generation and chemiluminescens in animal after absorbed 4Gy dose of γ radiation. Pol. J. Environ. Stud., 7: 357, 1998

[87] Niedworok J., Gwardys A., Jankowski A., Kowalczyk E., Oszmiański J., Skośkiewicz J.: Badania nad protekcyjnym wpływem żelu antocyjaninowego na fototoksyczne działanie promieni UV. Ochr. Środ. Zas. Nat., 18: 83-87, 1999

[88] Niedworok J., Jankowska B., Kowalczyk E., Charyk K., Kubat Z.: Anti ulcer activity of anthocyanin dye from *Aronia melanocarpa* Elliot. Herba Pol., 43: 222, 1997

[89] Matsumoto M., Hara H., Chiji H., Kasai T.: Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* Elliot) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats. J. Agric. Food. Chem., 52: 2226-2229, 2004

[90] Yaneva M.P., Botushanova A.D., Grigorov L.A., Kokov J.L., Todorova E.P., Krachanova M.G.: Evaluation of the immunomodulatory activity of aronia in combination with apple pectin in patients with breast cancer undergoing postoperative radiation therapy. Folia Med. (Plovdiv), 44: 22-25, 2002

[91] Król K.: Warto uprawiać jagodę kamczacką. Działkowiec, 6: 44-45, 2009

[92] Pierzga K.: Suchodrzew jadalny. http://www.szkolkarstwo.pl/article.php?id=199 (16.09.2010)

[93] Werner T.: „Jagoda kamczacka" czy jadalne odmiany suchodrzewu? http://www.szkolkarstwo.pl/article.php?id=600 (16.09.2010)

[94] Gąstoł M., Król K., Zawieracz W.: Rozmnażanie odmian jadalnych suchodrzewu. Szkółkarstwo, 2: 62-64, 2004

[95] Plekhanova, M.N.: Blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) – a new commercial berry crop for temperate climate: genetic resources and breeding. Acta Hortic., 538: 159-164, 2000

[96] Chaovanalikit A., Thompson M.M., Wrolstad R.E.: Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.), J. Agric. Food Chem., 52: 848-852, 2004

[97] Palíková I., Heinrich J., Bednář P., Marhol P., Křen V., Cvak L., Valentová K., Růžička F., Holá V., Kolář, Šimánek V., Ulrichová J.: Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle: a novel source for phenolic antioxidants. J. Agric. Food Chem., 56: 11883-11889, 2008

[98] Palíková I., Valentová K.R., Oborná I., Ulrichová J.: Protectivity of blue honeysuckle extract against oxidative human endothelial cells and rat hepatocyte damage. J. Agric. Food Chem., 57: 6584-6589, 2009

[99] Jin X.H., Ohgami K., Shiratori K., Suzuki Y., Koyama Y., Yoshida K., Ilieva I., Tanaka T., Onoe K., Ohno S.: Effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. Exp. Eye Res., 82: 860-867, 2006

[100] Zdařilová A., Rajnochová Svobodová A., Chytilová K., Šimánek V., Ulrichová J.: Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts. Food Chem. Toxicol., 48: 1555-1561, 2010

[101] Svobodová A., Rambousková J., Walterová D., Vostálová J.: Protective effects of phenolic fraction of blue honeysuckle fruits against UVA-induced damage to human keratinocytes. Arch. Dermatol. Res., 300: 225-233, 2008

[102] Svobodová A., Zdařilová A., Vostálová J.: *Lonicera caerulea* and *Vaccinium myrtillus* fruit polyphenols protect HaCaT keratinocytes against UVB-induced phototoxic stress and DNA damage. J. Dermatol. Sci., 56: 196-204, 2009

[103] Gruia M.I., Oprea E., Gruia I., Negoita V., Farcasanu I.C.: The antioxidant response induced by *Lonicera caerulaea* berry extracts in animals bearing experimental solid tumors. Molecules, 13: 1195-1206, 2008

[104] Oszmianski J., Wolniak M., Wojdylo A., Wawer I., Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices, J. Sci. Food Agric., 87: 573-579, 2007

[105] Kusznierewicz B., Śmiechowska A., Bartoszek A., Wolska L., Namieśnik J.: The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. Food Chem., 108: 853-861, 2008

[106] Łukowicz J., Peszyńska-Sularz G., Cieślak A., Piasek A., Szweda P., Popadiuk S., Grajek W., Bartoszek A.: Dietary intervention during chemotherapy with doxorubicin as means of combating toxic side effects – can it offer any worthwhile benefits? Proceedings of COST 926/927 Conference "Molecular and physiological effects of bioactive food compounds", Materiały konferencyjne, Wiedeń, 173, 2006

[107] Jasińska U., Lipowski J., Owczarek L., Skąpska S.: Wpływ obróbki mechanicznej na właściwości przeciwutleniające produktów roślinnych: Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne, red. Grajek W., Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2007, 458-467

[108] Inami O., Tamura I., Kikuzaki H. Nakatani N., Stability of anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. J. Agric. Food Chem., 44: 3090-3096, 1996

[109] Skrede G., Wrolstad R.E., Durst R.W.: Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), J. Food Sci., 65: 357-364, 2000

[110] Oszmiański J.: Zachowanie przeciwutleniaczy w czasie produkcji soków i przecierów z jabłek i owoców jagodowych: Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne, red. Grajek W., Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2007, 441-457

[111] Zhao Y.: Berry fruit. Value-added products for health promotion. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007

[112] Saario M.: Fresh lingonberry quality as affected by storage conditions and packaging. J. Food Qual., 23: 453-463, 2000

[113] de Ancos B., Ibanez E., Reglero G., Cano M.P.: Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. J. Agric. Food Chem., 48: 873-879, 2000

[114] Krupa T., Tomala K.: Wpływ warunków przechowywania na zawartość antocyjanów i aktywność przeciwutleniającą jagód borówki wysokiej. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2: 171-181, 2006

[115] Parry J., Yu L.: Fatty acid content and antioxidant properties of cold-pressed black raspberry seed oil and meal. J. Food Sci., 69: 189-193, 2004

[116] Wightman J.D. and Wrolstad R.E.: Anthocyanin analysis as a measure of glycosidase activity in enzymes for juice processing. J. Food Sci., 60: 862-867, 1995

[117] Rein M.J. and Heinonen M.: Stability and enhancement of berry juice color. J. Agric. Food Chem., 52: 3106-3114, 2004

[118] Wolniak M., Kalisz S.: Wpływ pektyn niskometylowanych na zawartość antocyjanów i polifenoli ogółem oraz ich aktywność przeciwrodnikową oznaczoną EPR w sokach truskawkowych. Żywność, 4: 39-46, 2006

[119] Hellström J., Rajaniemi S., Kivijärvi P., Mattila P.: The effect of processing on chokeberry (Aronia Medik.) polyphenols. Proceedings of NJF Seminar 399 "Beneficial health substances from berries and minor crops – How to increase their concentration in cultivated species, eliminate losses in processing and enhance dietary use", Materiały konferencyjne, Piikkiö, 40, 2007

[120] Navindra P. Seeram: Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. J. Agric. Food Chem., 56: 627-629, 2008

[121] Urządzenia dla przemysłu spożywczego. http://www.enbiotechnology.com/urzadzenia-do-przemyslu-spozywczego.html (26.07.2010)

[122] Kusznierewicz B., Wolska L., Bartoszek A., Namieśnik J.: Metody oznaczania *in vitro* właściwości przeciwutleniających próbek żywności. Cz.I, Bromat. Chem. Toksykol., 39: 251-260, 2006

[123] Kusznierewicz, B., Piasek A. Bartoszek A., Namiesnik J.: The elaboration of analytical parameters for routine profiling of antioxidants in complex mixtures by HPLC coupled post-column derivatisation. Phytochem. Anal. (w recenzji)

[124] Collins A.R.: The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol., 26, 249-261, 2004

[125] Szweda P., Friedberg T., Paine M.J., McLaughlin L., Polson E., Stenhouse A., Lewandowska J., Bartoszek A.: Antioxidative and cytotoxic activity of red beet (*Beta vulgaris*) in combination with inducers of oxidative stress. Proceedings of 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society „From Genes to Molecular Epidemiology", Materiały konferencyjne, Praga, 222, 2006

[126] Schieber A., Stintzing F.C., Carle R.: By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. Trends Food Sci. Technol., 12: 401-413, 2001

[127] Forstermann U.: Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. Nature Clin. Pract. Cardiovasc. Med., 5: 338-349, 2008

[128] Mills N.L., Donaldson K., Hadoke P.W., Boon N.A., MacNee W., Cassee F.R., Sandstrom T., Blomberg A., Newby D.E.: Adverse cardiovascular effects of air pollution. Nature Clin. Pract. Cardiovasc. Med., 6: 36-44, 2009

[129] Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol. Rev., 52: 673-751, 2000

[130] Current protocols in food analytical chemistry. http://www.scribd.com/doc/30689350/Current-Protocols-in-Food-Analytical-Chemistry-2001-Whitaker (09.08.2010)

[131] Mrugalska B.: Porównanie handlowo dostępnych, jadalnych odmian jagody kamczackiej pod względem właściwości przeciwutleniających. Praca dyplomowa. Politechnika Gdańska, Gdańsk, 2009

[132] Shahidi F., Ho C.T.: Phenolic compounds in foods and natural health products. American Chemical Society, Waszyngton, 2005

[133] Ball S.: Naturalne substancje przeciwnowotworowe. Medyk, Warszawa, 2000

[134] Schmidt B.M.,. Howell A.B, McEniry B., Knight C.T., Seigler D., Erdman J.W., Lila M.A.: Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. J. Agric. Food Chem., 52, 6433-6442, 2004

[135] Ramadan M.F., Moersel J.T.: Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice. J. Sci. Food Agric., 87: 452-460, 2007

[136] Meng J., Doyle M.P.: Introduction. Microbiological food safety. Microb. Inf., 4: 395-397, 2002

[137] Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J.: Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol. Cell. Biochem., 266: 37-56, 2004

[138] Loft, S., Poulsen, H.E.: Antioxidant intervention studies related to DNA damage, DNA repair and gene expression. Free Radic. Res., 33, 67-68, 2000

[139] Swartzlander D.B., Griffiths L.M., Lee J., Degtyareva N.P., Doetsch P.W., Corbett A.H.: Regulation of base excision repair: Ntg1 nuclear and mitochondrial dynamic localization in response to genotoxic stress. Nucleic Acids Res., 38: 3963-3974, 2010

[140] Fortini P., Pascucci B., Parlanti E., D'Errico M., Simonelli V., Dogliotti E.: The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. Biochimie, 85: 1053-1071, 2003

[141] Collins A.R., Azqueta Oscoz A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Štětina R.: The comet assay: topical issues. Mutagenesis, 23: 143-151, 2008

[142] Piperakis S.M.: Comet assay: a brief history. Cell Biol. Toxicol., 25: 1-3, 2009

[143] Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F.: Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen., 35: 206-221, 2000

[144] Vajpayee P., Dhawan A., Shanker R.: Evaluation of the alkaline comet assay conducted with the wetlands plant *Bacopa monnieri* L. as a model for ecogenotoxicity assessment. Environ. Mol. Mutagen., 47: 483-489, 2006

[145] Speit G., Hartmann A.: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods Mol. Biol., 314: 275-286, 2006

[146] McNamee J.P., McLean J.R.N., Ferrarotto C.L., Bellier P.V.: Comet assay: rapid processing of multiple samples. Mutat. Res., 466: 63-69, 2000

[147] Kähkönen M.P., Hopia A.I., Heinonen M.: Berry phenolics and their antioxidant activity. J. Agric. Food Chem., 49: 4076-4082, 2001

[148] Kaur C., Kapoor H.C.: Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. Int. J. Food Sci. Tech., 36: 703-725, 2001

[149] Kasparaviciene G, Briedis V.: Stability and antioxidant activity of black currant and black aronia berry juices. Medicina, 39: 65-69, 2003

[150] Dillard C.J., German J.B.: Phytochemicals: nutraceuticals and human health. J. Sci. Food Agric., 80: 1744-1756, 2000

[151] Liu R.H.: Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. Am. J. Clin. Nutr., 78: 517S-520S, 2003

[152] Grinder-Pedersen L., Rasmussen S. E., Bugel S., Jorgensen L.V., Dragsted L.O., Gundersen V., Sandstrom B.: Effect of diets based on foods from conventional versus organic production on intake and excretion of flavonoids and markers of antioxidative defense in humans. J. Agric. Food Chem., 51: 5671-5676, 2003

VII DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

1. Barbara Kusznierewicz, **Anita Piasek**, Joanna Lewandowska, Anna Śmiechowska, Agnieszka Bartoszek, Właściwości przeciwrakotwórcze kapusty białej, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość,* 6, 20-34 (2007)
2. Isabel Gaivão, **Anita Piasek**, Asgeir Brevik, Sergey Shaposhnikov, Andrew R. Collins, Comet assay-based methods for measuring DNA repair *in vitro*; estimates of inter- and intra-individual variation", *Cell Biol. Toxicol.,* 25, 45-52 (2009)
3. **Anita Piasek**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Substancje pochodzenia roślinnego przeciwdziałające kardiotoksyczności towarzyszącej chemioterapii nowotworów, *Postępy Hig Med. Dośw.*, 63, 142-158 (2009)
4. Agnieszka Bartoszek, Barbara Kusznierewicz, **Anita Piasek**, Anna Śmiechowska, Jacek Namieśnik, Glukozynolany – znaczenie i metody oznaczania, *Analityka: Nauka i Praktyka*, 3, 16-21 (2009)
5. Barbara Kusznierewicz, Joanna Lewandowska, Agnieszka Kruszyna, **Anita Piasek**, Anna Śmiechowska, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, The antioxidative properties of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) fresh and submitted to culinary processing, *J. Food Biochem.,* 34, 262-285 (2010)
6. Barbara Kusznierewicz, **Anita Piasek**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namiesnik, Application of the commercial derivatization instrument and established derivatization reagents to on-line determination of antioxidants, *J. Food Comp. Anal.* (wysłana do redakcji)
7. Barbara Kusznierewicz, **Anita Piasek**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namiesnik, The elaboration of analytical parameters for routine profiling of antioxidants in complex mixtures by HPLC coupled post-column derivatisation, *Phytochem. Anal.* (wysłana do redakcji)

Komunikaty ustne:

1. **Anita Piasek**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Wykorzystanie roślin jadalnych w kardioprotekcji, Materiały XIII Sesji Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ "Żywność współczesna - szanse i zagrożenia" z cyklu "Jakość i prozdrowotne cechy żywności", 28-29.05.2008, Łódź, Polska (str. 32)

2. **Anita Piasek**, Charakterystyka produktów spożywczych otrzymanych z owoców aronii (*Aronia melanocarpa* E.) pod kątem obecnych w nich przeciwutleniaczy, Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 22-23.09.2008, Gdańsk, Polska (str. 31)
3. **Anita Piasek**, Barbara Kusznierewicz, Barbara Mrugalska, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, Porównanie potencjału antyoksydacyjnego i składu przeciwutleniaczy w owocach aronii czarnoowocowej i suchodrzewu jadalnego, Materiały XXXIX Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN „Postęp w wytwarzaniu i ocenie żywności", 29.06-01.07.2009, Poznań, Polska (str. 68-69)
4. **Anita Piasek**, Skład fitozwiązków oraz właściwości przeciwutleniające owoców aronii (*Aronia melanocarpa* E.) oraz produktów z nich otrzymanych, Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej: Materiały, 21-22.09.2009, Gdańsk, Polska (str. 39)

Doniesienia konferencyjne:

1. Jolanta Łukowicz, Grażyna Peszyńska-Sularz, Anna Cieślak, **Anita Piasek**, Stefan Popadiuk, Włodzimierz Grajek, Agnieszka Bartoszek, Dietary intervention with red beet juice during cancer chemotherapy with doxorubicin as means of combating toxic side effects resulting from oxidative stress, Proceedings of 5th Multidisciplinary Conference on Drug Research, 15-17.05.2006, Darłowo, Polska (str. 9)
2. Anna Cieślak, **Anita Piasek**, Joloanta Łukowicz, Grażyna Peszyńska-Sularz, Stefan Popadiuk, Włodzimierz Grajek, Agnieszka Bartoszek, Zbadanie możliwości zastosowania testu kometowego do oceny kardiotoksyczności substancji indukujących stres oksydacyjny *in vivo*, Materiały Sympozjum Naukowo-Szkoleniowego „Zwierzęta Laboratoryjne w Hodowli i doświadczeniu", 12-14.06.2006, Gdańsk, Polska (S. P-3)
3. Anna Cieślak, Agnieszka Bartoszek, **Anita Piasek**, Jolanta Łukowicz, Grażyna Peszyńska-Sularz, Stefan Popadiuk, Włodzimierz Grajek, The possibility of application of comet assay in assessment of *in vivo* cardiotoxicity of oxidative stress inducedrs, Proceedings of 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society „From Genes to Molecular Epidemiology", 02-06.07.2006, Praga, Czechy (str. 143)
4. Jolanta Łukowicz, Grażyna Peszyńska-Sularz, Anna Cieślak, **Anita Piasek**, Stefan Popadiuk, Włodzimierz Grajek, Agnieszka Bartoszek, Dietary intervention with red

beet juice ameliorates side effects resulting from oxidative stress during cancer chemotherapy with doxorubicin *in vivo*“, Proceedings of 41st Meeting of the Polish Biochemical Society, 12-15.09.2006, Białystok, Polska, *Acta Biochim. Pol*., 53, 133 (2006)

5. Jolanta Łukowicz, Grażyna Peszyńska-Sularz, Anna Cieślak, **Anita Piasek**, Piotr Szweda, Stefan Popadiuk, Włodzimierz Grajek, Agnieszka Bartoszek, Dietary intervention during chemotherapy with doxorubicin as means of combating toxic side effects – can it offer any worthwhile benefits?, Proceedings of COST 926/927 Conference „Molecular and physiological effects of bioactive food compounds“, 11-14.10.2006, Wiedeń, Austria (str. 173)
6. Barbara Kusznierewicz, Agnieszka Kruszyna, **Anita Piasek**, Lidia Wolska, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, Comparison of chemopreventive properties of white cabbage (*Brassica oleracea*) from non-organic and organic farming“, Proceedings of COST 926/927 Conference „Molecular and physiological effects of bioactive food compounds“, 11-14.10.2006, Wiedeń, Austria (str. 26)
7. Agnieszka Bartoszek, Jolanta Łukowicz, Grażyna Peszyńska-Sularz, Anna Cieślak, **Anita Piasek**, Stefan Popadiuk, Przeciwdziałanie kardiotoksyczności w trakcie chemoterapii nowotworów przy użyciu roślinnych antyoksydantów: przegląd literatury i badania własne, Materiały Konferencji Naukowej "Naturalne przeciwutleniacze - od surowca do organizmu", 29-30.01.2007, Poznań, Polska (str. 10-11)
8. Barbara Kusznierewicz, Joanna Lewandowska, Agnieszka Kruszyna, **Anita Piasek**, Anna Śmiechowska, Lidia Wolska, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, Badania potencjału przeciwutleniającego kapusty białej przed i po obróbce kulinarnej oraz jej zdolności do indukowania komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych, Materiały Konferencji Naukowej "Naturalne przeciwutleniacze - od surowca do organizmu", 29-30.01.2007, Poznań, Polska (str. 61-62)
9. Isabel Gaivão, **Anita Piasek**, Andrew R. Collins, Base and nucleotide excision repair; intra and inter-individual variability, Proceedings of 7th International Comet Assay Workshop, 24-27.06.2007, Coleraine, Wielka Brytania, Mutagenesis, 22 (6), e1 (2007)
10. Anna Śmiechowska, Barbara Kusznierewicz, Agnieszka Bartoszek, **Anita Piasek**, Jacek Namieśnik, Cancer chemopreventive agents: glucosinolates and products of their decomposition in white cabbage, Materiały 50-tego Jubileuszowego Zjazdu

Polskiego Towarzystwa Chemicznego i 11 Międzynarodowej Konferencji Chemii Środowiska, 09-12.09.2007, Toruń, Polska (str. 277)

11. Anna Śmiechowska, Barbara Kusznierewicz, Agnieszka Bartoszek, **Anita Piasek**, Jacek Namieśnik, Charakterystyka warzyw kapustnych pod kątem obecnych w nich biologicznie aktywnych składników, Materiały XXXVIII Sesji Naukowej Komitetu Nauk o Żywności PAN „Żywność a jakość życia. Uwarunkowania technologiczne, higieniczne, żywieniowe i kulturowe", 20-22.09.2007, Olsztyn, Polska (str. 83)
12. Anna Śmiechowska, **Anita Piasek**, Karina Czapiewska, Barbara Kusznierewicz, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, The influence of fresh cabbage and sauerkraut juices on the activity of protective enzymes in human cell lines, Proceedings of COST Action 926 Conference „Benefits and Risks of Bioactive Plant Compounds", 27-28.03.2008, Kraków, Polska, Acta Biochim. Pol. 55, 28 (2008)
13. Anna Śmiechowska, **Anita Piasek**, Barbara Kusznierewicz, Agnieszka Szumska, Aleksandra Kawecka, Dominika Zemło, Iwona Sikora, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, HPLC analysis of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different cultivations in relation to metal content in soils, Proceedings of 6th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP) : The Application of Chromatographic Methods in Phytochemical & Biomedical Analysis, 15-18.06.2008, Lublin, Polska (str. 193)
14. **Anita Piasek**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, The antioxidant properties of anthocyanins in different Aronia products, Proceedings of 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF "Natural Products with Pharmaceutical, Nutraceutical, Cosmetic and Agrochemical Interest", 03-08.08.2008, Ateny, Grecja, Planta Medica: An International Journal of Natural Products and Medicinal Plant Research, 74 (9), 986 (2008)
15. Andrew R. Collins, Amaia Azqueta, Isabel Gaivão, **Anita Piasek**, Asgeir Brevik, Measurement of DNA damage and repair with the comet assay: Recent developments, Proceedings of 8th Winter Research Conferences, Oxidative DNA Damage: From Chemical Aspects to Biological Consequences, 17-23.01.2009, Les Houches, Francja (str. 46)
16. Jolanta Rakowska, Barbara Mrugalska, Barbara Kusznierewicz, **Anita Piasek**, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, Nietypowe owoce jadalne strefy borealnej jako źródło prozdrowotnych fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy, Materiały IX

Konferencji Naukowej „Żywność wzbogacona i nutraceutyki” z cyklu "Żywność XXI wieku'‘, 18-19.06.2009, Kraków, Polska (str. 70)

17. Andrew R. Collins, Amaia Azqueta, Isabel Gaivão, **Anita Piasek**, Yolanda Lorenzo, DNA repair studied with the comet assay, Proceedings of 8th International Comet Assay Workshop, 27-30.08.2009, Perugia, Włochy (str. 22)
18. Iwona Grzybowska, **Anita Piasek**, Barbara Kusznierewicz, Hanna Staroszczyk, Jacek Namieśnik, M. Krajczyński, M. Konczakowski, S. Kwiatkowski, P. Bojanowski, Agnieszka Bartoszek, The preservation of aronia and honey blueberry bioactive phytochemicals during sterilization of juices with *EnbioJet* flow pasteurizer, Proc. 4th International Conference on Quality and Safety in Food Production Chain, 24-25.09.2009, Wrocław, Polska (str. 73)
19. Iwona Grzybowska, **Anita Piasek**, Edyta Malinowska-Pańczyk, M. Krajczyński, M. Konczakowski, S. Kwiatkowski, P. Bojanowski, Agnieszka Bartoszek, The viability of natural microflora of aronia and honey blueberry after thermal treatment with using *EnbioJet* flow pasteurizer, Proceedings of 4th International Conference on Quality and Safety in Food Production Chain, 24-25.09.2009, Wrocław, Polska (str. 72)
20. Anna Śmiechowska, **Anita Piasek**, Agnieszka Szumska, Aleksandra Kawecka, Barbara Kusznierewicz, Dominika Zemło, Iwona Szuler, Małgorzata Kielbratowska, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, The impact of cultivation conditions on phytocomplex composition and chemopreventive properties of white cabbage, Proceedings of „NCC-09” Conference, Natural Compounds in Cancer Prevention and Treatment, 13-15.10.2009, Smolenice, Słowacja (str. 49)
21. Agnieszka Bartoszek, Jolanta Łukowicz, Grażyna Peszyńska-Sularz, **Anita Piasek**, Stefan Popadiuk, Włodzimierz Grajek, Cardioprotection during cancer chemotherapy with the use of natural antioxidants: review of literature and results of own studies, Proceedings of 6th International Conference on Clinical Cancer Prevention (SG-CAP 2010), 18-20.03.2010, St. Gallen, Szwajcaria, European Journal of Cancer: Supplements, 8 (2), 20-21 (2010)
22. **Anita Piasek**, Jacek Namieśnik, Anna Piekarska, Iwona Grzybowska, Barbara Kusznierewicz, Edyta Malinowska-Pańczyk, Agnieszka Bartoszek, M. Krajczyński, M. Konczakowski, S. Kwiatkowski, P. Bojanowski, Ocena skuteczności procesu przetwarzania soków z aronii oraz suchodrzewu jadalnego za pomocą mikrofalowego sterylizatora przepływowego *EnbioJet* pod kątem zachowania związków bioaktywnych oraz eliminacji mikroorganizmów, Seminarium Politechnika Gdańska -

uniwersytet przedsiębiorczy XXI wieku, sesja plakatowa: streszczenia, 24-25.05.2010, Gdańsk, Polska, (str. 23)

23. Iwona Grzybowska, **Anita Piasek**, Barbara Kusznierewicz, Edyta Malinowska-Pańczyk, Hanna Staroszczyk, Andrew Collins, Jacek Namieśnik, M. Krajczyński, Agnieszka Bartoszek, The influence of sterylization with *ENBIOJET* flow microwave pasteurizer on composition and biological phytochemicals found in aronia and honey blueberry juice, Pigments in Food: Chemical, Biological and Technological Aspects: proceedings of the 6th International Congress, 20-24.06.2010, Budapeszt, Węgry, (str. 47-48)
24. Barbara Kusznierewicz, **Anita Piasek**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Wykrywanie związków o właściwościach przeciwutleniających w próbkach żywności pochodzenia roślinnego za pomocą chromatografu cieczowego sprzężonego z derywatyzatorem postkolumnowym, VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej: Analityka dla społeczeństwa XXI wieku, 4-9.07.2010, Kraków, Polska (str. 486)

Przyznane granty, stypendia i wyróżnienia

1. Jolanta Łukowicz, Grażyna Peszyńska-Sularz, Anna Cieślak, **Anita Piasek**, Piotr Szweda, Stefan Popadiuk, Włodzimierz Grajek, Agnieszka Bartoszek, Przyznany medal w konkursie INNOWACJE 2007 za: „Zaprojektowanie produktu spożywczego na bazie buraka ćwikłowego i aronii jako wspomagania żywieniowego terapii przeciwnowotworowej", Targi Techniki Przemysłowej, Nauki i Innowacji – TECHNICON INNOWACJE 2007, 23-25.10.2007, Gdańsk, Polska
2. Agnieszka Bartoszek, Barbara Kusznierewicz, Edyta Malinowska-Pańczyk, **Anita Piasek**, Jacek Namieśnik, Marta Pieklik, Przyznany medal w konkursie INNOWACJE 2009 za: „Galaretki owocowe w czekoladzie o znamionach żywności funkcjonalnej wzbogacone o fitozwiązki z grupy polifenoli", Targi Techniki Przemysłowej, Nauki i Innowacji – TECHNICON INNOWACJE 2009, 21-23.10.2009, Gdańsk, Polska
3. Stypendium Rektora Politechniki Gdańskiej za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2007/2008.
4. Stypendium Rektora Politechniki Gdańskiej za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2008/2009.
5. Stypendium w ramach projektu "InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów, I edycja" przyznane przez Urząd Marszałkowski Województwa Pomorskiego w Gdańsku w grudniu 2008 r.

6. Stypendium w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii" współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (Projekt: POKL.04.01.01-00-368/09)
7. Stypendium w ramach projektu „Yggdrasil - young guest and doctoral researchers' annual scholarships for investigation and learning" przyznane przez organizację The Research Council of Norway (01.02.2010 – 30.06.2010)
8. Udział w projekcie „Wykorzystanie kapusty białej na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji gleby (AGROBIOKAP)". Umowa nr UDA-POIG.01.03.01-00-138/09. Projekt realizowany w ramach Działania 1.3 Poddziałania 1.3.1., współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013
9. Projekt badawczy promotorski pt. „Badanie zmian składu fitokompleksu i właściwości przeciwutleniających owoców aronii czarnoowocowej i suchodrzewu jadalnego pod wpływem przetwarzania" (umowa nr 1139/B/P01/2010/38)