

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

Rozprawa doktorska

**WYKORZYSTANIE SKÓR Z MECHANICZNEGO ODSKÓRZANIA ŁOSOSI JAKO
ŹRÓDŁA OLEJU I ŻELATYNY ORAZ OPRACOWANIE METODY
WYTWARZANIA FINALNEGO PRODUKTU W POSTACI MIKROKAPSULEK**

Mgr inż. Agnieszka Głowacz

Promotor: prof. dr hab. inż. Ilona Kołodziejska

Gdańsk 2014

Pani Profesor Ilonie Kołodziejskiej

Za możliwość pracy w jej zespole i realizacji niniejszej rozprawy

Panu Profesorowi Zdzisławowi E. Sikorskiemu

Za cenne uwagi i wskazówki w trakcie realizacji kolejnych etapów pracy

Pracownikom i doktorantom Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

Za życzliwość i ciepłą atmosferę

Justynie i Renacie

Za pomoc, skuteczny doping i dodawanie otuchy

Moim rodzicom i Łukaszowi

Za niezachwianą wiarę w moje możliwości i wsparcie we wszystkich trudnych momentach

Serdecznie dziękuję

SPIS TREŚCI

INDEKS STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	7
1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	9
1.1. WPROWADZENIE	9
1.2. SPOSOBY WYTWARZANIA OLEJÓW RYBNYCH.....	10
1.2.1. Charakterystyka tłuszczu rybnego	10
1.2.2. Metody pozyskiwania oleju rybnego	17
1.2.2.1 Wytop suchy oleju.....	17
1.2.2.2 Wytop mokry oleju.....	17
1.2.2.3 Ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi	20
1.2.2.4 Ekstrakcja rozpuszczalnikiem w stanie nadkrytycznym SFE (<i>ang.</i> supercritical fluid extraction).....	21
1.2.2.5 Metody odzyskiwania oleju z użyciem enzymów proteolitycznych.	23
1.2.3. Rafinacja oleju rybnego	25
1.2.4. Modyfikacje oleju rybnego.....	28
1.2.5. Przemiany lipidów ryb w trakcie przechowywania surowca i oleju i możliwości ich ograniczania .	31
1.3. KAPSULKOWANIE OLEJU RYBNEGO.	33
1.3.1. Kapsułki żelatynowe.....	34
1.3.2. Mikro kapsulkowanie	37
1.3.3. Metody wytwarzania mikro kapsulek	38
1.3.4. Składniki otoczek mikro kapsulek	40
1.3.5. Mikro kapsułki z otoczkami białkowymi	41
1.3.6. Mikro kapsułki z otoczkami sacharydowymi	45
1.3.7. Mikro kapsułki z otoczkami białkowo-sacharydowymi	49
1.3.8. Immobilizowanie oleju w komórkach mikroorganizmów	50
1.3.9. Praktyczne wykorzystanie mikro kapsulek – wzbogacanie żywności olejem rybnym	51
1.4. PODSUMOWANIE	52
2. CEL PRACY I UZASADNIENIE	53
3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	56
3.1 MATERIAŁY I APARATURA:	56
3.2 POSTĘPOWANIE DOŚWIADCZALNE	58
3.2.1 Opracowanie procedury ekstrakcji oleju ze skór	58
3.2.2 Określenie wpływu rozdrobnienia skór i czasu przechowywania na jakość wydzielanego oleju.....	58
3.2.3 Określenie wpływu warunków przechowywania surowego oleju na jego jakość	59
3.2.4 Zbadanie możliwości ograniczenia przemian oksydacyjnych w oleju surowym	60
3.2.4.1 Określenie wpływu dodatków suszonych ziół na jakość przechowywanego oleju	60
3.2.4.2 Określenie wpływu wysokiego ciśnienia na stabilność oksydacyjną przechowywanego oleju	60
3.2.5 Otrzymywanie żelatyny rybnej	62
3.2.6 Wytwarzanie mikro kapsulek żelatynowych zawierających olej z łososia	63

3.2.7	Otrzymywanie peletek żelatynowych zawierających olej z łososia.....	63
3.2.8	Badanie peletek żelatynowych z dodatkiem rozmarynu.....	64
3.2.9	Ocena jakości preparatów zawierających kwasy tłuszczowe z rodziny <i>n-3</i> dostępnych na polskim rynku.....	64
3.3	Metody analityczne	65
4.	WYNIKI I DYSKUSJA.....	70
4.1	OKREŚLENIE OPTYMALNYCH WARUNKÓW WYDOBYWANIA OLEJU ZE SKÓR ŁOSOSI I OCENA JAKOŚCI PRODUKTU	70
4.1.1	Charakterystyka surowca.....	70
4.1.2	Określenie wpływu warunków wydobywania oleju ze skór łososi hodowlanych na wydajność i jakość produktu.....	72
4.1.3	Określenie jakości i składu kwasów tłuszczowych oleju izolowanego ze skór łososi.....	76
4.1.4	Oznaczenie strat kolagenu (hydroksyproliny) w surowcu podczas ekstrakcji oleju ze skór łososi ...	78
4.2	WPLYW PRZECHOWYWANIA SKÓR ŁOSOSI NA JAKOŚĆ OTRZYMANEGO OLEJU.....	79
4.2.1	Liczba nadtlenkowa	79
4.2.2	Liczba kwasowa	81
4.2.3	Zawartość dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych	81
4.2.4	Skład kwasów tłuszczowych	83
4.3	WPLYW WARUNKÓW PRZECHOWYWANIA OLEJU NA JEGO JAKOŚĆ.....	84
4.3.1	Liczba nadtlenkowa	84
4.3.2	Liczba kwasowa	85
4.3.3	Zawartość wtórnych produktów utlenienia.....	85
4.3.4	Zawartość dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych	88
4.3.5	Zawartość barwników karotenoidowych	89
4.3.6	Skład kwasów tłuszczowych	90
4.4	WPLYW DODATKU ZIOŁ NA JAKOŚĆ PRZECHOWYWANEGO OLEJU	92
4.4.1	Stabilność oksydacyjna.....	92
4.4.2	Liczba nadtlenkowa	94
4.4.3	Liczba kwasowa	99
4.5	WPLYW WYSOKIEGO CIŚNIENIA NA POWSTAWANIE PIERWOTNYCH I WTÓRNYCH PRODUKTÓW UTLENIEŃ W OLEJU WYDZIELONYM ZE SKÓR ŁOSOSI	103
4.6	MIKROKAPSULKOWANIE OLEJU RYBNEGO Z ZASTOSOWANIEM ŻELATYNY RYBNEJ	107
4.6.1	Określenie stabilności emulsji przeznaczonych do wytwarzania mikrokapsulek.....	107
4.6.2	Określenie efektywności procesu mikrokapsulkowania.....	108
4.6.3	Wpływ przechowywania mikrokapsulkowanego oleju rybnego na zawartość pierwotnych i wtórnych produktów utleniania	110
4.6.4	Stabilność oksydacyjna oleju rybnego mikrokapsulkowanego w warunkach ograniczonego dostępu tlenu	115

4.6.5	Mikrokapsułkowanie oleju rybnego w peletkach żelatynowych	119
4.6.6	Mikrokapsułkowanie oleju rybnego w peletkach żelatynowych z dodatkiem rozmarynu.....	121
4.7	CHARAKTERYSTYKA HANDLOWYCH PREPARATÓW KAPSUŁKOWANEGO OLEJU RYBNEGO DOSTĘPNYCH NA POLSKIM RYNKU.....	126
5	WNIOSKI KOŃCOWE	131
6	PIŚMIENNICTWO	132
7	DOROBEK NAUKOWY	144
	ABSTRACT	146

INDEKS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DHA	kwas dokozaheksaenowy
EPA	kwas ejkozapentaenowy
EFSA	European Food Safety Authority
ESI	indeks stabilności emulsji
FDA	Food and Drug Administration
LK	liczba kwasowa
LOO	liczba nadtlenkowa
MDA	aldehyd malonowy
ME	efektywność mikrokapsułkowania
mEqO₂	milirównoważniki aktywnego tlenu
MUFA	jednonienasycone kwasy tłuszczowe
NNKT	niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe
SAFA	nasycone kwasy tłuszczowe
TAG	triacyloglicerole
WKT	wolne kwasy tłuszczowe

STRESZCZENIE

Duża ilość surowców ubocznych i odpadów powstających w przemyśle rybnym, w tym z przetwórstwa łososi hodowlanych, skłania do poszukiwania racjonalnego sposobu ich zagospodarowania. Skóry z mechanicznego odskórzania łososi zawierają ok. 15% kolagenu i 25% tłuszczu. Dlatego też, zamiast przerabiania ich na mączkę paszową, mogłyby zostać wykorzystane do odzysku tych substancji.

Pierwszym głównym celem pracy było opracowanie warunków ekstrakcji oleju ze skór. Sprawdzono, czy możliwe jest odzyskiwanie oleju z surowca w temperaturze nie przekraczającej 15°C. Stwierdzono, że już po 1 minucie mieszania rozdrobnionych skór z wodą i po odwirowaniu mieszaniny, wydajność ekstrakcji oleju była bardzo duża i wynosiła ok. 83%. Równocześnie określono jakość wydobywanego oleju poprzez oznaczenie zawartości pierwotnych (LOO) i wtórnych (test TBA) produktów utleniania oraz liczby kwasowej i składu kwasów tłuszczowych (ze szczególnym uwzględnieniem zawartości EPA i DHA). Metoda „na zimno” pozwoliła na otrzymywanie oleju rybnego z dobrą wydajnością i przy niewielkim nakładzie energii i, co bardzo ważne, nie prowadziła do niekorzystnych przemian oksydacyjnych i hydrolitycznych. Ponadto, w trakcie wydobywania oleju nie następowały straty surowca kolagenowego, który został następnie wykorzystany do otrzymywania żelatyny. Zbadano wpływ czasu przechowywania zamrażalniczego skór na jakość otrzymywanego z nich oleju. Przemiany oksydacyjne zachodziły w surowcu nawet w -20°C, przy czym LOO (będąca miernikiem zawartości pierwotnych produktów utleniania) oleju obecnego w skórkach przechowywanych w stanie nierozdrobnionym osiągnęła wartości powyżej 15 mEqO₂/kg tłuszczu po 110 dniach, zaś w oleju w skórkach rozdrobnionych już po 70 dniach przechowywania. Podczas przechowywania oleju w temperaturze pokojowej procesy oksydacji zachodziły ok. 2 razy szybciej niż w warunkach chłodniczych, chociaż skład kwasów tłuszczowych ulegał jedynie niewielkim zmianom. Określono przydatność suszonych ziół o właściwościach przeciwutleniających do poprawiania stabilności oksydacyjnej oleju. Dodatek rozmarynu do oleju, już w stężeniu 1% wydłużał okres indukcji reakcji utleniania około 9 razy w porównaniu do próby kontrolnej. Inne zioła: oregano i szałwia nie wykazywały tak silnego działania przeciwutleniającego jak rozmaryn.

Drugim głównym celem było opracowanie optymalnych warunków mikrokapsułkowania otrzymanego oleju metodą emulsyjną z wykorzystaniem suszenia sublimacyjnego. Jako materiał otoczek mikrokapsułek wykorzystano żelatynę, pochodzącą z tego samego surowca, co olej. Stwierdzono, że optymalny skład emulsji przeznaczonej do wytwarzania mikrokapsułek z olejem rybnym stanowiło 20% stężenie białka w mieszaninie

oraz stosunek rdzeń:otoczka równy 1:1. Mikrokapsułki wytwarzano susząc sublimacyjnie emulsję w formie płytek, które następnie rozdrabniano. Już bezpośrednio po ich wysuszeniu zachodziły przemiany oksydacyjne zamkniętego w ich strukturze oleju - LOO wzrosła od 1 do 8 mEqO₂/kg tłuszczu. Ograniczenie dostępu tlenu podczas wytwarzania emulsji nie poprawiło stabilności oksydatywnej mikrokapsułkowanych preparatów. W związku z tym wypróbowano inną metodę mikrokapsułkowania oleju – susząc emulsję w formie peletek żelatynowych. Uzyskano w ten sposób znaczną poprawę stabilności oksydatywnej mikrokapsułkowanego oleju. Po 4 tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej LOO oleju w peletkach osiągnęła wartość ok. 18 mEqO₂/kg tłuszczu i była trzykrotnie mniejsza niż w oleju niemikrokapsułkowanym. Podobnie, w temperaturze chłodniczej LOO oleju mikrokapsułkowanego w peletkach (ok. 3 mEqO₂/kg tłuszczu) była trzykrotnie mniejsza niż w oleju surowym przechowywanym w tych samych warunkach. Dodatkowo, włączenie rozmarynu w strukturę peletek zmniejszyło szybkość powstawania pierwotnych i wtórnych produktów utlenienia, niezależnie od warunków przechowywania. W peletkach z dodatkiem rozmarynu, nawet w przypadku przechowywania w temperaturze pokojowej LOO po 4 tygodniach była blisko 6-krotnie mniejsza niż w oleju surowym. Uzyskane opracowaną metodą mikrokapsułki w formie peletek żelatynowych mogłyby zostać wykorzystane jako suplement diety.

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1. WPROWADZENIE

Podczas obróbki wstępnej surowców rybnych powstają odpady, takie jak głowy, skóry i kości. Wykorzystywane są one głównie jako składniki pasz dla ryb, drobiu i zwierząt futerkowych. Część z nich trafia na wysypiska śmieci, gdzie traktowane są jako odpady szczególnie uciążliwe dla środowiska, obciążone najwyższymi stawkami opłat. Tymczasem odpady te mogą być racjonalnie zagospodarowane i wykorzystane do odzyskiwania cennych substancji w nich zawartych, takich jak olej rybny oraz żelatyna. Na światowym rynku produktów rybnych szczególnie istotne miejsce zajmuje łosoś - w latach 1990-2007 zanotowano wzrost jego światowej produkcji aż o 500% (1,13 milionów ton) (Larsen 2009). Krajowy import hodowlanego łososia norweskiego (patroszonego) szacuje się na 68 tys. ton rocznie. W wyniku jego przetwórstwa powstaje ok. 20 000 ton odpadów, w tym 3500 ton skór. Przyjmując, że skóry łososi zawierają 25% oleju i 15% kolagenu, są one dobrym materiałem do odzyskiwania tych składników (Kołodziejska i in. 2008).

Oleje rybne są bogatym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny *n-3*. Kwasom tym przypisuje się wyjątkową rolę w profilaktyce i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego, rozwoju mózgu dziecka już w okresie płodowym oraz stymulacji układu immunologicznego. Zawartość procentowa niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) w oleju zależy w dużym stopniu od gatunku ryby, z której został pozyskany. Szczególnie bogate w długołańcuchowe NNKT są tłuste ryby morskie, takie jak tuńczyk (28% ogólnej zawartości kwasów), makrela (23%), śledź (24%) a także łosoś (Gbogouri i in. 2006, Aidos i in. 2002, Bimbo. 1998). W oleju z łososia kwasy NNKT z rodziny *n-3* stanowią ok. 23% ogólnej zawartości (Gbogouri i in. 2006, Kołodziejska i in. 2008). Dlatego też może on zostać z powodzeniem wykorzystany do produkcji preparatów służących do wzbogacania diety w NNKT. W ostatnich latach obserwuje się wzmożone zainteresowanie takimi preparatami. Suplementy najczęściej mają postać żelatynowych kapsułek wypełnionych olejem. Żelatynowa otoczka kapsułki chroni jej zawartość przed wpływem czynników zewnętrznych. Kapsułki są wygodną i akceptowalną przez konsumentów formą dawkowania i przechowywania preparatu. Nowoczesną odmianą kapsułek są mikrokapsułki, których rozmiary wahają się w granicach od 5 do 1000 μm , co umożliwia ich zastosowanie np. jako dodatku do tradycyjnej żywności, a ponadto olej zyskuje wygodną formę proszku.

Surowcem do wytwarzania mikrokapsulek może być żelatyna rybna. Skóry łososia stanowią więc źródło obydwu składników potrzebnych do otrzymania gotowego produktu. Zaletą użycia żelatyny rybnej jako alternatywnego surowca do wytwarzania mikrokapsulek jest bezpieczeństwo zdrowotne, gdyż nie stwarza ona zagrożeń, jakie przypisuje się żelatynie bydłowej. Żelatyna z ryb różni się od żelatyny zwierząt stałocieplnych - nie żeluje bowiem w temperaturze pokojowej, a dopiero po ochłodzeniu do 10-12°C (Norland 1990, Kołodziejka i in. 2004), stąd konieczność odpowiedniej optymalizacji i dostosowania metody wytwarzania mikrokapsulek do jej specyficznych właściwości.

1.2. SPOSOBY WYTWARZANIA OLEJÓW RYBNYCH

1.2.1. Charakterystyka tłuszczu rybnego

Tłuszcz obecny w rybach może być integralnym składnikiem tkanki mięśniowej, odkładać się w postaci warstw o różnej grubości pod skórą i wokół przewodu pokarmowego, jak również w wątrobie, gonadach i czaszce. Olejem rybnym nazywa się olej pozyskany z całych ryb lub ich części. W zależności od zawartości oleju w mięsie, ryby dzieli się na: chude (zawartość tłuszczu do 2%), średnio tłuste (2-7%), tłuste (7-15%) i pełnotłuste (ponad 15%). Z technologicznego punktu widzenia najkorzystniej pozyskiwać olej z ryb należących do ostatniej grupy – ryb pełnotłustych. Przynależą do nich m.in. łosoś, śledź, makrela oraz tuńczyk.

Składniki oleju rybnego, określane wspólną nazwą lipidów, stanowią założoną mieszaninę różnych typów cząsteczek chemicznych. Podstawową grupą są triacyloglicerole (TAG), zwane też tłuszczem właściwym. W składzie tłuszczu rybnego oprócz TAG, które stanowią ok. 98%, obecne są również w różnych ilościach fosfolipidy, glikolipidy, sulfolipidy a także składniki zaliczane do tzw. substancji nie zmydlających się (SNZ).

Fosfolipidy są głównie składnikiem aktywnych metabolicznie błon i struktur komórkowych. Ich udział może wynosić nawet ok. 1% ogólnej masy tkanek, dlatego, w przypadku ryb chudych np. dorsza czy ryb wycieńczonych tarłem, fosfolipidy stanowią praktycznie całą frakcję lipidową mięsa. Znamioną cechą fosfolipidów ryb jest bardzo duża zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, rzędu 50-60%, w tym głównie kwasów pentaenowych i heksaenowych. Fosfolipidowa frakcja lipidów składa się w 50% z fosfatydylocholin i fosfatydyloetanolamin (Sikorski 2004).

W składzie frakcji SNZ obecne są sterole, węglowodory, tokoferole, barwniki karotenoidowe, woski oraz estry steroli. Oleje z mięsa ryb morskich zawierają stosunkowo niewielką ilość SNZ (od 0,5 – 3%), natomiast oleje z mięsa ryb słodkowodnych mogą zawierać ich znacznie więcej, nawet do 27%.

Sterole pełnią ważną funkcję jako składniki błon fosfolipidowych, mają wpływ na przepuszczalność błon dla wody, jonów i białek. Największy udział w ogólnej ilości steroli ryb ma cholesterol – nawet do 80%, przy czym wartość ta zależy od gatunku ryby, okresu połowu i rodzaju tkanki, z której jest wydzielany olej. Ilość cholesterolu jest mała w porównaniu do innych surowców żywnościowych – 5-krotnie mniejsza niż w maśle i ok. 20-krotnie mniejsza niż w żółtku jaja (Sikorski 2004; Kritchevski 1967; Feeley 1972). Oprócz cholesterolu w znacznych ilościach występują: brassikasterol, 22-dehydrocholesterol, desmosterol, 7-dehydrocholesterol, 24-metylencholesterol i β -sitosterol (Sikorski 1980).

Oleje rybne są bogatym źródłem witaminy A. W największych ilościach występuje ona w wątrobach ryb, od kilku do kilkudziesięciu mg w 100 ml tranu. Jej zawartość zwiększa się z wiekiem ryby i zmniejsza ze wzrostem udziału oleju w wątrobie. Mięśnie są uboższe w witaminę A o co najmniej rząd wielkości (Achremowicz, Szary-Sworst 2005; Bimbo 1998). Barwniki karotenoidowe (w rybach i bezkręgowcach morskich wykryto ich ponad 20) pobierane wraz z pokarmem, występują przede wszystkim w chromatoforach skóry ryb wielu gatunków np. karmazyna oraz w mięśniach ryb łososiowatych i makrełowatych. Powodują one intensywne zabarwienie niektórych olejów, zwłaszcza otrzymywanych z całych ryb lub odpadów po filetowaniu. Do karotenoidowych barwników ryb łososiowatych należy przede wszystkim astaksantyna, luteina, β -karoten i kantaksantyna, w mięsie makrełowatych występuje głównie tunaksantyna (Sikorski 2004; Johnston 2006).

Wątroby ryb zawierają też dużo witaminy D, głównie ergokalcyferolu (witamina D₂). Witamina E, czyli tokoferole, które syntezowane są przez plankton roślinny, trafiają do tkanek ryb przez łańcuch odżywczy. W mięśniach ryb ich zawartość wynosi 210-330 μg α -tokoferolu/g lipidów. Wyjątkowo bogate w witaminę E są ciemne mięśnie dorsza (do 630 μg α -tokoferolu/g lipidów) oraz wątroby dorsza i makreli (ok. 430 μg α -tokoferolu/g lipidów) (Sikorski 1973; Kamal-Eldin i Yanishlieva 2002).

Woski nie są korzystnymi żywieniowo składnikami oleju z mięsa ryb, ponieważ nie ulegają strawieniu. W olejach większości ryb wykorzystywanych w przemyśle rybnym, zawartość wosków nie przekracza 1%; są to najczęściej estry kwasu C_{18:1}, wykryto również obecność takich alkoholi jak C₁₆H₃₂O, C₁₈H₃₄O, C₂₂H₃₄O, a także nienasyconego alkoholu C₂₈ (Sikorski 1980). Woski służą jako regulatory pływalności, gdyż mają mniejszą gęstość niż

lipidy innych klas (z wyjątkiem skwalenu), przypuszczalnie mogą też być rezerwą energetyczną.

Skwalen ($C_{30}H_{50}$), zawierający sześć wiązań podwójnych, jest głównym przedstawicielem węglowodorów wchodzących w skład SNZ olejów rybnych. Szczególnie dużo skwalenu występuje w olejach z wątrób ryb morskich niektórych gatunków. Jest on prekursorem biosyntezy steroli, zwiększa odporność immunologiczną, przyspiesza regenerację i gojenie się skóry (Rao 1998). Oprócz skwalenu w oleju ryb występują węglowodory nasycone, takie jak dekan $C_{10}H_{22}$, pristan $C_{18}H_{38}$ oraz nienasycone – $C_{18}H_{36}$, $C_{18}H_{32}$ i $C_{28}H_{46}$.

Oleje rybne charakteryzują się specyficznym składem kwasów tłuszczowych, ich dużą różnorodnością, a zwłaszcza obecnością NNKT. Dzięki temu, olej rybny, oprócz spełniania wielu podstawowych funkcji, tj. ułatwiania przenikania pokarmu, dostarczania energii oraz rozpuszczalnych w tłuszczu witamin A, D i E, posiada wyjątkowe, szeroko opisywane w literaturze właściwości prozdrowotne.

W Tabeli 1 przedstawiono procentowy skład kwasów tłuszczowych w różnych olejach rybnych.

Tabela 1. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych w olejach rybnych

Kwasy tłuszczowe	Łosoś atlantycki ¹⁾	Śledź atlantycki ²⁾			Makreła atlantycka ³⁾	Menhaden ⁴⁾	Tuńczyk ³⁾
		Cały	Bez głów	Głowy			
ΣSAFA	25	29	28	30	23	28	33
ΣMUFA	40	45	45	47	49	21	28
ΣPUFA	36	26	27	24	25	35	39
ΣPUFA <i>n-6</i>	8	1	2	2	2	b.d.*	b.d.*
ΣPUFA <i>n-3</i>	23	25	26	22	23	33	b.d.*
EPA	8	9	10	9	5	16	6
DHA	12	11	11	10	12	10	22

¹⁾Gbogouri i in. 2006, ²⁾Aidos i in. 2002, ³⁾Bimbo 1998, ⁴⁾Chen i in. 2000

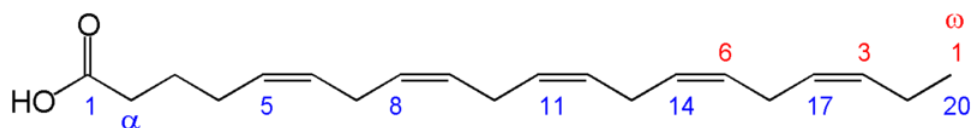
* brak danych

Nasycone kwasy tłuszczowe (SAFA - *ang.* saturated fatty acids) stanowią zazwyczaj ok. 15-30% ogólnej zawartości, w tym udział kwasu palmitynowego C16:0 wynosi 60-70%, kwasu mirystynowego C14:0 20 - 30% i kwasu stearynowego C18:0 około 5-10%. Kwasy C8:0, C10:0 oraz C12:0 łącznie stanowią mniej niż 15% tej frakcji. Udział kwasów jednonienasyconych (MUFA – *ang.* monounsaturated fatty acids) w oleju z ryb tłustych

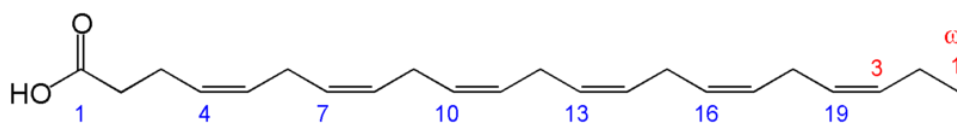
takich jak makreła lub łosoś zwykle stanowi ponad 40% ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych. Wśród kwasów nienasyconych największy udział mają kwasy wielonienasycone (PUFA – *ang.* polyunsaturated fatty acids): osiemnasto-, dwudziesto- i dwudziestodwuwęglowe. Występują również niewielkie ilości kwasów o 24 i 26 atomach węgla w łańcuchu.

W przypadku ryb hodowlanych skład kwasów tłuszczowych oleju, jak również jego sensoryczne właściwości zależą w dużej mierze od sposobu żywienia ryb. Występują znaczne odchylenia w zawartości kwasów tłuszczowych w tłuszczu ryb w zależności od stosowanej diety. Ze względów ekonomicznych pasze często zawierają dodatki olejów roślinnych (Larsen 2009; Carter i Hauler 2000; Ochang 2011). Duże ilości tych olejów w paszy zastępujące olej rybny mogą skutkować mniejszymi zawartościami kwasów *n-3* w mięsie ryb pochodzących z hodowli. Wykazano jednakże, iż możliwa jest substytucja do 60% oleju rybnego w diecie olejami roślinnymi (rzepakowy, sojowy, lniany) bez wpływu na wzrost czy wykorzystanie paszy przez długi okres karmienia ryb (Izquierdo i in. 2005).

W olejach rybnych za najcenniejsze uważa się kwas ikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA), należące do NNKT z rodziny *n-3*. Udział wielonienasyconych kwasów z rodziny *n-3* może dochodzić w szczególnych przypadkach nawet do 50% (Sikorski 1992).



EPA



DHA

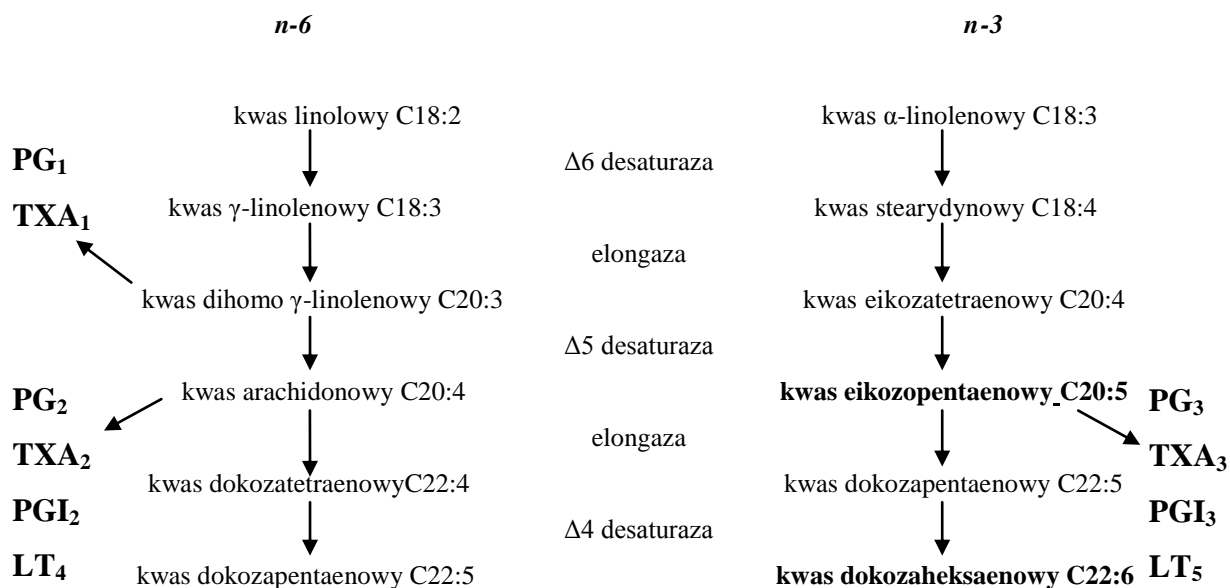
Rysunek 1. Budowa kwasów tłuszczowych EPA i DHA

Kwasy EPA i DHA zawierają w łańcuchu wodorowęglowym, odpowiednio, pięć i sześć wiązań podwójnych w konfiguracji *cis*, przedzielonych grupami metylenowymi (Rysunek 1). Zawartość procentową tych kwasów w mięsie ryb różnych gatunków przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Zawartość kwasów EPA i DHA w 100g ryby (Kris-Etherton i in, 2003)

Rodzaj ryby	Zawartość EPA+DHA [g/100 g ryby]
tuńczyk	0,29-1,52
sardynka	1,17-2,02
łososiwate	0,81-2,18
makrela	0,40-1,87
śledź	2,04-2,15

EPA i DHA wywierają korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Wchodzą w skład błon komórkowych, zwłaszcza tkanki nerwowej, a także są prekursorami wewnątrzustrojowej syntezy eikozanoidów - substancji hormonopodobnych o szerokim spektrum działania, takich jak prostaglandyny (PG), prostacykliny (PGI), tromboksany (TXA) i leukotrieny (LT) (Kolanowski 2000; Shukla i Perkins 1998; Newton 1996). Szlak enzymatyczny biokonwersji kwasów z rodziny *n-3* i *n-6* przedstawiono na Rysunku 2.



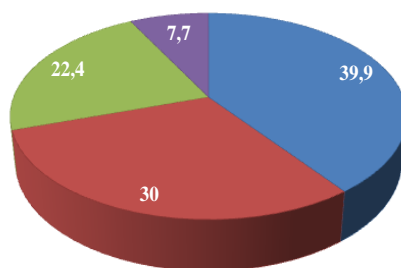
Rysunek 2. Przemiany enzymatyczne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie człowieka (Drozdowski 2007)

W diecie bogatej w kwasy z rodziny *n-6* efektywność biokonwersji kwasu α -linolenowego jest znikoma ze względu na konkurencję z kwasem linolowym o desaturazę $\Delta 6$. Stąd też konieczność przyjmowania bezpośredniego EPA i DHA, ponieważ ich synteza w organizmie jest bardzo ograniczona i nie wystarcza do zapewnienia właściwego poziomu tych właśnie kwasów.

Eikozanoidy mają istotny wpływ na układ sercowo-naczyniowy i regulację ciśnienia krwi. Obniżają zawartość TAG, a podwyższają poziom lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). Działają przeciwzakrzepowo i regulują odporność immunologiczną ustroju, proliferację komórek, czynności hormonów czy ekspresję genów (Singer i in. 1990; Mozaffarian i in. 2006; Harris 1989; Harris 2004). Wykazano, że EPA i DHA hamują rozwój niektórych nowotworów (raka sutka, płuc, gruczołu krokowego), reakcji zapalnych i alergicznych, łagodzą dolegliwości w chorobach reumatycznych (Lebiedzińska 2006; Kremer 1990). DHA jest istotnym składnikiem kory mózgu i siatkówki (bierze udział w rozwoju układu nerwowego już podczas życia płodowego oraz w dzieciństwie) a ponadto opóźnia występowanie patologicznych zmian u chorych na Alzheimerera. Wpływa na spowolnienie akumulacji białka, które jest odpowiedzialne za rozwój wewnątrz komórek nerwowych zwyrodnień neurofibrylarnych (Jackowska 2008; Kyle 1999; Petot i Friedland 2004). Stwierdzono, że ekstrakt zawierający kwasy tłuszczowe *n-3* pomaga w leczeniu zespołu maniakalno-depresyjnego (Kulikowski 2000; Adams i in. 1996). Potwierdza to 8 do 10 razy mniejsza częstotliwość występowania depresji poporodowych w krajach o dużym spożyciu ryb (Japonia, Malezja) niż w krajach o niskiej konsumpcji jak Niemcy, Holandia (Bykowski 2007). Przypuszcza się, że niskie spożycie DHA rzutuje negatywnie na współczynnik inteligencji (Kolanowski 2000; Horrocks i Young 1999).

Istnieje wiele rekomendacji, co do spożycia EPA i DHA dla różnych grup społecznych np. kobiet w ciąży, osób starszych, niemowląt. Zwykle zaleca się dzienne spożycie EPA i DHA dla dorosłego zdrowego człowieka na poziomie 200 – 500mg (wg. The American Dietetic Association, World Health Organization, Dutch Health Council). Według aktualnych zaleceń FAO/WHO ok. 1% energii dostarczanej wraz ze spożywanymi tłuszczami powinien pochodzić od EPA i DHA. Natomiast ich spożycie w Polsce kształtuje się na poziomie 0,05 – 0,1% (Dybkowska i in. 2007). Wynika to m.in. z częstotliwości spożywania ryb przez konsumentów w kraju – większość jada ryby nie częściej niż raz w tygodniu (Rysunek 3). Jest to zdecydowanie za mało, aby utrzymać odpowiednią podaż PUFA w diecie. Zauważa się jednak powolne odwracanie tego trendu i większe zainteresowanie żywnością pochodzenia morskiego (Grzybowska-Brzezińska i Pilarski 2005).

Aby zapewnić należyte ilości EPA i DHA w organizmie zaleca się spożycie co najmniej 300 g ryb morskich tygodniowo (obecnie w Polsce wynosi ono średnio ok. 125 g), lub nie zmieniając drastycznie nawyków żywieniowych, zwiększyć w diecie udział tych kwasów poprzez suplementację niewielkimi ilościami niewodornionego oleju rybnego.



Rysunek 3. Częstotliwość spożywania ryb w Polsce (wyrażona w procentowym udziale konsumentów) (Andrzejewska 2008) raz w tygodniu (■), 2-3 razy w miesiącu (■), raz w miesiącu lub rzadziej (■), częściej niż raz w tygodniu (■)

Olej rybny może być stosowany do spożycia w postaci czystej – ciekłej, w tym kapsułkowanej, a także w postaci wzbogaconej żywności (Kolanowski 2000; Achremowicz, Szary-Sworst 2005).

Ze względu na dużą liczbę wiązań nienasyconych, charakterystyczną cechą EPA i DHA jest ich duża podatność na procesy utleniania, nieporównywalnie wyższa niż PUFA z rodziny *n-3* pochodzących z tłuszczów roślinnych. Utlenianie PUFA pod wpływem tlenu atmosferycznego jest klasycznym problemem w technologii żywności i często główną przyczyną ograniczenia przydatności do spożycia gotowych produktów zawierających oleje. Szybkość reakcji utleniania rośnie wraz ze stopniem nienasylenia kwasów tłuszczowych. Stwierdzono, że w olejach roślinnych kwas linolowy utlenia się 10-40 razy szybciej niż oleinowy, natomiast linolenowy – 2-4-krotnie szybciej niż linolowy (Akoh i Min, 2008). Olej rybny jest tłuszczem wyjątkowo podatnym na procesy oksydacji i w porównaniu z olejem rzepakowym utlenia się ponad 5 razy szybciej (Jędrzejkiewicz i Krygier 2008).

Lipidy mięsa ryb utleniają się w wyniku reakcji autooksydacji oraz utleniania fotosensybilizowanego, a także w procesach enzymatycznych. Potencjalnymi inicjatorami autooksydacji są endogenne enzymy występujące w tkance ryb, takie jak lipooksygenaza skrzeli i skóry a także peroksydazy krwi i mięśni. Nadtlenki powstające na skutek reakcji utleniania rozpadają się do krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych, alkoholi, ketonów, aldehydów i węglowodorów. Niektóre z tych wtórnych produktów oksydacji wywołują pożądaną aromat świeżej ryby, inne natomiast - nieprzyjemną woń nieświeżych ryb a wydobyty z takiego utlenionego surowca olej ma charakterystyczny, wysoce niepożądany zapach. Działanie czynników zewnętrznych, takich jak tlen i temperatura może wzmacniać procesy utleniania zachodzące podczas wydobywania oleju, co w efekcie prowadzi do spadku zawartości w nim długołańcuchowych PUFA. Zwłaszcza lipidy skóry i warstwy podskórnej, a także w mięsie ciemnym utleniają się bardzo szybko. W związku z powyższym, ważna jest

taka optymalizacja procesu wydobywania oleju, aby w jak największym stopniu zapobiec niekorzystnym przemianom oksydacyjnym lipidów i stratom wartościowych, ze zdrowotnego punktu widzenia, PUFA.

1.2.2. Metody pozyskiwania oleju rybnego

Otrzymywanie oleju rybnego jest prowadzone za pomocą różnych metod. Ze względu na to, że stosowana metoda i jej parametry w znaczący sposób wpływają na jakość otrzymywanego produktu i możliwości jego późniejszego wykorzystania, musi być ona dobrana do rodzaju surowca i przeznaczenia gotowego oleju. Oleje rybne z mięsa i wnętrzności ryb, z wyjątkiem wątrób, na skalę przemysłową otrzymuje się głównie z ryb morskich – śledzi, makreli, menhadena i innych.

Metody otrzymywania oleju rybnego można podzielić na klasyczne (wytop suchy, mokry i ekstrakcja) i enzymatyczne.

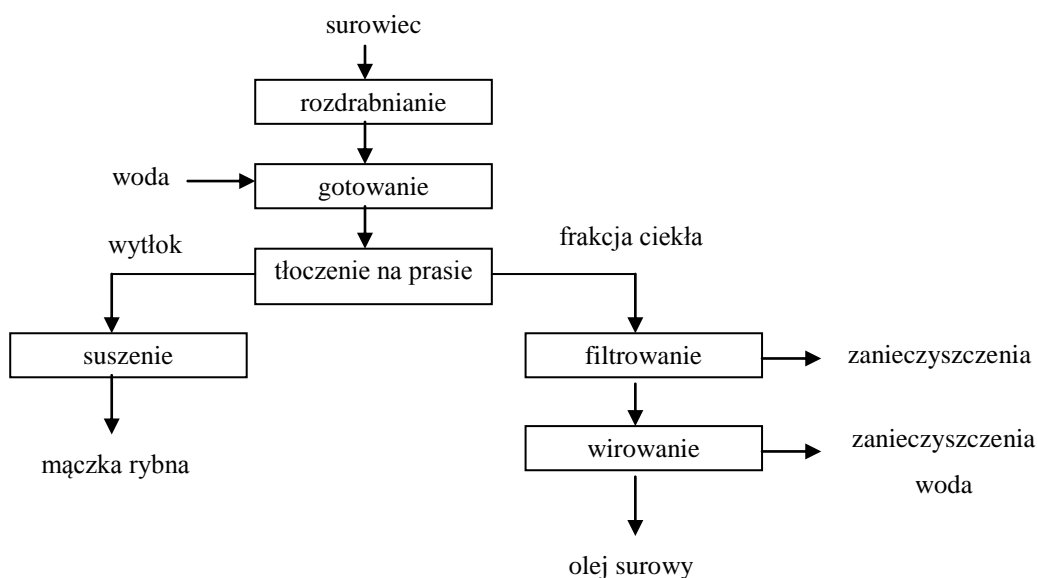
1.2.2.1 Wytop suchy oleju

Metodą tą uzyskuje się olej najgorszej jakości. Sposób ten wykorzystuje się głównie na statkach do przerobu odpadów powstałych przy filetowaniu oraz surowców rybnych ubogich w tłuszcz. Początkowo surowiec jest sterylizowany w temperaturze powyżej 100°C a następnie pod zmniejszonym ciśnieniem odparowuje się wodę. Jest to etap czasochłonny, ponieważ po zmniejszeniu zawartości wody w materiale do 50%, dalsze odwadnianie przebiega wolniej. Jeżeli do przerobu kieruje się ryby tłuste lub odpady z takich ryb, to po wytopie masę tłoczy się na prasach hydraulicznych (nacisk 30-40MPa) lub ślimakowych (Niewiadomski 1993). Wysoka temperatura zastosowana w procesie gwarantuje lepszą wydajność oleju, ale indukuje niekorzystne przemiany związane z utlenianiem i reakcjami produktów oksydacji. Sam proces jest energochłonny, a uzyskany olej najczęściej nie nadaje się do celów spożywczych.

1.2.2.2 Wytop mokry oleju

Najbardziej popularny i najszerzej stosowany jest wytop mokry. Nadaje się do wszystkich rodzajów ryb, zarówno tych bogatych jak i ubogich w tłuszcz. Surowce mogą, ale

nie muszą być sortowane przed wytopem. Stwierdzono, że olej wydobyty z niesortowanych odpadów (głowy, skóry, trzewia, szkielety) ze śledzia (*Clupea harengus*) oraz olej tylko z głów i z odpadów bez głów charakteryzują się bardzo podobnym składem kwasów tłuszczowych (Aidos i in. 2002). Surowiec jest rozdrabniany i gotowany w garnku. Pod wpływem pary wodnej zachodzi denaturacja białek, co ułatwia mechaniczne oddzielenie części stałych od ciekłych. Następnie rozdziela się masę na dwie frakcje – ciekłą (tłuszczowo-wodną) i stałą stanowiącą głównie uwodnione białka. Frakcję białkową następnie suszy się i przerabia na mączkę rybną. Frakcja ciekła zawiera znaczne ilości zawieszonych substancji białkowych, dlatego zwykle kierowana jest na sita oddzielające zanieczyszczenia. Ostatnim etapem jest wydzielenie oleju z odpowiedniej frakcji. Schemat standardowego procesu przedstawiono na Rysunku 4.



Rysunek 4. Standardowy proces produkcji oleju rybnego i mączki rybnej

Powszechnie stosuje się technologie, w których po wytopie rozdziela na trzy frakcje: stałą oraz dwie ciekłe (wodną i olejową) następuje w dekanterze (Aidos i in. 2001, 2002). Na podstawie badań nad wydobywaniem oleju z odpadów łososa atlantyckiego (*Salmo salar*) stwierdzono, że modyfikacja w linii technologicznej, polegająca na wprowadzeniu po dekanterze dodatkowego separatora, nie wpływa na jakość tłuszczu i jest zbędna (SkarÅ i in. 2004). Oddzieloną frakcję olejową kieruje się do wirówki oczyszczająco-polerującej, w której olej zostaje pozbawiony resztek wody i zawiesin.

Głównymi wadami wytopu mokrego są warunki sprzyjające hydrolizie wiązań estrowych w TAG, w związku z czym olej może charakteryzować się wysoką zawartością produktów degradacji TAG. Wysoka temperatura prowadzi też do denaturacji białek, w tym metaloprotein pochodzących z resztek tkanki mięśniowej na odpadach z ryb. Uwolnione jony metali działają jako prooksydanty i sprzyjają procesom utleniania, na które szczególnie wrażliwe są PUFA. Poprawę stabilności i jakości oleju rybnego w przypadku mokrego wytopu na gorąco można uzyskać przez obniżenie pH fazy wodno-olejowej poniżej 2. Według Crowther i in. 2001 w takich warunkach inaktywowane zostają enzymy – m.in. lipooksygenazy i peroksydazy, co zapobiega utlenianiu się i powstawaniu nieprzyjemnego zapachu w otrzymywanym oleju.

W przypadku pozyskiwania oleju z wątrób ryb, zawierających mniej niż 28% tłuszczu, a bogatych w witaminę A już w latach 30-tych ubiegłego wieku zaproponowano modyfikacje metody mokrego wytopu, mające na celu polepszenie wydajności procesu. W celu rozbicia układów białkowo-lipidowych w tkankach i zwiększenia odzysku tłuszczu zastosowano kwaśną lub alkaliczną obróbkę wstępną. Kwaśna obróbka polega na macerowaniu surowca przy pH środowiska ok. 1,5. W metodzie trawienia alkalicznego zhomogenizowane wątroby rybne są traktowane roztworem wodorotlenku sodu lub innej, słabszej zasady. W metodzie tej ważny jest dobór odpowiednich warunków procesu, takich jak czas działania zasady, proporcje wzajemne składników: tkanka – roztwór zasady oraz warunków mieszania. Nieprawidłowo dobrane parametry prowadzi do powstania w trakcie procesu mydeł i emulsji. Dlatego też roztwór zasady dozuje się w dwóch porcjach. Pierwsza ma za zadanie zobojętnić obecne w surowcu wolne kwasy tłuszczowe, zaś druga rozbić kompleksy białkowo-lipidowe w tkankach i uwolnić tłuszcz; pH powstałej mieszaniny mieści się w zakresie 8 – 12,5. Próbowano również udoskonalić ten proces stosując dodatkowo trawienie za pomocą enzymów.

W niektórych przypadkach, zwłaszcza dla ryb tłustych, mogą być użyte alternatywne metody bez podgrzewania surowca. Z uwagi na niekorzystne działanie wysokich temperatur podczas tradycyjnego wytopu, Barrier i Rousseau (2001) zaproponowali odzysk oleju na zimno z filetów pozbawionych skóry. Procedura obejmuje homogenizowanie surowca z wodą, w temperaturze nie przekraczającej 15°C (w zależności od lepkości homogenatu dodatek wody wynosi 10-40% w stosunku do masy surowca) i rozdzieleniu mieszaniny w dekanterze na frakcję wodno-olejową i stałe pozostałości.

1.2.2.3 Ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi

Metoda klasycznej ekstrakcji za pomocą układu rozpuszczalników pozwala na otrzymanie oleju pozbawionego wody oraz zawiesin, ale z wysoką zawartością różnych substancji towarzyszących, rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych. Należą do nich związki barwne, wolne kwasy tłuszczowe oraz fosfolipidy. Rafinacja takiego oleju jest kosztowna i przeważnie jest on gorszej jakości niż oleje otrzymywane przez wytop (Niewiadomski 1993).

Lipidy w surowcu rybnym występują w różnej postaci. W tkance zapasowej lipidy tworzą duże agregaty, stosunkowo łatwe do wyekstrahowania, natomiast te związane z białkami i polisacharydami w strukturze błon komórkowych jest znacznie trudniej wydobyć. Wybór rozpuszczalnika wpływa na wydajność ekstrakcji poszczególnych klas lipidów (Harrod 1998). Ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi można poddać surowiec rybnny suszony, świeży a także wytlók, otrzymany np. po wcześniejszym wytopie. Ekstrakcja surowca, który zawiera dużą ilość wody tj. 45-60% jest niekorzystna, ponieważ obecność wody przyczynia się do niekorzystnych zmian oksydacyjnych w oleju i ma on gorsze właściwości niż olej uzyskany przez tłoczenie na prasach hydraulicznych. W celu polepszenia jakości surowiec podsusza się do wilgotności ok. 10%. Najlepszej jakości olej i mączkę uzyskuje się z ekstrakcji podsuszonego surowca o zawartości 35-40% tłuszczu i wytlóków o zawartości ok. 8% tłuszczu (Niewiadomski 1993).

Ekstrakcję za pomocą układu rozpuszczalników organicznych stosuje się szeroko w analityce laboratoryjnej. Ekstrakcja jest punktem krytycznym analizy w badaniach nad przemianami oksydacyjnymi lipidów w mięsie ryb. W porównaniu do lipidów natywnych, produkty oksydacji są bardziej polarne a ponadto mogą być związane w strukturze błon komórkowych. Dlatego też mieszanina ekstrakcyjna musi być wystarczająco polarna, aby rozpuszczać kompleksy białkowo-lipidowe błon i ekstrahować zarówno lipidy natywne, jak i produkty utlenienia. Powinna również działać efektywnie w niskiej temperaturze, aby uniknąć utleniania podczas ekstrakcji tłuszczu z surowca (Harrod 1998).

Najpopularniejszą metodą ekstrakcji jest metoda Folcha (1957) za pomocą chloroformu i metanolu, przy jednoczesnej homogenizacji surowca, oraz jej modyfikacje, np. metoda Bligh-Dyera (1959). Metody te pozwalają na najwyższą efektywność ekstrakcji w niskiej temperaturze i ograniczenie przemian oksydacyjnych w oleju. Modyfikacja zaproponowana przez Bligh i Dyera (1959) polega na zmianie proporcji rozpuszczalników, zmniejszeniu ich ilości w stosunku do surowca. Procedura ta jest wykorzystywana do

pozyskiwania tłuszczu z ryb chudych. Ponieważ jednak w metodzie tej stosuje się duże ilości chloroformu, któremu przypisuje się właściwości rakotwórcze i drażniące, powstało kilka metod alternatywnych, wykorzystujących różne układy rozpuszczalników alkan-alkohol-woda (Harrod 1998).

Na skalę przemysłową ekstrakcja rozpuszczalnikami jest stosowana rzadko. W pierwszym etapie mieszaninę surowca i rozpuszczalnika ogrzewa się parą, co powoduje odparowanie wody. Skroplone opary oddziela się a rozpuszczalnik zawraca do procesu. Operację odwadniania powtarza się do osiągnięcia w surowcu 10% wilgotności. Pozostałą wodę oddziela się podczas destylacji azeotropowej. Zwykle ekstrakcję łączy się z odzyskiem oleju metodą wytopu lub tłoczenia. Otrzymuje się w ten sposób lepszej jakości olej oraz jaśniejszą mączkę przy jednoczesnym zmniejszeniu kosztów instalacji (Niewiadomski 1993).

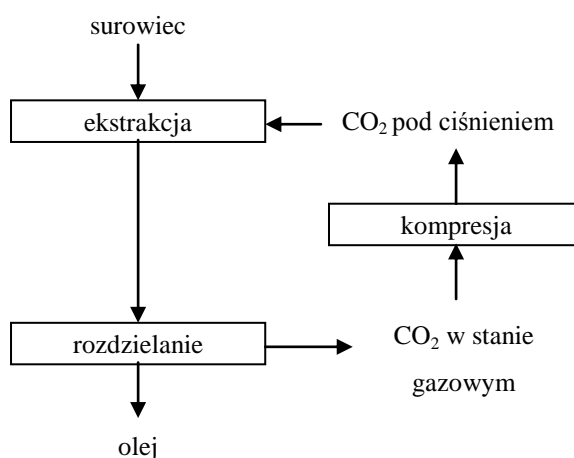
1.2.2.4 Ekstrakcja rozpuszczalnikiem w stanie nadkrytycznym SFE (*ang. supercritical fluid extraction*)

Ekstrakcja rozpuszczalnikiem w stanie nadkrytycznym jest metodą wydzielania pojedynczych substancji lub grup substancji z mieszanin z zastosowaniem jako ekstrahentów płynów w stanie nadkrytycznym. Substancja będąca w stanie nadkrytycznym charakteryzuje się specyficznymi właściwościami, co spowodowane jest tym, że znajduje się ona w warunkach ciśnienia i temperatury wyższych od jej parametrów krytycznych. W punkcie krytycznym zarówno właściwości pary jak i cieczy są jednakowe, zaś powyżej tego punktu substancja może istnieć już tylko jako tzw. płyn nadkrytyczny. Gęstość cieczy równa jest gęstości gazu a ciepło parowania wynosi zero. Płyn nadkrytyczny ma gęstość i zdolność rozpuszczania charakterystyczną dla rozpuszczalników ciekłych, natomiast szybkość dyfuzji, ściśliwość, lepkość i zdolność penetracji właściwe gazom. Pozwala to na głęboką penetrację ekstrahowanego materiału, a duża lotność płynu nadkrytycznego umożliwia łatwe jego usunięcie po ekstrakcji.

Wydajność procesu SFE zależy od warunków jego przeprowadzenia – temperatury, ciśnienia, czasu reakcji oraz od rodzaju użytego płynu. Zdolność rozpuszczania substancji w płynie nadkrytycznym można modelować w szerokich granicach dzięki zmianom temperatury i ciśnienia. Daje to możliwość prowadzenia ekstrakcji jednocześnie z frakcjonowaniem produktu. Na ogół płyny nadkrytyczne są rozpuszczalnikami niepolarnymi. Polarność ekstrahenta można zwiększać przez zmianę parametrów prowadzenia procesu oraz przez zastosowanie dodatkowych rozpuszczalników np. etanolu. W ten sposób rozszerza się

możliwości wykorzystania ekstrakcji w stanie nadkrytycznym do frakcjonowania mieszanin. Najczęściej do ekstrakcji w stanie nadkrytycznym stosuje się CO_2 ($T_K=30,98^\circ\text{C}$, $p_K=7,39\text{MPa}$), zwłaszcza w przemyśle spożywczym, ponieważ eliminuje się w ten sposób ryzyko toksycznych pozostałości rozpuszczalnika w produkcie. W przypadku olejów rybnych ekstrakcję w stanie nadkrytycznym można stosować do oczyszczania i częściowego rozfrakcjonowania oleju oraz do rozfrakcjonowania otrzymanych z niego estrów etylowych. Mniej natomiast prac poświęconych jest zastosowaniu SFE do wydobywania oleju z surowca rybnego. Frakcjonowanie oleju jest znacznie trudniejsze niż estrów etylowych. Wynika to z faktu, że różnica w budowie pomiędzy TAG jest znacznie mniejsza niż pomiędzy otrzymanymi z nich estrami etylowymi kwasów tłuszczowych. Istotny wpływ na proces ekstrakcji, a w szczególności na jego wydajność, ma zawartość wody w surowcu (Dunford 1998).

W procesie SFE surowiec za pomocą podajnika przenoszony jest do ekstraktora zaopatrzonego w płaszcz grzejny. Następnie pompowany jest tam CO_2 aż do momentu uzyskania odpowiedniego ciśnienia. Otwarcie zaworu pozwala na przepływ nadkrytycznego CO_2 przez złożę surowca. Mieszanina ekstraktu i rozpuszczalnika opuszcza ekstraktor i następnie jest rozdzielana w separatorze, w którym rozpuszczalnik przechodzi w stan gazowy. Proces rozdziału może być przeprowadzony poprzez zmianę temperatury mieszaniny lub zmianę ciśnienia. Najczęściej stosuje się jednoczesną zmianę obu parametrów. W obu przypadkach rozpuszczalnik jest regenerowany i po ponownym doprowadzeniu do warunków krytycznych wraca do ekstraktora, a oddzielona substancja jest usuwana z rozdzielacza (Rysunek 5):



Rysunek 5. Schemat ekstrakcji w stanie nadkrytycznym

Z badań nad wydajnością ekstrakcji olejów rybnych wynika, że wraz ze wzrostem zawartości wody w surowcu zmniejsza się rozpuszczalność oleju w CO₂ (Dunford 1998). W przeprowadzonym eksperymencie, przy ustalonych warunkach (temperatura 35°C, ciśnienie 34,5 MPa, czas 7 godzin, przepływ CO₂ 0,5 l/min), stwierdzono, że gdy zawartość wody w mięsie ryby była równa 3,7% (po liofilizacji), rozpuszczalność oleju wynosiła 2,67 kg/m³ CO₂. Przy wzroście zawartości wody do 62,2% rozpuszczalność zmniejszyła się do zaledwie 0,3 kg/m³ CO₂. Ustalono, że tak duże obniżenie rozpuszczalności miało miejsce dopiero po przekroczeniu zawartości wody powyżej 40%. Zasadniczą wadą odzyskiwania oleju rybnego za pomocą SFE jest mała wydajność procesu, o 50% mniejsza niż w metodzie enzymatycznej (Bryl i in. 2009), czy przy użyciu rozpuszczalników organicznych (Letisse i in. 2006).

Dzięki metodzie SFE możliwe jest stosunkowo łatwe wytworzenie oleju pozbawionego cholesterolu, ponieważ może być on usunięty na początku procesu jako pierwsza frakcja (Esquivel i in. 1997). Pozbawienie oleju w procesie ekstrakcji wszystkich substancji towarzyszących TAG, w tym tokoferoli, które należą do naturalnych przeciwutleniaczy, może spowodować z kolei jego większą podatność na procesy oksydacji. W związku z tym aby zapobiec stratom PUFA, olej należy wzbogacać w przeciwutleniacze.

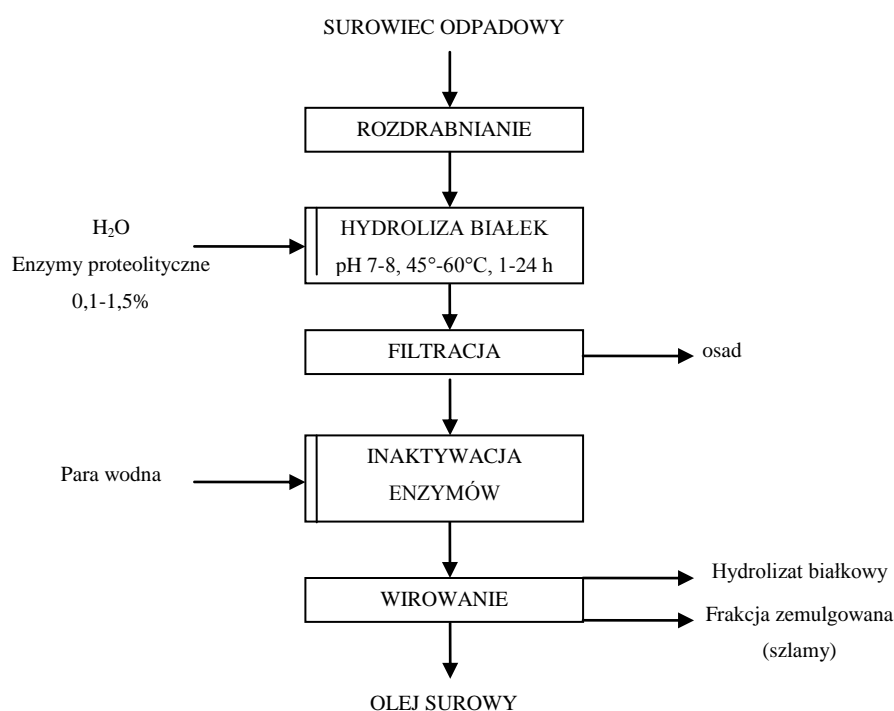
Z uwagi na konieczność prowadzenia ekstrakcji przy użyciu wysokiej klasy aparatury oraz niezbędne precyzyjne dopasowywanie parametrów do rodzaju surowca, SFE jest procesem skomplikowanym i kosztownym. Zasadniczym wymogiem, aby osiągnąć zadowalające wyniki odzysku, jest niska zawartość wody w surowcu, dlatego też musi być on przynajmniej częściowo liofilizowany. Olej otrzymany metodą SFE jest wyjątkowo czysty i wysokiej jakości, zawiera jednak mniej długołańcuchowych PUFA niż oleje otrzymywane w wyniku ekstrakcji Bligh-Dyera, gdyż część tych kwasów pozostaje w ekstrahowanym materiale. Ekstrakcja długołańcuchowych PUFA jest w tych warunkach mniej wydajna niż kwasów o krótszych łańcuchach (Esquivel i in. 1997). Poddając natomiast procesowi SFE nie surowiec, ale uprzednio wydzielony z niego inną metodą olej, można otrzymać koncentraty długołańcuchowych PUFA, które mogą być wykorzystane do suplementacji żywności.

1.2.2.5 Metody odzyskiwania oleju z użyciem enzymów proteolitycznych.

Brocklesby i Green już w latach 30tych ubiegłego stulecia zaproponowali enzymatyczną hydrolizę rozdrobnionego surowca w obecności pepsyny, a następnie trawienie alkaliczne. Zastosowana procedura minimalizowała ryzyko powstawania emulsji, kwaśne środowisko powodowało inaktywację lipaz. Wadą tej procedury, zwiększającą koszt

wydobycia oleju, była konieczność prowadzenia procesu w aparaturze ze stali kwasoodpornej oraz długi czas hydrolizy enzymatycznej.

Obecnie do uwalniania lipidów uwięzionych mechanicznie w sieci białek oraz związanych trwale w strukturze lipoprotein używane są proteazy, które działają aktywnie w środowisku o pH obojętnym i lekko zasadowym. Wykorzystując enzymy proteolityczne można otrzymywać olej w stosunkowo łagodnych warunkach temperaturowych (do 60°C). Ogólny schemat enzymatycznej metody wydobywania oleju przedstawiono na Rysunku 6.



Rysunek 6. Schemat wydobywania oleju z ryb z użyciem enzymów

W enzymatycznej metodzie wydobywania oleju otrzymuje się trzy frakcje: wodną, zemulgowaną (tzw. szlamy) i olejową. Faza olejowa zawiera głównie lipidy niepolarne - TAG. O wzajemnym stosunku tych frakcji i wydajności odzysku oleju w większej mierze decyduje dodatek wody na etapie hydrolizy niż rodzaj enzymu (Šližyte i in. 2005). Część lipidów jest zawarta także w fazie wodnej i szlamach, przy czym są to głównie lipidy polarne – fosfolipidy o właściwościach emulgujących. Przy pozyskiwaniu oleju z surowców odpadowych istotna jest ilość fosfolipidów przechodzących do fazy olejowej. Są one bogate w EPA i DHA, ale ich obecność może stwarzać duże problemy technologiczne podczas późniejszej rafinacji oleju. Fosfolipidy posiadają silne właściwości emulgujące, przez co utrudniają proces odkwaszania a w czasie odwaniania mogą stać się źródłem nieprzyjemnego

zapachu w wyniku reakcji z aminami. Ich cechą charakterystyczną jest wypadanie z warstwy olejowej pod wpływem wilgoci w postaci puszystego osadu. Pogarsza to nie tylko właściwości sensoryczne, ale stwarza również warunki do rozwoju mikroorganizmów.

Zawartość fosfolipidów w warstwie olejowej zależy od zastosowanego enzymu. W badaniach nad składem lipidów odzyskiwanych z głów łososia (*Salmo salar*) Gbogouri i in. (2006) zastosowali trzy komercyjnie dostępne enzymy firmy Novo-Nordisk. Przy użyciu Alcalase[®] polarne lipidy w dużym stopniu przeszły do warstwy olejowej i w szlamach pozostało ich tylko ok. 3%, natomiast przy zastosowaniu Neutrase[®] i Protamex[™] po ok. 6%.

Dzięki metodzie enzymatycznej uzyskuje się wydajność oleju wyższą niż w wytopie mokrym i niewiele niższą od wydajności uzyskiwanej w ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (Gbogouri i in. 2006, Mahmoud i in. 2008). Największy odzysk oleju z głów łososia zapewniał enzym Alcalase[®] (ok. 90%). W przypadku użycia Neutrase[®] i Protamex[™] wydajność była mniejsza (wynosiła około 68%), a duża część lipidów niepolarnych pozostała w szlamach w formie emulsji razem z polarnymi fosfolipidami i białkami. Również Dumay i in. (2006) stosując metodę enzymatyczną uzyskali większy odzysk oleju z wnętrzości sardynek niż w klasycznej ekstrakcji Folcha, bowiem hydroliza spowodowała łatwiejsze uwalnianie się lipidów z tkanek. Ekstrakcja enzymatyczna przebiega w łagodnych warunkach temperaturowych, dlatego też nie następuje zmniejszenie wydzielania tłuszczu spowodowane wiązaniem kropli oleju w zdenaturowanych łańcuchach białek (Chantachumi i in. 2000). Ponadto niska temperatura procesu hamuje przemiany oksydacyjne podczas wydzielania oleju.

1.2.3. Rafinacja oleju rybnego

Wydobyty olej surowy może charakteryzować się ciemną barwą oraz niepożądanym smakiem i zapachem. Jakość surowego oleju zależy nie tylko od wyboru metody jego wydobycia, ale też od szeregu czynników takich jak gatunek ryby i jej kondycja, wiek, pozycja w łańcuchu pokarmowym, a także od czasu i warunków przechowywania surowca oraz zawartości innych substancji towarzyszących TAG w tłuszczu. W Tabeli 3 zamieszczono orientacyjną charakterystykę surowego oleju rybnego.

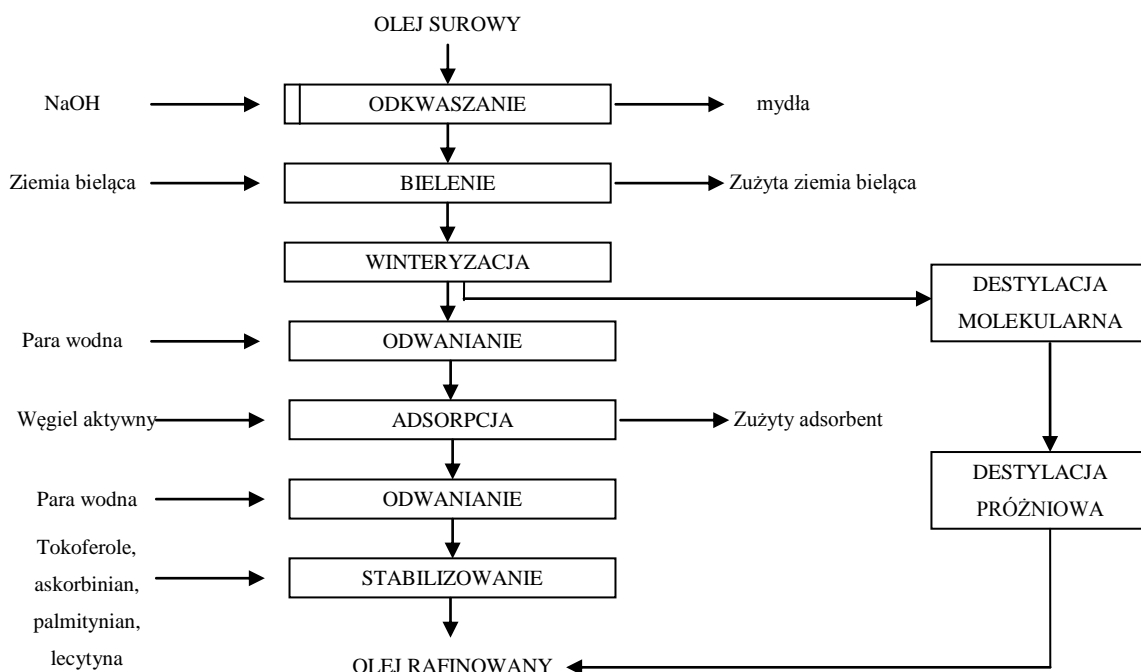
Zwykle olej surowy zawiera stosunkowo dużą ilość substancji nie będących TAG, m. in. cholesterol, tokoferole, barwniki, fosfolipidy, produkty przemian oksydacyjnych, wolne kwasy tłuszczowe, węglowodory aromatyczne, oraz inne zanieczyszczenia, w tym metale ciężkie i pozostałości pestycydów, które mogą wpływać negatywnie na jakość oleju.

Woda obecna w oleju sprzyja hydrolizie TAG, zaś obecność metali przyspiesza proces autooksydacji i tym samym prowadzi do obniżenia zawartości PUFA.

Tabela 3. Charakterystyka surowych olejów rybnych (Bimbo 1998)

Wskaźniki jakości	
Wilgoć i zanieczyszczenia [%]	0,5–1
WKT [%]	1–7, najczęściej 2–5
LOO [mEqO ₂ /kg]	3–20
Liczba anizydynowa	4–60
Totox	10–60
Liczba jodowa	115-200
Żelazo [g/l]	0,5-7,0x10 ⁻³
Miedź [g/l]	<0,3x10 ⁻³
Fosfor [g/l]	5-100x10 ⁻³

Barwniki mogą pogarszać barwę produktu, natomiast produkty utlenienia i hydrolizy są przyczyną nieprzyjemnego zapachu. Dlatego też większość niepożądanych związków usuwa się w procesie rafinacji oleju (Rysunek 7).



Rysunek 7. Rafinacja oleju rybnego (Newton 1996, Bimbo 1998)

W procesie odśluzowania usuwane są fosfolipidy oraz białka które przedostały się do oleju podczas jego otrzymywania. Pozostała część fosfolipidów wraz z barwnikami i WKT

jest usuwana podczas działania alkaliami w procesie odkwaszania. Olej przemywa się następnie wodą i suszy. Bielenie stosuje się celem usunięcia barwników obecnych w oleju, obniżenia zawartości metali ciężkich, związków siarki oraz pozostałych fosfolipidów. Zwykle stosuje się naturalne adsorbenty takie jak ziemie bielące i krzemionki lub syntetyczne: tlenek glinu, żele krzemionkowe, tlenek magnezu. Podczas winteryzacji (wymrażania) następuje oddzielenie wosków.

Specyficzny rybny zapach oleju jest wynikiem obecności produktów degradacji i oksydacji lipidów oraz produktów rozkładu białek i aminokwasów przez obecne w surowcu mikroorganizmy. W celu jego usunięcia stosuje się odwanianie oleju. Na skalę przemysłową wykorzystywana jest destylacja próżniowa z parą nasyconą w temperaturze 180-270°C. Wysoka temperatura prowadzenia procesu jest przyczyną przemian chemicznych lipidów, takich jak utlenianie, cyklizacja, polimeryzacja, izomeryzacja a także migracja nienasyconych wiązań. Reakcje te prowadzą do tworzenia polimerów i dimerów TAG, utlenionych TAG i produktów ich całkowitej i częściowej hydrolizy, monomerów cyklicznych oraz izomerów geometrycznych (Fournier 2006a, Fournier 2006b, Niewiadomski 1993). Proces odwaniania oleju rybnego przeznaczonego do celów spożywczych powinien być prowadzony w temperaturach zapewniających jak najmniejsze ubytki kwasów wielonienasyconych. Fournier i in. (2006a) wykazali, że w 180°C ubytek EPA i DHA wynosił tylko, odpowiednio, ok. 3% i 4%, podczas gdy w 250°C aż 85% i 89%. Straty można też znacznie ograniczyć stosując destylację próżniową w zakresie temperatur 60-100°C. Dodatkowe zastosowanie destylacji molekularnej pozwala na oddzielenie od oleju WKT, cholesterolu, i produktów utlenienia (Bimbo 1998). Prowadzenie procesu w takich warunkach zmniejsza nie tylko straty EPA i DHA, ale przynosi poprawę zapachu i stabilności oleju. Powstaje także mniej polimerów TAG, izomerów *trans* kwasów tłuszczowych oraz sprzężonych dienów (Chang i in. 1989)

Bardzo istotne jest usunięcie z oleju dioksyn oraz polichlorowanych bifenyli (PCB). Stosowane są dwie metody oczyszczania - odwanianie w wysokiej temperaturze lub adsorpcja na niepolarnych adsorbentach, takich jak np. węgiel aktywny. Adsorpcja, ze względu na łagodniejsze warunki temperaturowe, pozwala otrzymać olej o wyższej jakości. Prowadzenie procesu w temperaturze 65-75°C zapewnia pożądany spadek lepkości oleju, co gwarantuje wysoki stopień adsorpcji przy jednoczesnym zachowaniu stabilności oksydatywnej oczyszczanego oleju. Badania wykazały, że w próbkach oczyszczanych metodą adsorpcyjną zawartość EPA i DHA praktycznie nie ulega zmianie. W warunkach tych nie zachodzą przemiany oksydatywne, natomiast następuje odbarwienie oleju. Jest to spowodowane

zaadsorbowaniem na węglu aktywnym metali oraz witaminy A. Wadą tej metody jest usunięcie z oleju naturalnego retinolu oraz słabe powinowactwo adsorbentu do dioksynopodobnych PCB (Maes i in. 2005).

1.2.4. Modyfikacje oleju rybnego

Rafinowany olej rybny może być dalej wykorzystany do uzyskania różnego rodzaju preparatów o dużych zawartościach EPA i DHA, stosowanych jako suplementy diety. Za pomocą metod fizycznych, chemicznych lub enzymatycznych można oddzielić z olejów określone frakcje kwasów tłuszczowych.

W skali laboratoryjnej podejmowano różne próby otrzymywania koncentratów wolnych kwasów EPA i DHA oraz ich estrów przy pomocy technik chromatograficznych. Metodą tą udało się uzyskać koncentraty zawierające nawet 80-95% EPA+DHA, jednak nie jest możliwe jej przełożenie na skalę przemysłową.

Zastosowanie frakcjonowanej destylacji TAG w warunkach niskiego ciśnienia pozwala na około dwukrotne wzbogacenie koncentratu EPA i DHA. Nasycone kwasy tłuszczowe w niskich temperaturach krystalizują, podczas gdy PUFA pozostają w postaci ciekłej. Dobierając odpowiednio temperaturę oraz rodzaj rozpuszczalnika organicznego można wzbogacić olej w EPA i DHA. Zwykle metodą tą otrzymuje się olej rybny o nieco zwiększonej zawartości PUFA; określany jako olej zawierający 30% „EPA+DHA”.

Z uwagi na konieczność stosowania łatwopalnych i toksycznych rozpuszczalników organicznych, poszukuje się metod alternatywnych, które byłyby bardziej zbliżone do zasad „zielonej chemii” i jednocześnie pozwalały na osiągnięcie zadowalających wydajności reakcji (Hsieh i in. 2005, Riha i Brunner 2000).

Obiecującą techniką wytwarzania koncentratów EPA i DHA jest ekstrakcja estrów etylowych nadkrytycznym CO₂. Jego właściwości pozwalają na prowadzenie procesu w niskich temperaturach, co umożliwia ograniczenie postępu oksydacji. Ze względu na strukturę TAG, które zwykle mają jako podstawniki kwasy tłuszczowe o różnej długości łańcuchów, nie jest możliwe oddzielenie konkretnie EPA i DHA. W związku z tym TAG poddaje się hydrolizie, a następnie uwolnione kwasy tłuszczowe - derywatyzuje do formy estrów etylowych kwasów tłuszczowych (Hsieh i in. 2005). Estry te są lepiej rozpuszczalne w ciekłym CO₂, niż kwasy tłuszczowe (Riha i Brunner 2000). Metoda otrzymywania koncentratów EPA i DHA opiera się na wykorzystaniu różnicy rozpuszczalności w nadkrytycznym CO₂ składników o małej masie cząsteczkowej (estrów kwasów tłuszczowych

zawierających od 14 do 18 atomów węgla w łańcuchu) i estrów kwasów tłuszczowych dwudziesto- i dwudziestodwuwęglowych, o dużej masie cząsteczkowej. W ekstrakcji łatwiej rozpuszczają się estry kwasów tłuszczowych o mniejszej liczbie atomów węgla w łańcuchu i są one usuwane, zaś pozostałość po ekstrakcji jest tym samym bogatsza w estry EPA i DHA (Hsieh i in. 2005).

Inną metodą otrzymywania koncentratów EPA i DHA jest kompleksowanie z mocznikiem. Aby otrzymać koncentraty w ten sposób również konieczne jest poddanie TAG hydrolizie. Niekiedy hydrolizie towarzyszy również wytwarzanie estrów etylowych. Mocznik posiada zdolność kompleksowania prostolańcuchowych związków organicznych. W obecności cząsteczek o długich łańcuchach węglowodorowych mocznik krystalizuje w postaci heksagonalnych struktur z długim kanałem wewnątrz. Nasycone kwasy tłuszczowe jak również ich estry, mogą wnikać w te kanały i tworzą w ten sposób addukty. W przypadku PUFA ich rozmiary nie pozwalają na wnikanie w kryształy mocznika. Ponieważ addukty z mocznikiem są trwałe, łatwo można je oddzielić od reszty oleju (Riha i Brunner 2000). Stopień koncentracji EPA i DHA zależy od temperatury, rodzaju rozpuszczalnika, stężenia mocznika oraz od tego, czy rozdziela się wolne kwasy tłuszczowe czy też ich estry. W Japonii produkowany jest w ten sposób od lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku koncentrat z oleju sardyny.

Tabela 4. Skład kwasów tłuszczowych oleju z tuńczyka kolejno po estryfikacji, po strącaniu mocznikiem i ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ (Hsieh i in. 2005)

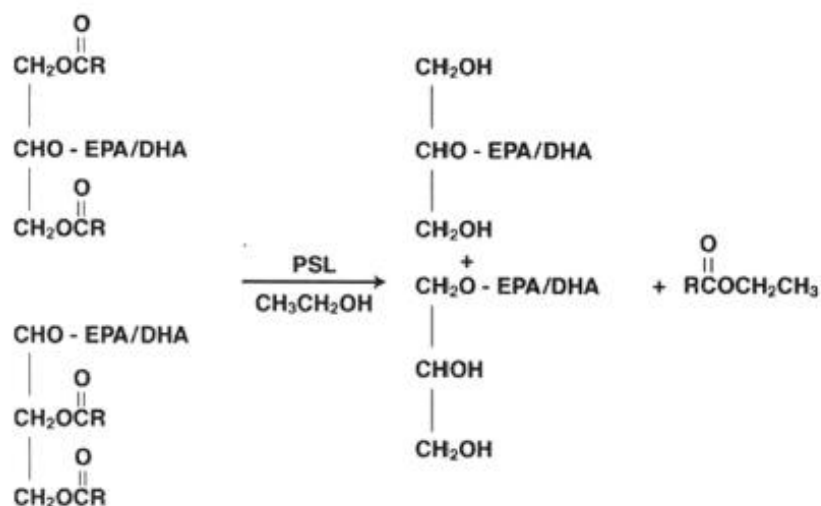
Kwas tłuszczowy	Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych w oleju [%]		
	po estryfikacji	po strącaniu mocznikiem	po ekstrakcji nadkrytycznym CO ₂
14:0	5,1	3,3	Nie wykryto
16:0	28,3	9,2	0,1
16:1	6,2	2,8	0,1
18:0	5,3	6,1	3,7
18:1	21,2	17,5	4,3
18:2 <i>n</i> -6	4,8	6,5	12,9
18:3 <i>n</i> -3	10,8	12,9	17,4
20:5 <i>n</i> -3	3,7	6,8	8,2
22:6 <i>n</i> -3	9,2	30,6	46,2
inne	5,3	5,1	6,2

Połączenie techniki wytwarzania kompleksów z mocznikiem po estryfikacji a następnie zastosowanie SFE pozwala na uzyskanie koncentratów o jeszcze wyższym stężeniu

PUFA (Tabela 4). Według Hsieh i in. (2005), odpowiednia optymalizacja warunków procesu SFE pozwala na uzyskanie koncentratów estrów kwasów tłuszczowych z rodziny *n*-3 na poziomie nawet 71%.

Z drugiej strony, zasadność wytwarzania koncentratów estrów PUFA jest dyskusyjna, bowiem według niektórych autorów EPA i DHA efektywniej przedostają się do krwiobiegu wbudowane w strukturę acylogliceroli niż w postaci estrów etylowych (Lawson i Hughes 1988). Tezę tę potwierdzają również wyniki badań Maki i in (2003).

W enzymatycznym procesie wytwarzania koncentratów EPA i DHA wykorzystuje się enzymy lipolityczne. Lipazy pochodzenia mikrobiologicznego posiadają liczne zalety, takie jak wysoka wydajność katalityczna a także duża selektywność. Enzymy działają w łagodnych warunkach temperatury, pH i ciśnienia, dzięki czemu reakcje przez nie katalizowane są zachowawcze dla wrażliwych na utlenianie i degradację PUFA. Ze względów ekonomicznych opłacalne jest prowadzenie procesu przy wykorzystaniu enzymów immobilizowanych (Haraldsson i in. 1997). Celem pozyskania preparatu o zwiększonej zawartości EPA i DHA, stosuje się enzymy o wysokim powinowactwie do wiązań estrowych w TAG tworzonych przez nasycone i jednonienasycone kwasy tłuszczowe, a niskim w stosunku do PUFA i charakteryzujące się minimalnym stopniem dyskryminacji pomiędzy EPA i DHA. Stwierdzono, że takie właściwości wykazuje m.in. lipaza PSL wyizolowana z bakterii *Pseudomonas* (Haraldsson i in. 1997). W temperaturze pokojowej i w obecności stechiometrycznych ilości etanolu przeprowadza następującą reakcję:



Dzięki temu, że lipazy te uwalniają z TAG nasycone i monoenoowe kwasy tłuszczowe, można je oddzielić, a przez to wzbogacić olej w EPA i DHA. Rice i in. (1999) opracowali optymalne warunki otrzymywania monoacylogliceroli (MAG) i diacylogliceroli (DAG)

zawierających w strukturze EPA i DHA za pomocą hydrolizy TAG z oleju z menhadena przez lipazę z *Candida cylindracea*. Enzym ten charakteryzuje się selektywnością w stosunku do wiązań estrowych i wykazuje największe powinowactwo do następujących kwasów (w malejącym porządku): C16:1, C16:0, C18:1, C14:0, C18:0. Po enzymatycznej lipolizie oleju rybnego otrzymano mieszaninę TAG o podwyższonej zawartości długołańcuchowych PUFA. Produkt oczyszczano na drodze winteryzacji, gdzie poprzez wymrażanie w temperaturze -20°C przez 12 godzin i oddzielenie frakcji stałej przez wirowanie lub filtrację, usunięto z mieszaniny nasycone kwasy tłuszczowe C14:0, C16:0 i C18:0. Pozostałe nasycone i jednonienasycone kwasy tłuszczowe oddzielono stosując frakcjonowane strącanie za pomocą mocznika.

1.2.5. Przemiany lipidów ryb w trakcie przechowywania surowca i oleju i możliwości ich ograniczania

Ze względu na obecność endogennych enzymów w skórkach i pozostałych na nich resztkach mięsa, jak również enzymów pochodzenia mikrobiologicznego, które katalizują niekorzystne przemiany lipidów i przyspieszają znacząco utlenianie i hydrolizę, ważne jest postępowanie z surowcem przeznaczonym do wytwarzania oleju. Aby otrzymać olej wysokiej jakości, konieczne jest, aby surowiec był świeży i nie nastąpił w nim rozkład PUFA. Szczególnie istotny jest sposób przechowywania surowca, oraz odpowiednio szybkie jego wykorzystanie, bowiem wiele szczepów psychrofilnych bakterii bytujących w rybach wytwarza aktywne enzymy lipolityczne. Enzymy te wykazują swoje właściwości nawet w warunkach chłodniczych, a wolne kwasy tłuszczowe obecne w surowcu pogarszają jego jakość, ponieważ hydroliza TAG stymuluje procesy utleniania lipidów. Wyjątkowo łatwo utleniają się lipidy zawarte w podskórnej tkance mięśniowej, której duże fragmenty zawierają skóry pochodzące z mechanicznego odskórzania ryb, oraz w samej skórze na skutek działania tlenu atmosferycznego oraz lipooksygenaz. Podatność na autooksydację zależy też od zawartości związków hematinowych w mięsie. Powodują one rozkład nadtlenków i wodoronadtlenków z wytworzeniem wolnych rodników, co inicjuje kolejne reakcje oksydacji. Pod wpływem produktów utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych zachodzą przemiany barwników karotenoidowych, skutkujące utratą charakterystycznej barwy przez mięso i olej z łososia. Oprócz obecności drobnoustrojów w surowcu innymi ważnymi czynnikami przyspieszającymi oksydację lipidów są temperatura oraz to, w jakiej formie jest on przechowywany. Rozdrobnienie materiału skutkuje lepszą dostępnością tlenu i

częściowym uwolnieniem oleju, przez co może on utleniać się znacznie szybciej niż w surowcu przechowywanym w całości.

Technologia wysokich ciśnień jest stosowana na skalę przemysłową w wielu krajach jako metoda utrwalania żywności. Metoda ta prowadzi do redukcji liczby drobnoustrojów i inaktywacji enzymów, co w efekcie zapobiega psuciu się i degradacji żywności. Wydaje się, że te właściwości wysokich ciśnień mogłyby zostać wykorzystane do utrwalania surowca do wytwarzania oleju rybnego, ponieważ to właśnie endogenne enzymy i mikroflora powodują niekorzystne przemiany lipolityczne i przyspieszają proces oksydacji, co obniża jakość oleju i powoduje utratę wartościowych PUFA. Jednakże wysokie ciśnienie może być, obok podwyższonej temperatury czy obecności katalizatorów (np. jonów metali), jednym z czynników wpływających na stopień przemian oksydacyjnych lipidów.

Według Tanaka i in. (1991) znacznie wolniej utleniają się lipidy ciśnieniowane bez obecności tkanki mięśniowej. Oznacza to, że dzięki ciśnieniu można spowolnić procesy oksydacyjne w gotowym, wydzielonym z surowca oleju z lepszym skutkiem, niż w przypadku mięsa. Ma to znaczenie zwłaszcza, gdy izolowany z odpadów olej rybny miałby być dodawany do żywności utrwalanej za pomocą techniki wysokociśnieniowej. Według Severini i in. (1999) wysokie ciśnienie nie powodowało znacznego przyrostu nadtlenków w oliwie z oliwek i niektórych olejach roślinnych, nawet po roku ich przechowywania w temperaturze 18°C. Wpływ ciśnieniowania oleju na jego jakość zależy od takich czynników jak jego pochodzenie, skład, wyjściowa jakość i stopień oksydacji. Dlatego też nie można, na podstawie dostępnego piśmiennictwa, dotyczącego głównie ciśnieniowania mięsa lub olejów roślinnych, ocenić jaki wpływ będzie miało działanie wysokim ciśnieniem na stabilność nierafinowanego oleju otrzymywanego z odpadów przemysłu rybnego.

Olej surowy, wyizolowany z surowca, ze względu na dużą zawartość PUFA charakteryzuje się małą stabilnością oksydacyjną, dlatego też, obok odpowiednio przeprowadzonej rafinacji, konieczne jest stosowanie dodatków zapobiegających utlenianiu. W lipidach ryb dominuje naturalny przeciwutleniacz: α - tokoferol (200 – 300 $\mu\text{g/g}$ oleju) (Kamal-Eldin i in. 2002, Kulås i Ackman 2001a, Kulås i in. 2002, Drusch i in. 2008). Przynajmniej lepiej niż inne tokoferole wbudowuje się on w strukturę błon komórkowych (Kulås i Ackman 2001b). Zawartość tokoferolu zmniejsza się znacząco w procesie rafinacji, można go natomiast uzupełniać przez dodatek syntetycznego tokoferolu do rafinowanego oleju. Należy jednak mieć na uwadze, że tokoferole po przekroczeniu krytycznego stężenia w układzie mają działanie prooksydacyjne. Dlatego też w przemyśle stosuje się jednocześnie dodatek substancji efektywnie współdziałających z tokoferolami, takich jak kwas

askorbinowy oraz lecytyna. Askorbiniany posiadają zdolność redukcji rodnika tokoferolowego do tokoferolu. W przypadku lecytyny proponowanych jest kilka mechanizmów działania. Powoduje ona m. in. „zmiatanie” tlenu singletowego, regenerację α -tokoferolu z α -tokoferylochinonu, chelatowanie jonów metali oraz tworzenie odwrotnych miceli. Różnorodność możliwych oddziaływań lecytyny wynika z faktu, że jest ona mieszaniną różnych fosfolipidów. Fosfatydyloetanolamina posiadająca w swojej strukturze aminę I-rzędową działa jako „zmiatacz” tlenu singletowego, natomiast zdolność chelatowania metali przypisuje się raczej fosfatydyloinozytolowi i innym fosfolipidom zawierającym reszty kwaśne (Drusch 2008).

Współcześnie użycie przeciwutleniaczy wyłącznie syntetycznych takich jak: butylohydroksytoluen (BHT), butylohydroksyanizol (TBHQ), t-butylohydroksychinon (BHA) zmniejsza się na rzecz antyoksydantów naturalnych. Budzą one zaufanie wśród konsumentów ze względu na swoje naturalne pochodzenie, jak również pozytywnie wpływają na organizm człowieka. Stosowanie mieszanek przeciwutleniaczy naturalnych i syntetycznych może dać pozytywny synergistyczny efekt (Horn i in. 2009; Frankel i in. 1996). Głównymi źródłami naturalnych substancji o charakterze przeciwutleniającym są zioła i rośliny przyprawowe m.in. rozmaryn, szalwia, oregano, tymianek, mięta, melisa czy imbir. Jedną z najpopularniejszych roślin stosowanych jako przeciwutleniacz jest rozmaryn (*Rosmarinus officinalis*), (Samotyja i Urbanowicz 2005). Właściwości przeciwutleniające rozmarynu wynikają z obecności w jego składzie związków takich jak karnozol, kwas karnozynowy czy kwas rozmarynowy, które posiadają aktywność przeciwutleniającą (Erkan i in. 2008). Rozmaryn jest przeciwutleniaczem stosowanym głównie w przemyśle mięsnym w postaci ekstraktów wodnych. Warto jednak rozważyć wykorzystanie go w technologii tłuszczów jadalnych, a zwłaszcza olejów rybnych.

1.3. KAPSULKOWANIE OLEJU RYBNEGO.

Olej rybny, który przeznaczony ma być do spożycia jako środek terapeutyczny lub suplement diety wymaga nadania mu odpowiedniej formy handlowej, zapewniającej stabilność produktu, ograniczenie wpływu czynników zewnętrznych oraz akceptowalnej i wygodnej dla konsumenta. Funkcję tę spełniają różnego rodzaju kapsułki, w których zamyka się olej. Ich niewątpliwą zaletą jest też zdolność do maskowania niepożądanego zapachu i smaku zamkniętych w nich substancji, a także wygoda dozowania do spożycia. Kapsułki,

które są wykorzystywane do przechowywania oleju wytwarzane są najczęściej z żelatyny, skrobi oraz innych polimerów naturalnych.

1.3.1. Kapsułki żelatynowe

Obecnie najczęściej wytwarzane są kapsułki żelatynowe. Ich produkcję rozpoczęto już w roku 1834. Rozróżnia się dwa typy kapsułek żelatynowych – twarde oraz miękkie (Rysunek 8).

a) kapsułki miękkie



b) kapsułki twarde



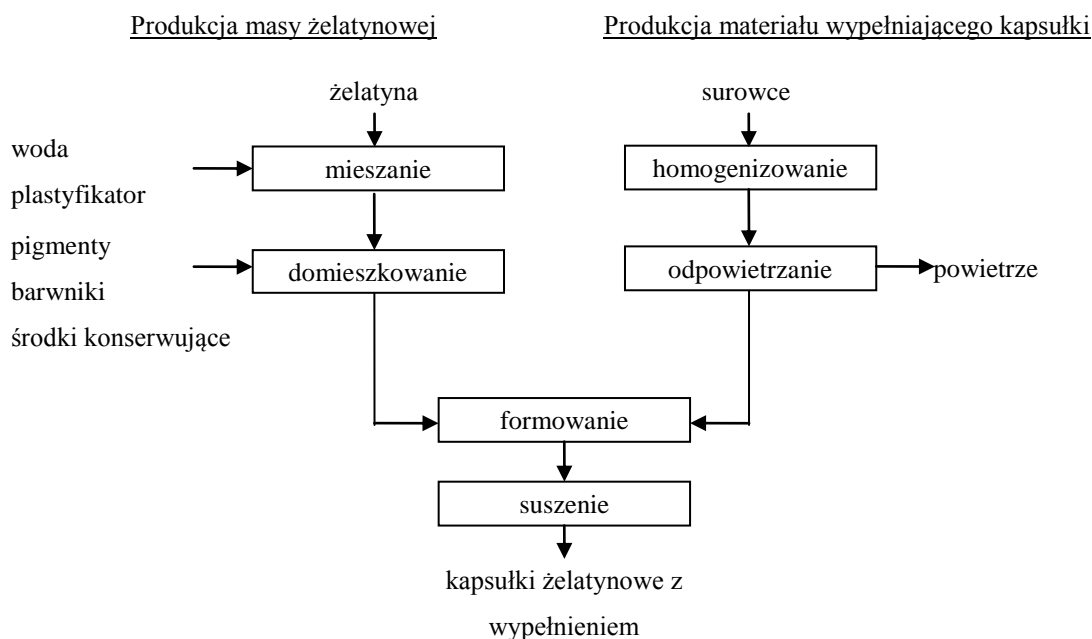
Rysunek 8. Rodzaje kapsułek żelatynowych

Kapsułki żelatynowe są szeroko rozpowszechnioną formą podania leków. Można w nich przechowywać substancje czynne, zabezpieczając je przed działaniem światła i tlenu z powietrza. Nazwa tych kapsułek wynika z faktu, że kapsułki miękkie zawierają dodatek substancji zmiękczających – plastyfikatorów. Ich właściwości mechaniczne zależą od ilości i rodzaju plastyfikatora, a także od takich czynników jak higroskopijność materiału, grubość samej powłoki oraz wilgotność środowiska. Dodatek plastyfikatora jest konieczny, aby zapobiec kruszeniu się gotowych kapsułek.

Miękkie kapsułki żelatynowe wytwarza się, formuje i napełnia w jednym, ciągłym procesie. Posiadają one większą grubość ścianek (ok. 300-400 μm) niż kapsułki twarde (ok. 100 μm). Stosuje się je do pakowania substancji hydrofobowych - różnego rodzaju olejów i substancji zawieszonych w olejach. Charakteryzują się one dużą trwałością i wytrzymałością mechaniczną, stanowią dobre, fizjologicznie obojętne zabezpieczenie substancji leczniczych i umożliwiają precyzyjne dawkowanie ciekłych i mazistych preparatów (Janicki 2003). Produkcja miękkich kapsułek żelatynowych rozpoczyna się od wytworzenia masy żelatynowej na powłokę kapsułki, składającej się głównie z wody (30-35%), żelatyny (40-48%) i substancji zmiękczającej (20-30%) o odpowiedniej czystości i jakości. Uzyskana masa ma postać ciekłą w ok. 60°C. Istotne są właściwości używanej żelatyny, zwłaszcza lepkość

roztworu i twardość formowanych żeli. Najczęściej do wytwarzania miękkich kapsułek stosowana jest żelatyna bydlęca lub świńska w zakresie 150-210° Bloom (Babel 1999).

Podczas całego procesu lepkość roztworu żelatyny musi być stabilna, a maksymalne odchylenie może wynosić 10-20%, ponieważ jest to podstawa do uzyskania stałej grubości kapsułek. Do otrzymywania masy żelatynowej stosowane są dwie metody, tzw. Cold i Hot Melt. Pierwsza z nich polega na poddaniu żelatyny o czystości farmaceutycznej pęcznieniu w mieszaninie zimnej wody i plastyfikatora, a następnie ostrożnemu rozpuszczaniu w temperaturze 60-70°C. W drugiej metodzie żelatyna jest wprowadzana do gorącego (60-80°C) roztworu wody i plastyfikatora. W obydwu metodach roztwór jest łagodnie mieszany pod próżnią, w celu usunięcia piany i pęcherzy powietrza, tworzących się w procesie pęcznienia i rozpuszczania żelatyny. W kolejnych etapach do powstałej masy mogą być dodawane barwniki lub substancje plastyfikujące. Zwykle jako plastyfikator w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym stosowany jest glicerol lub sorbitol (Coppola i in. 2008). Glicerol jest bardziej higroskopijny od sorbitolu i jest znacznie lepszym plastyfikatorem; mała higroskopijność sorbitolu może powodować kruchość powierzchni kapsułki (Babel 1999). Wypełnienie miękkiej kapsułki żelatynowej powinno być obojętne dla powłoki, nie może powodować jej rozpuszczania. Schematyczny przebieg produkcji miękkich kapsułek żelatynowych przedstawiono na Rysunku 9.



Rysunek 9. Wytwarzanie miękkich kapsułek żelatynowych

Ciekła masa żelatynowa rozprowadzana jest na bębnach suszących zaopatrzonych w półkoliste wgłębienia i formowana w dwa elastyczne pasy. Bębny suszące są chłodzone do około 20 °C (w ten sposób na ich powierzchni powstaje film żelatynowy). W utworzone wgniecenia w pasach żelatyny dozuje się substancję tworzącą wypełnienie, a następnie wytlacza i zamyka gotowe kapsułki. Powszechnie stosowane jest urządzenie Rotary Dye o wydajności 10-100 tys. kapsulek na godzinę. Wilgotne kapsułki są myte i kierowane do bębnów suszących. W ciągu pierwszych dwóch godzin tracą około połowy wilgotności z powłoki, a ostateczną wilgotność (ok. 7-8%) uzyskuje się w ciągu następnych 3-8 godzin w suszarni powietrznej. Gotowe kapsułki z zamkniętym wewnątrz wypełnieniem, zgodnie z zapotrzebowaniem, mogą być powlekane specjalną powłoką odporną na kwasy żołądkowe lub mogą być na nie nanoszone nadruki. Pojemność jednej miękkiej kapsułki wynosi od 60 µl do 3,6 ml (Babel 1999, Janicki i in. 2003). Twarde kapsułki żelatynowe stosuje się zwykle do pakowania substancji stałych, np. leków w formie proszków. Nadają się one również do substancji ciekłych, a z uwagi na to, że zapewniają dużą stabilność oksydacyjną pakowanym w nie preparatom, rozważa się możliwość wykorzystania ich do kapsułkowania olejów. Do produkcji kapsulek twardych stosowana jest żelatyna o wyższych °Bloom, niż do produkcji kapsulek miękkich (220-260°Bloom). Wytrzymują one bardziej radykalne warunki w procesie wytwarzania niż kapsułki miękkie (Coppola i in. 2008).

Twarde kapsułki żelatynowe wytwarza się zanurzając w roztworze żelatyny o temperaturze 45-50°C formy w postaci dwóch rzędów polerowanych kołków stalowych. Dzięki schłodzeniu form i wprawieniu ich w ruch obrotowy, roztwór żeluje i wytwarza się na nich jednolita powierzchnia przylegającej żelatyny. Kołki z zastygniętą żelatyną są następnie suszone powietrzem (ok. 25°C) do wilgotności ok. 15-16%, zdejmowane z kołków, odpowiednio przycinane i zamykane.

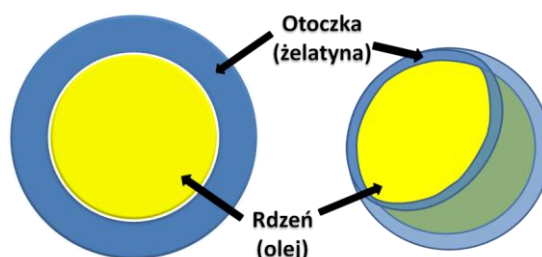
Wypełnianie kapsulek następuje zwykle u producenta gotowego leku, za pomocą odpowiednich maszyn i dopiero wtedy są trwale zamykane. W zależności od potrzeby mogą być także zaopatrzone w nadruk na powierzchni (Babel 1999).

Kapsułki twarde mogą też być wytwarzane z innych substancji niż żelatyna, np. polimerów, takich jak: hydroksypropyloceluloza lub hydroksypropylometyloceluloza lub pullulan (polisacharyd zbudowany z jednostek maltotriozy produkowany ze skrobii pozakomórkowo przez grzyb *Aureobasidium pullulans*).

Substancje mogące zastąpić żelatynę są szczególnie ważne, np. dla wegetarian (Nawrocki 2009).

1.3.2. Mikrokapsułkowanie

Mikrokapsułkowanie polega na powlekanii cząstek substancji aktywnej, stanowiącej rdzeń mikrokapsułki otoczkami, utworzonymi z jednej lub kilku substancji okrywających (Rysunek 10).



Rysunek 10. Schemat budowy mikrokapsułki żelatynowej z olejem

Mikrokapsułkowanie niesie za sobą szereg korzyści, m. in. maskowanie smaku i zapachu substancji stanowiącej rdzeń a także ułatwia przechowywanie i dozowanie ciekłych składników dzięki nadaniu im wygodnej, formy proszku. Przeciętna wielkość mikrokapsulek wynosi 100 - 500 μm ; kapsułki o rozmiarach powyżej 5000 μm nazywa się makrokapsułkami, a o rozmiarach poniżej 0,2 μm - nanokapsułkami. Kształt mikrokapsulek zależy od metody wytwarzania i użytych do tego celu materiałów. Rdzeń może stanowić od 10 do 90% ogólnej masy mikrokapsułki, przy czym może to być pojedyncza substancja lub mieszanina w postaci stałej lub ciekłej. Ponieważ mikrokapsułki stosowane są do wzbogacania w dodatkowe składniki szerokiej gamy produktów żywnościowych, takich jak zupy instant, budynie, mieszanki mleczne dla niemowląt, kaszki dla dzieci, puree ziemniaczane, kisiel, mleko w proszku czy kakao rozpuszczalne, wymaga to dostosowywania ich właściwości do spełniania żądanych funkcji. Mikrokapsułkowanie jest dobrą metodą utrwalania, zwłaszcza w przypadku substancji łatwo ulegających degradacji i niekorzystnym przemianom pod wpływem czynników zewnętrznych (np. dostępu światła czy tlenu), np. olejów. Rdzeń mikrokapsułki stanowią mikroskopijne krople oleju, który opłaszczony jest substancjami tworzącymi ścianki. Dodatkowo, dzięki mikrokapsułkowaniu ciekły olej przeprowadzany jest w formę „sproszkowaną”, co umożliwia jego zastosowanie do wzbogacania produktów żywnościowych typu instant i pieczywa. Stabilność produktu zależy od rodzaju i zawartości procentowej mikrokapsułkowanego oleju oraz od rodzaju materiału tworzącego ścianki a także od warunków tworzenia emulsji i suszenia. Tłuszcze stałe łatwiej poddać mikrokapsułkowaniu, w celu uzyskania proszku o dużej zawartości tłuszczu, niż oleje (Rusli i in. 2006).

1.3.3. Metody wytwarzania mikrokapsulek.

Istnieją różne metody mikrokapsułkowania. Najpopularniejsze i najczęściej stosowane jest sporządzenie emulsji z substancji mającej stanowić rdzeń i roztworu materiału, z którego mają powstać ścianki i następnie suszenie powstałej mieszaniny, zazwyczaj rozpyłowe lub sublimacyjne (Hogan i in. 2003, Keogh i in. 2001, Schrooyen i in. 2001). Metoda ta może być wykorzystana do produkcji mikrokapsulek z otoczkami białkowymi, sacharydowymi i białkowo-sacharydowymi (Heinzelmann i in. 2000a). Do wytworzenia mieszaniny stosuje się zazwyczaj homogenizację lub ultradźwięki (Klaypradit i Huang 2008). Obie fazy należy dobrać w taki sposób, by w niewielkim stopniu wykazywały wzajemne powinowactwo. W przypadku mikrokapsułkowania olejów stworzenie stabilnej emulsji typu O/W gwarantuje dobrą wydajność kapsułkowania. Formowanie mikrocząstek następuje w trakcie usuwania rozpuszczalnika. Problemem jest eliminacja całości rozpuszczalnika z powierzchni mikrokapsulek.

Podczas suszenia rozpyłowego mieszanina rdzenia i substancji tworzącej otoczkę jest podawana specjalną dyszą natryskową w strumień gazu suszącego. Powstające cząstki mają wielkość kilku mikrometrów a na ich rozmiar wpływa prędkość strumienia gazu, średnica dyszy oraz stosunek zawartości rdzenia do otoczki. Mikrokapsułkowanie poprzez suszenie rozpyłowe nie jest skuteczną metodą utrwalania bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe olejów rybnych. Wysoka temperatura panująca w komorze suszarki podczas suszenia, dochodząca do 200°C (Janiszewska i in. 2010), może sprzyjać oksydacji i rozpadowi PUFA, a także wytworzeniu szkodliwych dla zdrowia wtórnych produktów reakcji utleniania. Ponadto, część materiału rdzenia może przylegać do powierzchni wytwarzanych mikrokapsulek i tam się utleniać, zaś same kapsułki ulegają często uszkodzeniom (Ashady 1993, Janiszewska i in. 2010). Jakość otrzymanych produktów można polepszyć przez dodanie plastyfikatora umożliwiającego powstanie otoczki o gładziej i bardziej jednolitej powierzchni (Chowdary i Rao 2004). Dowiedziono także, że już na etapie przygotowywania emulsji, kontakt z powietrzem inicjuje zmiany oksydacyjne w oleju, które następnie są potęgowane w procesie suszenia rozpyłowego (Jacobsen 1999, Heinzelman i in. 2000a).

Suszenie sublimacyjne minimalizuje niekorzystne przemiany rdzenia, które mogą wystąpić w wyniku działania wysokiej temperatury podczas suszenia rozpyłowego (Anwar i Kunz 2011). Polega na odparowaniu rozpuszczalnika ze struktury suszonego materiału na skutek przemian fazowych. W celu odparowania rozpuszczalnika z powierzchni mikrokapsulek należy najpierw zamrozić emulsję materiału otoczki i rdzenia. Głównymi

zaletami tej metody jest niska temperatura suszenia oraz ograniczenie dostępu powietrza, zapobiegające pogorszeniu jakości produktu na skutek utleniania. Dlatego też, celowe wydaje się zbadanie możliwości wykorzystania suszenia sublimacyjnego do wytwarzania mikrokapsulek zawierających bogaty w PUFA olej z łososia. Wadą metody jest skomplikowana aparatura, stosunkowo długi proces suszenia i wysokie zapotrzebowanie energetyczne. Efektywność procesu zależy od intensywności odprowadzenia odparowanej wilgoci z materiału, wielkości próżni w komorze sublimacyjnej oraz ciśnienia cząstkowego pary nad produktem, a także od jego fizykochemicznych właściwości. Metoda ta była już wykorzystywana do mikrokapsułkowania różnych dodatków do żywności, np. aromatów oraz pigmentów. Heinzelmann i in. (2000a i b, 1999) z powodzeniem wykorzystali ją do wytwarzania mikrokapsulek polisacharydowych zawierających olej z menhadena i sardeli. Głównym problemem związanym z wykorzystaniem suszenia sublimacyjnego do mikrokapsułkowania jest porowata i nieregularna struktura powłok otrzymywanych cząstek, która w efekcie nie zapewnia dostatecznej bariery przed dostępem tlenu.

Oprócz rozpyłowego i sublimacyjnego suszenia emulsji stosuje się także mikrokapsułkowanie fluidyzacyjne, koacerwacyjne, ekstruzyjne, jak również przy użyciu liposomów i cyklodekstryn. Metoda fluidyzacyjna pozwala również na wytwarzanie mikrokapsulek w niskich temperaturach. Materiał stanowiący otoczkę musi charakteryzować się odpowiednią lepkością i wykazywać zdolność do tworzenia cienkiego filmu, dlatego też najczęściej wykorzystuje się pochodne celulozy, dekstryny, gumy roślinne a także np. woski (Zuidam i Shimoni 2010). Ponadto z uwagi na specyfikę samego procesu, cząstki substancji stanowiącej rdzeń muszą być praktycznie idealnie kuliste i o określonych rozmiarach, zbyt drobne bowiem mogą stwarzać ryzyko akumulacji na wkładach filtracyjnych i obniżać wydajność i efektywność fluidyzacji (Zuidam i Shimoni 2010, Turchiuli i in. 2005). Przykładem substancji mikrokapsułkowanych z powodzeniem przy użyciu tej metody są m.in. kwas mlekowy i sorbowy, witamina C, aspartam oraz wodorowęglan sodu (Gibbs i in. 1999). Anwar i Kunz (2011) wykazali, że mikrokapsułki zawierające olej rybny, utworzone metodą fluidyzacyjną miały wyższą termostabilność niż te otrzymane na drodze suszenia sublimacyjnego i rozpyłowego.

Metoda koacerwacyjna wykorzystuje zjawisko rozdziału faz pod wpływem zmiany warunków środowiska reakcji (temperatura, pH, stężenie poszczególnych polimerów, stężenie soli), co prowadzi do powstania otoczki polimerowej zamykającej rdzeń. Koacerwacja może zachodzić w środowisku wodnym lub bezwodnym, a zamykana substancja nie powinna mieszać się z rozpuszczalnikiem (Szymańska i Winnicka 2009). Proces może przebiegać z

udziałem dwóch lub większej liczby polimerów, np. chitozanu i alginianu sodu, strącanych z roztworu pod wpływem chlorku wapnia. Mikrokapsułki utworzone na drodze koacerwacji są nierozpuszczalne w wodzie nawet w podwyższonej temperaturze. Posiadają także dobrą zdolność do kontrolowanego uwalniania rdzenia. Szybkość uwalniania zależy od rodzaju rdzenia, wielkości cząstek, stopnia usieciowania otoczki i jej struktury (Dong i in. 2011).

W mikrokapsułkowaniu ekstruzyjnym mikrokapsułki formowane są w wyniku przeciskania (np. przez igłę) emulsji wprost do naczynia z czynnikiem sieciującym. Najczęściej stosowanymi polimerami w tej metodzie są: sacharoza, maltodekstryny i syrop glukozowy. Ze względu na łagodny przebieg reakcji (brak lotnych rozpuszczalników i działania wysokiej temperatury), umożliwia ona zamykanie wrażliwych substancji. Otrzymane metodą ekstruzji mikrokapsułki są stosunkowo dużych rozmiarów (>0,5 mm) (Szymańska i Winnicka 2009). Nową odmianą ekstruzji jest ekstruzja elektrostatyczna. W metodzie tej wykorzystuje się siły elektrostatyczne do zakłócenia ciągłości strumienia emulsji wypływającego z kapilary. Strumień zostaje podzielony na jednakowe, drobne krople. Zaletą tej metody jest zmniejszenie rozmiaru powstających mikrokapsulek, przez co ogranicza się ich negatywny wpływ na teksturę wzbogacanego produktu spożywczego. Wielkość powstających cząstek jest funkcją składową takich czynników jak szybkość przepływu cieczy, stopnia rozbicia kropeł na mniejsze na wylocie kapilary i właściwości polimeru (Manojlovic i in. 2008).

Technikę wytwarzania mikrokapsulek dobiera się w zależności od rodzaju materiału okrywającego.

1.3.4. Składniki otoczek mikrokapsulek

Ilość naturalnych polimerów jakie mogą zostać wykorzystane jako ich otoczki (białka, polisacharydy, żywice, gumy, celuloza), daje ogromną liczbę możliwości wytwarzania mikrokapsulek (Korus i in. 1997). Każda z wymienionych grup polimerów posiada określone wady i zalety determinujące właściwości otrzymywanych mikrokapsulek, dlatego też w praktyce często stosuje się ich mieszaniny. W wyborze materiału otaczającego bierze się zazwyczaj pod uwagę wiele czynników, takich jak oczekiwane właściwości gotowego produktu, efektywność mikrokapsułkowania, czynniki ekonomiczne jak również fakt, czy dany składnik został zatwierdzony przez FDA (USA) lub EFSA (Europa) do użycia w żywności (Amrita i in. 1999). Wymagane jest, aby materiał stanowiący otoczkę chronił wewnątrz kapsułki w maksymalnym stopniu przed czynnikami zewnętrznymi, nie reagował z

rdzeniem mikroksułka ani z innymi składnikami żywności, a jednocześnie był wygodny w zastosowaniu. Pożąpane cechy polimerów stosowanych do mikroksułkowania to przede wszystkim mała lepkość stężonych roztworów, która umożliwia całkowite usunięcie rozpuszczalnika w procesie suszenia, stabilność tworzonych emulsji oraz zdolność do uwalniania rdzenia w odpowiednim stopniu i czasie (Shahidi i Han 1993). O ile uzyskanie lepszych właściwości produktów przy wyższym koszcie produkcji jest możliwe do zaakceptowania w przemyśle farmaceutycznym czy kosmetycznym, o tyle w przemyśle spożywczym nowe rozwiązania nie mogą nieść za sobą znacznego zwiększenia cen, ponieważ konsument nie będzie zainteresowany nabywaniem wzbogaconych tą drogą produktów. Dlatego też, należy zwrócić uwagę, że nie wszystkie metody mikroksułkowania, choć niewątpliwie dające dobre efekty, mogą znaleźć zastosowanie w produkcji żywności, również ze względu na skomplikowaną i kosztowną aparaturę. Kluczowe znaczenie ma więc koszt wytwarzania otoczki, ponieważ w skrajnych przypadkach może stanowić nawet 90% ceny kapsułka. Niezależnie od stosowanej metody, problemem podczas mikroksułkowania jest wytworzenie dostatecznie szczelnej, pozbawionej porów otoczki, która mogłaby chronić substancję tworzącą rdzeń. Gotowe mikroksułki z olejem mogą zawierać nawet 75-83% rdzenia w stosunku do swojej całkowitej masy, jednakże im większa zawartość oleju stanowiąca rdzeń, tym cieńsza jest otoczka i słabsza ochrona przed czynnikami zewnętrznymi. Dodatkowo, większa zawartość oleju w mikroksułce może skutkować mniejszą efektywnością procesu mikroksułkowania (Rusli i in. 2006).

1.3.5. Mikroksułki z otoczkami białkowymi

Otoczki białkowe stanowią bardzo dobrą barierę chroniącą olej zamknięty w rdzeniu przez wpływem czynników zewnętrznych. Właściwości amfifilowe, duża masa cząsteczkowa, obecność różnych grup funkcyjnych i zdolność do wiązania się z wieloma różnymi substancjami sprawiają, że białka mają doskonałe właściwości funkcjonalne, takie jak lepkość, zdolność do stabilizowania emulsji oraz właściwości błonotwórcze. Podczas wytwarzania emulsji błona białkowa tworząca się wokół kropli oleju zapobiega flokulacji i koalescencji, a także zapewnia fizyczną trwałość emulsji w trakcie przetwarzania i przechowywania produktów spożywczych.

Do mikroksułkowania olejów wykorzystuje się białka serwatki, albuminę jaja lub wołową i białka soi (Young i in. 1993, Hogan i in. 2001, Gan i in. 2009). Białka mleka, w tym białka serwatkowe znajdują zastosowanie do mikroksułkowania wielu substancji, m.in.

olejów (Domian 2011). Są one łatwo dostępne na rynku jako izolaty białkowe (95-96% białka) lub koncentraty. Kim i Morr (1996) wykazali, że otoczki wytworzone podczas suszenia rozpyłowego z izolatów białek serwatkowych mogą chronić zawartość mikrokapsulek przed oksydacją i nadają się do mikrokapsułkowania aromatów. Dodatek laktozy do białek serwatkowych zwiększa wydajność procesu mikrokapsułkowania (Singh 2011, Gharsallaoui i in. 2007). Białka serwatkowe z dodatkiem laktozy wykorzystano m.in. do mikrokapsułkowania tłuszczu mlecznego (Keogh i O’Kennedy 1999) oraz kwasu rumenowego (sprzężonego kwasu linolowego) (Jimenez i in. 2004).

Białka soi powstają w dużych ilościach podczas wydzielania oleju z nasion. Wykorzystywane są one w wielu gałęziach przemysłu spożywczego ze względu na dużą wartość odżywczą a także właściwości teksturotwórcze i emulgujące. Rascón i in. (2011) wykazali, że białka soi mogą tworzyć stabilniejsze otoczki wokół olejów niż polisacharydy, np. guma arabska.

Do otrzymywania mikrokapsulek wykorzystywane mogą być albuminy jaja, zwykle sieciowane termicznie w połączeniach z innym polimerem, w celu zabezpieczenia przed wydostaniem się rdzenia. Stanowią one doskonałą barierę dla tlenu, dzięki czemu mogą zostać z powodzeniem wykorzystane w przemyśle spożywczym do ochrony substancji łatwo ulegających oksydacji, np. olejów o dużej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

1.3.5.1 Żelatyna rybna jako składnik otoczek mikrokapsulek

Żelatyna posiada dobre zdolności emulgujące i błonotwórcze i jest łatwo rozpuszczalna w ciepłej wodzie, jednak rzadko jest stosowana jako samodzielny polimer do wytwarzania otoczek mikrokapsulek. Częściej w tym celu łączy się żelatynę z sacharydami. Mikrokapsułki żelatynowe stosowane są do kontrolowanego uwalniania np. witamin czy leków. Wytwarzane są poprzez suszenie rozpyłowe emulsji lub mieszanin żelatyny i substancji aktywnej. Wydajność mikrokapsułkowania w otoczkach żelatynowych zależy głównie od parametrów prowadzenia procesu, a więc temperatury i prędkości przepływu medium suszącego oraz od właściwości samej emulsji – stosunku zawartości rdzenia do otoczki. Najistotniejszymi wyróżnikami jakości żelatyny spożywczej są lepkość, siła żelowania oraz temperatura i czas żelowania, które zależą od wielu czynników. Właściwości żelatyny w dużym stopniu zależą od jej składu aminokwasowego, a to z kolei związane jest z pochodzeniem tego białka.

Kolagen rybny, a więc i żelatyna zawiera mniej reszt proliny i hydroksyproliny w porównaniu z zawartością tych aminokwasów w białkach kolagenowych zwierząt stałocieplnych (Tabela 5).

Tabela 5. Porównanie składu aminokwasowego kolagenu zwierząt różnego pochodzenia [liczba reszt/1000reszt]

Aminokwas	Kolagen ze skór dorsza ¹⁾	Kolagen ze skór bydłych ²⁾
Glicyna	339	334
Alanina	109	105
Walina	17,4	-
Izoleucyna	9,3	25
Leucyna	20,9	25
Prolina	97	130
Hydroksyprolina	56	92
Fenylalanina	10,8	13
Tyrozyna	4,2	5
Seryna	73	38
Treonina	24,5	17
Metionina	18,2	7
Lizyna	27,9	25
Hydroksylizyna	6,5	7
Histydyna	8,5	5
Arginina	53	48
Kwas asparaginowy	52	48
Kwas glutaminowy	73	72

¹⁾ Piez 1965, ²⁾ Sikorski 1994

Żelatyny zwierząt stałocieplnych zawierają około 30% reszt proliny i hydroksyproliny, ryb żyjących w wodach ciepłych 22-25%, natomiast ryb żyjących w wodach zimnych (np. dorsz) jedynie 17% (Muyonga i in. 2004). Mniejsza zawartość proliny i hydroksyproliny w żelatynie rybnej, które stabilizują usieciowaną strukturę żelu tworzoną podczas żelowania, skutkuje tworzeniem słabszych żeli oraz niższymi temperaturami żelowania i topnienia (Avena-Bustillos 2006, Haug i in. 2004, Muyonga i in. 2004, Grossman i Bergmann 1992). Dlatego też żelatyna ze skór ryb bytujących w wodach zimnych, takich jak dorsz czy morszczuk żeluje dopiero po ochłodzeniu do 10-12°C (Kołodziejska i in. 2004, Norland 1990, Arenesen i Gildberg 2007, Gomez-Guillen 2002), podczas gdy żelatyna z ryb bytujących w wodach ciepłych, takich jak tilapia, tuńczyk, amur, tworzy wytrzymałe żeło w zakresie 15-

19°C (Gudmundsson 2002, Cho i in. 2005, Grossman i Bergman 1992, Jamilah i Harvinder 2002, Zhou i in. 2006, Kasankala 2007).

Mimo, iż mikrokapsułki żelatynowe wydają się być doskonałym rozwiązaniem do wzbogacania żywności w olej rybny, ich użycie jest ograniczone ze względu na wrażliwość termiczną (Cho i in. 2003) i mechaniczną (Mainardes i Silva 2004).

Aby zwiększyć możliwość wykorzystania żelatyny do wytwarzania mikrokapsulek stosuje się sieciowanie polimeru w celu zabezpieczenia przed wydostawaniem się rdzenia. Sieciowanie przeprowadzane jest z użyciem czynników fizycznych (temperatura), chemicznych (aldehyd glutarowy, genipina, siarczan (VI) sodu, chlorek wapnia) (Chowdary i Rao 2004, Huang-Chien i in. 2003) oraz enzymatycznych (transglutaminaza) (Prata i in. 2008).

Metoda chemiczna polega najczęściej na wkraplaniu mieszaniny polimer-rdzeń do czynnika sieciującego lub na odwrót. O wielkości powstających mikrocząstek decyduje szybkość mieszania roztworu. Małocząsteczkowe aldehydy (np. aldehyd glutarowy) są efektywnymi czynnikami sieciującymi, mogą jednak powodować denaturację białek i wykazują działanie toksyczne, co wyklucza ich zastosowanie do modyfikacji żelatyn przeznaczonych do spożycia. Kolejnym sposobem chemicznej modyfikacji żelatyn rybnych jest stosowanie dodatków różnych soli (Elysee-Collen i Lencki 1996). Aby jednak efekt działania soli był widoczny, muszą być one stosowane w dość dużych stężeniach (0,1-0,5M), a to również wyklucza ich zastosowanie w przemyśle spożywczym. Z tego względu dąży się do opracowania metod sieciowania polimerów przy użyciu substancji nie zagrażających zdrowiu konsumenta. Jedną z takich substancji jest związek pochodzenia naturalnego – genipina, która jest równie efektywna w sieciowaniu jak aldehyd glutarowy (Karim i Bhat 2009), jednak jej zasadniczą wadą jest wysoka cena.

Obecnie prowadzi się badania nad sieciowaniem przy użyciu transglutaminazy. Transglutaminaza jest transferazą, która występuje w tkankach zwierzęcych i roślinnych oraz jest wytwarzana przez mikroorganizmy (Nielsen 1995). Transglutaminaza katalizuje reakcję tworzenia wiązań sieciujących między grupą γ -karboksamidową reszty glutaminy a pierwszorzędowymi grupami aminowymi różnych związków jak np. białek (ϵ -aminowe reszty lizyny), amin, diamin lub poliamid. Wydajność procesu sieciowania zależy od stężenia enzymu i czasu trwania reakcji. W porównaniu z tymi sieciowanymi chemicznie i termicznie, mikrokapsułki sieciowane transglutaminazą mają bardziej regularny sferyczny kształt i mniej porowatą powierzchnię. Cechuje je też mniejsza rozpuszczalność w wodzie oraz podatność na

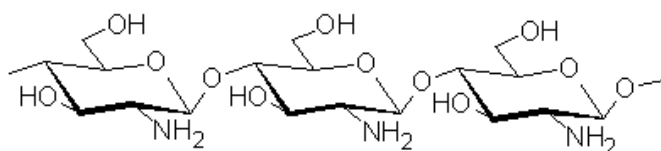
działanie pepsyny (Prata i in. 2008), lepiej spełniają swoją funkcję w stopniowym uwalnianiu preparatu *in vivo* (Cho i in. 2003).

1.3.6. Mikrokapsułki z otoczkami sacharydowymi

Sacharydy, stosowane jako otoczki mikrokapsulek, to przede wszystkim sacharoza, maltodekstryny oraz modyfikowane skrobie i chitozan.

Zaletą polisacharydów jest ich dostępność, niska cena, stosunkowo dobra rozpuszczalność i zdolność do tworzenia emulsji (Anwar i Kunz 2011, Madene i in. 2006). Wadą jest natomiast duża porowatość uzyskanych mikrocząstek. Skutkiem tego są znaczące straty rdzenia a także dostępność tlenu i innych czynników zewnętrznych do wnętrza mikrokapsułki. Taka nieuszczelna otoczka nie stanowi dobrego zabezpieczenia olejów przed oksydacją. Mikrokapsułki z otoczkami sacharydowymi należy przechowywać w warunkach niskiej wilgotności względnej, aby zapobiec zlepianiu się drobinek proszku. Zlepiając się, cząstki osłonek uwalniają na zewnątrz swoją zawartość (Drusch i in. 2006a, Drusch i in. 2006b).

Chitozan, otrzymywany jest na drodze deacetylacji chityny (Rysunek 11). Jego podstawowymi zaletami są biodegradowalność, nietoksyczność i dobra biokompatybilność (Aider 2010, Sinha i in. 2004).



Rysunek 11. Struktura chitozanu

Klaypradit i Huang (2008) wykazali, że sam chitozan nie jest w stanie wytworzyć stabilnej emulsji z olejem rybnym, co jest warunkiem niezbędnym by wysuszone, mikrokapsułki posiadały dobre właściwości ochronne. Z tego względu konieczne jest łączenie tego polimeru z innymi składnikami, takimi jak maltodekstryny czy izolaty białek serwatkowych. Wykazano, że otoczki wytworzone z chitozanu i białek skutecznie chroniły zamknięty w nich olej rybny przed oksydacją podczas przechowywania gotowego produktu (Devlieghere i in. 2004, Duan i in. 2011).

Natywna skrobia wykazuje małą zdolność do formowania otoczek, dlatego też nie znajduje zastosowania podczas wytwarzania mikrokapsulek. Jednakże, duża podatność skrobi

na różnego typu modyfikacje, pozwala uzyskać produkty o zróżnicowanych właściwościach (Korus i in. 2005). Wydajność mikrokapsułkowania substancji w otoczkach skrobiowych waha się od ok. 30 do 65% i zależy od zastosowanej modyfikacji polimeru (Korus i in. 2005). Skrobię przeznaczoną do wytwarzania mikrokapsulek modyfikuje się najczęściej poprzez jej estryfikowanie, np. w wyniku reakcji z bezwodnikiem kwasu bursztynowego. Modyfikowana w ten sposób skrobia rozpuszcza się w zimnej wodzie, ma dobre właściwości emulgujące, nawet stężone roztwory mają niską lepkość (Dłużewska 2008). Skrobie modyfikowane używane są najczęściej do mikrokapsułkowania substancji aromatycznych (Krishnan i in. 2005, Kshirsagar i Singhal 2008, Korus i in. 2005). Wykorzystuje się w tym celu zdolność granul skrobi do tworzenia porowatych, kulistych struktur podczas suszenia rozpyłowego. Koniecznym warunkiem do powstania takich agregatów jest niewielki dodatek substancji wiążących (białek, np. żelatyny czy rozpuszczalnych w wodzie sacharydów, takich jak guma guar, pektyny, dekstryny, pochodne celulozy, np. karboksymetyloceluloza) (Zhao i Whistler 1994). Kuliste cząstki agregatów skrobi mają ok. 10-40 μ m średnicy. Małe cząsteczki lotnych związków zapachowych, mogą wnikać w ich pory i zostać w ten sposób w nich uwięzione. Zdolność do zatrzymywania cząsteczek związków zapachowych w porach granul wzrasta wraz z ich polarnością (Arvisenet i in. 2002). Pod wpływem oddziaływań pomiędzy polarnymi cząsteczkami związków zapachowych a grupami hydroksylowymi skrobi wytwarzane są wiązania wodorowe, które stabilizują powstałą strukturę i zatrzymują daną substancję wewnątrz agregatów skrobi. Większa liczba porów umożliwia wydajniejsze zatrzymywanie substancji aktywnej. Wiele badań poświęcono opracowaniu procedur wytwarzania nowych mikroporowatych otoczek skrobiowych, celem polepszenia ich zdolności do wiązania substancji zapachowych. Wykazano, że poddanie granul skrobi działaniu α -amylazy prowadzi do wytworzenia bardziej porowatych struktur, która umożliwiają wydajniejsze wnikanie mikrokapsułkowanych substancji do ich wnętrza (Zeller i in. 1999). Uwięzione w strukturze granul skrobi lotne substancje aromatyczne zyskują po wysuszeniu materiału wygodną w użyciu formę i mogą zostać wykorzystane m.in. jako dodatki do nadawania zamiennikom tłuszczu pożądanych właściwości sensorycznych, np. aromatu świeżego masła czy bekonu.

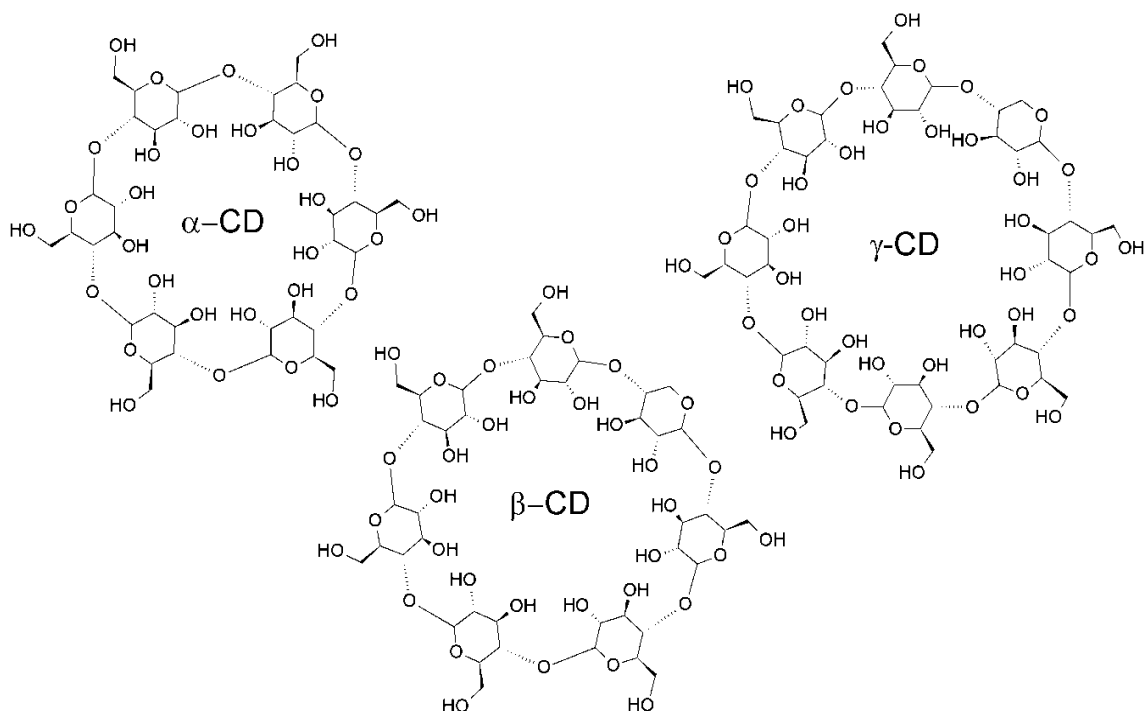
Maltodekstryny powstają w wyniku częściowej, kwasowej lub enzymatycznej, hydrolizy skrobi. Stopień scukrzenia mierzy się redukcyjnością hydrolizatu i wyraża jako tzw. równoważnik glukozy (DE) – liczba wiązań glikozydowych, które uległy hydrolizie w stosunku do całkowitej liczby wiązań glikozydowych obecnych w 100g materiału wyjściowego. DE jest ważnym parametrem opisującym właściwości fizykochemiczne

maltodekstryn. Nie mniej istotna jest także średnia masa cząsteczkowa mieszaniny maltodekstryn. Od tych parametrów zależy wydajność mikrokapsułkowania. Wykazano również, że DE może mieć wpływ na stabilność mikrokapsułkowanej substancji. Wagner i Warthensen (1995) wykorzystali mikrokapsułkowanie w maltodekstrynach do przedłużenia trwałości soku z marchwi, przy czym lepsze wyniki uzyskali przy wyższych wartościach DE. Podobną zależność stwierdzili także Anandaraman i Reineccius (1986) badając wpływ otoczek z maltodekstryn o różnym DE na szybkość utleniania olejku pomarańczowego zamkniętego w strukturze mikrokapsulek. Maltodekstryny o wyższym DE tworzą mniej przepuszczalne dla tlenu otoczki, jednakże są one bardzo higroskopijne, co utrudnia ich wykorzystanie praktyczne. Dlatego też podjęto próbę zwiększenia właściwości barierowych wobec tlenu otoczek z maltodekstryn o niskim DE poprzez włączenie w ich strukturę glukozy lub innych cukrów redukujących (Desobry i in. 1999).

Maltodekstryny charakteryzują się słodkim smakiem i małą lepkością stężonych roztworów. Wadą maltodekstryn, jako materiału służącego do wytwarzania mikrokapsulek, jest ich mała zdolność emulgująca oraz mała zdolność do zatrzymywania substancji aktywnej (Reineccius 1991). Z tego względu często stosuje się ich mieszaniny z innymi polimerami, np. gumą arabską (Krishnan i in. 2005) i białkami serwatki a także wykorzystuje się dodatek środków emulgujących.

Cyklodekstryny są związkami cyklicznymi zbudowanymi z 6-12 reszt glukozy połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Charakteryzują się łatwością kompleksowania różnych substancji chemicznych. Są to polarne związki, lecz dzięki charakterystycznemu ułożeniu grup hydroksylowych posiadają hydrofobowe wnętrze, dlatego mogą pełnić rolę „gospodarza” dla różnych, głównie lipofilowych cząsteczek. Do tego celu najczęściej wykorzystuje się struktury mające 7 (β) lub 8 (γ) reszt glukozy (Rysunek 12). Istotna jest tutaj geometria cząsteczek – cząsteczki substancji aktywnej muszą mieć mniejsze rozmiary niż wnętrze cyklodekstryn.

Zaletą mikrokapsułkowania przy użyciu cyklodekstryn jest tworzenie stabilnego termodynamicznie kompleksu, dzięki czemu wytworzone mikrokapsułki wykazują wyższą stabilność (nawet do 200°C) i odporność na wilgoć niż skrobiowe (Partanen i in. 2002). Główną wadą jest natomiast niska zawartość substancji aktywnej w gotowych mikrokapsułkach, wykazano, że wydajność wynosi ok. 10%.



Rysunek 12. Struktura α -, β -, γ -, cyklodekstryn

Do wytwarzania mikrokapsulek wykorzystywana jest także guma akacjowa (arabska). Dobrze rozpuszcza się w wodzie i tworzy mieszaniny z większością hydrokoloidów; stosowana jest jako stabilizator, zagęszczacz i emulgator w przemyśle spożywczym, wykazuje również właściwości ochronne przed utlenianiem (Ali i in. 2009). Krishnan i in. (2005) wykazali, że guma arabska stanowi lepszy materiał do wytwarzania otoczek niż skrobie modyfikowane. Guma akacjowa jest jednakże znacznie droższa niż np. maltodekstryny i mniej dostępna, co ogranicza jej szersze zastosowanie. Polimer ten łączy się z innymi polimerami w celu poprawy właściwości formowanych mikrokapsulek (Prata i in. 2008, Chang i in. 2006). Uzyskiwane metodą suszenia rozpyłowego mikrokapsułki z mieszanin gumy arabskiej i maltodekstryn mają zwykle 10 – 200 μm średnicy, natomiast wydajność procesu i zdolność do zatrzymywania rdzenia zależą również od parametrów suszenia i właściwości fizykochemicznych suszonego materiału (Madene i in. 2006).

Dobrym materiałem na otoczki kapsulek jest trehaloza (α -D-glukopiranozylo- α -D-glukopiranozyd). Posiada ona właściwości cukru nieredukującego o dużej stabilności termicznej i odporności na hydrolizę w kwaśnym środowisku. Cukier ten przeciwdziała też niepożądanym zmianom struktury i właściwości sensorycznych niektórych produktów; zapobiega retrogradacji skrobi oraz hamuje tworzenie się nadtlenków i lotnych aldehydów powstających wskutek autooksydacji lipidów. Trehaloza cechuje się unikatową zdolnością do ochrony przed oksydacją nienasyconych wiązań w konfiguracji *cis* w kwasach tłuszczowych.

Jedna cząsteczka cukru tworzy wiązania wodorowe z ugrupowaniami OH \cdots H oraz CH \cdots O wiązania podwójnego w kwasie tłuszczowym (Drusch i in. 2006b). Jest to szczególnie przydatna właściwość w przypadku olejów rybnych o wyjątkowo dużej zawartości PUFA. Dość istotną zaletą trehalozy jest mała higroskopijność i formowanie nie ulegającego krystalizacji „szkliwa” (Drusch i in. 2006b). Wadą natomiast jest dość wysoka cena, która ogranicza szersze wykorzystanie tego sacharydu w przemyśle spożywczym.

1.3.7. Mikrokapsułki z otoczkami białkowo-sacharydowymi

Otoczki białkowo-sacharydowe stanowią bardzo dobrą barierę chroniącą rdzeń mikrokapsułki przed utlenianiem. Do wytwarzania tego rodzaju otoczek najczęściej stosuje się kazeinian sodu, izolaty białek soi i serwatki, dekstryny, glukozę, odwodniony syrop glukozowy i celulozę (Rusli i in. 2006). W procesie mikrokapsułkowania białka serwatkowe pełnią rolę emulgatora i czynnika błonotwórczego. Białka serwatkowe, dzięki swej zdolności do tworzenia mostków disulfidowych, dodatkowo stabilizują film formowany wokół kropli oleju (Rusli i in. 2006, Suryanarayana i in. 2008). Young i in. (1993) wykazali, że połączenie sacharydów i białek serwatkowych zwiększa wydajność mikrokapsułkowania tłuszczu mlecznego, natomiast otoczki białkowe z dodatkiem polisacharydów z soi chroniły kwas linolowy przed oksydacją (Young i in. 1993, Fang i in. 2003). Dodatek sacharydów do białek poprawia nie tylko stabilność tworzonych preparatów, lecz także ułatwia ich suszenie rozpyłowe (Sheu i Rosenberg 1995). Mieszanki białek serwatkowych i polisacharydów wykorzystano również z powodzeniem do mikrokapsułkowania aromatów. Bardzo dobre wydajności mikrokapsułkowania uzyskano stosując również kazeinian sodu, np. w połączeniu z maltodekstrynami (Hogan i in. 2001).

Ostatnimi czasy duże zainteresowanie wzbudzają otoczki białkowo-sacharydowe, zawierające produkty reakcji Maillarda (Kato 2002). Reakcje Maillarda zachodzą naturalnie podczas obróbki termicznej żywności. Produkty tych reakcji charakteryzują się właściwościami przeciwutleniającymi, dlatego mogą być wykorzystane do mikrokapsułkowania olejów bogatych w PUFA (Augustin i in. 2006, Rusli i in. 2006, Kagami i in. 2003). Aby zainicjować powstawanie produktów reakcji Maillarda podczas wytwarzania mikrokapsulek, mieszaninę białek i sacharydów miesza się intensywnie, ogrzewa do temperatury 100°C a następnie schładza do 60°C przed dodaniem oleju. Do wytworzenia tego rodzaju mikrokapsulek zastosować można mieszaniny izolatu białka sojowego z syropem glukozowym (Rusli i in. 2006) lub rybozą (Gan i in. 2008) a także kazeinianu sodu ze skrobią

(Chung i in. 2011). Mechanizm działania przeciwutleniającego związków powstałych w reakcji Maillarda nie został dotychczas w pełni wyjaśniony. Produkty reakcji Maillarda cechuje stabilność w szerokim zakresie pH, co umożliwia ich wykorzystanie w większej gamie produktów żywnościowych, szczególnie do stabilizowania olejów o wysokim stopniu nienasycenia (Rusli i in. 2006, Sheperd i in. 2000).

1.3.8. Immobilizowanie oleju w komórkach mikroorganizmów

Nowatorskim sposobem zapewniającym olejom rybnym stabilność oksydacyjną jest ich zamykanie w komórkach drobnoustrojów. Wykorzystywane w tym celu tzw. drożdże oleiste *Cryptococcus curvatus* (nazywane również *Candida curvata D* lub *Apiotrichum curvatum*) posiadają zdolność syntezy olejów. Rosnąc na permeacie serwatki, zawierającym głównie laktozę i związki mineralne, mogą one przekształcać ten cukier w kwasy tłuszczowe, przechowywane w odrębnych wewnątrzkomórkowych wakuolach tłuszczowych pod postacią TAG. Drożdże oleiste potrafią także przyswajać różnorodne tłuszcze z pożywki i akumulować je w praktycznie nie zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. Prawdopodobnie hydrolizują one TAG obecne w pożywce, a następnie prowadzą również reestryfikację. Ilość lipidów zawartych w komórkach może sięgać nawet 60% ich suchej masy. Autorzy wykazali, że *C. curvatus*, mają także zdolność ochrony PUFA przed utlenieniem. Przypuszcza się, że wynika to z faktu posiadania przez *C. curvatus* grubej ściany komórkowej ograniczającej dostęp tlenu. Ponadto wakuole lipidowe wewnątrz komórek są zlokalizowane w znacznych odległościach od siebie, co zapobiega kaskadowej oksydacji (Iassonova i in. 2008).

Również drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae* mogą być zastosowane do mikrokapsułkowania różnych substancji (Czerniak i Jankowski 2013). Mikrokapsułkowane substancje przenikają na drodze biernej dyfuzji przez błony komórkowe, również martwych komórek drożdży. W warunkach laboratoryjnych uzyskano za pomocą tej metody mikrokapsułki drożdżowe z olejkami eterycznymi (pomarańczowy, miętowy) jak również z kwasem chlorogenowym. Przypuszcza się, że uzyskane w ten sposób mikrokapsułki są nie tylko bezpieczne dla człowieka, ale również ze względu na wysoką zawartość witaminy B oraz selenu w komórkach drożdży, mogłyby wywierać dodatkowy, korzystny wpływ na zdrowie. Wykazano jednak, że przy zbyt wysokich stężeniach mikrokapsułkowanych substancji komórki drożdży mogą ulegać uszkodzeniom i wydajność procesu jest mniejsza

(Wojtyś i Jankowski 2004, Shi i in. 2007). Metoda mikrokapsułkowania w komórkach drożdży nie jest jeszcze wykorzystywana w przemyśle.

1.3.9. Praktyczne wykorzystanie mikrokapsulek – wzbogacanie żywności olejem rybnym

Ostatnimi czasy wzrasta zainteresowanie tzw. żywnością funkcjonalną, której poza podstawowym zadaniem, jakim jest odżywianie, przypisuje się fizjologiczny wpływ na ludzki organizm; może np. obniżyć poziom cholesterolu, wzmacniać układ odpornościowy czy przywracać równowagę mikrobiologiczną układu pokarmowego. Już w roku 1993 pojawiły się pierwsze doniesienia na temat możliwości wykorzystania dodatku oleju rybnego do żywności, w tym przypadku do pieczywa (Newton i Snyder 1993), a następnie jako składnik tłuszczów do smarowania pieczywa (Roche 1994). Bezpośredni dodatek olejów pogarsza cechy smakowo-zapachowe produktu, co ogranicza możliwości jego wykorzystania w tej formie do wzbogacenia żywności w PUFA. Niektórzy autorzy podają, że białka mleka oraz wapń mogą w pewnym stopniu hamować przemiany oksydacyjne PUFA (Jonsdottir i in. 2005, Keogh 2001). Jednakże olej ten może być dodawany jedynie w niewielkich ilościach, głównie do produktów o silnych własnych cechach smakowo-zapachowych, takich jak np. serki czosnkowe, a nie np. do masła, ponieważ smak i zapach oleju rybnego są silnie wyczuwalne i obniżają trwałość tego produktu (Let i in. 2003). Warunkiem, który musi być spełniony, aby można było wzbogacać żywność olejem rybnym, jest dobra jakość wykorzystywanego w tym celu oleju a także należyte postępowanie z gotowym produktem. Produkty z dodatkiem oleju rybnego powinny być pakowane najlepiej w opakowania jednorazowe i przechowywane w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. W przypadku nie stosowania się do powyższych zaleceń, procesy utleniania zachodzące w produkcji, niosą za sobą nie tylko pogorszenie się smaku czy zapachu, ale również obniżenie bezpieczeństwa i wartości zdrowotnej produktu.

Ograniczenia w procesie wytwarzania wzbogaczanych w olej rybny produktów spożywczych skłaniają do poszukiwania alternatywnych rozwiązań takich jak mikrokapsułkowanie. Olej zamknięty w strukturze mikrokapsulek został m.in. wykorzystany do wzbogacania w PUFA suchych produktów żywnościowych typu instant, produktów mlecznych: jogurtów naturalnych i smakowych, serów twarogowych i topionych oraz masła (Let i in. 2003, Timm-Heinrich i in. 2004, Shiota i in. 1999) a nawet słodczy (pastylki pudrowe). Mikrokapsułkowane preparaty oleju rybnego stosowane są m. in. także do chleba,

w postaci gotowych mieszanek piekarskich (Whelan i Rust 2006). Dzięki mikrokapsułkowaniu wyczuwalność rybnego zapachu oleju jest ograniczona, pod warunkiem, że preparat nie ulega rozpuszczeniu bezpośrednio po dodaniu do żywności (Trautwein 2001, Whelan i Rust 2006). Obecność substancji smakowo-zapachowych, białek mleka i innych tłuszczów umożliwia stosowanie większych dodatków mikrokapsułkowanego oleju rybnego bez istotnego pogorszenia jakości sensorycznej. Jakość (trwałość) produktów spożywczych z dodatkiem mikrokapsułkowanego oleju rybnego podczas ich przechowywania nie jest jeszcze dotychczas wystarczająco określona, o czym świadczy m. in. niewielka liczba prac opublikowanych na ten temat dostępnym piśmiennictwie.

1.4. PODSUMOWANIE

Znacząca ilość odpadów, pochodzących ze wstępnej obróbki surowców rybnych, skłania do poszukiwania rozwiązań racjonalnego ich zagospodarowania. Dotychczas niewielka ich część przerabiana jest na materiały paszowe, zaś reszta (szczególnie skóry) zalega na wysypiskach śmieci. Z uwagi na cenne właściwości zdrowotne oleju z ryb, istnieje konieczność opracowania zachowawczej metody jego wydzielania z odpadów, która w przeciwieństwie do obecnie stosowanych, nie prowadziłaby do niekorzystnych przemian oksydacyjnych i hydrolitycznych, a jednocześnie pozwalałaby na wydajny odzysk produktu przy niewielkim nakładzie kosztów. Ponadto, w dostępnym piśmiennictwie niewiele jest informacji o możliwości wykorzystania żelatyn, uzyskanych ze skór ryb żyjących w wodach zimnych i o umiarkowanej temperaturze, do wytwarzania mikrokapsulek. Określenie stabilności oksydacyjnej i zbadanie wpływu warunków przechowywania na jakość wytwarzanych preparatów w postaci mikrokapsulek, ma kluczowe znaczenie w ocenie możliwości ich późniejszego wykorzystania do wzbogacania produktów spożywczych oraz pomogłoby uzupełnić lukę w tym obszarze wiedzy, o które świadczy wciąż niewielka liczba opracowań naukowych.

2 CEL PRACY I UZASADNIENIE

CEL

Pierwszym celem pracy było opracowanie procedury otrzymywania ze skór pochodzących z mechanicznego odskórzania łososi hodowlanych oleju o dobrej jakości, który mógłby zostać przeznaczony do spożycia jako źródło NNKT z rodziny *n-3*. Drugi cel pracy to opracowanie warunków mikrokapsułkowania otrzymanego uprzednio oleju w otoczkach z żelatyny rybnej (pochodzącej z tych samych odpadowych skór) metodą emulsyjną z wykorzystaniem suszenia sublimacyjnego.

Poniżej przedstawiono założenia, w oparciu o które postanowiono zrealizować postawione cele pracy.

ZAŁOŻENIE 1

Skóry, pochodzące z mechanicznej obróbki ryb tłustych, np. łososi, mogą stanowić doskonale źródło oleju bogatego w wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Podstawowym warunkiem jest takie dobranie parametrów ekstrakcji, aby proces ten nie powodował niepożądanych zmian oksydacyjnych i hydrolitycznych, a uzyskiwany olej był jak najlepszej jakości i miał odpowiedni skład kwasów tłuszczowych.

UZASADNIENIE

W części teoretycznej pracy wykazano, że obecnie stosowane metody otrzymywania olejów rybnych, chociaż pozwalają na uzyskanie dużych wydajności, prowadzone są zwykle w podwyższonej temperaturze, a tym samym nie są zachowawcze dla wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co skutkuje obniżeniem jakości otrzymywanego produktu. Wadą bardziej zaawansowanych metod, szczególnie ekstrakcji rozpuszczalnikiem w stanie nadkrytycznym, jest konieczność stosowania skomplikowanej aparatury, jak również z tym związane wysokie koszty prowadzenia procesu.

Postanowiono sprawdzić, czy możliwa jest ekstrakcja oleju z mieszaniny skór z wodą prowadzona w niskich temperaturach (nawet poniżej 15°C). Główną zaletą takiej metody byłoby zachowanie dobrej jakości izolowanego oleju i jego cennych prozdrowotnych właściwości. Dodatkowo, pominięcie ogrzewania mieszaniny byłoby korzystne, ponieważ każda operacja technologiczna, która wymaga zastosowania podwyższonej temperatury pociąga za sobą wysokie koszty. Ponadto, niska temperatura w trakcie wydobywania oleju nie powinna spowodować strat kolagenu w pozostałościach skór. Dzięki temu mogłyby zostać

one wykorzystane do produkcji żelatyny. W ten sposób, w jednym procesie technologicznym, ze skór odzyskane zostałyby obydwie substancje potrzebne do wytwarzania mikrokapsulek.

Skóry z pozostałościami tkanki mięśniowej mogą zawierać enzymy pochodzenia endogennego i bakteryjnego powodujące niekorzystne przemiany lipidów. Ponadto nawet przechowywanie w temperaturze poniżej 0°C nie gwarantuje, że w surowcu nie będą zachodzić przemiany oksydacyjne pogarszające jego jakość. Istotną więc jest ocena jak długo surowiec może być przechowywany w warunkach zamrażalniczych przed jego wykorzystaniem i w jakiej formie, tj. w całości czy uprzednio rozdrobniony.

ZAŁOŻENIE 2

Stabilność oksydacyjną oleju ze skór łososi można poprawić poprzez dodawanie naturalnych substancji o właściwościach przeciwutleniających, a także jego mikrokapsułkowanie z wykorzystaniem żelatyny pochodzącej z tego samego surowca, co olej.

UZASADNIENIE

Jako otoczki mikrokapsulek stosowane są rozmaite naturalne polimery, takie jak białka, polisacharydy, żywice i gumy. W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest informacji o możliwości wykorzystania żelatyn, uzyskanych ze skór ryb żyjących w wodach zimnych i o umiarkowanej temperaturze, do wytwarzania mikrokapsulek. Cenną i pożądaną zaletą żelatyny rybnej podczas wytwarzania mikrokapsulek jest niska lepkość nawet stężonych roztworów. Mikrokapsułkowanie oleju w otoczkach z żelatyny rybnej pozyskanych z tego samego surowca co olej umożliwiłoby jak najlepsze wykorzystanie odpadów przemysłu rybnego, a ponadto eliminowało zagrożenia zdrowotne przypisywane żelatynie bydlęcej.

Istnieją różne metody mikrokapsułkowania. Najpopularniejsze i najczęściej stosowane jest sporządzenie emulsji z substancji mającej stanowić rdzeń i roztworu materiału, z którego mają powstać ścianki i następnie suszenie powstałej mieszaniny, zazwyczaj rozpyłowe lub sublimacyjne. Metoda ta może być wykorzystana do produkcji mikrokapsulek z otoczkami białkowymi, sacharydowymi i białkowo-sacharydowymi. Założono, że metodą tą można będzie wytworzyć mikrokapsułki zawierające olej w otoczkach z żelatyny rybnej. Aby było to możliwe, należy opracować warunki uzyskiwania odpowiednio stabilnej emulsji.

Najpowszechniej stosowana metoda mikrokapsułkowania, jaką jest suszenie rozpyłowe, nie jest skuteczną metodą utrwalania bogatych w PUFA olejów rybnych, podobnie jak wytwarzanie mikrokapsulek metodą fluidalną. Dlatego też celowe wydaje się

zbadanie możliwości wykorzystania do tego celu suszenia sublimacyjnego, ponieważ proces prowadzony jest w warunkach próżni, a sam preparat jest zamrożony i w ten sposób chroniony przed niekorzystnym wpływem temperatury. Metoda ta była już wykorzystywana z powodzeniem do mikrokapsułkowania różnych dodatków do żywności, np. aromatów oraz pigmentów.

Olej rybny, ze względu na dużą zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest wyjątkowo podatny na utlenianie. Założono, że dodatkowe zwiększenie stabilności oksydacyjnej będzie możliwe poprzez wprowadzenie w strukturę mikrokapsulek ziół o właściwościach przeciwutleniających. W dostępnym piśmiennictwie jest wiele doniesień świadczących o antyoksydacyjnym wpływie ekstraktów niektórych ziół, np. szałwii, rozmarynu, oregano na oleje spożywcze. Dzięki temu procesy utleniania w mikrokapsułkowanym oleju powinny zachodzić wolniej nawet podczas jego przechowywania w temperaturze pokojowej.

3 CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

3.1 MATERIAŁY I APARATURA:

Materiały do badań:

- skóry surowe po mechanicznym odkórzaniu norweskich łososi hodowlanych udostępnione grzecznościowo przez firmę „Morpol” – skóry do momentu przeprowadzenia badań przechowywano w temperaturze ok. 4°C
- skóry po odkórzaniu łososi bałtyckich, dziko żyjących
- suszone zioła (zakupione w sklepie ze „zdrową żywnością”:
 - suszony liść rozmarynu, (Flos)
 - oregano, (Kawon)
 - liść szalwii, (Kawon)
- żelatyna wieprzowa (Dr Oetker)
- suplementy diety produkowane z oleju rybnego zawierające kwasy tłuszczowe z rodziny *n-3* (osiem preparatów zakupionych w lokalnych aptekach)

Lp.	Nazwa	Producent	Oznaczenie	Data przydatności do spożycia
1.	GalOmega	Gal	A	08.2011
2.	Omega 3	Naturell	B	10.2009
3.	Gold Omega 3	Olimp Labs	C	03.2009
4.	Omega 3 Forte	Natur Kaps	D	03.2011
5.	EkoGal	Gal	E	05.2010
6.	Triomar	Mölers	F	08.2011
7.	Omega Cardio	Aflofarm	G	06.2009
8.	Nutriline Omega 3 Complex	Amway	H	07.2012

Odczynniki chemiczne:

- kwas octowy, chloroform, eter dietylowy, wodorotlenek potasu, metanol (ChemPur)
- tiosiarczan sodu, fenoloftaleina, kwaśny siarczan sodu, etanol, n-propanol, izopropanol, aldehyd p-dimetyloaminobenzoesowy, odczynnik Tashiro, mieszanina selenowa (P.O.Ch.S.A. Gliwice)
- bezwodny siarczan sodu (Sigma)
- heksan, jodek potasu, płytki z żelazem krzemionkowym (Merck)

- natywna skrobia ziemniaczana „Superior” (P.P.Z. Trzemeszno)
- kwas tiobarbiturowy, kwas trichlorooctowy (Merck)
- kwas chlorowodorowy (P.P.H. „Stanlab”)
- butylohydroksytoluen (BHT), 1,1,3,3,-tetrametoksypropan (TMP) (Merck)
- cholesterol, α -tokoferol, δ -tokoferol (Sigma Aldrich),
- skwalen (Supelco)
- azot sprężony (Lindt)

Aparatura i oprzyrządowanie pomocnicze:

- blender nożowy, Philips
- chromatograf gazowy wraz z oprogramowaniem TotalChrom, Perkin Elmer Autosystem XL
- elektroniczne wagi laboratoryjne: WPA120C, WPS510/C/R, WPS600/C/2, Radwag
- homogenizator, Silentcrusher M. Heidolph
- jednostka destylacyjna Kjeltex System 1002, Foss Tecator
- liofilizator, Alpha 1-4 LD plus Christ
- łaźnia wodna, Grant
- mieszadło magnetyczne, MS11 WIGO
- piec muflowy, SNOL 8.2/1100 L
- płyta grzewcza, EKP-1500,1 ECC AFK
- próżniowa wyparka obrotowa, Rotavapor RE Büchi
- spektrofotometr, Spectronic Genesys 2, Milton Roy
- suszarki laboratoryjne, Premed
- system mineralizacyjny 2006, Foss Tecator
- wilk, PA-22-M Edesa
- wirówka sedymentacyjna, 6K15 Sigma
- wirówka, MPW Med. Instruments

3.2 POSTĘPOWANIE DOŚWIADCZALNE

3.2.1 Opracowanie procedury ekstrakcji oleju ze skór

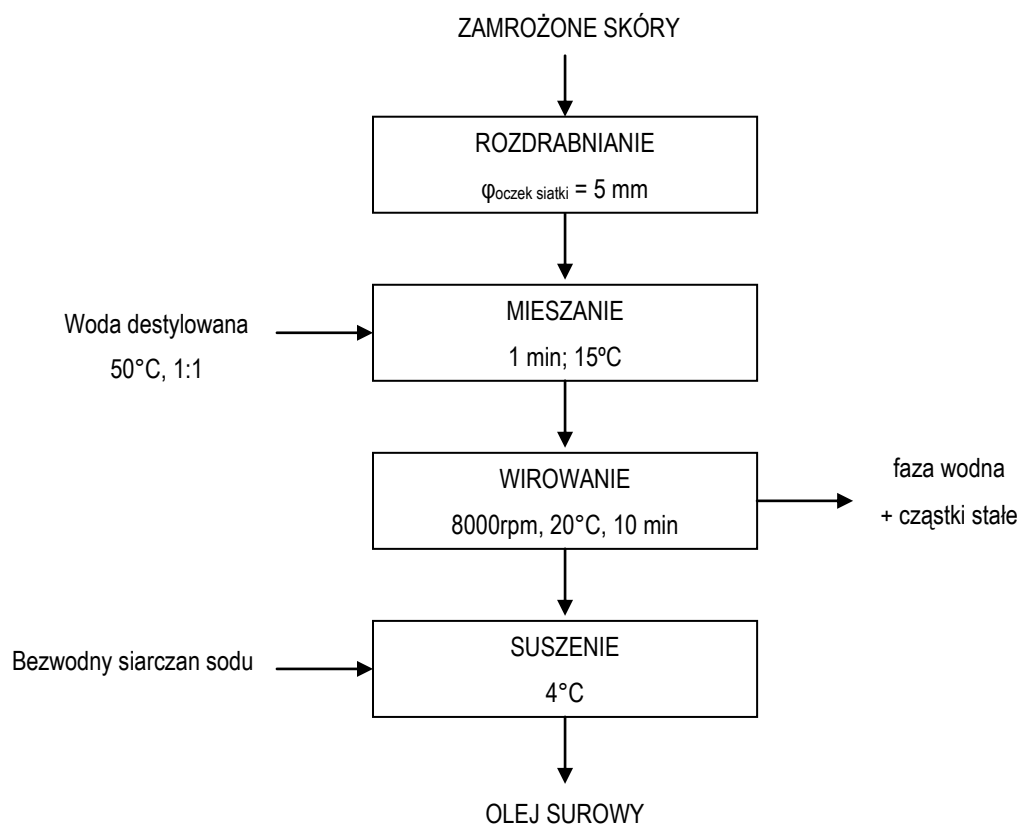
Określono podstawowy skład chemiczny surowca - skór z odskórzania łososi hodowlanych oraz, dla porównania, skór łososi bałtyckich.

Zbadano wydajność ekstrakcji oleju ze skór łososi za pomocą dwóch metod. W pierwszej metodzie (I) rozdrobnione zamrożone skóry mieszano z wodą o temperaturze 50°C a następnie homogenizowano ręcznym blenderem do uzyskania jednolitej pulpy ok. 5 minut. Pulpę ogrzewano do 95°C, mieszano a następnie schładzano do temperatury pokojowej w atmosferze azotu. Powstałą mieszaninę wirowano 10 minut przy 8000rpm. Oddzielony olej zbierano, a pozostałą fazę ciekłą ponownie wirowano. Oddzielony olej łączono z poprzednio otrzymanym. Ze względu na konieczność prowadzenia procesu ekstrakcji w warunkach zachowawczych dla PUFA przeprowadzono optymalizację metody II - otrzymywania oleju ze skór łososi „na zimno”, z pominięciem jakiegokolwiek ogrzewania. Zaobserwowano, że już podczas rozdrabniania skór tłuszcz sam wyciekał z tego surowca, co skutkowało jego stratami i sprawiało znaczne trudności w ocenie wydajności ekstrakcji. Dlatego też, skóry najpierw zamrażano w całości, a następnie zamrożone cięto na mniejsze kawałki i rozdrabniano w wilku. Ponieważ skóry i znajdujący się w nich olej były zamrożone, nie następował wyciek oleju z surowca podczas rozdrabniania i wyeliminowano w ten sposób jego straty. Rozdrobnione skóry ponownie zamrażano. Rozdrobnione i zamrożone skóry mieszano lub homogenizowano z wodą, tak aby temperatura nie przekraczała 15°C. Następnie pulpę wirowano i zbierano oddzielony olej. Zbadano wpływ czasu mieszania skór z wodą i czasu wirowania (w zakresie 1-15 minut) oraz prędkości wirowania (1000 – 8000 rpm) na efektywność odzysku oleju ze skór. W otrzymanym oleju oznaczano stopień utlenienia KT, zawartość wolnych KT oraz skład KT.

3.2.2 Określenie wpływu rozdrobnienia skór i czasu przechowywania na jakość wydzielanego oleju

Skóry surowe razem z łuskami i pozostałościami mięsa i tłuszczu rozdrabniano w wilku z siatką o średnicy oczek 5 mm. Po dokładnym wymieszaniu materiał pakowano w porcjach po około 250 g w woreczki polietylenowe i przechowywano w -20°C. Równolegle w tych samych warunkach przechowywano skóry nierozdrobnione. Po określonym okresie

przechowywania izolowano ze skór olej (Rysunek 13) według opracowanej na podstawie wcześniejszych doświadczeń procedury ekstrakcji (punkt 3.2.1).



Rysunek 13. Schemat ideowy izolacji oleju ze skór

Jakość wydzielonego oleju oceniono poprzez oznaczenie liczby nadtlenkowej, liczby kwasowej, składu kwasów tłuszczowych oraz zawartości dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych.

3.2.3 Określenie wpływu warunków przechowywania surowego oleju na jego jakość

Olej otrzymany ze świeżej partii skór, podzielono na porcje, zamknięto pod poduszką azotową w pojemnikach plastikowych i przechowywano przy ograniczonym dostępie światła w temperaturze pokojowej oraz 4°C. Dobór takich temperatur przechowywania podyktowany był przyszłym przeznaczeniem oleju jako składnika suplementów diety – w tych warunkach konsumenci przechowują zwykle zakupione preparaty farmaceutyczne.

Po określonym czasie przechowywania oceniono jakość oleju poprzez oznaczenie liczby nadtlenkowej, liczby kwasowej, zawartości wtórnych produktów utlenienia, zawartości

barwników karotenoidowych, składu kwasów tłuszczowych oraz zawartości dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych.

3.2.4 Zbadanie możliwości ograniczenia przemian oksydacyjnych w oleju surowym

3.2.4.1 Określenie wpływu dodatków suszonych ziół na jakość przechowywanego oleju

Zbadano wpływ dodatku suszonych ziół takich jak rozmaryn, oregano oraz szalwia na stabilność oksydacyjną i jakość oleju ze skór łososi. Wydzielony ze skór olej wymieszano z suszonymi ziołami (1g suszu/100g oleju) rozdrobnionymi w moździerzu porcelanowym, podzielono na porcje, zamknięto pod poduszką azotową w plastikowych opakowaniach i przechowywano przy ograniczonym dostępie światła w temperaturze pokojowej oraz 4°C. Po określonym czasie przechowywania oceniono jakość oleju poprzez oznaczenie liczby nadtlenkowej i liczby kwasowej oraz stabilności oksydacyjnej.

3.2.4.2 Określenie wpływu wysokiego ciśnienia na stabilność oksydacyjną przechowywanego oleju

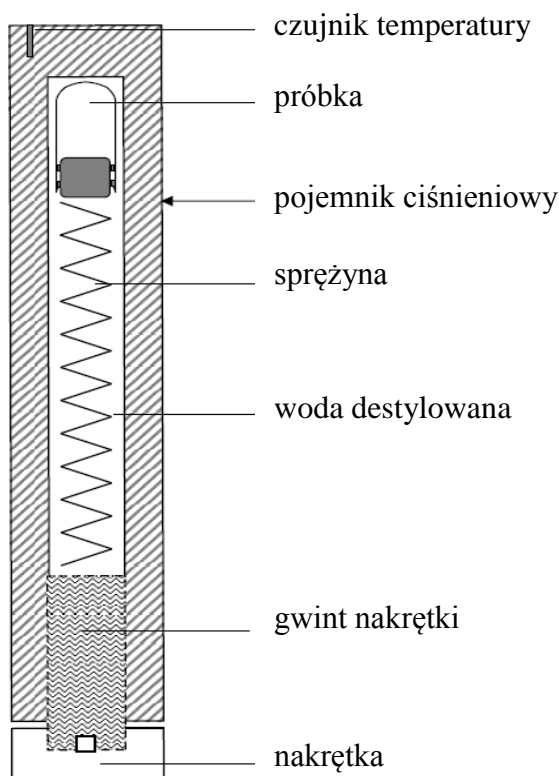
Sprawdzono wpływ działania wysokiego ciśnienia na stabilność oksydacyjną ciśnieniowanego oleju wyizolowanego ze skór łososi. Wysokie ciśnienie wytwarzano w sposób opisany przez Malinowską-Pańczyk i in. (2009). W szczelnym naczyniu wypełnionym wodą w temperaturach niższych od zera tworzący się lód I zwiększa swoją objętość i wskutek tego jest wytwarzane ciśnienie wewnętrzne. Według Bridgman (1912) pod wpływem wysokiego ciśnienia (207,5 MPa) następuje przesunięcie temperatury krzepnięcia wody do -22 ° C. W związku z tym próbka umieszczona w szczelnie zamkniętym naczyniu pod wpływem wysokiego ciśnienia pozostaje w stanie niezamrożonym.

Tabela 6. Ciśnienie wytwarzane w pojemniku ciśnieniowym w zależności od temperatury (Kalichevsky i in. 1995)

Temperatura [°C]	Ciśnienie [MPa]
-5	59,8
-10	110,9
-15	156,0
-20	193,3

Olej wyekstrahowany ze skór łososi umieszczono w probówkach szklanych zamkniętych specjalnym ruchomym korkiem i schładzano do 0°C. Probówkę z olejem umieszczano w cylindrycznym metalowym pojemniku wypełnionym wodą destylowaną i dociskano metalową sprężyną, której zadaniem jest utrzymywanie próby w niezamarzającej strefie pojemnika. Aparatura wykorzystywana w doświadczeniu została zaprojektowana i wykonana przez dr inż. Edwarda Dunajskiego w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności (Rysunek 14).

Zamknięty pojemnik ciśnieniowy nie mógł zawierać we wnętrzu pęcherzyków powietrza. Pojemnik zanurzano stopniowo od strony zamknięcia korkiem w zbiorniku kriostatu z mieszaniną niezamarzającą (etanol: glikol propylenowy: woda – 1:1:1) w czterech etapach przez 40 minut (4x10 min). Powrót prób do wyjściowego ciśnienia i temperatury polegał na wynurzeniu pojemnika ciśnieniowego ze zbiornika do połowy jego wysokości i ocalepieniu górnej części ciepłym kompresem do temperatury 15°C.

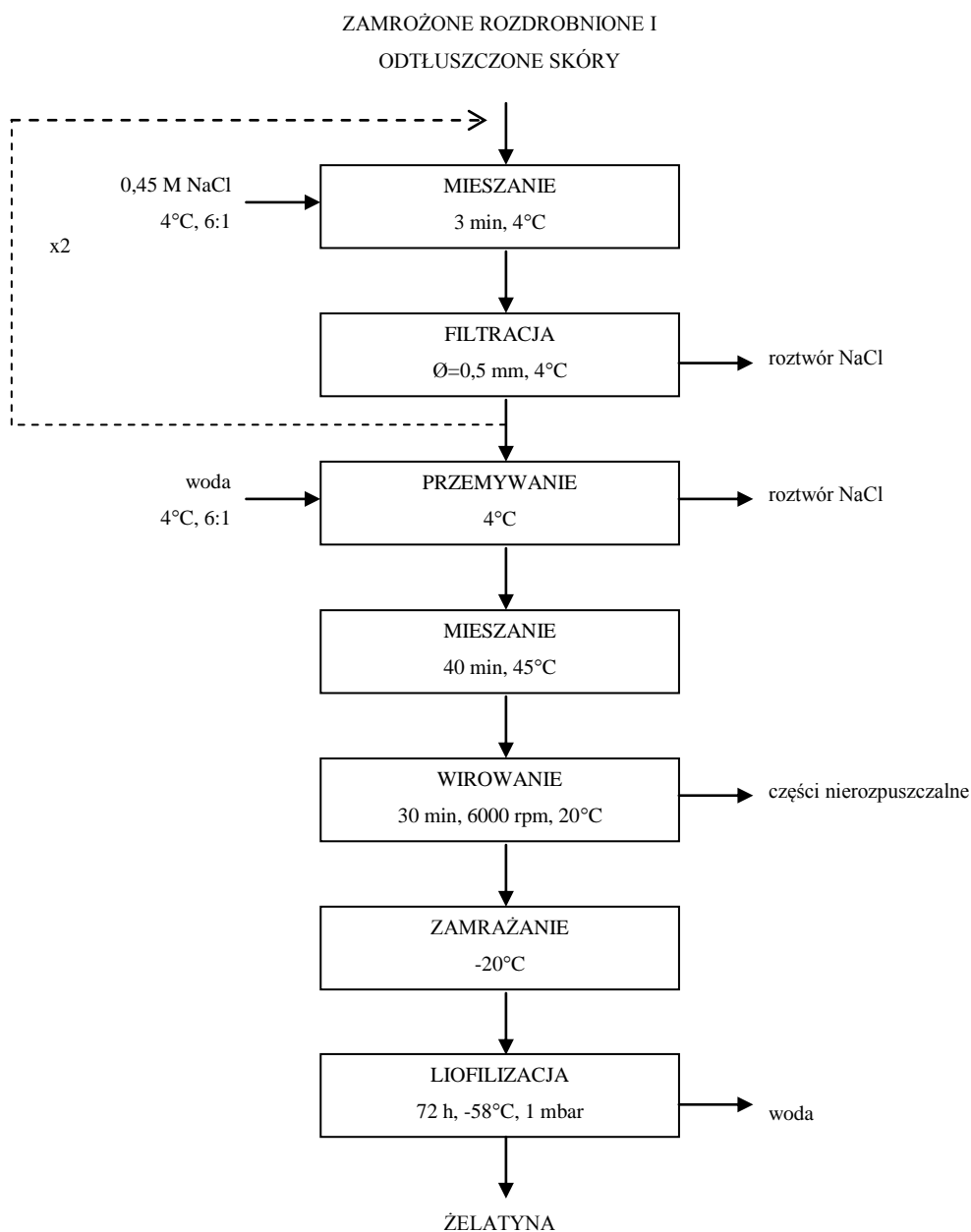


Rysunek 14. Schemat budowy komórki ciśnieniowej wraz z umieszczoną w niej próbką

Następnie pojemnik umieszczano na kilka minut w łaźni wodnej o temperaturze około 20°C w celu całkowitego rozpuszczenia lodu. Czas powrotu prób do ciśnienia wyjściowego (dekompresji) wynosił około 10 minut. Jakość oleju oceniano poprzez oznaczanie liczby nadtlencowej oraz za pomocą testu TBA.

3.2.5 Otrzymywanie żelatyny rybnej

Stałe pozostałości po ekstrakcji oleju były ponownie zamrażane i następnie wykorzystane do ekstrakcji żelatyny wg procedury przedstawionej na Rysunku 15. Otrzymaną żelatynę przechowywano w szczelnych pojemnikach w temperaturze chłodniczej przed dalszym wykorzystaniem.



Rysunek 15. Schemat ideowy ekstrakcji żelatyny (Kołodziejska i in. 2008)

3.2.6 Wytwarzanie mikrokapsulek żelatynowych zawierających olej z łososia

Aby opracować metodę wytwarzania mikrokapsulek z wykorzystaniem suszenia sublimacyjnego sprawdzono stabilność emulsji składających się z oleju i wodnych roztworów żelatyny rybnej oraz efektywność mikrokapsułkowania w zależności od składu i sposobu przygotowania emulsji. Do wodnego roztworu żelatyny dodawano świeżo otrzymany olej ze skór łososia i następnie homogenizowano ok. 2 minut przy 7500rpm w celu wytworzenia emulsji. Przeprowadzono też analogiczne doświadczenie wytwarzając emulsję w warunkach ograniczonego dostępu tlenu – w zamkniętym pojemniku, pod poduszką azotu. Otrzymaną emulsję nanoszono na szalki Petriego (w przypadku doświadczenia z ograniczonym dostępem tlenu w zamkniętych szalkach Petriego wytwarzano poduszkę azotu), zamrażano w temperaturze -20 °C a następnie suszono sublimacyjnie (48h, -58°C, 1Mbar). Wysuszony materiał, przeznaczony do badań przechowalniczych, podzielono na dwie części – jedną z nich rozdrobniono przy użyciu ręcznej tarki w celu otrzymania proszku a drugą pozostawiono w formie nierozdrobnionej. Materiał podzielono na porcje, zamknięto pod poduszką azotową w pojemnikach plastikowych i przechowywano bez dostępu światła w temperaturze pokojowej oraz 4°C.

Przechowywanie miało na celu porównanie szybkości przemian oksydacyjnych zachodzących w niekapsułkowanym oleju oraz oleju zamkniętym w mikrokapsułkach w formie materiału rozdrobnionego i nierozdrobnionego. Po określonym czasie przechowywania oceniono jakość oleju poprzez oznaczenie liczby nadtlencowej, zawartości wtórnych produktów utlenienia i liczby kwasowej.

3.2.7 Otrzymywanie peletek żelatynowych zawierających olej z łososia

Wytwarzanie mikrokapsulek poprzez rozdrabnianie wysuszonego na szalkach Petriego materiału było kłopotliwe, a olej zawarty w mikrokapsułkach utleniał się w szybkim tempie, również pomimo ograniczania dostępu tlenu. Dlatego też, opracowano metodę wytwarzania peletek żelatynowych, które mogłyby bezpośrednio zostać wykorzystane jako forma dozowania suplementu diety. Peletki żelatynowe również wytwarzano metodą emulsyjną w połączeniu z suszeniem sublimacyjnym. Do wodnego roztworu żelatyny dodawano świeżo otrzymany olej z łososia i następnie homogenizowano ok. 2 minut przy 7500rpm w celu wytworzenia emulsji. Otrzymaną emulsję nanoszono w ilości 1ml na płytki z 48 studzienkami, pełniącymi rolę foremek. Emulsję naniesioną do form zamrażano w

temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a następnie suszono sublimacyjnie (48h, $-58\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1Mbar). Wysuszony materiał, przeznaczony do badań przechowalniczych podzielono na porcje, zamknięto pod poduszką azotową w pojemnikach plastikowych. Całość materiału podzielono na dwie części i przechowywano bez dostępu światła – jedną z nich w temperaturze pokojowej a drugą w $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jednocześnie w tych samych warunkach przechowywano surowy olej wydzielony ze skór łososi.

Po określonym czasie przechowywania peletki rozdrabniano za pomocą młynka laboratoryjnego i oceniano jakość oleju poprzez oznaczenie liczby nadtlenkowej i zawartości wtórnych produktów utlenienia a także zmiany składu kwasów tłuszczowych.

3.2.8 Badanie peletek żelatynowych z dodatkiem rozmarynu

Na podstawie wyników wcześniejszych doświadczeń dotyczących wzbogacania oleju surowego dodatkami suszonych ziół i jego stabilności oksydatywnej jako dodatek do peletek wybrano najskuteczniej działający rozmaryn. Peletki żelatynowe z dodatkiem rozmarynu wytwarzano analogicznie, jak w punkcie 3.2.7, przy czym olej uprzednio zmieszano z suszonym rozmarynem. Dodatek rozmarynu wynoszący 1% wybrano biorąc pod uwagę również silny zapach i smak, które w większych stężeniach mogłyby nadawać peletkom niepożądane cechy sensoryczne. Dalsze postępowanie doświadczalne było identyczne jak w punkcie 3.2.7.

3.2.9 Ocena jakości preparatów zawierających kwasy tłuszczowe z rodziny *n-3* dostępnych na polskim rynku

Ocenie poddano osiem preparatów zawierających NNKT *n-3*, dostępnych na polskim rynku jako zarejestrowane suplementy diety. Oznaczono je kolejnymi literami od A do H. Wszystkie preparaty wyprodukowane zostały z oleju rybnego, zamkniętego w miękkich kapsułkach żelatynowych o różnej, w zależności od producenta, gramaturze. Ponieważ celem było zbadanie jakości oleju zawartego w kapsułkach, w takiej formie jaką spożywa konsument, analizy wykonywano bezpośrednio po otwarciu opakowań, pobierając zawartość z kapsulek za pomocą jałowych igieł i natychmiast wykonując oznaczenie, aby uniknąć zbyt długiej ekspozycji wydobytego oleju na czynniki zewnętrzne. Oznaczono stopień utlenienia kwasów tłuszczowych, zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (KT), zidentyfikowano obecne w preparacie klasy związków lipidowych oraz określono skład KT.

3.3 Metody analityczne

Zawartość tłuszczu

Zawartość tłuszczu w materiale określono metodą ekstrakcji Folcha w układzie rozpuszczalników chloroform-metanol, ponieważ pozwala ona na najefektywniejszy odzysk lipidów zarówno natywnych, jak i tych, które uległy procesom oksydacji (Harrod 1998). Oprócz tego, dla porównania określono również zawartość tłuszczu metodą Bligh-Dyera (Honeycutt i in. 1995) oraz metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta (Manirakiza i in. 2001).

Oznaczanie klas lipidów.

Klasy związków lipidowych obecne w suplementach diety określono na podstawie chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z użyciem gotowych płytek z żelem krzemionkowym. Na płytki nanoszono 10% roztwory badanych preparatów w chloroformie w ilości 5µl oraz 1% roztwory wzorców w chloroformie w ilości 1µl. Płytki rozwijano w układzie heksan-eter etylowy-kwas octowy [30:70:0,8], następnie suszono strumieniem azotu, spryskiwano roztworem 50% kwasu siarkowego w metanolu i wywoływano na płycie grzejącej. Identyfikacji klas związków obecnych w próbkach dokonywano na podstawie porównania otrzymanego obrazu rozdziału z wzorcami.

Oznaczanie suchej masy i popiołu.

Zawartość wody w surowcu oznaczono metodą suszarkową susząc materiał w 105°C do stałej masy, wg. normy PN-62/A-86783.

Popiół oznaczano metodą wagową spopielając próbki do stałej masy w 600°C w piecu muflowym.

Oznaczanie zawartości białka ogółem.

Azot ogółem oznaczono metodą Kjeldahla zgodnie z normą PN-75/A-04018. stosowano przelicznik 6,25 azotu ogółem na białko.

Oznaczanie składu KT

Skład KT oznaczono za pomocą chromatografii gazowej (GC). Estry metylowe otrzymano wg normy PN-EN ISO 5509:2000. Stosowano metodę transestryfikacji przy użyciu katalizatora alkalicznego. Estry metylowe kwasów tłuszczowych analizowano na chromatografii gazowej Perkin Elmer Autosystem XL, zaopatrzonej w kolumnę kapilarną

typ DB-23 o wymiarach 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (J&W Scientific). Do analizy wybrano program pracy kolumny w gradiencie temperatur, zapewniający najlepszy rozdział długołańcuchowych KT. Temperatura 120°C utrzymywana była przez 5 minut, następnie zwiększana do 180°C (10°C/min) i po osiągnięciu tej wartości utrzymywana 25 minut, po czym zwiększana do 210°C (10°C/min) i utrzymywana przez 30 minut. Przepływ gazu ustalono na 0,91ml/min, dzielnik strumienia 1:60. Całkowity czas analizy wynosił 65 minut. Temperatura dozownika wynosiła 250°C, detektora płomieniowo jonizacyjnego (FID) - 250°C, a gazem nośnym w kolumnie był hel. Identyfikacji kwasów tłuszczowych dokonano na podstawie wzorców.

Oznaczanie zawartości dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych

Zawartość dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych oznaczano metodą spektrofotometryczną wg normy PN-EN ISO 3656. Wykonywano pomiar absorbancji 1% roztworu próbki oleju w heksanie – widmo wykonywano w zakresie długości fali 240-500nm. Na widmie obserwowano wyraźne piki w okolicach długości fali 232 nm (dieny) oraz 268 nm (trieny). Zawartość dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych wyliczono na podstawie odpowiednich wzorów uwzględniając intensywność pików.

Oznaczanie liczby nadtlenkowej(LOO) i liczby kwasowej(LK)

Stopień utlenienia kwasów tłuszczowych wyrażany liczbą nadtlenkową oznaczono zgodnie z normą PN-EN ISO 3960:2005 a zawartość WKT poprzez oznaczenie liczby kwasowej (LK) na podstawie normy PN-EN ISO 660:1998. Ze względu na operowanie bardzo małymi ilościami tłuszczu wprowadzono modyfikacje sposobu wykonania oznaczenia. W stosunku do procedury podanej w normie zmniejszono naważkę tłuszczu z 5g do 1g a do miareczkowania zastosowano roztwór 0,01M KOH, zamiast, jak przewiduje norma, 0,1M KOH. Stwierdzono doświadczalnie, że zmiana stężenia nie wpływała na końcowy wynik oznaczenia. W przypadku określania LOO w oleju zawartym w strukturze mikrokapsulek uprzednio ekstrahowano go metodą Rose-Gottlieb'a (Heinzelmann i in. 2000a).

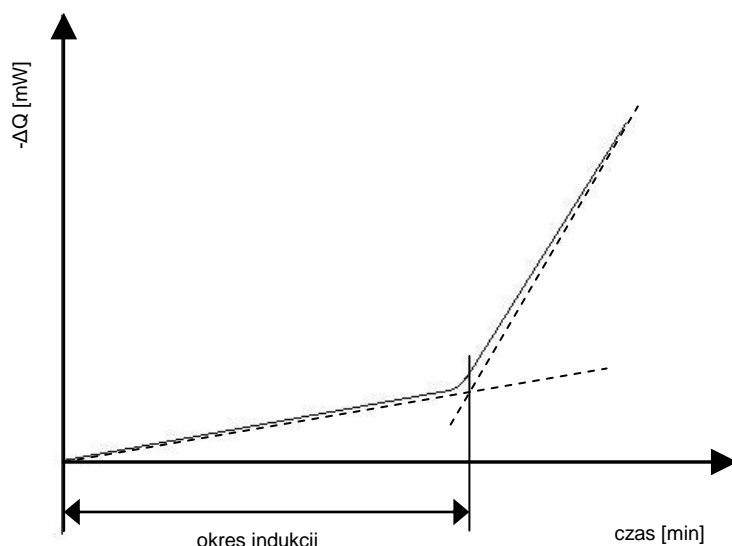
Oznaczanie zawartości wtórnych produktów utlenienia

Zawartość wtórnych produktów utlenienia oznaczano za pomocą testu TBA wg Hu i Zhonga (2010). Oznaczenie polegało na spektrofotometrycznym pomiarze ($\lambda=543$ nm) zawartości substancji dających dających barwną reakcję z kwasem 2-tiobarbiturowym.

Określanie stabilności oksydacyjnej

Stabilności oksydacyjną oleju określono za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Metoda polega na wyznaczaniu okresu indukcji, czyli czasu, po którym następuje gwałtowny wzrost ilości wydzielonego ciepła, ponieważ utlenianie jest procesem egzotermicznym. Przyspieszenie procesu uzyskuje się przez umieszczenie próbki w podwyższonej temperaturze i atmosferze intensywnie przepływającego tlenu.

Okres indukcji wyznaczano metodą graficzną – poprzez wyznaczanie stycznych do krzywych rejestrowanych przez kalorymetr różnicowy. Masa próbki wynosiła ok. 20 mg, prędkość przepływu tlenu 100ml/min, temperatura analizy wynosiła 110°C. Sposób wyznaczania długości okresu indukcji przedstawia Rysunek 16:



Rysunek 16. Wyznaczenie okresu indukcji metodą graficzną (Velasco 2004)

Oznaczanie zawartości barwników karotenoidowych

Zawartość barwników karotenoidowych oznaczano metodą spektrofotometryczną wg Lin i in. (1995) przez pomiar absorbancji roztworu oleju w heksanie przy długości fali $\lambda=446$ nm i wyrażono w przeliczeniu na β -karoten [ppm].

Oznaczanie klas lipidów we frakcji SNZ.

Klasy związków lipidowych obecne we frakcji SNZ wydzielanego oleju określono na podstawie chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z użyciem gotowych płytek z żelem krzemionkowym. Na płytki nanoszono 10% roztwory frakcji SNZ badanych olejów w chloroformie w ilości 5 μ l oraz 1% roztwory wzorców w chloroformie w ilości 1 μ l. Jako układ

rozwijający zastosowano mieszaninę heksan-eter etylowy-kwas octowy [30:70:0,8]. Płytki z naniesionymi próbkami po wyjęciu z komory chromatograficznej suszono strumieniem azotu, spryskiwano roztworem 50% kwasu siarkowego w metanolu i wywoływano na płycie grzejnej. Identyfikacji klas związków obecnych w próbkach dokonywano na podstawie porównania czasów retencji obecnych na chromatogramie z czasami retencji wzorców.

Oznaczanie zawartości kolagenu (hydroksyproliny)

Zawartość hydroksyproliny oznaczano spektrofotometrycznie metodą PN-ISO 3496:2000. Próby hydrolizowano 6 godzin w roztworze 6M HCl. Po wywołaniu reakcji barwnej z aldehydem p-dimetyloaminobenzoowym mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda=553$ nm i przeliczono na zawartość kolagenu w surowcu (stosowano przelicznik 14,7) (Żelechowska i in. 2010).

Określenie stabilności emulsji

Fazę wodną emulsji stanowił roztwór żelatyny rybnej lub wieprzowej o różnych stężeniach (1-20%). Do roztworu żelatyny dodawano olej rybny, tak aby stosunek masy rdzenia do masy substancji tworzącej otoczkę wynosił od 1:0,1 do 1:1,8. Następnie mieszaninę homogenizowano ok. 2 minut do uzyskania jednolitej emulsji.

Po 10 ml emulsji umieszczano w cylindrach miarowych, szczelnie zamykano i pozostawiano na 24 godziny. Emulsje wytworzone z żelatyny wieprzowej, aby zapobiec zżelowaniu, przechowywano w temperaturze 50 °C, natomiast z żelatyny rybnej w temperaturze pokojowej. Następnie odczytywano ilość oddzielonego oleju i na tej podstawie określono indeks stabilności emulsji (ESI) wg wzoru:

$$ESI = 1 - \frac{\text{całkowita objętość oddzielonego oleju}}{\text{całkowita objętość oleju w emulsji}}$$

Wartość ESI mieści się w zakresie od 0 do 1, ESI=1 świadczy o maksymalnej stabilności emulsji.

Określenie efektywności mikrokapsułkowania

Efektywność mikrokapsułkowania (ME), w literaturze określaną również jako wydajność procesu mikrokapsułkowania, wyznaczano na podstawie wzoru:

$$ME = \frac{(OC - OW)}{OC} \times 100\%$$

gdzie: *OC* – całkowita zawartość oleju w mikrokapsułkach; *OW* – olej niezwiązany w strukturze mikrokapsułek (wolny).

Oznaczanie ilości oleju niezwiązanego w strukturze mikrokapsułek

Oznaczanie ilości niezwiązanego w strukturze mikrokapsułek oleju wykonano według zmodyfikowanej metody Heinzelmanna i in. (2000a). Około 0,5 g mikrokapsułek wstrząsano z 2 ml heksanu przez 30 sekund. Następnie roztwór przesączało do uprzednio zważonej kolby kulistej, odparowywano rozpuszczalnik i grawimetrycznie oznaczono ilość oleju wolnego.

Oznaczanie całkowitej zawartości oleju w mikrokapsułkach

Całkowitą zawartość oleju w mikrokapsułkach oznaczano według zmodyfikowanej metody Rose-Gottlieb'a (Heinzelmanna i in. 2000a).

Około 0,5 g mikrokapsułek rozpuszczano w 5 ml wody o temperaturze 45°C z dodatkiem 1 ml 25% roztworu amoniaku. Następnie dodawano alkohol etylowy (5 ml) w celu precipitacji białek i ekstrahowano tłuszcz równymi ilościami eteru dietylowego oraz heksanu (po 10 ml). Po rozwarstwieniu mieszaniny, górną warstwę przesączało do uprzednio zważonej kolby kulistej, odparowano rozpuszczalniki i grawimetrycznie oznaczono całkowitą zawartość tłuszczu w badanym materiale.

Analiza statystyczna wyników

Wszystkie zamieszczone w tabelach oraz na wykresach wyniki są średnią z co najmniej trzech niezależnych oznaczeń ± odchylenie standardowe. W wybranych wariantach wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programu STATGRAPHICS version 2.1 (Statistical Graphics Corporation, USA). Zastosowano analizę wariancji z klasyfikacją pojedynczą.

4 WYNIKI I DYSKUSJA

4.1 OKREŚLENIE OPTYMALNYCH WARUNKÓW WYDOBYWANIA OLEJU ZE SKÓR ŁOSOSI I OCENA JAKOŚCI PRODUKTU

4.1.1 Charakterystyka surowca

Zawartość poszczególnych składników w surowych skórkach łososi hodowlanych oraz, dla porównania, w skórkach łososi dzikich (bałtyckich) przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Procentowa zawartość suchej masy, białka, popiołu i tłuszczu w skórkach po mechanicznej obróbce łososi

	Łosoś hodowlany ¹	Łosoś dziki ¹
Sucha masa	48,1 ± 2,0	36,2 ± 3,4
Białko ogółem N _{og} x 6,25	21 ± 1,4	22,9 ± 2,4
Popiół	2,5 ± 0,3	1,5 ± 0,1
Tłuszcz	28 ± 1,4	8,6 ± 0,1

¹ Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób ± odchylenie standardowe.

W przypadku łososi hodowlanych ponad połowę masy surowca stanowi woda, natomiast blisko 30% masy to tłuszcz. Można więc stwierdzić, że skóry łososi hodowlanych, jako odpady po odkórzaniu mechanicznym są dobrym materiałem do odzysku oleju rybnego. Ze względu na specyfikę mechanicznego odkórzania łososi, powstające skóry zawierają podskórną tkankę tłuszczową oraz stosunkowo dużo tkanki mięśniowej. Olej pochodzi faktycznie nie z samej skóry ryby, ale z tkanek do niej przylegających.

Skóry łososi dzikich zawierają znacznie mniej tłuszczu – o ok. 70%, zaś zawartość białka jest podobna jak w skórkach łososi hodowlanych. Podobną zależność stwierdzili Hamilton i in. (2005) badając odkórzane filety z łososi – zawartość lipidów w mięsie łososia hodowlanego (16,6%) była większa niż w mięsie łososia dzikiego (6,4%). Ponieważ zawartość tłuszczu związana jest ściśle ze stadium rozwojowym ryby, może to być główną przyczyną różnic pomiędzy zawartością tłuszczu w tkankach łososi dzikich i hodowlanych. Ponadto ryby hodowlane są regularnie karmione specjalną odżywcza paszą i w związku z tym nie muszą korzystać z rezerw tłuszczowych, mogą natomiast odkładać nadmiar składników energetycznych w postaci tłuszczu. W naturalnym środowisku dzikie łososie nie mają tak

łatwego dostępu do wysokokalorycznego pożywienia a także zużywają tłuszcz w trakcie wędrówki na tarło.

Analiza składu KT (Tabela 8) wskazuje, że w oleju ze skór łososi nienasycone kwasy tłuszczowe stanowią około 80% całkowitej zawartości KT.

Tabela 8. Skład kwasów tłuszczowych w oleju ze skór łososi hodowlanych i dzikich

Kwas tłuszczowy	Olej ze skór łosia	
	dzikiego ¹	hodowlanego ¹
C 14:0	3,2±0,0	3,9±0,0
C 15:0	0,3±0,0	0,3±0,0
C 16:0	15,0±0,1	11,9±0,0
C 17:0	0,1±0,0	0,5±0,0
C 18:0	2,5±0,1	2,5±0,0
C 20:0	0,0±0,0	0,5±0,0
ΣSAFA	21,1±0,0 ^a	18,6±0,0 ^b
C 14:1	0,1±0,0	0,1±0,0
C 16:1	0,4±0,0	0,2±0,0
C 16:1 n-7	4,0±0,0	4,7±0,0
C 17:1	0,5±0,0	0,4±0,0
C 18:1 n-9	23,0±0,2	22,7±0,1
C 18:1 n-7	2,5±0,0	2,8±0,0
C 20:1 n-9	1,2±0,1	4,9±0,1
C 22:1 n-11	0,0±0,0	4,1±0,0
C 22:1 n-9	0,2±0,0	0,6±0,0
C 24:1	1,1±0,0	0,6±0,0
ΣMUFA	33,0±0,0 ^a	41,1±0,0 ^b
C 18:2 n-6	4,5±0,0	6,8±0,0
C 18:3 n-3	2,8±0,0	2,7±0,0
C 18:4 n-3	1,8±0,0	1,4±0,0
C 20:2 n-6	0,9±0,0	0,7±0,0
C 20:3 n-6	0,1±0,0	0,2±0,0
C 20:3 n-3	0,4±0,0	0,3±0,0
C 20:4 n-6	0,6±0,0	0,7±0,0
C 20:4 n-3	2,0±0,0	1,4±0,0
C 20:5 n-3	6,4±0,1	7,8±0,0
C 22:5 n-3	3,2±0,0	3,7±0,0
C 22:6 n-3	17,7±0,2	9,1±0,0
ΣPUFA	40,4±0,1 ^a	34,8±0,0 ^b
EPA+DHA	24,1±0,1 ^c	16,9±0,0 ^f

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

SAFA zarówno w oleju ze skór łososi hodowlanych jak i dzikich stanowią jedynie ok. 20%. W największej ilości wśród SAFA występuje kwas palmitynowy C16:0, natomiast wśród MUFA - kwas oleinowy (C18:1). Zawartość MUFA była mniejsza w oleju ze skór łososi dzikich o ok. 20%, a jednocześnie zawartość PUFA była wyższa niż w oleju ze skór łososi hodowlanych. Głównymi składnikami frakcji PUFA były kwasy EPA i DHA, przy czym lipidy skór łososia hodowlanego zawierały jedynie 17% tych kwasów tłuszczowych, podczas gdy lipidy skór łososia dzikiego - 24%.

Z drugiej strony Blanchet i in. (2005) wykazał, że zawartość EPA + DHA była około 17% wyższa w lipidach mięsa łososi hodowlanych niż dzikich. Różnice mogą być spowodowane tym, że zawartość tłuszczu i skład KT ryby zależy od pory roku, co z kolei jest ściśle związane z rozmnażaniem i tarłem. Dlatego też, jeżeli w badaniach wykorzystano ryby w różnych stadiach rozwoju, wyniki mogą być różne. Blanchet i in. (2005) podkreślali również fakt, że badane lipidy pochodziły wyłącznie z tkanki mięśniowej, bez udziału tłuszczu z tkanki podskórnej i krezki otrzewnej, a więc odmiennego surowca niż skóry łososi.

W Tabeli 9 przedstawiono wyniki oznaczeń podstawowych wyróżników jakości oleju ze skór łososi wyekstrahowanym metodą Soxhleta. Podczas gdy LOO w oleju ze skór łososi hodowlanych była bardzo niska, w oleju uzyskanym ze skór łososi dzikich była kilkadziesiąt razy większa i przekraczała znacznie poziom zawartości nadtlenu, przy którym olej można by uznać jako zdatny do spożycia. Również LK była o ok. 6 razy większa w oleju ze skór łososi dzikich. Tak wysokie wartości LOO oraz LK mogły być spowodowane tym, że skóry łososi dzikich pochodziły przypuszczalnie z ryb przechowywanych zamrażalniczo, natomiast łososi hodowlanych – ze świeżego surowca.

Tabela 9. LOO i LK olejów ze skór łososi ekstrahowanych metodą Soxhleta

Olej ze skór łososi	LOO ¹	LK ¹
	[mEq O ₂ /kg]	[mg KOH/g]
hodowlanych	0,88 ± 0,01	0,98 ± 0,02
dzikich	76,42 ± 0,67	6,77 ± 0,11

¹ Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

4.1.2 Określenie wpływu warunków wydobywania oleju ze skór łososi hodowlanych na wydajność i jakość produktu.

We wstępnych eksperymentach ustalono wielkość reprezentatywnej próbki do badań. Stwierdzono, że najmniejsza próba, która pozwala na uzyskanie powtarzalnych wyników to

ok. 100g dokładnie wymieszanego surowca. Przy mniejszych próbach (50 i 25g) występowały duże rozrzuty wyników, mimo ujednoczenia surowca.

Stwierdzono, że olej izolowany z surowca metodą „na gorąco” (z ogrzewaniem pulpy zhomogenizowanej skóry z wodą do 95°C) ma stosunkowo wysoką LOO i LK, natomiast jest uzyskiwany z dobrą wydajnością (Tabela 10). Metodę „na gorąco” wybrano jako odpowiednik procesu przemysłowego, gdzie stosowane są dość wysokie temperatury podczas wydobywania oleju.

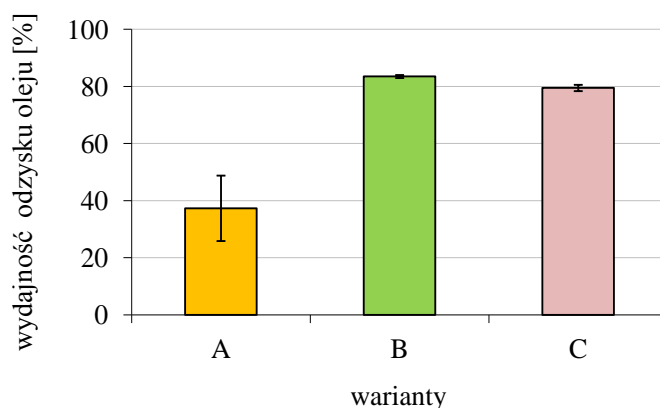
Tabela 10. Charakterystyka oleju izolowanego ze skór „na gorąco”

wydajność	LOO ¹	LK ¹
[%]	[mEqO ₂ /kg]	[mgKOH/g]
91,1±0,4	9,2±0,6	1,34±0,03

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

W następnym etapie podjęto próbę opracowania nowej metody ekstrakcji, która pomijałaby ogrzewanie pulpy, aby tym samym zapobiec przemianom oksydacyjnym w gotowym produkcie. Zamrożony, rozdrobniony surowiec homogenizowano (wariant A) lub tylko mieszano z wodą (wariant B) o temperaturze 50°C (temperatura mieszaniny nie przekraczała 15°C). Mieszaninę skór i wody wirowano i po oddzieleniu części stałych otrzymywany supernatant ogrzewano do temperatury 50°C celem denaturacji białek i ponownie go wirowano, aby oddzielić olej. W przypadku surowca homogenizowanego nawet po wirowaniu nie uzyskano pełnego rozdzielania oleju od fazy wodnej i innych składników, a oddzielona frakcja olejowa zawierała zanieczyszczenia w postaci zdenaturowanych białek. Jest to spowodowane tym, że uwolnione z błon podczas homogenizacji fosfolipidy sprzyjają tworzeniu emulsji i wiążą krople tłuszczu, uniemożliwiając tym samym ich oddzielenie od reszty supernatantu. Wydajność odzyskiwania oleju z homogenizowanej próby wynosiła tylko 37% (Rysunek 17). Natomiast odzysk oleju z rozdrobnionego surowca mieszanego z wodą wynosił aż 84%.

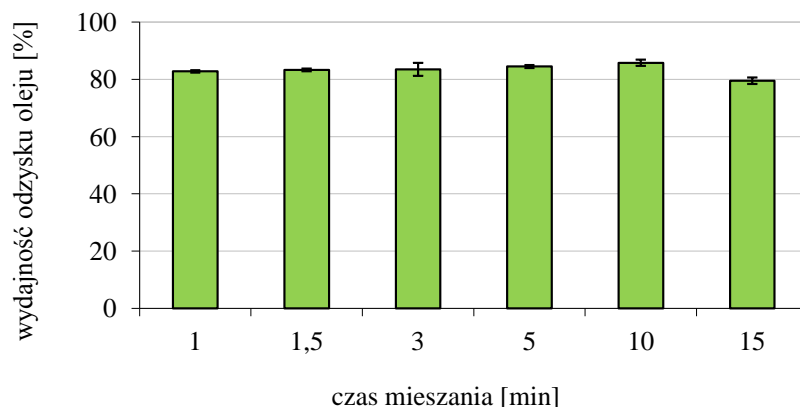
Następnie sprawdzono, czy konieczne jest ogrzewanie supernatantu uzyskanego w poprzednim etapie procesu (wariant C).



Rysunek 17. Wpływ mieszania oraz homogenizacji na wydajność odzysku oleju ze skór. Wariant A (■) – skóry homogenizowane z wodą, supernatant ogrzewany, wariant B (■) – skóry mieszane z wodą, supernatant ogrzewany, wariant C (■) - skóry mieszane z wodą, supernatant nieogrzewany. Wyniki są średnią z czterech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe.

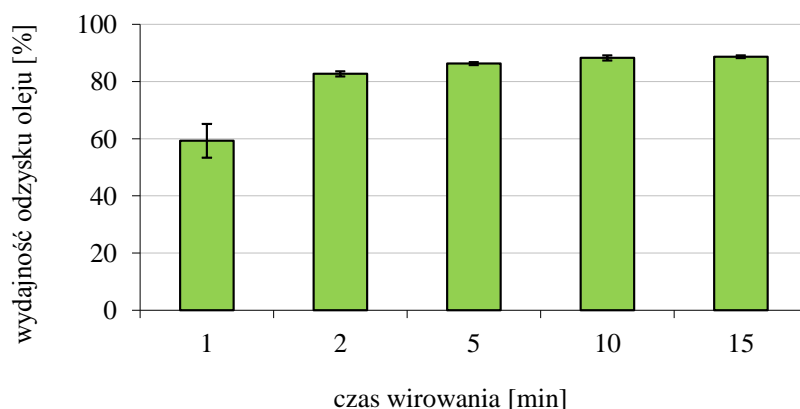
Każda operacja ogrzewania z punktu widzenia przemysłowego jest bardzo energochłonna i ze względu na koszty pożądane jest, aby uzyskiwać zadowalające wydajności produktów przy jednoczesnym jak najmniejszym zużyciu energii. Wydajność izolacji oleju bez ogrzewania supernatantu wynosiła ok. 80%, była więc tylko nieznacznie mniejsza niż w przypadku supernatantu ogrzewanego do 50°C (Rysunek 17). Stwierdzono zatem, że ten etap może być pominięty w procesie ekstrakcji oleju ze skór łososia. W związku z tym, że podczas całego procesu izolacji oleju temperatura nie przekraczała 15°C, opracowaną procedurę nazwano metodą odzysku „na zimno”. W dalszym etapie pracy dokonano optymalizacji tej metody, aby uzyskiwać jak najlepszą wydajność i jakość oleju.

Określono wpływ czasu mieszania surowca z wodą w proporcjach 1:1 (w/v). Temperatura mieszaniny nie przekraczała 15°C, również po 15 minutach procesu. Już po 1 minucie mieszania wydajność ekstrakcji oleju była bardzo duża i wynosiła ok. 83%. Wydłużenie czasu mieszania do 15 minut powodowało zmniejszenie wydajności do 80% (Rysunek 18). Przepuszczalnie w tych warunkach tworzyła się bardziej trwała emulsja. Uzyskane wyniki wskazują, że nawet bardzo krótkie mieszanie, nie przekraczające 1 minuty, jest wystarczające do otrzymywania oleju ze skór z dużą wydajnością.



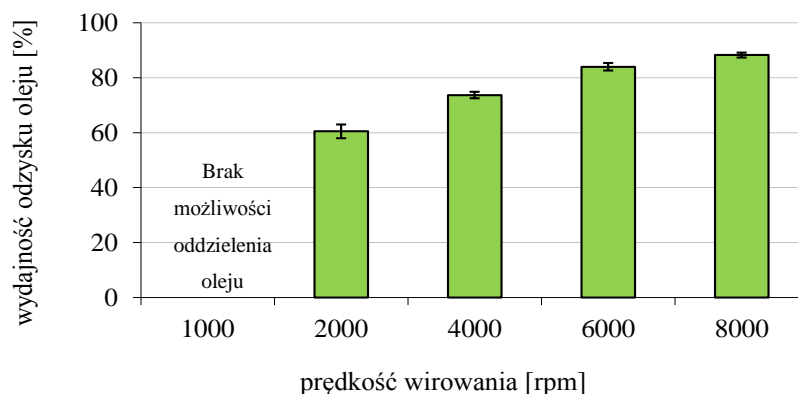
Rysunek 18. Wpływ czasu mieszania surowca z wodą na wydajność odzysku oleju ze skór
Wyniki są średnią z czterech oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe

W kolejnym etapie sprawdzono wpływ czasu i prędkości wirowania mieszaniny na wydajność odzysku tłuszczu. Stwierdzono, że już po 2 minutach wirowania w 15°C przy 8000 obr/min lub po 10 minutach przy 6000 obr/min wydajność oleju wynosi 83-84% (Rysunek 19 i Rysunek 20).



Rysunek 19. Wpływ czasu wirowania mieszaniny surowca z wodą na wydajność odzysku oleju ze skór (prędkość wirowania: 8000 obr/min)
Wyniki są średnią z czterech oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe.

Po wirowaniu poniżej tej prędkości odzysk oleju jest dużo mniejszy, ponieważ pozostaje on zemulgowany w warstwie wodnej, a przy 1000 obr/min rozdział w ogóle nie jest możliwy (Rysunek 20).



Rysunek 20. Wpływ prędkości wirowania mieszaniny surowca z wodą na wydajność odzysku oleju ze skór. (czas wirowania: 10 minut)
Wyniki są średnią z czterech oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe

4.1.3 Określenie jakości i składu kwasów tłuszczowych oleju izolowanego ze skór łososi

Sprawdzono wpływ czasu mieszania surowca z wodą oraz czasu wirowania uzyskanej mieszaniny na zawartość pierwotnych produktów utleniania kwasów tłuszczowych oraz produktów hydrolizy w otrzymywanym oleju. W badanym zakresie czasu (1-15 minut) nie wykazano znaczących różnic w wartości LOO oraz wartości LK (Tabela 11). Prowadzenie procesu ekstrakcji oleju w niskich temperaturach i przez krótki czas, chroni lipidy przed utlenianiem.

Tabela 11. Wartości liczby nadtlenkowej i liczby kwasowej w zależności od warunków wydzielania lipidów ze skór łososi

Warunki wydzielania lipidów	LOO [mEq O ₂ /kg] ¹	LK [mg KOH/g] ¹
Czas mieszania surowca z wodą w temperaturze <15°C [minuty]		
1	0,75 \pm 0,02	1,05 \pm 0,02
5	0,80 \pm 0,05	1,06 \pm 0,02
10	0,75 \pm 0,04	1,09 \pm 0,01
15	0,78 \pm 0,02	1,05 \pm 0,02
Czas wirowania mieszaniny w 20°C [minuty]		
1	0,80 \pm 0,04	1,08 \pm 0,04
5	0,75 \pm 0,06	1,04 \pm 0,02
10	0,75 \pm 0,04	1,05 \pm 0,01
15	0,76 \pm 0,02	1,05 \pm 0,02
Ekstrakcja Folcha	0,80 \pm 0,1	0,43 \pm 0,01

¹ Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe.

Porównano również skład kwasów tłuszczowych w oleju uzyskanym za pomocą ekstrakcji Folcha i izolacji oleju „na zimno” poprzez mieszanie surowca z wodą. Wyniki umieszczono w Tabeli 12.

Tabela 12. Skład kwasów tłuszczowych w oleju uzyskanym ze skór łososia różnymi metodami

Kwas tłuszczowy	Zawartość kwasów tłuszczowych [%] ¹	
	Ekstrakcja chemiczna	Ekstrakcja „na zimno”
	Folcha	zimno”
14:0	3,9 ± 0,0	4,1 ± 0,2
14:1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
15:0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
16:0	10,9 ± 0,0	11,4 ± 0,5
16:1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
16:1 <i>n-7</i>	4,7 ± 0,0	4,7 ± 0,3
17:0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
17:1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
18:0	2,5 ± 0,0	2,5 ± 0,0
18:1 <i>n-9</i>	22,7 ± 0,1	23,4 ± 0,6
18:1 <i>n-7</i>	2,8 ± 0,0	2,9 ± 0,1
18:2 <i>n-6</i>	6,8 ± 0,0	7,1 ± 0,2
18:3 <i>n-3</i>	2,7 ± 0,0	2,8 ± 0,2
18:4 <i>n-3</i>	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,0
20:0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
20:1 <i>n-9</i>	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1
20:2 <i>n-6</i>	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0
20:3 <i>n-6</i>	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
20:4 <i>n-6</i>	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0
20:3 <i>n-3</i>	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
20:4 <i>n-3</i>	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,1
20:5 <i>n-3</i> (EPA)	7,8 ± 0,0	7,3 ± 0,4
22:1 <i>n-11</i>	4,1 ± 0,0	4,2 ± 0,1
22:1 <i>n-9</i>	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0
22:5 <i>n-3</i>	3,7 ± 0,0	3,4 ± 0,5
22:6 <i>n-3</i> (DHA)	9,1 ± 0,0	8,4 ± 0,3
24:1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0
Inne	5,5	5,2

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

LOO olejów izolowanych „na zimno” ze skór (bez użycia rozpuszczalników organicznych) była zbliżona jak w oleju uzyskanym metodą ekstrakcji Folcha. Natomiast LK była o ok. 60% większa niż w oleju ekstrahowanym rozpuszczalnikami. Pomimo to, wartości LK w oleju izolowanym eksperymentalną metodą „na zimno” są bardzo niskie i nie przekraczają dopuszczalnych norm.

Olej otrzymywany metodą „na zimno” nie wykazuje znaczących różnic w składzie kwasów tłuszczowych w stosunku do oleju otrzymanego w wyniku ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Zawartość kwasów EPA i DHA, które są szczególnie pożądane do wytwarzania preparatów farmaceutycznych (suplementów diety) jest jedynie o ok. 10% mniejsza niż w przypadku ekstrakcji Folcha.

Uzyskane wyniki wskazują, że metoda ekstrakcji „na zimno” nadaje się do pozyskiwania oleju rybnego o właściwym mu charakterystycznym składzie kwasów tłuszczowych, a co jest szczególnie istotne, nie prowadzi do zmian oksydacyjnych i hydrolitycznych.

4.1.4 Oznaczenie strat kolagenu (hydroksyproliny) w surowcu podczas ekstrakcji oleju ze skór łososi

Pozostałości skór po izolacji oleju mogą posłużyć jako surowiec do otrzymywania żelatyny rybnej, która następnie zostałaby wykorzystana do mikrokapsułkowania oleju. Jest to sposób na kompleksowe zagospodarowanie skór pochodzących z mechanicznego odskórzania łososi hodowlanych, bowiem z tego samego surowca jest najpierw odzyskiwany olej, a następnie żelatyna. Sprawdzone, czy w wyniku zastosowanej procedury wydobywania oleju mogą następować straty kolagenu. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że zawartość kolagenu w pozostałości po izolacji oleju jest na tym samym poziomie, co w skórkach wyjściowych (Tabela 13).

Tabela 13. Zawartość kolagenu w surowcu przed i po ekstrakcji oleju

surowiec	Zawartość kolagenu Hypx14,7
Przed ekstrakcją oleju	19,8±2,8
Po ekstrakcji oleju	19,6±6,4

Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Ponadto izolacja tłuszczu jednocześnie prowadzi do wstępnego oczyszczenia surowca kolagenowego. W innym przypadku surowiec, czyli skóry, należy oczyścić ręcznie z resztek mięsa i tłuszczu przed przystąpieniem do ekstrakcji żelatyny. Wyniki te wskazują, że istnieje potencjalna możliwość otrzymania w jednym procesie technologicznym, z dobrą wydajnością, obu pożądaných produktów: oleju rybnego i żelatyny.

4.2 WPLYW PRZECHOWYWANIA SKÓR ŁOSOSI NA JAKOŚĆ OTRZYMANEGO OLEJU

Po ustąpieniu stężenia pośmiertnego tkanki ryb są doskonałym źródłem węgla i azotu dla mikroorganizmów. Rozwijające się drobnoustroje powodują niekorzystne zmiany surowca. Dlatego też, szczególne znaczenie dla jakości finalnych produktów ma temperatura oraz czas przechowywania surowców rybnych. Skóry ryb, jako odpad z produkcji, zazwyczaj nie są tak starannie chłodzone jak ryby przeznaczone na rynek żywnościowy, a z powodu zastrzeżeń zdrowotnych ogranicza się ich utrwalanie za pomocą środków chemicznych. Najkorzystniej jest oczywiście przetwarzać świeże odpady na inne, wartościowe produkty bezpośrednio w zakładzie przetwórstwa ryb, jednakże najczęściej nie jest to możliwe. Wiele przetwórci ryb i surowców pochodzenia morskiego nie zajmuje się przetwarzaniem odpadów, jedynie przekazuje je dalej do innych wyspecjalizowanych zakładów, np. wytwórni mączek paszowych. Dobrym rozwiązaniem wydaje się mrożenie surowców, jednakże nawet w temperaturze poniżej 0°C nie można wykluczyć niekorzystnych chemicznych i enzymatycznych przemian ich składników, w tym lipidów. W kolejnym etapie pracy podjęto więc badania nad wpływem czasu przechowywania zamrożonego surowca oraz jego rozdrobnienia na jakość otrzymywanego oleju. Celem było określenie optymalnych warunków przechowywania skór, które gwarantowałyby dobrą jakość otrzymywanego z nich oleju, tak aby mógł on zostać wykorzystany do celów spożywczych.

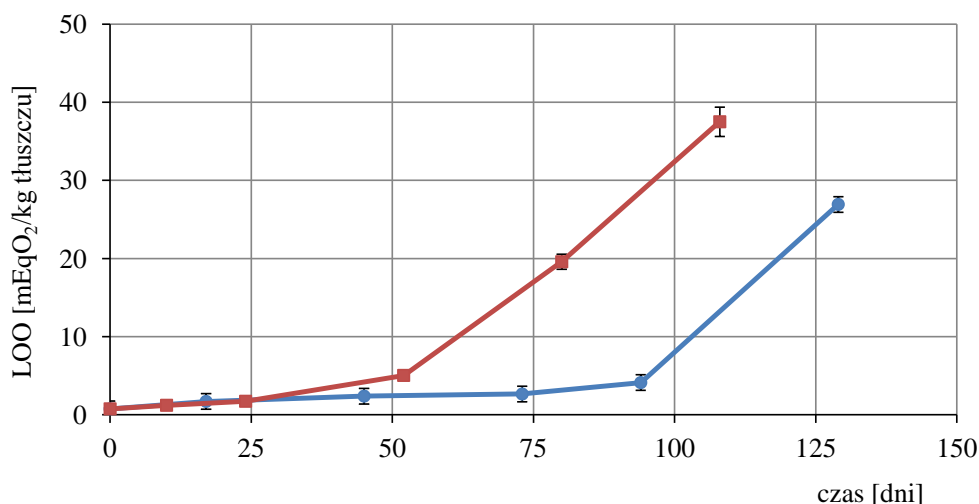
4.2.1 Liczba nadtlenkowa

Rysunek 21 przedstawia zmiany liczby nadtlenkowej olejów wyizolowanych ze skór rozdrobnionych oraz ze skór nierozdrobnionych przechowywanych w warunkach zamrażalniczych.

W obu przypadkach zaobserwowano, że pomimo przechowywania surowca w temperaturze -20°C, zachodziły w nim przemiany oksydacyjne, a LOO olejów po czasie

zależnym od formy surowca, przekroczyły dopuszczalne wartości, czyli 15 mEqO₂/kg oleju (według Codex Alimentarius). Świadczy to o znacznym pogorszeniu jakości oleju; wówczas staje się on nieprzydatny do spożycia. Lipidy w mrożonych surowcach rybnych utleniają się wskutek autooksydacji jak również w wyniku reakcji enzymatycznych. W oleju ze skór przechowywanych w stanie nierozdrobnionym liczba nadtlenkowa osiągnęła wartości powyżej 15 mEqO₂/kg po 110 dniach przechowywania. Zaś w oleju ze skór rozdrobnionych, proces utleniania przebiegał szybciej, liczba nadtlenkowa przekroczyła 15 mEqO₂/kg po 70 dniach przechowywania.

Zwiększenie szybkości utlenienia w oleju izolowanym ze skór rozdrobnionych związane jest najprawdopodobniej z lepszym dostępem tlenu niż w przypadku całych skór. Rozdrobnienie surowca sprzyja także większej dostępności do substratu enzymów endogennych pochodzących z mięsa lub wydzielanych przez bakterie psychrofilne bytujące na skórze ryb, a także ułatwia kontakt lipidów z metalami ciężkimi, które są obecne w skórze ryby.



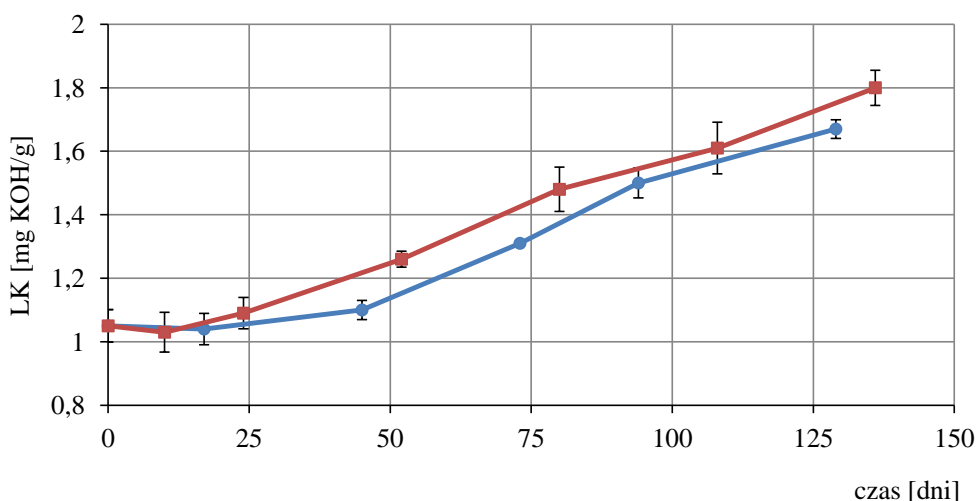
Rysunek 21. Zmiany liczby nadtlenkowej olejów: wyizolowanego ze skór rozdrobnionych (■) oraz ze skór nierozdrobnionych (●) przechowywanych w -20°C

Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Uzyskane wyniki wskazują, że aby surowiec mógł zostać wykorzystany do wytwarzania wysokiej jakości oleju (o niskiej LOO), należałoby go przechowywać w formie nierozdrobnionej i nie dłużej niż ok. 100 dni, przed przystąpieniem do odzyskiwania oleju.

4.2.2 Liczba kwasowa

Początkowo, podczas zamrażalniczego przechowywania skór LK zawartego w nich oleju kształtowała się na podobnym poziomie, niezależnie od formy surowca, przez okres do 20 dni przechowywania (Rysunek 22) a następnie zaczęła wzrastać. Na skutek zniszczenia lizosomów podczas zamrażania zostają uwolnione enzymy, które zwiększają szybkość uwalniania kwasów tłuszczowych. Chociaż rozdrobnienie, obok gatunku i biologicznego stanu ryby, może być jednym z czynników wpływających na szybkość hydrolizy w warunkach zamrażalniczych, to jednak nie stwierdzono dużych różnic pomiędzy LK olejów izolowanych ze skór rozdrobnionych i przechowywanych w całości (choć są one istotne statystycznie). Zarówno w przypadku lipidów izolowanych ze skór rozdrobnionych, jak i przechowywanych w całości, wartości liczb kwasowych nie przekroczyły 2 mg KOH/kg tłuszczu nawet po ok. 135 dniach przechowywania – są to bardzo małe wartości świadczące o niewielkim stopniu hydrolizy oleju.



Rysunek 22. Zmiany liczby kwasowej olejów: wyizolowanego ze skór rozdrobnionych (■) oraz ze skór nierozdrobnionych (●) przechowywanych w -20°C
Wyniki są średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± odchylenie standardowe

4.2.3 Zawartość dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych

Zarówno w oleju ze skór całych jak i rozdrobnionych ma miejsce wzrost zawartości dienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych w czasie zamrażalniczego przechowywania (Tabela 14 i Tabela 15).

Kwasy o wiązaniach sprzężonych, tworzące się z kwasów o wiązaniach izolowanych, są pierwszymi produktami procesu utleniania (Tynek i Drozdowski, 1998), które mogą ulegać

dalszej degradacji do aldehydów i ketonów. Powstawanie układów sprzężonych związane jest z przesunięciem podwójnego wiązania w następstwie mezomerii gdy autooksydacji ulegają kwasy polienowe o strukturze pentadienowej. Ponieważ rodnik powstały przy węglu metylenowym nie jest stabilny, w wyniku przegrupowania elektronów tworzą się układy dwóch lub trzech sprzężonych wiązań podwójnych. Stwierdzono dość dobrą korelację pomiędzy zawartością dienów a wartością LOO (Shahidi i in. 1994, Wanasundara i in. 1995).

Tabela 14. Zmiany w zawartości dienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych w oleju izolowanym ze skór nierozdrobnionych i rozdrobnionych przechowywanych w -20°C

Czas przechowywania [dni]	Zawartość dienów w oleju izolowanym ze skór [%] ¹	
	nierozdrobnionych	rozdrobnionych
0	0,328 ±0,016 ^{Aa}	0,328 ±0,011 ^{Aa}
17	0,418 ±0,006 ^{Abcd}	0,356 ±0,002 ^{Ba}
45	0,390 ±0,019 ^{Abc}	0,395 ± 0,029 ^{Ab}
73	0,444 ±0,021 ^{Ac}	0,441 ±0,007 ^{Ac}
94	0,369 ±0,042 ^{Aab}	0,469 ±0,007 ^{Bc}
129	0,453 ±0,028 ^{Ad}	0,509 ±0,011 ^{Bd}

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-B) i kolumnach (a-d) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

Do około 94 dni przechowywania nie obserwowano większych różnic pomiędzy zawartością dienów w oleju ze skór rozdrobnionych jak i nierozdrobnionych. Ponadto, w obydwu formach surowca wartość ta lekko wzrastała. Po 94 dniach wyraźnie widać, że zawartość dienów w oleju ze skór rozdrobnionych jest większa niż w oleju ze skór przechowywanych w całości. Po 129 dniach przechowywania różnica ta wynosiła ok. 12% (Tabela 14). Większa zawartość dienów może świadczyć o szybszym postępie utleniania lipidów, co znajduje również potwierdzenie w prezentowanych wcześniej wynikach oznaczania LOO.

W oleju wyizolowanym ze skór przechowywanych w całości nie zauważono widocznych zmian zawartości trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych (Tabela 15).

Podobnie, aż do 73 dni zawartość trienów w oleju ze skór rozdrobnionych była na zbliżonym poziomie, co w oleju ze skór przechowywanych w całości. Po 94 dniach przechowywania rozdrobnionych skór zawartość trienów zmniejszyła się do zera (Tabela 15), prawdopodobnie wskutek ich przekształcenia do innych, wtórnych produktów oksydacji.

Tabela 15. Zmiany w zawartości trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych w oleju izolowanym ze skór nierozdrobnionych i rozdrobnionych przechowywanych w -20°C

Czas przechowywania [dni]	Zawartość trienów w oleju izolowanym ze skór [%] ¹	
	nierozdrobnionych	rozdrobnionych
0	0,0005 ±0,0004 ^{Aa}	0,0005 ±0,0004 ^{Aa}
17	0,0005 ±0,0004 ^{Aa}	0,0007 ±0,0004 ^{Aa}
45	0,0005 ±0,0004 ^{Aa}	0,0007 ±0,0004 ^{Aa}
73	0,0009 ±0,0008 ^{Aa}	0,0007 ±0,0007 ^{Aab}
94	0,0007 ±0,0000 ^{Aa}	0,0000 ±0,0000 ^{Bb}
129	0,0010 ±0,0008 ^{Aa}	0,0000 ±0,0000 ^{Bb}

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-B) i kolumnach (a-b) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

Należy mieć również na uwadze fakt, że spektrofotometryczne oznaczanie zawartości dienów i trienów, choć jest prostą, szybką metodą wykazuje mniejszą czułość niż pomiar LOO (Antolovich i in. 2002).

4.2.4 Skład kwasów tłuszczowych

Na podstawie analizy chromatograficznej stwierdzono, że w oleju ze skór rozdrobnionych przechowywanych w -20°C skład kwasów tłuszczowych ulegał niewielkim zmianom (Tabela 16).

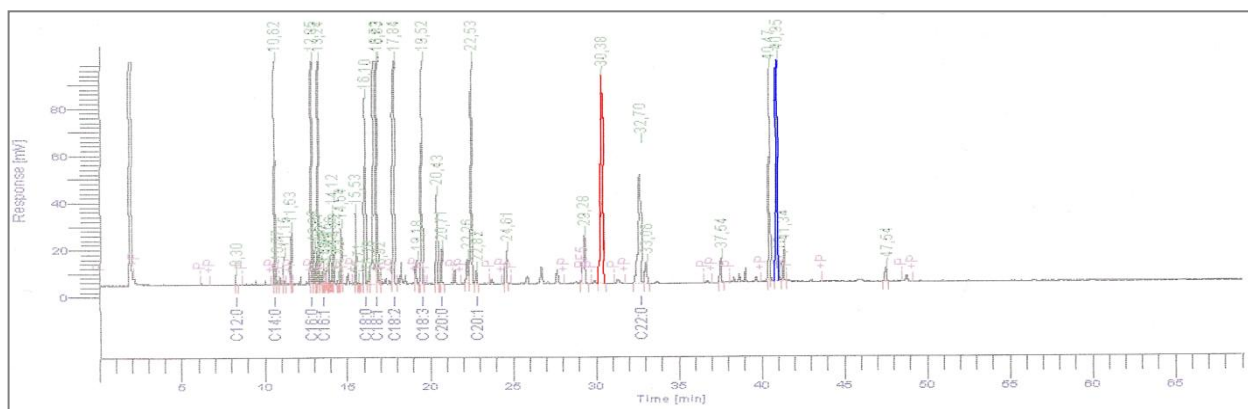
Tabela 16. Skład KT oleju wyizolowanego ze skór rozdrobnionych przechowywanych w -20°C

kwasy tłuszczowe [%] ¹	czas przechowywania [dni]						
	0	10	24	52	80	108	136
SAFA	22,5±0,0 ^{ab}	21,6±0,1 ^a	23,0±0,3 ^b	22,6±0,5 ^{ab}	22,0±1,0 ^{ab}	23,0±0,0 ^b	21,8±0,4 ^{ab}
MUFA	37,0±0,0 ^{ab}	36,1±0,6 ^a	37,3±1,0 ^{ab}	38,1±0,5 ^b	38,1±1,1 ^b	36,8±0,0 ^{ab}	36,2±0,1 ^a
PUFA	27,1±0,0 ^a	29,6±0,9 ^b	26,9±0,1 ^a	27,8±1,1 ^a	30,7±0,9 ^b	29,7±0,0 ^b	29,7±0,0 ^b
<i>n-3+n-6</i>	14,0±0,0 ^a	16,9±0,5 ^b	13,6±0,6 ^a	14,4±1,6 ^a	17,3±0,5 ^b	16,5±0,0 ^b	17,4±0,5 ^b
EPA	5,4±0,0 ^a	6,5±0,2 ^c	5,9±0,0 ^b	5,8±0,4 ^{ab}	6,7±0,2 ^c	6,4±0,0 ^c	6,6±0,1 ^c
DHA	6,1±0,0 ^a	7,3±0,2 ^b	5,5±0,4 ^a	6,0±0,8 ^a	7,5±0,2 ^b	7,1±0,0 ^b	7,2±0,2 ^b

Różne indeksy w wierszach oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Przykładowy chromatogram zamieszczono na Rysunku 23. Ponadto, pomimo stwierdzonych różnic istotnych statystycznie, nie zaobserwowano regularnej prawidłowości w zmianach ich składu w trakcie przechowywania surowca.

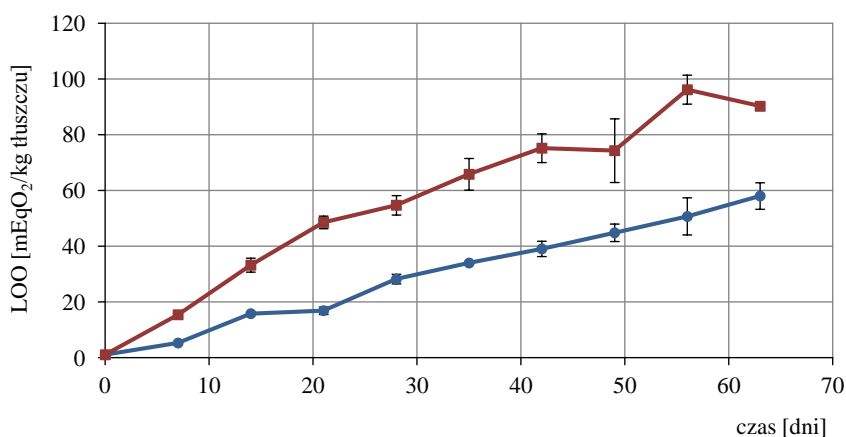


Rysunek 23. Przykładowy chromatogram z analizy oleju otrzymanego ze skór rozdrobnionych

Pomimo, że skład kwasów tłuszczowych nie odzwierciedla ich bezwzględnej zawartości w surowcu, gdyż przemiany jednej grupy skutkują zmianami udziału procentowego pozostałych grup w całej puli kwasów obecnych w oleju, można jednakże na podstawie analizy danych zawartych w Tabeli 16 stwierdzić, że podczas przechowywania surowca nie następują straty EPA i DHA.

4.3 WPLYW WARUNKÓW PRZECHOWYWANIA OLEJU NA JEGO JAKOŚĆ

4.3.1 Liczba nadtlenkowa



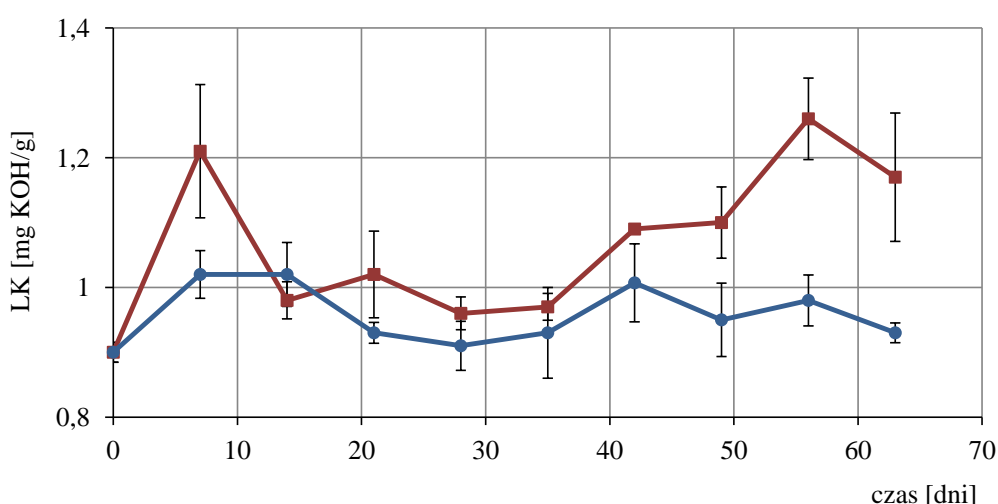
Rysunek 24. Zmiany liczby nadtlenkowej oleju przechowywanego w temperaturach pokojowej (■) i 4°C (●)

Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

W przypadku oleju przechowywanego w temperaturze pokojowej liczba nadtlenkowa rosła bardzo szybko, już po tygodniu przekroczyła wartość dopuszczalną czyli 15 mEqO₂/kg tłuszczu (Codex Alimentarius). W oleju przechowywanym w temperaturze 4°C proces ten przebiegał nieco wolniej, i dopiero po około 2 tygodniach przechowywania olej osiągnął wartości LOO świadczące o jego złej jakości (Rysunek 24). Z drugiej jednak strony zmiany oksydacyjne w przechowywanym chłodniczo oleju z łososia były większe niż w oleju z makreli przechowywanym w tej samej temperaturze (Boran 2006).

4.3.2 Liczba kwasowa

Obserwowano tylko nieznaczne zmiany LK podczas przechowywania oleju w obu badanych temperaturach, przy czym podczas przechowywania oleju w 4°C zawartość wolnych kwasów tłuszczowych była nieco mniejsza niż w temperaturze pokojowej (Rysunek 25).



Rysunek 25. Zmiany liczby kwasowej oleju przechowywanego w temperaturach pokojowej (■) i 4°C (●)
Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Po 63 dniach przechowywania olejów nie zostały przekroczone dopuszczalne wartości LK, czyli 4 mg KOH/kg tłuszczu (wg Codex Alimentarius).

4.3.3 Zawartość wtórnych produktów utlenienia

Zawartość wtórnych produktów utlenienia wierniej oddaje sensoryczną charakterystykę oleju niż zmiany liczby nadtlenkowej. Test TBA jest często używany do oceny jakości i stopnia przemian oksydacyjnych żywności, pomimo takich ograniczeń jak

brak specyficzności i czułości (Heras i in. 2003); wiele innych substancji może reagować z kwasem tiobarbiturowym i przyczyniać się do przeszacowania wyniku. Pomimo tych niedogodności test TBA nadaje się do oceny postępu procesu utleniania, zwłaszcza na zasadzie porównywania wyników dla poszczególnych prób w czasie.

W Tabeli 17 przedstawiono zmiany zawartości wtórnych produktów utleniania (w przeliczeniu na aldehyd malonowy) podczas przechowywania olejów w temperaturach: pokojowej i 4°C.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że już po 7 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej zawartość wtórnych produktów utleniania wzrosła ok. 3,5 razy. Podczas dalszego przechowywania, do 9 tygodni, zawartość wtórnych produktów oksydacji utrzymywała się na zbliżonym poziomie (Tabela 17).

Tabela 17. Zawartość wtórnych produktów utlenienia w oleju przechowywanym w temperaturze pokojowej i 4°C

Czas przechowywania [dni]	MDA [mmol/kg oleju] ¹	
	temperatura	
	pokojowa	4°C
0	0,75±0,15 ^{Aa}	0,75±0,15 ^{Aa}
7	2,57±0,45 ^{Ab}	1,02±0,21 ^{Bab}
14	2,60±0,02 ^{Ab}	1,24±0,23 ^{Bab}
21	2,70±0,05 ^{Ab}	2,01±0,00 ^{Bd}
28	2,28±0,28 ^{Ab}	1,89±0,34 ^{Accd}
35	2,77±0,39 ^{Ab}	1,35±0,14 ^{Bbc}
63	2,77±0,42 ^{Ab}	1,57±0,34 ^{Bbcd}

¹ Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-B) i kolumnach (a-d) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

W oleju przechowywanym w temperaturze 4°C powstawanie wtórnych produktów utlenienia przebiegało wolniej (Tabela 17). Po 21 dniach zawartość wtórnych produktów utleniania była ponad dwukrotnie większa niż w oleju wyjściowym, a następnie utrzymywała się na podobnym poziomie. Po upływie 35 dni zawartość wtórnych produktów utleniania była 2-krotnie mniejsza niż w oleju przechowywanym w temperaturze pokojowej i tendencja ta utrzymywała się w pozostałym okresie przechowywania prób. Wartości wskaźnika TBA podczas przechowywania oleju w temperaturze chłodniczej były też niższe niż stwierdzone przez Boran i in. (2006) w oleju z makreli przechowywanym w podobnych warunkach. Wyników tych nie można jednak w tak bezpośredni sposób porównywać, ponieważ zawartość

wtórnych produktów oksydacji zależy przede wszystkim od jakości wyjściowego oleju i jego pochodzenia.

Ponieważ test TBA posiada pewne wady opisane wcześniej, Wanasundara i Shahidi (1995) zaproponowali użycie bardziej kompleksowego parametru określającego postęp oksydacji – tzw. TotoxTBA (odpowiednik Totox):

$$\text{TotoxTBA} = 2\text{LOO} + \text{TBA}$$

Wskaźnik ten pozwala szacunkowo ocenić całkowity stopień utlenienia lipidów: zarówno pierwotnych jak i wtórnych produktów oksydacji.

W Tabeli 18 przedstawiono obliczone wartości wskaźnika TotoxTBA w trakcie przechowywania oleju otrzymanego ze skór w temperaturze pokojowej i 4°C.

Tabela 18. Zmiany wartości wskaźnika TotoxTBA oleju przechowywanego w temperaturze pokojowej i 4°C

Czas przechowywania [dni]	TotoxTBA	
	temperatura	
	pokojowa ¹	4°C ¹
0	2,97	2,97
7	33,49	11,66
14	69,08	32,94
21	99,88	35,85
28	111,78	58,39
35	134,49	69,37
42	153,95	81,03
56	196,66	102,6
63	183,27	117,71

¹ Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Ponieważ wartości LOO były bardzo duże w porównaniu z wskaźnikami TBA, zawartość wtórnych produktów utleniania miała niewielki wpływ na wartość TotoxTBA (Rysunek 26 i Tabela 18). Ponadto z uwagi na specyficzny charakter TotoxTBA (m.in. brak jednostki) nie jest możliwe wykorzystanie analizy statystycznej wyników do ich interpretacji.

4.3.4 Zawartość dienów i trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych

Stwierdzono wzrost zawartości dienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych w czasie przechowywania oleju w badanych temperaturach, jednak w oleju przechowywanym w niższej temperaturze był on mniejszy (Tabela 19).

Tabela 19. Zmiany zawartości dienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych w oleju przechowywanym w temperaturze pokojowej i 4°C

Czas przechowywania [dni]	Zawartość dienów[%] ¹	
	temperatura	
	pokojowa	4°C
0	0,514±0,005 ^{Aa}	0,514±0,005 ^{Aa}
7	0,608±0,027 ^{Ab}	0,561±0,010 ^{Bab}
14	0,632±0,033 ^{Ab}	0,585±0,019 ^{Ab}
21	0,714±0,007 ^{Ac}	0,576±0,007 ^{Bb}
28	0,716±0,037 ^{Ac}	0,706±0,021 ^{Ac}
35	0,751±0,021 ^{Ac}	0,694±0,012 ^{Bc}
42	0,852±0,035 ^{Ad}	0,700±0,000 ^{Bc}
49	0,836±0,016 ^{Ad}	0,721±0,022 ^{Bcd}
56	0,896±0,044 ^{Ad}	0,764±0,046 ^{Bd}
63	0,885±0,044 ^{Ad}	0,761±0,032 ^{Bd}

¹ Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-B) i kolumnach (a-d) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli 20, zawartość trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych w wyizolowanym oleju była bardzo mała i ponadto spadła do zera podczas przechowywania w obu temperaturach. Może to być wynikiem rozpadu trienów do wtórnych produktów utlenienia, które nie są wykrywane spektrofotometrycznie.

Tabela 20. Zmiany zawartości trienów o sprzężonym układzie wiązań podwójnych w oleju przechowywanym w temperaturze pokojowej i 4°C

Czas przechowywania[dni]	Zawartość trienów [%] ¹	
	temperatura	
	pokojowa	4°C
0	0,0009±0,0004 ^{Aa}	0,0009±0,0004 ^{Aa}
7	0,0010±0,0005 ^{Aa}	0,0011±0,0004 ^{Aa}
14	0,0000±0,0000 ^{Ab}	0,0008±0,0005 ^{Ba}
21	0,0000±0,0000 ^{Ab}	0,0000±0,0000 ^{Ab}
28	0,0000±0,0000 ^{Ab}	0,0000±0,0000 ^{Ab}
35	0,0000±0,0000 ^{Ab}	0,0000±0,0000 ^{Ab}
42	0,0000±0,0000 ^{Ab}	0,0000±0,0000 ^{Ab}
49	0,0000±0,0000 ^{Ab}	0,0000±0,0000 ^{Ab}
56	0,0000±0,0000 ^{Ab}	0,0000±0,0000 ^{Ab}
63	0,0000±0,0000 ^{Ab}	0,0000±0,0000 ^{Ab}

¹ Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-B) i kolumnach (a-b) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

4.3.5 Zawartość barwników karotenoidowych

Olej z łososia charakteryzuje się intensywną pomarańczową barwą, spowodowaną obecnością barwników karotenoidowych. Do barwników karotenoidowych mięśni ryb łososiowatych należy astaksantyna, a także luteina, β-karoten i kantaksantyna. Temperatura, czy produkty utlenienia nienasyconych kwasów tłuszczowych, jak również enzymy m.in. lipooksygenazy, są czynnikami katalizującymi rozkład barwników do bezbarwnych związków karbonylowych (Sikorski 2004). Przemiany barwników karotenoidowych prowadzą między innymi do płowienia świeżej barwy skóry, czy mięsa ryb, którego szybkość zależy od gatunku ryby i warunków przechowywania (Sikorski 2004, Chaijan 2005). Nawet przechowywanie chłodnicze ryb nie zapobiega tym niekorzystnym przemianom barwników (Einen 2002).

Zmniejszenie zawartości barwników karotenoidowych miało również miejsce podczas przechowywania oleju wyizolowanego ze skór łososia, przy czym proces ten zachodził szybciej w temperaturze pokojowej niż w temperaturze 4°C (Tabela 21). Po 63 dniach przechowywania zawartość β-karotenu w oleju przechowywanym w temperaturze 4°C była o ok. 33% większa niż w oleju przechowywanym w temperaturze pokojowej.

Tabela 21. Zawartość barwników karotenoidowych w oleju przechowywanym w temperaturze pokojowej i 4°C w przeliczeniu na β-karoten

czas przechowywania [dni]	Zawartość β-karotenu [μg/g] ¹	
	temperatura	
	pokojowa	4°C
0	5,35±0,05 ^{Aa}	5,34±0,05 ^{Aa}
7	4,16±0,29 ^{Ab}	5,12±0,40 ^{Ba}
14	3,70±0,13 ^{Abc}	3,93±0,49 ^{Abcd}
21	3,33±0,20 ^{Acđ}	4,11±0,28 ^{Bbc}
28	3,33±0,16 ^{Acđ}	4,20±0,18 ^{Bb}
35	3,06±0,07 ^{Ade}	3,56±0,37 ^{Bbcde}
42	2,88±0,48 ^{Adef}	3,20±0,09 ^{Ae}
49	2,33±0,21 ^{Afg}	3,43±0,26 ^{Bde}
56	2,10±0,11 ^{Ag}	3,52±0,00 ^{Bcde}
63	2,55±0,36 ^{Aefg}	3,33±0,13 ^{Bde}

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-B) i kolumnach (a-g) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

4.3.6 Skład kwasów tłuszczowych

Na podstawie wyników przedstawionych w Tabelach 22 i 23 stwierdzono, że skład kwasów tłuszczowych uległ jedynie nieznacznym, chociaż niekiedy istotnym statystycznie, zmianom w trakcie przechowywania zarówno w temperaturze chłodniczej jak i pokojowej, a stosunek PUFA/SFA był przez cały czas trwania doświadczenia zbliżony do 1.

Podobne wyniki otrzymali Wu i Bechtel (2008) przechowując olej z łososia w temperaturze 6 i 15°C. Uzyskane wyniki wskazują, że podczas przechowywania oleju w badanym zakresie czasowym nie następują znaczące straty EPA i DHA, nawet w temperaturze pokojowej.

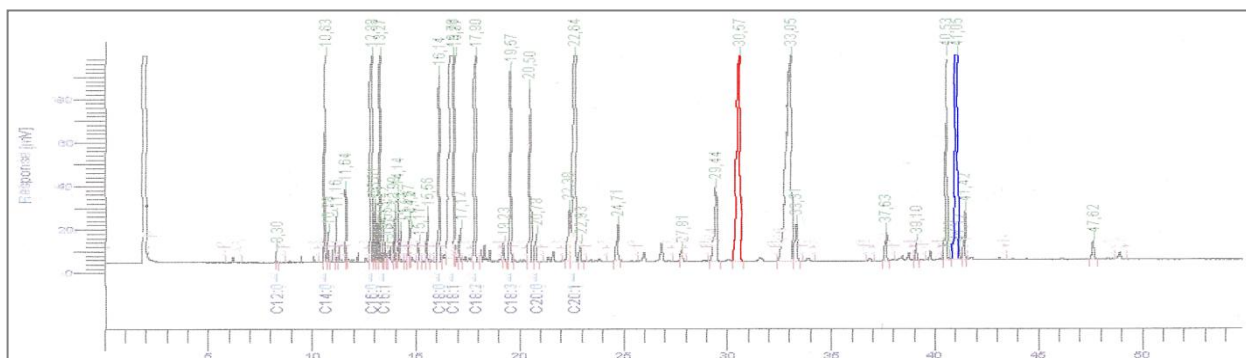
Na Rysunkach 26 i 27 zamieszczono przykładowe chromatogramy z analiz oleju przechowywanego w temperaturze pokojowej (Rysunek 26) i 4°C (Rysunek 27). Kolorem czerwonym zaznaczono pik odpowiadający zawartości kwasu EPA, a niebieskim – od DHA.

Tabela 22. Skład kwasów tłuszczowych oleju przechowywanego w temperaturze pokojowej

kwasy tłuszczowe [%] ¹	czas przechowywania [dni]									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
SAFA	27,4±0,5 ^a	27,4±0,9 ^a	26,8±0,4 ^a	27,2±0,5 ^a	26,9±0,5 ^a	26,5±0,4 ^a	27,4±0,3 ^a	27,1±0,1 ^a	27,3±0,0 ^a	27,4±0,4 ^a
MUFA	30,6±0,7 ^a	31,0±0,4 ^a	31,3±0,3 ^a	31,1±0,2 ^a	31,0±0,1 ^a	30,8±0,6 ^a	30,4±0,1 ^a	30,8±0,6 ^a	30,9±0,0 ^a	30,8±0,1 ^a
PUFA	27,2±0,4 ^{ab}	26,5±0,6 ^a	27,5±0,2 ^b	27,2±0,1 ^{ab}	26,9±0,2 ^{ab}	27,1±0,0 ^{ab}	26,7±0,8 ^{ab}	26,9±0,6 ^{ab}	26,3±0,0 ^a	26,4±0,3 ^a
PUFA/SAFA	0,99	0,97	1,04	1,01	1,00	1,02	0,98	0,99	0,96	0,96
<i>n-3+n-6</i>	18,2±0,4 ^{ab}	17,4±0,8 ^{ab}	18,5±0,2 ^b	18,1±0,1 ^{ab}	17,9±0,3 ^{ab}	18,2±0,1 ^{ab}	17,7±0,8 ^{ab}	17,8±0,6 ^{ab}	17,2±0,0 ^a	17,3±0,4 ^a
EPA	6,2±0,1 ^{ab}	6,1±0,1 ^{ab}	6,3±0,0 ^b	6,2±0,0 ^{ab}	6,1±0,0 ^{ab}	6,2±0,0 ^{abc}	6,1±0,2 ^{ab}	6,1±0,1 ^{ab}	6,0±0,0 ^a	6,0±0,1 ^a
DHA	9,5±0,4 ^a	8,9±0,0 ^a	9,6±0,2 ^a	9,4±0,0 ^a	9,3±0,2 ^a	9,5±0,1 ^a	9,2±0,5 ^a	9,3±0,5 ^a	8,9±0,0 ^a	9,0±0,2 ^a

Różne indeksy w wierszach oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$)

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe



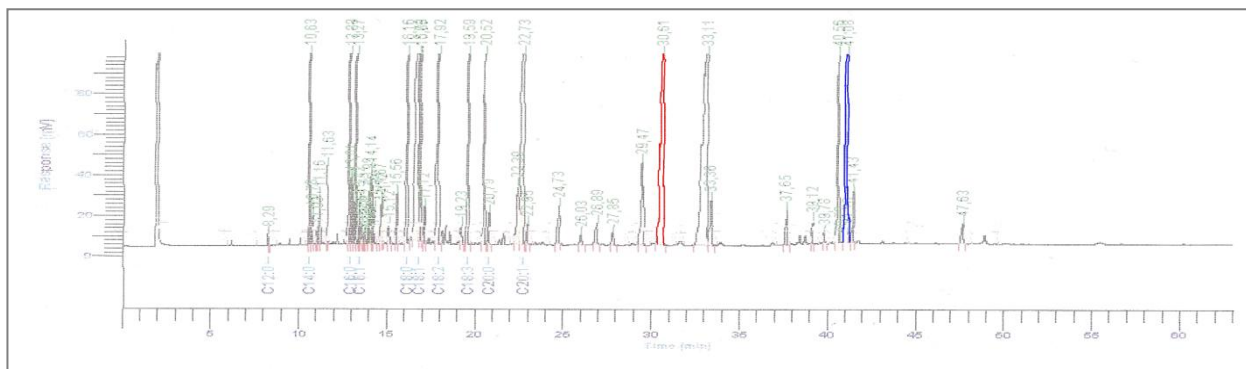
Rysunek 26. Przykładowy chromatogram z analizy oleju przechowywanego w temperaturze pokojowej

Tabela 23. Skład kwasów tłuszczowych oleju przechowywanego w temperaturze 4°C

kwasy tłuszczowe [%] ¹	czas przechowywania [dni]									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
SAFA	27,4±0,5 ^a	27,2±0,6 ^a	26,5±0,1 ^a	26,5±0,3 ^a	26,4±0,4 ^a	26,7±0,4 ^a	26,8±0,6 ^a	27,0±0,1 ^a	26,7±0,4 ^a	26,8±0,6 ^a
MUFA	30,6±0,7 ^a	30,9±0,3 ^a	31,1±0,1 ^a	30,9±0,0 ^a	30,6±0,5 ^a	30,7±0,4 ^a	30,0±0,8 ^a	30,9±0,5 ^a	31,0±0,5 ^a	31,1±0,2 ^a
PUFA	27,2±0,4 ^{abc}	26,8±0,3 ^{ab}	27,8±0,2 ^c	27,4±0,3 ^{abc}	27,5±0,3 ^{bc}	27,4±0,1 ^{abc}	27,9±0,4 ^c	26,7±0,1 ^a	26,7±0,2 ^a	26,9±0,5 ^{ab}
PUFA/SAFA	0,99	0,98	1,05	1,03	1,04	1,03	1,04	0,99	1,00	1,00
<i>n-3+n-6</i>	18,2±0,4 ^{ab}	17,7±0,4 ^a	18,7±0,1 ^{ab}	18,4±0,3 ^{ab}	18,5±0,4 ^{ab}	18,4±0,1 ^{ab}	19,0±0,9 ^b	17,7±0,2 ^a	17,7±0,2 ^a	17,8±0,6 ^a
EPA	6,2±0,1 ^{ab}	6,1±0,1 ^{ab}	6,3±0,0 ^{ab}	6,3±0,3 ^{ab}	6,3±0,1 ^{ab}	6,3±0,1 ^{ab}	6,4±0,2 ^b	6,1±0,0 ^a	6,1±0,0 ^a	6,1±0,1 ^{ab}
DHA	9,5±0,4 ^{ab}	9,2±0,3 ^a	9,8±0,1 ^{ab}	9,6±0,2 ^{ab}	9,7±0,2 ^{ab}	9,6±0,0 ^{ab}	10,1±0,8 ^b	9,1±0,2 ^a	9,1±0,2 ^a	9,3±0,4 ^{ab}

Różne indeksy w wierszach oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$)

¹ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe



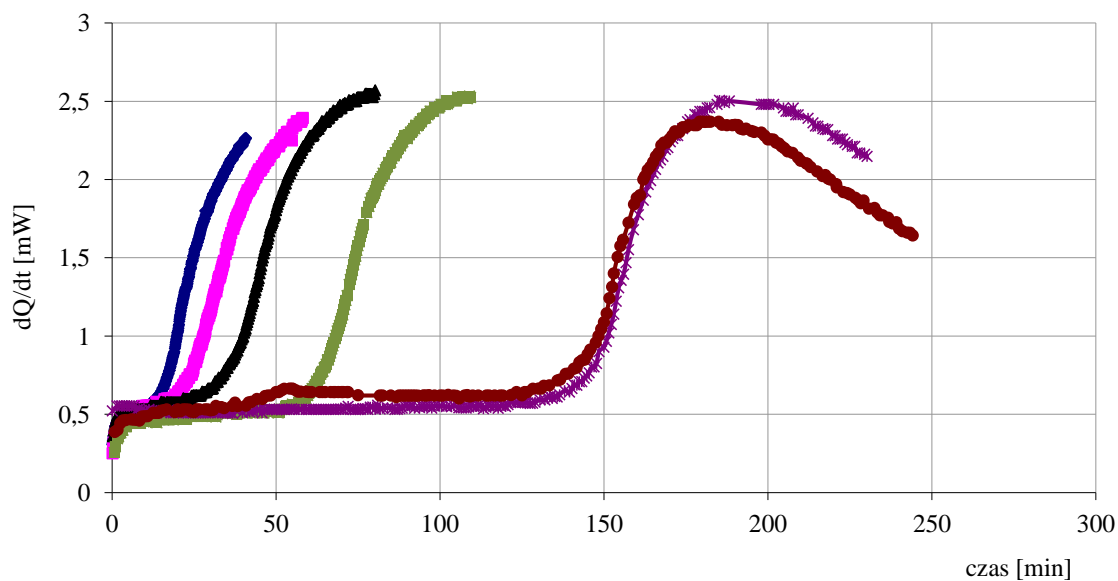
Rysunek 27. Przykładowy chromatogram z analizy oleju przechowywanego w temperaturze 4°C

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że metoda izolacji oleju ze skór „na zimno” zapewniała bardzo dobrą jakość uzyskiwanego oleju. Jednakże podczas przechowywania otrzymanego w ten sposób oleju, nawet w temperaturze 4°C, miało miejsce szybkie powstawanie pierwotnych i wtórnych produktów oksydacji, co związane jest z wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wyjątkowo podatnych na utlenianie. Aby polepszyć stabilność oksydacyjną, w następnym etapie pracy podjęto próbę wzbogacania olejów dodatkami suszonych ziół mających udokumentowane przeciwutleniające właściwości.

4.4 WPLYW DODATKU ZIÓŁ NA JAKOŚĆ PRZECHOWYWANEGO OLEJU

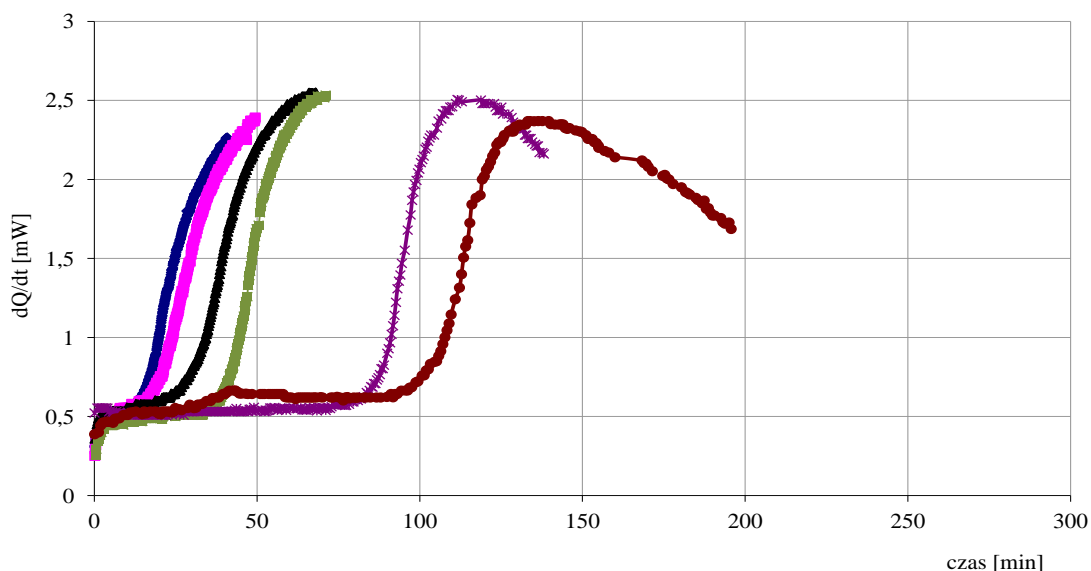
4.4.1 Stabilność oksydacyjna

Zbadano wpływ dodatku rozmarynu, oregano oraz szalwii w zakresie stężeń 0,25 – 2% na stabilność oksydacyjną oleju ze skór łososi. Miarą stabilności był okres indukcji reakcji utleniania. Stwierdzono, że już 0,5% stężenie suszonego rozmarynu w oleju wydłuża dwukrotnie okres indukcji (do ok. 35 minut), a 0,75% ok. czterokrotnie (Rysunek 28). Najbardziej efektywne okazało się stężenie 1% rozmarynu - okres indukcji był około 9 razy dłuższy niż w przypadku oleju bez tego dodatku. Wzrost stężenia rozmarynu do 2% nie powodował już dalszego spowalniania procesu utleniania oleju.



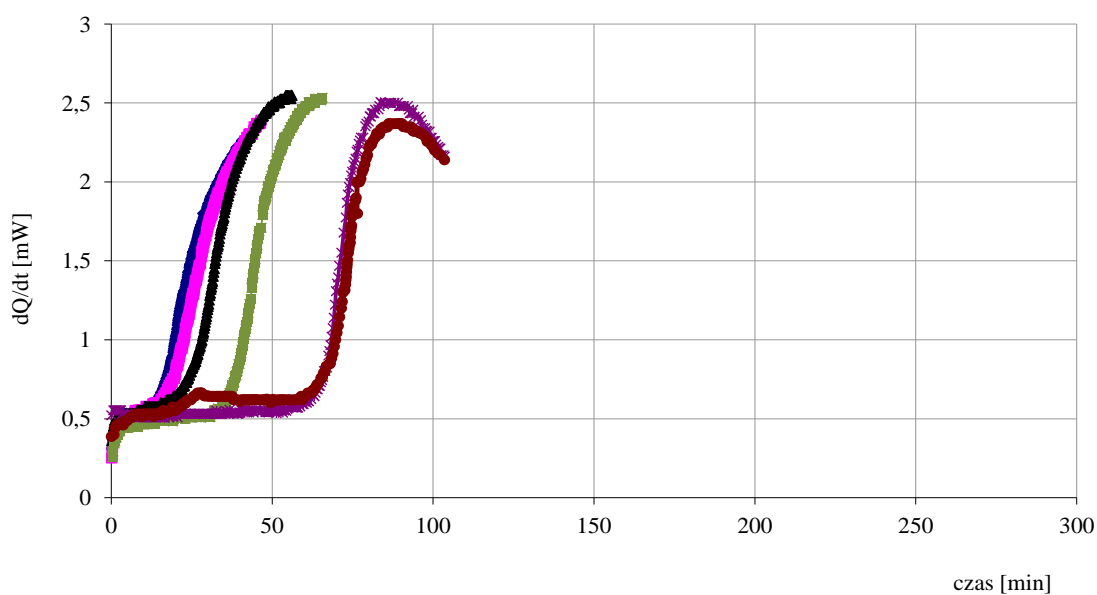
Rysunek 28. Krzywe termiczne utleniania oleju z dodatkiem rozmarynu: 0% (◆), 0,25% (■), 0,5% (▲), 0,75% (■), 1% (★), 2% (●)

Suszone oregano w stężeniu 0,5% również wydłużyło około dwukrotnie okres indukcji (do około 35 minut), jednak w wyższych stężeniach było mniej efektywne niż rozmaryn (Rysunek 29). Oregano w stężeniu 1% oraz 2% wydłużyło okres indukcji odpowiednio o około 5,5 (do około 85 minut) i 7 razy (do około 100 minut) w porównaniu do oleju bez takiego dodatku.



Rysunek 29. Krzywe termiczne utleniania oleju z dodatkiem oregano: 0% (◆), 0,25% (■), 0,5% (▲), 0,75% (■), 1% (★), 2% (●)

W obecności suszonej szałwii w stężeniu 0,5% okres indukcji został wydłużony jedynie o około 35% (Rysunek 30). Największą efektywność uzyskano, gdy jej stężenie wynosiło 1% i 2% - okres indukcji wydłużył się około 5-krotnie i wynosił ok. 70 minut. Taki efekt wywierał rozmaryn już w stężeniu 0,75%, można więc stwierdzić, że szałwia wykazuje słabsze działanie przeciwutleniające. Ayadi i in. (2009) badając wpływ m.in. rozmarynu, szałwii, i bazylii na stabilność oksydacyjną oliwy z oliwek również stwierdzili, że spośród badanych ziół najlepsze właściwości przeciwutleniające posiadał rozmaryn.

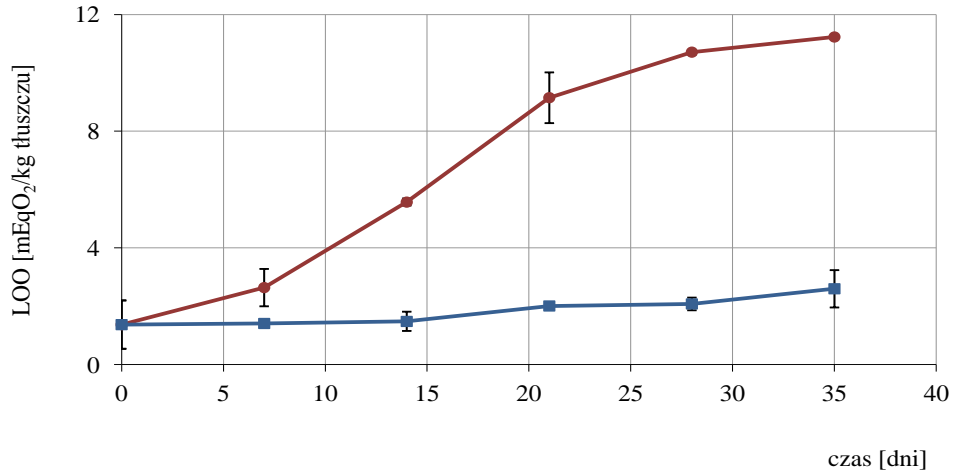


Rysunek 30. Krzywe termiczne utleniania oleju z dodatkiem szałwii: 0% (◆), 0,25% (■), 0,5% (▲), 0,75% (■), 1% (★), 2% (●)

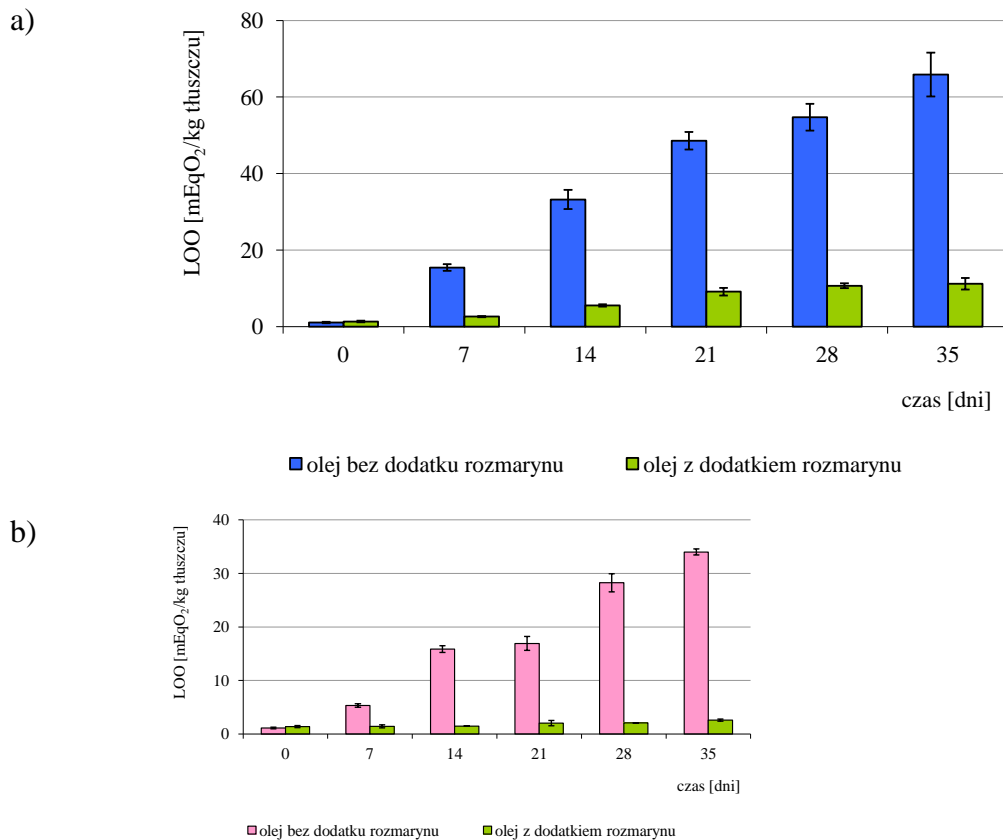
4.4.2 Liczba nadtlenkowa

Rysunek 31 przedstawia zmiany liczby nadtlenkowej w oleju przechowywanym z dodatkiem rozmarynu. W temperaturze 4°C liczba nadtlenkowa utrzymywała się na zbliżonym poziomie przez cały badany czas, natomiast w temperaturze pokojowej znacząco zwiększyła się już po 15 dniach przechowywania (Rysunek 31), lecz w znacznie mniejszym stopniu niż w oleju bez rozmarynu (Rysunek 32).

Po 35-dniowym przechowywaniu oleju z dodatkiem rozmarynu (w temperaturze pokojowej i 4°C) LOO oleju była odpowiednio ok. 6 i 13-krotnie mniejsza niż oleju bez tego dodatku (Rysunek 32).



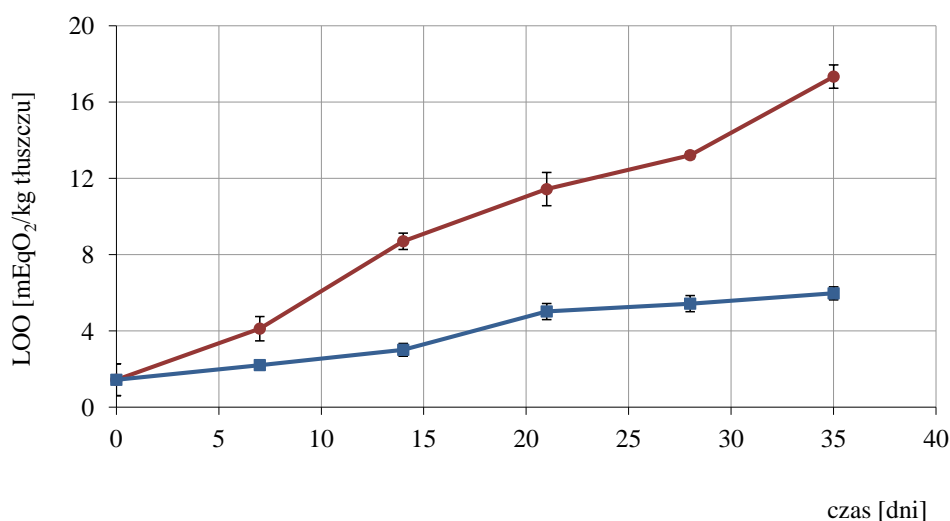
Rysunek 31. Zmiany liczby nadtlenkowej oleju ze skór łososi z dodatkiem 1% suszonego rozmarynu przechowywanego w temperaturach pokojowej (●) i 4°C (■)
Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe



Rysunek 32. Porównanie zmian liczby nadtlenkowej oleju ze skór łososi bez i z dodatkiem rozmarynu przechowywanego w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C
Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Aktywność przeciwutleniającą sproszkowanego rozmarynu w hamowaniu autooksydacji przechowywanego oleju z ryb wykazał również Tsimidou i inni (1995). Spowolnienie oksydacji w obecności rozmarynu obserwowano także w przechowywanych olejach roślinnych różnego pochodzenia: oleju sojowym i kukurydzianym (Basaga 1997), rzepakowym (Samotyja, Małecka 2007) oraz słonecznikowym (Hras 2000) oraz w lipidach mięsa kurcząt i indyków podczas ich przechowywania w temperaturze chłodniczej i zamrażalniczej (Szczepanik 2007).

Dodatek 1% oregano do oleju okazał się nieco mniej skuteczny w ograniczaniu procesów oksydacyjnych niż rozmaryn o tym samym stężeniu.



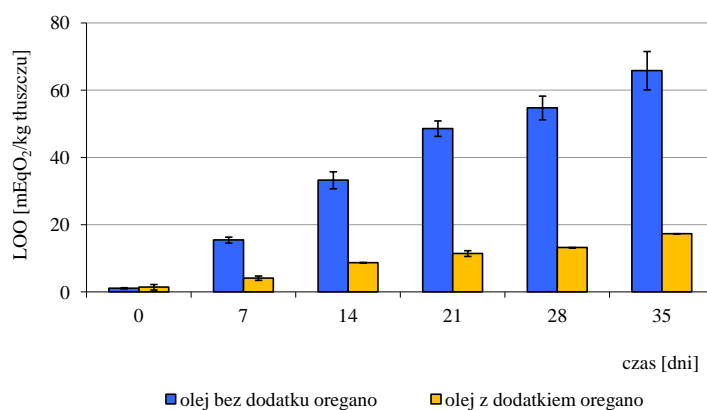
Rysunek 33. Zmiany liczby nadtlenkowej oleju ze skór łososi z dodatkiem 1% suszonego oregano przechowywanego w temperaturach pokojowej (●) i 4°C (■)

Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

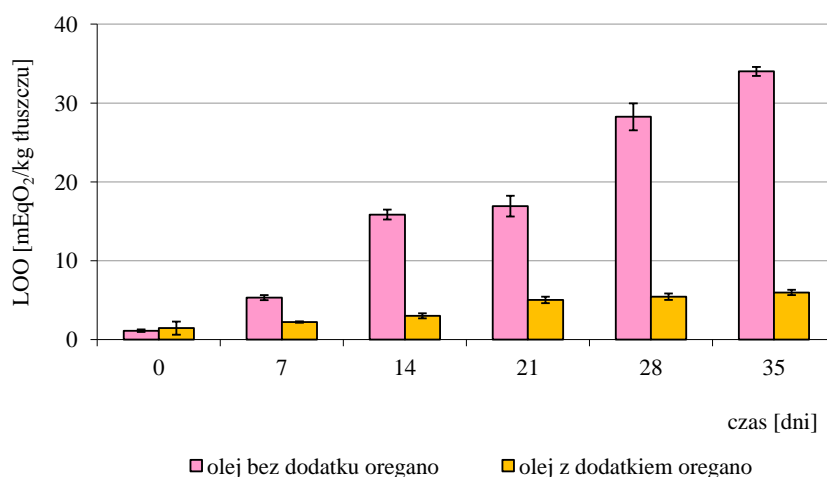
Jest to podobna zależność do tej obserwowanej w przypadku stabilności oksydacyjnej. Po upływie 35 dni LOO oleju wzbogaconego o dodatek oregano, przechowywanego w temperaturze pokojowej, osiągnęła wartość 17 mEqO₂/kg tłuszczu (Rysunek 33). Po 5 tygodniach przechowywania prób w 4°C LOO wzrosła w stosunku do początkowego poziomu, ale pomimo to była znacznie mniejsza, niż w temperaturze pokojowej.

Znacznie wyraźniej widać przeciwutleniający wpływ dodatku oregano podczas porównania z olejem przechowywanym bez takiego dodatku. Zaobserwowano, że LOO oleju z oregano po 35 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej była 3,5 razy, natomiast w temperaturze 4°C – aż sześciokrotnie mniejsza niż w oleju surowym (Rysunek 34).

a)



b)

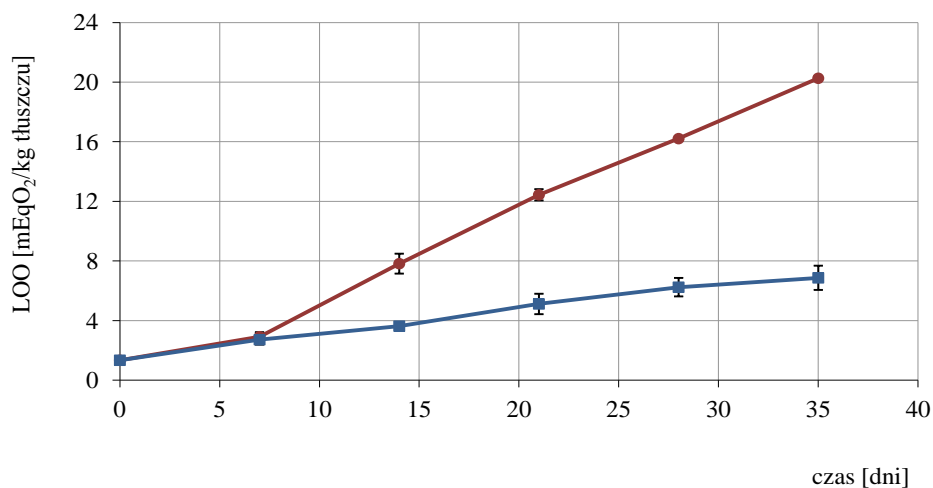


Rysunek 34. Porównanie zmian liczby nadtlenkowej oleju ze skór łososi bez i z dodatkiem oregano przechowywanego w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C

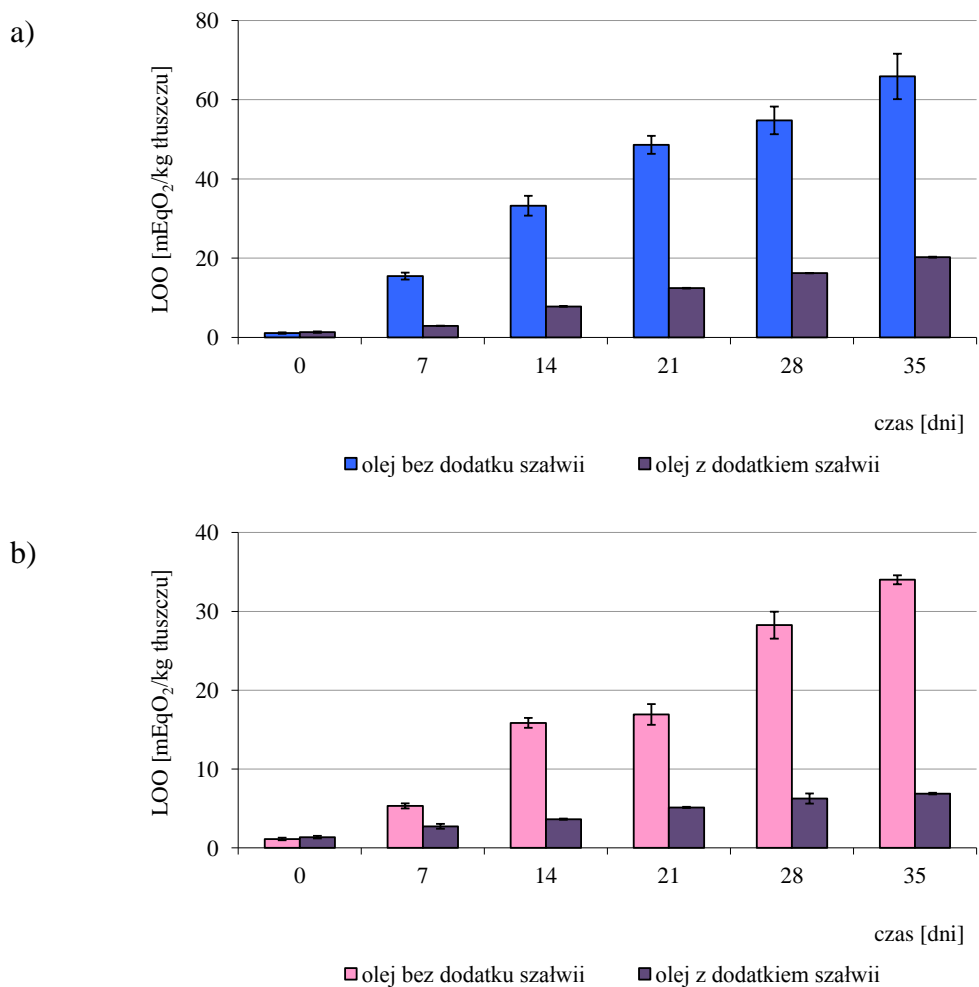
Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

LOO oleju z dodatkiem szałwii początkowo była podobna w obu badanych temperaturach, jednak już po 14 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej była ona dwa razy większa niż w 4°C, a po 5 tygodniach ok. 3 razy i przekroczyła 20 mEqO₂/kg tłuszczu (Rysunek 35).

W porównaniu z olejem surowym, olej z dodatkiem szałwii utleniał się wolniej. Po 5 tygodniach przechowywania w temperaturze chłodniczej LOO oleju z szałwią była ok 4,5 razy mniejsza od LOO oleju bez tego dodatku. Ponadto, mimo, że proces oksydacji zachodził szybciej w temperaturze pokojowej, to nawet po 35 dniach zawartość wtórnych produktów utleniania w oleju z szałwią była ponad 3 razy mniejsza, niż w oleju surowym przechowywanym w tych samych warunkach (Rysunek 36).



Rysunek 35. Zmiany liczby nadtlenkowej oleju ze skór łososi z dodatkiem 1% suszonej szałwii przechowywanego w temperaturach pokojowej (●) i 4°C (■)
Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe



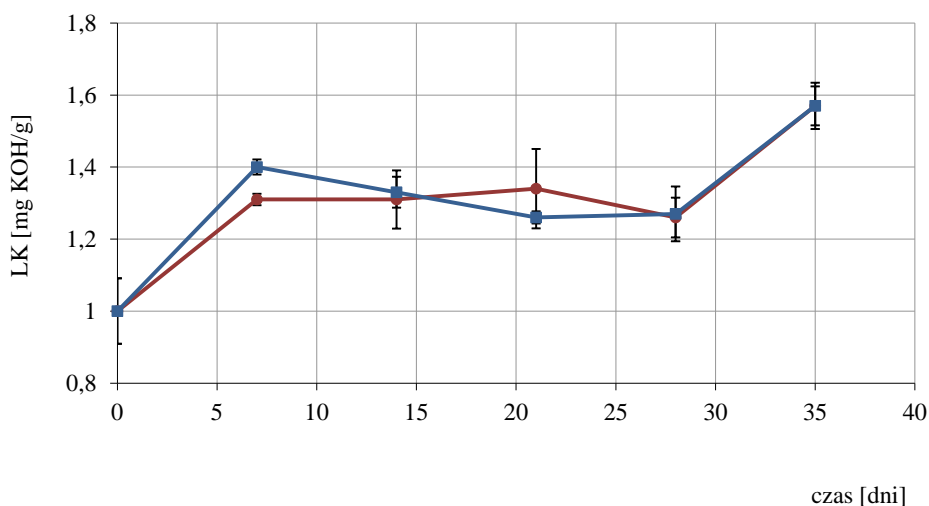
Rysunek 36. Porównanie zmian liczby nadtlenkowej oleju ze skór łososi bez i z dodatkiem szałwii przechowywanego w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C
Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Spośród badanych ziół szalwia wykazywała najsłabsze działanie antyoksydacyjne. Wyniki te są spójne z wynikami uzyskanymi z badań stabilności oksydacyjnej, gdzie również szalwia w najmniejszym stopniu wydłużała okres indukcji.

Obecność badanych ziół skutkowała znacznym obniżeniem zawartości pierwotnych produktów utlenienia w oleju ze skór ryb podczas jego przechowywania. Wskazuje to, że substancje w nich zawarte mają zdolność unieszkodliwiania rodników nadtlenkowych, które prowadzą do powstawania wodoronadtlenków. Ponieważ najlepszą efektywność w hamowaniu procesów utleniania wykazywał rozmaryn, wybrano go do wzbogacania i poprawiania stabilności oksydacyjnej mikrokapsulek wytwarzanych w dalszej części pracy. Na podstawie otrzymanych wyników badań LOO wzbogacanych w zioła olejów oraz ich stabilności oksydacyjnej, do dalszych badań dotyczących mikrokapsułkowania olejów wybrano 1% stężenie rozmarynu w oleju.

4.4.3 Liczba kwasowa

Zaobserwowano nieznaczny wzrost liczby kwasowej w trakcie przechowywania olejów z dodatkiem rozmarynu w obu badanych temperaturach (Rysunek 37), jednakże wartości LK nie przekraczają 1,6 mg KOH/kg tłuszczu.

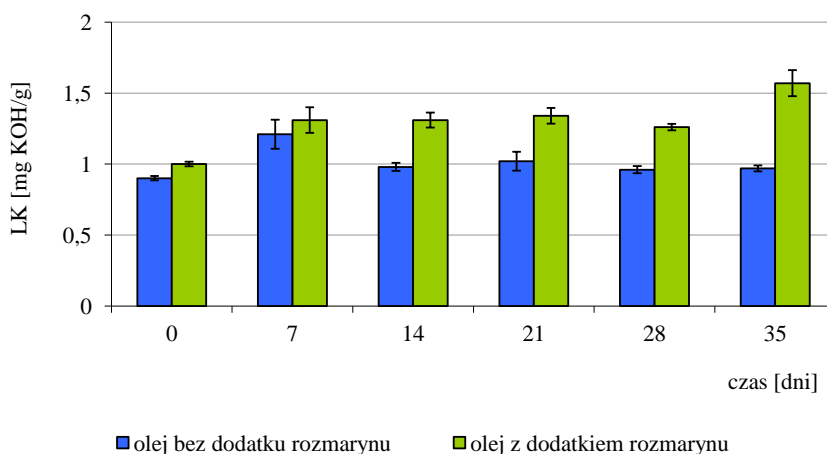


Rysunek 37. Zmiany liczby kwasowej oleju ze skór łososi z dodatkiem rozmarynu przechowywanego w temperaturach pokojowej (●) i 4°C (■)

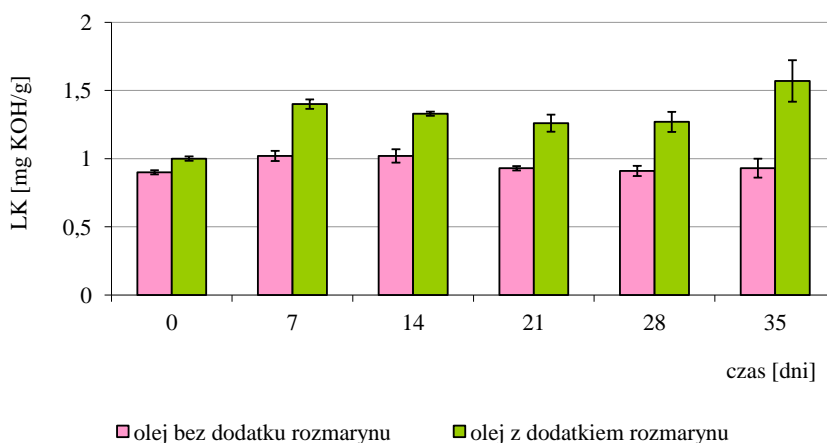
Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Rysunek 38 przedstawia porównanie LK olejów przechowywanych z dodatkiem i bez dodatku rozmarynu w temperaturach: pokojowej i 4°C.

a)



b)



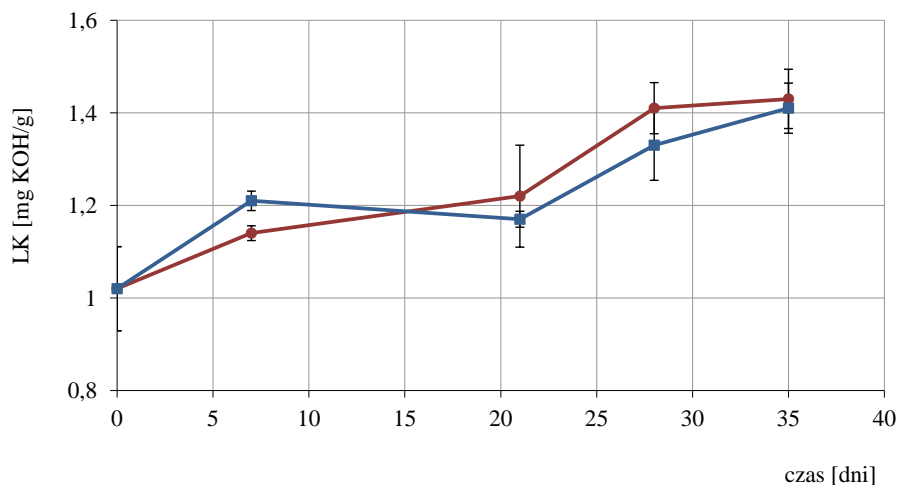
Rysunek 38. Porównanie zmian liczby kwasowej oleju ze skór łososi bez i z dodatkiem rozmarynu przechowywanego w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C

Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe

Olej z dodatkiem rozmarynu charakteryzował się większą liczbą kwasową niż olej bez takiego dodatku, co najprawdopodobniej związane jest z wprowadzeniem pewnej ilości wody wraz ze sproszkowanym rozmarynem do oleju.

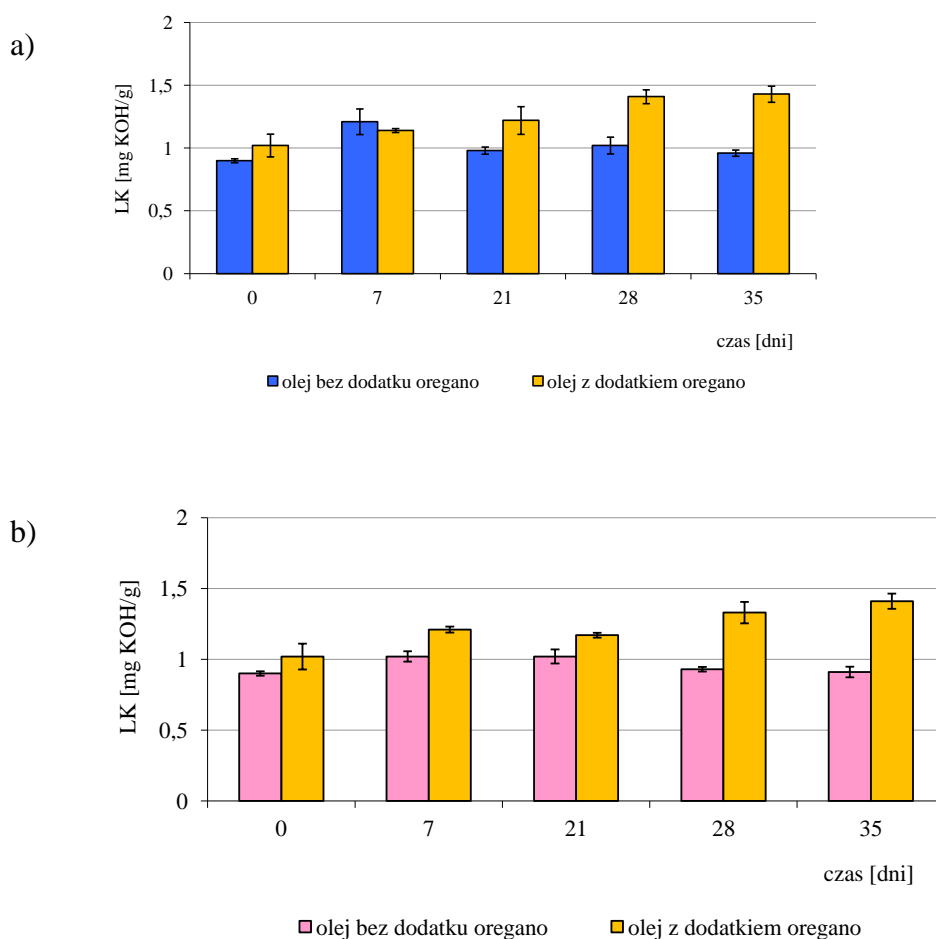
W trakcie przechowywania olejów z dodatkiem oregano w obu badanych temperaturach LK była do siebie zbliżona (Rysunek 39). Podobnie jak w przypadku dodatku rozmarynu, wartości LK nawet po 5 tygodniach nie przekraczają 1,5 mg KOH/kg tłuszczu.

Porównując liczby kwasowe olejów przechowywanych z dodatkiem i bez dodatku oregano w temperaturach: pokojowej i 4°C można zaobserwować, że oregano, podobnie jak rozmaryn, również sprzyjał procesowi hydrolizy (Rysunek 40).



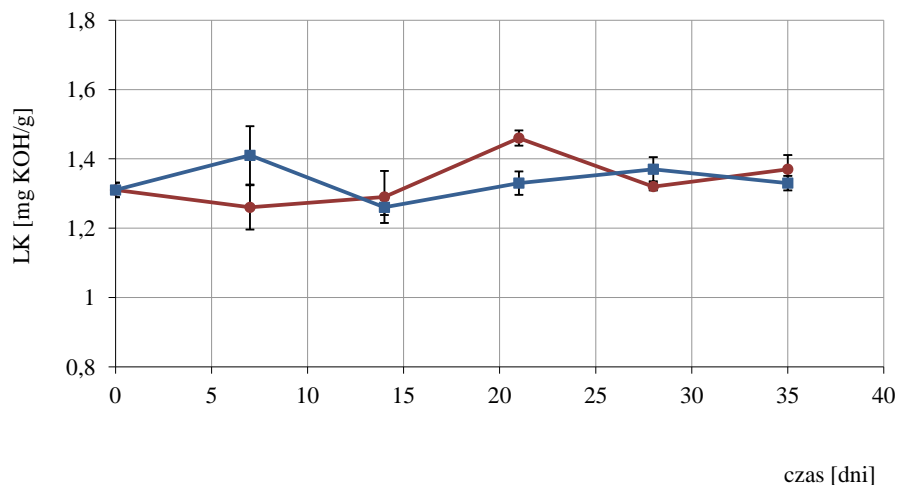
Rysunek 39. Zmiany liczby kwasowej oleju ze skór łososi z dodatkiem oregano przechowywanego w temperaturach pokojowej (●) i 4°C (■)

Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe



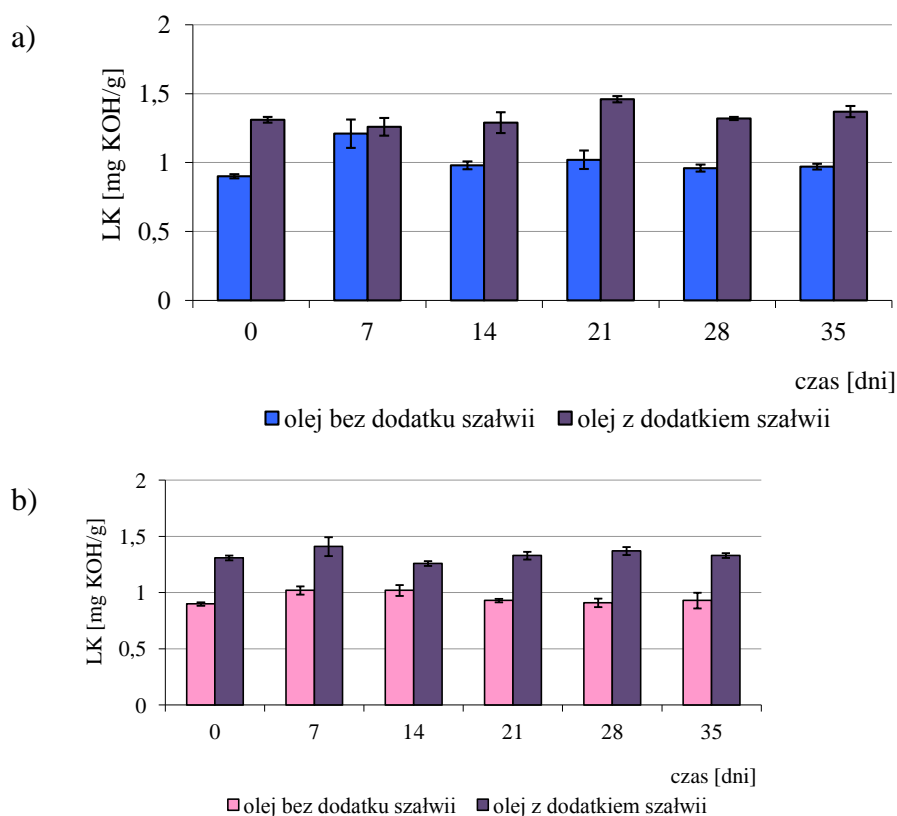
Rysunek 40. Porównanie zmian liczby kwasowej oleju ze skór łososi bez i z dodatkiem oregano przechowywanego w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C

Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe



Rysunek 41. Zmiany liczby kwasowej oleju ze skór łososi z dodatkiem szałwii przechowywanego w temperaturach pokojowej (●) i 4°C (■)

Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe



Rysunek 42. Porównanie zmian liczby kwasowej oleju ze skór łososi bez i z dodatkiem szałwii przechowywanego w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C

Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Dodatek szaławii nie powodował znaczących zmian LK w trakcie przechowywania olejów w obu badanych temperaturach, natomiast podobnie jak rozmaryn i oregano skutkowało wzrostem LK nawet o 30% w stosunku do oleju surowego przechowywanego w tych samych warunkach (Rysunek 41 i Rysunek 42).

4.5 WPLYW WYSOKIEGO CIŚNIENIA NA POWSTAWANIE PIERWOTNYCH I WTÓRNYCH PRODUKTÓW UTLENIEŃ W OLEJU WYDZIELONYM ZE SKÓR ŁOSOSI

W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć dane dotyczące wpływu wysokiego ciśnienia na lipidy mięsa zwierząt stałocieplnych, jak również olejów roślinnych, niewiele natomiast jest wyników doświadczeń prowadzonych na olejach z ryb, a zwłaszcza olejach pochodzących z odpadów rybnych.

Traktowanie oleju wydzielonego ze skór łososi ciśnieniem 60 i 193 MPa skutkowało zmianami zawartości pierwotnych oraz wtórnych produktów utleniania. Bezpośrednio po działaniu wysokim ciśnieniem nastąpiło zmniejszenie LOO w badanym oleju (Tabela 24). Było to prawdopodobnie związane z rozpadem nadtlenków pod wpływem wysokiego ciśnienia. Dodatkowym argumentem potwierdzającym tę tezę jest obserwowany jednocześnie wzrost zawartości wtórnych produktów utleniania, które są głównie produktami degradacji nadtlenków.

Jednocześnie wartość wskaźnika TBA zwiększyła się wraz ze wzrostem ciśnienia – po działaniu ciśnieniem 193 MPa wzrosła o około 30% w stosunku do próby kontrolnej nie poddanej działaniu ciśnienia (Tabela 25).

Okolo dwukrotne zmniejszenie LOO w ciśnieniowanym oleju w stosunku do próby kontrolnej sugerowało, że wysokie ciśnienie może być sposobem na zmniejszenie zawartości pierwotnych produktów utleniania. Zbadano więc, jaki wpływ ma ciśnieniowanie oleju na jego stabilność oksydacyjną podczas przechowywania w temperaturze 4°C w warunkach tlenowych oraz ograniczonego dostępu tlenu.

Ograniczenie dostępu tlenu (atmosfera azotu i szczelnie zamknięte pojemniki) miało na celu sprawdzenie, czy proces utleniania jest zależny od warunków przechowywania po uprzednim działaniu na olej wysokim ciśnieniem.

Tabela 24. Wpływ wysokiego ciśnienia na zawartość pierwotnych produktów utleniania w oleju ze skór łosia w trakcie przechowywania w 4°C

warunki	ciśnienie [MPa]	LOO [mEqO ₂ /kg tłuszczu] ¹⁾			
		Czas [dni]			
		0	14	28	42
tlenowe	0,1	0,7 ± 0,0 ^{Aa}	1,0 ± 0,1 ^{Ba}	12,6 ± 0,5 ^{Ca}	18,8 ± 0,6 ^{Da}
	60	0,4 ± 0,0 ^{Ab}	8,1 ± 0,1 ^{Bb}	27,6 ± 3,5 ^{Cb}	37,9 ± 1,6 ^{Db}
	193	0,3 ± 0,0 ^{Ac}	13,9 ± 0,3 ^{Bc}	24,1 ± 0,7 ^{Cb}	42,0 ± 1,2 ^{Dc}
ograniczony dostęp tlenu	0,1	0,7 ± 0,0 ^{Aa}	0,7 ± 0,1 ^{Aa}	12,6 ± 0,6 ^{Ba}	11,6 ± 2,2 ^{Ba}
	60	0,4 ± 0,0 ^{Ab}	2,2 ± 0,1 ^{Bb}	14,2 ± 3,3 ^{Ca}	16,7 ± 0,3 ^{Cb}
	193	0,3 ± 0,0 ^{Ac}	9,7 ± 0,2 ^{Bc}	23,3 ± 0,9 ^{Cb}	32,1 ± 1,5 ^{Dc}

Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-D) i kolumnach (a-c) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

Po 42 dniach przechowywania olejów poddanych działaniu ciśnienia 193 MPa, w warunkach tlenowych oraz ograniczonego dostępu tlenu, LOO była odpowiednio ponad dwu- i trzykrotnie większa niż oleju nieciśnieniowanego przechowywanego w tych samych warunkach. Procesy oksydacyjne zachodziły nieco wolniej w oleju poddanym działaniu ciśnienia 63 MPa, jednakże w porównaniu do prób kontrolnych wartości LOO były niemal dwukrotnie wyższe. Wynika z tego, że choć wysokie ciśnienie początkowo spowodowało zmniejszenie wartości LOO, to jednak w trakcie przechowywania oleju przemiany oksydacyjne zachodzą znacznie szybciej w oleju ciśnieniowanym niż w surowym oleju i im większym ciśnieniem poddano na olej, tym szybciej się on utleniał. Podobne wyniki uzyskali Tanaka i in. (1991) podczas przechowywania w 5°C oleju wyekstrahowanego z sardynek i poddanego działaniu ciśnienia 180 MPa. LOO w oleju traktowanym ciśnieniem po czterech dniach przechowywania wzrosła dwukrotnie w porównaniu do oleju surowego. Jak można było przypuszczać, przemiany oksydacyjne zachodziły wolniej w oleju, który przechowywany był w warunkach ograniczonego dostępu tlenu (Tabela 24). Po 42 dniach przechowywania w warunkach ograniczonego dostępu tlenu oleju poddanego działaniu ciśnienia 193 MPa LOO była o ok. 24% mniejsza niż w tym samym oleju przechowywanym w warunkach tlenowych. W przypadku działania na olej ciśnieniem 63 MPa różnica ta była jeszcze większa i wynosiła aż ok. 45% (Tabela 24).

We wszystkich badanych próbach wartość wskaźnika TBA rosła w miarę przechowywania, natomiast była znacznie większa w przypadku olejów ciśnieniowanych (Tabela 25). Również Cheah i Ledward (1995) wykazali, że tłuszcz świński poddany działaniu ciśnienia 800 MPa podczas przechowywania w 50°C utleniał się szybciej, niż tłuszcz nieciśnieniowany.

Tabela 25. Wpływ wysokiego ciśnienia na zawartość wtórnych produktów utleniania w oleju ze skór łososia w trakcie przechowywania w 4°C

warunki	ciśnienie [MPa]	MDA [mmol/ kg oleju] ¹⁾			
		Czas [dni]			
		0	14	28	42
tlenowe	0,1	1,2 ± 0,1 ^{Aa}	1,7 ± 0,1 ^{Aa}	2,0 ± 0,3 ^{BCa}	2,1 ± 0,1 ^{Ca}
	60	1,4 ± 0,1 ^{Ab}	2,3 ± 0,1 ^{Bb}	2,5 ± 0,1 ^{Cb}	2,6 ± 0,6 ^{BCa}
	193	1,6 ± 0,0 ^{Ac}	2,7 ± 0,3 ^{Bc}	2,9 ± 0,1 ^{Bc}	3,2 ± 0,0 ^{Cb}
ograniczony dostęp tlenu	0,1	1,2 ± 0,0 ^{Aa}	1,6 ± 0,0 ^{Ba}	1,8 ± 0,1 ^{Ca}	1,9 ± 0,0 ^{Da}
	60	1,4 ± 0,1 ^{Ab}	2,2 ± 0,1 ^{Bb}	2,4 ± 0,0 ^{Cb}	2,6 ± 0,0 ^{Db}
	193	1,6 ± 0,0 ^{Ac}	2,5 ± 0,1 ^{Bc}	2,7 ± 0,1 ^{Cc}	3,0 ± 0,1 ^{Dc}

¹⁾ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-D) i kolumnach (a-c) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

Zmiany wartości wskaźnika TBA, w odróżnieniu od LOO nie wskazują już tak wyraźnie na to, że przemiany oksydacyjne zależą od dostępu tlenu podczas przechowywania prób (Tabela 25). Zawartość produktów utleniania w oleju poddanym działaniu ciśnienia 60 MPa była podobna po 42 dniach przechowywania zarówno w warunkach tlenowych, jak i ograniczonego dostępu tlenu. Podobną zależność obserwowano, gdy przechowywano próby oleju poddanego działaniu ciśnienia 193 MPa.

Sprawdzono również zawartość skoniugowanych dienów (które także mogą świadczyć o stopniu oksydacji tłuszczu) w oleju poddanym działaniu wysokiego ciśnienia (Tabela 26).

Wykazano, że bez względu na sposób przechowywania, zarówno w oleju nieciśnieniowanym jak i traktowanym wysokim ciśnieniem zawartość dienów wzrasta wraz z upływem czasu, jednak przyrost ten jest niewielki.

Tabela 26. Wpływ wysokiego ciśnienia na zawartość dienów w oleju wyekstrahowanym z łososia i przechowywanym w 4°C

warunki	ciśnienie [MPa]	Zawartość dienów[%] ¹⁾			
		Czas [dni]			
		0	7	14	21
tlenowe	0,1	0,456 ± 0,045 ^{Aa}	0,535 ± 0,027 ^{Ba}	0,536 ± 0,064 ^{ABCa}	0,576 ± 0,004 ^{Ca}
	60	0,471 ± 0,011 ^{Aa}	0,516 ± 0,006 ^{Ba}	0,531 ± 0,008 ^{Ca}	0,573 ± 0,017 ^{Da}
	193	0,471 ± 0,011 ^{Aa}	0,518 ± 0,022 ^{Ba}	0,513 ± 0,067 ^{ABCa}	0,575 ± 0,010 ^{Ca}
ograniczony dostęp tlenu	0,1	0,456 ± 0,045 ^{Aa}	0,462 ± 0,005 ^{ABa}	0,501 ± 0,014 ^{ACa}	0,556 ± 0,006 ^{Da}
	60	0,471 ± 0,011 ^{Aa}	0,479 ± 0,016 ^{ABa}	0,533 ± 0,032 ^{BCab}	0,517 ± 0,020 ^{Ba}
	193	0,471 ± 0,011 ^{Aa}	0,480 ± 0,021 ^{ABa}	0,537 ± 0,002 ^{Ca}	0,489 ± 0,001 ^{Bb}

¹⁾ Wyniki są średnią z trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-D) w kolumnach (a-b) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

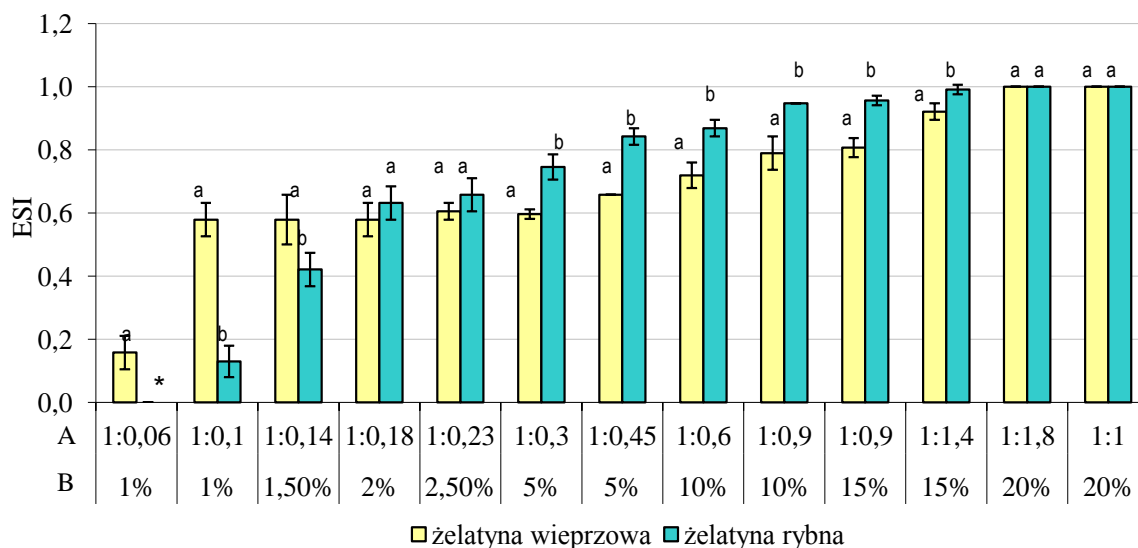
LOO jak i wyniki testu TBA o wiele wyraźniej wskazywały na szybki proces utleniania ciśnieniowanego oleju. Po 21 dniach przechowywania w warunkach tlenowych nie stwierdzono żadnych różnic w zawartości dienów pomiędzy olejem ciśnieniowanym a próbą kontrolną, nie poddaną działaniu wysokiego ciśnienia. Natomiast w warunkach ograniczonego dostępu tlenu zaobserwowano, że po tym czasie zawartość sprzężonych dienów była mniejsza o około 15% w oleju poddanym działaniu ciśnienia 193MPa niż w oleju nieciśnieniowanym (Tabela 26). Zależności takiej nie stwierdzono, gdy przechowywany olej był uprzednio poddany działaniu ciśnienia 60 MPa.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że wysokie ciśnienie, choć bezpośrednio po procesie znacznie zmniejszało LOO oleju, to jednak podczas jego przechowywania występowało przyspieszenie przemian oksydacyjnych, nawet w warunkach beztlenowych, a utlenianie zachodziło tym szybciej, im większym ciśnieniem działano na olej.

4.6 MIKROKAPSULKOWANIE OLEJU RYBNEGO Z ZASTOSOWANIEM ŻELATYNY RYBNEJ

4.6.1 Określenie stabilności emulsji przeznaczonych do wytwarzania mikrokapsulek.

W mikrokapsułkowaniu substancji metodą emulsyjną istotnym elementem jest wytworzenie emulsji z roztworu polimeru, który ma stanowić otoczki mikrokapsulek oraz substancji stanowiącej rdzeń, zazwyczaj hydrofobowej. Warunkiem koniecznym, aby otoczki równomiernie okalały materiał rdzenia jest wysoka stabilność emulsji. Cho i in. (2003) wykazali, że o jej stabilności decyduje przede wszystkim pochodzenie białka, jego stężenie oraz ewentualne modyfikacje. Na Rysunku 43 przedstawiono porównanie indeksu stabilności emulsji (ESI) wytworzonych z oleju rybnego i żelatyny rybnej oraz wieprzowej.



Rysunek 43. Wartości ESI emulsji oleju rybnego z żelatyną rybną lub wieprzową; A – stosunek rdzeń : otoczka, B – stężenie żelatyny w mieszaninie;

* emulsja po zakończeniu homogenizacji natychmiast rozwarstwiała się.

Różne indeksy (a-b) w obrębie tego samego rodzaju emulsji z żelatyny rybnej i wieprzowej oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe.

Ilość oleju uwalnianego z emulsji malała wraz ze wzrostem stężenia żelatyny w mieszaninie. Dotyczy to zarówno żelatyny rybnej jak i wieprzowej, dla obydwu żelatyn największą stabilność emulsji uzyskano, gdy stężenie białka w roztworze wynosiło 20% a stosunek rdzeń:otoczka był równy 1:1 oraz 1:8.

Przy stosunku rdzenia do otoczki wynoszącym od 1:0,06 do 1:0,14 i małych stężeniach białka (1-1,5%), powstające emulsje były stabilniejsze w obecności żelatyny

wieprzowej niż rybnej. Przy najmniejszym stosunku 1:0,06 emulsja wytwarzana z żelatyny wieprzowej wykazywała niewielką stabilność, natomiast z żelatyny rybnej natychmiast się rozwarstwiała z całkowitym uwolnieniem oleju, ESI wynosiło 0. Natomiast, przy nieco wyższych stężeniach białka w mieszaninie (2-2,5%) i wyższym stosunku rdzeń:otoczka (1:0,18 – 1:0,23), stabilność emulsji z zastosowaniem żelatyny rybnej była taka sama jak emulsji wytworzonej z udziałem żelatyny wieprzowej, niewielkie różnice nie były statystycznie istotne (Rysunek 43). W miarę wzrastania stężenia białka oraz przy wyższych stosunkach zawartości rdzenia do otoczki, emulsje z oleju i żelatyny rybnej były bardziej stabilne niż emulsje z udziałem żelatyny wieprzowej.

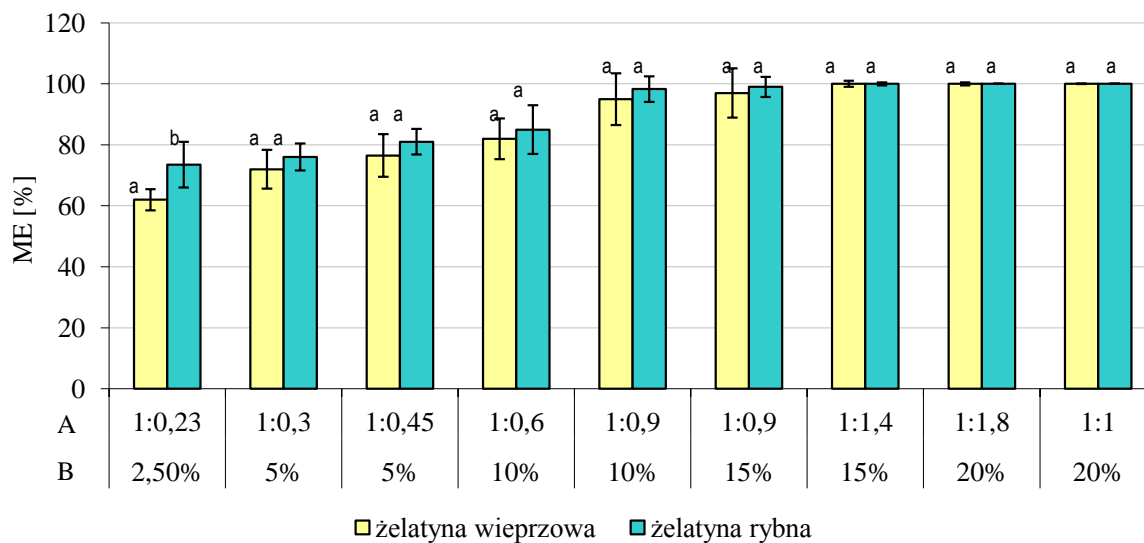
Na podstawie powyższych badań wykazano, że emulsje o dużej stabilności ($ESI > 0,8$) można uzyskać przez zastosowanie żelatyny rybnej już przy 5% stężeniu w mieszaninie oraz odpowiednim stosunku zawartości rdzenia do otoczki (1:0,45). Podobne wyniki uzyskali Surh i in. (2006) wytwarzając emulsję z żelatyn rybnych o różnej masie cząsteczkowej i oleju kukurydzianego.

4.6.2 Określenie efektywności procesu mikrokapsułkowania.

Efektywność mikrokapsułkowania (ME) określa nie tylko wydajność procesu, ale także, pośrednio, ilość oleju, który został zamknięty w strukturze mikrokapsulek i w ten sposób może być chroniony przed niekorzystnym działaniem czynników środowiska, przede wszystkim przed dostępem tlenu. Olej, który nie został związany w polimerowych otoczkach, a pozostaje na ich powierzchni, jest bardziej podatny na oksydację, ze względu na zwiększoną powierzchnię kontaktu z powietrzem, dlatego też, m.in., pożądane jest, aby ME była jak największa. ME zależy zarówno od rodzaju materiału zastosowanego jako otoczki, jak i metody wytwarzania mikrokapsulek (Anwar i Kunz 2011).

Na rysunku 44 przedstawiono ME oleju rybnego z wykorzystaniem żelatyny wieprzowej i rybnej, przy różnych stężeniach białka w mieszaninie i różnych stosunkach zawartości rdzenia do otoczki. Mikrokapsułki wytwarzano poprzez sublimacyjne suszenie przygotowanych jednorodnych emulsji.

Przy stosunku zawartości rdzenia do otoczki równym 1:0,23 ME była o ok. 18% większa w przypadku użycia żelatyny rybnej niż żelatyny wieprzowej. Natomiast przy wyższych stosunkach rdzeń:otoczka nie zaobserwowano różnic pomiędzy efektywnością mikrokapsułkowania z wykorzystaniem żelatyny rybnej czy wieprzowej.



Rysunek 44. Wpływ stosunku zawartości rdzenia do otoczki i stężenia białka (żelatyna wieprzowa i żelatyna rybna) w roztworze na ME; A – stosunek rdzeń : otoczka, B – stężenie roztworu żelatyny.

Różne indeksy (a-b) w obrębie tego samego rodzaju emulsji z żelatyny rybnej i wieprzowej oznaczają różnice istotne statystycznie ($P < 0,05$).

Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe.

Największą ME, ok. 100%, zarówno w przy użyciu żelatyny rybnej jak i wieprzowej, uzyskano przy stosunku zawartości rdzenia do otoczki powyżej 1:0,6.

Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że zarówno żelatyna rybna jak i wieprzowa stanowią dobry materiał na otoczki mikrokapsulek zawierających olej rybny i przy odpowiednim stosunku rdzeń:otoczka pozwalają na uzyskanie wysokich wydajności procesu mikrokapsułkowania. Uzyskane wartości ME dla pozyskiwanej ze skór łososi żelatyny były wyższe niż dla innych naturalnych polimerów wykorzystywanych do wytwarzania mikrokapsulek metodą emulsyjną w połączeniu z suszeniem sublimacyjnym. Wydajność mikrokapsułkowania oleju z użyciem maltodekstryn wynosiła jedynie 28 – 47%, nawet przy znacznie wyższym niż stosowany w pracy stosunku zawartości rdzenia do otoczki (1:4) (Anwar i Kunz 2011). ME w przypadku żelatyny rybnej była również większa niż uzyskana dla mieszanin kazeiny z laktozą lub maltodekstrynami (Heinzelmann i in. 2000).

Biorąc pod uwagę ME oraz ESI, wybrano jako optymalny skład emulsji przeznaczonej do wytwarzania mikrokapsulek poprzez suszenie sublimacyjne 20% stężenie białka w mieszaninie oraz stosunek rdzeń:otoczka równy 1:1. Otrzymywane z emulsji o takim składzie mikrokapsułki przeznaczone do dalszych badań przechowalniczych.

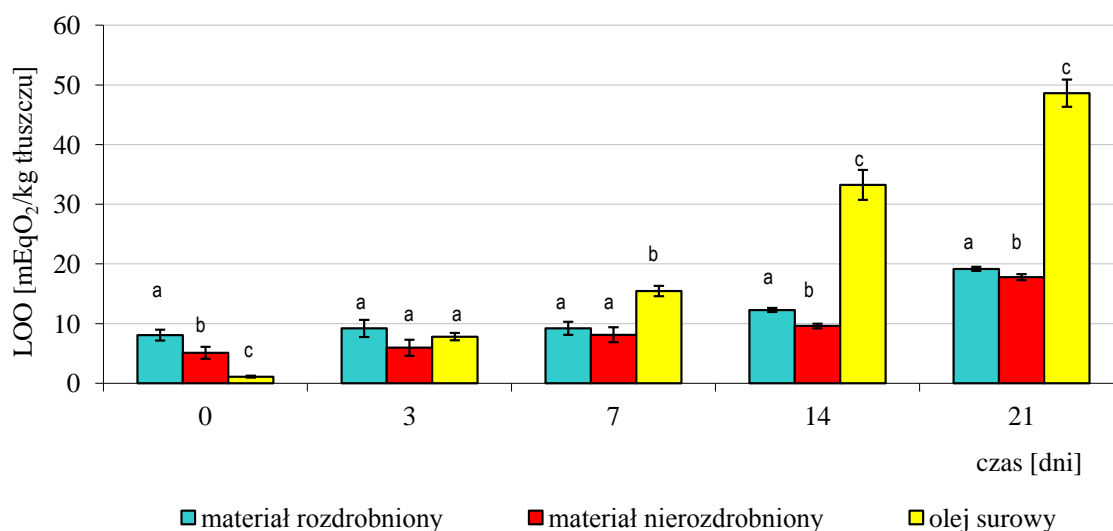
4.6.3 Wpływ przechowywania mikroksułowowanego oleju rybnego na zawartość pierwotnych i wtórnych produktów utleniania.

Materiał uzyskany po sublimacyjnym suszeniu emulsji żelatyny i oleju rybnego miał postać twardych zwartych płytek. Część otrzymanego materiału rozdrobniono przy pomocy ręcznej tarki uzyskując w ten sposób drobny jasnokremowy proszek. Dla porównania, drugą część materiału przechowywano w formie nierozdrobnionej. Miało to na celu sprawdzenie, czy rozdrobnienie materiału otrzymanego w wyniku suszenia sublimacyjnego emulsji ma wpływ na stabilność oksydacyjną oleju zawartego w strukturze mikroksułowek.

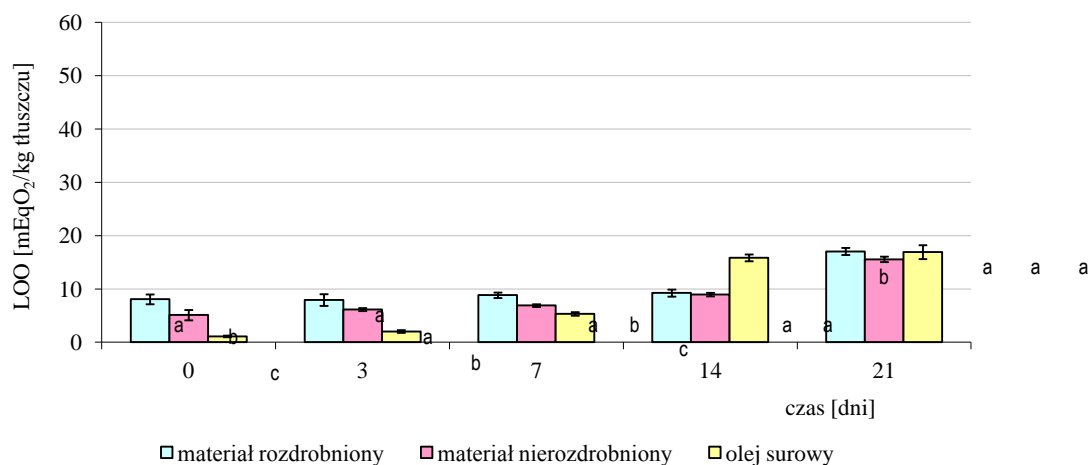
Wykazano, że tuż po wytworzeniu mikroksułowek, LOO zamkniętego w ich strukturze oleju rybnego wzrosła z ok. 1 do ok. 5 i 8 mEqO₂/kg tłuszczu, odpowiednio dla mikroksułowek w formie materiału nierozdrobnionego i rozdrobnionego (Rysunek 45). Jest to najprawdopodobniej związane z zastosowaną metodą mikroksułowowania. Wg. Heinzelmann i Franke (1999), już na etapie wytwarzania emulsji, jeszcze przed procesem suszenia, może dochodzić do przyspieszenia przemian oksydacyjnych. Podobnie Serfert i in. (2009) wykazali czterokrotny wzrost liczby nadtlencowej podczas wytwarzania emulsji z sukcyulowanej skrobi i syropu glukozowego z olejem rybnym bez dodatku jakichkolwiek przeciwutleniaczy. Przyspieszenie procesów oksydacyjnych podczas wytwarzania emulsji jest wynikiem zwiększonego kontaktu warstwy olejowej z powietrzem, spowodowanego intensywnym mieszaniem. Zjawiska tego nie można całkowicie uniknąć, nawet stosując homogenizację pod ciśnieniem. Dodatkowo, podczas wytwarzania emulsji, na skutek działania sił ścinających, wzrasta temperatura mieszaniny, co dodatkowo przyczynia się do szybszego utleniania oleju (Siefert i in. 2009).

Podczas przechowywania prób w temperaturze pokojowej wykazano ochronny efekt mikroksułowowania w przypadku materiału rozdrobnionego oraz nierozdrobnionego (Rysunek 45a). LOO oleju mikroksułowowanego, chociaż była początkowo większa niż w oleju surowym, to po 7 dniach była mniejsza o ok. 40% od LOO oleju niemikroksułowowanego. Stopień utlenienia oleju zamkniętego w otoczce żelatynowej po trzech tygodniach przechowywania wzrósł ponad dwukrotnie, jednak LOO była ponad 2,5 razy mniejsza niż dla oleju niemikroksułowowanego. Chociaż czas przechowywania był stosunkowo krótki, to jednak biorąc pod uwagę poziom utlenienia surowego oleju można stwierdzić, że mikroksułowowanie oleju znacznie polepszyło jego stabilność oksydacyjną.

a)



b)



Rysunek 45. Zawartość pierwotnych produktów utleniania w surowym oleju ze skór łososi oraz w oleju zawartym w strukturze mikrokapsulek przechowywanych w formie materiału rozdrobnionego i nierozdrobnionego:

a) w temperaturze pokojowej

b) w 4°C

Różne indeksy (a-c) w obrębie poszczególnych dni oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe.

Podobne wyniki uzyskał Cho i in. (2003) wykazując, że podczas przechowywania w podwyższonej temperaturze, proces oksydacji surowego oleju przebiegał szybciej niż oleju zamkniętego w otoczce białkowej. Także Klinkerson i in. (2005) stwierdzili, że olej z

tuńczyka zamknięty w mikrokapsułkach chitozanowo-dekstrynowych był mniej podatny na utlenianie niż olej surowy.

W początkowym okresie przechowywania w warunkach chłodniczych LOO mikrokapsułkowanego oleju była większa niż oleju niekapsułkowanego, co wynikało z większej zawartości pierwotnych produktów utleniania w wyjściowych mikrokapsułkach (Rysunek 45b). Natomiast po 14 dniach LOO oleju mikrokapsułkowanego była o ok. 45% mniejsza niż oleju nie zamkniętego w strukturze mikrokapsułek i nie przekraczała 10 mEqO₂/kg tłuszczu. Ten ochronny efekt mikrokapsułkowania nie był widoczny po dłuższym okresie przechowywania - po 21 dniach LOO oleju mikrokapsułkowanego jak i niemikrokapsułkowanego była podobna. Po 3 tygodniach przechowywania w temperaturze 4°C LOO mikrokapsułkowanego oleju była jedynie o 10% niższa niż w temperaturze pokojowej.

Stopień rozdrobnienia, w przypadku przechowywania w temperaturze chłodniczej, nie miał większego wpływu na stabilność oksydacyjną mikrokapsułkowanego oleju - niewielkie różnice występowały tylko w początkowym okresie przechowywania, natomiast po dłuższym czasie wartości LOO były na zbliżonym poziomie. Zarówno w przypadku mikrokapsułek przechowywanych w formie rozdrobnionej jak i nierozdrobnionej w temperaturze pokojowej i chłodniczej, LOO zawartego w nich oleju po 21 dniach nie przekroczyła 20 mEqO₂/kg tłuszczu (Rysunek 45).

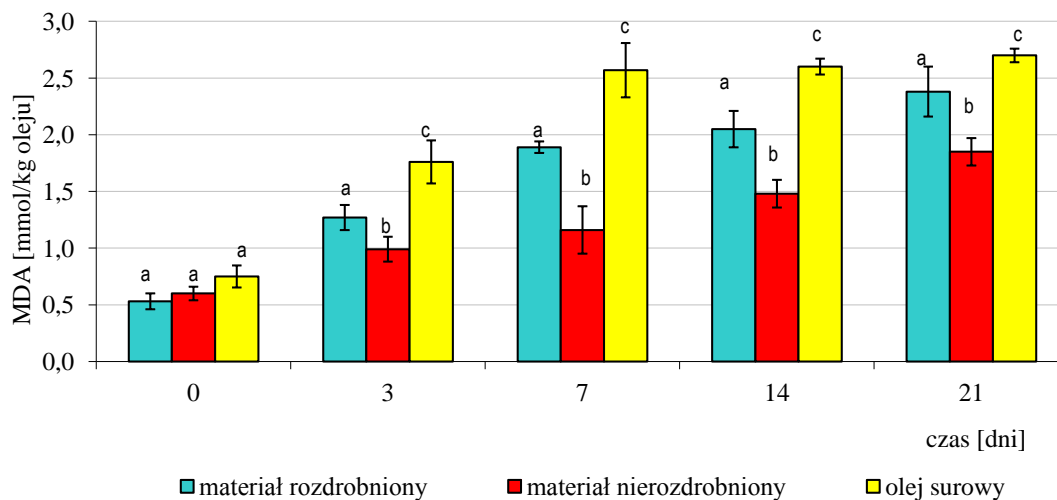
Ze względu na to, że LOO określa jedynie zawartość pierwotnych produktów utleniania i nie oddaje w pełni obrazu całości zmian oksydacyjnych zachodzących w badanych mikrokapsułkowanych olejach, zbadano także zawartość wtórnych produktów utleniania za pomocą testu TBA.

W porównaniu z LOO, w teście TBA wyraźniej widać różnicę w szybkości utleniania mikrokapsułkowanego oleju pomiędzy materiałem rozdrobnionym i nierozdrobnionym, przechowywanym zarówno w temperaturze pokojowej jak i chłodniczej (Rysunek 46).

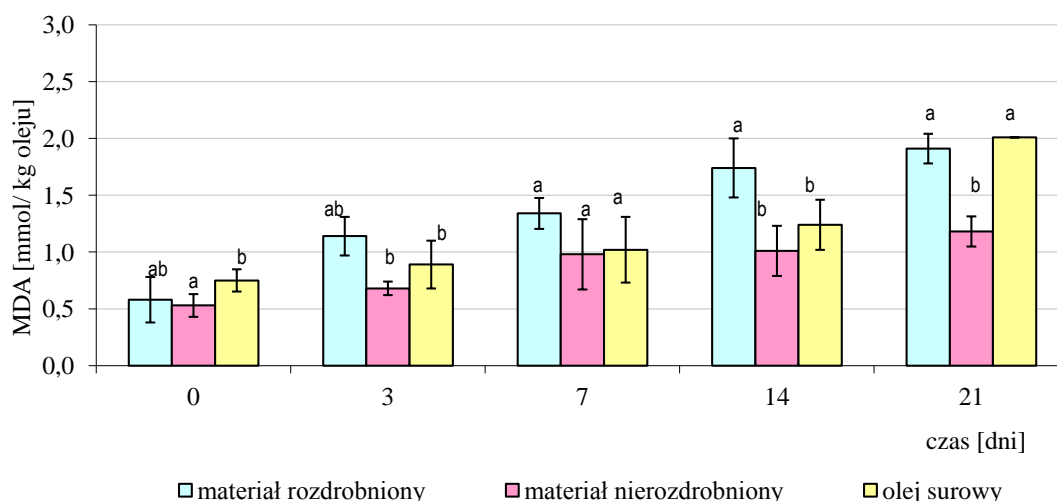
Tuż po wytworzeniu mikrokapsułkowanego materiału zawartość wtórnych produktów utleniania w zawartym w nich oleju była taka sama jak w oleju surowym (Rysunek 46). W trakcie przechowywania prób w temperaturze pokojowej zaobserwowano, że wartość wskaźnika TBA dla oleju zawartego w materiale rozdrobnionym po 21 dniach była mniejsza niż w oleju surowym, jednak nie jest to duża różnica. Ochronny efekt mikrokapsułkowania i spowolnienie procesu powstawania wtórnych produktów utleniania wykazano jedynie w przypadku materiału nierozdrobnionego. W oleju mikrokapsułkowanym w formie materiału nierozdrobnionego zawartość wtórnych produktów utleniania była mniejsza niż w oleju

surowym i oleju mikrokapsułkowanym w formie materiału rozdrobnionego przez cały okres przechowywania. Po 21 dniach różnica wartości wskaźnika TBA oleju w materiale nierozdrobnionym a oleju niekapsułkowanym wynosiła ok. 35%.

a)



b)



Rysunek 46. Zawartość wtórnych produktów utleniania w surowym oleju ze skór łososi oraz w oleju zawartym w strukturze mikrokapsulek przechowywanych w formie materiału rozdrobnionego i nierozdrobnionego:

a) w temperaturze pokojowej

b) w 4°C

Różne indeksy (a-c) w obrębie poszczególnych dni oznaczają różnice istotne statystycznie.

Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób ± odchylenie standardowe.

Trudno jest stwierdzić korelację pomiędzy wynikami dotyczącymi oznaczenia wtórnych oraz pierwotnych produktów utleniania. LOO oleju zawartego w materiale rozdrobnionym i nierozdrobnionym była do siebie dość zbliżona, podczas gdy wyraźnie

zauważalne jest, że proces rozpadu nadtlenków, a tym samym tworzenia się wtórnych produktów oksydacji, zachodził szybciej w oleju mikrokapsułkowanym w formie materiału rozdrobnionego.

Podczas przechowywania prób w temperaturze chłodniczej wykazano, że do 14 dni wskaźnik TBA dla oleju w mikrokapsułkach w formie materiału rozdrobnionego był większy niż dla oleju niekapsułkowanego przechowywanego w tych samych warunkach (Rysunek 46b). Po 21 dniach zawartość wtórnych produktów utleniania była taka sama w oleju mikrokapsułkowanym w formie materiału rozdrobnionego, jak i w oleju surowym. Natomiast wartości wskaźnika TBA dla oleju zawartego w materiale przechowywanym w całości były mniejsze niż w oleju zawartym w materiale rozdrobnionym przez cały okres przechowywania o około 40%. Przez 2 tygodnie nie obserwowano żadnych różnic w zawartości wtórnych produktów utleniania pomiędzy olejem zawartym w materiale nierozdrobnionym a niemikrokapsułkowanym olejem, jednakże już po upływie 21 dni wskaźnik TBA dla oleju mikrokapsułkowanego w tym materiale był mniejszy o 35% niż w oleju surowym. Wyniki testu TBA nie znajdują bezpośredniego przełożenia na LOO, wydaje się jednak, że rozdrobnienie przyczyniło się do szybszego wzrostu zawartości wtórnych produktów utleniania w oleju w materiale przechowywanym w 4°C (Rysunek 46).

Z uwagi na specyficzny charakter wskaźnika TBA niemożliwe jest bezpośrednio porównywanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi, bowiem zawartość wtórnych produktów oksydacji jak również szybkość ich powstawania, zależą od wielu czynników, m.in. wyjściowej jakości oleju. Wan i in. (2011) wykazali, że w emulsjach z kazeiny i oleju menhadena przeznaczonych do mikrokapsułkowania przyrost zawartości wtórnych produktów oksydacji następował wyjątkowo szybko i już po 88 godzinach przechowywania w 20°C wartości wskaźnika TBA były 2,5 razy większe niż po wytworzeniu emulsji. Baik i in. (2004) podczas 14 dniowego przechowywania mikrokapsułkowanego oleju z menhadena w 30°C zaobserwowali aż ok. 60-krotny wzrost zawartości wtórnych produktów oksydacji – z 0,15 do 60 mmol/kg. Odmienne wyniki uzyskali Klinkerson i in. (2005) – po 14 dniach przechowywania w 37°C mikrokapsułek wytworzonych poprzez suszenie sublimacyjne emulsji chitozanu i oleju z tuńczyka wskaźnik TBA wzrósł jedynie dwukrotnie osiągając wartość ok. 2 mmol/kg.

Uzyskane wyniki wskazują, że mikrokapsułkowanie ograniczyło proces oksydacji oleju jedynie w niewielkim stopniu. O zawartości pierwotnych produktów utleniania w mikrokapsułkowanym oleju, oprócz sposobu wytwarzania emulsji, decydować mogła morfologia otrzymanego produktu, a więc przede wszystkim nieregularna struktura

wytwarzanych wokół kropli oleju otoczek, ich porowatość, a co za tym idzie - większa powierzchnia kontaktu rdzenia z powietrzem (Anwar i Kunz 2011). Możliwe jest, że zastosowany sposób rozdrabniania również wpłynął negatywnie na stabilność oleju zamykanego w rdzeniu mikrokapsulek – podczas tego procesu część otoczek mogła ulec zniszczeniu, co z kolei skutkowało łatwiejszym dostępem tlenu do wnętrza mikrokapsulek.

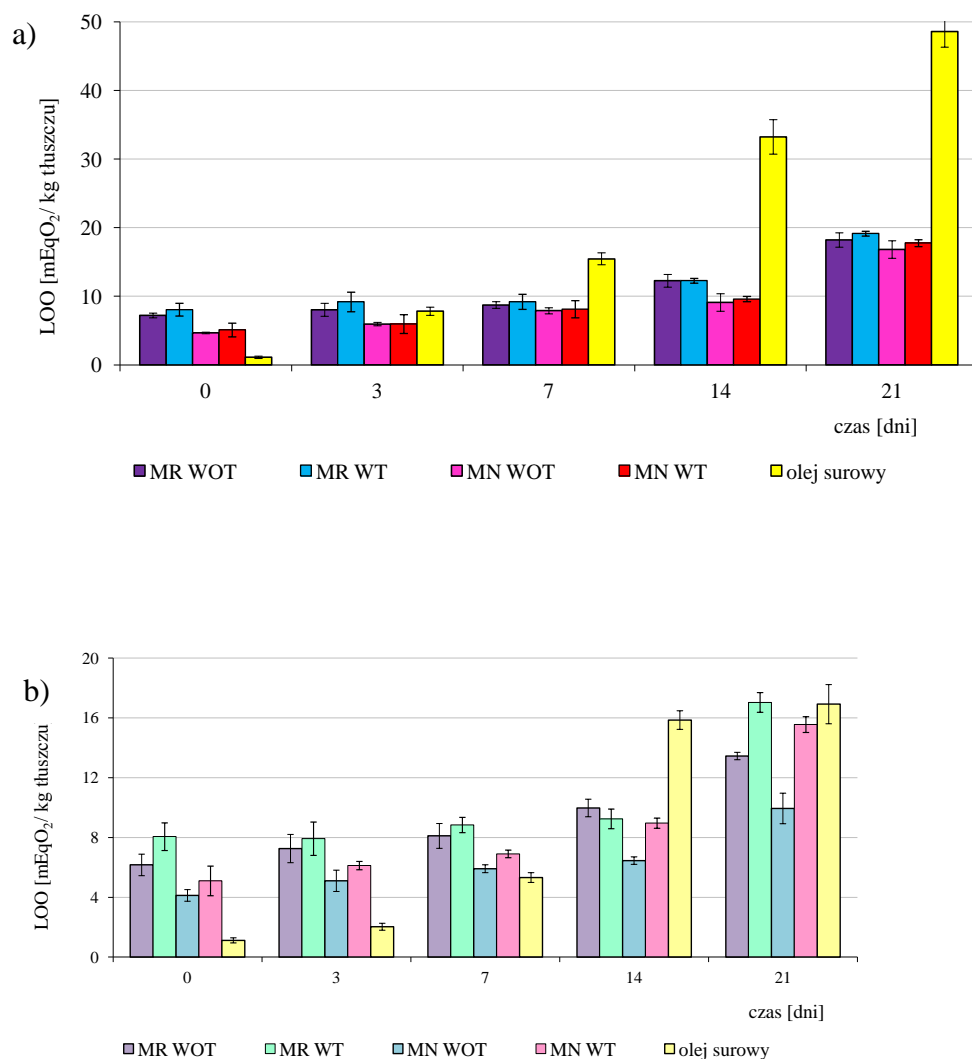
4.6.4 Stabilność oksydacyjna oleju rybnego mikrokapsułkowanego w warunkach ograniczonego dostępu tlenu.

Ze względu na to, że wyjściowa zawartość pierwotnych produktów utlenienia w mikrokapsułkowanym oleju była stosunkowo wysoka bezpośrednio po wytworzeniu mikrokapsulek, w kolejnym etapie pracy sprawdzono czy wytwarzanie emulsji w atmosferze gazu obojętnego pozwoli na ograniczenie przemian oksydacyjnych w otrzymywanym materiale. Jednakże, tuż po wytworzeniu mikrokapsulek miało miejsce podobne zjawisko jak w przypadku mikrokapsulek wytwarzanych w warunkach tlenowych – nastąpił wzrost LOO zamkniętego w ich strukturze oleju rybnego.

W przypadku materiału rozdrobnionego zawartość pierwotnych produktów utleniania w mikrokapsułkowanym oleju była około 6-krotnie większa niż w oleju surowym, natomiast w oleju w materiale nierozdrobnionym – około 4 razy większa. Podczas przechowywania prób w temperaturze pokojowej nie zaobserwowano żadnych różnic LOO w porównaniu z olejem z mikrokapsulek wytwarzanych w warunkach tlenowych. Dotyczy to zarówno oleju mikrokapsułkowanego w formie materiału rozdrobnionego, jak i przechowywanego w całości (Rysunek 47).

Po 21 dniach przechowywania prób w temperaturze pokojowej zawartość nadtlenków w oleju mikrokapsułkowanym w warunkach ograniczonego dostępu tlenu była blisko 2,5 razy mniejsza niż w oleju surowym (Rysunek 47a).

Podczas przechowywania w temperaturze 4°C aż do 7 dni nie było żadnych różnic w zawartości pierwotnych produktów utleniania w mikrokapsułkowanym oleju pomiędzy mikrokapsułkami wytwarzanymi w warunkach tlenowych i ograniczonego dostępu tlenu (Rysunek 47b).



Rysunek 47. Zawartość pierwotnych produktów utleniania w surowym oleju ze skór łososi oraz w oleju zawartym w strukturze mikrokapsulek wytwarzanych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, przechowywanych w formie materiału rozdrobnionego i nierozdrobnionego:

a) w temperaturze pokojowej

b) w 4°C

MR WOT – materiał rozdrobniony, wytworzony w warunkach ograniczonego dostępu tlenu

MR WT – materiał rozdrobniony, wytworzony w warunkach tlenowych

MN WOT – materiał nierozdrobniony, wytworzony w warunkach ograniczonego dostępu tlenu

MN WT – materiał rozdrobniony, wytworzony w warunkach tlenowych

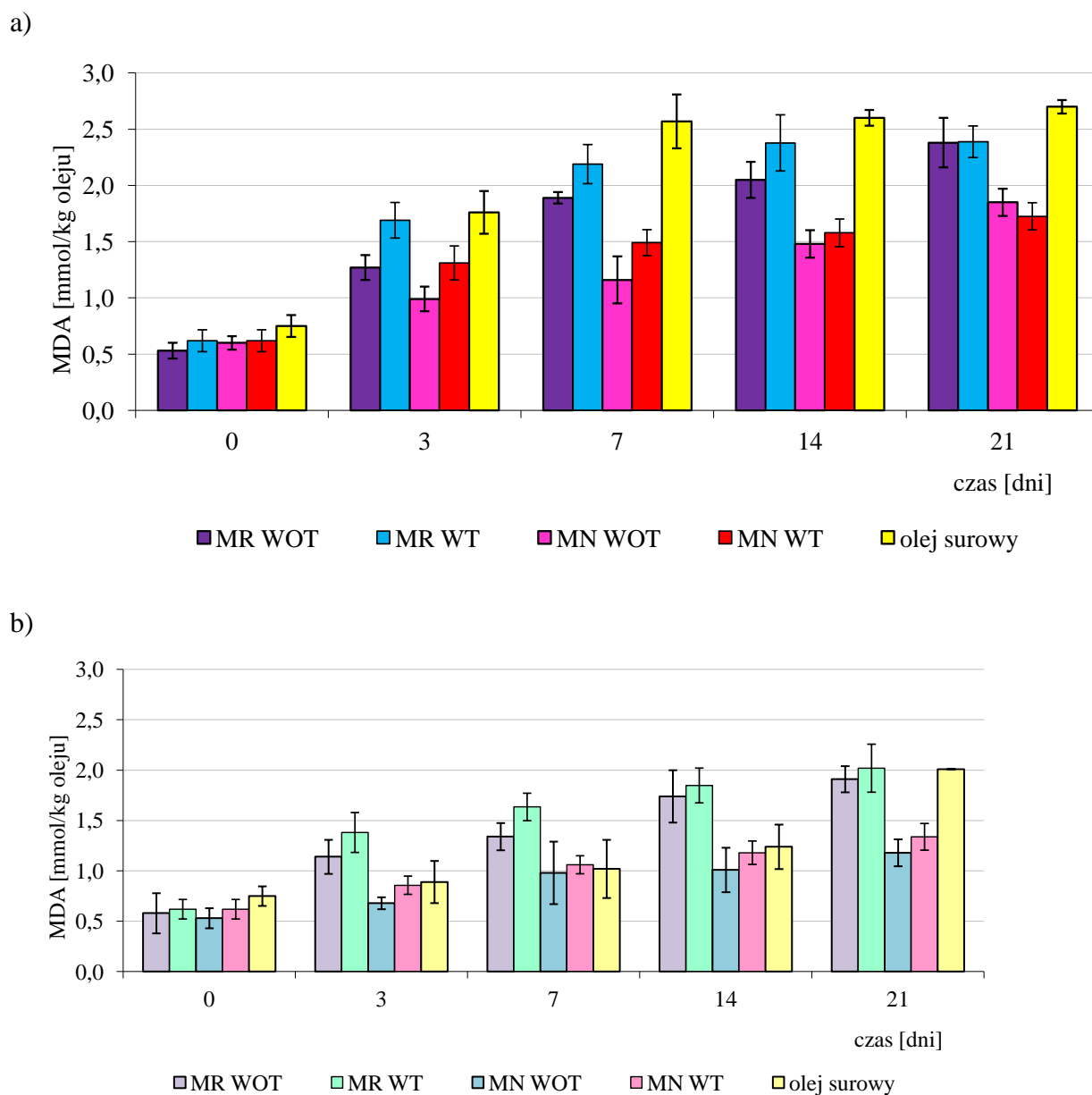
Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe.

Po dwóch tygodniach przechowywania zauważyć można, że LOO oleju zawartego w strukturze mikrokapsulek w formie materiału nierozdrobnionego wytwarzanych w warunkach

ograniczonego dostępu tlenu jest mniejsza o około 28% niż w tych wytwarzanych w warunkach tlenowych. Po upływie 21 dni różnice dotyczą zarówno mikrokapsulek wytwarzanych w formie materiału rozdrobnionego jak i przechowywanego w całości. Zawartość pierwotnych produktów utleniania w oleju w materiale rozdrobnionym i nierozdrobnionym była niższa odpowiednio o ok. 22% i 40% niż w ich odpowiednikach wytwarzanych w warunkach tlenowych. LOO oleju zawartego w strukturze mikrokapsulek wytwarzanych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu była znacznie niższa niż w oleju surowym przechowywanym w warunkach chłodniczych. W przypadku oleju mikrokapsułkowanego w formie materiału nierozdrobnionego różnica ta wynosiła około 45%.

Podczas przechowywania w temperaturze pokojowej materiału rozdrobnionego i nierozdrobnionego stwierdzono, że tuż po wytworzeniu zawartość wtórnych produktów oksydacji w mikrokapsułkowanym oleju w przypadku mikrokapsulek wytwarzanych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu i tlenowych była zbliżona (Rysunek 48a). Następnie, zarówno w oleju zawartym w materiale rozdrobnionym jak i przechowywanym w całości aż do 7 dnia wartości wskaźnika TBA były mniejsze niż w ich odpowiednikach wytwarzanych bez ograniczenia dostępu tlenu. Natomiast od 14 dni aż do końca przechowywania nie było żadnych różnic w zawartości wtórnych produktów utleniania pomiędzy olejem w mikrokapsułkach wytwarzanych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu i tlenowych – dotyczy to zarówno materiału rozdrobnionego jak i przechowywanego w całości. Ponadto, na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że wartość wskaźnika TBA jest mniejsza w oleju w materiale nierozdrobnionym wytwarzanym w warunkach ograniczonego dostępu tlenu niż w surowym oleju podczas całego okresu przechowywania w temperaturze pokojowej – po 21 dniach różnica ta wynosiła ok. 36%. Natomiast w przypadku oleju zawartego w strukturze materiału rozdrobnionego wartości te nie różniły się znacząco od tych wyznaczonych dla oleju surowego.

Podczas przechowywania prób w temperaturze chłodniczej zawartość wtórnych produktów utleniania w oleju w mikrokapsułkach wytwarzanych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu była taka sama jak w oleju w mikrokapsułkach wytwarzanych w warunkach tlenowych (Rysunek 48b). Zależność ta dotyczyła zarówno mikrokapsulek przechowywanych w formie materiału rozdrobnionego jak i nierozdrobnionego.



Rysunek 48. Zawartość wtórnych produktów utleniania w surowym oleju ze skór łososi oraz w oleju zawartym w strukturze mikrokapsulek wytwarzanych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, przechowywanych w formie materiału rozdrobnionego i nierozdrobnionego:

a) w temperaturze pokojowej

b) w 4°C

MR WOT – materiał rozdrobniony, wytworzony w warunkach ograniczonego dostępu tlenu

MR WT – materiał rozdrobniony, wytworzony w warunkach tlenowych

MN WOT – materiał nierozdrobniony, wytworzony w warunkach ograniczonego dostępu tlenu

MN WT – materiał rozdrobniony, wytworzony w warunkach tlenowych

Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe.

Stwierdzono, że ograniczając dostępu tlenu podczas wytwarzania emulsji nie uzyskano wystarczającego zabezpieczenia mikroksułowanego oleju rybnego przed postępującym utlenianiem. Prawdopodobnie więc, przyczyną szybkiej oksydacji oleju rybnego zawartego w strukturze mikroksułowek był nie sposób i warunki wytwarzania emulsji, ale sposób suszenia.

Przypuszczalnie duża powierzchnia suszenia w formie płytek a następnie ich ręczne rozdrabnianie miały wpływ na stosunkowo małą stabilność oksydacyjną zamkniętego w nich oleju i mogły przyczynić się do stopniowego pogarszania jego jakości w trakcie przechowywania gotowych mikroksułowek. Dlatego też, w kolejnym etapie prac, aby uniknąć suszenia emulsji w formie płytek o dużej powierzchni wykorzystano możliwość wytwarzania peletek żelatynowych, które nie wymagałyby rozdrobnienia.

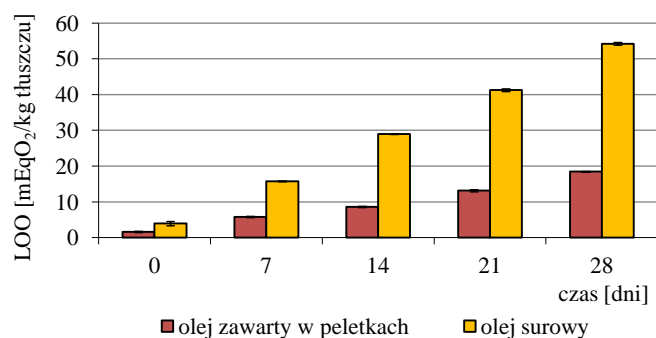
4.6.5 Mikroksułowanie oleju rybnego w peletkach żelatynowych

Peletki są jedną z wygodniejszych form dawkowania leku i preparatów farmaceutycznych. Tradycyjne tabletki drażowane produkuje się wykorzystując prasy i ściskając pod odpowiednim ciśnieniem substancję czynną oraz substancje pomocnicze, np. laktozę. Peletki natomiast nadają się do mikroksułowania substancji oleistych, ponieważ wytwarzane są poprzez suszenie sublimacyjne emulsji substancji czynnej i nośnika (w postaci wodnego roztworu) naniesionej do odpowiednich form. Częstki substancji czynnej otaczane są nośnikiem i w ten sposób powstają mikroksułowki. Peletki można rozdrobnić w celu uzyskania proszku lub też mogą być powlekane dodatkową warstwą ochronną, podobnie jak tabletki. Wyjątkowy charakter peletek pozwala także na wprowadzenie w ich strukturę dodatkowych składników, np. o charakterze przeciwutleniającym. Obecnie na rynkach zagranicznych są już dostępne peletki zawierające olej rybny. Peletki te nie tylko chronią olej przed oksydacją, ale również nie powodują nieprzyjemnych problemów gastrycznych, które mają niektórzy pacjenci po zażyciu tradycyjnych miękkich kapsułek żelatynowych z olejem.

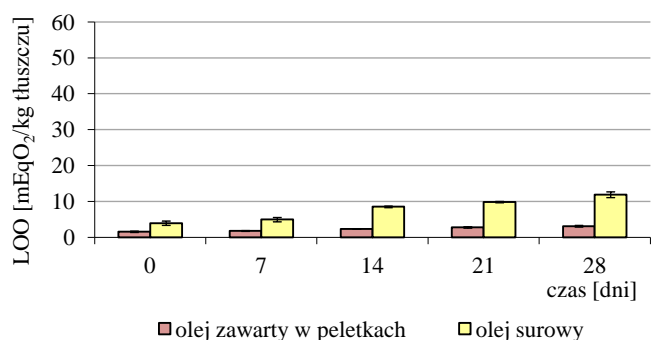
Na Rysunku 49 przedstawiono zmiany liczby nadtlencowej w trakcie przechowywania peletek żelatynowych zawierających olej z łososia oraz surowego oleju w temperaturze pokojowej i chłodniczej.

Tuż po wytworzeniu peletek zawartość pierwotnych produktów utlenienia w oleju była dwukrotnie mniejsza niż w oleju surowym i blisko 3-krotnie niższa niż w oleju zawartym w strukturze materiału suszonego w formie płytek w całości oraz 5-krotnie niższa niż w oleju w materiale rozdrobnionym (Rysunek 45 i 49).

a)



b)



Rysunek 49. Wpływ przechowywania w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C na zawartość pierwotnych produktów utleniania w oleju surowym i oleju zawartym w strukturze peletek

Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób ± odchylenie standardowe.

Wyniki te potwierdzają hipotezę, że kluczowe znaczenie dla stabilności oksydacyjnej mikrokapsułkowanych preparatów ma sposób suszenia sublimacyjnego emulsji, a ściślej – forma mikrokapsułkowanego materiału. Mniejsza powierzchnia kontaktu z powietrzem (w porównaniu do suszonych sublimacyjnie płytek) ograniczyła proces oksydacji tuż po wytworzeniu materiału. Po 28 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej LOO oleju w peletkach nie przekroczyła 18 mEqO₂/kg tłuszczu i była trzykrotnie niższa niż w oleju niemikrokapsułkowanym przechowywanym w tych samych warunkach (Rysunek 49a). Również w trakcie przechowywania prób w temperaturze chłodniczej wykazano ochronny wpływ mikrokapsułkowania oleju w postaci peletek na jego stabilność oksydacyjną. Po czterech tygodniach przechowywania LOO oleju w peletkach wzrosła tylko z 1,5 do 3,13 mEqO₂/kg tłuszczu i była 3,5 razy mniejsza niż w oleju surowym (Rysunek 49b).

Wartości wskaźnika TBA były nieco mniejsze podczas całego okresu przechowywania oleju w peletkach niż w oleju surowym, zarówno w temperaturze pokojowej

jak i 4°C, nie są to jednak duże różnice (Tabela 27). Mniejsza zawartość wtórnych produktów utleniania jest związana z częściowym zahamowaniem procesu powstawania nadtlenków w mikroksułowanym oleju. Dzięki mikroksułowaniu w formie peletek zwiększyła się stabilność oksydacyjna oleju rybnego, co potwierdzają zarówno wyniki dotyczące zawartości pierwotnych jak i wtórnych produktów utleniania.

Tabela 27. Wpływ przechowywania w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C na zawartość wtórnych produktów utleniania w oleju surowym i oleju zawartym w strukturze peletek

a)

Czas przechowywania [dni]	MDA [mmol/kg oleju] ¹	
	olej surowy	olej zawarty w peletkach
0	0,316±0,005 ^{Aa}	0,240±0,003 ^{Ba}
7	0,346±0,003 ^{Ab}	0,277±0,002 ^{Bb}
14	0,445±0,008 ^{Ac}	0,399±0,003 ^{Bc}
21	0,579±0,003 ^{Ad}	0,509±0,003 ^{Bd}
28	0,698±0,002 ^{Ae}	0,622±0,003 ^{Be}

b)

Czas przechowywania [dni]	MDA [mmol/kg oleju] ¹	
	olej surowy	olej zawarty w peletkach
0	0,316±0,005 ^{Aa}	0,240±0,003 ^{B^a}
7	0,327±0,001 ^{Ab}	0,246±0,002 ^{Bb}
14	0,428±0,002 ^{Ac}	0,359±0,004 ^{Bc}
21	0,543±0,002 ^{Ad}	0,455±0,005 ^{Bd}
28	0,644±0,002 ^{Ae}	0,541±0,002 ^{Be}

¹Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-B) i kolumnach (a-e) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

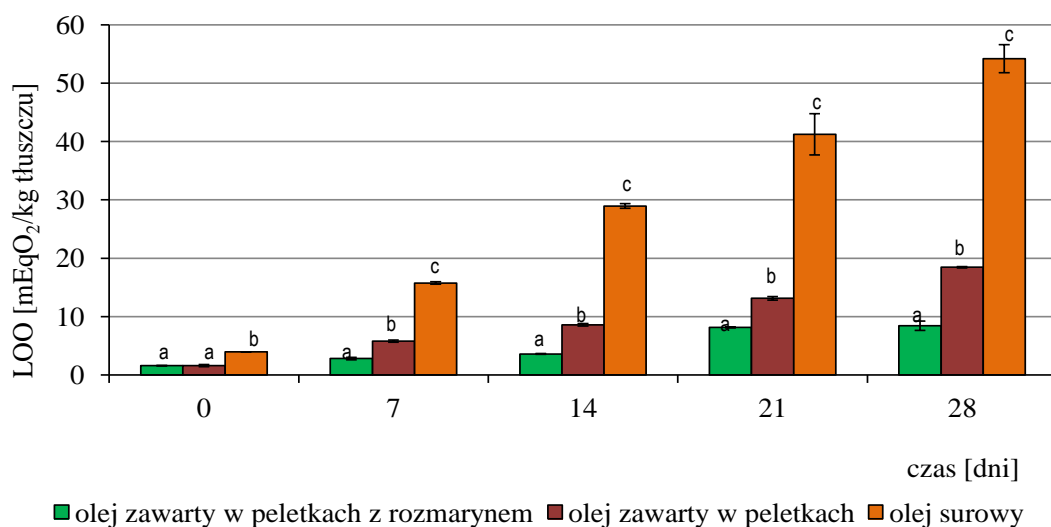
4.6.6 Mikroksułowanie oleju rybnego w peletkach żelatynowych z dodatkiem rozmarynu

Aby jeszcze efektywniej chronić olej przed oksydacją, również w temperaturze pokojowej, w następnym etapie postanowiono wykorzystać dodatek rozmarynu, który jest naturalnym źródłem substancji o charakterze antyoksydacyjnym. Jest to istotne z tego względu, że wielu konsumentów przechowuje zakupione preparaty farmaceutyczne w

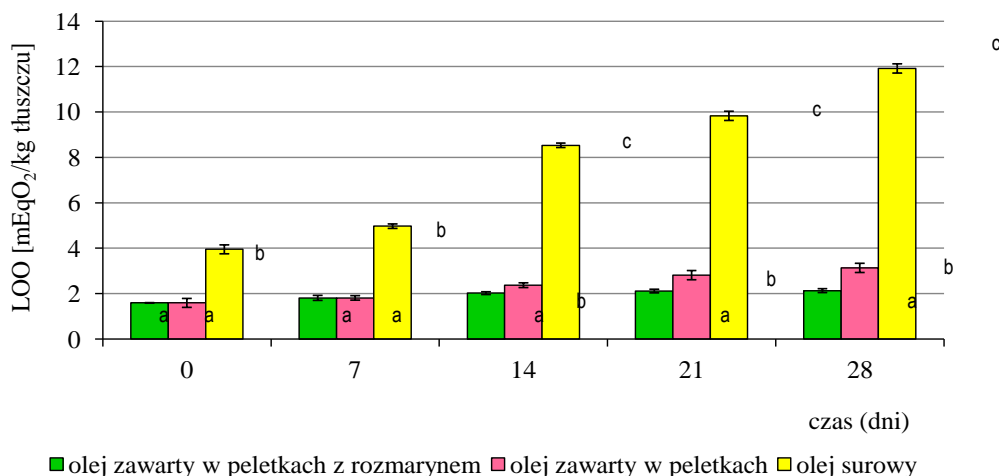
temperaturze pokojowej. Działanie przeciwutleniające rozmarynu na olej ze skór łososi potwierdzono we wcześniejszych etapach pracy (punkt 2.5).

Zaobserwowano, że 1% dodatek rozmarynu znacznie poprawił jakość mikroksułowowanego oleju w porównaniu do oleju w peletkach bez takiego dodatku i surowego oleju. Nawet w temperaturze pokojowej po 28 dniach przechowywania LOO oleju w peletkach z rozmarynem nie przekroczyła 10 mEqO₂/kg tłuszczu, podczas gdy w peletkach bez takiego dodatku wartość ta była dwukrotnie większa (Rysunek 50a).

a)



b)



Rysunek 50. Wpływ przechowywania w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C na zawartość pierwotnych produktów utleniania w oleju surowym i oleju zawartym w strukturze peletek z dodatkiem rozmarynu

Różne indeksy (a-c) w obrębie poszczególnych dni oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

Wyniki są średnią z sześciu oddzielnych prób ± odchylenie standardowe.

Zawartość pierwotnych produktów utlenienia w oleju w peletkach z dodatkiem rozmarynu po czterech tygodniach przechowywania była o ok. 50% mniejsza niż w oleju w peletkach bez takiego dodatku (Rysunek 50a). Należy zauważyć, że przechowywany w tych samych warunkach surowy olej ze skór łososi praktycznie już po 14 dniach nie nadawał się w ogóle do spożycia. Zawartość pierwotnych produktów utlenienia w oleju mikroksułowanym w peletkach z dodatkiem rozmarynu była sześciokrotnie mniejsza niż w oleju nieksułowanym przechowywanym w temperaturze pokojowej.

Podczas przechowywania prób w temperaturze chłodniczej do 7 dni LOO oleju była taka sama w peletkach bez i z dodatkiem rozmarynu, natomiast po 14 dniach zaobserwowano, że w oleju w peletkach z dodatkiem rozmarynu zawartość pierwotnych produktów oksydacji była mniejsza. Zależność ta utrzymywała się podczas dalszego przechowywania prób. Po 4 tygodniach LOO wzrosła z ok. 1,6 do ok. jedynie 2 mEqO₂/kg tłuszczu, co świadczy o tym, że przyrost zawartości nadtlenków był powolny, a wzbogacony w rozmaryn olej wykazywał bardzo dobrą stabilność oksydacyjną (Rysunek 50b). Po tym czasie zawartość pierwotnych produktów oksydacji w oleju zawartym w strukturze peletek z dodatkiem rozmarynu była ponad 6-krotnie mniejsza niż w surowym oleju.

Serfert i in. (2009) wykazali przeciwutleniający wpływ ekstraktu rozmarynu już na etapie przygotowania emulsji. Przechowywane w ciemności przez 2 dni emulsje wytworzone z oleju rybnego, modyfikowanej skrobi i syropu glukozowego z dodatkiem ekstraktu rozmarynu zawierały nawet 7-krotnie mniej pierwotnych produktów utlenienia w porównaniu z emulsjami bez takiego dodatku. Również w przypadku mikroksułek z dodatkiem rozmarynu, przechowywanych w temperaturze 20°C, nawet po 60 dniach LOO nie przekroczyła 20 mEqO₂/kg (Siefert i in. 2009). Podobne wyniki dotyczące mikroksułowania olejów z dodatkiem przeciwutleniaczy uzyskali m.in. Baik i in. (2004), którzy stwierdzili, że dodatek α -tokoferolu w stężeniu powyżej 0,02% znacznie polepszał stabilność oksydacyjną oleju rybnego zamykanego w mikroksułowkach z dekstryn i kazeinianu sodu.

Już po wytworzeniu peletek z dodatkiem rozmarynu zawartość wtórnych produktów utlenienia była o połowę mniejsza niż w peletkach bez takiego dodatku oraz blisko trzykrotnie mniejsza niż w oleju surowym (Tabela 28). Podczas przechowywania prób w temperaturze pokojowej zaobserwowano, że w peletkach z dodatkiem rozmarynu po 28 dniach wartość wskaźnika TBA była mniejsza o ok. 20% niż w peletkach bez takiego dodatku (Tabela 28a). Również w porównaniu z olejem surowym wartość ta była niższa przez cały okres przechowywania o ok. 25%.

Zahamowanie powstawania wtórnych produktów oksydacji w oleju zawartym w strukturze peletek z dodatkiem rozmarynu stwierdzono również podczas przechowywania prób w temperaturze 4°C. Po 4 tygodniach zawartość MDA była o ok. 23% mniejsza w oleju w peletkach wzbogaconych rozmarynem niż w oleju w peletkach bez takiego dodatku. Ponadto, po 28 dniach przechowywania, w porównaniu z olejem surowym wartość wskaźnika TBA była mniejsza w oleju zawartym w peletkach z dodatkiem rozmarynu o blisko 35%.

Tabela 28. Wpływ przechowywania w temperaturze a) pokojowej i b) 4°C na zawartość wtórnych produktów utleniania w oleju surowym i oleju zawartym w strukturze peletek z dodatkiem rozmarynu

a)

Czas przechowywania [dni]	MDA [mmol/kg oleju] ¹		
	olej surowy	olej zawarty w peletkach	
		bez dodatku	z dodatkiem rozmarynu
0	0,316±0,005 ^{Aa}	0,240±0,003 ^{Ba}	0,124±0,011 ^{Ca}
7	0,346±0,003 ^{Ab}	0,277±0,002 ^{Bb}	0,210±0,008 ^{Cb}
14	0,445±0,008 ^{Ac}	0,399±0,003 ^{Bc}	0,299±0,006 ^{Cc}
21	0,579±0,003 ^{Ad}	0,509±0,003 ^{Bd}	0,409±0,013 ^{Cd}
28	0,698±0,002 ^{Ae}	0,622±0,003 ^{Be}	0,522±0,002 ^{Ce}

b)

Czas przechowywania [dni]	MDA [mmol/kg oleju] ¹		
	olej surowy	olej zawarty w peletkach	
		bez dodatku	z dodatkiem rozmarynu
0	0,316±0,005 ^{Aa}	0,240±0,003 ^{Ba}	0,124±0,002 ^{Ca}
7	0,327±0,001 ^{Ab}	0,246±0,002 ^{Bb}	0,132±0,015 ^{Ca}
14	0,428±0,002 ^{Ac}	0,359±0,004 ^{Bc}	0,239±0,007 ^{Cb}
21	0,543±0,002 ^{Ad}	0,455±0,005 ^{Bd}	0,354±0,001 ^{Cc}
28	0,644±0,002 ^{Ae}	0,541±0,002 ^{Be}	0,417±0,003 ^{Cd}

¹ Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (A-B) i kolumnach (a-e) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

Również Jonsdottir i in. (2005) stwierdzili, że dodatek przeciwutleniacza do emulsji kazeinianu, laktozy i oleju rybnego może ograniczyć powstawanie wtórnych produktów utleniania podczas przechowywania produktu. Natomiast Klinkerson i in. (2005) wykazali, że podczas przechowywania w 55°C przez 14 dni mikrokapsulek wytworzonych poprzez

suszenie sublimacyjne emulsji chitozanu, lecytyny i oleju z tuńczyka dodatek tokoferolu ograniczył zawartość wtórnych produktów oksydacji prawie dwukrotnie.

Skład kwasów tłuszczowych oleju zawartego w peletkach zarówno w tych z, jak i bez rozmarynu, nie ulegał praktycznie żadnym zmianom podczas ich przechowywania w temperaturze pokojowej i 4°C (Tabela 30). Przez cały okres przechowywania wytworzonych preparatów stosunek PUFA/SFA zbliżony był do jedności.

Tabela 30. Skład kwasów tłuszczowych oleju zawartego w strukturze peletek z i bez dodatku rozmarynu przechowywanych w temperaturze: a) pokojowej i b) 4°C

a)

kwasy tłuszczowe [%] ¹	czas przechowywania [dni]									
	Olej zawarty w peletkach					Olej zawarty w peletkach z dodatkiem rozmarynu				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
SAFA	26,4±0,7 ^a	27,4±1,0 ^a	26,5±0,1 ^a	26,5±0,6 ^a	26,4±0,8 ^a	26,5±0,4 ^a	26,7±1,0 ^a	26,5±0,1 ^a	26,7±0,2 ^a	26,3±0,6 ^a
MUFA	31,0±0,4 ^a	30,9±0,9 ^a	30,4±0,8 ^a	30,9±0,1 ^a	30,7±0,2	30,7±0,2 ^a	30,0±1,1 ^a	31,1±1,5 ^a	31,2±0,7 ^a	31,1±1,3 ^a
PUFA	26,9±0,4 ^{ab}	26,7±0,5 ^{ab}	27,1±0,2 ^a	27,1±0,3 ^{ab}	26,5±1,3 ^b	27,5±0,1 ^{ab}	27,8±0,4 ^a	27,7±0,9 ^a	27,0±1,2 ^a	27,0±0,5 ^{ab}
PUFA/SAFA	0,98	1,02	0,99	1,00	1,00	1,03	1,02	0,99	1,00	1,00
EPA	6,3±0,1 ^{ab}	6,2±0,1 ^{ab}	6,3±0,0 ^{ab}	6,3±0,3 ^{ab}	6,3±0,1 ^{ab}	6,3±0,1 ^{ab}	6,4±0,2 ^b	6,5±0,0 ^b	6,1±0,0 ^a	6,5±0,1 ^{ab}
DHA	9,4±0,4 ^{ab}	9,3±0,2 ^a	9,8±0,6 ^{ab}	9,2±0,2 ^{ab}	9,9±1,2 ^{ab}	9,6±0,4 ^{ab}	9,8±0,8 ^b	9,1±0,7 ^a	9,1±1,2 ^a	9,1±0,4 ^{ab}

b)

kwasy tłuszczowe [%] ¹	czas przechowywania [dni]									
	Olej zawarty w peletkach					Olej zawarty w peletkach z dodatkiem rozmarynu				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
SAFA	26,4±0,7 ^a	27,3±1,0 ^a	27,5±1,1 ^a	26,6±1,5 ^a	27,0±0,8 ^a	26,5±0,4 ^a	26,7±1,0 ^a	26,5±0,1 ^a	26,7±0,2 ^a	26,3±0,6 ^a
MUFA	31,0±0,4 ^a	30,6±1,0 ^a	29,9±1,4 ^a	30,0±0,5 ^a	31,1±1,2	30,7±0,2 ^a	30,0±1,1 ^a	31,1±1,5 ^a	31,2±0,7 ^a	31,1±1,3 ^a
PUFA	26,9±0,4 ^{ab}	27,5±1,5 ^{ab}	26,8±0,2 ^a	27,0±0,3 ^{ab}	27,0±1,3 ^b	27,5±0,1 ^{ab}	27,8±0,4 ^a	27,7±0,9 ^a	27,0±1,2 ^a	27,0±0,5 ^{ab}
PUFA/SAFA	0,98	1,00	0,98	1,00	1,00	1,03	1,02	0,99	1,00	1,00
EPA	6,3±0,1 ^{ab}	6,2±0,1 ^{ab}	6,2±0,0 ^{ab}	6,3±0,2 ^{ab}	6,2±0,1 ^{ab}	6,3±0,1 ^{ab}	6,2±0,4 ^b	6,4±0,2 ^b	6,1±0,1 ^a	6,3±0,1 ^{ab}
DHA	9,4±0,4 ^{ab}	9,7±0,6 ^a	9,4±0,6 ^{ab}	9,3±0,3 ^{ab}	9,3±0,6 ^{ab}	9,6±0,4 ^{ab}	9,6±0,0 ^b	9,2±0,4 ^a	9,1±0,6 ^a	9,5±0,4 ^{ab}

¹⁾ Wyniki są średnią z oznaczeń dla trzech oddzielnych prób ± odchylenie standardowe

Różne indeksy w wierszach (a-b) oznaczają różnice istotne statystycznie (p<0,05)

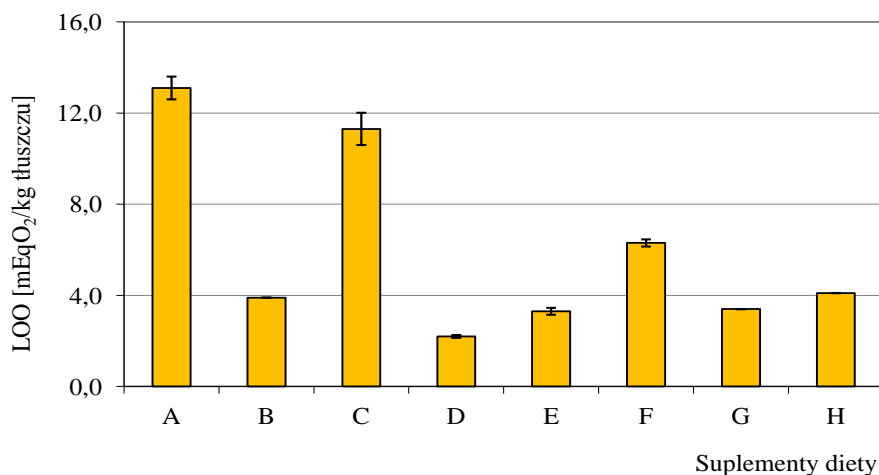
Podsumowując, dzięki mikrokapsułkowaniu oleju rybnego w formie peletek zwiększyła się znacząco jego stabilność oksydacyjna, co potwierdzają zarówno wyniki dotyczące zawartości pierwotnych jak i wtórnych produktów utlenienia. Ponadto, rozmaryn wprowadzany do struktury peletek dodatkowo zwiększał stabilność mikrokapsułkowanego oleju w badanym zakresie czasu i mógłby zostać wykorzystany do przedłużania trwałości i polepszania jakości mikrokapsułkowanych preparatów oleju rybnego.

4.7 CHARAKTERYSTYKA HANDLOWYCH PREPARATÓW KAPSUŁKOWANEGO OLEJU RYBNEGO DOSTĘPNYCH NA POLSKIM RYNKU.

Oprócz badania jakości wytwarzanych podczas prac badawczych mikrokapsułkowanych preparatów zawierających olej ze skór łososi, ocenie poddano również 8 preparatów zawierających olej rybny zakupionych w lokalnych aptekach. Niestety, na polskim rynku nie jest dostępny żaden preparat, który zawierałby olej w postaci mikrokapsułek. Wszystkie preparaty zakupione w aptekach miały więc postać kapsułek żelatynowych wypełnionych olejem i w momencie przeprowadzenia badań miały jeszcze co najmniej sześciomiesięczny okres ważności. Doświadczenie takie miało na celu sprawdzenie jakości zarejestrowanych preparatów farmaceutycznych dostępnych na polskim rynku (ponieważ w przypadku suplementów diety producent nie ma obowiązku wykonywania badań trwałości) oraz przynajmniej przybliżone porównanie wartości LOO i składu KT w stosunku do oleju zamkniętego w strukturze peletek żelatynowych otrzymywanych opracowaną w pracy metodą.

Określenie jakości oleju

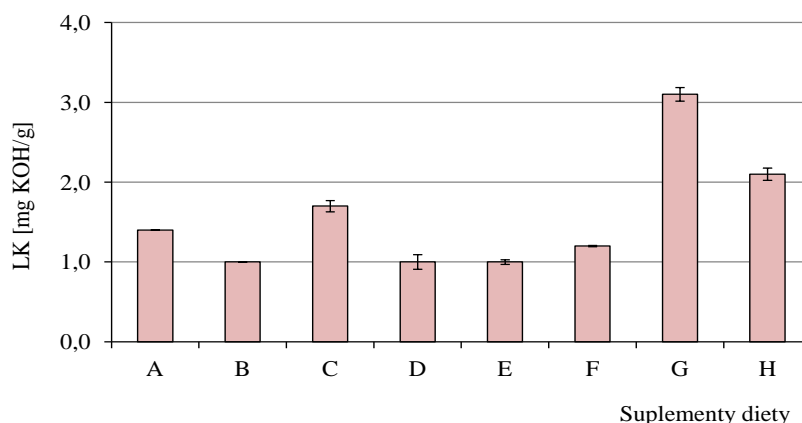
Na podstawie oznaczeń LOO, stwierdzono, że zawartość pierwotnych produktów utlenienia była najwyższa w preparatach A i C, wynosiła odpowiednio ok. 13 i 11 mEqO₂/kg oleju (Rysunek 51).



Rysunek 51. Wartości liczby nadtlenkowej badanych suplementów diety

Natomiast według Codex Alimentarius do spożycia dopuszcza się olej rybny o LOO do 10 mEqO₂/kg. Preparaty te zawierają zbyt dużo nadtlenków, by mogły być bezpiecznie stosowane w celach terapeutycznych. Stwierdzono również, że miały one nieprzyjemny, jełki zapach co może świadczyć o dużym stężeniu wtórnych produktów utlenienia tłuszczu, takich jak np. heksanal i nonanal. W pozostałych sześciu preparatach zawartość LOO nie przekraczała dopuszczalnych norm. Olej z nich pochodzący miał jednorodną barwę i swoisty zapach.

Analiza próbek wykazała, że badane preparaty charakteryzowały się dość małą zawartością WKT (Rysunek 52).



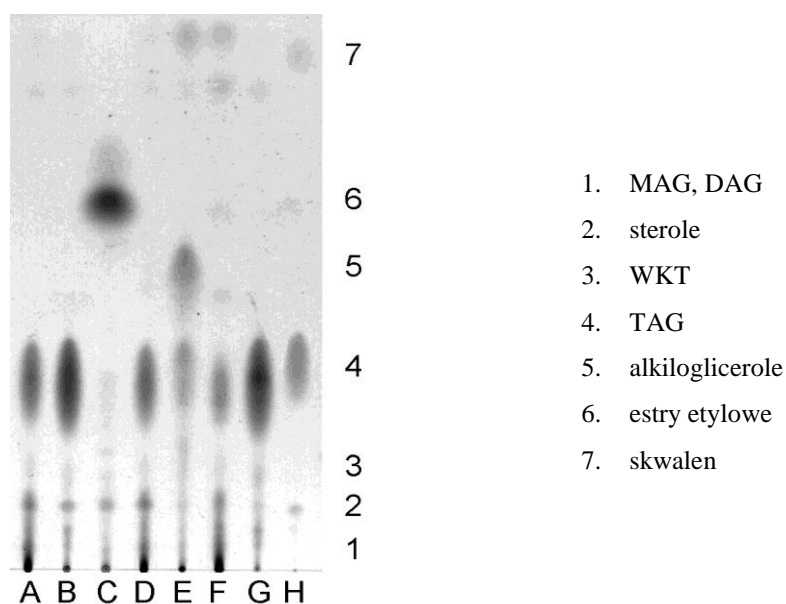
Rysunek 52. Wartości liczby kwasowej badanych suplementów diety

Przyjęte w skali międzynarodowej normy i zalecenia zawarte w Codex Alimentarius dopuszczają do spożycia oleje rybne o LK równej nawet 4 mg KOH/g tłuszczu. Mała wartość LK w badanych próbkach świadczy o niewielkim stopniu hydrolizy triacylogliceroli (TAG)

obecnych w olejach. Można więc stwierdzić, że miękkie kapsułki żelatynowe choć chronią zamknięty w nich olej przed procesem hydrolizy, nie są dostateczną barierą dla tlenu i nie ograniczają całkowicie procesu utleniania oleju.

Oznaczenie klas związków lipidowych.

Stosując analizę TLC stwierdzono, że w preparacie C wszystkie KT występują w formie estrów etylowych (Rysunek 53). Takie preparaty są wytwarzane, aby zwiększyć zawartość konkretnych KT w produkcie, zwłaszcza długołańcuchowych *n-3* PUFA. Według Lawsona i Hughes (1988) spożywane kwasy EPA i DHA efektywniej przedostają się do krwiobiegu wbudowane w strukturę acylogliceroli niż w postaci estrów etylowych. Tezę tą potwierdzają również wyniki badań Maki i in (2003). Producent preparatu C jednak nie zamieścił odpowiedniej adnotacji na opakowaniu, opisując swój produkt jedynie jako preparat oleju rybnego. W badanych próbkach można zaobserwować obecność skwalenu, szczególnie dużo zawierają go preparaty E, F i H oraz steroli (rysunek 53). We wszystkich preparatach, oprócz C, obecne są różne ilości TAG oraz produktów ich hydrolizy – WKT, mono i diacylogliceroli. Charakterystyczny jest skład preparatu E, wyprodukowanego z oleju z rekina, w którym stwierdzono obecność eterowych analogów TAG - alkilogliceroli. Alkiloglicerole są naturalnym składnikiem oleju rekina, czym wyróżnia się on wśród innych olejów rybnych. Udowodniono, że mogą one hamować wzrost guzów i redukować uszkodzenia popromienne (Pugliese 1998).



Rysunek 53. Obecność różnych klas związków w badanych suplementach diety

Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych.

Wyniki analizy składu KT przy wykorzystaniu chromatografii gazowej przedstawiono w Tabeli 29. Zastosowano podział na SFA, MUFA i PUFA uwzględniając przynależność tych ostatnich do rodzin *n-3* i *n-6*.

Tabela 29. Zawartość SFA, MUFA, PUFA, PUFA *n-3* i PUFA *n-6* w badanych suplementach diety

Kwasy tłuszczowe	Suplementy diety							
	A	B	C	D	E	F	G	H
	Zawartość kwasów tłuszczowych [%]							
ΣSFA	31,1	30,2	1,3	26,9	20,3	15,9	27,7	25,4
ΣMUFA	24,3	24,2	11,0	24,4	52,9	19,0	21,8	28,1
ΣPUFA	38,1	35,5	69,0	39,1	14,2	55,0	39,7	34,7
ΣPUFA <i>n-3</i>	35,9	34,1	58,9	35,9	13,7	52,0	37,0	33,3
ΣPUFA <i>n-6</i>	2,2	1,4	10,1	2,2	0,5	3,0	2,7	1,4

Zauważyć można, że pięć preparatów: A, B, D, G i H charakteryzuje się bardzo podobnymi zawartościami poszczególnych rodzajów kwasów tłuszczowych, typowymi dla oleju rybnego. PUFA z rodziny *n-3* stanowią od 33 do 37% ogólnej zawartości KT w oleju. Natomiast znaczące różnice składu dotyczą preparatu C, gdzie PUFA stanowią blisko 70% ogólnej zawartości KT, w tym ok. 60% to kwasy z rodziny *n-3*. Tak duża koncentracja tych kwasów była możliwa do uzyskania poprzez przeprowadzenie ich w formę estrów etylowych. Preparat E, wyprodukowany z oleju z rekina, zawiera znacznie mniej PUFA z rodziny *n-3* niż pozostałe suplementy, natomiast charakterystyczna jest dla niego duża zawartość MUFA. Preparat F wyróżnia się dużą zawartością PUFA, a mniejszą od innych SFA, ale w przeciwieństwie do C, nie zawiera estrów etylowych KT, a wyłącznie TAG.

Dokonano porównania wyznaczonej eksperymentalnie zawartości kwasów EPA i DHA z wartościami deklarowanymi przez producenta na opakowaniu. Wyniki przedstawiono w tabeli 30.

Tabela 30. Porównanie wyznaczonej doświadczalnie i deklarowanej przez producenta zawartości EPA i DHA w badanych suplementach diety

Kwasy tłuszczowe	Suplementy diety							
	A	B	C	D	E	F	G	H
	Zawartość kwasów tłuszczowych [%]							
EPA:								
doświadczalne wartości	17,6±0,1	17,3±0,0	31,3±0,0	18,2±0,2	7,5±0,1	21,4±0,0	17,5±0,2	17,6±0,0
deklarowane wartości	bd ¹⁾	18	30	18	bd ¹⁾	bd ¹⁾	18	bd ¹⁾
DHA:								
doświadczalne wartości	12,1±0,2	10,4±0,2	21,8±0,0	11,5±0,1	3,8±0,0	23,6±0,0	12,8±0,1	9,0±0,0
deklarowane wartości	bd ¹⁾	12	20	12	bd ¹⁾	bd ¹⁾	12	bd ¹⁾

¹⁾ bd - brak danych

Producent suplementu diety, wedle obowiązujących przepisów, wprowadzając swój preparat do obrotu powinien jedynie powiadomić o tym fakcie Głównego Inspektora Sanitarnego i przedstawić projekt etykiety, nie ma natomiast obowiązku umieszczać na niej wszystkich danych (Dz. U. nr 196 poz. 1425 z dnia 24 października 2007r.). Nie obowiązuje niezależna kontrola jakościowa suplementu ani badania trwałości. O długości okresu przydatności do spożycia decyduje producent na podstawie własnych analiz. Dlatego też na opakowaniach niektórych preparatów (A, E, F) nie znaleziono informacji dotyczących zawartości EPA i DHA - producent nie jest zobowiązany do ich zamieszczania. Stwierdzono, że pięć badanych preparatów (A, B, D, G i H) ma bardzo podobną zawartość EPA - od 17,3 do 18,2% oraz DHA - od 9 do 12,8%. Występują niewielkie różnice pomiędzy deklarowanymi zawartościami a stwierdzonymi doświadczalnie. Preparat C zawiera wyjątkowo duże ilości EPA oraz DHA - 31,3 i 21,8%, co, jak już wcześniej wspomniano, jest efektem wydzielenia ich z oleju rybnego w formie estrów etylowych. Preparat F, chociaż nie jest koncentratem estrów etylowych, zawiera znaczące, w porównaniu z innymi suplementami, zawartości EPA oraz DHA. Możliwe jest, że efekt taki uzyskano stosując frakcjonowanie oleju. Wyjątkowo małe ilości EPA i DHA stwierdzono w preparacie E; jest to charakterystyczne dla oleju z rekina.

5 WNIOSKI KOŃCOWE

1. Opracowana metoda ekstrakcji oleju ze skór łososi „na zimno”, pozwala na otrzymywanie oleju rybnego przy niewielkim nakładzie energii z dużą wydajnością (powyżej 80%) oraz, dzięki utrzymywaniu podczas procesu temperatury poniżej 15°C - nie powoduje przemian oksydacyjnych i hydrolitycznych. W trakcie wydobywania oleju nie następują straty surowca kolagenowego, który może zostać wykorzystany do otrzymywania żelatyny.
2. Olej zawarty w surowcu utlenia się, nawet pomimo przechowywania go w warunkach zamrażalniczych. Okres przechowywania zamrażalniczego surowca nie powinien przekraczać ok. 100 dni, aby olej otrzymywany ze skór był dobrej jakości i mógł zostać przeznaczony na cele farmaceutyczne i spożywcze. Korzystniej jest przechowywać skóry w całości, gdyż rozdrobnienie surowca przyspiesza przemiany oksydacyjne.
3. Dodatek suszonych i sproszkowanych ziół zawierających naturalne zawiązki przeciwutleniające, spowalnia proces oksydacji lipidów w temperaturze pokojowej i w dużym stopniu hamuje go podczas przechowywania produktu w warunkach chłodniczych. Spośród badanych ziół najbardziej efektywny jest rozmaryn (1% stężenie wydłuża okres indukcji reakcji utleniania około 9-krotnie).
4. Uwzględniając indeks stabilności emulsji oraz efektywność procesu mikrokapsułkowania, optymalny skład emulsji przeznaczonej do wywarzania mikrokapsulek z olejem rybnym stanowi 20% stężenie białka w mieszaninie oraz stosunek rdzeń:otoczka równy 1:1.
5. Forma mikrokapsułkowanego materiału ma kluczowe znaczenie dla stabilności oksydacyjnej zawartego w nim oleju. Rozdrobnienie mikrokapsułkowanego materiału zwiększa szybkość tworzenia się wtórnych produktów oksydacji w oleju, niezależnie od temperatury przechowywania mikrokapsulek.
6. Najlepiej chroniony przed utlenianiem jest olej mikrokapsułkowany w postaci peletek. Włączenie w strukturę peletek rozmarynu w stężeniu 1% dodatkowo zwiększa stabilność oksydacyjną zamkniętego w nich oleju – po 4 tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej i 4°C LOO była około 6-krotnie mniejsza niż w oleju surowym, podczas gdy w peletkach bez rozmarynu – 3-krotnie mniejsza.

6 PIŚMIENNICTWO

- Achremowicz K., Szary-Sworst K. 2005. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe czynnikiem poprawy stanu zdrowia człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 3, 23-35
- Adams P.B., Lawson S., Sanigorski A., Sinclair A.J. 1996. Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids* 31, 157-161
- Aider M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT – Food Science and Technology* 43, 837-842
- Aidos I., Masbernat-Martinez S., Luten J.B., Boom R.M., van der Padt A. 2002. Composition and stability of herring oil recovered from sorted byproducts as compared to oil from mixed byproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 2818-2824
- Aidos I., van der Padt A., Boom R.M., Luten J.B. 2001. Upgrading of maatjes herring byproducts: production of crude fish oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49, 3697-3704
- Akoh C.C., Min D.B. 2008. *Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Wyd CRC Press, USA, 2008
- Ali B.H., Ziada A., Blunden G. 2009. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1-8
- Amrita K., Dabur R.S., Kapoor C.M. 1999. Application of microencapsulation technology in dairy industry. *Indian Food Industry* 18, 57-64
- Anandaraman S., Reineccius G.A. 1986. Stability of encapsulated orange peel oil. *Food Technology* 40, 88-93
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonnald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Critical Review. The Analyst* 127, 183-198
- Anwar S.H., Kunz B. 2011. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: comparison of spray granulation, spray drying and freeze drying, *Journal of Food Engineering* 105, 367-378
- Arnesen J.A., Gildberg A. 2007. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology* 98, 53-57
- Arvisenet G., Voilley A., Cayot N. 2002. Retention of aroma compounds in starch matrices: competitions between aroma compounds toward amylose and amylopectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7345-7349
- Ashady R. 1993. Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation* 10, 413-435
- Augustin M. A., Sanguansri L., Bode O. 2006. Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *Journal of Food Science* 71, 25-32
- Avena-Bustillos R.J., Olsen C.W., Chiou B., Yee E., Bechtel P.J., McHugh T.H. 2006. Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *Journal of Food Science* 71, 202-207.
- Ayadi M. A., Grati-Kamoun N., Attia H. 2009. Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2613-2619
- Babel W.: Zastosowanie żelatyny w farmacji. W: *Żelatyna. Właściwości – Technologia – Użytkowanie*. Polska Izba Dodatków do Żywności 1999, 69-74
- Baik M.-Y., Suhendro E.L., Nawar W.W., McClements D.J., Decker E.A., Chinachoti P. 2004. Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 81, 355-360
- Barrier P., Rousseau J. 2001. Method and plant for extracting fish oil and resulting products. US Patent 6214396

- Basaga H., Acikel F., Tekkaya C. 1997. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 30, 105-108
- Bimbo A.P. 1998. Guidelines for characterizing food –grade fish oil. *INFORM*, 9, 473-383
- Blanchet C., Lucas M., Julien P., Levesque B., Dewailly E. 2005. Fatty acids composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 40, 529-531
- Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917
- Boran G., Karacam H., Boran M. 2006. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. *Food Chemistry* 98, 693-698
- Bridgman P.W. 1912. Water, in the liquid and five solid forms, under pressure. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 47, 441-558
- Bryl P., Laplante S., Souchet N. 2009. Comparison of low- temperature processes for oil and coenzyme Q10 extraction from mackerel and herring. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 135-141
- Bykowski J. 2007. Z rybą zdrowiej. *Wiadomości Rybackie* 5-6, 19-21
- Carter C.G., Hauler R.C. 2000. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 185, 299-311
- Chaijan M., Benjakul S., Visessanguan W., Faustman C. 2005. Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry* 93, 607-617
- Chang C.P., Leung T.K., Lin S.M., Hsu C.C. 2006. Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 50, 136-140
- Chang S.S., Bao Y., Pelura. 1989. Purification of fish oil. US Patent No. 189198
- Chantachum S., Benjakul S., Sriwirat N. 2000. Separation and quality of fish oil from precooked and non –precooked tuna heads. *Food Chemistry* 69, 289-294
- Cheah P.B., Ledward D.A. 1995. High-pressure effects on lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72, 1059-1063
- Chen T-Ch, Ju Y-H. 2000. Enrichment of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in saponified menhaden oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77, 425-428
- Cho S.M., Gu Y.S., Kim S.B. 2005. Extraction optimization and physical properties of yellowfish tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 19, 221-229
- Cho Y.H., Shim H.K., Park J. 2003. Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins. *Journal of Food Science* 68, 2717–2723
- Chowdary K.P.R., Rao Y.S. 2004. Mucadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, 1717-1742
- Chung C., Sanguansri L., Augustin M. A. 2011. In vitro lipolysis of fish oil microcapsules containing protein and resistant starch. *Food Chemistry* 124, 1480-1489
- Codex Alimentarius: Codex standard for edible fats and ols not covered by individual standards., Codex Stan 19-1981
- Coppola M., Djabourov M., Ferrand M. 2008. Phase Diagram of gelatin plasticized by water and glycerol. *Macromolecular Symposia* 273, 56-65

- Crowther J.B., Booth B.H., Blackwell D.S. 2001. Process for producing edible quality refined fish oil. Patent WO/2001/041582
- Czerniak A., Jankowski T. 2013. Mikroksułowanie α -tokoferolu wewnątrz komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 91, 151-164
- Desobry S., Netto F.M., Labuza T.P. 1999 Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25DE on encapsulated β -carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 23, 39-55
- Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J. 2004. Chitosan:antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21, 703-714
- Dłużewska E. 2008. Mikroksułowanie dodatków do żywności. *Przemysł Spożywczy* 62, 30-35
- Domian E. 2011. Charakterystyka suszonych rozpyłowo emulsji stabilizowanych białkami mleka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 79, 5-23
- Dong Z., Ma Y., Hakat K., Jia C., Xia S., Hang X. 2011. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *Journal of Food Engineering* 104, 455-460
- Drusch S., Gross N., Schwarz K. 2008. Efficient stabilization of bulk fish oil rich in long-chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 351-359
- Drusch S., Serfert Y., Schwarz K. 2006a. Microencapsulation of fish oil with n-octenylsuccinate-derivatised starch: Flow properties and oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 501-512
- Drusch S., Serfert Y., Van Den Heuvel A., Schwarz K. 2006b. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International* 39, 807-815
- Duan J., Jiang Y., Zhao Y. 2011. Chitosan-whey protein isolate composite films for encapsulation and stabilization of fish oil containing ultra pure omega-3 fatty acids. *Journal of Food Science* 76, C133-C141
- Dumay J., Donnay-Moreno C., Barnathan G., Jaouen P., Bergé J.P. 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry* 41, 2237-2332
- Dunford N.T., Goto M., Temelli F. 1998. Modeling of extraction with supercritical CO₂ from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) at different moisture contents. *Journal of Supercritical Fluids* 13, 303-309
- Dybowska E., Świdorski F., Waszkiewicz-Robak B. 2007. The intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the polish diet in relation to the intake in other countries. *Polish Journal of Nature Sciences* 22, 722-732
- Einen O., Guerin T., Fjaera S.O., Skjervold P.O. 2002. Freezing of pre-rigor Atlantic salmon. *Aquaculture* 212, 129-140
- Elysée-Collen B., Lencki R.W. 1996. Effect of ethanol, ammonium sulfate, and temperature on the phase behaviour of type B gelatin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1651-1657
- Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110, 76-82
- Esquivel M., Bandarra M., Fontan I., Bernardo-Gil M.G., Batista I., Nunes M.L., Empis J.A. 1997. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of sardine (*Sardina pilchardus*) oil. *LWT – Food Science and Technology* 30, 715-720

- Fang X., Watanabe Y., Adachi S., Matsumura Y., Mori T., Maeda H., Nakamura A., Matsuno R. 2003. Microencapsulation of linoleic acid with low- and high-molecular weight components of soluble soybean polysaccharide and its oxidation process. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67, 1864-1869
- Feeley R.M., Criner P.E., Watt B.K. 1972. Cholesterol content in foods. *Journal of American Dietetic Association*, 61, 134-149
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509
- Fournier V., Destailats F., Juaneda P., Dionisi F., Lambelet P., Sebedio J.L., Berdeaux O. 2006a. Thermal degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 33-42.
- Fournier V., Juaneda P., Destailats F., Dionisi F., Lambelet P., Sebedio J.L., Berdeaux O. 2006b. Analysis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization. *Journal of Chromatography A* 1129, 21-28
- Frankel E.N., Huang S-W., Prior E., Aeschback R. 1996. Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 72, 201-208
- Gan C-Y., Cheng L-H., Easa A.M. 2008. Physicochemical properties and microstructures of soy protein isolate gels produced using combined cross-linking treatments of microbial transglutaminase and Maillard cross-linking. *Food Research International* 41, 600-605
- Gan C-Y., Cheng L-H., Phuah E-T., Chin P-N., Alkarkhi A.F.M., Easa A.M. 2009. Combined cross-linking treatments of bovine serum albumin gel beadlets for controlled-delivery of caffeine. *Food Hydrocolloids* 23, 1398-1405
- Gbogouri G.A., Linder M., Fanni J., Parmentier M. 2006. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 766-775
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 40, 1107-1121
- Gibbs B.F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C.N. 1999. Encapsulation in the food industry. *International Journal of Food Science and Nutrition* 50, 213-224
- Gómez-Guillen M.C., Turnay J., Fernandez-Diaz M.D., Ulmo N., Lizarbe M.A., Montero P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids* 16, 25-34
- Grossman S., Bergman M. 1992. Process for the production of gelatin from fish skins. US Patent 5093474
- Grzybowska-Brzezińska M., Pilarski S. 2005. Styl życia a konsumpcja żywności. *Stowarzyszenie ekonomistów rolnictwa i agrobiznesu. Roczniki naukowe, zeszyt 3*
- Gudmundsson M. 2002. Rheological properties of fish gelatin. *Journal of Food Science* 67, 2172-2176
- Hamilton M.C., Hites R.A., Schwager S.J., Foran J.A., Knuth B.A., Carpenter D.O. 2005. Lipid composition and contaminants in farmed and wild salmon. *Environmental Science and Technology* 39, 8622-8629
- Haraldsson G.G., Kristinsson B., Sigurdardottir R., Gudmundsson G.G., Breivik H. 1997. The preparation of concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74, 1419-1424

- Harris W.S. 1989. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *Journal of Lipid Research* 30, 785
- Harris W.S. 2004. Fish oil supplementation: Evidence for health benefits. *Clinic Journal of Medicine* 71, 208-220
- Harrod M., Lingnert H., Undeland I. 1998. Comparison between methods using low- toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry* 61, 355-365
- Haug I.J., Draget K.I., Smidsrød O. 2004. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids* 18, 203-213
- Heinzelmann K., Franke K. 1999. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12, 223-229
- Heinzelmann K., Franke K., Valesco J., Marquez – Ruiz G. 2000a. Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage. *European Food Research and Technology* 211, 234-239
- Heinzelmann K., Franke K., Jensen B., Haahr A. 2000b. Protection of fish oil from oxidation by microencapsulation using freeze-drying techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology* 102, 114-121
- Heras A., Schoch A., Gibis M., Fisher A. 2003. Comparison of methods for determining malondialdehyde in dry sausage by HPLC and the classic TBA test. *European Food Research and Technology* 217, 180-184
- Hogan S.A., McNamee B.F., O’Riordan E.D., O’Sullivan M. 2001. Microencapsulating properties of whey protein concentrate. *Journal of Food Science* 66, 675-680
- Hogan S.A., O’Riordan E.D., O’Sullivan M. 2003. Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions. *Journal of Microencapsulation* 20, 675-688
- Honeycutt M.E., McFarland V.A., McCant D.D. 1995. Comparison of three lipid extraction methods for fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 469-472
- Horn A.F., Nielsen N.S., Jacobsen C. 2009. Additions of caffeic acid, ascorbyl palmitate or γ -tocopherol to fish oil-enriched energy bars affect lipid oxidation differently. *Food Chemistry* 112, 412-420
- Horrocks L.A., Young K.Y. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research* 40, 211-225
- Hras A.R., Hadolin M., Knez Z., Bauman D. 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry* 71, 229-233
- Hsieh Ch., Ko W. ,Chang Ch. 2005. Supercritical CO₂ extraction and concentration of *n*-3 polyunsaturated fatty acid ethyl esters from tuna cooking juice. *Fisheries Science* 71, 441-447
- Hu Z., Zhong Q. 2010. Determination of thiobarbituric acid reactive substances in microencapsulated products. *Food Chemistry* 5, 1-6
- Huang-Chien L., Wen-Hsiang C., Ko-Jung L., Hsing-Wen S. 2003. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research* 65, 271-282
- Iassonova D.R., Hammond E.G., Beattie S.E. 2008. Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85, 711-716

- Izquierdo M.S., Montero D., Robaina L., Caballero M.J., Rosenlund G., Gines R. 2005. Alternations in fillet acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish feeding. *Aquaculture* 250, 431-444
- Jackowska W. 2008. Pijcie rybi tran! Może chronić przed chorobą Alzheimera. *21 wiek* 5, 67
- Jacobsen C. 1999. Sensory impact of lipid oxidation in complex food systems. *Lipids* 101, 484 – 492
- Jamilah B., Harvinder K.G. 2002. Properties of gelatins from skin of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry* 77, 81-84
- Janicki S., Fiebig A., Szmítowska M. (red.) 2003. *Farmakologia stosowana*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 215-233
- Janiszewska E., Śliwińska D., Witrowa-Rajchert D. 2010. Wpływ zawartości aromatu cytrynowego na wybrane właściwości fizyczne mikrokapsulek. *Acta Agrophysica* 16, 59-68
- Jędrzejkiewicz K., Krygier K. 2008. Zastosowanie gazów inertnych do poprawy stabilności oksydacyjnej oleju rybnego, rzepakowego i ich mieszaniny. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 60, 248-256
- Jimenez M., Garcia H.S., Beristain C.I. 2004. Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *European Food Research and Technology* 219, 588–592
- Johnston I.A., Xuejun L., Vera L.A., Nickell D., Dingwall A., Alderson R., Campbell P., Bicherdike R. 2006. Muscle and flesh quality traits in wild and farmed Atlantic salmon. *Aquaculture* 256, 323-336
- Jonsdottir R., Bragadottir M., Arnarson G.O. 2005. Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *Journal of Food Science* 70, 433-440
- Kagami Y., Sugimura S., Fujishima N., Matsuda K., Kometani T., Matsumura Y. 2003. Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science* 68, 2248-2255
- Kalichevsky M., Knorr D., Lillford P.J. 1995. Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science and Technology* 6, 253-258
- Kamal-Eldin A., Yanishliwina N. 2002. *n-3* fatty acids for human nutrition: stability considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 825-836
- Karim A.A., Bhat R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 23, 563-576
- Kasankala L.M., Xue Y., Weilong Y., Hong S.D., He Q. 2007. Optimization of gelatin extraction from grass carp (*Catenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. *Bioresource Technology* 98, 3338-3343
- Kato A. 2002. Industrial application of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food Science and Technology Research* 8, 193-199
- Keogh M., O'Kennedy B., Kelly J. 1999. Stability to oxidation spray-dried fish oil powder microencapsulated using milk ingredients. *Journal of Food Science* 66, 217–224
- Keogh M.K., O'Kenedy B.T., Kelly P.M. 2001. Stability to oxidation of spray-dried fish oil powder microencapsulated using milk ingredients. *Journal of Food Science* 66, 217-224
- Kim Y.D., Morr C.V., Schenz, T.W. 1996. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: liquid orange oil emulsion particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1308–1313

- Klaypradit W., Huang Y-W. 2008. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *Learning With Technologies* 41, 1133-1139
- Klinkerson U., Sophanodora P., Chinachoti P., McClements D.J., Decker E.A. 2005. Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8365–8371
- Kolanowski W. 2000. Olej rybny - wpływ na zdrowie i wzbogacanie żywności. *Magazyn Przemysłu Rybnego* 6, 54-56
- Kołodziejska I., Kaczorowski K., Piotrowska B., Sadowska M. 2004. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chemistry* 86, 203-209
- Kołodziejska I., Skierka E., Sadowska M., Kołodziejski W. , Niecikowska C. 2008. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry* 107, 700–706
- Korus J., Archemowicz B., Sikora M. 1997. Mikrokapsułkowanie substancji spożywczych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 37, 30-40
- Korus J., Gibiński M., Archemowicz B. 2005. Zastosowanie natywnej i modyfikowanej skrobi lędźwianu siewnego (*Lathyrus dativus l.*) do mikrokapsułkowania aromatów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 45, 74-80
- Kremer J.M., Lawrence D.A., Jubiz W. 1990. Dietary fish oil and olive oil in supplementation in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 33, 810
- Kris-Etherton P.M., Harris W.S., Lawrence J. 2003. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *American Heart Association Inc.* 23, 20-30
- Krishnan S., Kshirsagar A.C., Singhal R.S. 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers* 62, 309-315
- Kritchevski D., Tepper S.A., DiTullo N.W., Holmes W.L. 1967. The sterols of seafood. *Journal of Food Science* 32, 64-66
- Kshirsagar A.C., Singhal R.S. 2008. Preparation of hydroxypropyl corn and amaranth starch hydrolyzate and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Food Chemistry* 108, 958-964
- Kulås E., Ackman R. G. 2001a. Properties of α -, γ -, and δ -tocopherol in purified fish oil triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78, 361 – 367
- Kulås E., Ackman R. G. 2001b. Protection of α -tocopherol in nonpurified and purified fish oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78, 197-203
- Kulås E., Olsen E., Ackman R. G. 2002. Effect of α -, γ -, and δ -tocopherol on the distribution of volatile secondary oxidation products in fish oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 520-529
- Kulikowski T. 2000. Zdrowotne aspekty spożywania ryb. *Magazyn Przemysłu Rybnego* 5, 50-52
- Kyle D.J. 1999. Low serum docosahexaenoic acid is a significant risk factor alzheimer’s dementia. *Lipids* 34, 245
- Larsen M. 2009. *Salmon Farming Industry Handbook. Marine Harvest.*
- Lawson L.D., Hughes B.G. 1988. Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 152, 328
- Lebiedzińska A. 2006. Łososie wędzone cennym źródłem składników odżywczych. *Magazyn Przemysłu Rybnego* 2 , 33-36

- Let M.B., Jacobsen C., Meyer A.S. 2003. Effects of fish oil type, lipid antioxidants and presence of rapeseed oil on oxidative flavour stability of fish oil enriched milk. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106, 170-182
- Létisse M., Rozières M., Hiol A., Serget M., Comeau L. 2006. Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without organic modifier. I. Optimization of extraction conditions. *Journal of Supercritical Fluids* 38, 27-36
- Lin S.W., Sue T.T., Ai T.Y. 1995. Carotene content. W: *Methods of test for palm oil and palm oil products*. Palm Oil Research Institute of Malaysia, 43-44
- Madene A., Jacquot M., Scher J., Desorby S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release – A review. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 1–21
- Maes J.; De Meulenaer B.; Van Heerswynghe P.; De Greyt W.; Eppe G.; De Pauw E.; Huyghebaert A. 2005. Removal of dioxins and PCB from fish oil by activated carbon and its influence on the nutritional quality of the oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82, 593-597
- Mahmoud K., Linder M., Fanni J., Parmentier M. 2008. Characterisation of the lipid fractions obtained by proteolytic and chemical extractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) roe. *Process Biochemistry* 43, 376-383
- Mainardes R.M., Silva L.P. 2004. Drug delivery systems: past, present and future. *Current Drug Targets* 5, 449-455
- Maki K.C., Davidson M.H., Dicklin M.R., Elliot J.G., Ingram K.A. 2003. Bioavailability of eicosapentaenoic and docosahexaenoic *n*-3 polyunsaturated fatty acids in salmon patties compared with capsules. *Journal of Food Science* 68, 761-764
- Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejka I. 2009. Effect of lysozyme or nisin on survival of some bacteria treated with high pressure at subzero temperature. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 767-777
- Manirakiza P., Covaci A., Schepens P. 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese–Gottlieb, Bligh and Dyer, and modified Bligh and Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 93–100
- Manojlovic V., Rajic N., Djonlagic J., Obradovic B., Nedovic V., Bugarski B. 2008. application of electrostatic extrusion – flavour encapsulation and controlled release. *Sensors* 8, 1488-1496
- Mozaffarian D., Prineas R.J., Stein P.K., Siscovick D.S. 2006. Dietary fish and *n*-3 fatty acid intake and cardiac electrocardiographic parameters in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 48, 578-483
- Muyonga J.H., Cole C.G.B., Duodu K.G. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collage and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* 86, 325-332
- Nawrocki T. 2009. Kapsułki w recepturze aptecznej. *Aptekarz Polski* 31, czasopismo online
- Newton I., Snyder D. 1993. Nutritional aspects of long-chain omega-3 fatty acids and their use in bread enrichment. *Cereal Foods World* 3, 126-131
- Newton I.S. 1996. Food enrichment with long – chain *n*-3 PUFA. *INFORM* 7, 169-177
- Nielsen P.M. 1995. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnology* 9, 119-156
- Niewiadomski H. 1993. *Technologia Tłuszczów Jadalnych WNT*, Warszawa, 131-149

- Norland R. E. 1990. Fish gelatin. In: *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability*. M.N. Voight, J.K. Botta (Eds.), Technomic Publishing Co., Lancaster PA, 325-333
- Ochang S.N. 2011. Effect of replacing cod liver oil with soybean oil as dietary lipid on carcass composition, haematology and sensory properties of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *International Aquatic Research* 3, 71-77
- Partanen R., Ahro M., Hakala M., Kallio H., Forssell P. 2002. Microencapsulation of caraway extract in β -cyclodextrin and modified starches. *European Food Research and Technology* 214, 242-247
- Petot G.J., Friedland R.P. 2004. Lipids, diet and Alzheimer disease: an extended summary. *Journal of the Neurological Sciences* 226, 31-33
- Piez K.A. 1965. Characterization of a collagen from codfish skin containing three chromatographically different α chains. *Biochemistry* 49, 2590-2596
- PN-62/A-86783. Ryby i przetwory rybne. Oznaczenie zawartości wody.
- PN-75/A-04018. Produkty rolno-żywnościowe. Oznaczenie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
- PN-EN ISO 3656. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczenie absorpcji w nadfiolecie wyrażonej jako ekstynkcja właściwa w świetle UV.
- PN-EN ISO 3960:2005. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby nadtlenkowej.
- PN-EN ISO 5509:2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych.
- PN-EN ISO 660:1998. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby kwasowej i kwasowości
- PN-ISO 3496:2000. Mięso i przetwory mięsne. Oznaczenie zawartości hydroksyproliny
- Prata A.S., Zanin M.H.A., Re M.I., Grosso C.R.F. 2008. Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum arabic microcapsules containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 67, 171-178
- Pugliese P.T., Jordan K., Cederberg H., Brohult J. 1998. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 4, 87-99
- Rao C.V., Newmark H.L., Reddy B.S. 1998. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis* 19, 703-706
- Rascón M.P., Berstein C. I., Garcia H.S., Salgado M.A. 2011. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT – Food Science and Technology* 44, 549-557
- Reineccius G.A. 1991. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology* 45, 144-147
- Rice K. E., Watkins J., Hill C. G. 1999. Hydrolysis of menhaden oil by a *Candida cylindracea* lipase immobilized in a hollow-fiber reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 63, 33-45.
- Riha V., Brunner G. 2000. Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 17, 55-64
- Roche H., Gibney M.J. 1994. The effect of consumption of fish oil-enriched spreadable fats on platelet phospholipids fatty acids consumption in human volunteers. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 64, 237-242
- Rusli J.K., Sanguansri L., Augustin M. A. 2006. Stabilization of oils by microencapsulation with heated protein-glucose syrup mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83, 965-972.

- Samotyja U., Małecka M. 2007. Effects of blackcurrant seeds and rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substances. *Food Chemistry* 104, 317-323
- Samotyja U., Urbanowicz A., 2005. Przeciwutleniające właściwości handlowych ekstraktów z rozmarynu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2, 184 – 192
- Schrooyen P.M.M., Van der Meer R., De Kruif C.G. 2001. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society* 60, 475-479
- Serfert Y., Drusch S., Schwarz K. 2009. Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. *Food Chemistry* 113, 1106-1112
- Severini C., Romani S., Dall'Aglio G., Provere P., Conte L., Lericci C.R. 1999. High pressure effects on lipid oxidation of extra virgin olive oils and seed oils. *The Journal of Food Technology in Africa* 4, 65-68
- Shahidi F., Han X.Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33, 501–547
- Shahidi F., Wanasundara U., Brunet N. 1994. Oxidative stability of oil from blubber of harp seal (*Phoca groenlandica*) as assessed by NMR and standard procedures. *Food Research International* 27, 555-562
- Shepherd R., Robertson A., Ofman D. 2000. Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins. *Food Hydrocolloids* 14, 281-286
- Sheu T.Y., Rosenberg M. 1995. Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems. *Journal of Food Science* 60, 98-103
- Shi G., Rao L., Yu R., Xiang H., Pen H., Long S., Yang C. 2007. Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water-soluble antioxidant. *Journal of Food Engineering* 80, 1060-1067
- Shiota M., Konisi H., Tatsumi K. 1999. Oxidative stability of fish oil blended with butter. *Journal of Dairy Science* 82, 1877-1881
- Shukla V.K.S., Perkins E.G. 1998. Rancidity in encapsulated health-food oils. *INFORM* 9, 955-962
- Sikorski Z.E. 1994. Białka – budowa i właściwości. W: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. Sikorski Z.E. (red), WNT, Warszawa 1994
- Sikorski Z.E. 1973. Zarys budowy mięśni ryb i bezkręgowców morskich. W: *Technologia chłodniczego utrwalania morskich surowców żywnościowych*. Rusak E. (red), Gdańsk, Wydawnictwo Morskie, 21-87
- Sikorski Z.E. *Morskie surowce żywnościowe*. WNT, Warszawa 1992, 60-62, 73,79
- Sikorski Z.E. *Ryby i bezkręgowce morskie*. WNT, Warszawa 2004
- Sikorski Z.E. *Technologia żywności pochodzenia morskiego*. WNT, Warszawa 1980, 78, 539
- Singer P., Wirth M., Berger I. 1990. A possible contribution of decrease in free acids to low serum triglyceride levels after diets supplemented with *n-6* and *n-3* polysaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 83, 167
- Singh H. 2011. Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids* 25, 1938–1944
- Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 274, 1-33
- Skarå T., Sivertsvik M., Birkeland S. 2004. Production of salmon oil from filling byproducts – effect of storage conditions on lipid oxidation and content of ω -polyunsaturated fatty acids. *Journal of Food Science* 69, E417-E421
- Šližyte R., Daukšas E., Falch E., Storrø I., Rustad T. 2005. Yield and compositions of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by products. *Process Biochemistry* 40, 1415-1424

- Surh J., Decker A., McClements D. 2006. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocolloids* 20, 596-606
- Suryanarayana C., Chowdoji Rao K., Kumar D. 2008. Preparation and characterization of microcapsules containing linseed oil and its use in self-healing coatings. *Progress in Organic Coatings* 63, 72-78
- Szczepanik G. 2007. Wpływ ekstraktów kopru, podbiału, rozmarynu, skrzypu, szalwii i tymianku na hamowanie utleniania lipidów wyekstrahowanych z tkanki mięśniowej kurcząt i indyków. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 4, 89-98
- Szymańska E., Winnicka K. 2009. Mikrosfery – nowoczesna postać leku do oczu o kontrolowanym uwalnianiu. *Farmacja Polska* 65, 378-386
- Tanaka M., Xueyi Z.Y., Nagashima Y., Taguchi T. 1991. Effect of high pressure on the lipid oxidation in sardine meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 957-963
- Timm-Heinrich M., Xu X., Nielsen N.S., Jacobsen C. 2004. Oxidative stability of mayonnaise and milk drink produced with structures lipids based on fish oil and caprylic acid. *European Food Research and Technology* 219, 32-41
- Trautwein E.A. 2001. N-3 fatty acids – physiological and technical aspects for their use in food. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 45-55
- Tsimidou M., Papavergou E., Boskou D. 1995. Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil. *Food Research International* 28, 431-433
- Turchiuli C., Fuchs M., Bohin M., Cuvelier M.E., Ordonnaud C., Peyrat-Maillars M.N. 2005. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6, 29-35
- Tynek M., Drozdowski B. 1998. Monitorowanie oksydacyjno-termicznych przemian tłuszczów metodą spektrofotometryczną. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 17, 27-38
- Velasco J., Andersen M.L., Skibsted L.H. 2004. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry* 85, 623-632
- Wagner L.A., Warthens J.J. 1995. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science* 60, 1048-1053
- Wan Y., Bankston J.D., Bechtel P.J., Sathivel S. 2011. Microencapsulation of menhaden fish oil containing soluble rice bran fiber using spray drying technology. *Journal of Food Science* 76, E348-E356
- Wanasundara U.N., Shahidi F. 1995. Storage stability of microencapsulated seal blubber oil. *Journal of Food Lipids* 2, 73-86
- Whelan J., Rust C. 2006. Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annual Review of Nutrition* 26, 75-103
- Wojtyś A., Jankowski T. 2004. Wpływ temperatury na szybkość przenikania wybranych olejków eterycznych do komórek drożdży piekarskich. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 40, 77-86
- Wu T.H., Bechtel P.J. 2008. Salmon by-product storage and oil extraction. *Food Chemistry* 111, 868-871
- Young S.L., Sarda X., Rosenberg M. 1993. Microencapsulating properties of whey proteins 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *Journal of Dairy Science* 76, 2868-2877
- Żelechowska E., Sadowska M., Turk M. 2010. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Hydrocolloids* 24, 325-329

- Zeller B.L., Saleeb F.Z., Ludescher R.D. 1999. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use on flavor encapsulation. *Trends in Food Science and Technology* 9, 389-394
- Zhao J., Whistler R.L. 1994. Spherical aggregates of starch granules as flavor carrier. *Food Technology* 48, 104–105
- Zhou P., Mulvaney S.J., Regenstein J.M. 2006. Properties of Alaska pollock skin gelatin: a comparison with Tilapia and pork skin gelatins. *Journal of Food Science* 69, 393-398
- Zuidam N.J., Shimoni E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. W: *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Ed. Zuidam N.J., Nedovic V. Springer-Verlag New York, 3-29

7 DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

1. **Głowacz A.**, Tynek M., Kołodziejska I. 2010. Ocena jakości dostępnych na rynku suplementów diety zawierających kwasy tłuszczowe z rodziny $n-3$. Jakość i bezpieczeństwo żywności wyzwaniem XXI wieku, s. 50-57.
2. **Głowacz A.**, Kołodziejska I. 2011. Determination of optimal conditions for the isolation of oil from the fishing industry offal. W: 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers: "Advances in Chemical and Mechanical Engineering, Vol. 1/2, Gdansk, 5th-7th May 2011 / ed. C. Fijała. Faculty Mechanical Engineering, Chemical Faculty Gdansk University of Technology, Gdańsk, 2011, s.182-185.
3. **Głowacz A.**, Kołodziejska I., Malinowska-Pańczyk E., Tynek M., Martysiak-Żurowska D., Pawłowicz R. 2013. Salmon (*Salmo salar*) processing byproducts as a source of oil and long-chain polyunsaturated fatty acids: "cold" extraction of the oil – a comparison with other extraction methods. *LWT – Food Science and Technology (w recenzji)*
4. Jędrkiewicz R., Kupka M., **Głowacz A.**, Gromadzka J., Namieśnik J. 2013. 3-MCPD: A worldwide problem of food chemistry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition (przyjęto do druku 24.07.2013)*

Doniesienia przedstawione na konferencjach naukowych:

1. **Głowacz A.**, Tynek M. 21-22.05.2009. Badanie jakości dostępnych na rynku preparatów farmaceutycznych zawierających kwasy tłuszczowe z rodziny $n-3$. XIV Ogólnopolska Sesja Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Jakość i bezpieczeństwo żywności - wyzwanie XXI wieku”, Gdynia
2. **Głowacz A.**, Gottfried K., Staroszczyk H., Kołodziejska I. 29.XI.2009. Kompleksowe zagospodarowanie wybranych odpadów przemysłu rybnego. VII Konferencja Krajowa Dla Miasta i Środowiska. Problemy unieszkodliwiania odpadów, Warszawa
3. **Głowacz A.**, Kołodziejska I. 5-7.05.2011. Determination of the optimal conditions for the isolation of oil from the fishing industry offal. 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers, Gdańsk
4. **Głowacz A.**, Kołodziejska I. 9-13.05.2011. Określenie wpływu warunków przechowywania skór łososi oraz surowego oleju na ich jakość. VII Ogólnopolskie Studenckie Seminarium Naukowo-Technologiczne BIOMEDITECH – badania i innowacje, Sopot
5. Malinowska-Pańczyk E., **Głowacz A.**, Kołodziejska I. 29.06.-01.07.2011. Wpływ wysokiego ciśnienia na stopień utlenienia lipidów mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych. XL Sesja Komitetu Nauk o Żywności Polskiej Akademii Nauk - Tradycja i nowoczesność w żywności i żywieniu, Warszawa
6. **Głowacz A.**, Wielesik B., Kołodziejska I. 6-8.07.2011. The influence of powdered rosemary on the quality of fish oil during storage. XVI Conference EuroFoodChem. Translate food chemistry into health benefits, Gdańsk

7. **Głowacz A.** 18-19.11.2011. Wielowymiarowe korzyści i potencjał zastosowania w gospodarce nowego sposobu otrzymywania wartościowego oleju z odpadów przemysłu rybnego. Seminarium naukowo-biznesowe „Budowa gospodarki opartej na wiedzy – wynalazczość studencka”, Kielce
8. **Głowacz A.**, Kołodziejska I. 16-19.05.2012. Microencapsulation of fish oil using freeze drying technique. 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers, Gdańsk
9. **Głowacz A.** Prezentacja zgłoszenia patentowego: Sposób otrzymywania oleju rybnego z odpadów ryb tłustych, zwłaszcza łososi. Krajowa Giełda Wynalazczości Studenckiej, Kielce 18-19.10.2012
10. **Głowacz A.**, Gromadzka J. 27-30.10.2011. Estimation of 3-MCPD in dietary supplements: fish liver oils and capsulated fish oil from Polish market. 11th Euro Fed Lipid Congress and 30th ISF lecture series "Oils, Fats and Lipids: New Strategies for a High Quality Future", Antalya
11. Gromadzka J., **Głowacz A.**, Jędrkiewicz R., Kupka M. 27-30.10.2013. 3-MCPD in food lipids. 11th Euro Fed Lipid Congress and 30th ISF lecture series "Oils, Fats and Lipids: New Strategies for a High Quality Future", Antalya

Patent

Tynek M., Kołodziejska I., Pawłowicz R., **Głowacz A.**, Martysiak-Żurowska D., Malinowska-Pańczyk E., Kasprzak J., Malek J. *Sposób otrzymywania oleju rybnego z odpadów ryb tłustych, zwłaszcza łososi*. Zgłoszenie patentowe nr P392002 z dn. 26.07.2010, patent przyznano 23.08.2012. Zgłaszający: Politechnika Gdańska; MK AQUA sp. z o.o. Szczecin

Uczestnictwo w projektach badawczych

Udział w projekcie badawczym pt: *"Susceptibility of rape varieties to flavour reversion" (2010) realizowanym w ramach wieloletniego porozumienia o współpracy naukowo-dydaktycznej pomiędzy Wydziałem Chemicznym Politechniki Gdańskiej a Centrum Badań i Rozwoju Tłuszczów Bünge Europe.*

Nagrody

Wyróżnienie w I Ogólnopolskim Konkursie Student-Wynalazca pod patronatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Urzędu Patentowego RP dla współautora zgłoszenia patentowego P392002 „Sposób otrzymywania oleju rybnego z odpadów ryb tłustych, zwłaszcza łososi” (pozostali autorzy: M. Tynek, Kołodziejska I., Pawłowicz R., Martysiak D., Malinowska-Pańczyk E., Kasprzak J., Malek J.)

Laureatka programu stypendialnego „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów, IV edycja” organizowanego przez Urząd Marszałkowski Województwa Pomorskiego w Gdańsku

Stypendium za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2010/2011 z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych.

ABSTRACT

A large amount of offal and by-products generated in the fishing industry, including the processing of farm salmon, induces the search for a new rational management method. Skins from the process of mechanical skinning of salmon contain about 15 % collagen and 25 % fat, and therefore they could be used for recovery of these substances.

The first aim of this work was to develop the new method of oil extraction from the skins. It was investigated that there is a possibility to recover oil from the raw material at a temperature below 15°C. It was found that after one minute of mixing minced skins with water and then centrifugation of obtained mixture, the oil extraction yield was very high (about 83%). At the same time the quality of extracted oil was examined by determining the content of the primary (PV) and secondary (TBARS) oxidation products and the free fatty acids content and fatty acid composition (with particular attention to the content of EPA and DHA). The "cold extraction" method allowed to receive fish oil with a good yield and low energy input, and what is very important, does not lead to unfavorable oxidative and hydrolytic changes. Furthermore, during the oil extraction the collagen from the skins was not lost and it was then used for the preparation of gelatin. The effect of frozen storage time on the quality of obtained oil was examined. Oxidative changes took place in the raw material even at -20°C. The oil oxidation processes took place about two times faster during storage at room temperature than in cold storage, although the composition of fatty acids changed only slightly. The suitability of the dried herbs with antioxidant properties to improve the oxidative stability of the oil was investigated. The addition of rosemary to oil, already at a concentration of 1% prolonged induction period of the oxidation reaction of about 9 times with comparison to the control sample. Other herbs: oregano and sage, did not show such a strong antioxidant effect as rosemary.

Another main aim of the work was to develop optimal conditions for the microencapsulation of oil obtained by applying the freeze-drying of emulsions. The gelatin, produced from the same raw material as an oil, was used as the material for the shells of the microcapsules. It was found that the optimal composition of the emulsion intended for the microencapsulation consisted of 20 % protein concentration in the mixture and the ratio of core:shell was 1:1. Microcapsules were prepared by freeze-drying of the emulsion in the form of plates, which were then grinded. Immediately after drying, the oxidation of the microencapsulated oil occurred. Limitation of oxygen access during the preparation of the emulsion did not improve the oxidative stability of microcapsules. Therefore the another oil encapsulation method was investigated - drying the emulsion in the form of pellets. This resulted in a significant improvement of oxidative stability of the microencapsulated oil during storage. In addition, the inclusion in the structure of rosemary pellets reduced the rate of formation of primary and secondary oxidation products. The LOO of the oil in pellets with the addition of rosemary, even when they were stored at room temperature after 4 weeks was almost 6 times lower than in the crude oil. The microcapsules in the form of pellets, obtained by using the developed method, could be used as a dietary supplement.