

**Badania przemian i właściwości biologicznych elagotanin roślin
z rodziny *Rosaceae***

mgr inż. Agnieszka Hejduk

Promotor: prof. dr hab. inż. Robert Klewicki

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Michał Sójka

Streszczenie

Owoce jagodowe rodziny *Rosaceae* są cennym źródłem elagotanin, antocyjanów i błonnika pokarmowego. Niska trwałość owoców jagodowych sprawia, że są one zazwyczaj mrożone i przetwarzane. Przetwórstwo wiąże się z powstaniem ubocznych produktów odpadowych w postaci wyłoków.

Głównym celem pracy było pozyskanie i rozszerzenie wiedzy na temat przemian oraz właściwości biologicznych elagotanin (ETs) wyizolowanych z wyłoków wybranych owoców z rodziny *Rosaceae*, tj. maliny, jeżyny, truskawki i poziomki. Równorzędnym celem było określenie stopnia interakcji elagotanin z białkami żywności oraz wpływu skompleksowania z żelatyną na odzysk tych polifenoli w warunkach symulujących, z chemicznego punktu widzenia, układ trawienny. Innowacyjnym elementem pracy było określenie wpływu dodatku surowego ekstraktu malinowego na wybrane właściwości mięsa wieprzowego i jego produktów.

We wstępie teoretycznym przedstawiono znaczenie owoców jagodowych, charakterystykę elagotanin oraz metody wyodrębniania tych związków. W dalszej kolejności przedstawiono stan wiedzy na temat przemian chemicznych oraz właściwości biologicznych elagotanin oraz ich interakcjach z wybranymi składnikami żywności.

W części doświadczalnej scharakteryzowano materiały oraz przedstawiono metody wykorzystane w pracy badawczej.

W pierwszym etapie z badanych owoców wyprodukowano soki nieklarowane i przeciera, które przeznaczono do analizy stabilności elagotanin w warunkach przechowalniczych o zróżnicowanej temperaturze ($-20, 4$ i $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) i czasie (0 – 12 miesięcy). Najszybsze obniżenie stężenia ETs odnotowano po roku, w najwyższej testowanej temperaturze. Ponadto, wykazano wyższą stabilność elagotanin w sokach niż w przecierach pochodzących z surowców z rodzaju *Rubus*. Z kolei w przypadku produktów na bazie surowców z rodzaju *Fragaria* wyższą stabilnością charakteryzowały się elagotaniny w przetworach truskawkowych, w porównaniu z poziomkowymi.

W pracy wykazano, że wyłoki po produkcji soków i przecierów są bogatym źródłem ETs, w tym związków oligomerycznych. Dlatego też w dalszej kolejności z wyłoków badanych owoców pozyskano surowe ekstrakty polifenolowe o wysokiej zawartości elagotanin (od 1,5 do ponad 19 g/100 g suchej masy). Ekstrakty poddano dalszemu oczyszczaniu na złożu

adsorpcyjnym XAD Amberlite 1600 N oraz zastosowano oczyszczanie z wykorzystaniem techniki chromatografii wykluczania (SEC). Zastosowana procedura pozwoliła na efektywne oddzielenie elagotanin od antocyjanów i częściowo od flawanoli. W 100 g liofilizowanych ekstraktów o najwyższym stopniu oczyszczenia oznaczono elagotaniny, antocyjany i flawanole w ilości odpowiednio 12 – 74 g, 0 – 0,5 g i 4 – 18 g.

W następnym etapie w liofilizowanych ekstraktach surowych i oczyszczonych określono przemiany elagotanin podczas rocznego przechowywania w zróżnicowanych warunkach, w 4 wariantach, tj. -20, 4, 20 (światło), 20 (ciemność)°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). W większości rozpatrywanych przypadków najwyższe ubytki ETs zanotowano dla najwyższej testowanej temperatury z dostępem do światła. Ponadto, czynnikiem wpływającym na stabilność ETs był stopień oczyszczenia ekstraktu. W surowych ekstraktach po dwunastu miesiącach ubyło od 6 do 29% początkowego stężenia ETs, podczas gdy w oczyszczonych było to od 1 do 37% dla przechowywania w 20°C w ciemności oraz od 12 do 70% przy dostępie do światła. Elagotaniny pozostawały stabilne podczas 24 - godzinnej ekspozycji na promieniowanie UV-C, niezależnie od stopnia oczyszczenia ekstraktu i rodzaju owocu.

Kolejnym elementem pracy była ocena przemian ETs w wodnych roztworach w warunkach zróżnicowanego pH (3 – 8) i temperatury (20 – 80°C $\pm 2^\circ\text{C}$). Do badań wybrano oczyszczone ekstrakty malinowe i truskawkowe, stanowiące odpowiednio źródło ETs oligomerycznych oraz związków o niższej masie cząsteczkowej. Wykazano, że wysoka temperatura sprzyjała obniżeniu stężenia elagotanin, zwłaszcza przy wysokim pH. Przy niższym pH temperatura miała mniejsze znaczenie. W większości wariantów dla ekstraktów malinowych głównym produktem przemian była dimeryczna sanguina H – 10. Z kolei roztwory po inkubacji ekstraktów truskawkowych były złożoną mieszaniną związków o niższej masie, w tym bis-HHDP-glukozy, galolilo-HHDP-glukozy, kwasu agrymonowego i sanguiny H-2 bez reszty kwasu galusowego. Dla wszystkich testowanych ekstraktów wysokie temperatury w połączeniu z wysokim pH skutkowały wzrostem udziału kwasu elagowego oraz jego koniugatów (EAC) już w pierwszych godzinach inkubacji.

Badania stabilności elagotanin wyizolowanych z wycieków malinowych w roztworach o zróżnicowanym stopniu natlenowania wykazały, że stężenie tych związków obniża się w każdym analizowanym układzie. Po 14 dniach inkubacji ekstraktów z tlenem oraz bez napowietrzania stężenie ETs i EAC było ponad dwu- i czterokrotnie niższe w porównaniu

do wyjściowego ekstraktu. Z kolei elagotaniny wyizolowane z wycieków truskawkowych pozostawały stabilne przez cały okres napowietrzania.

W dalszym etapie określono interakcje elagotanin z białkami żywności w różnych matrycach (roztwory buforowe o pH 3, 5, 7; woda; chlorek sodu; sacharoza). Białkiem najsilniej wiążącym ETs niezależnie od matrycy była żelatyna (10 – 99% związania). Interakcje z pozostałymi białkami zależały od składu matrycy. ETs malinowe łączyły się z białkami najlepiej w środowisku chlorku sodu (do 99%), a najgłębiej w środowisku wodnym (<10% dla większości białek). Z kolei ETs truskawkowe dobrze łączyły się w wodzie (20 – 59%), a najgłębiej w środowisku z dodatkiem cukru (0 – 14%). Rozpuszczone kompleksy wykazywały niższe wartości potencjału antyoksydacyjnego (wartość inhibicji rodnika DPPH w zakresie od 1 do 36%) w porównaniu z ich hydrolizatami (DPPH od 1 do 67%).

Dodatkowo określono wpływ skompleksowania z żelatyną na stabilność elagotanin w warunkach symulujących, pod względem chemicznym, układ pokarmowy. Nieskompleksowane elagotaniny wykazywały stabilność w większości testowanych warunków, tj. w pH 1,2 i 7,5 oraz w obecności pepsyny. Wyjątek stanowiła inkubacja z enzymami jelitowymi, gdzie stężenie ETs zostało obniżone o 80 – 90%. W osadach po interakcjach z pankreatyną oznaczono 15 i 60% EAC, odpowiednio dla ekstraktów z surowców z rodzaju *Rubus* i *Fragaria*. Wysokie odzyski EAC w osadach po interakcjach z pankreatyną (15 – 60%) mogą świadczyć o silnym powinowactwie elagotanin z enzymami.

Określono właściwości antagonistyczne elagotanin w stosunku do szczepów patogennych zanieczyszczających żywność. Do badań wykorzystano 8 ekstraktów o najwyższej koncentracji elagotanin po oczyszczeniu metodą SEC. Ekstrakty wykazywały potencjał antibakteryjny w stężeniu 200 mg/mL wobec bakterii z rodzaju *Listeria* spp. oraz 60 mg/mL wobec bakterii z rodzaju *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. i *Staphylococcus* spp. Minimalne stężenie hamujące wzrost patogenów (MIC) wynosiło od 0,391 do 12,5 mg/mL, przy czym nie odnotowano różnicy dla bakterii Gram – ujemnych i Gram – dodatnich. Ekstrakty wykazywały również właściwości hamujące formowanie biofilmów przez *Listeria innocua*.

Innowacyjnym elementem była aplikacja surowego ekstraktu malinowego, bogatego w elagotaniny, do produktów przetwarzania mięsa wieprzowego. W pracy po raz pierwszy wskazano problem efektywności ekstrakcji ETs z matrycy mięsnej. We wszystkich produktach mięsnych niewyeksahowane elagotaniny stanowiły od 20 do 49%. W pozostałości poekstrakcyjnej obecne były elagotaniny związane trwale najprawdopodobniej z białkami lub

peptydami. Tym samym dowiedziono, że niski odzysk elagotanin nie wynikał jedynie z termicznej degradacji tych związków.

W dalszej kolejności przygotowano 54 produkty mięsne wzbogacone surowym ekstraktem malinowym bogatym w elagotanniny. Warianty zróżnicowano pod względem dawki ekstraktu i peklosoli oraz obróbki termicznej. Dodatek ekstraktu poprawił czerwoną barwę oraz właściwości antyoksydacyjne w większości rozpatrywanych wariantów, niezależnie od rodzaju zastosowanej obróbki termicznej. Dodatek ekstraktu malinowego nie wpłynął na soczystość, kruchość i atrakcyjność ogólną wędzonych kiełbas z obniżoną dawką peklosoli. Wpływ na obniżenie akceptowalności kiełbas miał natomiast całkowity brak peklosoli. Wyniki prezentowanych badań wskazują na wysoki potencjał możliwości aplikacji surowych ekstraktów bogatych w elagotanniny pozyskanych z ubocznych produktów odpadowych.