UNIWERSYTET EKONOMICZNY W POZNANIU

Wydział Towaroznawstwa

Olga Bińczak

Stabilność oksydacyjna frakcji tłuszczowej wytłoku z orzecha włoskiego w kontekście jego wykorzystania w przemyśle spożywczym

Oxidation stability of walnut cake's lipid fraction in the context of its valorization in the food industry

Praca doktorska

Promotor: dr hab. inż. Urszula Samotyja, prof. nadzw. UEP

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Dankowska

Pracę przyjęto dnia ……

Wydział Towaroznawstwa
Katedra Towaroznawstwa Żywności

Poznań 2018

Spis treści

Wykaz używanych skrótów..... 5

Wstęp..... 6

1. Pozostałości poprodukcyjne przemysłu spożywczego..... 8

1.1. Ekologiczne, ekonomiczne i prawne aspekty zagospodarowania odpadów oraz produktów ubocznych..... 9

1.2. Odpady i produkty uboczne przemysłu spożywczego oraz sposoby ich zagospodarowania..... 15

1.3. Wybrane odpady i produkty uboczne przemysłu olejarskiego..... 23

1.3.1. Proces produkcji olejów jadalnych w kontekście generowanych odpadów i produktów ubocznych..... 25

1.3.2. Wytłoki roślin oleistych..... 28

2. Wytłok z orzecha włoskiego jako produkt uboczny o wysokim potencjale wykorzystania w przemyśle spożywczym..... 45

2.1. Orzechy włoskie – wybrane elementy rynku..... 45

2.2. Właściwości odżywcze i prozdrowotne orzechów włoskich i wytłoków z orzecha włoskiego..... 46

2.3. Wykorzystanie wytłoku z orzecha włoskiego w świetle trendów na rynku żywności..... 53

2.4. Czynniki ograniczające wykorzystanie wytłoku z orzecha włoskiego..... 58

3. Stabilność oksydacyjna frakcji tłuszczowej surowców oleistych..... 60

3.1. Chemiczne procesy utleniania – przebieg i konsekwencje..... 60

3.2. Procesy utleniania enzymatycznego – mechanizm i konsekwencje aktywności lipooksygenazy..... 66

3.3. Ochrona frakcji tłuszczowej surowców oleistych przed postępującymi procesami oksydacjnymi..... 71

3.3.1. Potencjał antyoksydacyjny natywnych przeciwutleniaczy surowców oleistych..... 72

3.3.2. Metody hamowania aktywności lipooksygenazy..... 76

4. Założenia badawcze, cel pracy i hipotezy badawcze..... 82

5. Przedmiot i zakres badań..... 84

6. Metody badawcze..... 93

6.1. Charakterystyka składu chemicznego i wybranych właściwości fizykochemicznych 93

6.2. Oznaczenie aktywności lipooksygenazy..... 97

6.2.1. Przygotowanie testów służących pomiarowi aktywności lipooksygenazy 98

6.2.2. Oznaczenie aktywności lipooksygenazy 99

6.2.3. Określenie typu lipooksygenazy i warunków dla jej optymalnej aktywności 99

6.2.4. Ocena wpływu związków fenolowych na aktywność lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego 100

6.3. Ocena właściwości przeciwutleniających ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego..... 100
6.3.1. Przygotowanie ekstraktów z wytłoków z orzecha włoskiego……. 101
6.3.2. Oznaczenie profilu związków fenolowych w ekstraktach z wytłoków z orzecha włoskiego techniką ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC)……. 101
6.3.3. Oznaczenie ogólnej zawartości związków fenolowych..... 102
6.3.4. Oznaczenie zawartości flawonoidów..... 102
6.3.5. Oznaczenie właściwości redukujących w teście FRAP..... 103
6.3.6. Oznaczenie aktywności przeciwrodnikowej w teście z rodnikiem DPPH..... 103
6.3.7. Oznaczenie zdolności do hamowanaia degradacji β-karoten w modelowej emulsji kwas linolowy/β-karoten..... 104
6.4. Oznaczenie stężenia ditlenku węgla…… 105
6.5. Ocena zasięgu zmian oksydacyjnych..... 105
6.5.1. Przygotowanie materiału badanego……. 106
6.5.2. Badanie zmian oksydacyjnych……..... 107
6.6. Optymalizacja warunków termicznej inaktywacji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego…… 109
6.7. Analiza statystyczna wyników..... 110
6.8. Wykaz odczynników, aparatury i sprzętu laboratoryjnego..... 110
7. Wyniki badań i dyskusja..... 113
7.1. Charakterystyka składu i wybranych właściwości fizykochemicznych wytłoków z orzecha włoskiego…….. 113
7.2. Charakterystyka typu i stopnia aktywności natywnej lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego…… 117
7.3. Wpływ czasu przechowywania na aktywność lipooksygenazy, stabilność oksydacyjną oraz potencjał antyoksydacyjny wytłoków z orzecha włoskiego…… 121
7.4. Możliwość wykorzystania wytłoku z orzecha włoskiego jako składnika recepturowego produktów spożywczych i źródła związków fenolowych.. 135
7.4.1. Wpływ dodatku wytłoków z orzecha włoskiego na trwałość modelowego koncentratu ciasta w proszku 136
7.4.2. Wpływ dodatku ekstraktu z wytłoków z orzecha włoskiego na stabilność modelowych próbek oleju tłoczonego na zimno..... 139
7.5. Wpływ związków fenolowych na aktywność natywnej lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego..... 142
7.6. Procesy termiczne jako metoda służąca ograniczaniu aktywności lipooksygenazy..... 147
7.6.1. Wpływ czasu i temperatury ogrzewania surowca na aktywność natywnej lipooksygenazy, stabilność oksydacyjną oraz potencjał przeciwutleniający wytłoków z orzecha włoskiego…… 147
7.6.2. Wpływ procesu termicznej inaktywacji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego na stabilność oksydacyjną modelowego koncentratu ciasta w proszku…….. 161

7.6.3. Wpływ procesu termicznej inaktywacji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego na stabilność oksydacyjną tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich..... 163

8. Podsumowanie wyników i wnioski..... 169

Literatura..... 174

Wykaz rysunków..... 205

Wykaz tabel..... 207

Wykaz używanych skrótów

AE	potencjał antyoksydacyjny
ALA	kwas α-linolenowy
a_w	aktywność wody
BHT	butylohydroksytoluen
DHA	kwas dokozaheksaenowy
DPPH	1,1-difenylo-2-pikrylhydazyl
EC_{50}, T_{EC50},	parametry aktywności przeciwrodnikowej
EPA	kwas eikozapentaenowy
FRAP	test oceny siły redukującej (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power)
GAE	kwas galusowy
GC	chromatografia gazowa (ang. gas chromatography)
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości
j.u.	jednostka umowna
JNKT	jednonienasycone kwasy tłuszczowe
K	próbka kontrolna
LA	kwas linolowy
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości
LOO	liczba nadtlenkowa
LOX	lipooksygenaza
meq O_2/kg	milirównoważniki aktywnego tlenu na kilogram próbki
NKT	nasycone kwasy tłuszczowe
NNKT	niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe
P	oznaczenie próbek wytłoków poddanych ogrzewaniu
QE	kwercetyna
S	oznaczenie próbek wytłoków przechowywanych przez 8 miesięcy
SHS-GC	metoda chromatografii gazowej z wykorzystaniem techniki statycznego headspace do badania fazy nadpowierzchniowej (ang. static headspace-gas chromatography)
s.m.	sucha masa
TPTZ	2,4,6-tripirydylo-s-triazyna
Trolox	kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy
W	oznaczenie próbek wytłoków nie poddanych ogrzewaniu
WNKT	wielonienasycone kwasy tłuszczowe

Wstęp

Branża olejarska od lat stanowi jeden z filarów rynku spożywczego, co znajduje odzwierciedlenie nie tylko w systematycznym wzroście produkcji, ale i masie wytwarzanych przez nią odpadów stałych. Wśród nich istotne znaczenie przemysłowe przypisywane jest wytłokom, które stanowią bogate źródło związków pokarmowych i w myśl obowiązującego prawa są klasyfikowane jako produkty uboczne. Coraz częściej podkreśla się, że w obliczu przemian dokonujących się w zakresie zasad gospodarki odpadami oraz zmian modelu żywieniowego w niedługiej przyszłości mogą stać się one istotnym źródłem związków odżywczych dla światowej populacji. Co więcej, ich zagospodarowanie wydaje się być uzasadnione z ekologicznego, ekonomicznego oraz marketingowego punktu widzenia.

W miarę pogłębiania wiedzy na temat wytłoków roślin oleistych rośnie przekonanie, że główną barierą we wprowadzeniu ich na rynek spożywczy może być wzmożona podatność na procesy oksydacyjne. Nabiera to jeszcze większego znaczenia w kontekście panującego przekonania, że w przypadku produktów sypkich o złożonej matrycy, wciąż nierozwiązanych jest wiele kwestii związanych z mechanizmami utleniania. Wśród wytłoków jednymi z cenniejszych, jednak do tej pory mało opisanymi w literaturze przedmiotu, są wytłoki z orzecha włoskiego, charakteryzujące się wysokim udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych we frakcji lipidowej oraz analogicznym do orzechów składem frakcji polarnej. Biorąc pod uwagę kierunki zmian zachodzących na rynku żywności dyktowane aktualnymi i przewidywanymi trendami, w najbliższych latach z dużym prawdopodobieństwem można spodziewać się stopniowego wzrostu zainteresowania podmiotów przemysłu spożywczego tym rodzajem wytłoków. Obecnie jednak brak jest kompleksowej oceny trwałości omawianego surowca, szczególnie w obszarze identyfikacji czynników determinujących rodzaj i tempo zmian oksydacyjnych zachodzących w czasie składowania. W konsekwencji jego wprowadzenie na rynek wciąż wiąże się z dużym ryzykiem związanym z możliwością utraty jakości i poniesieniem potencjalnych strat ekonomicznych.

Niniejsza praca swoim zakresem obejmuje ocenę czynników wpływających na zasięg zmian oksydacyjnych oraz prezentuje potencjalne sposoby ich ograniczania. W części teoretycznej dokonano przeglądu piśmiennictwa w zakresie obowiązujących przepisów prawa dotyczących gospodarki odpadami oraz przedstawiono wybrane elementy rynku spożywczego w kontekście wytwarzanych odpadów. Szczególną uwagę poświęcono pozostałościom

poprodukcyjnym przemysłu olejarskiego i sposobom racjonalnego gospodarowania nimi. Przedstawiono szanse wykorzystania wytłoków z orzecha włoskiego przez przemysł spożywczy w świetle obowiązujących i przewidywanych trendów, jak również potencjalne zagrożenia związane z zachodzącymi w nich procesami utleniania. W części empirycznej pracy przedstawiono hipotezy i cele pracy oraz zakres badań. Scharakteryzowano materiał badany oraz metodykę badawczą, omówiono otrzymane wynik na tle dostępnych danych literaturowych oraz zawarto podsumowanie wraz z wnioskami.

Celem podjętych badań była ocena działania czynników determinujących stabilność oksydacyjną frakcji tłuszczowej wytłoków z orzecha włoskiego, a także wydłużenie okresu ich trwałości, co warunkuje możliwość ich zagospodarowania jako surowca dla przemysłu spożywczego. Zakres badań obejmował 5 głównych etapów poprzedzonych charakterystyką składu chemicznego materiału badanego oraz wybranych cech fizykochemicznych. W pierwszym z nich oceniono zasięg zmian oksydacyjnych wywołanych procesami utleniania chemicznego i enzymatycznego oraz zmiany potencjału antyoksydacyjnego. Następnie na podstawie badań modelowych określono wpływ czasu przechowywania wytłoków na ich efektywność przeciwutleniającą oraz trwałość wybranych produktów przemysłu spożywczego, w których wytłoki stanowiły podstawowy składnik recepturowy. W etapie trzecim zbadano skuteczność modelowych fenolokwasów oraz natywnych związków przeciwutleniających w hamowaniu aktywności lipooksygenazy. W części czwartej dokonano wyboru najbardziej odpowiedniej kombinacji czasu i temperatury ogrzewania wytłoków jako techniki ograniczającej procesy utleniania enzymatycznego, opierając wnioskowanie na stopniu aktywności enzymu, zawartości nadtlenków oraz zmianach zachodzących w obrębie aktywności przeciwutleniającej. Ostatni etap to ocena skuteczności zastosowania termicznej inaktywacji lipooksygenazy w ochronie stabilności oksydacyjnej oraz potencjału przeciwutleniającego wytłoków z orzecha włoskiego – badania modelowe z wykorzystaniem modelowego koncentratu ciasta w proszku oraz oleju tłoczonego na zimno.

1. Pozostałości poprodukcyjne przemysłu spożywczego

Przemysł spożywczy to jeden z najważniejszych działów gospodarki o istotnym znaczeniu makroekonomicznym. Jako największy odbiorca surowców rolniczych i główny dostawca żywności w handlu, integruje podmioty zrzeszone w całym procesie wytwarzania żywności. Tworzą go zakłady bezpośredniego przetwórstwa surowców pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, zakłady zajmujące się tzw. przetwórstwem wtórnym, w tym przemysł napojów bezalkoholowych i koncentratów spożywczych oraz zakłady specjalizujące się w wyrobie używek (gorzelnie i browary).

W Polsce sektor spożywczy uznawany jest za jeden z najszybciej rozwijających się w gospodarce, o potencjale dorównującym największym krajom rozwiniętym Unii Europejskiej. Charakteryzuje się on również stabilną dynamiką wzrostu produkcji (4-6% na rok) oraz stosunkowo małą wrażliwością na wahania koniunktury gospodarczej (Główny Urząd Statystyczny [GUS], 2017b; Polska Agencja Informacji i Handlu [PAIH], 2015). Co roku przetwórstwo spożywcze wytwarza blisko 3% wartości produktu krajowego brutto (PKB), a w roku 2016 wartość produkcji sprzedanej artykułów spożywczych i napojów wyniosła 215,12 mld zł, co odpowiadało kolejno 16,5% krajowej produkcji sprzedanej ogółem oraz 19,2% sprzedaży przetwórstwa przemysłowego. W strukturze przedsiębiorstw dominują podmioty prywatne (99,9%), o średniej wielkości zatrudnienia poniżej 100 pracowników, przy niespełna tylko 2-procentowym udziale jednostek zatrudniających ponad 500 osób (GUS, 2017b). Działalność produkcyjna zakładów spożywczych cechuje wysoki stopień konsolidacji i koncentracji, zapoczątkowany w momencie transformacji gospodarczej w latach 90. XX wieku, dyktowany przede wszystkim dążeniem do redukcji kosztów produkcji oraz zbudowaniem przewagi konkurencyjnej na rynkach międzynarodowych. Znaczne ożywienie działalności sektora przy równoczesnym wzroście udział kapitału zagranicznego obserwowane jest natomiast od momentu przystąpienia Polski do Unii Europejskiej. Stabilność i spójność gospodarcza, położenie geograficzne, duża chłonność rynku wewnętrznego przy relatywnie niskich cenach surowców i kosztach siły roboczej czynią Polskę odpowiednim krajem dla inwestycji zagranicznych (Łucek, 2016).

Wielkość oraz skala działalności przemysłu spożywczego znajduje odzwierciedlenie w bezpośrednim oddziaływaniu na środowisko. Produkcja żywności stanowi źródło zanieczyszczeń emitowanych do gleb, wód, atmosfery oraz dostarcza odpadów

zróżnicowanych pod względem fizycznym, chemicznym i biologicznym. Co więcej, cechą charakterystyczną sektora jest okresowość występowania danego typu odpadów, wynikająca bezpośrednio z sezonowości produkcji surowców, jak również różny stopień ich oddziaływania na środowisko. Wśród zakładów o największym negatywnym łącznym wpływie na środowisko wymienia się przede wszystkim mleczarnie, zakłady cukrownicze, przemysł mięsny oraz owocowo-warzywny. Stosunkowo neutralne są natomiast zakłady przemiału zbóż i koncentratów spożywczych (Kasztelan i Kierepka, 2014). W kolejnych rozdziałach pracy omówiono przykładowe rodzaje powstających odpadów stałych z podziałem na wybrane branże oraz przedstawiono główne kierunki ich zagospodarowania.

1.1. Ekologiczne, ekonomiczne i prawne aspekty zagospodarowania odpadów oraz produktów ubocznych

Rosnący wraz z liczbą ludności na świecie stopień produkcji przemysłowej nie pozostaje obojętny wobec środowiska. Obszarami, które w szczególności wymagają poprawy są zużycie wody pitnej i energii oraz ograniczenie ilości powstających i składowanych pozostałości poprodukcyjnych. Nieracjonalna gospodarka odpadami stałymi prowadzi bowiem do postępujących procesów degradacji zasobów naturalnych oraz marnotrawienia ich wysokiego potencjału przetwórczego. Rzutuje to również na wyniki finansowe przedsiębiorstw, a w dłuższej perspektywie prowadzi do obniżenia ogólnej jakości życia społeczeństwa. Priorytetem zatem stało się opracowywanie skutecznych strategii i środków służących odpowiedniemu wykorzystaniu, przetworzeniu czy utylizowaniu odpadów. Coraz częściej podkreśla się również konieczność oddzielenia wzrostu masy wytwarzanych odpadów w stosunku do wzrostu PKB (Komisja Europejska, 2011).

Pozostałościami poprodukcyjnymi powszechnie przyjęło się nazywać wszystkie substancje i przedmioty stanowiące skutek uboczny procesu produkcyjnego. W zależności od właściwości mogą być one uznane za odpady lub produkty uboczne. Jeszcze do niedawna klasyfikacja ta wobec braku jednoznacznej wykładni prawnej była stosunkowo umowna. Dla przykładu, w rozporządzeniu Rady (EWG) nr 3035/80 z dnia 11 listopada 1980 r. pozostałości poprodukcyjne utożsamiane były z odpadami, a terminy te używane były zamiennie. Zgodnie z powyższym rozporządzeniem **odpad** definiowany był jako element danego procesu produkcyjnego o składzie i cechach wyraźnie odmiennym od właściwego towaru, który od

produktu ubocznego odróżniał brak możliwości wprowadzenia w niezmienionej formie do obrotu rynkowego (Rozporządzenie Rady (EWG) nr 3035/80, 1980). Obecnie pojęcia te zostały usystematyzowane w wiodącej dla UE dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE z dnia 19 listopada 2008 r. w sprawie odpadów oraz uchylającej niektóre dyrektywy (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2008/98/WE, 2008) i na potrzeby niniejszej pracy taką systematykę przyjęto. Zgodnie z art. 3 pkt 1. tej dyrektywy **odpad** definiowany jest jako „każda substancja lub przedmiot, których posiadacz pozbywa się, zamierza się pozbyć, lub do których pozbycia został zobowiązany". **Produkt uboczny** (art. 5, pkt 1) natomiast to substancja lub przedmiot, powstające w wyniku procesu produkcyjnego, którego podstawowym celem nie jest ich produkowanie. Termin ten ma zastosowanie jedynie wówczas, gdy powstałe produkty spełniają równocześnie cztery warunki, tj. (I) ich dalsze wykorzystanie jest pewne; (II) mogą być one wykorzystywane bezpośrednio bez jakiegokolwiek dalszego przetwarzania innego niż normalna praktyka przemysłowa; (III) są produkowane jako integralna część procesu produkcyjnego; (IV) dalsze wykorzystanie jest zgodne z właściwymi wymogami prawa (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2008/98/WE, 2008). Zgodnie z powyższymi definicjami oraz celem UE odnoszącym się do maksymalizowania zysków ekonomicznych przy zachowaniu wysokiego poziomu ochrony ekosystemów, produkty uboczne powinny być każdorazowo wykorzystywane. Odpady natomiast, jeśli tylko pozwala na to ich specyfika w pierwszej kolejności należy poddać odzyskowi lub recyklingowi, a procesy unieszkodliwiania lub likwidacji, realizowane tylko wówczas, kiedy żadna z innych form zagospodarowania pozostałości nie jest możliwa.

Zgodnie z artykułem 11 Traktatu o Funkcjonowaniu UE, Unia Europejska swoją politykę, w tym przede wszystkim dotyczącą ochrony środowiska, opiera na idei zrównoważonego rozwoju (Traktat o Funkcjonowaniu Unii Europejskiej, 2012; Komisja Europejska, 2011). Termin ten został wprowadzony w życie w 1980 r. przez Międzynarodową Unię Ochrony Przyrody oraz rozpowszechniony przez raport „Nasza wspólna przyszłość" w 1987 r. Najogólniej definiuje się go jako stałe dążenie do ciągłego doskonalenia w obszarze racjonalnego korzystania z zasobów, które ma zapewnić wszystkim żyjącym i przyszłym pokoleniom wysokie standardy życia (ekonomiczne, ekologiczne i społeczno-kulturowe), w granicach tolerancji natury (Rogall, 2010). Idea zrównoważonego rozwoju była tematem przewodnim na wielu szczytach UE, w tym m.in. na Pierwszym Ziemskim Szczycie

Ekologicznym w Rio de Janeiro oraz na Światowych Szczytach Zrównoważonego Rozwoju w Johannesburgu, Rio de Janeiro i Nowym Jorku w konsekwencji stając się podwaliną do wypracowania dokumentu „Agenda 21" oraz „Milenijnych Celów Rozwoju", zastąpionych w 2015 roku przez siedemnaście „Celów Zrównoważonego Rozwoju" zawartych w „Agendzie Rozwojowej 2030". Uzupełnieniem założeń dotyczących zrównoważonego rozwoju są również Strategia Lizbońska i Göteborska (Komisja Wspólnoty Europejskiej, 2015) oraz długookresowy program rozwoju społeczno-gospodarczego UE – Strategia „Europa 2020" (Olejarczyk, 2016). Wśród dokumentów o charakterze strategicznym można natomiast wymienić m.in. „Strategię ochrony różnorodności biologicznej na okres do 2020 r.", „Europa efektywnie korzystająca z zasobów" – inicjatywa przewodnia strategii „Europa 2020", Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady, Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów „Ku gospodarce o obiegu zamkniętym: program „zero odpadów" dla Europy". W prawodawstwie polskim zasada zrównoważonego rozwoju została ujęta w art. 5 rozdz. I Konstytucji Rzeczypospolitej Polskiej (Konstytucja Rzeczypospolitej Polskiej, 2009), a dokładną definicję podano w art. 3 pkt. 50 ustawy Prawo ochrony środowiska z dnia 27 kwietnia 2001 (Ustawa nr 62 z dnia 27 kwietnia 2001, 2001).

Przywołany artykuł 11 Traktatu podkreśla istotę integracji wzrostu gospodarczego, stabilności cen, konkurencyjności gospodarki rynkowej i rozwoju społecznego z jednoczesnym zachowaniem wysokiego poziomu ochrony i poprawy jakości środowiska (Traktat o Funkcjonowaniu Unii Europejskiej, 2012). Zgodnie z powyższym konieczne staje się uwzględnianie gospodarki odpadami jako integralnego elementu aspektów środowiskowych, we wszystkich obszarach życia ludzkiego (Olejarczyk, 2016). Coraz częściej wprost podkreśla się, że brak zintegrowanego i efektywnego planu zarządzania pozostałościami poprodukcyjnymi negatywnie wpływa na kondycję ekosystemów oraz jakość życia, jak również jest ekonomicznie nieopłacalne. W konsekwencji legislacja dotycząca wytwarzania i gospodarowania odpadami stanowi jedną z najbardziej obszernych składowych prawa ochrony środowiska, które uwzględnia specyfikę odpadów, formy ich występowania, stopień niebezpieczeństwa i oddziaływania na środowisko oraz dopuszczone formy transportu.

W Unii Europejskiej fundamentalnym dokumentem dotyczącym gospodarki odpadami jest przywołana Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE z dnia 19 listopada 2008r., bazująca na trzech zasadach: „hierarchii postępowania z odpadami", „rozszerzonej odpowiedzialność producenta" oraz „zanieczyszczający płaci". Nadrzędnym celem dokumentu

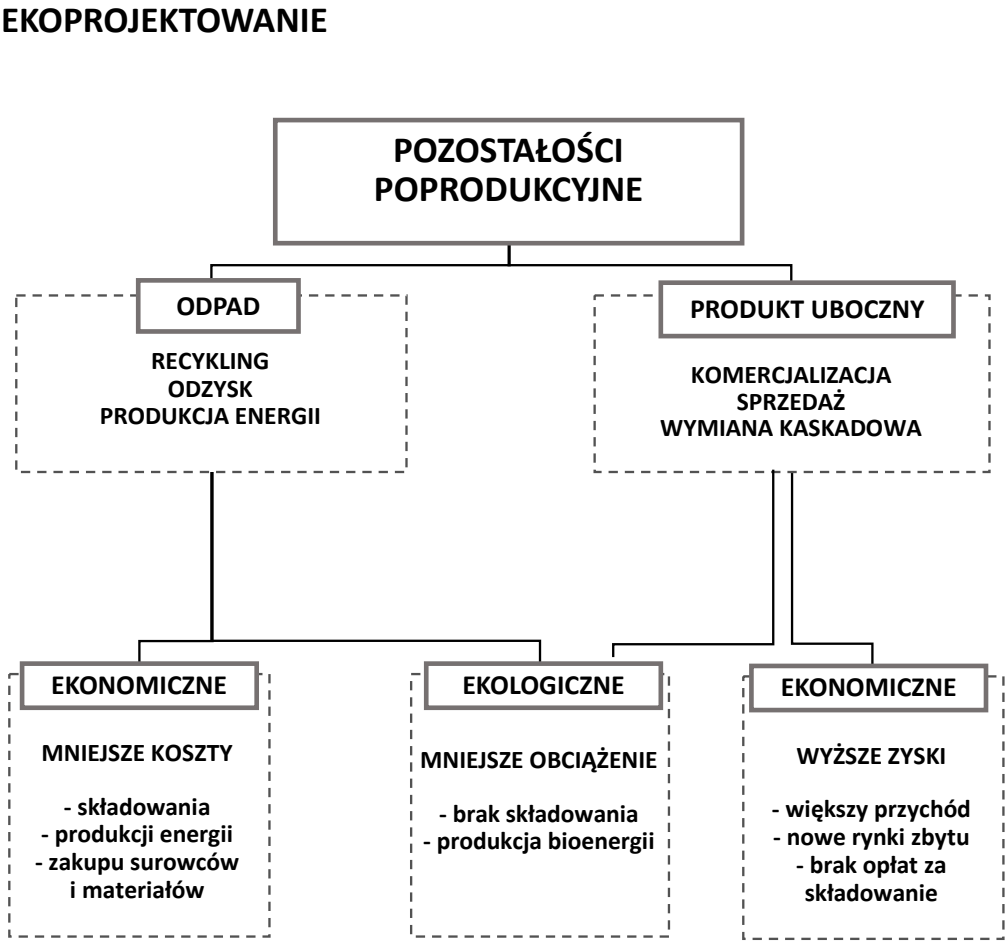
jest dostarczenie państwom członkowskim rozwiązań dla skutecznego zapobiegania nadmiernemu wytwarzaniu odpadów, ukazanie narzędzi służących ograniczaniu negatywnego wpływu pozostałości poprodukcyjnych na środowisko oraz sposobów efektywnego gospodarowania nimi (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2008/98/WE, 2008).

Idea „hierarchii postępowania z odpadami" bezpośrednio wskazuje listę priorytetów, którymi powinny kierować się państwa członkowskie podczas ustanawiania wewnętrznych wymogów przepisów prawa. Zgodnie z powyższym przepisy te powinny przede wszystkim obligować wytwórców i posiadaczy odpadów do zapobiegania powstawania pozostałości i kolejno do ograniczania ilości składowanej ich masy poprzez przygotowanie do ponownego użycia, recyklingu lub odzysku inną dopuszczoną metodą. Jednocześnie unieszkodliwianie lub składowanie traktować należy tylko jako procesy wspomagające. Dyrektywa dopuszcza w uzasadnionych przypadkach odstępstwa od powyższej reguły, zgodnie z zasadą prawa o ochronie środowiska, która zakłada, że każdorazowo należy zachować zrównoważone podejście, podparte wysokim stopniem ostrożności oraz uwzględniające całkowite efekty środowiskowe, gospodarcze i ekonomiczne, wykonalność techniczną oraz wpływ na zdrowie i życie obywateli. Pomocą dla organów zaradczych w egzekwowaniu założeń powyższej reguły priorytetów są natomiast dwie pozostałe zasady bazowe, które bezpośrednio nakładają na wytwórców i posiadaczy odpadów większą odpowiedzialność, w tym również finansową (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2008/98/WE, 2008).

Uzupełnieniem Dyrektywy 2008/98/WE oraz obowiązujących aktów powiązanych są dobrowolne inicjatywy, łączące aspekty środowiskowe, w tym gospodarkę odpadami z wymiernymi korzyściami ekonomicznymi uzyskiwanymi przez podmioty rynkowe. Są to m.in. ekoprojektowanie, najlepsze dostępne techniki BAT (ang. Best Available Techniques) oraz systemy zarządzania środowiskowego (m.in. ISO 14000 oraz EMAS).

Za jedno z najważniejszych narzędzi racjonalnej gospodarki odpadami uznaje się ekoprojektowanie. Podkreśla ono istotę „uzyskiwania lepszych efektów z mniejszej ilości zasobów" poprzez m.in. gospodarowanie w obiegu zamkniętym oraz maksymalny możliwy odzysk surowców i składników zawartych w pozostałościach, głównie w zakładzie macierzystym. Uwzględnienie już na etapie projektowania wyrobu miejsca i sposobu powtórnego wykorzystania generowanych podczas jego produkcji odpadów niesie szereg wymiernych korzyści ekologicznych i ekonomicznych (Rysunek 1). Co więcej, właśnie w ekoprojektowaniu Unia Europejska upatruje możliwości zredukowania łącznej masy

magazynowanych odpadów stałych do poziomu 10% oraz finalnie wprowadzenia zakazu składowania odpadów segregowanych i biodegradowalnych, a cel taki na najbliższą dekadę zawarto w pakiecie Komisji Europejskiej opublikowanym w 2015 (Komisja Wspólnoty Europejskiej, 2015).



Rysunek 1. Korzyści ekoprojektowania
Źródło: opracowanie własne

Konieczność włączenia aspektów środowiskowych w podstawowy zakres działalności organizacji oraz ujednolicenie obowiązujących zasad w tym obszarze, stało się podwaliną do stworzenia ram systemowego zarządzania środowiskowego, rozumianego jako element systemu zarządzania skupiający się na procesach użytkowania, ochrony i kształtowania środowiska (Matuszak-Flejszman, 2015). Podstawowym celem systemów środowiskowych jest dostarczanie realnych narzędzi ułatwiających organizacjom integrację wyników finansowych z ochroną środowiska. Co prawda początkowe etapy implementacji wymogów

wiążą się z poniesieniem relatywnie dużych nakładów czasu, pracy i pieniędzy oraz wymagają zaangażowania pracowników na różnych szczeblach, to jednak w miarę upływu czasu efekty dbałości o środowisko znajdują pozytywne odzwierciedlenie we wszystkich obszarach działalności tych podmiotów, w tym zarządzania, finansów oraz prawno-społecznych. Bardzo często również rzutuje to na poprawę wartości rynkowej przedsiębiorstwa, wzrost jego udziałów w rynku lub pozyskanie nowych kategorii odbiorców (Matuszak-Flejszman, 2015).

***

W Polsce szereg zmian dotyczących postępowania z odpadami został zapoczątkowany wraz z przystąpieniem do Unii Europejskiej. Wymusiło to na organach rządowych i samorządowych dostosowanie krajowych aktów prawnych do obowiązującego ustawodawstwa unijnego, a na przedsiębiorcach konieczność wprowadzenia zmian modernizujących technologię i organizację produkcji, jak również kompleksowe myślenie o wyrobie, uwzględniające cały jego cykl życia. Zgodnie z wytycznymi Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, krajowe instrumenty zarządzania środowiskowego mają charakter oddziaływania bezpośredniego (regulacje ustrojowe, problemowe i prawno-administracyjne) oraz pośredniego (instrumenty ekonomiczne, ekologiczna reforma podatkowa, instrumenty dobrowolnego stosowania oraz instrumenty oddziaływania społecznego) (Czyżyk i in., 2010). Niemniej podstawowymi krajowymi aktami prawnymi, normalizującymi zagadnienia gospodarki odpadami są: Ustawa o zmianie ustawy o odpadach oraz niektórych innych ustaw (Ustawa z dnia 24 listopada 2017 r., 2017) oraz ustawa Prawo ochrony środowiska (Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. nr 62 Prawo ochrony środowiska, 2017). Ich uzupełnieniem są natomiast m.in.: „Długookresowa Strategia Rozwoju Kraju – Polska 2030", „Trzecia fala nowoczesności", „Koncepcja Przestrzennego Zagospodarowania Kraju 2030" czy „Krajowy program zapobiegania powstawaniu odpadów". Ponadto, zgodnie z wymaganiami Dyrektywy 2008/98/WE cyklicznie przygotowywane są plany gospodarki odpadami, uwzględniające analizę aktualnej sytuacji w tym obszarze oraz prezentujące środki służące udoskonaleniu dotychczasowych działań w odniesieniu do danej kategorii odpadów. Najnowszy, przygotowany na lata 2016-2022 Krajowy plan gospodarki odpadami (Kpgo), zakłada m.in. utrzymanie masy składowanych odpadów biodegradowalnych innych niż komunalne na poziomie nie przekraczającym 40%, stopniowy spadek ich produkcji (w tempie około 1,5% rocznie) oraz wzrost ich zagospodarowania, recyklingu i odzysku. Wśród głównych priorytetów w Kpgo wyróżniono

natomiast dążenie do całkowitego zakazu składowania odpadów ulegających biodegradacji zgodnie z zasadą „zero odpadów dla Europy” (Uchwała nr 88 Rady Ministrów z dnia 1 lipca 2016 r., 2016).

***

Przedstawione w niniejszym rozdziale wymogi przepisów prawa mają za zadanie wymóc na podmiotach rynkowych uwzględnianie aspektów racjonalnej gospodarki odpadami, we wszystkich obszarach ich zasadniczej działalności. Podwaliną do stworzenia „społeczeństwa recyklingu”, w którym dominującymi zasadami będą „hierarchia postępowania z odpadami”, „gospodarka w obiegu zamkniętym” oraz dążenie do produkcji bezodpadowej, powinna być systematyczna edukacja, współpraca i zaangażowanie wszystkich zainteresowanych stron, w tym społeczeństwa, producentów oraz lokalnych władz. W efekcie, w myśl idei zrównoważonego rozwoju, poprawie powinna ulec jakość życia ludzkiego przy jednoczesnym wysokim stopniu zachowania zasobów naturalnych.

1.2. Odpady i produkty uboczne przemysłu spożywczego oraz sposoby ich zagospodarowania

Produkcja artykułów spożywczych dostarcza różnorodne pozostałości poprodukcyjne, często stanowiące bogate źródło węglowodanów, białek, lipidów oraz tzw. bioaktywnych substancji towarzyszących. Pozostałości te to przede wszystkim resztki surowcowe i materiałowe stanowiące produkty uboczne i odpady technologiczne, jak również inne elementy związane z użytkowaniem i zużywaniem się maszyn, urządzeń i zabudowań. Generowana ilość odpadów warunkowana jest aspektami technicznymi i technologicznymi produkcji oraz jej rozmiarem i intensywnością. Zależy ona również od stanu ekonomicznego przedsiębiorstwa i podejmowanych przez nie działań na rzecz ochrony środowiska (Czyżyk i Strzelczyk, 2015; Ravindran i Jaiswal, 2016).

Według danych GUS (2017a) krajowy sektor spożywczy w 2016 roku (produkcja artykułów spożywczych i napojów) wytworzył 3,62 mln ton odpadów poprodukcyjnych, co stanowiło 13,3% łącznej masy odpadów powstałych w wyniku produkcji przemysłowej oraz 2,8% łącznej masy zarejestrowanych odpadów w kraju. 84,2% tych pozostałości zostało poddane odzyskowi, 5,6% unieszkodliwiono, 5,3% przekazano innym odbiorcom, a 4,6% czasowo zmagazynowano (GUS, 2017a).

Wskaźniki wytwarzania odpadów różnicują podmioty gospodarcze, zarówno między- jak i wewnątrzbranżowo. Cechą wspólną pozostaje natomiast rodzaj pozostałości generowanych przez daną gałąź oraz stopień ich oddziaływania na ekosystemy. Zgodnie z danymi przedstawionymi w Tabeli 1 największa masa odpadów powstaje podczas przerobu mleka (nr 10.5 zgodnie z Polską Klasyfikacją Działalności (2007)) - 22,7% łącznej masy odpadów powstających w czasie produkcji artykułów spożywczych. Kolejne pozycje zajmują przedsiębiorstwa zajmujące się przerobem surowców pochodzenia zwierzęcego (10.1) - 14,4% oraz warzyw i owoców (10.3) - 14,3% (GUS, 2017a). W każdym przypadku są to przede wszystkim pozostałości organiczne o określonej wartości odżywczej, energetycznej oraz nawozowej, często charakteryzujące się wysokim biologicznym (BZT) lub chemicznym (ChZT) zapotrzebowaniem na tlen oraz niekorzystnym pH. Ulegają one szybkim procesom gnilnym a składowane stanowią zagrożenie ekologiczne oraz istotny czynnik ryzyka wystąpienia chorób epidemiologicznych (Zmudziński, 2012).

Tabela 1. Masa oraz sposób postępowania z odpadami w Polsce w zależności od kierunku działalności (w roku 2016 r.) (tys. ton)

Działy i grupy według PKD	Ogół	Poddane odzyskowi	Unieszkodliwione	Przekazane innym odbiorcom	Magazynowane czasowo
Ogół	**128306,9**	**63492,4**	**58979,6**	**3517,7**	**1821,9**
Sekcja C	**27195,9**	**18563,6**	**7133,1**	**759,5**	**739,2**
Dział 10	**2869,8**	**2352,2**	**199,5**	**151,5**	**166,6**
10.1	412,5	234,1	108,1	61,2	9,1
10.2	41,3	22,8	2,4	16,1	-
10.3	409,7	368,5	13,6	23,6	4,0
10.4	18,4	18,4	-	-	-
10.5	652,4	619,7	23,7	8,3	0,7
10.6	139,2	133,7	-	2,4	3,1
10.7	27,8	19,9	5,4	2,5	-
10.8	1120,3	900,3	37,9	32,4	149,7
10.9	48,2	34,8	8,4	5,0	-
Dział 11	**752,2**	**697,7**	**12,5**	**42,0**	**-**

Źródło: Ochrona środowiska, GUS 2017

Poniżej przedstawiono wybrane rodzaje odpadów powstających w poszczególnych branżach sektora spożywczego wraz z proponowanymi lub stosowanymi formami ich zagospodarowywania.

Zagospodarowanie odpadów powstających w branży mleczarskiej

Branża mleczarska stanowi jeden z filarów przemysłu spożywczego, co potwierdza zarówno skala jej działalności, jak również znaczący udział w łącznej produkcji pozostałości poprodukcyjnych (GUS, 2017a, 2017b). Pomimo tego, że szeroko rozumiane przetwórstwo mleka dostarcza przede wszystkim organicznych odpadów płynnych o złożonym składzie i silnie alkalicznym odczynie, w tym głównie wody technologicznej zanieczyszczonej maślanką, barwnikami i solami, wśród opadów wyodrębnić można również te o wartości dodanej. Dominuje wśród nich serwatka, charakteryzująca się stosunkowo niską trwałością oraz wysokim chemicznym zapotrzebowaniem na tlen. Stanowi ona 60-95% łącznej masy odpadów wytwarzanych podczas produkcji serów i kazeiny kwasowej. Ze względu na wartość odczynu, wyróżnia się serwatkę słodką (pH 6,2-6,5) i kwaśną (pH 4,1-4,2), w skład których wchodzą pełnowartościowe białko (np. β-laktoglobulina, α-laktoalbumina, laktoferyna) oraz laktoza, tłuszcz mleczny, substancje mineralne, witamina C i witaminy z grupy B (Mirabella, Castellani i Sala, 2014; Zmudziński, 2012). Według szacunkowych danych tylko w samej Unii Europejskiej w 2016 roku wyprodukowano ponad 4 mln ton suchej masy serwatki (European Dairy Association Economic Report 2017/18, 2018). W Polsce natomiast jest to corocznie około 2 mld litrów (Czyżyk i in., 2010). Skala produkcji oraz skład chemiczny serwatki zaowocowały stworzeniem odrębnej gałęzi zajmującej się jej przetwarzaniem i dostarczaniem na rynek, m.in. w postaci surowca wzbogacającego produkty spożywcze oraz jako podłoże do przeprowadzania fermentacji mlekowej (Zmudziński, 2012). Znalazła ona zastosowanie przy produkcji serów serwatkowych, mlecznych napojów fermentowanych oraz jako dodatek spożywczy o właściwościach zagęszczających i emulgujących. Co więcej, otrzymywane są z niej izolaty i koncentraty białek, wykorzystywane w preparatach przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci oraz w środkach wspomagających rozbudowę masy mięśniowej u osób aktywnych fizycznie. Uprzednio zagęszczona i sproszkowana stanowi dodatek funkcjonalny w produktach przemysłu piekarskiego i cukierniczego. Ponadto, serwatka może być substratem do otrzymywania żywic i polimerów kazeinowych oraz pośrednio służyć do produkcji biodegradowalnych polimerów na bazie kwasu mlekowego. Podejmowane są również próby zastosowania jej jako naturalnego środka dezynfekującego m.in. liście sałaty lub marchew (Mirabella i in., 2014). Zgodnie z zalecaniami Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi najbardziej racjonalnym i uzasadnionym z punktu widzenia ekonomicznego sposobem

wykorzystania serwatki jest jej kompleksowe przetwarzanie w miejscu powstawania, poprzez odzyskiwanie najważniejszych składników odżywczych, a następnie produkcję biogazu zużywanego na potrzeby energetyczne zakładu macierzystego (Czyżyk i in., 2010). Działaniem jednoznacznie zabronionym jest natomiast łączenie jej ze ściekami i rozlewanie na polach (Zmudziński, 2012). Obok serwatki drugim powszechnie wykorzystywanym produktem ubocznym branży mleczarskiej jest generowana podczas produkcji masła, maślanka, w której skład wchodzi głównie woda (91-92%) oraz laktoza (3,8-4%), związki azotowe (3,0-3,4%) i tłuszcz (0,1-1,0%). Produkt ten stosowany jest przede wszystkim przy produkcji maślanki spożywczej oraz serów prasowanych trzeciego gatunku (Czyżyk i Strzelczyk, 2015).

Zagospodarowanie odpadów powstających w branży cukrowniczej

Przemysł cukrowniczy od lat osiąga jedne z najwyższych wskaźników wytwarzania pozostałości poprodukcyjnych w kraju (GUS, 2017a). Odpady i produkty uboczne ze względu na kampanijny charakter produkcji występują sezonowo i stanowią 20-40% ogólnej masy przetwarzanych buraków cukrowych. Są to przede wszystkim odpadowa masa roślinna, błoto spławiakowe, szlamy defekosaturacyjne oraz wysłodki buraczane i melasa. Wszystkie one mogą być wykorzystane w rolnictwie jako składniki pasz treściwych oraz naturalne nawozy. Na melasie, składającej się w 80% z suchej masy, bazuje blisko 20% krajowej produkcji alkoholu etylowego. Co więcej, jest ona produktem notowanym na giełdzie towarowej i stanowi substrat do produkcji kwasu mlekowego, cytrynowego, drożdży piekarskich oraz biogazu. Do produkcji bioetanolu i biogazu a dodatkowo również pektyn, preparatów wysokobłonnikowych, kwasu galakturonowego i ferulowego przeznaczane są także wysłodki buraczane, charakteryzujące się wysoką zawartością celulozy (20-30% s.m.), hemicelulozy (22-30% s.m.), pektyn (24-32% s.m.) i lignin (1-8% s.m.). Stosuje się je również jako mikrowypełniacze papieru i tektury oraz absorbent służący usuwaniu barwników i metali ciężkich z roztworów wodnych. Równocześnie uznawane są one za surowiec wysokoenergetyczny, którego wartość opałowa, w zależności od stopnia wysuszenia, wynosi 14-17 MJ/kg (Kryvoruchko, Andrea Machmüller, Amon i Amon, 2009; Majoch i Jabłońska, 2013).

Zagospodarowanie odpadów powstających w branży owocowo-warzywnej

Odpady stałe przemysłu owocowo-warzywnego stanowią około 20% całkowitej masy przetwarzanych surowców. Są to zarówno pozostałości o cechach produktów ubocznych (wytłoki, młóto, pestki oraz skórki), jak i odpadowa masa roślinna pozostała z czyszczenia i segregacji surowca (Łaba, 2012).

Złożony skład chemiczny większości produktów ubocznych pochodzących z przetwórstwa owoców jest ich dużą zaletą, równocześnie jednak warunkuje on ich niską trwałość i w konsekwencji znacząco ogranicza przydatność przetwórczą. Składowane ulegają bowiem szybkim procesom fermentacji i pleśnienia, stając się tym samym źródłem nieprzyjemnych zapachów oraz poważnym zagrożeniem epidemiologicznym. Wymagane jest zatem ich szybkie wykorzystanie lub utrwalenie w wyniku suszenia termicznego lub zakiszenia (Czyżyk i in., 2010; Hamalo Okino Delgado i Francisco Fleuri, 2016). Obecnie jednym z podstawowych kierunków zagospodarowania wytłoków, skórek oraz młóta jest skarmianie nimi zwierząt hodowlanych. Ich dodatek pozytywnie modyfikuje walory odżywcze mieszanek paszowych gwarantując równocześnie lepsze efekty hodowlane (Kumar Sharma, Bansal, Mangal, Kumar Dixit, Gupta i Mangal, 2015). Ponadto, skórki oraz wytłoki stanowią źródło szeregu substancji bioaktywnych, m.in. karotenoidów, związków fenolowych czy kwasu askorbinowego, które można w prosty sposób wyizolować i wykorzystywać w produktach spożywczych i przemysłowych. Są one również niedrogim substratem do produkcji wyrobów winiarskich, preparatów błonnikowych i pektynowych, herbat owocowych, octu winnego oraz substancji wypełniających w pieczywie i suplementach diety (Kumar Sharma, i in., 2015; Mirabella i in., 2014; Uthumporn, Woo, Tajul i Fazilah, 2015). Udowodniono, że włączenie wytłoków owocowych do podstawowego składu produktów piekarskich, cukierniczych czy mleczarskich korzystnie modyfikuje ich funkcje technologiczne i odżywcze. Lepsze właściwości reologiczne ciasta, wyższą stabilność emulsji wodno-tłuszczowych oraz wyższą wartość odżywczą i potencjał antyoksydacyjny w stosunku do produktów konwencjonalnych stwierdzono m.in. w chlebie, babeczkach, makaronach, naleśnikach, batonach, ciastkach, jogurtach, majonezach oraz sosach przygotowanych na bazie jogurtów, w których zastosowano wybrane wytłoki owocowe (Gómez i Martínez, 2017; Górecka, Pachołek i Dziedzic, 2010; Hamalo Okino Delgado i Francisco Fleuri, 2016; Tseng i Zhao, 2013). Co więcej, wytłoki i skórki wykazują silne właściwości sorpcyjne w stosunku do tłuszczów oraz metali ciężkich, przez co trwają próby

zastosowania ich jako naturalnych biosorbentów służących oczyszczaniu wód (Jain, 2015). Pozostające po produkcji przecierów owocowych młóto przeznaczane jest na produkcję marmolad oraz powideł (Łaba, 2012). Szerokie zastosowanie znalazły również pestki owoców jagodowych oraz pestkowych, z których m.in. produkowane są oleje tłoczone na zimno o korzystnym składzie frakcji tłuszczowej z wysokim udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych, tokoferoli i steroli (Kumar Sharma i in., 2015). Udowodniono również, że wysoki potencjał antyoksydacyjny pestek owocowych może być wykorzystany m.in. w stabilizacji produktów wysokotłuszczowych (Małecka, Rudzińska, Pachołek i Wąsowicz, 2003; Pachołek i Małecka, 2010). Miazga uzyskana z obłuszczonych i odgoryczonych jąder pestek moreli lub brzoskwini stanowi bazę masy percepanowej (Łaba, 2012). Z kolei pestki przerobione na pył wykorzystywane są jako wypełniacze do klejów meblarskich oraz surowiec do produkcji węgla aktywowanego. Otrzymuje się z nich również benzaldehyd, czyściwa polernicze, dodatki do kremów peelingujących oraz wypełniacze poduszek rehabilitacyjnych i materaców. Potencjał produktów ubocznych z przetwórstwa owoców wykorzystywany jest również przez przemysł biotechnologiczny, m.in. do produkcji biogazu oraz pożywek mikrobiologicznych stosowanych przy produkcji enzymów, antybiotyków, etanolu i kwasów organicznych (Dhillon, Kaur i Brar, 2013; Lai, Khing, Lim, Hee i Sim, 2017).

Pozostałości przemysłu warzywnego w porównaniu do odpadów owocowych charakteryzują się znacznie wyższą trwałością oraz podatnością na procesy utrwalania. Obecnie większość z nich znalazła zastosowanie jako naturalne nawozy kompostowe oraz kiszonki paszowe, przy czym ze względu na skład, w tym wysoką zawartośc białka szczególnie pożądane są odpady roślin strączkowych (łupiny oraz zielone części roślin), jak również pozostałości z przerobu ziemniaków i roślin krzyżowych. Ponadto z odpadów warzywnych produkowane są biogaz oraz furfural – surowiec niszowy, wykorzystywany przede wszystkim przez przemysł farmaceutyczny, naftowy, chemiczny oraz branżę budowlaną (Czyżyk i Strzelczyk, 2015). Na szczególną uwagę zasługują produkty uboczne pochodzące z przetwórstwa pomidorów, co warunkowane jest zarówno skalą przerobu surowca (obok ziemniaków są najczęściej uprawianym i przetwarzanym warzywem na świecie), jak i składem chemicznym. Pomidory są istotnym źródłem karotenoidów, tokoferoli, steroli oraz związków fenolowych izolowanych z odpadów m.in. przy użyciu niedrogich metod enzymatycznych lub ekstrakcji w stanie nadkrytycznym (Papaioannou i Karabelas, 2012; Strati i Oreopoulou, 2011). Wytłoki pomidorowe mogą być stosowane jako dodatki funkcjonalne, w tym wydłużające

trwałość takich produktów spożywczych jak preparaty błonnikowe, wyroby piekarskie, odżywki dla dzieci i odtłuszczone mleka w proszku (Gómez i Martinez, 2017; Ingle i Nawkar, 2016; Uthumporn i in., 2015). Co więcej, na szeroką skalę odzyskiwana jest z nich tomatyna – związek stanowiący substrat do przemysłowej syntezy hormonów sterydowych. Młóto z przerobu pomidorów służy do produkcji oleju tłoczonego na zimno, wykorzystywanego przez przemysł kosmetyczny (Łaba, 2012).

Zagospodarowanie odpadów powstających w branży gorzelniczej i piwowarskiej

Podstawowa działalność słodowni, browarów oraz gorzelni opiera się na przetwórstwie zbóż i ziemniaków. Stosowane procesy produkcyjne dostarczają zanieczyszczeń mineralnych, pozostałości roślinnych oraz produktów ubocznych, takich jak brzeczka czy młóto pofiltracyjne. Obecnie odpady mineralne kierowane są na specjalne składowiska lub wykorzystywane do wypełniania zagłębień terenu. Kiełki słodowe stanowią surowiec w przemyśle farmaceutycznym do produkcji pożywek hodowlanych, aminokwasów oraz preparatów enzymatycznych. Uprzednio zakiszone i poddane granulacji wywary gorzelnicze, młóto oraz biomasa roślinna stosowane są jako pasze przeznaczone dla drobiu i innego ptactwa (Czyżyk i Strzelczyk, 2015). Pozostającą po filtracji piwa ziemię okrzemkową wykorzystuje się natomiast przy oczyszczaniu osadów ściekowych oraz do produkcji materiałów budowlanych. Ponadto jej spalanie w temperaturze 750°C pozwala na odzysk energii wykorzystywanej następnie na potrzeby zakładu produkcyjnego (Czyżyk i in., 2010).

Zagospodarowanie odpadów powstających w branży mięsnej

Krajowy przemysł mięsny rocznie generuje ponad 4 mln ton odpadów, o blisko 80-procentowym udziale związków organicznych, w tym lotnych związków odorotwórczych. Co więcej, pozostałości te ze względu na swoją specyfikę i niską trwałość stanowią poważne zagrożenie bakteriologiczne i w konsekwencji uznawane są za najbardziej niebezpieczne dla łańcucha żywnościowego i paszowego oraz środowiska (Wojdalski i in., 2015). Wszystko to w połączeniu z wysokim ryzykiem nieprawidłowego składowania wymusza konieczność jak najszybszej ich utylizacji lub przekształcenia, głównie w wysokoenergetycznych procesach termicznych. Zaleca się jednak, aby powstające produkty uboczne, o ile spełniają wymagania prawa, w tym Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia

21 października 2009 r. o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego oraz Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 183/2005 z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiającego wymagania dotyczące higieny pasz, były wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, spożywczym i paszowym (Majoch i Jabłońska, 2013; Sobczak i Błyszczek, 2009). Na mocy rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 produkty uboczne branży mięsnej podzielono na trzy kategorie, przy czym za najbardziej niebezpieczną uznaje się kategorię 1, do której zaliczono około 7% odpadów pochodzących od zwierząt chorych, w tym podejrzanych o choroby zakaźne oraz od zwierząt dzikożyjących i cyrkowych (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009, 2009). W normalnych warunkach przetwórczych i ubojowych 80% odpadów sklasyfikowanych jest jednak w grupie 3, w której z kolei dominują odpady rzeźne (37%) zagospodarowywane przez przemysł chemiczny, odzieżowy i ceramiczny, rzadziej w przemyśle spożywczym (Sobczak i Błyszczek, 2009). Przez wiele lat krew oraz tkanki miękkie stanowiły główny surowiec do produkcji wysokobiałkowej mączki mięsno-kostnej, służącej skarmianiu zwierząt. Czynności te zostały jednak zakazane, ze względu na wysokie ryzyko rozprzestrzeniania się zakażeń prionami (BSE). W konsekwencji mączka, o wartości opałowej 15,2 MJ/kg, służy obecnie wytwarzaniu energii wykorzystywanej następnie w procesach technologicznych zakładu macierzystego. Ponadto, wchodzi ona w skład ceramiki użytkowej, stanowi substrat do produkcji kwasu fosforowego i nawozów fosforowych oraz pozyskiwany jest z niej hydroksyapatyt, stosowany m.in. w chirurgii kostnej (Sobczak i Błyszczek, 2009; Wojdalski i in., 2015). Pozostałe produkty uboczne generowane podczas przerobu zwierzyny, wykorzystuje się m.in. do produkcji żelatyny, aminokwasów, osłonek wędliniarskich czy nici chirurgicznych (elementy niegarbarskie skóry) oraz materiałów filcowych i tapicerskich, szczotek i pędzli (elementy garbarskie). Odpowiednio przerobione treści żołądków i jelit stanowią natomiast składnik użyźniających nawozów organiczno-wapiennych (Mirabella i in., 2014; Wojdalski i in., 2015). Produkty uboczne przerobu tłuszczów zwierzęcych, w tym gęstwa skwarkowa oraz tłuszcze odpadowe spełniające wymagania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 183/2005 oraz nr 1069/2009, wykorzystywane są jako wysokoenergetyczne dodatki do mieszanek paszowych. Dodatkowo tłuszcze odpadowe mogą być przeznaczone do produkcji mydeł, kosmetyków oraz stosowane jako dodatek do oleju opałowego (Czyżyk i Strzelczyk, 2015; Majoch i Jabłońska, 2013). Głównie jednak, ze względu

na wysoką wartość opałową oraz niskie koszty pozyskania, wykorzystywane są do produkcji biopaliw i energii (Mata, Cardoso, Ornelas, Neves i Caetano, 2011).

***

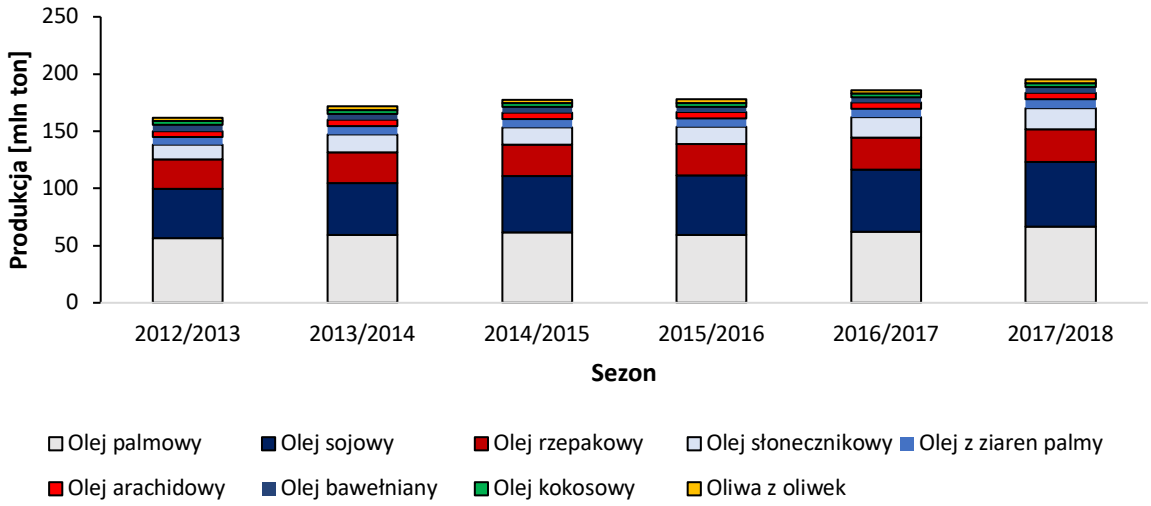
Oprócz pozostałości poprodukcyjnych charakterystycznych dla danej branży, w zakładach przetwórstwa spożywczego wytwarzane są odpady będące skutkiem eksploatacji urządzeń, maszyn, budynków, a także pozostałości opakowaniowe. Te obojętne, jak gruz, żużel, odpady papiernicze, popiół czy szkło zaleca się wykorzystywać na potrzeby zakładu lub poddawać odzyskowi i procesom recyklingu. Odpady niebezpieczne powinny być natomiast przekazywane specjalnym jednostkom, odpowiednio przystosowanym do prowadzenia ich zbiórki, odzysku lub unieszkodliwiania.

Obecnie pozostałości poprodukcyjne sektora spożywczego wykorzystywane są przede wszystkim jako substraty w wybranych procesach biotechnologicznych oraz surowce do produkcji nawozów i pasz. Jednocześnie niewielki udział w ich zagospodarowaniu ma wciąż przemysł spożywczy. Wydaje się jednak, że systematycznie ewoluujące regulacje prawne z zakresu ochrony środowiska będą wymuszać na podmiotach sektora żywnościowego modyfikacje ich zaplecza surowcowego i technologicznego pod kątem zagospodarowania tworzonych przez nie odpadów.

1.3. Wybrane odpady i produkty uboczne przemysłu olejarskiego

Podstawowy zakres działalności przemysłu olejarskiego obejmuje wytwarzanie olejów technicznych i jadalnych oraz ich pochodnych, w oparciu o szeroko rozumiane przetwórstwo surowców oleistych. Za surowce te przyjęło się traktować wybrane części morfologiczne rośliny, w których udział tłuszczu w suchej masie wynosi przynajmniej 15%. Są to przede wszystkim nasiona (rzepaku, lnu, maku, ogórecznika i rokitnika), pestki (dyni, czarnej porzeczki, winogrona), owoce (drzewa oliwnego i palmowego, awokado), kiełki i zarodki (pszenicy i ryżu) oraz orzechy (włoskie, laskowe i pistacje) (Wroniak i Rękas, 2016). Przemysł olejarski od lat zajmuje ugruntowaną pozycję w światowej gospodarce, przy czym jego cechą charakterystyczną jest faworyzowanie lokalnych rynków zbytu oraz specyficzna wrażliwość na zmiany popytu i podaży, w tym niska elastyczność cenowa. Siłą napędową, odzwierciedlaną w systematycznym wzroście globalnej produkcji, są jednocześnie wzmożony popyt na oleje jadalne oraz rozwój przemysłu biopaliw. Dodatkowo, coraz większy udział w rozwoju tego

sektora ma wzrost zapotrzebowania na izolaty i hydrolizaty białkowe, wytwarzane na bazie wytłoków (lub inaczej makuchów – pozostałość po procesie tłoczenia) i śruty poekstrakcyjnej (produkt uboczny powstający w czasie ekstrakcji tłuszczu) (Chibowski i in., 2016; FEDOIL, 2018; Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju/Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa [OECD/FAO], 2016). Światowa produkcja roślin oleistych i ich przetworów wykazuje wieloletni trend wzrostowy z niewielkimi wahaniami uzależnionymi głównie od warunków pogodowych (Szajner, 2015). Na przestrzeni ostatnich 10 lat łączna wielkość produkcji olejów z dziewięciu najpopularniejszych surowców (owoc palmowy, nasiona soi, rzepaku, słonecznika, ziarno palmowe, orzech ziemny, bawełna, kokos i oliwka) wzrosła blisko o 80% osiągając w sezonie 2016/2017 poziom 185,7 mln ton, o ponad 4% wyższy niż w sezonie poprzedzającym. Co więcej, na nadchodzące lata wciąż prognozowana jest ekspansja produkcji do poziomu 195,1 mln ton w sezonie 2017/2018 oraz przekroczenie masy 200,0 mln ton w roku 2023. W globalnej strukturze produkcji olejów dominują kolejno olej palmowy (35%) i sojowy (27%), a następnie rzepakowy (15%), słonecznikowy (9%), z ziaren palmowych, bawełniany, arachidowy, kokosowy i oliwa (Rysunek 2) (Statista, 2018a). Systematycznie wzrasta również zużycie olejów, w tym ich światowa konsumpcja, dla której tylko w przeciągu minionej dekady odnotowano 76-procentowy wzrost (Statista, 2018b).



Rysunek 2. Światowa wielkość produkcji wybranych olejów jadalnych
Źródło: Statista, 2018a

W Polsce przetwórstwo surowców oleistych stanowi jedną z najbardziej dochodowych branż sektora spożywczego, o potencjale przetwórczym zbliżonym do wysokorozwiniętych krajów Zachodu. Średnia wartość produkcji sprzedanej od dekady utrzymuje się na stabilnym

poziomie 3,4 mld zł rocznie (GUS, 2017b), a największe zmiany dokonują się w obszarze asortymentowym. Obserwowany jest wzmożony rozwój rynku olejów tłoczonych na zimno, produkowanych z surowców tradycyjnych (rzepaku, siemienia lnianego, pestek dyni, nasion wiesiołka i czarnuszki, orzechów włoskich i laskowych), jak również mniej konwencjonalnych (pestek arbuza, moreli, wiśni oraz ogórecznika, oregano, ziaren amarantusa, nasion chia i gorczycy, krokosza barwierskiego, lnianki siewnej, rokitnika czy ostropestu) (Chibowski i in., 2016; Wroniak i Rękas, 2016). Bezzmiennie jednak surowcem bazowym są nasiona rzepaku, którego zasiewy stanowią ponad 95% powierzchni upraw wszystkich roślin oleistych w Polsce (GUS, 2018), którego coroczne zbiory utrzymują się na stabilnym poziomie ok. 2 mln ton (GUS, 2017c). Na tle pozostałych branż sektora spożywczego krajowy przemysł olejarski jest w pełni sprywatyzowany, silnie skoncentrowany i oligopolistyczny, o ugruntowanej pozycji trzech głównych przedsiębiorstw mających blisko 60-procentowy udział w łącznej produkcji branży oraz 70-procentowy w zatrudnieniu (Mroczek, 2014). Głównym odbiorcą wyprodukowanych towarów jest rynek wewnętrzny, przy czym wielkość eksportu systematycznie wzrasta i tak z 5% w roku 2002 osiągnęła poziom równy blisko 37% w roku 2016 (GUS, 2017b). Silna współpraca krajowych przedsiębiorstw sektora olejarskiego zaowocowała porozumieniem powołującym Polskie Stowarzyszenie Producentów Olejów (PSPO), do którego zadań należą przede wszystkim: ustanawianie i rozpowszechnianie jednolitych standardów jakościowych dla roślin oleistych, olejów, śruty poekstrakcyjnej oraz wytłoków. Co więcej, jego członkowie starają się systematycznie zwiększać świadomość konsumentów dotyczącą wysokiej wartości odżywczej makuchów (PSPO, 2017).

1.3.1. Proces produkcji olejów jadalnych w kontekście generowanych odpadów i produktów ubocznych

Oleje roślinne, zgodnie z definicją Kodeksu Żywnościowego, to niezmienione pod względem pierwotnego charakteru tłuszcze wyodrębniane z surowca metodami mechanicznymi lub ekstrakcyjnymi z ewentualnym wykorzystaniem podwyższonej temperatury (Codex Standard 19-1981, 2017). W Polsce produkowane są oleje rafinowane i tłoczone na zimno, przy czym oleje rafinowane mogą być z pierwszego tłoczenia lub powstawać dwuetapowo przez wstępne tłoczenie na gorąco, a następnie ekstrakcję tłuszczu resztkowego z makuchu rozpuszczalnikiem organicznym (Kochhar, 2017).

Większość obecnie dostępnych na rynku olejów jadalnych powstaje w wyniku procesu tłoczenia, czyli mechanicznego wyciskania tłuszczu z wybranej części morfologicznej rośliny oleistej, poprzez zastosowanie siły nacisku lub siły ścinającej, a proces może przebiegać w temperaturach nieprzekraczających 50°C (tłoczenie na zimno) lub wyższych, zwykle powyżej 80°C (tłoczenie na gorąco) (Shim, Gui, Wang i Reaney, 2015). Tłoczenie najczęściej poprzedzane jest płatkowaniem i kondycjonowaniem surowca np. poprzez jego prażenie. W efekcie uzyskuje się wyższą wydajność technologiczną procesu oraz wzrost wydobycia substancji towarzyszących, które mogą podnosić (tokoferole, sterole, karotenoidy oraz produkty nieenzymatycznego brunatnienia) lub ograniczać (chlorofile, związki siarkowe i fosfolipidy) stabilność oksydacyjną oleju. Dodatkowo, wstępna obróbka termiczna surowca zwykle skutkuje otrzymaniem oleju o wyższej jakości organoleptycznej i mikrobiologicznej m.in. dzięki uwolnieniu związków lotnych, zniszczeniu ewentualnych drobnoustrojów patogennych oraz inaktywacji natywnych enzymów surowca (Rękas, Siger, Wronika, Ścibisz, Derewiaka i Anders, 2017; Shim i in. 2015). Większy odzysk tłuszczu z surowca jest możliwy również dzięki zastosowaniu dodatkowej siły mechanicznej, dłuższego czasu tłoczenia lub tłoczenia dwuetapowego. Po tłoczeniu na zimno olej oczyszczany jest przez przemywanie wodą, filtrowanie lub wirowanie, a następnie konfekcjonowany, natomiast produkt tłoczenia na gorąco kierowany do dalszych procesów (Codex Standard, 2017). Na etapie tłoczenia obok oleju powstają wytłoki oraz zanieczyszczenia roślinne i szlamy. Zaleca się, aby odpady pochodzące z segregacji i czyszczenia surowca były wywożone i zaorywane na polach, kompostowane z innymi pozostałościami roślinnymi lub wykorzystywane jako bezpośrednie nawozy. Wytłoki natomiast, o ile jest to możliwe, powinny być traktowane jako produkty uboczne i dalej zagospodarowywane (Czyżyk i in., 2010).

Praktyka wskazuje, że makuchy o zawartości tłuszczu resztkowego wahającej się w przedziale 20-60% powinny być poddawane dalszej, najczęściej wieloetapowej ekstrakcji niskotoksycznym rozpuszczalnikiem organicznym (heksanem) (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/32/WE, 2009; Vaisali, Charanyaa, Belur i Regupathi, 2014). Proces ten prowadzony jest w przeciwprądzie i podwyższonej temperaturze, do momentu maksymalnego możliwego odzysku tłuszczu z materiału. Produktem głównym procesu ekstrakcji jest miscela, czyli mieszanina oleju oraz rozpuszczalnika, frakcjonowana na drodze filtracji i destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Odzyskany olej ekstrakcyjny łączony jest z olejem otrzymanym w wyniku tłoczenia na gorąco dając tzw. olej surowy. Heksan natomiast

zawracany jest ponownie do procesu ekstrakcji (FEDOIL, 2018; Shim i in., 2015). Ze względu na obecność w olejach surowych śladowych ilości zanieczyszczeń, fosfolipidów, białek, metali ciężkich, barwników, wosków, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), pozostałości pestycydów oraz produktów utleniania kwasów tłuszczowych, poddawane są one obowiązkowej rafinacji (Vaisali i in., 2014). Proces ten finalnie gwarantuje otrzymanie produktu o neutralnych cechach organoleptycznych, wysokiej przydatności technologicznej oraz stabilnego wobec procesów hydrolitycznych i oksydacyjnych (Shim i in., 2015). Obecnie rafinacja jest procesem o coraz większej selektywności, co bezpośrednio rzutuje na zmniejszenie strat składników pożądanych, takich jak tokoferole, sterole i karotenoidy (straty wynoszą około 10-15%). Zwyczajowo wyodrębnia się cztery podstawowe etapy rafinacji (FEDIOL, 2018; Kochhar, 2017;):

- odśluzowanie – usuwanie przy pomocy kwasu fosforowego lub cytrynowego pozostałości śluzów, białek, fosfolipidów i metali ciężkich;
- odkwaszenie – usuwanie wolnych kwasów tłuszczowych, związków fosforowych, metal ciężkich oraz nieznacznej ilości barwników przy użyciu ługu sodowego;
- bielenie – usuwanie na ziemi bielącej, tlenku glinu lub węglu aktywnym pozostałej część barwników, w tym głównie chlorofilowych;
- odwanianie (deodoryzacja) – usuwanie z produktu lotnych związków zapachowych, w tym głównie aldehydów i ketonów, w procesie destylacji prowadzonej w bardzo wysokiej temperaturze, dochodzącej do 220°C i wysokiej próżni, gwarantującej ochronę rafinowanego oleju przed procesami utleniania.

Niektóre oleje, w tym słonecznikowy i kukurydziany dodatkowo poddawane są winteryzacji (wymrażaniu), czyli stopniowemu schładzaniu oleju do najniższej temperatury, w której może być on przechowywany (4°C). Zabieg, na skutek wytrącenia kryształów triacylogliceroli i oddzielenia ich od frakcji płynnej poprzez filtrację, zapobiega mętnieniu gotowego wyrobu w czasie jego przechowywania chłodniczego (Wang, 2013; Vaisali i in., 2014).

Biorąc pod uwagę wszystkie etapy produkcji olejów, największa ilość odpadów generowana jest podczas kolejnych faz rafinacji. Wśród odpadów tych są przede wszystkim (Vaisali i in., 2014):

- woda technologiczna;

- szlamy pohydratacyjne - stanowiące surowiec do odzysku fosfolipidów, w tym lecytyny spożywczej;
- zaolejona ziemia bieląca - uznawana za najbardziej niebezpieczny dla środowiska odpad, który powinien być natychmiastowo unieszkodliwiany lub regenerowany metodami termicznymi. Równocześnie jednoznacznie zabrania się wypełniania nią wyrobisk i zagłębień terenu.

Oprócz wymienionych powyżej pozostałości poprodukcyjnych w branży tej występują również produkty uboczne o wartości dodanej, takie jak makuchy, śruta poekstrakcyjna oraz glicerol, charakteryzujące się wysokim potencjałem przetwórczym. Gliceryna destylowana wykorzystywana jest m.in. przy produkcji lakierów, farb, rozpuszczalników, produktów chemii gospodarczej oraz materiałów wybuchowych. Glicerynę techniczną o wysokiej wartości opałowej (18,6-25,2 $MJ \cdot kg^{-1}$) przeznacza się natomiast na produkcję energii (Vaisali i in., 2014).

Proponowane sposoby zagospodarowania wytłoków oraz śruty poekstrakcyjnej zostaną szczegółowo omówione w kolejnym podrozdziale.

1.3.2. Wytłoki roślin oleistych

Pogłębienie wiedzy na temat roli tłuszczów w codziennej diecie człowieka oraz związane z tym zmiany preferencji żywieniowych konsumentów, stały się siłą napędową do rozwoju nowych kategorii wyrobów olejarskich, jak również modyfikacji technologii ich wytwarzania (Szajner, 2015). Od blisko dekady swoją pozycję na rynku ugruntowują margaryny funkcjonalne oraz oleje tłoczone na zimno. Co więcej, w ostatnich latach rozszerzeniu uległa baza surowcowa, przy czym na szczególnym znaczeniu zyskały części roślin oleistych o korzystnym składzie frakcji tłuszczowej, takie jak orzechy włoskie. To konsekwentne podążanie branży olejarskiej za oczekiwaniami konsumentów znajduje odzwierciedlenie w stałym wzroście wielkości produkcji olejów, i co z tym związane, masy generowanych odpadów, które według najnowszych wymogów powinny być racjonalnie zagospodarowywane poprzez tworzenie z nich wartości dodanej (OECD/FAO, 2016). Obecnie światowe zasoby śruty i makuchów są w blisko 97% zużywane. W Polsce jest to ok. 70%, z czego ponad 60% przeznaczanych jest na cele paszowe, 7% trafia do obrotu (handel zagraniczny) oraz 6% przetwarzane jest na energię (PSPO, 2017; Szajner, 2015).

W sezonie 2014/2015 światowy przemysł olejarski wyprodukował 279 mln ton śruty i makuchów, notując przy tym 57-procentowy wzrost w stosunku do lat 2000-2004. Prognozy zakładają, że do roku 2024 łączna wielkość produkcji tych produktów ubocznych osiągnie poziom 355 mln ton (Statista, 2018; Szajner, 2015). Jednocześnie jednak według danych OECD/FAO (2016) w nadchodzącej dekadzie należy spodziewać się nieznacznego spadku zainteresowania przemysłu paszowego śrutą oraz makuchami, w wyniku zmniejszającego się popytu na mięso i jego przetwory oraz postępującej poprawy wydajności produkcji zwierzęcej w krajach rozwiniętych. Dodatkowo zahamowaniu może ulec światowy handel tymi surowcami, jako konsekwencja zwiększenia ich wykorzystania w krajach producenckich. Na przestrzeni ostatnich 15 lat (2000-2015) największy wzrost produkcji odnotowano dla śruty i wytłoków palmowych (108%), rzepakowych (90%), słonecznikowych (67%) i sojowych (54%). W obrocie rynkowym dominują jednak kolejno odpady pochodzące z przerobu nasion soi (65%), rzepaku (13%), bawełny (6%) i słonecznika (5%) (Szajner, 2015). Największymi producentami niezmiennie są Chiny oraz Stany Zjednoczone, których łączny udział w światowej produkcji w sezonie 2014/2015 wyniósł 41%. Przy tym USA, obok Argentyny i Brazylii, są jednym z największych światowych eksporterów, natomiast blisko 30% łącznej ilości śruty i makuchów dostępnych na międzynarodowym rynku jest importowana przez kraje członkowskie Unii Europejskiej (OECD/FAO, 2016).

Wartość odżywcza wytłoków roślin oleistych

Możliwość i kierunki zagospodarowania wytłoków roślin oleistych determinowane są ich jakością, która z kolei zależy od czynników środowiskowych, w tym rodzaju surowca wyjściowego i warunków jego uprawy oraz technologicznych (technika i parametry procesu tłoczenia) (Ramachandran, Singh, Larroche, Soccol i Pandey, 2007). Wpływ powyższych czynników nabiera szczególnego znaczenia podczas analizy wartości odżywczej poszczególnych makuchów, co obrazują dostępne, bardzo często różniące się, dane literaturowe. Jedną z cech wspólnych wytłoków roślin oleistych jest ich niska wilgotność zawierająca się w przedziale 4-8%, co bezpośrednio przekłada się na ich stosunkowo wysoką stabilność mikrobiologiczną (Cozea, Ionescu, Popescu, Neagu, Gruia, 2016). Jest to niewątpliwie znacząca przewaga makuchów oleistych nad nietrwałymi wytłokami przemysłu owocowo-warzywnego. Kolejną z zalet omawianych produktów ubocznych jest ich złożony

skład chemiczny, w którym występują składniki o charakterze odżywczym oraz związki bioaktywne. Średnio wytłoki roślin oleistych zawierają od 2% do nawet 50% białka oraz od 2% do 20% błonnika pokarmowego, a ilość tych składników bezpośrednio wynika z rodzaju surowca wyjściowego. Najbardziej zasobne w białko są makuchy z orzechów włoskich, sojowe, sezamowe i konopne, natomiast kokosowe, z nasion chia i rzepakowe w błonnik pokarmowy (Bakkalbasi, Meral i Dogan, 2015; Chambal, Bergenstähl i Dejmek, 2012; Pojić, Dapćević Hadnadev, Hadnadev, Rakita i Brlek, 2015). Od 3% (wytłoki lniane i dyniowe) do 8% (kokosowe i sezamowe) suchej masy wytłoków stanowią składniki frakcji popiołowej, w tym mikro- i makroelementy swoiste dla roślin oleistych, tj. potas, wapń, magnez, cynk, żelazo, mangan, fosfor, miedź i sód. W znaczących ilościach występują również witaminy z grupy B. Niewielki udział przypada natomiast związkom towarzyszącym frakcji lipidowej, tj. witaminom A i E (Beegum, Sharma, Manikantan i Grupta, 2017; Bhise, Kaur, Ahluwali i Thind, 2014; Cozea i in., 2016). Cechą różnicującą makuchy jest ilość tłuszczu, bezpośrednio wynikająca z wydajności procesu tłoczenia oraz sposobu jego prowadzenia. I tak nieco powyżej 2% wynosi zawartość tłuszczu w makuchach poddanych dodatkowemu odtłuszczeniu, która może osiągać poziom 50% w przypadku zastosowania pras o małej wydajności i przy niskiej temperaturze procesu (Parry, Cheng, Moore i Yu, 2008; Teh, 2015). Różny jest również profil kwasów tłuszczowych, swoisty dla danego gatunku. Makuchy z orzechów włoskich, nasion chia, słonecznikowe, lniane i konopne cechują się najwyższą spośród wszystkich innych zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT), w tym kwasu linolowego i α-linolenowego (60-80% sumy wszystkich kwasów tłuszczowych). W składzie wytłoków rzepakowych i oliwnych dominują kwasy jednonienasycone (JNKT) (ok. 70%), reprezentowane przede wszystkim przez kwas oleinowy. Zbliżone proporcje jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (po 40-45%) występują w makuchach sezamowych, natomiast w dyniowych ok. 20% przypada na nasycone kwasy tłuszczowe, 30% na jednonienasycone i 50% na wielonienasycone (Parry i in. 2008; Sahin i Elhussein, 2018).

Rośliny oleiste, a w ślad za nimi również wytłoki, charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwutleniającą. Podstawową różnicą jest jednak to, że w przypadku makuchów potencjał ten warunkowany jest obecnością związków fenolowych, podczas gdy w przypadku surowców oleistych również tokoferoli i karotenoidów. Co więcej, profil związków fenolowych jest cechą charakterystyczną dla każdego rodzaju wytłoków (Sahin i Elhussein, 2018). Związkami swoistymi dla makuchów rzepakowych (70-85% całkowitej zawartości polifenoli) są synapina

(cholinowy ester kwasu synapinowego) oraz kwas synapinowy, który w wyniku dekarboksylacji przekształcany jest do canololu – związku o aktywności przeciwutleniającej zbliżonej do tokoferoli czy flawonoidów (Siger, Jóźwiak i Górnaś, 2017). W wytłokach lnianych i sezamowych dominują lignany i ich glikozydy, przy czym w wytłokach sezamowych są to przede wszystkim sezamol i sezamina (Teh, Niven, Bekhit, Carne i Birch, 2015). Wytłoki sojowe są zasobne w izoflawony i ich pochodne – fitosterole uznawane za związki kompatybilne pod względem strukturalnym i funkcjonalnym z żeńskimi estrogenami (Ganesan i Xu, 2017). Elagotaniny, kwas elagowy oraz galusowy, zaliczane są z kolei do wiodących związków fenolowych wytłoków z orzechów włoskich (Sánchez-González, Ciudad, Noe i Izquierdo-Puillo, 2017). W makuchach słonecznikowych, oliwnych, bawełnianych, z orzechów ziemnych, dyniowych czy kokosowych występują przede wszystkim kwasy fenolowe, w tym kwas p-kumarowy, ferulowy, wanilinowy, chlorogenowy, kawowy oraz flawonoidy reprezentowane przez kwercetynę i katechiny (Muíño i in., 2017; Peiretti, Meineri, Gai, Longato I Amarowicz, 2017; Seneviratne, Prasadani i Jayawardena, 2016). Obecność związków fenolowych, którym przypisuje się m. in. zdolność do ograniczania stanów zapalnych oraz procesów starzenia się organizmów, stanowi jedną z wielu zalet przemawiających za włączeniem wytłoków do składu produktów spożywczych. Z drugiej strony nadmierna ilość tych związków w połączeniu z substancjami o charakterze antyodżywczym może ograniczać odżywcze i terapeutyczne właściwości wytłoków. Związane jest to przede wszystkim z zaburzeniem prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych, w tym inaktywacji natywnych enzymów trawiennych i wchodzeniem tych związków w szlaki metaboliczne w następstwie innych substancji (Parry i in., 2008; Sarwar, Sarwar, Sarwar, Qadri i Moghal, 2013). Za jedne z najbardziej szkodliwych związków antyodżywczych uznaje się pochodne glukozynolanów, które absorbowane z przewodu pokarmowego wykazują działanie goitrogenne, hamują syntezę hormonów tarczycy, zaburzają pracę wątroby i nerek, przy czym problem ten dotyczy przede wszystkim wytłoków rzepakowych (Kaczmarek, Korniewicz, Lipiński i Mazur, 2016). Praktyka wskazuje, że wytłoki składowane w nieodpowiednich warunkach mogą wykazywać podatność na skażenie mykotoksynami, o szczególnie niekorzystnych dla zdrowia człowieka właściwościach (rakotwórczych, teratogennych i immunosupresyjnych) (Afsah-Hejri, Jinap, Hajeb, Radu i Shakibazaeh, 2013).

Kierunki zagospodarowania wytłoków roślin oleistych

Złożony skład chemiczny oraz cechy fizykochemiczne wytłoków roślin oleistych leżą u podstaw wyboru obecnych i potencjalnych kierunków ich zagospodarowania. Wśród najważniejszych wymienia się (Ramachandran i in., 2007; Sahin i Elhussein, 2018):

- produkcję bioenergii;
- przemysłowe procesy biotechnologiczne;
- produkcję naturalnych nawozów i środków ochrony roślin;
- produkcję pasz;
- odzysk związków chemicznych;
- przemysł spożywczy.

Produkcja bioenergii

Systematyczny globalny wzrost zużycia energii w połączeniu z malejącą podażą paliw kopalnianych i rosnącym sprzeciwem społecznym wobec wykorzystywania surowców spożywczych na cele energetyczne stanowią przyczynę intensyfikacji prac w kierunku produkcji biopaliw nowej generacji bazującej na biomasie odpadowej (Oluyori, Adelani-Akande i Inyinbor, 2017; Szajner, 2015). Doniesienia naukowe wskazują, że produkty uboczne przemysłu olejarskiego, stanowiąc odpowiednie źródło składników mineralnych oraz aktywnych biochemicznie związków organicznych, są surowcem o szczególnie wysokim potencjale zagospodarowania w tym obszarze. Dodatkowo cechuje je porównywalna w stosunku do węgla kamiennego (26 $MJ \cdot kg^{-1}$) wartość opałowa, wynosząca w przypadku wytłoków lnianych i konopnych – 18,8 $MJ \cdot kg^{-1}$, rzepakowych – 21,7 $MJ \cdot kg^{-1}$, dyniowych – 26,4 $MJ \cdot kg^{-1}$, sezamowych – 27,8 $MJ \cdot kg^{-1}$ i słonecznikowych – 28,2 $MJ \cdot kg^{-1}$ (Kachel-Jakubowska, Kraszkiewicz i Krajewska, 2016). Niższe są również koszty związane ze składowaniem i transportem surowca w porównaniu do węgla kamiennego, co uzyskuje się m.in. przez jego uprzednią granulację. Z drugiej strony ta wysoka zawartość złożonych związków organicznych i siarki w wytłokach może stanowić pewne ograniczenie w ich masowym zastosowaniu w bioenergetyce, głównie ze względu na wzmożoną emisję zanieczyszczeń do atmosfery (Liu, Quek i Balasubramanian, 2014).

Przemysłowe procesy biotechnologiczne

Wytłoki roślin oleistych jako niedrogie źródło związków węgla i azotu stanowią komponenty pożywek hodowlanych wykorzystywanych w przemysłowej produkcji enzymów (Ravindran i Jaiswal, 2016; Tsouko i in., 2017). Pierwszym enzymem otrzymanym w latach 50. XX wieku była lipaza, której produkcja bazowała na związkach organicznych wytłoków sezamowych i szczepach *Penicillium chrysogenum*. Obecnie wytwarza się ją również z użyciem wytłoków bawełnianych, sezamowych, palmowych czy kokosowych w połączeniu ze szczepami *P. simplicissium, P. Chrysogenum* S_1*, R. pusillus, R. rhizopodiformis czy Aspergillus niger.* Wśród innych enzymów otrzymywanych na bazie wytłoków są wybrane enzymy proteolityczne, fitaza, inulinoaza, glutaminaza oraz α-amylaza (Kiran, Trzcinski, Wun Jern i Yu, 2014; Ramachandran i in., 2007). O 90% niższe koszty produkcji, wysoka wydajność oraz naturalny charakter procesu stanowią siłę napędową do podejmowania prób zastąpienia tradycyjnych metod otrzymywania m.in. α-amylazy fermentacją w stanie stałym z wykorzystaniem makuchów oleistych (Kiran i in., 2014; Tsouko i in., 2017). Przykładowo, wykazano, że enzym ten z powodzeniem może być syntetyzowany na drodze fermentacji związków organicznych wytłoków kokosowych prowadzonej przez szczepy *Aspergillus oryzae* (Ramachandran i in., 2004).

Pożywki przygotowane na bazie wytłoków roślin oleistych wykorzystywane są również do hodowli mikroorganizmów odpowiedzialnych za produkcję antybiotyków bakteryjnych. Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują na brak różnic w wydajności pomiędzy pożywkami na bazie makuchów, a ich komercyjnymi i laboratoryjnymi odpowiednikami (Oluyori i in., 2017; Ramachandran i in., 2007; Tsouko i in., 2017).

Jednym z bardziej innowacyjnych sposobów zagospodarowania odtłuszczonych makuchów roślin oleistych jest wytwarzanie na ich bazie jadalnych, przeciwbakteryjnych folii pokrywających wyroby mięsne. Opracowano m.in. chroniącą przed szczepami *Salmonelli* błonę, której podstawą była odtłuszczona mączka sojowa w połączeniu z laktoperoksydazą oraz folie na bazie koncentratów białek wytłoków słonecznikowych. Dodatek wytłoków wzmocnił dyfuzję środka przeciwbakteryjnego, barwę i rozciągliwość folii, przy równoczesnym zachowaniu właściwości organoleptycznych pokrytego nią produktu (Lee i Min, 2013; Salgado, López-Caballero, Gómez-Guillén, Mauri i Montero, 2012). Ponadto, udowodniono, że białko

odzyskiwane z wytłoków słonecznikowych stanowi odpowiedni materiał osłonowy w mikrokapsułkach α-tokoferolu (Nesterenko, Alric, Violleau, Silvestre i Durrieu, 2013).

Produkcja nawozów naturalnych i środków ochrony roślin

Kolejną z gałęzi przemysłu wykorzystującą organiczny charakter wytłoków, głównie pochodzących z produkcji olejów niejadalnych np. rycynowego, jest produkcja organicznych nawozów azotowych. Stwierdzono, że nawozy te mogą opóźniać procesy nitrowania gleb, tym samym zapewniając zwiększone wchłanianie niezbędnego do wzrostu roślin azotu. Ponadto substancje zawarte w wytłokach wykazują zdolność do ochrony rośliny przed nicieniami, owadami i pasożytami (Oluyori i in., 2017). Stwierdzono znaczący spadek populacji patogenów grzybiczych oraz nicieni (*Meloidogyme incognita, Rotylenchulus reniformis* czy *Tylenchorhynchus brassicae*) w wyniku zastosowania środków ochrony roślin na bazie wytłoków lnianych, musztardowych i rycynowych, przy czym efekt ulegał wzmocnieniu w obecności komercyjnego nematocydu karbofuranu 3G (Flis, Dobosz, Rybarczyk-Mydłowska, Wasilewska-Nascimento, Kubicz i Winieszewska, 2018; Ramachandran i in., 2007).

Produkcja pasz

Wprowadzony przez Komisję Europejską zakaz stosowania mączek mięsno-kostnych w skarmianiu zwierząt wymusił na rolnikach oraz producentach pasz zastąpienie ich komponentami równie zasobnymi w białko. Wśród zalecanych surowców są produkty uboczne przemysłu olejarskiego – śruta poekstrakcyjna oraz wytłoki, znajdujące się na oficjalnej liście dopuszczonych dodatków do pasz wydanej przez Komisję Europejską (Komisja Europejska, 2013). Obecnie makuchy sojowe, rzepakowe, bawełniane i słonecznikowe są powszechnie stosowane w mieszankach paszowych przeznaczonych dla praktycznie wszystkich gatunków zwierząt hodowlanych (Kaczmarek, Korniewicz, Lipiński i Mazur, 2016; Longato, Meineri i Peiretti, 2017; Smulikowska 2006; Strzetelski, 2006). Podkreśla się jednak, że wytłoki nie powinny być wykorzystywane do bezpośredniego skarmiania zwierząt, a jedynie stanowić jeden ze składników recepturowych paszy, ponieważ pomimo wysokiej zawartości białka oraz korzystnego składu frakcji tłuszczowej charakteryzuje je (Smulkowska 2006; Strzetelski, 2006; Szajner, 2015; Xie, Huang, Dong i Zou, 2012):

- niższa w stosunku do komercyjnych pasz wysokobiałkowych biodostępność białka (przyswajalne w 75-85%);
- niska zawartość podstawowych składników energetycznych (skrobi i tłuszczu);
- wysoka zawartość nietrawionego przez zwierzęta błonnika pokarmowego;
- obecność substancji antyodżywczych, które spożywane w nadmiarze mogą prowadzić do zahamowania wzrostu zwierzęcia.

Przydatność żywieniowa wytłoków możne być jednak zwiększona poprzez uprzednią obróbkę termiczną (np. ekstruzję lub prażenie) lub częściową hydrolizę z wykorzystaniem enzymów pochodzenia grzybiczego (Kaczmarek i in., 2016). Śruta poekstrakcyjna powinna być dodatkowo poddana procesowi destylacji azeotropowej w celu usunięcia i odzysku pozostałości rozpuszczalnika. Zabiegi te równocześnie gwarantują wyższą jakość mikrobiologiczną surowców oraz zmniejszenie zawartości glukozynolanów i inhibitorów trypsyny. Obecnie zaleca się stosowanie suplementacji na poziomie 5-20% (Czyżyk i in., 2010; Kaczmarek i in. 2016; Xie i in., 2012). Udowodniono, że taki udział wytłoków w mieszankach paszowych przeznaczonych m.in. dla trzody chlewnej, drobiu, owiec czy kóz gwarantuje wysoki poziom produkcyjności hodowli, zapewnia odpowiedni rozwój potomstwa oraz podnosi jakość pozyskiwanego mięsa, mleka czy jaj, głównie w wyniku obniżenia zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych na korzyść WNKT przy jednoczesnym zmniejszeniu stosunku n-6/n-3 (Borys, 2014; Gorlov, Slozhenkina, Alekseev i Sutorma, 2017; Lima i in., 2018; Smulikowska, 2006; Strzetelski, 2006; Xie i in., 2012). Wśród dodatkowych zalet są niższe nawet o 15% dzienne koszty wyżywienia zwierząt hodowlanych, jak również racjonalnie zagospodarowywane są pozostałości poprodukcyjne, przy czym obecnie rynek paszowy zdominowany jest głównie przez śrutę sojową i rzepakową (Borys, 2014; OECD/FAO, 2016).

Odzysk związków odżywczych chemicznych

Biomasa powstająca po wytłoczeniu oleju stanowi źródło wysokiej jakości białka, które może być odzyskiwane w postaci tzw. hydrolizatów. Dzięki niższym właściwościom alergizującym oraz wyższej biodostępności w porównaniu do białek o strukturze IV-rzędowej, hydrolizaty mogą stanowić bazę odżywek przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci, wchodzić w skład żywności dla sportowców oraz być stosowane jako dodatki funkcjonalne wzbogacające wartość odżywczą oraz zwiększające walory organoleptyczne i właściwości

technologiczne produktów spożywczych (Das i Bhattachrjee, 2017; Lai i in., 2017). Do tej pory światowa produkcja hydrolizatów opierała się przede wszystkim na wytłokach sojowych, jednak obserwowana w ostatnich latach wzmożona popularność izolatów białkowych, szczególnie pochodzenia roślinnego, wskazuje na konieczność oceny przydatności technologicznej innych rodzajów wytłoków (Segura-Campos, Salazar-Vega, Chel-Guerrero i Betancur-Ancona, 2013). Dotychczas udowodniono, że z sukcesem wykorzystywane ku temu celowi mogą być odtłuszczone wytłoki rzepakowe, lniane, arachidowe, kokosowe, konopne czy słonecznikowe (Chambal i in., 2012; Chee, Ling i Ayob, 2012; Jamdar, Rajalaksjmi, Pednekar, Juan, Yardi i Sharma, 2010; Malomo i Aluko, 2015; Shim, i in., 2015; Yoshie-Stark, Wada i Wäsche**,** 2008). Zasadniczym problemem w tym obszarze jest jednak uzyskanie wysokiej czystości preparatu przy zachowaniu pożądanych właściwości funkcjonalnych i technologicznych, w tym odpowiedniej rozpuszczalności, zdolności do tworzenia stabilnych pian i żeli oraz absorpcji wody i tłuszczu. Wykorzystywane dotychczas techniki izolacji opierały się na niskowrzących rozpuszczalnikach organicznych, usuwanych z preparatu w mało efektywnych, nieopłacalnych ekonomicznie i negatywnie wpływających na środowisko procesach wysokotemperaturowych. Obecnie zatem podejmuje się działania w kierunku zastąpienia ich procesami membranowymi, hydrolizą enzymatyczną z wykorzystaniem proteaz, wodną ekstrakcją podciśnieniową, technikami bazującymi na oddziaływaniu pulsacyjno-elektrycznym czy ultradźwiękach połączonych z dodatkową ekstrakcją (Breeze, Meng, Harrison, George i Colyer, 2015; Das i Bhattachrjee, 2017; Hadnadev i in., 2017; Shim i in., 2015). Nowością w tym obszarze jest chroniona zgłoszeniem patentowym technologia wyodrębniania białek z wytłoków, polegająca kolejno na procesach fluidyzacji i filtracji wodnych roztworów makuchów. Została ona opracowana przez polskie przedsiębiorstwo Napiferyn Biotech®, a jej przewagą nad obecnie stosowanymi technikami jest uzyskiwanie wysokiej jakości izolatów białek przy równoczesnej redukcji obciążenia wywieranego na środowisko (Wnukowski i Kozłowska, 2017).

Dotychczas prowadzone badania wskazują na możliwość odzysku z wytłoków roślin oleistych związków fenolowych (Lai i in., 2017; Matthäus, 2002; Muíño i in., 2017; Roselló-Soto, Poojary, Barba, Lorenzo, Mañes i Moltó, 2018; Seneviratne i in., 2016; Shim i in., 2015). Proces ten nabiera szczególnego znaczenia w obliczu nieustających poszukiwań surowców o wysokim potencjale przeciwutleniającym, co związane jest z pogłębieniem wiedzy na temat czynników warunkujących stabilność oksydacyjną produktów oraz z powszechnymi

obawami konsumentów wobec syntetycznych dodatków do żywności. Co więcej, odzysk związków fenolowych z surowców odpadowych i uzyskiwane dzięki nim wydłużenie okresu trwałości wyrobów ogranicza straty produktowe i tym samym wychodzi naprzeciw bieżącym inicjatywom ukierunkowanym na ograniczenie marnotrawienia żywności. Wpisuje się również w założenia zarządzania generowanymi odpadami w sposób przyjazny środowisku. Obecnie prace badawcze skupiają się na doborze takich warunków ekstrakcji związków fenolowych, które zapewniłyby maksymalną wydajności tego procesu. Wśród najskuteczniejszych metod wymienia się ekstrakcję wodną w stanie nadkrytycznym w temperaturze 40-60°C i przy ciśnieniu 20-30 MPa oraz kilkuetapowy proces łączący ekstrakcję cieczą pod ciśnieniem z metodami bazującymi na pulsacyjnym polu elektrycznym, ultradźwiękach o częstotliwości fali akustycznej przewyższającej 20 kHz lub mikrofalach o częstotliwości 2,45 GHz (Teh i in., 2015; Terpinc i in., 2012; Wijngaard, Hossain, Rai i Brunton, 2012). Bez względu jednak na zastosowaną metodę, otrzymywane ekstrakty mogą być wykorzystywane jako dodatki wydłużające trwałość produktów spożywczych, pasz, kosmetyków oraz produktów chemii gospodarczej. Dla przykładu, dzięki zastosowaniu wodnych ekstraktów wytłoków oliwnych w pasztecikach jagnięcych (w stężeniu 100-400 mg/kg mięsa) o 3 dni, w stosunku do próbki kontrolnej, wydłużono ich okres przydatności do spożycia, uzyskując mniejszy stopień utleniania lipidów i białek przy jednoczesnym utrzymaniu akceptowalnej barwy oraz smakowitości (Muíño i in., 2017; Terpinc i in., 2012; Wijngaard i in., 2012). Równie zadowalający stopień ograniczenia zasięgu zmian oksydacyjnych zachodzących w oleju sojowym stwierdzono dla etanolowych wyciągów z wytłoków oliwnych i sojowych (w stężeniu 150 mg/kg). Ekstrakty te charakteryzowały się dodatkowo wyższą w porównaniu do syntetycznych przeciwutleniaczy (BHT, BHA, TBHQ), skutecznością (Mojerlou, Elhamirad i Kenari, 2017; Zamindar i in., 2017).

Przemysł spożywczy

Sektor spożywczy stoi przed koniecznością przeformułowania swojej dotychczasowej działalności w kierunku bardziej racjonalnego gospodarowania dostępnymi zasobami oraz poszukiwania nowych źródeł surowców o wysokim potencjale odżywczym (Michalczuk, 2011). Jest to pokłosie ogólnych problemów występujących w gospodarce globalnej, w tym:

- wyczerpywania się zasobów naturalnych i ziem uprawnych;

- problemów związanych z nierównością społeczną, skutkujących jednoczesnym niedożywieniem i marnotrawieniem żywności;
- dążenia do zmniejszenia kosztów produkcji;
- postępujących procesów degradacji środowiska.

Nie ustaje również presja tworzenia produktów innowacyjnych, które równocześnie w możliwie jak najwyższym stopniu spełniałyby wymogi zaleceń żywieniowych. Obecne wskazania dietetyczne odwołują się do konieczności zapobiegania niedoborom elementarnych składników odżywczych oraz włączenia do codziennej diety, w miejsce żywności wysokoprzetworzonej, surowców pochodzenia roślinnego, w tym nasion roślin strączkowych, orzechów oraz produktów pełnoziarnistych (Jarosz, 2017; Sofi i in., 2018). Coraz częściej za antidotum na przedstawione problemy uznaje się odpady przemysłu spożywczego, co bezpośrednio wynika ze stale rosnącej wiedzy na temat ich właściwości. W konsekwencji w najbliższych latach należy oczekiwać zmian w obszarze relacji: produkcja żywności a towarzyszące jej pozostałości, które ostatecznie mają prowadzić do stopniowego zapewnienia globalnego bezpieczeństwa żywnościowego i środowiskowego.

Wytłoki roślin oleistych są jednym z produktów ubocznych przemysłu spożywczego, którym poświęca się najwięcej uwagi, a ostatnia dekada przyniosła intensyfikację prac w zakresie oceny ich właściwości odżywczych, funkcjonalnych i technologicznych, które zaowocowały uznaniem ich za jedno z głównych alternatywnych źródeł substancji odżywczych dla światowej populacji (Akay, Kazan, Celiktas i Yesil-Celiktas, 2015; Galanakis, 2012; Parry i in., 2008; Sarwar i in., 2013). Obecnie na rynku dostępne są one przede wszystkim w postaci mąk wytłokowych, których przewagą nad powszechnie dostępnymi mąkami (pszenną, kukurydzianą czy żytnią) jest m.in. obecność praktycznie wszystkich aminokwasów egzogennych, mniejsze właściwości alergizujące białek, korzystny skład frakcji tłuszczowej, jak również wyższa zawartość błonnika pokarmowego, składników mineralnych i witamin. Dodatkowo są to produkty bezglutenowe o przyjemnych właściwościach organoleptycznych (Coelho i Salas-Mellado, 2015; Parry i in., 2008; Sahin i Elhussein, 2018). Wydaje się zatem, że ich implementacja do pieczywa, ciast oraz produktów przekąskowych w połączeniu z popularnością ww. wyrobów może być jedną z niedrogich, szybkich, prostych i jednocześnie wygodnych strategii wyrównywania niedoborów żywieniowych oraz zagospodarowania odpadów. Dla przykładu, połączenie tradycyjnej mąki pszennej (zasobnej w aminokwasy

siarkowe i ubogiej w lizynę, tryptofan i treoninę) z wytłokami o komplementarnym profilu aminokwasowym pozwala na otrzymanie zbilansowanego pod kątem zawartości aminokwasów produktu finalnego (Gobbettia, Pontonio, Filannino, Rizzello, De Agnelis i Di Cagno, 2017; Lin i in., 2017; Rosell, 2011; Sarwar i in., 2013).

Próby włączenia wytłoków roślin oleistych do produktów piekarskich i cukierniczych pojawiają się w doniesieniach naukowych od ponad dwóch dekad. Obecnie dąży się przede wszystkim do wyboru takich metod modyfikacji tych surowców, które bez ponoszenia nadmiernych nakładów finansowych, pozwoliłyby na spełnienie wszystkich norm bezpieczeństwa stawianych żywności oraz zapewniły wysoki stopień trwałości. Intensyfikacji ulegają również prace nad doborem optymalnego udziału wytłoku w składzie, który gwarantowałby pożądane cechy odżywcze i organoleptyczne. W literaturze szeroko opisane są właściwości odżywcze wytłoków lnianych, słonecznikowych, sezamowych, sojowych, kokosowych, dyniowych czy z nasion chia, a dotychczasowe kierunki ich zastosowania przedstawiono w Tabeli 2. Warto również zaznaczyć, że receptura chrupek ziemniaczanych z 30-procentowym dodatkiem wytłoków lnianych, zaproponowana przez naukowców z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w 2012 roku została objęta zgłoszeniem patentowym (Kita, Pęksa i Gryszkin, 2012).

Tabela 2. Zastosowanie wytłoków roślin oleistych w produktach przemysłu spożywczego

Produkt	Źródło
Pieczywo	Bińczak, Pawłowski, Jankowska i Kowalski, 2016a; Coelho i Salas-Mellado, 2015; Koca i Anil, 2007; Marpalle, Sonawane i Subhash Arya, 2014; Poijć i in., 2015; Skrbić i Filipcev, 2008
Wyroby ciastkarskie (kruche ciastka, babeczki, batony zbożowe)	Alobo, 2001; Beegum i in., 2017; Bhise, i in., 2014; Białek i in., 2016; Chinma, Igbabul i Omotayo, 2012; Kulkarni i Joshi, 2013; Lin i in., 2017; Man i in., 2017; Revathy i Sabitha, 2013; Silva, Marques, Simão, Corrêa, Pinheiro i Silva, 2014; Srivastava, Semwal, Sharma i Bawa, 2010
Makarony, gotowe ciasta naleśnikowe, placki typu tortilla	Martínez, Labuckas, Lamarque i Maestri, 2010
Produkty przeznaczone do żywienia dzieci i niemowląt (odżywki i mleko w proszku)	Ingle i Nawkar, 2016
Produkty przekąskowe (prażynki i chrupki ziemniaczane)	Kita, Górnicka, Wojdyło i Drożdż, 2012; Kita i Popiela-Kukuś, 2010
Produkty pochodzenia zwierzęcego (farsze mięsne, paszteciki, długo dojrzewające kiełbasy, wołowe i wieprzowe hamburgery	Davis, Dean, Price i Sanders, 2010; Martínez i in., 2010; Muíño i in., 2017; Roselló-Soto i in., 2018; Xanthopoulou Nomikos, Fragopoulou i Antonopoulou, 2009

Źródło: opracowanie własne

Wraz ze wzrostem udziału mąki wytłokowej w produktach zwiększała się zawartość białka, błonnika pokarmowego mikro- i makroelementów, w tym głównie magnezu, żelaza, miedzi, cynku i manganu. Istotnie niższa była za to zawartość sodu, cukrów prostych, dwucukrów i skrobi, i w konsekwencji niższa wartość energetyczna i niższy indeks glikemiczny nowego produktu (Coelho i Salas-Mellado, 2015; Lin i in., 2017). Obserwowano ponadto spadek udziału kwasów nasyconych na korzyść jedno- i wielonienasyconych (Białek i in., 2016; Sunil, Appaiah i Prasanth Kumar, 2015; Srivastava i in., 2010). Co więcej, otrzymane produkty cechowały się wyższą zawartością związków fenolowych, co jest ważne w kontekście przypisywanych tych substancjom właściwości antymutagennych, antynowotworowych, przeciwzapalnych, antybakteryjnych, immunosupresyjnych i estrogennych (Akay i in., 2015; Kumar Sharma i in. 2015; Lai i in., 2017; Martins, Pinho i Ferreira, 2017; Żbikowska i Rutkowska, 2011). Zaleca się jednak, aby wytłoki przed ich włączeniem do produktów spożywczych były poddawane obróbce termicznej (teksturowanie, gotowanie, prażenie, ekstruzja), częściowej hydrolizie, fermentacji lub działaniu promieniowania jonizującego, w celu neutralizacji potencjalnych substancji antyodżywczych. Uznaje się również, aby analogicznie, jak w przypadku pasz, stanowiły one funkcjonalny dodatek do żywności, a nie bazę (Lai i in., 2017).

Przydatność technologiczna wytłoków roślin oleistych

Każda modyfikacja receptury produktów spożywczych w zakresie zmiany wybranego składnika powinna być poprzedzona oceną przydatności technologicznej zamiennika oraz określeniem jego wpływu na wartość odżywczą i walory organoleptyczne wyrobu. W przypadku produktów, do składu których włączono wytłoki roślin oleistych, proporcjonalnie do wzrostu udziału zamiennika, intensyfikacji ulegała finalna barwa, co stanowiło najprawdopodobniej wypadkową zwykle ciemniejszej barwy samych makuchów, jak i ich wyższej, z uwagi na wyższą zawartość białka, podatności na uleganie reakcjom Maillarda (Bhise i in., 2014; Pojić i in., 2015; Srivastava i in., 2010). Co więcej, produkty z dodatkiem wytłoków roślin oleistych z reguły cechowały się wyższą w porównaniu do próbki kontrolnej akceptacją i pożądalnością wśród oceniających. Efekt ten obserwowany był jednak dla suplementacji nieprzekraczającej 40%. Wyższy procentowy udział wytłoków wiązał się ze zmianami tekstury nowego produktu oraz znaczącym uwydatnieniem charakterystycznego dla

wytłoków smaku i zapachu. W konsekwencji charakter nowych produktów istotnie odbiegał od ich tradycyjnych odpowiedników.

Tabela 3. Wpływ dodatku wytłoków roślin oleistych na właściwości gotowych produktów

Produkt	Zmiany	Przyczyna
Produkty przemysłu piekarskiego i cukierniczego	– spadek elastyczności i sprężystości ciasta – spadek objętości ciasta oraz gotowego wyrobu – mniejsza porowatość – wyższa gęstość – wyższa wilgotność – niższa wartość współczynnika absorpcji wody	– wysoka zawartość błonnika wiążącego wodę – brak białek glutenowych odpowiedzialnych za zatrzymywanie ditlenku węgla
Produkty przekąskowe typu prażynki ziemniaczane	– niższa ekspansja ciasta podczas smażenia – niższy stopień chłonięcia tłuszczu – mniejsze rozmiary gotowego wyrobu – wyższa masa	– wysoka zawartość błonnika pokarmowego – niska zawartość skrobi
Wyroby mięsne	– wyższa wydajność produkcji – wyższa masa – niższa zawartość tłuszczu – niższa wartość pH	– wyższa zawartość wolnych kwasów tłuszczowych – wyższa zawartość błonnika pokarmowego

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Bhise i in., 2014; Kita, i in. 2012; Kita i Popiela-Kukuś, 2010; Lin i in., 2017; Pojić i in., 2015; Ravathy i Sabitha, 2013; Rosello-Soto i in., 2018; Skrbić i Filipcev, 2008; Srivastava i in., 2010

Dane wskazują również, że wyżej oceniane były produkty zawierające wytłoki, które powstały z surowców o dobrze znanym konsumentom smaku, takie jak kokos, sezam, pestki dyni czy słonecznika (Białek i in., 2017; Coelho i Salas-Mellado, 2015; Man i in., 2017). I odwrotnie, nieprzyjemny, ziemisty posmak wytłoków rzepakowych dyskryminował przygotowane próbki już przy niewielkim ich udziale w składzie produktu (Bińczak i in., 2016a). Typowe zmiany w cechach fizykochemicznych i technologicznych wynikające z włączenia wytłoków do recepturowego składu wybranych produktów przedstawiono w Tabeli 3.

Konfrontacja wyników oznaczeń fizykochemicznych i instrumentalnych badań tekstury z wynikami uzyskanymi za pomocą metod analizy sensorycznej wykazywała, że optymalna ilość dodatku wytłoków roślin oleistych nie powinna przekraczać 30-40%. Pozwala to na uzyskanie najlepszego całkowitego efektu tj. wzrost wartości odżywczej produktu, zachowanie właściwości technologicznych i spełnienie oczekiwań konsumentów.

***

Wpływ zagospodarowania wytłoków na wynik finansowy przedsiębiorstwa – analiza przypadku

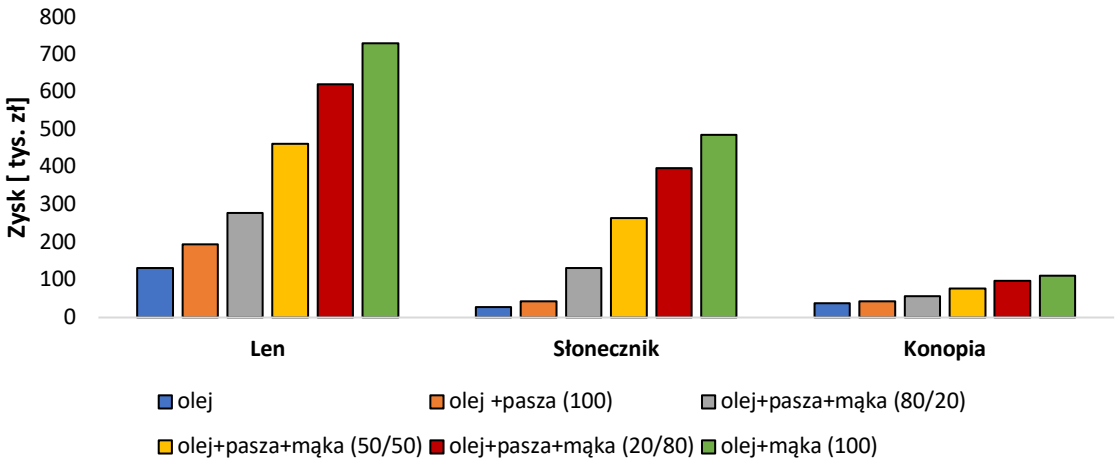
Jak pokazuje dotychczasowa praktyka, wykorzystanie wytłoków roślin oleistych na cele paszowe może mieć wymierne korzyści finansowe dla przedsiębiorstw olejarskich oraz podmiotów odkupujących te surowce, w tym hodowców zwierząt. Brak jest jednak złożonej oceny opłacalności ekonomicznej takiego przedsięwzięcia, szczególnie uwzględniającej zagospodarowanie makuchów w przemyśle spożywczym. Jest to ważne również w kontekście zgłaszanego zapotrzebowania przez producentów olejów na stworzenie z wytłoków produktów o wartości dodanej. Biorąc powyższe pod uwagę przeprowadzono analizę, której przedmiotem było dokonanie symulacji w zakresie wpływu odsprzedaży wytłoków (na cele paszowe lub spożywcze) na roczny wynik finansowy olejarni.

W niniejszej analizie przypadku podmiotem badań był rodzinny zakład zlokalizowany w województwie lubuskim, który tłoczy oleje na zimno przede wszystkim z siemienia lnianego, nasion słonecznika oraz konopi. Wydajność produkcji wynosi średnio 40%, a generowane podczas niej wytłoki są bezpośrednio sprzedawane na cele paszowe zaprzyjaźnionym rolnikom (nie są ponoszone żadne koszty z tym związane). Ze względu jednak na coraz większe nasycenie rynku paszowego oraz niski stopień opłacalności produkcji tylko olejów, przedsiębiorstwo szuka nowych form zagospodarowania makuchów. Jednym z rozważanych kierunków jest konfekcjonowanie wytłoków i ich sprzedaż w formie mąki wytłokowej, za pośrednictwem własnego serwisu internetowego.

Dane, na których bazowano wykonując analizę, zostały udostępnione przez wyżej opisane przedsiębiorstwo. Dotyczą one sezonu 2016/2017 i uwzględniają koszty związane z dostosowaniem zaplecza technologicznego firmy do przemiału i konfekcjonowania wytłoków. Ceny mąk wytłokowych stanowią natomiast średnią cenę produktów dostępnych w sklepach internetowych w grudniu 2017 roku.

Analiza danych wykazała znaczące różnice w szacunkowych zyskach firmy, ściśle zależne od sposobu postępowania z generowanymi wytłokami (Rysunek 3). Sprzedaż wszystkich wytworzonych przez zakład wytłoków na cele paszowe zwiększyłaby zyski producenta (w stosunku do sprzedaży tylko olejów) od 13% nawet do 49%, w zależności od surowca wyjściowego. Gdyby jednak ta sama masa wytłoków została przeznaczona na mąkę wytłokową

i sprzedana bez pośrednictwa, roczne zyski mogłyby wzrosnąć nawet 3-18 – krotnie w porównaniu do zysków generowanych ze sprzedaży wyłącznie samego oleju oraz 2-11 – krotnie w porównaniu do zysków z odsprzedaży ich lokalnym rolnikom. Co więcej, przeznaczenie tylko około 20% wygenerowanych makuchów na mąkę wytłokową (pozostałe 80% sprzedane na paszę) mogłoby zaowocować nawet podwojeniem rocznych zysków, a przy 50-procentowym udziale wynik finansowy byłby od 3,5 do 9 – krotnie wyższy niż osiągany obecnie ze sprzedaży oleju.



Rysunek 3. Roczny zysk przedsiębiorstwa w zależności od formy zagospodarowania wytłoków roślin oleistych

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych przedsiębiorstwa zajmującego się produkcją olejów

Powyższe dane jednoznacznie wskazują, że zagospodarowanie makuchów niesie ze sobą wymierne korzyści ekonomiczne nawet dla najmniejszych przedsiębiorstw zajmujących się produkcją olejów. Istotnie wyższe zyski, które producent mógłby osiągnąć w wyniku sprzedaży wytłoków w postaci mąk wytłokowych wynikają przede wszystkim z relatywnie wysokich cen tych produktów. Wpływ na to ma ciągle jeszcze innowacyjny charakter tych produktów, stosunkowo niski popyt na nie oraz wykorzystywanie ich głównie przez rynek żywności bezglutenowej, którego cechą charakterystyczną są wysokie ceny oferowanych produktów. W dłuższej perspektywie, w miarę wzrostu ich popularności i podaży, zgodnie z podstawowym prawem gospodarki rynkowej należy spodziewać się spadku cen, jednak wciąż zagospodarowanie wytłoków będzie bardziej opłacalne ekonomicznie niż składowanie i dodatkowo podparte korzyściami środowiskowymi.

***

Kierunki zagospodarowania wytłoków roślin oleistych są różnorodne, przy czym ich wysoki potencjał dostrzegany jest przede wszystkim przez branżę biotechnologiczną, energetyczną i przemysł paszowy. Pomimo badań nad możliwością ich implementacji w produktach przemysłu spożywczego, na rynku praktycznie niespotykane są wyroby z ich udziałem, a przedstawione informacje dotyczyły jedynie produktów przygotowanych w skali laboratoryjnej. Przyczyny takiego stanu rzeczy należy najprawdopodobniej upatrywać z jednej strony w specyfice innych branż, gdzie z dużą łatwością można dostosować wytłoki do realiów stosowanych procesów, z drugiej w braku dostatecznej promocji i co z tym związane odpowiedniej świadomości producentów, jak i konsumentów dotyczącej właściwości makuchów oraz ich bezpieczeństwa żywieniowego. Istotne jest zatem odpowiednie wyeksponowanie walorów odżywczych wytłoków oraz ekonomicznych zalet wynikających z ich wykorzystania, jak również stosowanie na cele spożywcze głównie tych surowców, które charakteryzują się korzystnymi właściwościami organoleptycznymi, jak np. wytłoki z orzecha włoskiego.

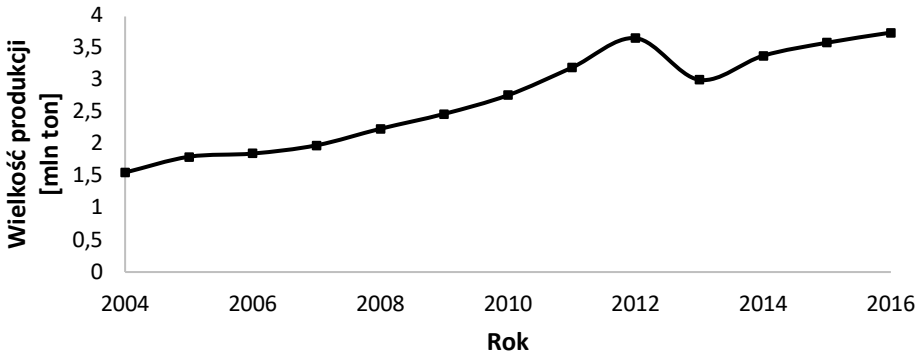
2. Wytłok z orzecha włoskiego jako produkt uboczny o wysokim potencjale wykorzystania w przemyśle spożywczym

2.1. Orzechy włoskie – wybrane elementy rynku

Orzech włoski (*Juglans regia* L.) to jeden z najstarszych i najbardziej rozpowszechnionych gatunków drzew owocowych na świecie. Wywodzi się z centralnej Azji, a obecnie uprawiany jest w południowej Europie, północnej Afryce, wschodniej Azji, USA oraz w Ameryce Południowej (Slatnar, Mikulic-Petkovsek, Stampar, Verbic i Solar, 2015). Blisko 2/3 dostępnych w handlu owoców orzechów włoskich występuje jako produkt surowy, przeznaczony do bezpośredniej konsumpcji. Pozostała część stosowana jest jako surowce do otrzymywania oleju tłoczonego na zimno, produktów wysokobiałkowych oraz wyrobów alkoholowych. Część stanowi składnik recepturowy m.in. płatków śniadaniowych, wyrobów cukierniczych, ciastkarskich, piekarskich i przekąskowych oraz jogurtów i mieszanek orzechów. Liście i zielone łupiny, ze względu na silne właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne oraz przeciwbiegunkowe znalazły zastosowanie w przemyśle zielarskim i kosmetycznym, a drewno zagospodarowywane jest do produkcji mebli oraz elementów broni (McNeil and Evans, 2014).

Orzechy włoskie są trzecim co do wielkości zbiorów rodzajem orzechów uprawianych na świecie. Tylko w przeciągu ostatniej dekady ich globalna produkcja wzrosła o 87%, osiągając wielkość 3,75 mln ton w sezonie 2015/2016 (Rysunek 4). Największymi producentami od lat są Stany Zjednoczone i Chiny, których łączna produkcja stanowi ponad 2/3 produkcji globalnej (2,39 mln ton w 2016 r.). Znaczącą pozycję zajmują również Ukraina, Iran i Turcja (łącznie ok. 20%). Według danych FAOSTAT (2018) roczna wielkość produkcji orzechów włoskich w Europie od roku 2005 przekracza 300 tys. ton rocznie, co daje 9% produkcji światowej, a wyższa jest tylko w Azji (67,5% - 2,53 mln ton) i Ameryce Północnej (16,2% - 607,81 tys. ton). Największymi europejskimi producentami są Francja, Rumunia oraz Ukraina (łącznie 54,0% produkcji europejskiej). W Polsce produkcja orzechów włoskich w 2016 roku osiągnęła wielkość 7,22 tys. ton, co stanowiło niespełna 0,2% produkcji globalnej i 2,0% produkcji europejskiej (FAOSTAT, 2018). Od 2004 roku globalny handel orzechami włoskimi wykazuje tendencję zwyżkową. W sezonie 2016/2017 według szacunków wielkość eksportu wyniosła ponad 700,0 tys. ton a importu ok. 680,0 tys. ton. Największym eksporterem orzechów włoskich są USA, z ponad 40-procentowym udziałem w rynku, a także Ukraina (13%), Meksyk

(11%) oraz Chile (6%). Głównymi odbiorcami są kraje europejskie oraz Japonia, Korea Południowa i Chiny (International Nut&Fruit [INC], 2016).



Rysunek 4. Globalna wielkość produkcji orzechów włoskich (wyrażona masą orzechów w łupinach) w latach 2005-2015

Źródło: FAOSTAT, 2018

Analogicznie do produkcji wzrasta również konsumpcja orzechów włoskich, która w roku 2014 wyniosła blisko 6,3 tys. ton (0,9 kg na osobę na rok) (INC, 2016). Największe ilości orzechów włoskich spożywane są w Chinach, USA oraz Iranie. W Polsce według danych GUS (2016) w roku 2015 krajowe spożycie orzechów, nasion i pestek jadalnych wyniosło 1,2 kg na osobę i było o 11,1% wyższe w stosunku do roku 2014.

2.2. Właściwości odżywcze i prozdrowotne orzechów włoskich i wytłoku z orzecha włoskiego

Orzechy włoskie doceniane są nie tylko przez swoje charakterystyczne walory smakowo-zapachowe, ale przede wszystkim ze względu na korzystny skład, dzięki któremu uznawane są za najbardziej wartościowe pod względem odżywczym i prozdrowotnym wśród wszystkich rodzajów orzechów. Przy tym należą do grupy roślin oleistych, z których podczas procesu tłoczenia obok oleju powstają równie bogate w składniki odżywcze i związki bioaktywne wytłoki.

Jądra orzechów włoskich w zależności od warunków uprawy zawierają 14-24% białka, 55-70% tłuszczu, 2-7% błonnika pokarmowego oraz 12-16% węglowodanów, w tym ok. 2,7% sacharozy. Ponadto w ich składzie w ilości 1,7-2% występują związki mineralne, takie jak magnez, potas, fosfor, wapń, selen czy cynk oraz kompleks witamin B, witamina E i A (Tabela

4) (Labuckas, Maestri, Perelló, Martínez i Lamarque, 2008; McNeil i Evans, 2015). Całkowita zawartość tokoferoli waha się w przedziale 320-505 mg/kg masy jąder, z czego dominującym jest γ- tokoferol (172,6-470,0 mg/kg), a następnie kolejno homolog δ- (8,2-26,0 mg/kg) i α- (7,0-16,6 mg/kg), nie zidentyfikowano natomiast β-tokoferolu (Bakkalbasi, Yilmaz, Poyrazoglu i Artik, 2012). Ponadto wśród związków swoistych dla frakcji tłuszczowej występują sterole reprezentowane przez β-sitosterol (70,0-90,0% wszystkich steroli), kampesterol (0,3-5,2%) oraz Δ5-avenasterol (0,1-7,0%) (Abdallah i in., 2014).

Tabela 4. Skład chemiczny orzechów włoskich (w 100 g jąder)

Składnik pokarmowy	Udział [g]	Kwasy tłuszczowe	Udział* [%]
białko	14,2	palmitynowy C16:0	5,7 – 6,7
tłuszcz	65,2	stearynowy C18:0	2,2 – 2,3
frakcja popiołowa	1,8	oleinowy C18:1	18,5 – 18,9
węglowodany	13,7	linolowy C18:2	50,0 – 62,2
błonnik pokarmowy	6,7	α-linolenowy C18:3	10,1 – 15,0
cukry	2,6	ΣNKT	7,9 – 8,9
skrobia	0,1	ΣJNKT	18,5 – 18,9
		ΣWNKT	71,7 – 73,1
Składniki mineralne	**Udział**	**Witaminy**	**Udział**
magnez [mg]	158,0	retinol (wit. A)[IU]	20,0
potas [mg]	441,0	α-tokoferol (wit. E) [mg]	0,7
fosfor [mg]	346,0	biotyna (wit. K) [μg]	2,7
wapń [mg]	98,0	kwas askorbinowy (wit. C) [mg]	1,3
selen [μg]	4,9	γ- tokoferol [mg]	20,8
mangan [mg]	3,4	tiamina B_1[mg]	0,3
cynk [mg]	3,1	ryboflawina B_2 [mg]	0,2
żelazo [mg]	2,9	niacyna B_3 [mg]	1,1
		kwas pantotenowy B_5[mg]	0,6
		pirydoksyna B_6 [mg]	0,5
		kwas foliowy B_9 [μg]	98,0

Źródło: Copolovici, Bungau, Boscencu, Tit i Copolovici, 2017; Hayes, Angove, Tucci i Dennis, 2016; Labuckas i in., 2008; McNeil i Evans, 2015; Salcedo i Nazareno, 2015
*udział w puli kwasów tłuszczowych

W wytłokach dominującym składnikiem suchej masy są białka (ponad 40%) oraz błonnik pokarmowy (ponad 10%). Zawartość tłuszczu zwykle waha się w przedziale od 8% do 20%, przy czym profil kwasów tłuszczowych jest analogiczny do profilu w orzechach (Bińczak, Samotyja i Małecka, 2016b; Slatnar i in., 2015). Zbieżny w stosunku do orzechów włoskich jest również profil substancji mineralnych, witamin rozpuszczalnych w wodzie oraz związków fenolowych reprezentowanych głównie przez elagotaniny oraz kwas elagowy i galusowy (Vinson i Cai, 2012; Regueiro, Sánchez-González, Vallverdú-Queralt, Simal-Gándara, Lamuela-Raventós i Izquierdo-Pulido, 2014).

Żywieniowa przydatność białek warunkowana jest składem aminokwasowym, a w szczególności ilością i wzajemnymi proporcjami aminokwasów egzogennych (Greco i in., 2017). Białka orzechów włoskich budują kolejno frakcje gluteiny (70%), globulin (18%) albumin (7%) oraz prolamin (5%). Cechuje je wysoka biodostępność, rozpuszczalność i lekkostrawność oraz w pełni zbilansowany skład aminokwasów, wśród których dominują kwas glutaminowy, arginina, kwas asparaginowy, leucyna oraz walina. Głównym aminokwasem ograniczającym jest natomiast lizyna, dzięki czemu orzechy te charakteryzują się niskim, korzystnym z punktu żywieniowego i prozdrowotnego, stosunkiem lizyny do argininy (0,18) (Labuckas, Maestri i Lamarque, 2014). Dodatkowo, arginina zaliczana jest do grupy aminokwasów warunkowo niezbędnych, odgrywających kluczową rolę podczas endogennej syntezy białka, podziale komórkowym, gojeniu ran, uwalnianiu hormonów oraz usuwaniu amoniaku z organizmu. Wspomaga ona również procesy wytwarzania tlenku azotu rozszerzającego światło naczyń krwionośnych, co w konsekwencji przeciwdziała powstawaniu miażdżycy (Greco i in., 2017; Fatima, Showkat i Hussain, 2018; Hartman, 2017; Martínez i in., 2010). Wśród pozostałych aminokwasów budujących białka orzechów na uwagę zasługuje leucyna i walina, które wraz z izoleucyną jako aminokwasy rozgałęzione tworzą kompleks nazywany powszechnie BCAA (z ang. branched-chain amino acid) wykorzystywany jako baza w żywności dla sportowców i osób aktywnych fizycznie. Podejrzewa się, że kompleks ten zmniejsza uczucie zmęczenia po treningu oraz zapobiega samoistnemu rozpadowi komórek mięśniowych (Greco i in., 2017). Z drugiej strony orzechy włoskie uznawane są za jedne z najsilniejszych alergenów roślinnych, za co odpowiedzialne jest przynajmniej 5 homologów białkowych (Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Jug r 4 oraz Jug r 5). Wśród wymienionych szczególnie niekorzystne jest białko Jug r 4, które wykazuje wysoką homologię sekwencji z antygenami innych orzechów, warunkując tym samym reakcje krzyżowe (Costa, Carrapatoso, Oliveira i Mafra, 2014). Znacząco niższy w porównaniu do orzechów jest natomiast stopień alergenności wytłoków, zawierających białka, które uległy częściowej hydrolizie podczas tłoczenia oleju. Dodatkowo białka te cechują się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi, w szczególności ponadprzeciętnymi zdolnościami do wychwytywania wolnych rodników, jak również są one lepiej przyswajalne przez organizm człowieka (Gu i in., 2015). Wysoki potencjał antyoksydacyjny stwierdzono również w przypadku pochodnej tryptofanu – metioniny, neurohormonu regulującego zegar biologiczny oraz ograniczającego ryzyko zawału mięśnia sercowego i powstawania innych schorzeń układu sercowo-naczyniowego (Catalá, 2017; Fatima i in., 2018).

Zawartość tłuszczu w owocach orzechów warunkowana jest odmianą, sposobem prowadzenia uprawy oraz warunkami klimatycznymi. W wytłokach natomiast kluczowy jest proces tłoczenia, szczególnie jego wydajność. Dominującym składnikiem frakcji tłuszczowej jest kwas linolowy (50,0-62,2% łącznej sumy kwasów tłuszczowych) i kolejno oleinowy (ponad 18,5%) oraz α-linolenowy (10,1-15,0%) (Tabela 4) (Copolovici i in., 2017; Ling, Hou, Li i Wang, 2014). Udowodniono, że kwasy te odgrywają istotną rolę m.in. w profilaktyce i leczeniu nadwagi, otyłości oraz chorób metabolicznych, w tym cukrzycy typu 2. Normalizują gospodarkę lipidową, działają kardioprotekcyjnie, łagodzą skutki nadmiernego stresu oksydacyjnego, ograniczają częstość występowania alergii oraz obniżają ryzyko zachorowania m.in. na raka jelita grubego, prostaty, piersi czy żołądka (Fialkow, 2016; Hayes i in., 2016). Dodatkowo, wśród wszystkich rodzajów orzechów, orzechy włoskie charakteryzują się najkorzystniejszym stosunkiem kwasów n-6/n-3 (Slatnar i in., 2015), co jest istotne w obliczu doniesień, że pochodne kwasu α-linolenowego syntetyzowane w organizmie (kwas eikozapentaenowy – EPA i kwas dokozaheksaenowy – DHA) wspomagają rozwój i pracę układu nerwowego, poprawiają zdolności poznawcze i behawioralne oraz działają protekcyjnie w obrębie siatkówki oka. Przypisuje się im również udział w ograniczaniu występowania zaburzeń neurodegeneracyjnych, depresyjnych i anoreksji. Natomiast związki syntetyzowane z kwasu linolowego (leukotrieny i tromboksany) podejrzewane są m.in. o zaburzanie równowagi redox organizmu oraz inicjowanie stanów zapalnych, stąd tak istotne są odpowiednie proporcje pomiędzy ilością kwasów z rodziny n-6 i n-3 (Fialkow, 2016; Hayes i in., 2016; Weylandt i in., 2015). W świetle najnowszych doniesień, w codziennej racji pokarmowej kwas linolowy powinien dostarczać 4% łącznej podaży energii, natomiast kwas α-linolenowy 0,5% (Jarosz, 2017).

Błonnik pokarmowy stanowi ok. 1-7% suchej masy orzechów i 5-12% wytłoków. Działanie związków wchodzących w skład błonnika w organizmie jest wielokierunkowe, zależne od stopnia rozpuszczalności. Do najważniejszych właściwości frakcji nierozpuszczalnych należą: zwiększenie perystaltyki jelit, buforowanie i wiązanie nadmiaru kwasu solnego w żołądku, zwiększanie wydzielania soków trawiennych czy detoksykacja organizmu. Ostatnie badania wskazują na udział błonnika w prewencji polipów jelita czy żylaków odbytu. Powstałe w wyniku fermentacji związków błonnika krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe obniżają pH jelita grubego i tym samym korzystnie modelują skład jego mikroflory bakteryjnej (Aljuraiban i in., 2015; Slavin, 2013). Polimery rozpuszczalne w wodzie stymulują różnicowanie

i proliferację komórek nabłonka jelitowego, wydłużają czas przebywania pożywienia w żołądku oraz spowalniają pasaż treści pokarmowej przez jelita. Udowodniono również ich udział w utrzymaniu prawidłowego poziomu glukozy we krwi oraz modelowaniu profilu lipidowego organizmu (Slavin, 2013). Z uwagi na fakt, że błonnik pokarmowy wykazuje zdolności adsorpcyjne względem m.in. substancji mineralnych i witamin, jego dzienne wystarczające spożycie ustalono na poziomie 25 g dla osób w wieku 19-65 lat oraz średnio 20 g dla osób starszych oraz dzieci (Jarosz, 2017).

Orzechy włoskie stanowią źródło witamin z grupy B, w tym ryboflawiny (B_2), niacyny (B_3), kwasu pantotenowego (B_5) i pirydoksyny (B_6) oraz najważniejszych mikro- i makroelementów. Związki te wspomagają pracę układu nerwowego, w tym funkcje poznawcze mózgu, wzmagają odporność organizmu, poprawiają kondycję skóry, włosów i paznokci. Uczestniczą w gospodarce węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej organizmu, zapobiegają nadciśnieniu tętniczemu, arytmii serca oraz powstawaniu blaszki miażdżycowej. Co więcej, wykazują zdolność do detoksykacji organizmu, łagodzenia skutków stresu oksydacyjnego, neutralizacji wolnych rodników oraz komórek nowotworowych, jak również zapobiegają mutacjom (Fatima i in., 2018; Lao, Lao, Lam, Agarwal i Chow, 2017). Zawarty w orzechach i wytłokach kwas foliowy odgrywa znaczącą rolę w detoksykacji homocysteiny - aminokwasu siarkowego, który ma silne właściwości aterogenne (Offia-Olua, 2014).

Swoisty, lekko cierpki smak orzechów włoskich kształtowany jest przez związki fenolowe, których orzechy są siódmym co do zawartości źródłem wśród surowców oraz produktów spożywczych (Vinson i Cai, 2012). Co więcej, według doniesień ze spotkania Amerykańskiego Towarzystwa Chemicznego (American Chemical Society), charakteryzują się one najkorzystniejszym, pod względem wpływu na zdrowie, profilem przeciwutleniaczy, wykazując blisko dwukrotnie wyższy potencjał antyoksydacyjny w porównaniu z pozostałymi orzechami z drzew (American Chemical Society [ACS], 2011). W jądrach orzecha włoskiego zidentyfikowano przede wszystkim pochodne kwasu hydroksybenzoesowego (kwas galusowy i wanilinowy) i kwasu hydroksycynamonowego (kwas kawowy, ferulowy i p-kumarowy) oraz najliczniejszą grupę - elagotanin (Abdallah, Macciola, Boukhchina, de La Torre Fornell i De Leonadris, 2017; Hayes i in., 2016). Szczególnie silne działanie fizjologiczne przypisuje się urolitynom - produktom stopniowej degradacji kwasu elagowego w przewodzie pokarmowym. Udowodniono, że związki te są silnymi inhibitorami substancji kancerogennych, w tym wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA),

nitrozoamin oraz heterocyklicznych amin aromatycznych (HCA). Badania wskazują również na znaczący wpływ urolityn w redukcji ryzyka wystąpienia lub zahamowaniu rozwoju raka prostaty, w tym również ograniczania rozrostu i wymiarów guza nawet o 75% (Saha i in., 2016; Sánchez-González, Ciudad, Izquierdo-Pulido i Noé, 2016). Co więcej, kwas elagowy i produkty jego rozpadu silnie przeciwdziałają wybranym dysfunkcjom układu krążenia oraz przewodu pokarmowego. Wykazano ich antagonistyczną aktywność wobec bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych, szczególnie wobec *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Bacillus subtillis*, czy *Helicobacter pylori* oraz szczepów antybiotykoopornych (Abdallah i in., 2017; Selma i in., 2015). Oprócz kwasów fenolowych w jądrach orzechów występują związki z grupy flawonoidów, w tym kwercetyna i epikatechina, proantocyjanidyny i cyjanidyny (Hosseini, Ghorbani, Sadeghi Mahoonak i Maghsoudlou, 2014). Badania wskazują, że flawonoidy jako jedne z najsilniejszych reduktorów wolnych rodników, zapobiegają powstawaniu blaszki miażdżycowej, regulują gospodarkę cholesterolową organizmu, wykazują zdolności antymutagenne i antynowotworowe oraz zmniejszają ryzyko powstawania i rozwoju guzów, w tym raka piersi oraz jelita grubego (Fatima i in., 2018; Sánchez-González i in., 2017).

***

Liczne dane wskazują na wysoki potencjał orzechów włoskich w profilaktyce chorób dietozależnych, w tym schorzeń układu sercowo-naczyniowego (Catalá, 2017; Fatima i in., 2018). Wykazano obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego i lipoprotein małej gęstości (LDL) o kolejno 4,9% i 6,4% na skutek włączenia do diety orzechów włoskich w ilości 5-25% dziennej dostarczanej energii (Sabate, Fraser, Burke, Knutsen, Bennett i Lindsted, 1993). Dodatkowo zaobserwowano wyższe stężenie apolipoproteiny oraz istotną poprawę funkcji nabłonka naczyń krwionośnych (Banel i Hu, 2009). Uwzględnienie orzechów włoskich w zwyczajowej diecie było dodatnio skorelowane z ograniczaniem ryzyka powstawania syndromu metabolicznego i cukrzycy typu 2 oraz powikłań z nimi związanymi, w tym ryzyka nadciśnienia, nadwagi i otyłości (Hayes i in., 2016; Li i in., 2015). Stwierdzono, że dieta bogata w orzechy może wspierać modulację gospodarki hormonalnej odpowiedzialnej za odczucie sytości i głodu, i tym samym przyczyniać się do kontrolowania apetytu. U osób poddanych badaniu wykazano spadek stężenia greliny na czczo i jednoczesny istotny wzrost peptydu YY (PYY) (Stevenson, Paton i Cooper, 2017). Ponadto osoby, które włączyły do codziennej diety orzechy włoskie spożywały mniej kilokalorii w ciągu dnia w porównaniu z grupą kontrolną oraz

osiągały szybsze spadki masy ciała niż osoby stosujące dietę niskotłuszczową (Baer, Gebauer i Novotny, 2016).

Terapeutyczne działanie orzechów włoskich, a w szczególności zapobieganie procesom przedwczesnego starzenia się organizmu, wspomaganie łagodzenia stanów zapalnych, utrzymywanie integralności błony komórek nerwowych oraz przeciwdziałanie uszkodzeniom oksydatywnym wywołanym utlenianiem β-amyloidu – kluczowego białka w patogenezie choroby Alzheimera, wynika z jednoczesnej obecności w ich składzie nienasyconych kwasów tłuszczowych, związków fenolowych, składników mineralnych oraz witamin. Podkreśla się bowiem, że związki te wykazują znacząco silniejsze działanie wówczas, gdy są dostarczane do organizmu równocześnie, co z kolei stanowi konsekwencję ich wzajemnie synergistycznych oddziaływań. U osób starszych, których codzienna dieta uwzględniała orzechy włoskie, zahamowane zostało tempo spadku funkcji poznawczych, poprawie ulegała motoryka ruchu i kondycja fizyczna. Osoby te wykazywały również wyższe zdolności uczenia się i zapamiętywania (Arab i Ang, 2015). Co więcej, stwierdzono pozytywny wpływ orzechów włoskich na modelowanie mikroflory jelitowej, w tym supresję komórek nowotworowych okrężnicy (Saha i in., 2016).

W świetle najnowszych doniesień naukowych, optymalna ilość orzechów pozwalająca na uzyskanie kompleksowych pozytywnych efektów odżywczych i prozdrowotnych wynosi 30-60 g na dobę, przy czym ograniczenie ilościowe bezpośrednio wynika z ich wysokiej wartości energetycznej, co z kolei związane jest z wysoką zawartością tłuszczu. Stąd, z punktu widzenia energetycznego lepszym rozwiązaniem wydaje się być częściowe zastąpienie tych owoców wytłokami o blisko o połowę niższej kaloryczności (Jankowski, 2017). Warto również podkreślić, że większość związków antyodżywczych orzechów włoskich, np. juglon, zlokalizowana jest w liściach i zielonej okrywie, dlatego wytłoki z orzecha włoskiego w porównaniu do innych tego typu produktów ubocznych (szczególnie wytłoków sojowych, rzepakowych i lnianych) charakteryzują się niewielką ich zawartością (Vinson i Cai, 2012).

2.3. Wykorzystanie wytłoku z orzecha włoskiego w świetle trendów na rynku żywności

Rynek spożywczy stale ewoluuje dostosowując swoją działalność do zmieniających się warunków gospodarczych i potrzeb konsumentów, które bardzo często kreowane są przez obowiązujące trendy (Sojkin, 2009). Uwypuklenie walorów odżywczych surowców odpadowych oraz rozpowszechnienie wiedzy na temat zintegrowanych korzyści środowiskowych płynących z ich powtórnego wykorzystania może być zatem kluczowym czynnikiem decydującym o sukcesie rynkowym wytłoków z orzecha włoskiego, pozwalającym na stałe włączenie ich i powstałych na ich bazie produktów do asortymentu dostępnych artykułów spożywczych.

Analiza prognozowanych trendów oraz tych pojawiających się na przestrzeni kilku minionych lat wyraźnie wskazuje na jeden podstawowy nurt, jakim jest szeroko rozumiana poprawa jakości życia. Cel ten może być realizowany m.in. poprzez zmiany w obrębie nawyków żywieniowych, jak i działania na rzecz poprawy stanu środowiska (Gul, Singh i Jabeen, 2016). W Tabeli 5 przedstawiono autorski podział silnie utrzymujących się na rynku trendów, notowanych przez światowe agencje badań rynkowych. Za podstawę poniższego podziału przyjęto bazowy obszar, którego dotyczą trendy.

Tabela 5. Najważniejsze trendy obowiązujące na rynku żywności w 2018 r.

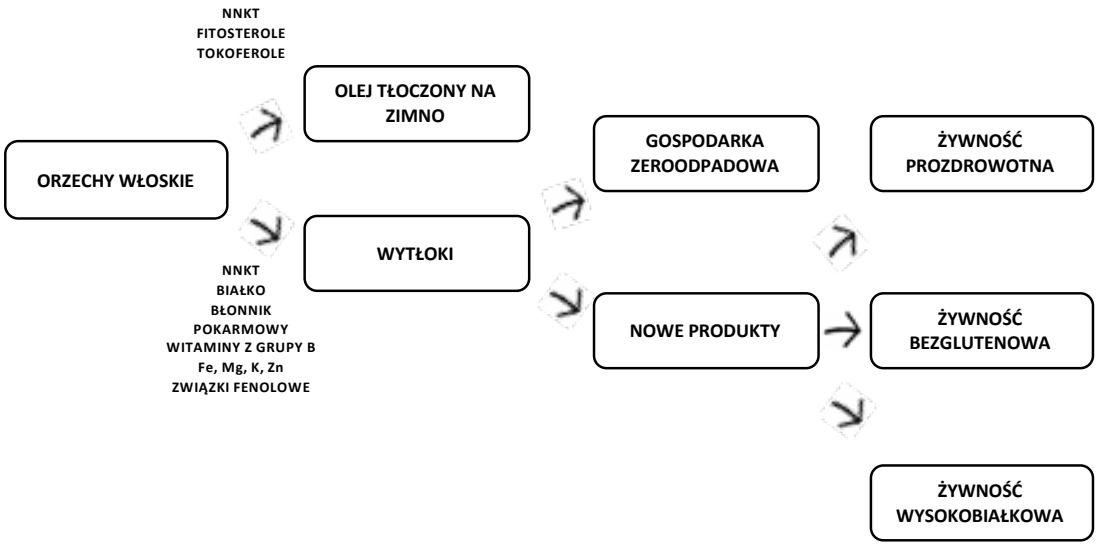
OBSZAR TRENDÓW		
GOSPODARCZO-EKOLOGICZNE	**ZACHOWANIA KONSUMENTÓW**	**ŻYWIENIOWO-ZDROWOTNE**
▪ gospodarka w obiegu zamkniętym ▪ minimalizacja ilości powstających odpadów ▪ waloryzacja produktów ubocznych ▪ zmniejszenie kosztów związanych z leczeniem ▪ programy walki z chorobami dietozależnymi	▪ diety eliminacyjne (bez glutenu, laktozy, białek mleka, mięsa: fleksitarianie, wegetarianie i weganie) ▪ zapotrzebowanie na odpowiednio skomponowane posiłki - wywołane wzrostem aktywności fizycznej ▪ powrót do tradycji ▪ dostępność produktów i wygoda ich przygotowania ▪ oczekiwanie nowości	▪ żywność jako lek i czynnik prewencyjny w chorobach ▪ odpowiednia ilość pełnowartościowego białka, nienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym NNKT, błonnika pokarmowego w diecie

Źródło: opracowanie własne na podstawie GlobaFoodForums®, 2018

Dokonując jeszcze większego uogólnienia wyróżniono trzy cechy wspólne przedstawionych powyżej trendów:

- wzmożone zainteresowanie żywnością o ponadodżywczych właściwościach,
- istotna rola diety jako nieodłącznego elementu codziennego życia,
- działania na rzecz poprawy stanu środowiska.

Powyższe trendy stały się podstawą rozważań nad możliwością zagospodarowania wytłoków z orzecha włoskiego przez przemysł spożywczy, co zobrazowano na Rysunku 5.



Rysunek 5. Możliwe kierunki zagospodarowania wytłoków z orzecha włoskiego w świetle obowiązujących trendów

Źródło: opracowanie własne

W ostatnich latach obserwowany jest systematyczny wzrost świadomości konsumentów dotyczący wpływu codziennej diety na stan zdrowia i dobre samopoczucie. Jednocześnie jednak, według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), blisko 60% globalnej liczby zgonów spowodowanych jest niezakaźnymi chorobami dietozależnymi (NCD) lub ich powikłaniami. Prognozuje się również, że w najbliższych latach sytuacja ta może ulec dalszemu nasileniu (WHO, 2009, 2013; 2016a; 2016b). Taki stan rzeczy wraz z dynamicznym wzrostem kosztów leczenia wymusza wypracowanie nowych, kompleksowych rozwiązań w obszarze przeformułowania receptur obecnie dostępnych produktów spożywczych. Wymaga to współpracy władz i producentów oraz powinno być podparte intensywną edukacją społeczeństwa nakierowaną na zmianę codziennych nawyków żywieniowych. Podkreśla się bowiem, że głównym czynnikiem ryzyka występowania NCD jest nieodpowiedni tryb życia, a tylko dzięki zbilansowanemu modelowi żywieniowemu i włączeniu aktywności fizycznej można byłoby uniknąć nawet do 40% przypadków zachorowań na najpowszechniejsze nowotwory (Lee, Shiroma, Lobelo, Puska, Blair i Katzmarzyk 2012). Uważa się również, że najprostszym i równocześnie najtańszym środkiem prewencyjnym jest dieta oparta głównie na żywności pochodzenia roślinnego (Schellenberg, Dryden, Vandermeer, Ha i Kowownyk,

2013). Przedstawione czynniki bezpośrednio przyczyniły się do podtrzymania trendu „żywności prozdrowotnej", której cechą podstawową jest udokumentowany, korzystny i ponadodżywczy wpływ na organizm człowieka lub wybrane funkcje życiowe. Za takie mogą być uznane zarówno surowce naturalnie bogate w składniki funkcjonalne, jak i produkty w nie wzbogacane, a wśród związków szczególnie pożądanych są probiotyki i prebiotyki, błonnik pokarmowy, WNKT, witaminy, składniki mineralne, aminokwasy oraz substancje fitochemiczne, w tym związki fenolowe, karotenoidy i fitosterole (Abdallah i in., 2017; Gul i in., 2016; Grochowicz, Dominik i Fabisiak, 2017; Sojkin, 2009). Wraz z postępem badań nad wymienionymi składnikami nasila się przekonanie, że rozwiązaniem zapewniającym łączne kompleksowe korzyści odżywcze, zdrowotne i ekonomiczne jest spożywanie żywności jak najmniej przetworzonej, z natury bogatej w związki funkcjonalne. Sprzyja to bioróżnorodności oraz ogranicza ryzyko przekroczenia dawek bezpiecznych. Właściwości orzechów włoskich i wytłoków, dyktowane ich składem chemicznym (szczegółowo opisanym w podrozdziale 2.2) spełniają wszystkie przedstawione powyżej założenia. Wyrazem tego było m.in. uwzględnienie orzechów na liście 10 superfoods w 2017 roku (Hartman, 2016). Co więcej, mąka wytłokowa zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1924/2006 w sprawie oświadczeń żywieniowych oraz z Rozporządzeniem Komisji 116/2010 zmieniającym rozporządzenie 1924/2006, mogłaby zostać opatrzona oświadczeniami żywieniowymi dotyczącymi wysokiej zawartości białka, błonnika pokarmowego i kwasów tłuszczowych z rodziny n-3. Przyznanie oświadczenia jest jednym z warunków koniecznych do oznaczenia produktu jako prozdrowotnego (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 116/2010, 2010; Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1924/2006, 2010).

Coraz częściej sposób odżywiania nie wynika z potrzeby zaspokojenia podstawowych funkcji życiowych, ale jest ważnym elementem codzienności, w tym jedną z form wyrażania własnych przekonań i potwierdzeniem dbałości o siebie. Wśród najbardziej popularnych obecnie diet należy wymienić te eliminujące produkty odzwierzęce, gluten i laktozę oraz dietę wysokobiałkową i śródziemnomorską. Ta ostatnia, bazująca przede wszystkim na owocach, warzywach, rybach, produktach pełnoziarnistych, roślinach strączkowych oraz orzechach włoskich, uznawana jest za jeden z najbardziej racjonalnych modeli żywieniowych. Zapewnia bowiem odpowiednią podaż wszystkich składników odżywczych i prozdrowotnych (Sofi i in., 2018). W efekcie realizacja jej założeń pozwala na wydłużenie liczby lat przeżytych w dobrym zdrowiu, co potwierdzono w licznych badaniach naukowych (Kojima, Avgerinou, Iliffe

i Walters, 2018). Oczywistym jest zatem, że wytłoki jako pochodne orzechów włoskich, nieodzownego elementu diety śródziemnomorskiej, również wpisują się w jej założenia i mogłyby zostać włączone na stałe do listy produktów przez nią zalecanych. Co więcej, mogłyby stać się istotnym składnikiem w diecie osób na co dzień niespożywających produktów odzwierzęcych, których liczba, według aktualnych prognoz w najbliższych latach, może ulec dynamicznemu wzrostowi. Tylko w samej Wielkiej Brytanii liczba osób deklarujących stosowanie diety wegańskiej wzrosła blisko 4-krotnie w latach 2014-2017 (Askew, 2018a; Askew, 2018b; GlobalFoodForums®, 2018). W Polsce grupa ta stanowi około 3,2% populacji, przy czym już w 2014 roku co dziesiąty Polak w wieku 25-34 lat deklarował ograniczanie ilości mięsa w codziennej diecie, a 12% krajowej populacji uważało, że spożywa go w za dużych ilościach (Centrum Badań Opinii Społecznej [CBOS], 2014). Nie bez znaczenia pozostają również zalecenia żywieniowe, które wskazują na konieczność zmniejszenia udziału mięsa i jego przetworów w codziennej diecie, na korzyść produktów roślinnych o możliwie najbardziej zbilansowanym składzie aminokwasów. W efekcie w najbliższych latach przewiduje się wzmożenie zainteresowania innowacyjnymi surowcami wysokobiałkowymi spełniającymi te wymagania. Stanowi to dużą szansę dla wytłoków, których zaletą jest korzystny profil aminokwasów, w tym wysoki udział argininy – aminokwasu uznanego za jeden ze związków, które w szczególności będą poszukiwane w żywności w 2018 roku (Greco i in., 2017; Hartman, 2017). Wynikający z wysokiej zawartości pełnowartościowego białka potencjał wytłoków mógłby zostać również wykorzystany w dietach wysokobiałkowych jako m.in. surowiec do produkcji izolatów białkowych oraz składnik recepturowy batonów i ciastek proteinowych. Co więcej, jako produkt pozbawiony białek glutenowych, wytłok mógłby zostać zagospodarowany przez segment żywności bezglutenowej, który od 2013 roku odnotował blisko 130-procentowy wzrost, a według szacunków, globalna wartość rynkowa produktów przez niego oferowanych do 2020 roku osiągnie wartość 7,6 miliarda USD (Gobbettia i in., 2017; Statista, 2018c). Na rynku żywności bezglutenowej, obok produktów specjalistycznych, jak mieszanki mąk bezglutenowych, dostępna jest już szeroka gama innych kategorii produktów (np. przetwory mięsne), a lista wciąż się poszerza. Pomimo tego dynamicznego rozwoju powszechne są jednak zarzuty wobec produktów bezglutenowych, związane zarówno z ich niską wartością odżywczą i jakością organoleptyczną, jak i nieadekwatnie do tego, wysokimi cenami. W efekcie intensywnie poszukuje się surowców bezglutenowych o wysokiej wartości odżywczej i odpowiednich cechach technologicznych, zwracając coraz częściej uwagę

na mąki wytłokowe. Główną przewagą mąki z wytłoków z orzecha włoskiego nad obecnie stosowanymi surowcami bezglutenowymi jest zbilansowany pod kątem wszystkich składników pokarmowych skład. Przykładowo zawiera ona 8 razy więcej białka, 6 razy więcej błonnika pokarmowego, ponad 4 razy więcej kwasu foliowego i magnezu oraz ponad dwukrotnie więcej fosforu i potasu niż mąka kukurydziana (Kunachowicz, Przygoda, Nadolna i Iwanow, 2017, Martínez i in., 2010). Co więcej, wytłok charakteryzuje się wyrazistym, przyjemnym smakiem i aromatem, uwydatnianym w podwyższonych temperaturach. Znacząco niższe są także same koszty jego pozyskania i przetwarzania, szczególnie w odniesieniu do zyskujących coraz większą popularność egzotycznych mąk z pseudozbóż, np. amarantusa, quinoa czy teff (Gobbettia i in., 2017). Wykorzystanie wytłoków w powyższym celu byłoby również zgodne z aktualnie obowiązującym trendem tj. „alternatywa dla mąki pszennej – mąki bezglutenowe z nasion roślin oleistych" (GlobalFoodForums®, 2018).

Ewoluujące wymogi przepisów prawa wymuszają na podmiotach ryku żywności dostosowanie swojej zasadniczej działalności do fundamentalnych założeń idei zrównoważonego rozwoju. W efekcie skutkuje to nasiloną promocją gospodarowania odpadami w obiegu zamkniętym, co znajduje odzwierciedlenie w rozwoju trendów „nowe życie dla produktów ubocznych" oraz „rozwój rynku innowacyjnych produktów i surowców bazujących na produktach ubocznych" (GlobalFoodForums®, 2018). Prognozuje się pogłębienie działań proekologicznych przedsiębiorstw wyrażanych głównie zagospodarowaniem odpadów jako surowców wtórnych, co w dłuższej perspektywie ma prowadzić do gospodarki zero-odpadowej (z ang. „zero waste") (Askew, 2018a; GlobalFoodForums®, 2018). Obecnie pozostałości poprodukcyjne wciąż stanowią balast dla producentów, którzy zmuszeni są ponosić coraz wyższe koszty składowania lub utylizacji tworzonych odpadów. Przewiduje się zatem, że sytuacja ta wraz z postępem wiedzy na temat właściwości fizykochemicznych odpadów stanie się stymulatorem do rozwoju rynku surowców wtórnych. Uwagę na potencjał przetwórczy pozostałości poprodukcyjnych zwrócono m.in. w Raporcie Żywność i Żywienie w XXI wieku, w którym za jedną z najważniejszych szans dla wzrostu konkurencyjności polskiego sektora spożywczego na arenie międzynarodowej uznano wykorzystanie niekonwencjonalnych surowców pochodzenia naturalnego oraz odpadów poprodukcyjnych (Michalczuk, 2011). Wszystko to, wraz ze zgłaszanym przez producentów olejów zapotrzebowaniem na zagospodarowanie

wytłoków, stanowi przesłankę do zainteresowania się wytłokami z orzecha włoskiego jako szczególnie atrakcyjnym pod kątem odżywczym produktem ubocznym.

Reasumując przedstawione informacje, wytłoki z orzecha włoskiego spełniają założenia wiodących trendów na rynku żywności. Co więcej, kierunki prognozowanych zmian przynoszą dużą nadzieję na umiejscowienie ich na stałe w gamie dostępnych produktów spożywczych. Należy jednak zaznaczyć, że niski stan wiedzy na temat m.in. ich właściwości funkcjonalnych i technologicznych oraz stabilności przechowalniczej nadal stanowi czynnik ograniczający ich wykorzystanie.

2.4. Czynniki ograniczające wykorzystanie wytłoku z orzecha włoskiego

Rozważania na temat możliwości zastosowania wytłoków z orzecha włoskiego w przemyśle spożywczym powinny bazować na kompleksowej ocenie mocnych i słabych stron tego przedsięwzięcia, opartej na specyfice samego surowca, jak i uwarunkowaniach zewnętrznych.

W przypadku wytłoków, które są produktem odpadowym, jedną z kluczowych barier wydaje się być niski stopień świadomości konsumentów i producentów żywności. Nieustannie bowiem panuje powszechna niechęć w stosunku do surowców odpadowych, które utożsamiane są z materiałem bezwartościowym, stanowiącym potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz środowiska, co również przekłada się na brak odpowiednich rynków zbytu dla tego typu surowców. Ostatnie lata przyniosły jednak intensyfikację prac badawczych i wdrożeniowych w tym obszarze, a duży w tym udział ma zapotrzebowanie zgłaszane ze strony producentów olejów, którzy we wprowadzeniu wytłoków do obiegu rynkowego upatrują najprostszej i najtańszej drogi do poszerzenia swojej oferty asortymentowej i w efekcie zwiększenia przychodów oraz pozyskania nowych grup konsumentów, w tym tzw. pionierów stale poszukujących innowacji produktowych.

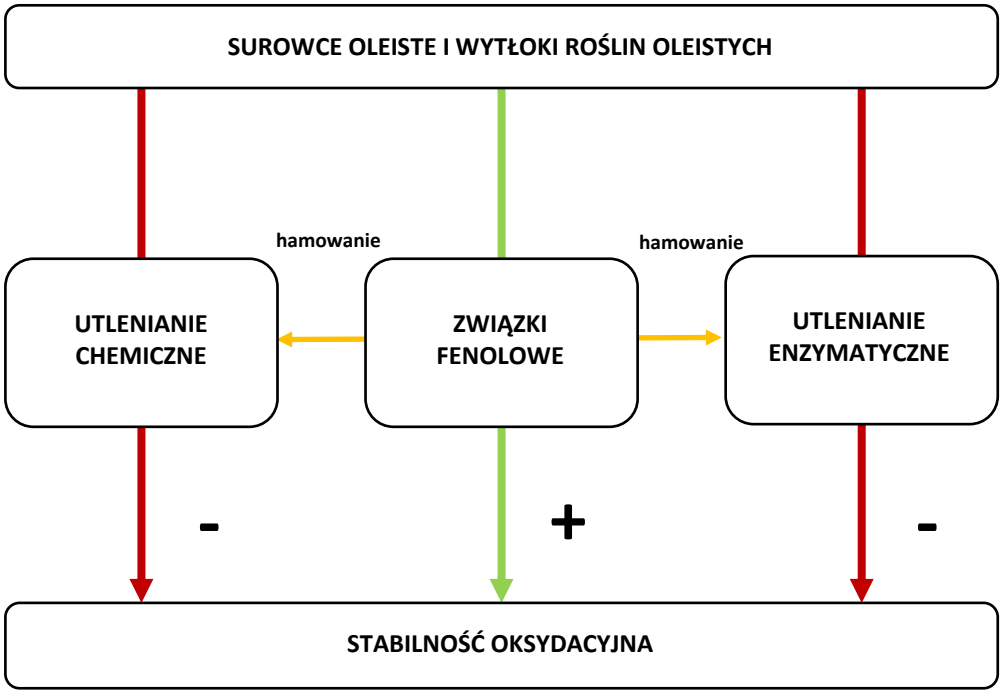
Niszowy charakter wytłoków z orzecha włoskiego skutkuje również brakiem jednoznacznych danych dotyczących ich wpływu na właściwości produktu finalnego, w szczególności na właściwości reologiczne, teksturę, barwę oraz smakowitość. W ślad za innymi wytłokami roślin oleistych (podrozdział 1.3.2) można z dużym prawdopodobieństwem uznać, że ich dodatek nie pozostawałby obojętny wobec wartości odżywczych i funkcjonalnych, przy czym ciągle jest mało danych dotyczących ilości wymaganej do osiągnięcia założonych efektów. Niemniej, w literaturze można spotkać nieliczne dane z tego

obszaru. Przykładowo, w kiełbaskach typu frankfurterki zastępując słoninę mączką z orzechów włoskich uzyskano wyższy udział nienasyconych kwasów tłuszczowych, tokoferoli, steroli i związków fenolowych, przy jednocześnie niższym stosunku kwasów n-6 do n-3 oraz lizyny do argininy (Ayo, Carballo, Serrano, Olmedilla-Alonso, Ruiz-Capillas i Jiménez-Colmenero, 2007). Dodatek mąki wytłokowej do składników tradycyjnej receptury ciastek spowodował natomiast ograniczenie rozrostu ciasta, mniejszą twardość, sprężystość i porowatość oraz ciemniejszą barwę gotowych wyrobów w porównaniu do próbki kontrolnej. Ponadto modyfikacjom ulegały cechy sensoryczne, w tym smak, smaki następcze oraz ogólna akceptowalność produktów, ocenianych przez konsumentów. Wyższe od tradycyjnych ciastek oceny uzyskiwały próbki o 20-procentowym udziale wytłoków w składzie. W konsekwencji uznano, że suplementacja na poziomie 15% jest najbardziej optymalna i pozwala otrzymać ciastka o pożądanych właściwościach fizycznych i sensorycznych, charakteryzujące się przy tym podwyższoną wartością odżywczą i aktywnością przeciwutleniającą, a spostrzeżenia takie wykazali zarówno Bakkalbasi i in. (2015), jak i Barber i Obinna-Echem (2016).

Obecnie największą barierą wykorzystania wytłoków do tworzenia innowacyjnych produktów spożywczych jest brak wiedzy na temat ich stabilności w czasie składowania. Informacje na temat zasięgu zmian zachodzących wraz z upływem czasu na skutek procesów biochemicznych, chemicznych i fizycznych stanowią bowiem podstawowe kryterium określenia adekwatnego okresu trwałości i w konsekwencji do szacowania opłacalności wykorzystania surowca. W przypadku wytłoków z orzecha włoskiego ich największa zaleta, jaką jest bardzo wysoki udział nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 i n-6, stanowi równocześnie jedno z potencjalnie najważniejszych ograniczeń wprowadzenia ich na rynek, szczególnie wobec faktu, że z dużym prawdopodobieństwem można uznać, iż procesy oksydacyjne zachodzące w obrębie ich frakcji tłuszczowej będą bezpośrednio rzutowały na zmiany jakości produktów otrzymanych z ich udziałem.

3. Stabilność oksydacyjna frakcji tłuszczowej surowców oleistych

Stabilność oksydacyjna to jeden z podstawowych czynników decydujących o trwałości surowców oleistych, a tym samym o ich przydatności technologicznej i finalnie – jakości i bezpieczeństwie zdrowotnym powstałych na ich bazie produktów (Zhou i in., 2018). W przypadku surowców przemysłu olejarskiego, zmiany wywołane oksydacją są tym bardziej istotne, że stanowią one wypadkową procesów utleniania chemicznego i enzymatycznego oraz aktywności natywnych przeciwutleniaczy (Rysunek 6). Dodatkowo złożoność mechanizmów i czynników warunkujących oksydację implikuje konieczność indywidualnego podejścia do każdego z surowców.



Rysunek 6. Czynniki warunkujące stabilność oksydacyjną surowców i wytłoków oleistych
Źródło: opracowanie własne

3.1 Chemiczne procesy utleniania – przebieg i konsekwencje

Surowce oleiste ze względu na wysoką gęstość odżywczą, w tym dominujący w składzie udział białek i tłuszczów, oraz specyficzną budowę morfologiczno-anatomiczną, uważane są za materiał szczególnie podatny na procesy fizjologiczne, fizyczne oraz chemiczne nasilające się w miarę upływu czasu składowania (Sahin i Elhussein, 2018). Dodatkowo ich jakość warunkowana jest czynnikami zewnętrznymi oddziałującymi zarówno podczas uprawy roślin, jak i po zbiorach, zwłaszcza w sferze obróbki wstępnej (Singh, Paroha i Prakash Mishra, 2017).

Co więcej, obok białek oraz tłuszczów, w składzie surowców oleistych występują znaczne ilości miko- i makroelementów, witamin oraz związków bioaktywnych (Sahin i Elhussein, 2018). Wszystkie wymienione składniki układu wchodzą we wzajemne interakcje inicjowane i katalizowane przez czynniki zewnętrzne, co finalnie prowadzi do obniżenia jakości materiału. Wśród procesów uznanych za krytyczne dla trwałości surowców oleistych uznaje się utlenianie chemiczne, w tym autooksydację, czyli wolnorodnikową reakcję łańcuchową zachodzącą spontanicznie na skutek oddziaływania wolnych rodników, nadtlenków, wodoronadtlenków lub śladowych ilości metali przejściowych z cząsteczkami kwasu tłuszczowego. Reakcja ta przebiega w trzech podstawowych etapach: inicjacji, propagacji i terminacji, poprzedzonych okresem indukcji, w którym dochodzi do stopniowego gromadzenia się rodników w układzie. W pierwszej fazie autooksydacji atom wodoru zostaje oderwany od cząsteczki kwasu tłuszczowego, co prowadzi do wytworzenia rodnika alkilowego ($R^{\cdot}$) (I) (Hu i Jacobsen, 2017).

Inicjacja	$RH \rightarrow R^{\cdot}$	(I)
Propagacja	$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$	(II)
	$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$	
Terminacja	$2\ ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR + O_2$	(III)
	$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow ROOR$	
	$RO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow ROR$	
	$2\ R^{\cdot} \rightarrow R\text{-}R$	

Powstały rodnik reaguje gwałtownie z cząsteczkami tlenu atmosferycznego dając w konsekwencji wolne rodniki nadtlenkowe ($ROO^{\cdot}$), przekształcane w cyklu kolejnych przemian do wodoronadtlenków (ROOH) i kolejnych rodników lipidowych ($R^{\cdot}$) (II). Faza propagacji kończy się wraz z wyczerpaniem się zasobów tlenu z bezpośredniego otoczenia lub w wyniku dostarczenia inhibitora przerywającego łańcuch reakcji. Na etapie terminacji powstałe w poprzednich fazach rodniki wchodzą we wzajemne interakcje tworząc względnie stabilne, nierodnikowe, krótkołańcuchowe produkty (III), co bezpośrednio skutkuje przerwaniem ciągu reakcji łańcuchowej (Choe i Min, 2009; Hu i Jacobsen, 2017).

Sezonowość zbiorów oraz wymóg stałej dostępności surowców oleistych, jak i produktów ich przerobu wymusza konieczność składowania ich przez znaczną część roku.

Wówczas ich stabilność warunkowana jest zasięgiem zmian zachodzących w matrycy surowca oraz intensywnością oddziaływania czynników zewnętrznych, w tym tlenu atmosferycznego, temperatury i energii promienistej. Udowodniono, że wszystkie te czynniki mają kluczowe znaczenie dla inicjowania oraz propagacji reakcji łańcuchowej (Singh, Paroha i Prakash Mishra, 2018). Uznaje się przy tym, że mechanizmy, według których przebiegają procesy autooksydacji w surowcach roślinnych, są jednymi z najbardziej złożonych, co w dużej mierze wynika ze wzmożonej labilności produktów pośrednich powstających podczas utleniania oraz ich interakcji z katalizatorami i związkami o charakterze przeciwutleniającym (Catalá, 2017; Kristott, 2010).

Na kinetykę autooksydacji kluczowy wpływ ma skład chemiczny surowca, a w szczególności stopień nienasycenia jego frakcji lipidowej. Podkreśla się, że szczególnie podatne na procesy autooksydacji są surowce oleiste swoiste dla klimatu umiarkowanego, w tym głównie orzechy włoskie z ponad 70-procentowym udziałem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz rzepak, len, słonecznik, wiesiołek, sezam czy pestki dyni, w których również kwasy nienasycone dominują nad nasyconymi (Borchani, Besbes, Blecker i Attia, 2010; Breeze i in., 2015; Hu i Jacobsen, 2017; Ivanova, Marinova i Batchvarov, 2016; Mojerlou i in., 2017; Sahin i Elhussein, 2018). Stwierdzono bowiem, że w warunkach normalnych reaktywność kwasów tłuszczowych wzrasta wraz ze wzrostem liczby nienasyconych wiązań w łańcuchu węglowym, stąd najbardziej reaktywnymi są kwas dokozaheksaenowy (DHA), eikozapentaenowy (EPA), arachidonowy, a następnie kolejno kwas α-linolenowy (ALA), linolowy (LA) i oleinowy. Co więcej, szybciej utleniają się kwasy tłuszczowe w stanie wolnym, co nabiera szczególnego znaczenia w przypadku surowców, w których zachowana została aktywność lipazy (Frankel, 1998; Singh i in., 2017).

Bezpośrednio po zbiorach wilgotność surowców oleistych jest stosunkowo wysoka i może dochodzić nawet do 20%, a jak udowodniono w przypadku np. nasion rzepaku, soi i olejarki abisyńskiej (*Guizotia abyssinica)* obniżenie jej do poziomu 11-13% wydłuża czas składowania materiału nawet 2-krotnie (Singh i in., 2017; Tańska i Rotkiewicz, 2003). Stwierdzono również, że zdecydowanie wyższą stabilnością charakteryzuje się materiał roślinny, w tym jądra orzechów włoskich, nasiona rzepaku, lnu i słonecznika oraz pestki dyni, który zaraz po zbiorach został poddany zabiegom m.in. wstępnego suszenia lub prażenia (Fu, Qu, Yang i Zhang, 2016; Labuckas, Maestri i Lamarque, 2011; Iqbal, Bhatti, Shahid I Nisar., 2016; Rękas i in., 2017; Raczyk, Siger, Radziejewska-Kubzdela, Ratusz i Rudzińska, 2017;

Siegmund i Murkovic, 2004). W konsekwencji uznaje się, że zarówno wilgotność, jak i aktywność wody są czynnikami istotnie rzutującym na mechanizm i tempo autooksydacji w surowcach oleistych, przy czym kierunki oddziaływania ściśle zależą od przedziału wartości tych wyróżników. Zaleca się, aby wilgotność materiału, szczególnie tego przeznaczonego do dłuższego składowania, nie przekraczała 7%, przy czym najkorzystniejszy jest zakres 5-6%. Wówczas materiał wykazuje najwyższą wytrzymałość mechaniczną, a dodatkowo obniżeniu ulega aktywność wody, co hamuje rozwój mikroflory patogennej. Co więcej, ograniczona zostaje aktywność natywnych i mikrobiologicznych enzymów, w tym lipaz, które katalizują procesy uwolnienia kwasów tłuszczowych i przyśpieszają ich oksydację. Na uwadze należy mieć jednak fakt, że utlenianie tłuszczów zachodzi w środowisku suchym o niskiej aktywności wody, dlatego ograniczanie wilgotności poniżej 5% nie jest zalecane. Twierdzi się, że zabiegi suszenia powinny prowadzić do finalnego obniżenia wartości aktywności wody do poziomu 0,2-0,5 (Pałacha, 2008). Przy takich wartościach woda tworzy monowarstwę, która równocześnie ogranicza dostęp tlenu atmosferycznego do cząsteczek tłuszczu oraz hamuje prooksydacyjne działanie metali katalizujących, które to wyższą aktywność wykazują w stanie suchym. Co więcej, woda wiążąc się przez wiązania wodorowe z produktami pośrednimi autooksydacji bezpośrednio eliminuje ich udział w reakcjach rodnikowych oraz przyśpiesza reakcje, których produkty wykazują działanie przeciwutleniające (Zielińska, Rutkowska i Antoniewska, 2017). Z drugiej strony zbyt wysoka aktywność wody (>0,7), przy której woda zaczyna pełnić funkcję rozpuszczalnika, skutkuje spadkiem lepkości i spójności surowca, a tym samym zwiększa się dyfuzja tlenu do warstw, w których zlokalizowany jest tłuszcz (Hu i Jacobsen, 2017).

Barwniki chlorofilowe proporcjonalnie do ich zawartości w układzie zwiększają podatność surowców oleistych na procesy utleniania chemicznego. Wśród surowców o szczególnie wysokiej zawartości chlorofili w stosunku do innych są nasiona rzepaku czy pestki dyni (Alfawaz, 2004; Kaczmarek i in., 2016; Siger i in., 2017). Barwniki te wykazują zdolność do absorbowania promieniowania w zakresie światła czerwonego i niebieskiego i tym samym ulegają wzbudzeniu do wyższego stanu energetycznego równocześnie przekazując nadmiar energii na podwójne wiązanie kwasu tłuszczowego. W konsekwencji wiązanie to zwiększa swoją podatność na oksydację podczas kontaktu z cząsteczką tlenu. Proces ten nosi nazwę utleniania fotosensybilizowanego i podobnie jak autooksydacja prowadzi do powstania wolnych rodników i wodoronadtlenków, które mogą inicjować

łańcuch reakcji rodnikowej (Catala, 2017; Zielińska i in., 2017).

Jakość surowców oleistych w czasie przechowywania kształtowana jest również przez czynniki zewnętrzne, które bezpośrednio rzutują na powstawanie czynników endogennych. Zaleca się, aby podczas składowania tych surowców wilgotność względna powietrza nie przekraczała 70%, co gwarantuje zachowanie równowagi pomiędzy wilgotnością materiału i jego aktywnością wody (Singh i in., 2017). Ważne jest również stałe monitorowanie temperatury, wraz ze wzrostem której rośnie tempo utleniania kwasów tłuszczowych, skraca się czas indukcji tych procesów oraz zmianom ulega profil kwasów tłuszczowych, w tym obserwowany jest znaczący spadek udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych na rzecz kwasów nasyconych, szczególnie średnio- i długołańcuchowych (Drzewieniecka, 2017; Rondanini, Borrás i Savin, 2018; Siegmund i Mulkovic, 2004). Zaleca się, aby temperatura otoczenia nie przekraczała 15°C, a jeśli jest to możliwe była niższa od 10°C. Gwarantuje to wydłużenie czasu przechowywania nawet 4-krotnie, co udowodniono m.in. dla nasion rzepaku, kukurydzy i soi (Rondanini i in., 2018; Tańska i Rutkiewicz, 2003; Singh i in., 2017; Singh i in., 2018). Istotne jest również odpowiednie oczyszczanie i segregacja surowca po zbiorach, prowadząca do eliminacji materiału częściowo uszkodzonego lub pozbawionego okrywy nasiennej. Zniszczenie komórek skutkuje bowiem ułatwionym dostępem enzymów lipolitycznych oraz tlenu atmosferycznego do lipidów i w konsekwencji procesy oksydacyjne zachodzą szybciej, wzrasta ilość barwników chlorofilowych w układzie oraz dochodzi do wzmożonej degradacji tokoferoli (Singh i in., 2018).

Finalnym efektem utleniania chemicznego są uszkodzenia lub modyfikacje cząsteczek lipidów, tym bardziej zaawansowane, im większy był stopień nienasycenia frakcji tłuszczowej surowca. Ponadto, w materiale kumulują się znaczne ilości nadtlenków i wodoronadtlenków, które ulegają dalszym przemianom, w tym wchodzą w interakcje z pozostałymi składnikami układu. W konsekwencji skróceniu ulega czas składowania surowca oraz obniża się ogólna jego jakość.

W początkowych etapach składowania surowców oleistych obserwowany jest przede wszystkim systematyczny wzrost pierwotnych produktów utleniania. Są to wysoce niestabilne, bezwonne wodoronadtlenki o zachowanej strukturze węglowej utlenianego kwasu tłuszczowego. Ulegają one szybkiej dekompozycji do rodników alkoksylowych ($RO^{\cdot}$) i hydroksylowych ($OH^{\cdot}$), inicjujących lub wzmagających przebieg autooksydacji (Kristott, 2010; Zielińska i in., 2017). W miarę upływu czasu składowania tempo procesów utleniania nasila

się, co skutkuje nadmiernym nagromadzeniem wodoronadtlenków, które stopniowo przekształcane są do tzw. wtórnych produktów utleniania. Są to krótkołańcuchowe związki organiczne należące do grupy aldehydów, ketonów, estrów, kwasów, laktonów, furanów, alkoholi i węglowodorów, z których większość to związki lotne odpowiedziale za pogorszenie się cech smakowo-zapachowych materiału roślinnego, w tym głównie powstawanie tzw. zapachów jełkich (Kristott, 2010). Z punktu widzenia jakości surowców oleistych najistotniejsze znaczenie mają przede wszystkim, cechujące się niskim progiem wyczuwalności, aldehydy i ketony powstałe w wyniku utleniania kwasu oleinowego, linolowego i α-linolenowego, w tym nonanal, heksanal i *trans,cis*-2,4-heptadienal. Udowodniono bowiem, że rodzaj powstałych produktów wtórnych oraz ich wzajemne proporcje zależą bezpośrednio od wyjściowego składu kwasów tłuszczowych oraz mechanizmów, według których przebiegało utlenianie (Belitz, Grosch i Schieberle, 2009; Hu i Jacobsen, 2017). Wśród związków tych powszechnym markerem zaawansowania procesów oksydacyjnych lipidów jest heksanal (Catalá, 2017). Podkreśla się jednak, że w przypadków surowców oleistych, wnioskowanie o postępie utleniania jedynie na podstawie zawartości tego związku nie jest wystarczające i powinno być uzupełnione o dodatkowe analizy. Wystepuje w nich bowiem aktywna dehydrogenaza alkoholowa, która w wyniku mechanizmów obronnych materiału roślinnego w bardzo szybkim tempie przekształca heksanal do kwasu heksanowego. Wówczas jego stężenie w układzie jest niskie co w dużym stopniu ogranicza wnioskowanie o rzeczywistym stanie utlenienia materiału (Lehto, Laakso i Lehtinen, 2003).

Następstwem utleniania chemicznego surowców oleistych, obok pogorszenia cech organoleptycznych, jest stopniowa degradacja i w konsekwencji zmniejszenie w składzie udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz związków bioaktywnych. W miarę upływu czasu składowania surowców, wtórne produkty utleniania ulegają stopniowej polimeryzacji, co skutkuje wzrostem lepkości tłuszczu. Co więcej, udowodniono, że spadek wartości odżywczej surowców oleistych w wyniku procesów utleniania jest bardziej zauważalny w przypadku surowców zasobnych w białko, w tym orzechów włoskich, nasion soi i chia (Ahad, Masoodi, Nissar, Rather, Hussain i Maqbool, 2017; Alfawaz, 2004; Segura-Campos i in., 2013; Bhise i in., 2014). Produkty rozpadu kwasów tłuszczowych mogą bowiem reagować z natywnymi białkami surowców, m.in. sieciując je, przekształcając ich grupy sulfhydrylowe i aminowe oraz prowadząc do utlenienia aminokwasów. W konsekwencji zmniejsza się ogólna

strawność białek oraz biodostępność aminokwasów, co ma szczególne znaczenie w przypadku aminokwasów egzogennych (Weylandt i in., 2015). Rozpatrując konsekwencje utleniania chemicznego, należy również mieć na uwadze, że skład chemiczny surowców wyjściowych warunkuje jakość produktów ich przerobu. Nabiera to szczególnego znaczenia wobec wiedzy, że wolne rodniki dostarczane wraz z żywnością mogą być absorbowane z przewodu pokarmowego i przy wysokich stężeniach zaburzać wiele funkcji fizjologicznych organizmu. Przede wszystkim nasileniu ulega stan stresu oksydacyjnego, który obecnie uznawany jest za jedną z głównych przyczyn powstawania chorób cywilizacyjnych, w tym schorzeń układu sercowo-naczyniowego i pokarmowego (Weylandt i in., 2015).

3.2 Procesy utleniania enzymatycznego – mechanizm i konsekwencje aktywności lipooksygenazy

Ze względu na zachowaną strukturę tkankową w surowcach oleistych, obok procesów utleniania chemicznego równolegle zachodzą zmiany spowodowane aktywnością natywnych i mikrobiologicznych enzymów (Porta i Rocha-Sosa, 2002). W orzechach włoskich, nasionach soi, pestkach dyni, nasionach sezamu i słonecznika, owocach awokado czy drzewa oliwnego stwierdzono obecność przynajmniej dwóch kluczowych dla trwałości enzymów. Są to: lipaza, należąca do klasy hydrolaz oraz lipooksygenaza, zaliczana do oksydoreduktaz (Baysal i Demirdöven, 2007; Fu i in. 2016; Kubicka i Jędrychowski, 2001; Salas, Williams, Hatwood i Sánchez, 1999). Przy czym, bezpośrednio za procesy utleniania frakcji lipidowej odpowiedzialna jest lipooksygenaza, której substratów do działalności dostarcza lipaza, katalizująca rozpad cząsteczek triacylogliceroli z uwolnieniem wolnych kwasów tłuszczowych (Berg, Tymoczko i Stryer, 2009).

Lipooksygenaza (LOX, EC. 1.13.11.12) to enzym należący do klasy oksydoreduktaz i podklasy dioksygenz, który katalizuje przede wszystkim procesy wbudowania dwóch atomów tlenu do cząsteczki substratu (Brash, 1999; Robinson, Wu, Domoney i Casey, 1995). Z materiału roślinnego po raz pierwszy została wyizolowana w latach 30. XX wieku, przy czym dopiero w 1973 roku potwierdzono jej aktywność katalityczną (Cai, Fang, Xia i Su, 2004). Lipooksygenaza występuje w komórkach drożdży piekarniczych, alg, grzybów, cyjanobakterii, mchów, w ponad 60 gatunkach roślin oraz w niektórych tkankach zwierzęcych (Tabela 6) (Baraniak i Szymanowska, 2006; Seta, Skórzyńska-Polit, Szczuka i Giełwanowska, 2009).

Tabela 6. Występowanie lipooksygenazy w surowcach przemysłu spożywczego

Lp.	Surowiec	Badania
1.	**Rośliny strączkowe** (soja, zielony groszek, łubin)	Dahuja i Madan, 2004; Gökmen, Savas Bahçeci i Acar, 2002; Gökmen, Savas Bahçeci, Serpen i Acar, 2005; Stephany, Bader-Mittermaier, Schweiggert-Weisz i Carle, 2014; Szymanowska, Jakubczyk, Baraniak i Kur, 2009
2.	**Warzywa** (ziemniaki, pomidor, brokuł, dynia, marchew, kolczoch jadalny)	Anese i Sovrano, 2006; Aziz, Wu i Robinson, 1999; Del Angel-Coronel, León-Garcia, Vela-Gutiérrez, Rojas-Reyes, Gómez-Lim i Garcia, 2018; Baraniak i Krzepiłko 2004; Jarjes, Mahmood, Danial, Ibrahim, Ibrahim i Omar, 2017; Kubicka i Jędrychowski, 2001
3.	**Zboża** (pszenica, ryż)	Hsieh i McDonald, 1984; Malekian, Rao, Prinyawiwatkul, Marshall, Windhauser i Ahmedna, 2000;
4.	**Rośliny oleiste** (oliwki, słonecznik, awokado, sezam)	Lorenzi, Maury, Casanova i Berti, 2006; Williams, Morales, Aparicio i Harwood, 2002; Kubicka i Jędrychowski, 1998; Manovski, Semedzieva, i Yotova 2015; Marvian-Hosseini i Asoodeh, 2017
5.	**Orzechy** (orzechy włoskie, migdały, orzechy ziemne)	Buranasompob, Tang, Powers, Reyes, Clark i Swanson, 2007; Müller, Amé, Carrari, Gieco i Asis, 2014; Salcedo, Lopez de Mishima i Nazareno, 2010; Zacheo, Cappello, Gallo, Santino i Capello, 2000
6.	**Tkanki zwierzęce** (królik, makrela, tilapia)	Banerjee, 2006; Schewe, 2002; Sea-Leaw, Benjakul, Gokoglu i Nalinanon, 2013

Źródło: opracowanie własne

Lipooksygenaza zbudowana jest z jednego pofałdowanego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 75-100·10^3 Da, w którym wyróżnia się krótką domenę N-końcową o kształcie β-cylindrycznym i dłuższą helikalną, która otacza dwuwartościowy jon żelaza (Fe^{2+}) (Baysal, i Demirdöven, 2007). W warunkach fizjologicznych enzym ten katalizuje przede wszystkim reakcje utleniania występujących w stanie wolnym nienasyconych kwasów tłuszczowych, zawierających układ wiązań *cis,cis*-1,4 pentadienowych. Wyjątek stanowią lipooksygenazy nasion soi i owoców ogórka, które dodatkowo wykazują aktywność względem kwasów tłuszczowych związanych estrowo. Stwierdzono również, że w niektórych przypadkach substratami reakcji katalizowanych przez lipooksygenazę mogą być związki nieposiadające ugrupowań pentadienowych, w tym estry metylenu i związki z acetylowaną grupą metylenową, np. pochodne furanu (Batna i Spiteller, 1994; Kühn, Wiesner, Rathmann i Schewe, 1991; Porta i Rocha-Sosa, 2002). Produktami katalizowanych reakcji są przede wszystkim 9- i 13- wodoronadtlenki, przy czym ich wzajemne proporcje zależą od rodzaju utlenianego substratu oraz genów enzymu. Stwierdzono również, że lipooksygenazy pochodzenia roślinnego mogą wykazywać aktywność dioksygenazy, hydroksyperoksydazy

oraz syntazy leukotrienów, prowadząc kolejno do drugorzędowej konwersji wodoronadtlenków lipidów, dioksygenacji substratów lipidowych lub syntezy epoksyleukotrienów (Kühn i in., 1991; Porta i Rocha-Sosa, 2002; Seta i in. 2009).

Zwyczajowo wyróżnia się dwa typy genów lipooksygenaz roślinnych (I i II), które sklasyfikowano na podstawie podobieństw w strukturze kodowania białek (Shibata i Axelrod, 1995), przy czym oba typy mogą występować jednocześnie w jednym materiale roślinnym. Niemniej w surowcach oleistych najczęściej występującym jest typ II. Charakterystykę porównawczą obu typów przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Charakterystyka typów lipooksygenazy

	LOX I	**LOX II**
Optymalne warunki aktywności	pH zasadowe (ok. 9,0)	pH obojętne i słabo zasadowe (6,0-7,8);
Dodatkowe właściwości	utlenianie barwników karotenoidowych	transport białka do chloroplastów
Produkty reakcji	13-wodoronadltenki	13- i 9-wodoronadtlenki
Występowanie	soja, oliwki, słonecznik, rzepak	orzechy włoskie i ziemne, migdały, dynia, marchew, pomidor
Badania	Baysal i Demirdöven, 2007; Lorenzi i in. 2006; Williams i in., 2002	Manovski i in., 2015; Porta i Rocha-Sosa, 2002

Źródło: opracowanie własne

Stwierdzono, że w miarę upływu czasu składowania surowców oleistych i pogłębiania procesów utleniania chemicznego nasila się również aktywność lipooksygenazy, co bezpośrednio wynika za specyfiki jej budowy oraz drogi aktywacji. Lipooksygenaza jest metaloproteiną, wymagającą do aktywacji utlenienia dwuwartościowego jonu żelaza zlokalizowanego w centrum aktywnym do jego trójwartościowej formy. Proces ten zachodzi pod wpływem interakcji cząsteczki enzymu z 13- wodoronadtlenkami lub pod wpływem oddziaływania zewnętrznych czynników stresogennych, w tym m.in. gwałtownej zmiany temperatury, działania promieniowania UV czy na skutek uszkodzenia mechanicznego (Baysal i Demirdöven, 2007; Grechkin, 1998; Porta i Rocha-Sosa, 2002). Szlak przemian katalizowanych przez aktywną lipooksygenazę przebiega w trzech zasadniczych etapach (Baraniak i Szymanowska, 2006; Wu, Robinson, Hughes, Casey, Hardy i West 1999):

1) utworzenie rodnika kwasu tłuszczowego oraz redukcja jonu żelaza na skutek stereospecyficznego odłączenia atomu wodoru od grupy metylenowej położonej pomiędzy wiązaniami podwójnymi,

2) przemiany rodnika w skoniugowane dieny,
3) utworzenie kolejno rodnika nadtlenkowego poprzez stereospecyficzne przyłączenie cząsteczki tlenu, a następnie utworzenie wodoronadtlenków.

Cechą charakterystyczną opisanego szlaku jest dwuetapowy, nieodwracalny i kanałowy transport atomu wodoru z substratu do enzymu oraz przeniesienie elektronu z atomu wodoru na jon żelaza, co skutkuje redukcją tego jonu do stanu dwuwartościowego i tym samym zamknięciem cyklu katalitycznego lipooksygenazy (Cai i in., 2004; Porta i Rocha-Sosa, 2002). Enzym wykazuje aktywność zarówno w warunkach beztlenowych, jak i tlenowych (Seta i in., 2009). W warunkach anaerobowych powstały rodnik kwasu tłuszczowego oddysocjowuje od enzymu i uczestniczy w reakcjach wolnorodnikowych (Fukushige, Wang, Simpson, Gardner i Hildebrand, 2005). W warunkach tlenowych natomiast do powstałego kompleksu enzym-rodnik przyłącza się atom tlenu tworząc rodnik nadtlenkowy kwasu tłuszczowego, który następnie zostaje przekształcony do anionu nadtlenkowego. W kolejnym z etapów do powstałego anionu przyłącza się atomu wodoru dając wodoronadtlenek kwasu tłuszczowego, który finalnie oddysocjowuje od cząsteczki enzymu. Powstałe wodoronadtlenki w cyklu szlaków katalizowanych przez inne enzymy układu ulegają dalszej dekompozycji, finalnie dając produkty o istotnym wpływie na jakość surowców (Casey i Hughes, 2004; Fukushige i in., 2005; Grechkin, 1998; Seta i in., 2009). Należy zaznaczyć, że utlenianie enzymatyczne, w przeciwieństwie do chemicznego, prowadzi do powstania najczęściej jednego, swoistego izomeru związku o wysokim stopniu czystości optycznej (Kristott, 2010; Liavonchanka i Feussner, 2006).

Produkty powstałe w wyniku aktywności lipooksygenazy mogą bezpośrednio rzutować na jakość surowca, włączać się w cykl reakcji rodnikowej lub stanowić substraty reakcji katalizowanych m.in. przez liazę, peroksydazę, syntazy oraz dehydrogenazę wodoronadtlenków.

W wyniku aktywności liazy, wodoronadtlenki przekształcane są w lotne aldehydy, ketony, krótkołańcuchowe alkohole i estry cechujące się swoistym dla surowca zapachem. W roślinach oleistych jest to charakterystyczny trawiasty, zielony i jełki aromat, za który odpowiada przede wszystkim n-heksanal. Natomiast w bananach, pomidorach, melonach oraz szeregu innych warzyw i owoców związki te odpowiadają za przyjemny, świeży zapach swoisty dla danego surowca (Contreras, Tjellström, Beaudry, 2016; Fukushige i in. 2005; Porta

i Rocha-Sosa, 2002; Siegmund i Murkovic, 2004). W Tabeli 8 przedstawiono główne związki powstające w wyniku konwersji wodoronadtlenków powstających wskutek działania lipooksygenazy.

Wodoronadtlenki w wyniku sekwencji reakcji zapoczątkowywanych przez syntazę tlenku allenowego mogą być przekształcane do kwasu jasmonowego, który odpowiada m.in. za starzenie się komórek, degradację chlorofilu, czy hamowanie odkładania białek zapasowych (Seta i in., 2009). Uważa się, że w surowcach oleistych związek ten może być odpowiedzialny za aktywację genów niezbędnych do syntezy enzymów proteolitycznych. Udowodniono bowiem, że usunięcie lipooksygenazy z nasion soi i tym samym ograniczenie produkcji kwasu jasmonowego, przyczyniło się do znaczącego obniżenia poziomu trypsyny i chymotrypsyny w stosunku do próby kontrolnej (Lima de Carvalho, Goreti de Almeida Olivera, Goncalves de Barros i Alves Moreira, 1999).

Tabela 8. Produkty przemian wodoronadtlenków

Substrat	Typ LOX	Produkt
Kwas linolowy	I	– heksanal – *trans*-2-*trans*-4-dekadienal
	II	– heksanal, – *trans*-2-heptanal, – *trans*-2-oktanal, – *trans*-2-*trans*-4-nonadienal – *trans*-2-*cis*-4-dekadienal
Kwas α-linolenowy	I	– *trans*-2-heksanal, – propanal – pentanal
	II	– *trans*-2,*cis*-4-heptadienal, – 2,4,6-nonatrienal – 3,5-octadien-2-non

Źródło: Casey, West, Hardy, Robinson, Wu i Hughes, 1999; Dahuja I Madan, 2004; Frankel, 1998; Robinson I in., 1995; Seta i in., 2009

Transformacja wodoronadtlenków może prowadzić do syntezy oksylipin – związków o potencjalnym działaniu ograniczającym aktywność lipooksygenazy (Hamberg, 1993) oraz monomerów kutyn, które obok wodoronadtlenków są niezbędne surowcom do utrzymania prawidłowej odporności na infekcje bakteryjne, wirusowe i grzybicze. Kutyny wykazują zdolność do wbudowywania atomu tlenu do cząsteczek fosfolipidów budujących błony mitochondrialne komórek, co bezpośrednio zmienia ich przepuszczalność i finalnie prowadzi do programowanej śmierci patogenu (Baysal i Demirdöven, 2007; Casey i Hughes, 2004; Fukushige i in., 2005). Wykazano, że produkty aktywności lipooksygenazy mogą ograniczać

m.in. rozwój zakażenia wywołanego *Aspergillus parasiticus* w orzechach ziemnych (Müller i in., 2014).

Lipooksygenaza może wykazywać działanie kooksydanta, uczestniczącego w reakcjach utleniania zawartych w surowcach oleistych karotenoidów, barwników chlorofilowych, jak również witamin C i E. Procesy te przebiegają zgodnie ze schematem reakcji wolnorodnikowych, a ich efektem jest rozjaśnienie barwy surowca z równoczesnym utworzeniem stabilnego rodnika i związków karbonylowych o charakterystycznym nieprzyjemnym jełkim zapachu (Robinson i in., 1995; Porta i Rocha-Sosa, 2002; Serpen i Gökmen, 2006). Dzięki powyższym właściwościom, uznaje się, że monitorowanie zmian w aktywności lipooksygenazy może być odpowiednim wskaźnikiem obniżenia jakości surowców bogatych w karotenoidy i chlorofile, jak również służyć jako marker zahamowania aktywności innych enzymów. Daje to następnie podstawę do wyznaczania optymalnej temperatury i czasu blanszowania surowców roślinnych przed ich zamrożeniem (Anese i Sovrano, 2006; Gökmen i in., 2005; Wu i in. 1999).

3.3 Ochrona frakcji tłuszczowej surowców oleistych przed procesami oksydacyjnymi

Dobór metody służącej ochronie frakcji tłuszczowej surowców oleistych przed postępującymi procesami utleniania warunkowany jest profilem kwasów tłuszczowych, jak również ilością i rozmieszczeniem tłuszczu w masie, przewidywanym czasem ich przechowywania, podstawowym przeznaczeniem, a przede wszystkim obowiązującymi wymogami prawa.

Zgodnie z najnowszymi danymi literaturowymi surowce oleiste, w tym orzechy włoskie, pestki dyni oraz nasiona rzepaku, słonecznika i sezamu charakteryzują się niższą podatnością na procesy utleniania i tym samym dłuższym potencjalnym czasem przechowywania wówczas, gdy bezpośrednio po zbiorach zostaną poddane odpowiednim zabiegom termicznym. Procesy te oprócz podniesienia stabilności oksydacyjnej materiału skutkują dodatkowo wzrostem trwałości i uwypukleniem cech smakowo-zapachowych wytłoczonych olejów oraz generowanych w procesie tłoczenia wytłoków. Równocześnie podkreśla się, że oddziaływanie podwyższoną temperaturą w ściśle określonych warunkach nie wywołuje niekorzystnych zmian w profilu kwasów tłuszczowych oraz nie zwiększa stopnia utlenienia świeżego materiału. Większość danych potwierdza również wzrost zawartości związków fenolowych w surowcu oraz w powstałych wytłokach. Brak jest jednak jednoznacznych danych

dotyczących tokoferoli i tokotrienoli. Kierunek zmian w przypadku tych związków był zazwyczaj bezpośrednio związany z rodzajem homologu oraz z zastosowanymi warunkami procesu (Hama, 2017; Iqbal i in., 2016; Kosary, Bujdoso, Szentivanyi, Rehus, Emmert i Frakas 2009; Rękas i in., 2017; Siegmund i Murkovic, 2004; Siger i in., 2017; Xu, Jiang, Meng, Li i Liu, 2014). Pozytywne efekty obróbki termicznej surowców oleistych stanowią najprawdopodobniej wypadkową wzrostu zawartości związków fenolowych i przeciwutleniających produktów reakcji Maillarda oraz zahamowania aktywności lipooksygenazy, co w konsekwencji eliminuje wpływ procesów utleniania enzymatycznego na ogólne zmiany oksydacyjne (Anese i Sorvano, 2006; Fu i in., 2016; Raczyk i in., 2017).

3.3.1 Potencjał antyoksydacyjny natywnych przeciwutleniaczy surowców oleistych

Rośliny oleiste uznawane są za jedno z najbogatszych źródeł związków o charakterze przeciwutleniającym, które już przy bardzo niskich stężeniach wykazują zdolność do ograniczania lub opóźniania procesów oksydacyjnych zachodzących w surowcach oraz produktach otrzymanych w wyniku ich przerobu (Kouba, Mhemdi i Vorobiev, 2015; Oroian i Escriche, 2015). W składzie surowców oleistych zidentyfikowano przeciwutleniacze o charakterze lipofilowym i hydrofilowym, przy czym zaznacza się, że za potencjał antyoksydacyjny w ok. 95% odpowiadają związki polarne, a tylko w 5% substancje towarzyszące frakcji tłuszczowej (Arranz, Pérez-Jiménez i Saura-Calixto, 2008).

Dominującą grupą natywnych przeciwutleniaczy surowców oleistych są związki fenolowe. Nasiona rzepaku, słonecznika i soi, pestki dyni oraz orzechy i owoce drzewa oliwnego syntetyzują przede wszystkim wolne lub estrowo związane kwasy hydroksyfenolowe, w tym kwas p-kumarowy, p-hydroksybenzoesowy, ferulowy, kawowy i wanilinowy oraz wybrane flawonoidy, jak katechinę, epikatechinę czy kwercetynę. W nasionach rzepaku dominującym związkiem jest cholinowy ester kwasu synapinowego oraz kwas synapinowy (Siger i in., 2017). W orzechach zidentyfikowano przede wszystkim kwas galusowy, kawowy i wanilinowy, a w przypadku orzechów włoskich dodatkowo kwas elagowy i elagotaniny (Azadmard-Damirichi, Emami, Hesari, Peighambardoust i Nemati, 2011; Blomhoff, Carlsen, Andersen i Jacobs, 2006). Nasiona soi są bogatym źródłem izoflawonów, siemię lniane - lignów, a nasiona słonecznika i oliwki – katechin i epikatechin (Bahaciu, Segal i Nocilae, 2015; Bhise i in, 2014). Jak widać profil związków fenolowych jest cechą charakterystyczną dla każdego rodzaju surowca, chociaż często różnicuje się również w jego obrębie. Wpływ na taki stan rzeczy ma

fakt, że oprócz gatunku rośliny, stopień syntezy związków fenolowych zależy od stadium jej rozwoju, warunków agrotechnicznych i klimatycznych oraz czasu przechowywania surowca po zbiorach. Liczba wszystkich wymienionych związków znacząco wzrasta wówczas, gdy surowiec narażony zostanie na działanie tzw. czynników stresogennych, w tym m.in. promieniowania UV, wahań temperatury, obecności mikroorganizmów patogennych i owadów oraz przy nadmiernym stężeniu CO_2 (Boussetta, Soichi, Lanoiselle i Vorobiev, 2014; Breeze i in., 2015; Ganesan i Xu, 2017; Lago i in., 2014; Vinson i Cai, 2012; Terpinc i in., 2012).

Funkcje związków fenolowych determinowane są przede wszystkim ich budową chemiczną. Cechą wspólną szkieletu kwasów fenolowych jest występowanie przynajmniej jednego pierścienia benzenowego o właściwościach hydrofobowych, połączonego z minimum jedną hydrofilową grupą hydroksylową. Taka budowa implikuje łatwe łączenie się kwasu przez grupę funkcyjną z innymi składnikami układu, w tym z alkoholami, sacharydami i innymi kwasami, przy czym najczęściej spotykaną związaną formą są glikozydy, czyli połączenia z cukrami (Huang, Ou i Prior, 2005; Oroian i Escriche, 2015; Reische, Lillard i Eitenmiller, 2002). W przypadku flawonoidów cechą wspólną związków jest szkielet zbudowany z trzech pierścieni C15 (C6-C3-C6), a elementem różnicującym – typ, ilość oraz miejsce przyłączenia grup funkcyjnych (Lago i in., 2014; Vinson i Cai, 2012). Co więcej, grupa hydroksylowa związków fenolowych może ulegać procesom autooksydacji oraz utleniania enzymatycznego (w difenolach), czego widocznym efektem jest stopniowe brunatnienie surowców (Catalá, 2017).

Związki fenolowe zidentyfikowane w surowcach oleistych mogą wykazywać aktywność tzw. przeciwutleniaczy właściwych, które stanowiąc donor atomu wodoru dla rodników, przerywają łańcuch reakcji autooksydacji, wykazując przy tym zazwyczaj większe niż cząsteczki nienasyconych kwasów tłuszczowych, powinowactwo wobec rodników peroksylowych ($ROO^{\cdot}$) i alkoksylowych ($RO^{\cdot}$). Co więcej, ich efektywność jest wyższa w początkowych etapach utleniania oraz zgodnie ze zjawiskiem „paradoksu polarności" w układach o niskim stopniu polarności (Oroian i Escriche, 2015; Yanishlieva-Maslarova, 2001; Zhong i Shahidi, 2012). Dodatkowo, aktywność ta może opierać się na zdolnościach do redukcji lub chelatowania jonów metali przejściowych oraz regeneracji antyoksydantów pierwotnych z ich form rodnikowych (Abramovič, 2015; Reische i in., 2002; Zhang i in., 2015). Kluczowy jest jednak ich sumaryczne stężenie w materiale, przy czym z punktu widzenia ograniczania procesów oksydacji bardziej pożądane są stężenia niższe, ponieważ nadmierna kumulacja

przeciwutleniaczy przyczynia się do regeneracji rodnika peroksylowego i tym samym przyśpieszenia reakcji autooksydacji (Frankel, 1998; Reische i in., 2002). Nasilenie tempa reakcji rodnikowej może również nastąpić na skutek poddania surowców oleistych, szczególnie tych bogatych w kwasy hydroksycynamonowe, zbyt długiej i niekontrolowanej ekspozycji na procesy ogrzewania termicznego. Na przykładzie kwasu kawowego udowodniono, że godzinne ogrzewanie jego roztworu w temperaturze 90°C prowadzi do rozkładu cząsteczki do związków o cechach proutleniających (Andueza, Manzocco, de Peña, Cid, i Nicoli, 2009). Twierdzi się, że wśród surowców oleistych najsilniejsze właściwości przeciwutleniające wykazują nasiona rzepaku, w których dominuje kwas synapinowy zawierający dwie dodatkowe grupy funkcyjne oraz nasiona słonecznika i orzechy, z wysokim udziałem kwasu kawowego posiadającego dwie grupy hydroksylowe. W obu przypadkach za aktywność tą odpowiada bezpośrednio budowa chemiczna przeciwutleniacza. Udowodniono, że większą skuteczność wykazują związki, w których obok grupy hydroksylowej w pierścieniu występuje dodatkowa grupa metoksylowa lub kilka grup hydroksylowych, a efektywność ta może być dodatkowo wzmacniania wówczas, gdy grupa funkcyjna stanowiąca donor atomów wodoru zlokalizowana jest w pozycji *orto* lub *para* (Andueza i in., 2009; Catalá, 2017; Frankel, 1998; Huang i in., 2005; Reische i in., 2002). Skuteczność flawonoidów warunkowana jest natomiast miejscem oraz stopniem hydroksylacji przyłączonego do dwóch skondensowanych pierścieni (A i C) pierścienia B (Lago i in., 2014; Liu i in., 2017).

Surowce oleiste na tle innych roślin zawierają znaczące ilości tokoferoli. Uznaje się, że jednym z najbogatszych źródeł tych związków są orzechy, a wśród nich przede wszystkim orzechy włoskie, laskowe i migdały, w których stwierdzono obecność wszystkich homologów tokoferoli (Azadmard-Damirichi i in., 2011; Bakkalbasi i in., 2012; Kornsteiner, Wagner i Elmadfa, 2006). W pozostałych surowcach oleistych występują głównie homologi γ- i α-, przy czym dobrym źródłem pierwszego z nich są nasiona sezamu (521 - 983 mg/kg oleju), soi (89 - 2307 mg/kg oleju) oraz rzepaku (189 - 753 mg/kg oleju). Drugi natomiast w dużych ilościach występuje w nasionach słonecznika (403 - 935 mg/kg oleju) i rzepaku (100 - 386 mg/kg oleju) (Oreaopoulou i Tzia, 2007; Sahin i Elhussein, 2018; Siger i in., 2017). Tokoferole podobnie jak związki fenolowe wykazują aktywność zarówno przeciwutleniaczy właściwych, jak i synergentów, przy czym efektywniej działają one w fazie propagacji reakcji rodnikowej oraz w układach charakteryzujących się wysoką polarnością. Co więcej, jako jedne z niewielu związków wygaszają tlen singletowy ($^1O_2$) do jego mniej aktywnego stanu tripletowego, dzięki

czemu częściowo łagodzą procesy utleniania fotosensybilizowanego (Oroian i Escriche, 2015; Yanishlieva-Maslarova, 2001).

W ślad za surowcami oleistymi, równie wysoką zawartością związków fenolowych charakteryzują się produkty powstające podczas ich przerobu. Są to przede wszystkim wytłoki, które biorąc pod uwagę aspekty ekologiczne, ekonomiczne oraz ciągłe dążenie sektora spożywczego do wydłużania okresu trwałości produktów, mogłyby stać się jednym z ważniejszych źródeł naturalnych przeciwutleniaczy wykorzystywanych w stabilizacji lipidów żywności (Arranz i in., 2008; Matthäus, 2002). W badaniach Sielickiej i Małeckiej (2016) ekstrakty związków fenolowych otrzymane z wytłoków lnianych wykazały wyższą, w porównaniu do BHT, skuteczność w hamowaniu zmian oksydacyjnych zachodzących w trakcie 3-tygodniowego przechowywania tłoczonego na zimno oleju lnianego w temperaturze 40°C. Związki fenolowe wytłoków lnianych również skutecznie ograniczały zmiany w profilu kwasów tłuszczowych oraz utlenianie lipidów i cholesterolu w wieprzowych klopsach przechowywanych pół roku w warunkach mroźniczych (Waszkowiak i Rudzińska, 2014). Kmiecik, Korczak, Rudzińska, Gramza-Michałowska, Hęś i Kobus-Cisowska (2015) udowodnili natomiast, że ekstrakty otrzymane z wytłoków rzepakowych mogą przeciwdziałać utlenianiu fitosteroli, wykazując przy tym wyższą skuteczność niż komercyjne ekstrakty z rozmarynu i zielonej herbaty, mieszaninach tokoferoli, czy BHT.

Złożony mechanizm działania przeciwutleniaczy, zależny od rodzaju układu, do którego zostały włączone oraz sposobu ich ekstrakcji z materiału wciąż przekłada się jednak na brak wiedzy i w konsekwencji na potrzebę kontynuacji badań w tym obszarze. Prace naukowe w szegółności skupiają się na ocenie potencjalnych skutków implementacji natywnych przeciwutleniaczy do żywności i uwzględniają aspekt technologiczny, zdrowotny i żywieniowy. W większości przypadków ten niedostateczny stan wiedzy przekłada się również na brak stosownych uregulowań prawnych zezwalających na stosowanie ww. ekstraktów. Obecnie wyjątek stanowi ekstrakt z rozmarynu, na mocy Dyrektywy Komisji 2010/67/UE umieszczony na liście dozwolonych substancji dodatkowych do żywności (Dyrektywa Komisji 2010/67/UE, 2010).

3.3.2 Metody hamowania aktywności lipooksygenazy

Ze względu na inicjowanie procesów utleniania kwasów tłuszczowych oraz znaczący udział w syntezie nieprzyjemnych zapachów, obecność lipooksygenazy w surowcach oleistych jest cechą niepożądaną i dąży się do możliwie jak największego ograniczenia jej aktywności (Porta i Rocha-Sosa, 2002). Wśród metod, którym poświęca się obecnie najwięcej uwagi są procesy termiczne oraz wykorzystanie związków o charakterze przeciwutleniającym, w tym przede wszystkim związków fenolowych.

Metody fizyczne

Lipooksygenaza bez względu na pochodzenie biologiczne oraz typ, może być inaktywowana termicznie, zwykle poprzez krótkotrwałe oddziaływanie temperatury wyższej niż 60°C (Anese i Sovrano, 2006; Anthon i Barret, 2003; Busto, Owusu Apenten, Robinson, Wu, Casey i Hughes, 1999; Smith, Linforth i Tucker, 1997). Czasami sugeruje się jednak, że nawet po inaktywacji enzym ten może wciąż w niewielkim stopniu katalizować procesy utleniania, uwalniając podczas dysocjacji jon żelaza, który następnie oddziałuje na cząsteczkę dowolnego kwasu tłuszczowego (Frankel, 1998). Ponadto, w przypadku surowców sypkich poddanych procesowi suszenia termicznego takich jak np. sproszkowana papryka lub suszone zioła nie wyklucza się możliwości regeneracji enzymu w momencie przechowywania materiału w otoczeniu o nadmiernej wilgotności (Schweigger, Schieber i Carle, 2005). Za najbardziej termooporne uznawane są lipooksygenazy pochodzące z nasion soi, które do całkowitej inaktywacji wymagają podniesienia temperatury surowca powyżej 100°C, dlatego dobre efekty uzyskiwano działając na nasiona ultrafioletowym światłem pulsacyjnym (PUV) oraz promieniowaniem podczerwonym w zakresie mocy 814-1003 W, co każdorazowo wiązało się ze wzrostem temperatury surowca do 140°C (Alhendi, Yang, Goodrich-Schneider i Sarnoski, 2017; Janve, Yang, Marshall, Reyes-De-Corcuera i Rababah, 2014; Yalcin i Basman, 2015). Dla większości surowców, w tym dla orzechów włoskich, migdałów, pestek dyni, grochu, fasoli, marchwi czy pomidorów, dla uzyskania zadowalających efektów, wystarczające jest jednak zastosowanie temperatur z zakresu 70-90°C, przy czym ilość czynników determinujących końcowe efekty inaktywacji bezpośrednio przekłada się na rozbieżności w dostępnych danych dotyczących tych samych surowców (Anese i Sorvano; 2006; Anthon i Barreta, 2003; Buranasompob i in., 2007; Busto i in., 1999; Gökmen i in., 2005; Jarjes i in., 2017; Kosary i in.,

2009). Zaleca się zatem, żeby zarówno temperatura, jak i czas ogrzewania dobierany był adekwatnie do stosowanej metody inaktywacji, rodzaju i odmiany surowca, stopnia jego rozdrobnienia oraz stężenia enzymu w materiale. Jest to również istotne biorąc pod uwagę fakt, że jak wskazują dotychczasowe badania, w materiale roślinnym najczęściej występują dwie izoformy enzymu, które różnią się stopniem odporności termicznej (Anese i Sovrano, 2006; Busto i in., 1999; Gökmen i in., 2005; Xu i in., 2016). Inaktywacja lipooksygenazy może zachodzić na drodze blanszowania, prażenia, tradycyjnego suszenia w strumieniu gorącego powietrza, wykorzystania fal promieniowania mikrofalowego lub podczerwonego. Cechą wspólną tych procesów jest krótkotrwałe podniesienie temperatury surowca powyżej zakresu tzw. optimum temperaturowego enzymu, czyli przedziału, w którym wykazuje on najwyższą stabilność. Przekroczenie tej maksymalnej temperatury skutkuje denaturacją części białkowej enzymu i w konsekwencji najczęściej gwałtownym spadkiem jego aktywności (Belitz i in., 2009). Przyjmuje się, że dla lipooksygenazy optimum temperaturowe zawiera się w przedziale 30-50°C, przy czym stosunkowo wysoką aktywność wykazuje ona również w temperaturze pokojowej (21-23°C). Ponadto, po przekroczeniu 60°C jej stabilność maleje w tempie zależnym od rodzaju genów (Bisswanger, 2014). Podkreśla się również, że zaletą ww. procesów jest fakt, że wraz ze wzrostem temperatury układu zahamowanie aktywności enzymów zachodzi w tempie szybszym niż degradacja składników odżywczych oraz pogorszenie cech organoleptycznych (Anese i Sovrano, 2006).

Metody chemiczne

W literaturze przedmiotu dostępny jest szereg danych dowodzących skuteczności naturalnych przeciwutleniaczy w hamowaniu aktywności katalitycznej lipooksygenazy. Zdolności takie stwierdzono dla związków polifenolowych występujących w afrykańskich przyprawach oraz ziołach kulinarnych (Dzoyem i in., 2014), nagietku (Mohamed, 2016), zielonej kawie (Gawlik-Dziki, Świeca, Dziki, Kowalska, Pecio, Durak I Sęczyk, 2014), orkiszu (Gawlik-Dziki, Świeca i Dziki, 2012), brokułach i jego kiełkach (Baraniak i Krzepiłko, 2004; Gawlik- Dziki, Świeca i Sugier, 2012) oraz zielonej i czarnej herbacie (Banerjee, 2006; Hong i in. 2001). Wśród związków o najwyższej skuteczności działania wymienia się flawonoidy, kwercetynę, luteinę, katechiny, w tym kolejno galusan (-)-epigalokatechiny (EGCG) > galusan (-)-epikatechiny (ECG) > (-)-epigalokatechina (EGC) > (-)-epikatechina (EC) oraz kwasy fenolowe – głównie kawowy, ferulowy i chlorogenowy (Lattig, i in. 2007; Schneider i Bucara, 2005a; Schneider i Bucara,

2005b; Skrzypczak-Jankun, Chorostowska-Wynimko, Selman i Jankun, 2007). Efektywność działania ww. związków zależy od pochodzenia enzymu, jego izomeru, stopnia utlenienia jonu żelaza w centrum aktywnym, a także współzawodnictwa pomiędzy aktywnością prooksydacyjną i kooksydacyjną enzymu (Borbulevych, Jankun, Selman i Skrzypczak-Jankun, 2004; Skrzypczak-Jankun i in., 2007). Co więcej, podobnie jak w przypadku autooksydacji, istotne znaczenie ma odpowiednie stężenie przeciwutleniacza w układzie oraz wzajemne proporcje poszczególnych związków, co wykazano m.in. w badaniach nad aktywnością związków fenolowych pochodzących z pestek dyni wobec lipooksygenazy sojowej (Xanthopoulou i in. 2009).

Hamowanie aktywności lipooksygenazy przez substancje przeciwutleniające zachodzi na drodze inhibicji odwracalnej, przy czym inhibitory mogą konkurować z substratem o miejsce wiązania z enzymem (inhibicja kompetycyjna) lub przyłączać się do enzymu zarówno w centrum aktywnym (ale nie w miejscu substratu), jak i w miejscu innym niż centrum aktywne (inhibicja niekompetycyjna). W pierwszym przypadku stopień zahamowania reakcji zależy od wzajemnych proporcji substratu i inhibitora, a reakcja przy zachowaniu stałej szybkości przesuwa się w stronę związku o wyższym stężeniu. Inhibicja niekompetycyjna prowadzi natomiast do spadku maksymalnej szybkość reakcji, przy zachowaniu niezmienionego powinowactwa enzym-substrat (Berg i in. 2009).

Jeden z głównych mechanizmów inaktywacji lipooksygenazy opiera się na zdolnościach przeciwutleniaczy do neutralizacji produktów pośrednich generowanych w czasie autooksydacji. Prowadzi to przede wszystkim do obniżenia stężenia wodoronadtlenków w układzie, co w konsekwencji uniemożliwia utlenienie jonu żelaza zlokalizowanego w centrum aktywnym enzymu i tym samym zablokowana zostaje możliwość jego transformacji w formę aktywną (Schewe, Kühn i Sies, 2002).

Druga z teorii zakłada, że cykl katalityczny lipooksygenazy może zostać zachwiany poprzez bezpośrednią redukcję aktywnej formy jonu żelaza Fe^{3+} do postaci żelazowej Fe^{2+}. Właściwości takie wykazano m.in dla kwasu nordihydrogwajaretowego (NDGA), naturalnego przeciwutleniacza krzewu kreozotu, wobec lipooksygenazy sojowej (Chedea i Jisaka, 2011) oraz związków z grupy izoflawonów, które stanowią donor elektronów akceptowanych przez jon żelazowy (Mahesha, Singh i Appu Roa, 2007).

Uważa się, że jednymi z najskuteczniejszych inhibitorów lipooksygenazy są flawonoidy, których grupy katecholowe wykazują zdolność do kompleksowania jonu żelaza, blokując tym

samym możliwość jego utlenienia (Banerjee 2006; Sadik, Sies i Schewe, 2003). Równocześnie u podłoża tej aktywności leży budowa strukturalna związków, w tym równoczesne występowanie ugrupowania katecholowego w pierścieniu B i grupy karbonylowej oraz wiązania podwójnego pomiędzy drugim a trzecim atomem węgla w pierścieniu C. Wspomniane wiązanie podwójne stabilizuje cały kompleks lub pośrednie związki utworzone przez cząsteczki flawonoidów oraz warunkuje płaską strukturę przestrzenną cząsteczki związku, co ułatwia jego przemieszczanie się między aromatycznymi i heteroaromatycznymi resztami aminokwasowymi w miejscu aktywnym lipooksygenazy (Hong, Smith, Ho, August i Yang, 2001; Hu, Huang, Xiong, Lou i Chen, 2006; Lattig, i in. 2007). Z drugiej strony brak wspomnianego podwójnego wiązania oraz występowanie grupy hydroksylowej przy trzecim atomie węgla (3-OH) w pierścieniu C znacząco obniża właściwości inhibicyjne flawonoidów. Twierdzi się również, że mniejszą efektywnością działania charakteryzują się flawonoidy związane z ugrupowaniem cukrowym. Ich wysoka hydrofilowość skutkuje bowiem niższym powinowactwem do lipofilnego centrum aktywnego lipooksygenazy. Bez znaczenia dla procesu inaktywacji pozostaje natomiast liczba grup hydroksylowych zawartych w pierścieniu A (Lago i in. 2014; Lattig i in. 2007; Ribeiro i in., 2014; Sadik i in., 2003). Według danych, związkiem o dużym potencjale hamowania aktywności lipooksygenazy jest kwercetyna. Stwierdzono, że jej działanie opiera się m.in. na wydłużeniu fazy indukcji aktywacji lipooksygenazy oraz natychmiastowym obniżaniu początkowej szybkości reakcji katalizowanych przez enzym zaraz po przekroczeniu fazy inicjacji. Ponadto, lepszym interakcjom kwercetyny z lipooksygenazą sprzyja zasadowe środowisko reakcji (Chedea i Jisaka, 2011; Chedea, Vicas, Oprea i Socaciu, 2006; Schewe i Sies, 2003).

Zahamowanie aktywności lipooksygenazy może być również efektem jej interakcji z wybranymi związkami, w tym izoflawonami, które współzawodniczą z wodoronadtlenkami o miejsce wiązania z enzymem, przy czym stwierdzono 2-krotnie wyższą efektywność genistyny w porównaniu z daidzeiną (Mahesha i in., 2007; Vicaş, Chedea i Socaciu, 2011). Udowodniono również, że skutecznymi inhibitorami, które wiążą się przez grupy sulfohydrylowe lub aminowe z enzymem są półchinony i chinony powstałe z flawonoidów podczas tworzenia rodnika kwasu tłuszczowego (Banerjee, 2006, Lago i in. 2014; Schewe i Sies, 2003).

Pośrednio w hamowaniu aktywności lipooksygenazy udział biorą również związki z grupy karotenoidów, w tym przede wszystkim β-karoten i likopen. Stwierdzono, że β-karoten

wykazuje zdolności do blokowania utleniania jonu żelaza w centrum aktywnym enzymu, ogranicza ilość niezbędnych do aktywacji wodoronadtlenków w układzie poprzez przerywanie reakcji łańcuchowej hydroperoksydacji kwasu linolowego na początkowym jej etapie, jak również oddziałuje jako aktywny czynnik wychwytujący rodniki nadtlenkowe wytwarzane w szlaku lipooksygenazy (Biacs i Daood, 2000; Chedea i Jisaka, 2011; Chadea, i in. 2006; Lomnitski, Bar-Natan, Sklan, Grossman, 1993; Pastore i in., 2000; Serpen i Gökmen, 2006; Vicaş i in., 2011). Z kolei Hazai, Bikádi, Zsila i Lockwood (2006) na podstawie modelowania molekularnego wykazali, że likopen z dużym powinowactwem może wiązać się z centrum aktywnym enzymu i w ten sposób bezpośrednio hamować na drodze inhibicji kompetycyjnej aktywności enzymu.

Reasumując, dotychczasowe wyniki badań wskazują, że mechanizm zahamowania aktywności lipooksygenazy przez natywne przeciwutleniacze może zachodzić na drodze bezpośredniego oddziaływania wybranego związku w obrębie centrum aktywnego enzymu oraz pośrednio w wyniku eliminowania przez antyoksydant czynników niezbędnych do przejścia enzymu w stan aktywny. Najprawdopodobniej jednak końcowy efekt stanowi wypadkową wszystkich omówionych w podrozdziale reakcji (Chedea i Jisaka, 2011; Skrzypczak-Jankun i in., 2007).

***

Równoczesne występowanie w składzie orzechów włoskich ponadprzeciętnej ilości kwasu linolowego oraz wysoce reaktywnej wobec niego lipooksygenazy stanowi podstawę do uznania tych orzechów za surowce szczególnie podatne na procesy oksydacyjne. W literaturze przedmiotu dostępny jest szereg danych dotyczących oceny trwałości tego rodzaju orzechów oraz otrzymywanego z nich oleju. Wciąż znikoma jest jednak wiedza o wytłokach pozostających po procesie tłoczenia, a pojawiające się nieliczne doniesienia naukowe bardzo często są rozbieżne (Ahad i in., 2017; Ling i in., 2014; Martínez, Penci, Ixtaina, Ribotta i Maestri, 2013; Vaidya i Eun, 2013). Dotychczas prowadzone badania skupiły się na określeniu optymalnego czasu i warunków składowania mąk wytłokowych, w których za podstawę do wnioskowania każdorazowo przyjmowano zmiany w zawartości produktów utleniania. Według Vanhanen i Savage (2006), przechowywanie wytłoków w temperaturze 23°C w pojemnikach wykonanych z polipropylenu lub w papierowych torebkach z powłoką PVP zapewnia zachowanie wszystkich właściwości surowca, bez znaczących zmian oksydacyjnych,

przez 26 tygodni. Natomiast Labuckas i in., (2011), za optymalny czas składowania wytłoków w puszkach wykonanych z aluminium, w temperaturze pokojowej, podali 8 miesięcy. Z kolei według Ling i in. (2014) maksymalny czas przechowywania wytłoków w temperaturze 25°C, w którym zmiany oksydacyjne są jeszcze akceptowalne, to tylko 2 miesiące, przy czym na tempo zachodzących zmian nie miała żadnego wpływu eliminacja tlenu z opakowania. Istotne jest także to, że w dotychczasowych badaniach skupiono się jedynie na monitorowaniu przebiegu zmian wywołanych autooksydacją, bez podjęcia prób wyjaśnienia roli aktywności lipooksygenazy oraz potencjału antyoksydacyjnego natywnych przeciwutleniaczy. Brak jest również danych o możliwościach wykorzystania w stabilizacji wytłoków procesów utrwalania termicznego, które z powodzeniem były już wykorzystywane w przypadku jąder orzechów włoskich (Iqbal i in., 2016).

Biorąc powyższe pod uwagę, istnieje konieczność zdobycia nowej wiedzy na temat kierunku i zasięgu zmian oksydacyjnych zachodzących w wytłokach z orzecha włoskiego, szczególnie w kontekście wzajemnych powiązań procesów chemicznych i enzymatycznych z uwzględnieniem aktywności natywnych przeciwutleniaczy. Ich poznanie może stanowić punkt wyjścia dla prac badawczo-rozwojowych nad możliwością zastosowania wytłoków w przemyśle spożywczym.

4.Założenia badawcze, cel pracy i hipotezy badawcze

Rosnące zainteresowanie produktami ubocznymi przemysłu olejarskiego, których wykorzystanie ściśle wpisuje się zarówno w wiodące trendy na rynku żywności, jak i jest zgodne z ideą zrównoważonego rozwoju, daje nadzieję na możliwość wykorzystania wytłoków z orzecha włoskiego w przemyśle spożywczym. Będzie to jednak możliwe jedynie wówczas, gdy będą one charakteryzowały się wysoką jakością oraz bezpieczeństwem. Podczas przechowywania surowców roślinnych oraz produktów spożywczych zachodzą bowiem liczne procesy ograniczające ich trwałość, czego finalnym efektem jest ogólne obniżenie jakości i przydatności technologicznej.

Wytłoki z orzecha włoskiego uznawane są za surowiec o szczególnie wysokiej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, charakteryzujący się równocześnie ponadprzeciętnym potencjałem przeciwutleniającym. W konsekwencji stanowi to podstawę do stwierdzenia, że jego trwałość warunkowana jest przede wszystkim tempem i zasięgiem zmian zachodzących pod wpływem oddziaływania przeciwstawnych sobie czynników. Z jednej strony są to chemiczne i enzymatyczne procesy utleniania kwasów tłuszczowych, z drugiej – efekty aktywności natywnych związków fenolowych. Obecnie jednak brak jest kompleksowej wiedzy w tym obszarze, potwierdzającej powyższe założenia. Dodatkowo, większość prowadzonych dotychczas badań naukowych dotyczących stabilności frakcji lipidowej została poświęcona roli i ograniczaniu procesów autooksydacji, w dużym stopniu marginalizując znaczenie enzymów oksydacyjnych. Biorąc powyższe pod uwagę, w pracy skupiono się na diagnozie wpływu wymienionych czynników na stabilność oksydacyjną frakcji lipidowej wytłoków z orzecha włoskiego.

Cel pracy i hipotezy badawcze

Celem podjętych badań była ocena działania czynników determinujących stabilność oksydacyjną frakcji tłuszczowej wytłoków z orzecha włoskiego, a także wydłużenie okresu trwałości tego surowca, co warunkuje możliwość jego zagospodarowania jako surowca dla przemysłu spożywczego. W pracy skupiono się na współoddziaływaniu procesów zachodzących z udziałem natywnych przeciwutleniaczy z procesami oksydacyjnymi o podłożu chemicznym i enzymatycznym oraz ich wzajemnym przeciwstawnym wpływie na stabilność wytłoków z orzecha włoskiego.

Sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. Związki fenolowe działają jako inhibitory natywnej lipooksygenazy w wytłokach z orzecha włoskiego.
2. Ogrzewanie wytłoków z orzecha włoskiego w ściśle kontrolowanych warunkach czasu i temperatury zwiększa jego stabilność oksydacyjną.

W celu zweryfikowania postawionych hipotez wyznaczono cztery cele szczegółowe:

1. Ocena stabilności oksydacyjnej frakcji tłuszczowej oraz potencjału przeciwutleniającego wytłoków z orzecha włoskiego podczas przechowywania.
2. Ocena wpływu związków fenolowych na aktywność natywnej lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego.
3. Ocena wpływu czasu i temperatury ogrzewania na aktywność lipooksygenazy, stabilność oksydacyjną i potencjał antyoksydacyjny wytłoków z orzecha włoskiego.
4. Ocena wpływu termicznej inhibicji lipooksygenazy na zachowanie stabilności oksydacyjnej i potencjału przeciwutleniającego wytłoków z orzecha włoskiego podczas przechowywania – badania modelowe nad możliwością zastosowania surowca w przemyśle spożywczym (na przykładzie wybranych produktów).

5. Przedmiot i zakres badań

Przedmiot badań

Podstawowy materiał badany stanowiły wytłoki z orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) otrzymane od lokalnego producenta olejów tłoczonych na zimno, pochodzące z trzech kolejnych sezonów: 2014, 2015, 2016.

Zakres badań

Badania zostały podzielone na pięć głównych etapów, których zakres odpowiadał realizacji celów szczegółowych (Tabela 9). Zostały one poprzedzone charakterystyką składu chemicznego i wybranych właściwości fizykochemicznych wytłoków z orzecha włoskiego (etap 0). Oznaczono wilgotność i aktywność wody, zawartość białka, tłuszczu i włókna surowego, udział składników frakcji popiołowej oraz profil kwasów tłuszczowych. Ponadto, scharakteryzowano typ oraz warunki optymalnej aktywności lipooksygenazy.

W pierwszym etapie badań (etap 1) podczas trwających 12 miesięcy testów przechowalniczych określono podatność surowca na procesy oksydacyjne, przyjmując za kryterium oceny zawartość nadtlenków. Ponadto, oceniono stopień aktywności lipooksygenazy, stężenie ditlenku węgla oraz zmiany potencjału przeciwutleniającego.

Następnie (etap 2) w badaniach modelowych oceniono wpływ zmian oksydacyjnych zachodzących w przechowywanych wytłokach z orzecha włoskiego na trwałość wybranych produktów spożywczych w czasie ich przechowywania oraz skuteczność etanolowych ekstraktów wyodrębnionych z wytłoków w ochronie substratu lipidowego przed utlenianiem. W tym celu przygotowano modelowy produkt – koncentrat ciasta w proszku na bazie wytłoków z orzecha włoskiego, w którym w badaniach przechowalniczych monitorowano zasięg pierwotnych zmian oksydacyjnych w odniesieniu do próbki kontrolnej przygotowanej z użyciem mąki pszennej. Badaniom poddano również próbki tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich[1] stabilizowane ekstraktami wyodrębnionymi z wytłoków z orzecha

[1] W badaniach modelowych wykorzystno olej z orzechów włoskich uznawany za produkt niszowy, obecnie na szeroką skalę produkowany jedynie w krajach Europy południowej, Francji, Chile i Argentynie, a w niewielkich ilościach również w Polsce (Sandulachi, Chirita i Costis, 2013). W oleju tym jedno i wielonienasycone kwasy tłuszczowe (oleinowy, linolowy i α-linolenowy) stanowią ponad 90% łącznej sumy kwasów tłuszczowych (Martínez i in,m 2013; Rabadán i in., 2018a), co implikuje jego wzmożoną podatność na procesy oksydacyjne, a głównym czynnikiem przeciwdziałającym tym procesom są naturalnie występujące w surowcu tokoferole.

włoskiego bezpośrednio po otrzymaniu ich od producenta oraz z wytłoków przechowywanych przez 8 miesięcy. Próbki poddano testom przyśpieszonego starzenia i monitorowano zasięg zmian oksydacyjnych.

Trzeci etap (3) stanowił ocenę zdolności związków fenolowych do ograniczania aktywności natywnej lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego. W badaniach wykorzystano ekstrakty pozyskane z wytłoków z orzecha włoskiego oraz modelowe kwasy fenolowe.

W kolejnym etapie (4) skupiono się na możliwości ograniczenia zasięgu zmian oksydacyjnych zachodzących w wytłokach z orzecha włoskiego w czasie ich składowania, poddając surowiec ogrzewaniu. Na podstawie wyników badań obejmujących 30 wariantów czasu i temperatury wybrano warunki procesu, które gwarantowały zahamowanie aktywności lipooksygenazy na założonym poziomie, przy równoczesnym zminimalizowanym negatywnym wpływie na procesy autooksydacji oraz potencjał przeciwutleniający surowca.

W ostatnim etapie (5) zweryfikowano słuszność przyjętych założeń poprzez zbadanie wpływu termicznej inaktywacji lipooksygenazy na zachowanie stabilności oksydacyjnej i potencjału przeciwutleniającego wytłoków z orzecha włoskiego podczas przechowywania. W tym celu przeprowadzono badania z wykorzystaniem:

- koncentratu ciasta w proszku przygotowanego na bazie wytłoków z orzecha włoskiego, przechowywanego w temperaturze pokojowej (21±2°C) przez 8 miesięcy;
- tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich stabilizowanego ekstraktami pozyskanymi z wytłoków z orzecha włoskiego poddanych uprzednio obróbce termicznej w warunkach ustalonych w etapie czwartym.

Utlenialność oleju z orzechów włoskich wyznaczona teoretycznie wynosi 0,84, co wskazuje, że może on utleniać się 10,5-krotnie szybciej niż olej z orzechów makadamia czy 7,5-krotnie szybciej niż olej z orzechów laskowych (Kondratowicz-Pietruszka, 2017). Pomimo faktu, że orzechy włoskie uznawane są za surowiec wykazujący jedne z najsilniejszych właściwości przeciwutleniających, to tylko w ok. 5% zależne jest to od antyoksydantów rozpuszczalnych w fazie tłuszczowej. Pozostałe 95% przypisuje się natomiast związkom fenolowym, które podczas procesu tłoczenia zostają zachowane w wytłokach (Arranz i in., 2008; Tapia i in., 2013). Ten wysoki stopień utlenialności oleju z orzechów włoskich przy równocześnie wysokim potencjale antyoksydacyjnym wytłoków pozostających po jego wytłoczeniu oraz możliwość wykorzystania związków fenolowych pochodzących z tych wytłoków już na etapie produkcji, stały się podstawą wyboru do badań właśnie tego rodzaju oleju. Wydaje się to bowiem najprostszym sposobem równoczesnego rozwiązania problemów związanych ze stabilnością oleju oraz zagospodarowaniem pozostałości poprodukcyjnych powstających w czasie jego otrzymywania.

Tabela 9. Charakterystyka poszczególnych etapów badań

CHARAKTERYSTYKA I WARUNKI PROWADZENIA BADANIA	METODY BADAŃ
(0) Charakterystyka materiału badanego	
Charakterystyka wytłoków z orzecha włoskiego bezpośrednio po otrzymaniu od producenta pod kątem czynników, które mogłyby istotnie rzutować na ich trwałość. Oznaczono: ▪ zawartość podstawowych składników, ▪ właściwości fizykochemiczne. Badania wykonano dla 3 kolejnych partii wytłoków z orzecha włoskiego.	▪ wilgotność – metoda suszarkowo-wagowa ▪ zawartość białka – metoda Kjeldahla ▪ zawartość tłuszczu – metoda ekstrakcyjno-wagowa ▪ udział frakcji popiołowej – metoda mineralizacji „na sucho” ▪ zawartość włókna surowego – metoda Scharrera-Kürschnera ▪ wyznaczenie zawartości węglowodanów i wartości energetycznej – metoda obliczeniowa ▪ oznaczenie aktywności wody (a_w) ▪ oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych – metoda analizy estrów metylowych kwasów tłuszczowych za pomocą chromatografii gazowej

Ocena aktywności lipooksygenazy – oznaczenie typu i warunków optymalnej aktywności Badania miały na celu: 1) dobranie warunków pomiarowych aktywności lipooksygenazy, w celu standaryzacji metodyki wykorzystywanej w kolejnych etapach pracy. Określono: ▪ optymalną wartość pH buforu wykorzystywanego do ekstrakcji lipooksygenazy z wytłoków z orzecha włoskiego, ▪ optymalną wartość pH buforu wykorzystywanego do przygotowania mieszaniny reakcyjnej, ▪ wpływ stężenia enzymu w mieszaninie reakcyjnej na rejestrowaną aktywność. 2) określenie aktywności lipooksygenazy w wytłokach z orzecha włoskiego Badania wykonano dla 3 kolejnych partii wytłoków z orzecha włoskiego.	▪ metoda spektrofotometryczna
(1) Ocena stabilności oksydacyjnej frakcji tłuszczowej oraz potencjału przeciwutleniającego wytłoków z orzecha włoskiego podczas przechowywania	
Ocena stabilności oksydacyjnej frakcji tłuszczowej wytłoków z orzecha włoskiego podczas jego przechowywania. Przez okres 12 miesięcy, cyklicznie co 50 dni monitorowano: ▪ aktywność lipooksygenazy, ▪ zasięg zmian oksydacyjnych we frakcji lipidowej,	▪ zasięg zmian oksydacyjnych – badanie zawartości nadtlenków (liczba nadtlenkowa) ▪ aktywność lipooksygenazy – metoda spektrofotometryczna ▪ wilgotność – metoda suszarkowo-wagowa

▪ wilgotność, ▪ aktywność wody wytłoków z orzecha włoskiego przechowywanych w zamkniętych szklanych pojemnikach bez dostępu światła, w temperaturze pokojowej (21±2ºC). Badania wykonano dla 3 kolejnych partii wytłoków z orzecha włoskiego.	▪ aktywność wody (a_w)
Monitorowanie zmian potencjału przeciwutleniającego wytłoków z orzecha włoskiego podczas przechowywania. Z wytłoków bezpośrednio po otrzymaniu od producenta przygotowano etanolowe ekstrakty, w których oznaczono: ▪ profil związków fenolowych, ▪ ogólną zawartość związków fenolowych, ▪ zawartość flawonoidów, ▪ potencjał przeciwutleniający: właściwości redukujące; aktywność przeciwrodnikowa oraz hamowanie degradacji β-karotenu. Następnie przez okres 12 miesięcy, cyklicznie co 50 dni wyodrębniano z przechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego etanolowe ekstrakty, w których oznaczano: zawartość związków fenolowych i flawonoidów oraz potencjał antyoksydacyjny. Dodatkowo monitorowano zmiany stężenia ditlenku węgla w bezpośrednim otoczeniu próbki. Badania wykonano dla 3 kolejnych partii wytłoków z orzecha włoskiego.	▪ profil związków fenolowych – metoda ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) ▪ ogólna zawartość związków fenolowych – metoda Folina-Ciocalteu ▪ zawartość flawonoidów – metoda spektrofotometryczna ▪ właściwości redukujące – test FRAP ▪ aktywność przeciwrodnikowa – test DPPH ▪ hamowanie degradacji β-karotenu – metoda spektrofotometryczna z wykorzystaniem modelowej emulsji kwas linolowy/β-karoten ▪ stężenie ditlenku węgla

(2) Wpływ zmian oksydacyjnych zachodzących w przechowywanych wytłokach z orzecha włoskiego na trwałość wybranych produktów spożywczych – badania modelowe	
Ocena wpływu czasu przechowywana i zmian zachodzących w obrębie frakcji tłuszczowej wytłoków z orzecha włoskiego na trwałość produktów modelowych. W tym celu przygotowano: ▪ koncentrat ciasta w proszku na bazie wytłoków z orzecha włoskiego, w którym podczas przechowywania (8 miesięcy, w temperaturze 21±2ºC) oceniano zasięg zmian oksydacyjnych frakcji tłuszczowej względem próbki kontrolnej przygotowanej na bazie mąki pszennej, ▪ próbki tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich stabilizowane ekstraktami otrzymanymi z wytłoków świeżych oraz przechowywanych przez 8 miesięcy, w których podczas przechowywania (15 dni, w temperaturze 50±2ºC) monitorowano zasięg zmian oksydacyjnych.	▪ zasięg zmian oksydacyjnych – badanie zawartości nadtlenków (liczba nadtlenkowa) ▪ wilgotność – metoda suszarkowo-wagowa ▪ aktywność wody (a_w)

(3) Ocena wpływu związków fenolowych na aktywność natywnej lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego	
Ocena zdolności związków fenolowych do hamowania aktywności natywnej lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego. W badaniach wykorzystano: ▪ etanolowe ekstrakty otrzymane z wytłoków z orzecha włoskiego (zakres stężeń od 0,005 do 0,01%) ▪ modelowe fenolokwasy: kwas galusowy, elagowy, kawowy, ferulowy, synapinowy, wanilinowy (zakres stężeń od 0,05 do 0,5mM). Przeciwutleniacze inkubowano wraz z enzymem przez 10 minut, a następnie wykonywano pomiar absorbancji próbek zgodnie z metodyką oznaczania aktywności lipooksygenazy.	▪ metoda spektrofotometryczna
(4) Ocena wpływu czasu i temperatury ogrzewania na aktywność lipooksygenazy, stabilność oksydacyjną i potencjał antyoksydacyjny wytłoków z orzecha włoskiego	
Ocena możliwości ograniczenia zasięgu zmian oksydacyjnych zachodzących w wytłokach z orzecha włoskiego w czasie ich przechowywania poprzez termiczną inaktywację lipooksygenazy.	▪ zasięg zmian oksydacyjnych – badanie zawartości nadtlenków (liczba nadtlenkowa) ▪ zasięg wtórnych zmian oksydacyjnych – badanie stężenia heksanalu – metoda chromatografii gazowej z

W tym celu wytłoki poddano ogrzewaniu w strumieniu gorącego powietrza. Zastosowano kombinację pięciu wariantów temperatury (50 60 70 90 i 100°C) z pięcioma czasami (2, 4, 6, 10 i 20 min) ogrzewania, oznaczając każdorazowo: ▪ aktywność lipooksygenazy, ▪ zasięg zmian oksydacyjnych frakcji tłuszczowej, ▪ ogólną zawartość związków fenolowych, ▪ potencjał przeciwutleniający etanolowych ekstraktów. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej metodą regresji powierzchni odpowiedzi i na tej podstawie wybrano optymalną temperaturę i czas ogrzewania tj. takie, przy których enzym wykazywał założoną aktywność, a proces nie wpływał negatywnie na stabilność oksydacyjną i potencjał przeciwutleniający.	wykorzystaniem techniki statycznego headspace do badania fazy nadpowierzchniowej (SHS-GC) ▪ aktywność lipooksygenazy – metoda spektrofotometryczna ▪ ogólna zawartość związków fenolowych – metoda Folina-Ciocalteu ▪ właściwości redukujące – test FRAP ▪ aktywność przeciwrodnikowa – test DPPH
(5) Ocena wpływu termicznej inhibicji lipooksygenazy na zachowanie stabilności oksydacyjnej i potencjału przeciwutleniającego wytłoków z orzecha włoskiego podczas przechowywania – badania modelowe	
Ocena wpływu termicznej inaktywacji lipooksygenazy na zachowanie stabilności oksydacyjnej i potencjału przeciwutleniającego wytłoków z orzecha włoskiego podczas przechowywania. W tym celu przeprowadzono badania z wykorzystaniem: ▪ koncentratu ciasta w proszku na bazie wytłoków z orzecha włoskiego, w którym podczas przechowywania (8 miesięcy, w temperaturze 21±2°C)	▪ zasięg zmian oksydacyjnych – badanie zawartości nadtlenków (liczba nadtlenkowa) ▪ zasięg wtórnych zmian oksydacyjnych – badanie stężenia heksanalu – metoda chromatografii gazowej (SHS-GC) ▪ wilgotność – metoda suszarkowo-wagowa ▪ aktywność wody (a_w)

oceniano zasięg zmian oksydacyjnych frakcji tłuszczowej względem próbki kontrolnej przygotowanej na bazie mąki pszennej, ▪ próbkek tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich stabilizowanych ekstraktami otrzymanymi z wytłoków świeżych oraz przechowywanych przez 8 miesięcy, w których podczas przechowywania (15 dni, w temperaturze 50±2°C) monitorowano zasięg zmian oksydacyjnych. W koncentratach ciasta w proszku w trakcie 8-miesięcznego przechowywania w temperaturze 21±2°C porównywano zasięg zmian oksydacyjnych zachodzących w próbkach przygotowanych na bazie wytłoków poddanych i niepoddanych procesowi termicznej inaktywacji lipooksygenazy. W próbkach tłoczonego na zimno oleju zastosowano 0,1% dodatek etanolowego ekstraktu otrzymanego z wytłoków poddanych ogrzewaniu oraz poddanych ogrzewaniu i przechowywanych przez okres 8 miesięcy. W testach przyśpieszonego starzenia (w czasie 15 dni w temperaturze 50±2°C) badano wpływ ogrzewania oraz przechowywania wytłoków na skuteczność wytłoków hamowania zmian oksydacyjnych zachodzących w oleju.	

6. Metody badawcze

6.1. Charakterystyka składu chemicznego i wybranych właściwości fizykochemicznych

Charakterystykę składu chemicznego oraz wybranych właściwości fizykochemicznych przeprowadzono dla:

- wytłoków z orzecha włoskiego pochodzących z trzech kolejnych sezonów,
- koncentratów ciasta w proszku otrzymanych na bazie mąki pszennej i wytłoków z orzecha włoskiego.

Dla wytłoków z orzecha włoskiego oznaczono: wilgotność, aktywność wody, zawartość białka, tłuszczu, składników frakcji popiołowej, włókna surowego, profil kwasów tłuszczowych. Dodatkowo oszacowano zawartość węglowodanów ogółem oraz wartość energetyczną.

W koncentratach ciasta w proszku określono wilgotność, aktywność wody oraz zawartość białka i tłuszczu.

Oznaczenie wilgotności

Wilgotność wyznaczono metodą suszarkowo-wagową, susząc próbki w temperaturze 105°C do ustalenia się stałej masy (nr 925.09, Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 2000). Analizę przeprowadzono w trzech równoległych powtórzeniach dla każdej próbki. Wyniki wyrażono w g/100 g surowca.

Oznaczenie aktywności wody

Aktywność wody (a_w) oznaczano zgodnie z metodyką zawartą w normie ISO 21807:2004 (Standard International Organization for Standardization [ISO], 2004]) przy użyciu aparatu Novasina ms 1-aw (Novasina, Szwajcaria). Analizę przeprowadzano każdorazowo w trzech równoległych powtórzeniach dla każdej z przygotowanych próbek.

Oznaczenie zawartości białka

Oznaczenie zawartości białka wykonano metodą Kjeldahla zgodnie z metodyką nr 979.09 AOAC (AOAC, 2000), wykorzystując współczynnik przeliczeniowy azotu na białko równy 6,25. Do badań wykorzystano jednostkę do mineralizacji próbek „na mokro” model K-425/436 oraz

destylarkę z parą wodną model K-355 marki Bűchi Labortechnik. Analizę przeprowadzono w trzech równoległych powtórzeniach dla każdej badanej próbki. Wyniki wyrażono w g/100 g surowca.

Oznaczenie zawartości tłuszczu

Oznaczenie zawartości tłuszczu przeprowadzono metodą ekstrakcyjno-wagową Randalla, wykorzystując w tym celu aparat SER 148/3 firmy VELP. Tłuszcz z uprzednio podsuszonych wytłoków z orzecha włoskiego (w temperaturze 105°C przez 1 h), ekstrahowano przy użyciu eteru naftowego w temperaturze 145°C zgodnie z programem: 60 minut immersji, 60 minut wymywania oraz 60 minut odzysku rozpuszczalnika (nr 930.09, AOAC, 2000). Oznaczenie wykonano w trzech równoległych powtórzeniach. Wyniki wyrażono w g/100 g surowca.

Oznaczenie łącznego udziału składników frakcji popiołowej w składzie wytłoków

Łączny udział składników frakcji popiołowej oznaczono zgodnie z metodyką: 5 g ($\pm$ 0,0001 g) próbki zwęglono w kwarcowych tyglach na palniku gazowym, a następnie przez 120 minut spopielano pozostałość w piecu muflowym, w temperaturze 550°C. Badania wykonano w trzech równoległych powtórzeniach dla każdej partii surowca (AOAC, 2000).

Oznaczenie włókna surowego metodą Scharrera-Kürschnera

Oznaczenie polegało na 30-minutowym ogrzewaniu pod chłodnicą zwrotną 1-gramowych próbek wytłoków z orzecha włoskiego w mieszaninie kwasów (70-procentowym kwasie octowym, stężonym kwasie azotowym oraz krystalicznym kwasie trichlorooctowym) i przesączeniu na gorąco powstałego roztworu przez sączek bibułowy. Pozostały na sączku osad przemyto następnie wodą oraz 96-procentowym alkoholem etylowym i suszono w suszarce laboratoryjnej w 105°C przez 30 minut (Przybyłowski i Śmiechowska, 1996). Udział włókna surowego wyznaczono ze wzoru:

$$X = \frac{(b-a)}{c} 100\%$$

gdzie:

a – masa sączka bez osadu [g],

b – masa sączka z osadem [g],

c – naważka badanego produktu [g].

Oznaczenie wykonano w trzech równoległych powtórzeniach. Wyniki wyrażono w g/100 g surowca.

Wyznaczenie zawartości węglowodanów w wytłokach z orzecha włoskiego

Zawartość węglowodanów obliczono zgodnie ze wzorem:

$$W = 100 - (S + B + T + P + BP)$$

gdzie:

W – zawartość węglowodanów [g/100 g],

S – zawartość wody [g/100 g],

B – zawartość białka [g/100 g],

T- zawartość tłuszczu [g/100 g],

P – zawartość frakcji popiołowej [g/100 g],

BP – zawartość błonnika pokarmowego [g/100 g].

Wyznaczenie wartości energetycznej wytłoków z orzecha włoskiego

Wartość energetyczną oszacowano na podstawie wzoru:

$$(1)\ WE = 4W + 4B + 9T + 2BP$$

$$(2)\ WE = 17W + 17B + 37T + 8BP$$

gdzie:

(1)WE – wartość energetyczna [kcal/100 g],

(2)WE - wartość energetyczna [kJ/100g],

W – zawartość węglowodanów [g/100 g],

B – zawartość białka [g/100 g],

T- zawartość tłuszczu [g/100 g],

BP – zawartość błonnika pokarmowego [g/100 g].

Do obliczeń wykorzystano współczynniki przeliczeniowe podane w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169//2011 z 25 października 2011 wynoszące:

- 4 kcal/g (17 kJ/g) dla białka i węglowodanów,
- 9 kcal/g (37 kJ/g) dla tłuszczu,

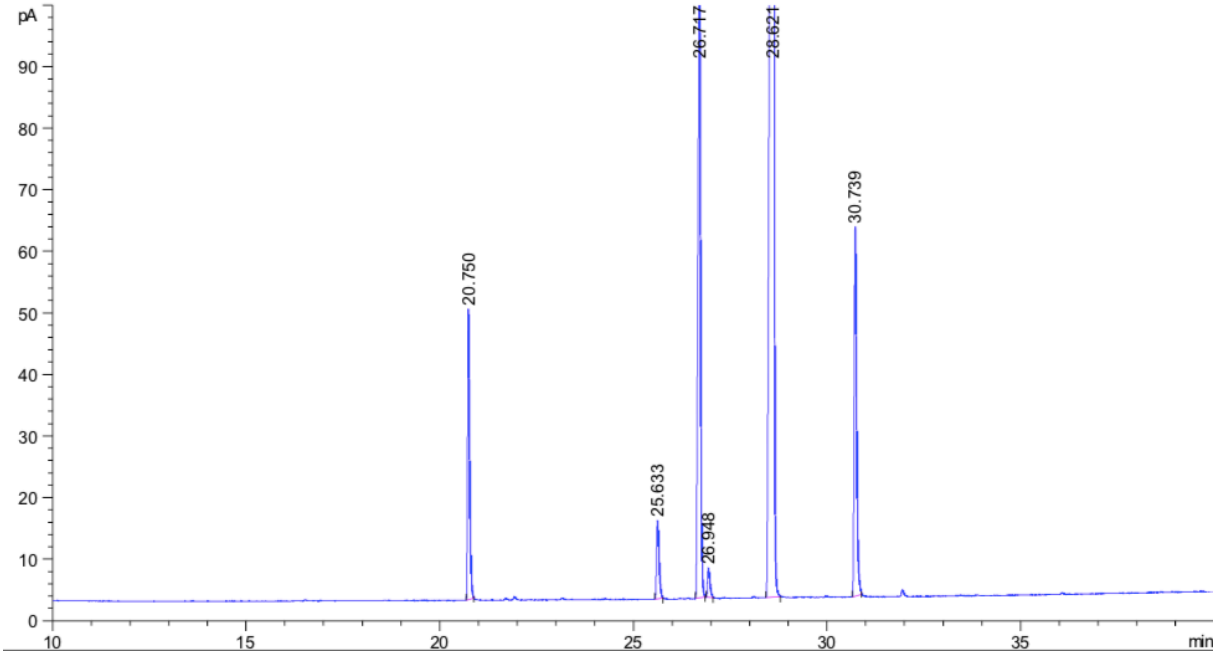
- 2 kcal/g (8 kJ/g) dla błonnika pokarmowego.

Oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej wytłoków z orzecha włoskiego techniką chromatografii gazowej

Analizę profilu kwasów tłuszczowych wytłoków z orzecha włoskiego poprzedzono ekstrakcją tłuszczu z surowca zgodnie z metodyką Folch'a, Less'a i Sloane'a (1957), wykorzystując mieszaninę chloroform/metanol, w proporcjach 2:1 (v:v) oraz estryfikacją według normy PN-ISO 5509:1996 (1996).

W ampułkach mieszano 50 mg wyizolowanego tłuszczu z 1 cm^3 0,5M metanolowego roztworu NaOH. Hydrolizę prowadzono przez 10 minut w łaźni wodnej w temperaturze 75°C. W momencie zaniku kropelek tłuszczu do wrzącego roztworu dodawano 2 cm^3 trifluorku boru (BF_3) i utrzymywano próbkę w stanie wrzenia przez kolejne 2 minuty. Następnie do próbki dodawano 1 cm^3 heksanu i utrzymywano wrzenie przez kolejną minutę. Do ochłodzonej ampułki z próbką dodawano bezwodny siarczan sodu (Na_2SO_4) oraz nasycony roztwór chlorku sodu (NaCl), tak aby warstwa organiczna zawierająca estry metylowe kwasów tłuszczowych znalazła się w szyjce ampułki. Uzyskaną warstwę organiczną pobierano do fiolek chromatograficznych w celu dalszych analiz (PN-ISO 5509:1996, 1996).

Analizę estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) wykonano zgodnie z Klensporf-Pawlik, Zmudziński i Bąkowska (2018) przy użyciu chromatografu gazowego Agilent Technologies 7820 A wyposażonego w automatyczny dozownik próbek ciekłych oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Do rozdziału związków wykorzystano polarną kolumnę chromatograficzną BPX70 (60m x 250 µm x 0,25 µm). Jako gaz nośny zastosowano hel, o wielkości przepływu ustalonej na poziomie 0,8 ml/min. W czasie analiz stosowano program temperaturowy: temperatura pieca 140°C (5 min), wzrost temperatury o 6°C/min do 240°C (20 minut). Temperatura portu nastrzykowego wynosiła 250°C, aparat pracował w trybie split 50:1, temperatura detektora 270°C. Kwasy tłuszczowe identyfikowano na podstawie standardowej mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME 37, Supelco). Wyniki obliczono stosując metodę normalizacji wewnętrznej.



Rysunek 7. Chromatogram kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej wytłoków z orzecha włoskiego

6.2. Oznaczenie aktywności lipooksygenazy

Pierwszym etapem badań nad aktywnością lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego było określenie jej typu oraz warunków dla optymalnej aktywności. W tym celu przy pomocy serii buforów oceniono:

- optymalne warunki ekstrakcji enzymu z materiału,
- wpływ pH mieszaniny reakcyjnej na aktywność lipooksygenazy,
- zależność stopnia aktywności lipooksygenazy od jej stężenia w mieszaninie reakcyjnej.

Powyższe badania pozwoliły na wybranie odpowiednich warunków wykonywania kolejnych testów, które obejmowały:

- ocenę aktywności lipooksygenazy w wytłokach pochodzących z trzech kolejnych sezonów,
- ocenę zmian aktywności lipooksygenazy w czasie 12-miesięcznego przechowywania wytłoków z orzecha włoskiego,
- ocenę aktywności lipooksygenazy w wytłokach z orzecha włoskiego, w których zastosowano termiczną inaktywację enzymu.

W każdym z wyżej wymienionych przypadków do oznaczania aktywności lipooksygenazy wykorzystano metodę spektrofotometryczną, opierającą się na pomiarze absorbancji próbki w ultrafioletowym zakresie widma (λ=234 nm) przed i po dodaniu ekstraktu lipooksygenazy. Obserwowany wzrost wartości absorbancji wynika z przyrostu zawartości skoniugowanych dienów, powstałych w wyniku utleniania kwasu linolowego przez lipooksygenazę.

6.2.1. Przygotowanie testów służących pomiarowi aktywności lipooksygenazy

Przygotowanie buforów

Przygotowano serię buforów w zakresie pH od 4,0 do 10,5.

- bufory o odczynach od 4,0 do 5,0 oraz od 8,5 do 10,5 otrzymano wykorzystując uniwersalny bufor Brittona i Robinsona – 100 cm^3 wodnego roztworu mieszaniny kwasów: octowego (0,04 M), fosforowego (0,04 M) i borowego (0,04 M) łączono w odpowiednich proporcjach z 0,2 – molowym wodorotlenkiem sodu.
- bufory o odczynach od 5,5 do 8,0 otrzymano poprzez łączenie określonych objętości wodnego roztworu fosforanu disodowego (0,067 M) i fosforanu jednopotasowego (0,067 M).

Izolacja enzymu

Ekstrakt lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego otrzymano na podstawie metodyki opisanej przez Zacheo i in. (2000). Enzym ekstrahowano z wytłoków (0,5-gramowe naważki (±0,0001g)) przy użyciu 10 cm^3 buforu fosforanowego (o dobranym eksperymentalnie pH, wynoszącym 7,0) poprzez wytrząsanie mieszaniny przez 20 minut z prędkością 180 cykli/min na wytrząsarce DOS-10M, Elmi. Otrzymany ekstrakt chłodzono przez godzinę w temperaturze 4±2°C, odwirowywano przy 4500 obr/min przez 20 minut oraz przesączano pod zmniejszonym ciśnieniem na lejku Büchnera.

Przygotowanie emulsji kwasu linolowego

Emulsję kwasu linolowego przygotowywano w oparciu o metodykę Salcedo i in. (2010). W tym celu roztwór zawierający 20 µl kwasu linolowego i 200 µl emulgatora Tween 20 mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego do momentu równomiernego połączenia się składników,

a następnie dodawano do niego małymi porcjami bufor fosforanowy o pH 6,0 do końcowej objętości 5 cm^3.

6.2.2. Oznaczenie aktywności lipooksygenazy

Aktywność lipooksygenazy mierzono metodą spektrofotometryczną. W tym celu do 1,96 cm^3 buforu fosforanowego dodawano 20 µl emulsji kwasu linolowego oraz 20 µl ekstraktu z lipooksygenazy, całość inkubowano przez 1 minutę i mierzono absorbancję próbki przy długości fali λ=234 nm. O aktywności lipooksygenazy wnioskowano na podstawie różnicy absorbancji mierzonej w próbkach z dodatkiem i bez dodatku wyekstrahowanego enzymu. Aktywność enzymu wyrażono w jednostkach umownych [j.u.].

6.2.3. Określenie typu lipooksygenazy i warunków dla jej optymalnej aktywności

Ocena optymalnych warunków ekstrakcji lipooksygenazy z surowca

W celu określenia optymalnych warunków ekstrakcji lipooksygenazy z wytłoków z orzecha włoskiego przygotowano serię buforów w zakresie pH od 5,5 do 10,5 (w interwałach 0,5 pH), przy pomocy których ekstrahowano enzym. Następnie określano aktywność lipooksygenazy, w wystandaryzowanych warunkach pomiarowych (przy takiej samej wartości pH buforu mieszaniny reakcyjnej dla wszystkich punktów pomiarowych). Za optymalne warunki ekstrakcji uznano tę wartość pH, przy której absorbancja próbki była najwyższa.

Ocena wpływu pH mieszaniny reakcyjnej na aktywność lipooksygenazy

W celu określenia optymalnego środowiska aktywności dla lipooksygenazy przygotowano bufory w zakresie pH od 4,5 do 10,5, które następnie wykorzystywano do pomiaru aktywności lipooksygenazy zachowując wystandaryzowane warunki przygotowania emulsji kwasu linolowego oraz ekstrakcji enzymu z surowca. Założono, że optymalną wartością pH jest ta, przy której enzym wykazywał najwyższą aktywność.

Ocena zależności stopnia aktywności lipooksygenazy od jej stężenia w mieszaninie reakcyjnej

Przygotowano serię rozcieńczeń ekstraktu lipooksygenazy w buforze o pH 7,6 (1/5, 2/5, 3/5 i 4/5). Enzym ekstrahowano wykorzystując bufor o pH 7,0, a następnie określano aktywność metodą spektrofotometryczną w warunkach optymalnych, dobranych doświadczalnie – przy pH mieszaniny reakcyjnej wynoszącym 7,6.

6.2.4. Ocena wpływu związków fenolowych na aktywność lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego

Potencjał inhibicyjny związków fenolowych względem natywnej lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego oceniono na podstawie pomiaru zmian w aktywności enzymu wywołanych bezpośrednio dodatkiem przeciwutleniacza. W tym celu przygotowano 80-procentowe etanolowe roztwory:

- kwasu elagowego, galusowego, kawowego, ferulowego, synapinowego i wanilinowego (zakres stężeń od 0,05 do 0,5 mM),
- układów kwasów fenolowych stosowanych parami (0,05 mM, 0,25 mM i 0,4 mM) – kwasu galusowego, elagowego, kawowego i ferulowego,
- ekstraktów otrzymanych z wytłoków z orzecha włoskiego (zakres stężeń od 0,005 do 001%).

Podane powyżej stężenia zostały dobrane eksperymentalnie. Po 10-minutowej inkubacji tak przygotowanych roztworów przeciwutleniaczy z ekstraktem lipooksygenazy w proporcjach 1:1 (v:v) inicjowano reakcję enzymatyczną poprzez dodanie emulsji kwasu linolowego i mierzono absorbancję próbek przy długości fali λ=234 nm. Wyniki każdorazowo odnoszono do próbki kontrolnej niezawierającej przeciwutleniacza.

6.3. Ocena właściwości przeciwutleniających ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego

Ocenę aktywności przeciwutleniającej przeprowadzono dla ekstraktów pozyskanych z:

- wytłoków otrzymanych bezpośrednio od producenta,
- wytłoków przechowywanych przez 12 miesięcy,
- wytłoków, w których dokonano termicznej inaktywacji lipooksygenazy.

Dla wytłoków otrzymanych bezpośrednio od producenta oraz przechowywanych przez okres 12 miesięcy co 50 dni oznaczano: ogólną zawartość związków fenolowych i flawonoidów, właściwości redukujące, aktywność przeciwrodnikową testem DPPH oraz zdolności do hamowania degradacji β-karoten w modelowej emulsji kwas linolowy/β-karoten. Dodatkowo dla wytłoków otrzymanych bezpośrednio od producenta wyzaczono profil związków fenolowych.

W ekstraktach otrzymanych z wytłoków poddanych procesowi termicznej inaktywacji lipooksygenazy oznaczono ogólną zawartość związków fenolowych oraz potencjał przeciwutleniający z wykorzystaniem testu FRAP oraz DPPH.

6.3.1. Przygotowanie ekstraktów z wytłoków z orzecha włoskiego

Etanolowe ekstrakty z wytłoków z orzecha włoskiego przygotowano w oparciu o metodykę zaproponowaną przez Pachołka i Małecką (2000) z modyfikacjami. Wytłoki z orzecha włoskiego wstępnie wysuszono w temperaturze 105°C przez 1 h i następnie odtłuszczono przy pomocy eteru naftowego. Z tak przygotowanego surowca przygotowano 5-gramowe próbki odważone z dokładnością ± 0,0001g, które poddano 3-krotnej ekstrakcji 80-procentowym alkoholem etylowym w temperaturze 80°C. Każdorazowo po zakończonym etapie ogrzewania w łaźni wodnej (1h) próbki wytrząsano przez 1 minutę i dekantowano płyn znad osadu. Zebrane wyciągi zatężono na wyparce rotacyjnej w temperaturze 40°C i uzupełniono 80-procentowym alkoholem etylowym do końcowej objętości równej 10 cm^3. W gotowych ekstraktach oznaczono zawartość suchej masy metodą suszarkowo-wagową, susząc próbki ekstraktu w temperaturze 105°C do osiągnięcia stałej masy. Z każdej partii wytłoku przygotowano równolegle po 3 ekstrakty, które wykorzystano do analizy profilu związków fenolowych, oceny potencjału przeciwutleniającego oraz stabilizacji tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich.

6.3.2. Oznaczenie profilu związków fenolowych w ekstraktach z wytłoków z orzecha włoskiego techniką ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC)

Analizę jakościowo-ilościową związków fenolowych wytłoków z orzecha włoskiego wykonano za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Acquity™ (Waters, MA, USA) w oparciu o metodykę Klimczak (2017). Do rozdziału

wykorzystano kolumnę Kinetex^{TM} XB-C18 (100×2,1 mm; 1,7 µm) marki Phenomenex (Torrence, USA). Detekcję kwasu galusowego i (+)-katechiny prowadzono przy λ=280 nm, kwasu wanilinowego przy λ=260 nm, natomiast kwasu elagowego i jego pochodnej przy λ=370 nm. Fazę ruchomą stanowiły rozpuszczalniki: acetonitryl oraz 0,1-procentowy kwas trifluorooctowy. Rozdział miał charakter gradientowy. Prędkość przepływu wynosiła 0,3 cm^3/min. Identyfikacji związków polifenolowych dokonano przez porównanie czasów retencji pików rozdzielonych związków i ich widm UV z czasami retencji i widmami UV substancji wzorcowych. Stężenie zidentyfikowanych związków oznaczono metodą kalibracji bezwzględnej. Wyniki podano w mg/ g s.m. ekstraktu.

6.3.3. Oznaczenie ogólnej zawartości związków fenolowych

Ogólną zawartość związków fenolowych w etanolowych ekstraktach wytłoków z orzecha włoskiego oznaczono metodą spektrofotometryczną z zastosowaniem odczynnika Folina–Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965). W kolbach miarowych o pojemności 10 cm^3 przygotowywano roztwór odczynnika Folina-Ciocalteu (0,5 cm^3) i wody destylowanej (1 cm^3), do którego dodawano następnie ekstrakt z wytłoków z orzecha włoskiego (0,1 cm^3) oraz 20-procentowy węglan sodu (1,0 cm^3). Tak przygotowane próbki inkubowano przez 1 godzinę bez dostępu światła i po upływie tego czasu mierzono ich absorbancję przy długości fali λ=725 nm wobec próbki odnośnikowej (bez dodatku ekstraktu). Zawartość związków fenolowych obliczono na podstawie przygotowanej krzywej wzorcowej przedstawiającej zależność absorbancji etanolowego roztworu kwasu galusowego (GAE) od jego stężenia w układzie reakcyjnym. Wynik wyrażono w mg kwasu galusowego/g suchej masy ekstraktu (mg GAE/g s.m.).

6.3.4. Oznaczenie zawartości flawonoidów

Zawartość flawonoidów oznaczono metodą spektrofotometryczną według metodyki Ordon, Gomez i Vattuone (2006), opierającej się na barwnej reakcji przeciwutleniaczy z chlorkiem glinu. Ekstrakt z wytłoków z orzecha włoskiego inkubowano przez godzinę z 2-procentowym etanolowym roztworem chlorku glinu ($AlCl_3$) w proporcjach 1:1 (v:v). Po upływie wyznaczonego czasu mierzono absorbancję roztworów wobec próbki odnośnikowej przy długości fali λ=420 nm. Zawartość flawonoidów obliczono na podstawie przygotowanej

krzywej wzorcowej, a wyniki wyrażono w mg (mg QE/g s.m.).

6.3.5. Oznaczenie właściwości redukujących w teście FRAP

O właściwościach redukujących etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego wnioskowano na podstawie testu FRAP (ang. Ferric-Reducing Antioxidant Power) (Benzie i Strain, 1999). Oznaczenie opiera się na pomiarze wzrostu absorbancji, który jest następstwem redukcji kompleksu żelaza Fe^{3+}-TPTZ (kompleks żelazowy-2,4,6-tripirydylo-s-triazyny) do kompleksu Fe^{2+}-TPTZ przez aktywne składniki ekstraktów.

W kolbach miarowych przygotowywano roztwory zawierające 0,3 cm^3 etanolowego ekstraktu o doświadczalnie dobranym stężeniu oraz 2 cm^3 mieszaniny reakcyjnej FRAP (połączone w proporcji 1:1:10 roztwory: TPTZ (10 mM) w 40 mM kwasu solnego, $FeCl_3$ (20 mM), bufor octanowy (0,1 M) o pH równym 3,6), które uzupełniono wodą destylowaną do końcowej objętości równej 10 cm^3. Następnie próbki inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej i mierzono ich absorbancję wobec próbki odnośnikowej (ekstrakt zastąpiono etanolem) przy długości fali λ=593 nm. Aktywność redukującą obliczono na podstawie przygotowanej krzywej wzorcowej przedstawiającej zależność absorbancji od stężenia Troloxu. Właściwości redukujące ekstraktów wyrażono w mmolach Troloxu/g suchej masy ekstraktu (mM Troloxu/g s.m.).

6.3.6. Oznaczenie aktywności przeciwrodnikowej w teście z rodnikiem DPPH

Badanie aktywności przeciwrodnikowej etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego przeprowadzono według metodyki Sánchez-Moreno, Larrauri i Saura-Calixto (1998) z modyfikacją polegającą na przygotowaniu roztworu 0,0025 g rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylhydrazyl) w 1000 cm^3 etanolu zamiast metanolu. Zastosowany rodnik jest stabilny w warunkach normalnych, natomiast w obecności przeciwutleniacza ulega redukcji, której towarzyszy zmiana barwy mieszaniny reakcyjnej z fioletowej na żółtą. Zmiana ta wyrażona jest spadkiem absorbancji mierzonej przy długości fali λ=515 nm.

Do kuwety o długości drogi optycznej 1 cm pobierano kolejno 2,4 cm^3 roztworu rodnika DPPH oraz 0,1 cm^3 ekstraktu i mierzono ich absorbancję co 30 sekund przez 10 minut (częstotliwość pomiarów oraz stężenie ekstraktów zostały dobrane na drodze eksperymentalnej). Wykonano po trzy równoległe oznaczenia dla każdego stężenia ekstraktu.

Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono kinetyki reakcji ekstraktów z rodnikiem DPPH oraz wyliczono procentową inhibicję aktywności rodnika DPPH według równania:

$$\%\ \text{inhibicja} = (1 - \frac{[A]_t}{[A]_{to}})\ 100\ [\%],$$

gdzie:

$[A]_{t0}$ – wartość początkowa absorbancji roztworu rodnika DPPH,

$[A]_t$ – wartość absorbancji próbki po 10 minutach inkubacji.

Aktywność przeciwutleniającą obliczono na podstawie krzywej wzorcowej przygotowanej z wykorzystaniem Troloxu.

Na podstawie krzywych zależności procentowej inhibicji rodnika DPPH od czasu wyznaczono wartości wskaźników:

- EC_{50} – definiowanego jako stężenie przeciwutleniacza niezbędne do redukcji o połowę początkowej zawartości rodnika DPPH w warunkach prowadzenia oznaczenia – im niższa wartość tym wyższa aktywnośc przeciwutleniająca,
- T_{EC50} – czasu potrzebnego do osiągnięcia stanu EC_{50},

na podstawie których wnioskowano o efektywności antyoksydacyjnej (AE) zgodnie ze wzorem:

$$\text{AE} = \frac{1}{\text{EC}_{50}\text{T}_{\text{EC}_{50}}}.$$

6.3.7. Oznaczenie zdolności do hamowania degradacji β-karotenu w modelowej emulsji kwas linolowy/β-karoten

Ocenę zdolności do hamowania degradacji β-karotenu etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego przeprowadzono metodą spektrofotometryczną opierając wnioskowanie na stopniu zahamowania spadku absorbancji próbki w obecności przeciwutleniacza (Taga, Miller i Pratt, 1984). Obserwowany spadek absorbancji spowodowany jest degradacją β-karotenu przez nadtlenki, powstałe w wyniku utleniania kwasu linolowego w warunkach podwyższonej temperatury.

Modelową emulsję kwas linolowy/β-karoten przygotowano łącząc w równych proporcjach chloroformowe roztwory: β-karotenu (0,01%), kwasu linolowego (2%) oraz emulgatora Tween 40 (20%). Następnie odparowano rozpuszczalnik w temperaturze 40°C za pomocą wyparki

rotacyjnej. Pozostałość rozpuszczano w 50 cm^3 wody redestylowanej i przy pomocy 0,1M wodorotlenku sodu doprowadzano roztwór do wartości pH 8,5. Próbki zawierające 1,5 cm^3 emulsji reakcyjnej i ekstrakt o dobranych eksperymentalnie stężeniach (0,02-0,1% (m/v) inkubowano przez 2 godziny w suszarce laboratoryjnej w 60°C. W 20 minutowych odstępach czasu mierzono spadek ich absorbancji przy długości fali λ=470 nm. Dla każdego ze stężeń ekstraktu wykonano po dwa równoległe oznaczenia. Następnie wyznaczono kinetyki reakcji oraz przygotowano krzywą wzorcową prezentującą zależność absorbancji mierzonej w mieszaninie reakcyjnej po 2 godzinach inkubacji emulsji w 60°C od stężenia Troloxu.

6.4. Oznaczanie stężenia ditlenku węgla

Stężenie ditlenku węgla oznaczano bezpośrednio w atmosferze wypełniającej wolną przestrzeń pomiędzy wytłokiem, a wiekiem szczelnie zamkniętego szklanego pojemnika, w którym umieszczony był surowiec. Pomiar wykonywany był automatycznie po uprzednim pobraniu gazów za pomocą sondy pomiarowej zakończonej igłą. Oznaczenie każdorazowo wykonywano w trzech równoległych powtórzeniach. Wyniki wyrażono w procentach [%].
Badania wykonano w Katedrze Towaroznawstwa i Ekologii Produktów Przemysłowych na Uniwersytecie Ekonomicznym w Poznaniu.

6.5. Ocena zasięgu zmian oksydacyjnych

Zasięg zmian oksydacyjnych badano w:

- wytłokach z orzecha włoskiego przechowywanych przez 12 miesięcy,
- w wytłokach z orzecha włoskiego poddanych procesowi termicznej inaktywacji lipooksygenazy,
- we frakcji tłuszczowej koncentratów ciasta w proszku,
- próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich stabilizowanych ekstraktami wyodrębnionymi z wytłoków z orzecha włoskiego oraz z wytłoków z orzecha włoskiego poddanych procesowi termicznej inaktywacji lipooksygenazy.

W materiale suchym, tj. w wytłokach z orzecha włoskiego oraz koncentratach ciasta w proszku oznaczano zawartość pierwotnych produktów utleniania metodą jodometryczną. W próbkach

tłoczonego na zimno oleju oceniano poziom liczby nadtlenkowej oraz stężenie heksanalu techniką statycznego headspace (SHS-GC).

6.5.1. Przygotowanie materiału badanego

Przygotowanie testów przechowalniczych wytłoków z orzecha włoskiego

W celu oceny zasięgu zmian oksydacyjnych zachodzących w czasie przechowywania, 100-gramowe (±0,1g) próbki wytłoku z orzecha włoskiego przechowywano w szklanych zamkniętych opakowaniach, w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Cyklicznie, co 50 dni, przez 12 miesięcy, monitorowano aktywność lipooksygenazy, zawartość pierwotnych produktów utleniania, wilgotność, aktywność wody, stężenie CO_2, ogólną zawartość związków fenolowych oraz potencjał przeciwutleniający. Dla każdego punktu pomiarowego przygotowywano dwie równoległe próbki przechowalnicze, a badania wykonano dla trzech partii surowca.

Przygotowanie modelowych próbek olejów do testów przyspieszonego starzenia

Na podstawie przeglądu danych literaturowych i badań wstępnych przygotowano próbki tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich z dodatkiem 0,05%, 0,1% i 0,2% etanolowych ekstraktów (s.m./m.) otrzymanych z wytłoków z orzecha włoskiego. Zastosowano ekstrakty wyodrębnione z:

- wytłoków bezpośrednio po otrzymaniu ich od producenta,
- wytłoków przechowywanych przez 8 miesięcy w temperaturze pokojowej (21±2°C) bez dostępu światła,
- wytłoków poddanych ogrzewaniu w temperaturze 90°C przez 2 minuty,
- wytłoków poddanych ogrzewaniu w temperaturze 90°C przez 2 minuty i przechowywanych przez 8 miesięcy w temperaturze pokojowej (21±2°C) bez dostępu światła.

Próbki oleju (10 cm^3) mieszano z ekstraktami z wytłoków z orzecha włoskiego przy pomocy mieszadła magnetycznego i przedmuchiwano argonem do momentu zaniku zapachu rozpuszczalnika. Równolegle, według tej samej procedury, przygotowano próbkę kontrolną oraz próbkę z 0,02-procentowym dodatkiem butylohydroksytoluenu (BHT). Próbki poddano

testom przyśpieszonego starzenia, przechowując je w zamkniętych szklanych fiolkach w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 50°C. W celu zapewnienia równomiernego oddziaływania przeciwutleniaczy w całej masie oleju, próbki codziennie mieszano przy pomocy vorteksu. Jako kryterium oceny zachodzących zmian oksydacyjnych przyjęto poziom liczby nadtlenkowej (LOO) oraz zawartość heksanalu.

Przygotowanie modelowego koncentratu ciasta w proszku na bazie wytłoków z orzecha włoskiego

Na podstawie przeglądu danych literaturowych oraz analizy składu produktów występujących na polskim rynku przygotowano mieszankę ciasta zgodnie z przepisem na babkę piaskową podaną przez Ambroziak (2010). W skład mieszanki wchodziły następujące surowce:

- 450 g mąki pszennej typu 650 albo wytłoków z orzecha włoskiego (świeżych oraz poddanych procesowi termicznej inaktywacji lipooksygenazy),
- 200 g cukru,
- 150 g skrobi ziemniaczanej,
- 15 g proszku do pieczenia.

100-gramowe porcje mieszanki przechowywano w temperaturze pokojowej (21±2°C), bez dostępu światła, w szklanych, szczelnie zamkniętych naczyniach przez okres 8 miesięcy, monitorując zasięg pierwotnych zmian oksydacyjnych (LOO), aktywność wody (a_w) i wilgotność.

6.5.2. Badanie zmian oksydacyjnych

Oznaczenie zawartości nadtlenków w wytłokach z orzecha włoskiego oraz koncentracie ciasta w proszku

Oznaczenie zawartości nadtlenków w wytłokach z orzecha włoskiego oraz przygotowanych modelowych koncentratach ciasta sypkiego poprzedzono wyizolowaniem tłuszczu z materiału zgodnie z metodyką PN-A-74780:1996 z modyfikacjami polegającymi na doświadczalnym dobraniu proporcji naważki próbki w stosunku do objętości rozpuszczalnika ekstrakcyjnego. Ekstrakcję tłuszczu wykonano poprzez 15-minutowe wytrząsanie 30-gramowych (±0,1 g) próbek wytłoków z orzecha włoskiego z 60 cm^3 chloroformu i przesączenie otrzymanego ekstraktu przez sączki jakościowe pod zmniejszonym ciśnieniem. W tak przygotowanych

przesączach oznaczono zawartość tłuszczu metodą suszarkowo-wagową, w temperaturze 105°C.

Oznaczenie zawartości nadtlenków wykonano metodą jodometryczną, zgodnie z metodyką PN-EN ISO 3960:2012. Zawartość nadtlenków wyrażono jako liczbę nadtlenkową w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram masy wyekstrahowanego oleju [meq O_2/kg], obliczając ją według wzoru:

$$LOO = \frac{(V_1 - V_0)T}{m} 1000,$$

w którym:

V_1 – objętość roztworu tiosiarczanu sodu użytego do miareczkowania próbki badanej [cm^3],

V_0 – objętość roztworu tiosiarczanu sodu użytego do miareczkowania próbki zerowej [cm^3],

T – normalność roztworu tiosiarczanu sodu [N],

m – masa badanej próbki [g].

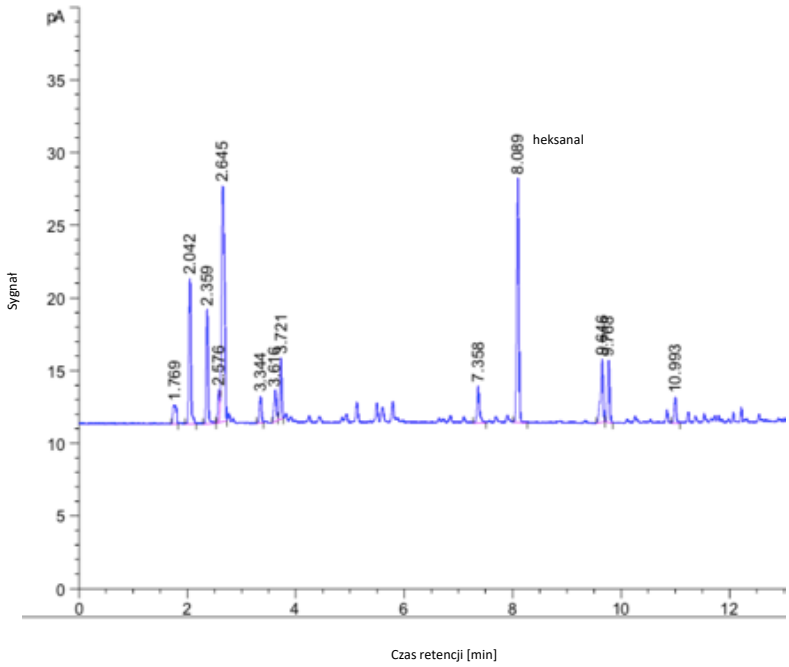
Oznaczenie zawartości nadtlenków w oleju z orzechów włoskich

Oznaczenie zawartości nadtlenków w próbkach oleju z orzechów włoskich przeprowadzono przy pomocy metody jodometrycznej w oparciu o wytyczne normy PN-EN ISO 3960:2012 z modyfikacją wprowadzoną przez Samotyję i Jurę (2012). Zawartość nadtlenków obliczono według wzoru podanego powyżej i wyrażono jako liczbę nadtlenkową (LOO) w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram próbki [meq O_2/kg].

Oznaczenie zawartości heksanalu metodą chromatografii gazowej z wykorzystaniem techniki statycznego headspace (SHS-GC)

Do oznaczenia zawartości heksanalu w próbkach oleju z orzechów włoskich wykorzystano metodę chromatografii gazowej, przy użyciu techniki statycznego headspace (static headspace, SHS-GC). Istotą metody jest osiągnięcie stanu równowagi między próbką, a statyczną przestrzenią gazową nad nią, do której w wyniku ogrzania próbki w komorze urządzenia przechodzą związki lotne. Następnie faza nadpowierzchniowa jest bezpośrednio nastrzykiwana na kolumnę chromatograficzną, gdzie następuje rozdział na poszczególne składniki lotne. W badaniach wykorzystano chromatograf gazowy Agilent Technologies 7820A wyposażony w zautomatyzowany dozownik fazy nadpowierzchniowej (headspace sampler) Agilent 7697A oraz kolumnę CP Sil 8CB o wymiarach 30 m x 0,53 mm x 1,5 μm. Gazem nośnym

był hel. Identyfikacji heksanalu dokonano poprzez porównanie czasów retencji rozdzielanych związków i substancji wzorcowej (Aldrich). Oznaczeń ilościowych dokonano na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej przedstawiającej zależność wielkości pola powierzchni piku od stężenia heksanalu. Wyniki wyrażono w $\mu g/cm^3$.



Rysunek 8. Chromatogram związków lotnych próbki tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich stabilizowanego ekstraktami otrzymanymi z wytłoków z orzecha włoskiego

6.6. Optymalizacja warunków termicznej inaktywacji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego

W celu termicznej inaktywacji lipooksygenazy 100-gramowe próbki wytłoków z orzecha włoskiego ogrzewano w suszarce laboratoryjnej w zakresie temperatur od 50°C do 100°C (50°C, 60°C, 70°C, 90°C i 100°C – zakres dobrany na podstawie danych literaturowych), kolejno przez 2, 4, 6, 10 i 20 minut (dla każdej wartości temperatury). W podgrzanych wytłokach monitorowano:

- zmiany aktywności lipooksygenazy (LOX),
- zawartość nadtlenków (LOO),
- ogólną zawartość związków fenolowych
- potencjał antyoksydacyjny testem FRAP i DPPH.

6.7. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu programów Microsoft Excel 2017 oraz IBM SPPS Statistics. Zakres analiz był zróżnicowany w zależności od charakteru pozyskanych w toku badań danych. Wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), test post-hoc Tukey'a oraz współczynnik korelacji liniowej Pearsona (r). Za poziom istotności każdorazowo przyjmowano wartość $p<0,05$. Ponadto w celu wybrania optymalnych warunków termicznej inaktywacji lipooksygenazy zastosowano metodę regresji powierzchni odpowiedzi przy użyciu programu Statistica 12.0. Analiza ta powszechnie wykorzystywana jest w praktyce przemysłowej do wyjaśniania nieliniowych związków pomiędzy wybranymi cechami jakości, a zmiennymi zależnymi, przy czym wartość zmiennej predykcyjnej ustalana jest tak, aby analizowane zmienne uzyskały optimum.

6.8. Wykaz odczynników, aparatury i sprzętu laboratoryjnego

Wykaz odczynników:

- alkohol etylowy 96%,
- alkohol metylowy,
- β-karoten,
- butylohydroksytoluen (BHT) 99%,
- chlorek żelaza (III) sześciowodny,
- chloroform,
- 1,1 –difenylo – 2 – pikrylhydrazyl (DPPH),
- eter naftowy,
- fosforan disodowy 12-dwunastowodny,
- fosforan jednopotasowy,
- heksan bezwodny,
- heksanal 98%,
- jodek potasu,
- kwas borowy,
- kwas elagowy min. 95%,
- kwas ferulowy min. 97%,
- kwas galusowy min. 97%,

- kwas kawowy min. 98%,
- kwas linolowy,
- kwas octowy min. 99,5%,
- kwas p-kumarowy min. 97%,
- kwas siarkowy,
- kwas solny,
- kwas wanilinowy min. 95%,
- kwercetyna,
- octan sodu,
- odczynnik Folina – Ciocalteu,
- siarczan (VI) miedzi (II),
- siarczan (VI) potasu,
- siarczan żelaza (II) siedmiowodny,
- tiosiarczan sodu,
- 2,4,6,-tripirydylo-s-triazyna (TPTZ) ≥99%,
- 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromian-2-kwas karboksylowy (Trolox),
- Tween 20,
- Tween 40,
- węglan sodu, bezwodny,
- wodorotlenek sodu,
- wskaźnik Tashiro

Wykaz aparatury i sprzętu laboratoryjnego:

- chromatograf cieczowy Acquity™ (Waters, MA, USA) wyposażony w kolumnę Kinetex™ XB-C18,
- chromatograf gazowy Agilent Technologics 7820 wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) i autosampler Agilent 7697A,
- cieplarka laboratoryjna, Memmert,
- destylarka z parą wodną K-355, Büchi Labortechnik,
- ekstraktor SER 148/3, VELP,
- jednostka do mineralizacji próbek “na mokro” model K-425/436 Büchi Labortechnik,
- kuwety szklane o długości drogi optycznej 1 cm, Hellma Analytics,

- kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 1 cm, Hellma Analytics,
- łaźnia wodna MLL 547, POCH,
- łaźnia ultradźwiękowa, Ultron,
- mieszadło magnetyczne typu ES – 21H, Wigo,
- młynek laboratoryjny,
- pipety automatyczne High Tech Lab,
- pompa próżniowa,
- spektrofotometr UV-VIS Genesys 6, Thermo Spectronic,
- waga laboratoryjna o dokładności 0,0001g,
- wirówka MPW 351E,
- vorteks BVX-10,
- wyparka rotacyjna Rotavapor R-114 z łaźnią wodną B-480, Büchi Labortechnik,
- wytrząsarka DOS-10M, Elmi

7.Wyniki badań i dyskusja

7.1. Charakterystyka składu i wybranych właściwości fizykochemicznych wytłoków z orzecha włoskiego

Ocena składu chemicznego i właściwości fizykochemicznych stanowi punkt wyjścia do wnioskowania o przydatności żywieniowej i technologicznej surowców oraz wykazywanej przez nie stabilności w czasie przechowywania. Wytłoki z orzecha włoskiego z założenia są produktem ubocznym o niskim stopniu przetworzenia, co sugeruje, że ich skład powinien być zbliżony do składu surowca wyjściowego z wyjątkiem zawartości tłuszczu, przy czym ze względu na naruszoną strukturę tkankową mogą charakteryzować się one niższą trwałością i w wyższym stopniu być narażone na procesy biochemiczne, mikrobiologiczne oraz oddziaływanie czynników zewnętrznych.

W Tabeli 10 przedstawiono charakterystykę składu chemicznego oraz wybranych właściwości fizykochemicznych wytłoków z orzecha włoskiego pochodzących z trzech partii produkcyjnych z roku 2014 (partia 1), 2015 (partia 2) i 2016 (partia 3). Wyniki wyrażono w g/100 g surowca.

Wilgotność badanych wytłoków z orzecha włoskiego nie przekraczała 7 g/100 g, co pozwala sklasyfikować je jako produkty suche. Otrzymane wyniki są zgodne z danymi zawartymi w pracach Bakkalbasi i in. (2015), Labuckas i in. (2014) oraz Martínez i in. (2010). Wyższą zawartość wody w mące orzechowej stwierdzili natomiast Santos, Alvarez-Irti, Sena-Moreno, Rabadán, Pardo i Oliveira (2018) – 11,43 g/100 g, podkreślając również silnie ujemną korelację pomiędzy czasem i temperaturą prażenia jąder orzechów przed tłoczeniem oleju, a wilgotnością powstałych w trakcie tego procesu wytłoków. Zakłada się, że w celu zapewnienia odpowiedniej trwałości przeznaczonych do składowania wytłoków z orzecha włoskiego, ich wilgotność nie powinna przekraczać 15% (Salcedo i Nazareno, 2015). Wyższa zawartość wody przyczynia się bowiem do niekorzystnych zmian jakościowych, w tym do wzmożonego rozwoju mikroorganizmów, a w przypadku produktów suchych również do przyśpieszenia procesów dojrzewania i wymiany gazów oraz samozagrzewania i zbrylania. Co więcej, ograniczona zostaje przydatność technologiczna surowców, głównie przez zmniejszoną higroskopijność względem dodawanej w czasie produkcji wody (Ambroziak, 2010).

Aktywność wody jest cechą istotną w kontekście rozważań nad trwałością surowców, ponieważ warunkuje ona m.in. podatność surowca na rozwój drobnoustrojów, procesy enzymatyczne, szybkość przebiegu reakcji Maillarda i nieenzymatycznego brunatnienia oraz utlenianie kwasów tłuszczowych i barwników (Pałacha, 2008). W przypadku surowców suchych, jakimi są wytłoki, aktywność wody obok m.in. ogólnej wilgotności jest jednym z elementów bezpośrednio wpływających na tempo utleniania kwasów tłuszczowych. Stwierdzono niewielkie zróżnicowanie, w zależności od partii produkcyjnej, poziomu wartości aktywności wody dla badanych wytłoków. Nieznacznie wyższą wartość wyróżnika wynoszącą 0,500 otrzymali w badaniach wytłoków z orzecha włoskiego Tarek-Tilistyák, Juhasz-Roman, Jeko i Mathe (2014).

Za optymalną wartość aktywności wody, warunkującą najwyższą stabilność oksydacyjną przyjmuje się zakres 0,200-0,300, przy których woda występuje w postaci ściśle związanej monowarstwy, przez co nie stanowi środowiska dla działalności m.in. enzymów, utrudnione jest również wiązanie produktów pośrednich reakcji łańcuchowej oraz niższe jest stężenie jonów metali proutleniających. Tempo utleniania lipidów gwałtownie wzrasta jednak, gdy wartość tej cechy przekroczy poziom 0,400 lub jest niższa niż 0,200. W świetle przedstawionych informacji można spodziewać się, że badane wytłoki z orzecha włoskiego z jednej strony będą podatne na procesy utleniania, z drugiej ograniczona zostaje możliwość rozwoju m.in. mezofilnych bakterii i drożdży, co zostało potwierdzone w badaniach na wytłokach orzechowych podczas ich 4-miesięcznego przechowywania zarówno w temperaturze pokojowej, jak i chłodniczej (Tarek-Tilstykák i in., 2014).

Wytłoki z orzecha włoskiego pochodzące ze wszystkich trzech partii produkcyjnych wykazywały swoistą dla tego typu produktów ubocznych zawartość białka wynoszącą ponad 40 g/100 g surowca. Tak wysoki udział białka w składzie jest cechą charakterystyczną dla produktów ubocznych powstających w wyniku mechanicznego procesu, jakim jest tłoczenie. Co więcej, uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi zawartymi w literaturze przedmiotu. Według Santos i in. (2018) w odtłuszczonej mące z orzechów włoskich, w zależności od odmiany surowca, zawartość białka wahała się na poziomie 39-44 g/100 g. Analogiczne do ww. dane prezentują także Hadded i Gaban-Chong, Oda i Sabate (2014), Fu i in. (2016), Pereira Oliveira, Sousa, Ferreira, Bento i Estevinho (2008), Vanhanen i Savage (2006) oraz Tarek-Tilistyák i in. (2014). Nieco niższą wartość, równą 36,8 g/100 g oznaczył Bakkalbasi i in. (2015) oraz wyższą – wynoszącą 52,5 g/100 g Mao i Hua (2012). Dla porównania, podobnym udziałem

białka w składzie charakteryzuje się mąka sojowa (30-59 g/100 g), natomiast znacząco niższą mąka kokosowa (12,6%), dyniowa (12,4-24,9 g/100 g) czy oliwna (2,7 g/100 g) (Beegum i in., 2017; Białek i in. 2016; Lin i in., 2017; Sujirtha i Mahendran, 2015).

Udział związków frakcji popiołowej, która świadczy o zawartości składników mineralnych, dla każdej z badanych partii wytłoków z orzecha włoskiego wynosił ponad 5,5 g/100 g, co również znajduje potwierdzenie w większości badań prowadzonych na zmielonych i częściowo odtłuszczonych jądrach orzechów włoskich (Fukuda, Ito i Yoshida, 2003; Santos i in., 2018; Tapia, Sánchez-Morgado, Garcia-Parra, Ramirez, Hernandez i González-Gomez., 2013; Tarek-Tilistyák i in., 2014). Niemniej w literaturze można spotkać dane wskazujące na znacznie niższe wartości składników frakcji popiołowej, które nie przekraczają 2 g/100 g (Mao i Hua, 2012). Dane dotyczące popiołowości innych wytłoków roślin oleistych również różnicują się w podobny sposób, niemniej wyższy udział związków frakcji popiołowej stwierdzono w przypadku wytłoków sezamowych (dochodzącą do 9 g/100 g), kokosowych (8 g/100 g) oraz sojowych (7 g/100 g). Dla większości makuchów wartości oscylującą jednak w przedziale od 3 do 7 g/100 g. Warto również nadmienić, że wytłoki z orzecha włoskiego mają znaczącą przewagę nad mąką pszenną, żytnią, kukurydzianą czy ziemniaczaną, charakteryzując się od 2,5- do 12-krotnie wyższą zawartością składników mineralnych od ww. produktów (Kunachowicz i in., 2017).

Tabela 10. Charakterystyka wartości odżywczej i energetycznej oraz wybranych właściwości fizykochemicznych wytłoków z orzecha włoskiego

Wyróżnik	Partia 1	Partia 2	Partia 3
Wartość energetyczna [kJ/kcal]	1555,5/370,0	1567,4/373,3	1563,5/372,0
Tłuszcz [g/100g]	$8,5^{a*} \pm 0,04$	$9,9^{b} \pm 0,01$	$8,9^{c} \pm 0,01$
Węglowodany [g/100g]	22,2	18,2	21,2
Białko [g/100g]	$44,7^{a} \pm 0,36$	$46,3^{b} \pm 0,40$	$45,4^{a} \pm 0,32$
Włókno surowe [g/100g]	$9,0^{a} \pm 0,20$	$9,0^{a} \pm 0,01$	$9,01^{a} \pm 0,11$
Popiół [g/100g]	$5,5^{a} \pm 0,00$	$5,8^{c} \pm 0,00$	$5,5^{a} \pm 0,01$
Wilgotność [g/100g]	$6,2^{a} \pm 0,02$	$6,8^{b} \pm 0,02$	$6,1^{a} \pm 0,01$
Aktywność wody	$0,342^{a} \pm 0,001$	$0,338^{b} \pm 0,001$	$0,299^{c} \pm 0,001$

*średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p<0,05$) w wierszach

Zawartość tłuszczu w wytłokach z orzecha włoskiego była cechą charakterystyczną dla każdej z badanych partii surowca, co można tłumaczyć przede wszystkim warunkami klimatycznymi panującymi w danym roku uprawy, odmianą orzechów wykorzystanych do tłoczenia, jak również parametrami tego procesu. Zróżnicowane są również dane zawarte

w literaturze, gdzie podawana zawartość tłuszczu w mąkach orzechowych waha się nawet w przedziale od 18 do 30 g/100 g (Martínez i in., 2010; Santos i in., 2018; Vanhanen i Savage 2006). Bardzo często na potrzeby badań wytłoki otrzymuje się w wyniku bezpośredniego tłoczenia oleju z surowca w warunkach laboratoryjnych, co może wiązać się z niższą w porównaniu do przemysłowego tłoczenia wydajnością, skutkującą wyższą zawartością tłuszczu resztkowego w makuchach. Porównywalną zawartość tłuszczu stwierdzono w wytłokach kokosowych (9,2 g/100 g), rzepakowych (7 g/100 g), słonecznikowych (6,9 g/100 g) czy dyniowych (8,3 g/100 g) (Beegum i in., 2017; Białek i in., 2016; Lin i in., 2017; Surjirtha i Mahendran, 2015, Zamindar i in., 2017).

Badane partie wytłoków charakteryzowały się niemal identycznym profilem kwasów tłuszczowych z dominującym udziałem kwasu linolowego (ponad 61% wszystkich kwasów tłuszczowych) oraz oleinowego (ponad 18%). Na szczególną uwagę zasługuje jednak ponad 10-procentowy udział kwasu α-linolenowego, który zgodnie z prawodawstwem europejskim pozwala uznać mąkę wytłokową za surowiec stanowiący źródło kwasów tłuszczowych z rodziny omega-3, która w konsekwencji mogłaby zostać opatrzona takim oświadczeniem żywieniowym (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 116/2010, 2010). Wśród kwasów nasyconych zidentyfikowano kwas palmitynowy oraz stearynowy (Tabela 11).

Tabela 11. Skład kwasów tłuszczowych wytłoków z orzecha włoskiego (procentowy udział w puli wszystkich kwasów tłuszczowych) [%]

Kwas tłuszczowy	Partia 1	Partia 2	Partia 3
Kwas palmitynowy (C16:0)	6,67 ± 0,02	6,62 ± 0,02	6,64 ± 0,01
Kwas stearynowy (C18:0)	2,27 ± 0,01	2,24 ± 0,00	2,22 ± 0,01
Kwas oleinowy (C18:1 n-9)	18,51 ± 0,00	18,48 ± 0,00	18,53 ± 0,02
Kwas wakcenowy (C18:1 n-7)	0,82 ± 0,01	0,79 ± 0,03	0,81 ± 0,01
Kwas linolowy (C18:2 n-6)	61,56 ± 0,04	61,75 ± 0,08	61,66 ± 0,06
Kwas α-linolenowy (C18:3 n-3)	10,17 ± 0,01	10,12 ± 0,02	10,14 ± 0,01
Σ NKT	8,94	8,86	8,86
Σ JNKT	19,33	19,27	19,34
Σ WNKT	71,73	71,87	71,80

Oznaczony we frakcji lipidowej wytłoków profil kwasów tłuszczowych jest analogiczny do profilu zidentyfikowanego zarówno w mące orzechowej (Rabadán, Pardo, Gómez i Álvarez-Ortí, 2018b), jądrach orzechów włoskich (Hayes i in., 2016; Salcedo i Nazareno, 2015; Tapia i in., 2013; Borecka, Walczak i Starzycki, 2013; Grabowska i Wieczorek, 2017), jak i w tłoczonym

na zimno oleju z orzechów włoskich (Copolovici i in., 2017; Popovici i Deseatnicova, 2013; Rabadán, Álvarez-Ortí, Pardo i Alvarruiz, 2018a; Zhou, Fan, Chu i Pei, 2016).

Biorąc pod uwagę oznaczone substancje odżywcze oraz dane literaturowe wyznaczono teoretyczną zawartość węglowodanów oraz oszacowano wartość energetyczną badanych wytłoków z orzecha włoskiego. Na podstawie obliczeń stwierdzono, że 100 gramów wytłoków z orzecha włoskiego w zależności od partii produkcyjnej dostarcza średnio od 371 do 381 kcal (1523-1566 kJ), co jest zgodne z danymi Santos i in. (2018). Wartość energetyczna wytłoków jest zatem nieznacznie wyższa w porównaniu z wartością tradycyjnych mąk pszennych i żytnich (340-360 kcal/100 g) dostępnych na rynku, co ściśle związane jest z blisko 8-krotnie wyższą zawartością tłuszczu w wytłokach. Jednocześnie jednak znacząco wyższy procentowy udział błonnika pokarmowego kosztem węglowodanów rekompensuje tę nadwyżkę energetyczną dyktowaną blisko 10-procentowym udziałem tłuszczu. Wysoka jest również wartość odżywcza wytłoków, co warunkowane jest przede wszystkim znaczącym udziałem białka o korzystnym składzie aminokwasowym (Arab i Ang, 2015), wysoką zawartością błonnika pokarmowego i składników mineralnych oraz korzystnym profilem kwasów tłuszczowych. Rozważając proporcje poszczególnych składników odżywczych w odniesieniu do tzw. mąk tradycyjnych można uznać, że mąka pozyskiwana w wyniku przemiału wytłoków stanowi dla nich cenną alternatywę.

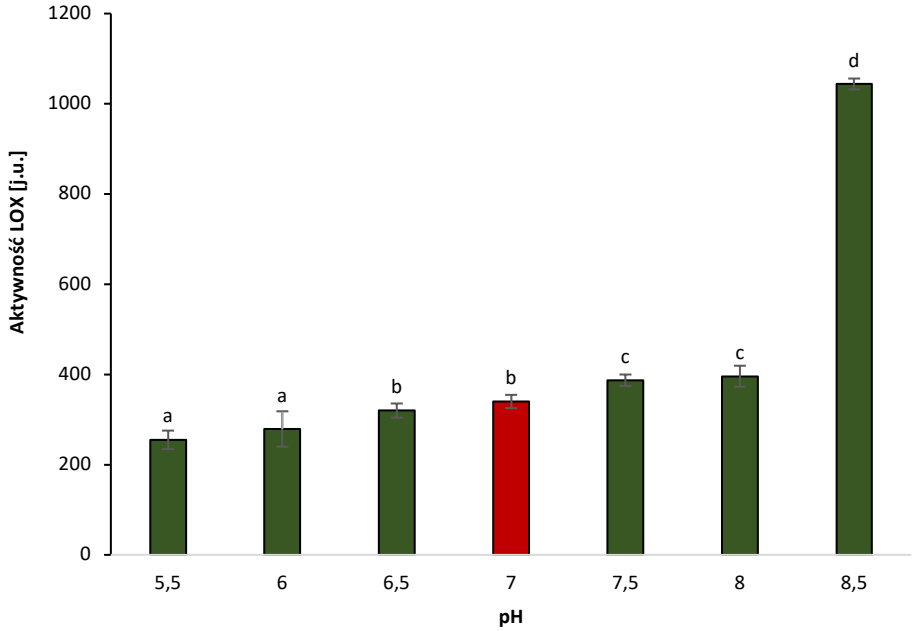
Wyniki prezentowane w podrozdziale 7.2 zostały opublikowane w monografii Current Trends in Commodity Science - New Trends in Food Quality, Packaging and Consumer Behavior w artykule *„Characterisation of lipoxygenase activity in walnut cake" (Bińczak, Małecka i Samotyja, 2015)*

7.2. Charakterystyka typu i stopnia aktywności natywnej lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego

W przypadku badań *in vitro* nad enzymami istotne znaczenie ma standaryzacja warunków pomiarowych, co gwarantuje wysoki stopień porównywalności wyników oraz zobrazowanie aktywności w warunkach *in vivo* (Bisswanger, 2014). Na potrzeby niniejszej pracy wykonano zatem serię badań mających na celu określenie optymalnego odczynu ekstrahenta wykorzystywanego do izolacji enzymu z surowca oraz medium, w którym bezpośrednio

wykonywany był pomiar. Uzyskane informacje pozwoliły na zachowanie jednolitych warunków pomiarowych na wszystkich etapach badań oraz określenie typu lipooksygenazy występującego w badanych wytłokach z orzecha włoskiego. Powszechnie bowiem w surowcach roślinnych wystepuje jedna z dwóch form lipooksygenazy, których podstawowym sposobem identyfikacji jest określenie warunków dla optymalnej aktywności. Typ I jest najbardziej stabilny przy pH silnie zasadowym (w okolicach 9,0), a typ II w pH obojętnym i słabo alkalicznym (pH 6,0-7,8).

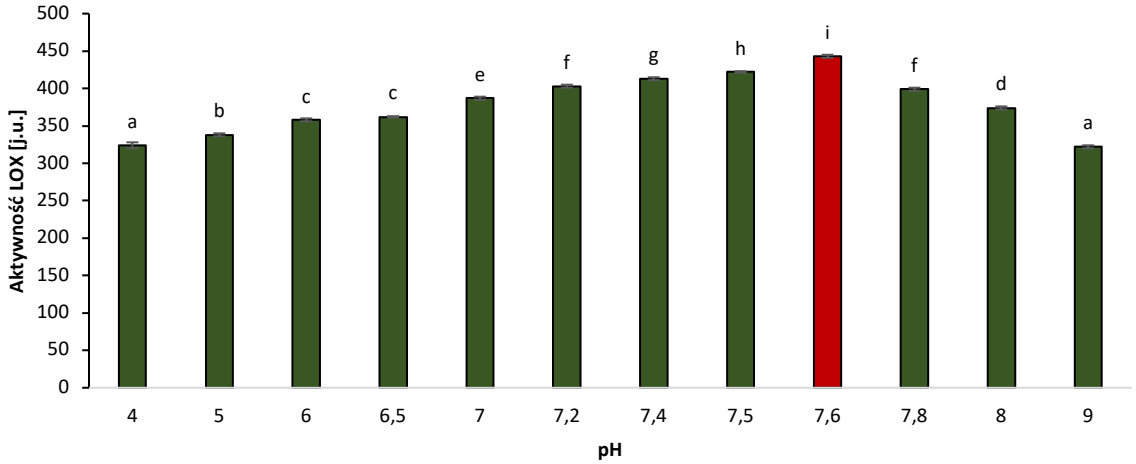
Na Rysunku 9. przedstawiono zależność aktywności lipooksygenazy od odczynu rozpuszczalnika wykorzystywanego do jej ekstrakcji z surowca. Stwierdzono stabilną aktywność enzymu w zakresie pH od 5,5 do 8,0 oraz gwałtowny skok po przekroczeniu wartości pH 8,0. Przyczyną tego wzrostu jest prawdopodobnie wyekstrahowanie dodatkowych, interferujących związków zaburzających wynik. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki oraz dane literaturowe, wskazujące m.in. na wysoką efektywność rozpuszczalników o odczynie obojetnym, wykluczono pH silnie zasadowe, a do dalszych badań wybrano bufor fosforanowy o pH 7,0 (Jarjes i in., 2017).



Rysunek 9. Wpływ pH mieszaniny ekstrakcyjnej na aktywność lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego

a, b, c, … - średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p<0,05$)

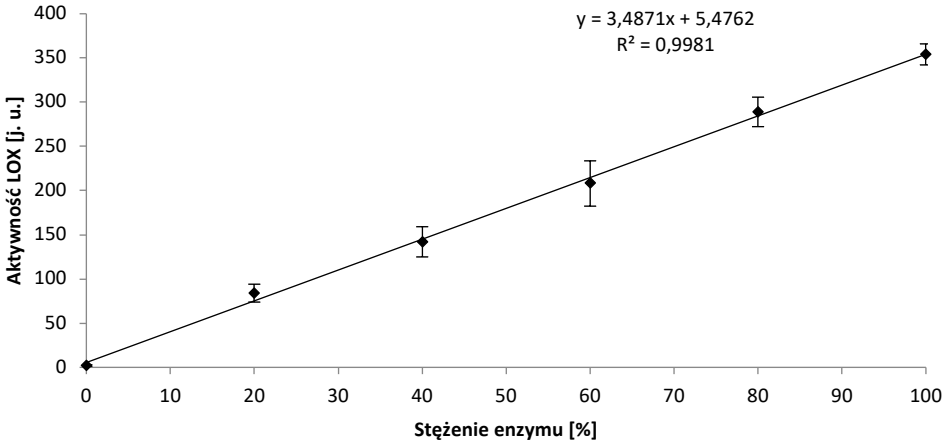
Rejestrowana aktywność lipoooksygenazy różnicowała się również w zależności od odczynu buforu zastosowanego do przygotowania mieszaniny reakcyjnej (Rysunek 10). Stwierdzono systematyczny, istotny statystycznie wzrost aktywności enzymu wraz z przesuwaniem się pH w kierunku odczynu obojętnego i lekko zasadowego, z maksimum przy pH 7,6. Następnie, w miarę wzrostu alkaliczności roztworu wykazywana aktywność katalityczna enzymu stopniowo malała. Otrzymane wyniki są zbieżne z Kosary i in. (2009), których badania nad aktywnością lipooksygenazy orzechów włoskich wykazały analogiczną tendencję, a autorzy w konsekwencji do zasadniczych badań wykorzystali bufory o wartości pH 7,7. Buranasompob i in. (2007) stwierdzili natomiast, że optymalne warunki dla aktywności enzymu pochodzącego z orzechów włoskich i migdałów występują przy pH 7,0, przy czym zakres badanego odczynu mieszaniny reakcyjnej został ograniczony przez tych autorów do trzech wartości (4,0; 7,0 i 9;0). Zgodnie z ogólnym twierdzeniem, że enzymy wykazują najwyższą aktywność przy pH fizjologicznym tj. 7,5 (zwykle jednak jest to szerszy zakres od 7,0 do 8,0) (Bisswanger, 2014), do dalszych badań wybrano bufor o pH 7,6 przy którym lipooksygenaza wykazywała najwyższą aktywność wobec kwasu linolowego. Należy jednak zauważyć, że optimum aktywności badanego enzymu jest cechą charakterystyczną dla danego gatunku rośliny, jak również może różnicować się w obrębie danego gatunku, co prawdopodobnie wynika z różnic w budowie białek spowodowanych z kolei zmiennością warunków uprawy. Biorąc pod uwagę powyższe informacje warunki pomiarowe każdorazowo powinny być dobierane do badanego surowca (Szymanowska i in., 2009; Yoshie-Stark i Wäsche, 2004). Dla przykładu optymalne warunki wyrażone wartością pH mieszaniny reakcyjnej dla lipooksygenazy zielonego groszku zawierały się w przedziale od 5,0 do 6,5, dla łubinu od 6,0 do 8,0, jednak w niektórych z badań tych surowców nie rejestrowano aktywności enzymu poniżej wartości 7,2 (Stephany i in., 2014).



Rysunek 10. Wpływ pH mieszaniny reakcyjnej na aktywność lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego

a, b, c, … - średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p<0,05$)

Optimum aktywności w pH 7,6 wskazuje, że dominującym typem lipooksygenazy w badanych wytłokach z orzecha włoskiego jest typ II. Cechą charakterystyczną tego typu enzymu jest wprost proporcjonalny wzrost jego aktywności wraz ze wzrostem jego stężenia w mieszaninie reakcyjnej, co przedstawiono na Rysunku 11. Typ II lipooksygenazy w szczególności katalizuje procesy utleniania kwasu linolowego – substratu wykorzystywanego w przeprowadzonych badaniach oraz równocześnie dominującego składnika frakcji tłuszczowej badanych wytłoków.



Rysunek 11. Wpływ stężenia lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego w mieszaninie reakcyjnej na wykazywaną przez nią aktywność

Kolejnym etapem badań było oznaczenie aktywności lipooksygenazy dla wytłoków z orzecha włoskiego pochodzących z trzech odrębnych partii w wystandaryzowanych warunkach pomiarowych. Aktywność enzymu w zależności od partii wahała się w przedziale od 335 do 377 j.u. (Tabela 12) i była zbliżona do aktywności oznaczonej w świeżych jądrach orzechów włoskich (Fu i in., 2016) oraz awokado, pomidorach, brokułach czy szparagach (Manovski i in., 2015). Należy jednak zaznaczyć, że porównywanie aktywności lipooksygenazy jest względne, ponieważ jest ona warunkowana wieloma czynnikami nie zawsze związanymi z rodzajem surowca. Duży wpływ mają warunki uprawy, a ściślej mówiąc czynniki stresogenne, na których oddziaływanie był narażony surowiec. Nie bez znaczenia pozostaje również stopień denaturacji białek tworzących dany enzym oraz same warunki zastosowane w czasie wykonywania oznaczeń.

Tabela 12. Aktywność lipooksygenazy w wytłokach z orzecha włoskiego

	Partia 1	**Partia 2**	**Partia 3**
Aktywność lipooksygenazy [j. u.]	377 ± 8,0	335 ± 2,5	390 ± 1,9
Aktywność lipooksygenazy [mmol/g s.m. wytłoku]	0,032 ± 0,001	0,032 ± 0,001	0,033 ± 0,002

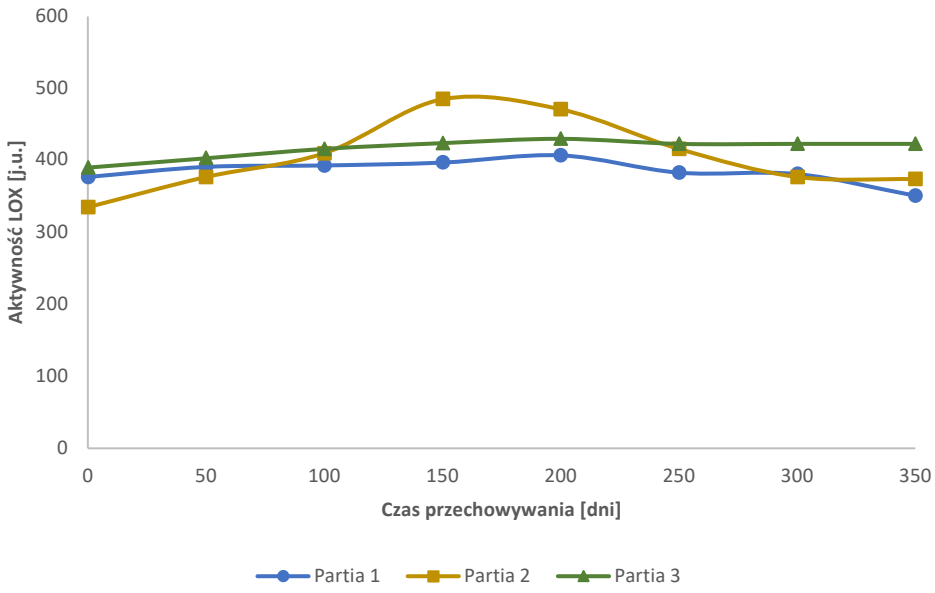
Wyniki badań uzyskane na tym etapie badań, podparte danymi prezentowanymi przez Labuckas i in. (2011), Ling i in. (2014) oraz Watkins (2005) sugerują, że jakość i trwałość wytłoków z orzecha włoskiego może być w dużym stopniu ograniczana przez procesy oksydacyjne, co wynika bezpośrednio ze składu chemicznego oraz cech fizykochemicznych wytłoków, takich jak stopień rozwinięcia powierzchni oraz zachowanie aktywności natywnej lipooksygenazy.

7.3. Wpływ czasu przechowywania na aktywność lipooksygenazy, stabilność oksydacyjną oraz potencjał przeciwutleniający wytłoków z orzecha włoskiego

W celu określenia optymalnego czasu przechowywania wytłoków z orzecha włoskiego oraz oceny wpływu poszczególnych czynników uznanych w tym obszarze za krytyczne, przeprowadzono testy przechowalnicze w warunkach normalnego składowania. Przez okres 12 miesięcy (350 dni), regularnie co 50 dni badano aktywność lipooksygenazy, zawartość nadtlenków, aktywność wody, wilgotność oraz potencjał przeciwutleniający próbek.

Aktywnośc lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego

Na Rysunku 12 przedstawiono zmiany aktywności lipooksygenazy zachodzące wraz z upływem czasu składowania surowca, pochodzącego z trzech kolejnych sezonów. W ciągu roku aktywność enzymu ulegała wahaniom, przy czym zasięg zmian był zależny od partii produkcyjnej. Dla materiału pochodzącego z partii 1 i 3 zmiany te nie przekraczały 10%, podczas gdy w przypadku partii 2 różnica pomiędzy minimalną, a maksymalną zarejestrowaną aktywnością enzymu wyniosła blisko 45%. Zbliżony natomiast był sam kierunek zmian, tj. przez pierwsze pół roku trwania doświadczenia obserwowano stopniowy wzrost aktywności lipooksygenazy, a następnie po osiągnięciu maksimum następował niewielki spadek i stabilizacja na określonym poziomie. Dane literaturowe potwierdzają, że takie wahania są cechą charakterystyczną lipooksygenazy pochodzenia roślinnego. Dla przykładu, od 10- do 30-procentowe odchylenia od początkowej wartości aktywności enzymu w czasie przechowywania grochu zaobserwował Gökmen i in. (2005). Również badania nad nasionami brązowego ryżu wykazały, że aktywność lipooksygenazy ulegała fluktuacjom w czasie przechowywania, przy czym zasięg i kierunek wahań był ściśle zależny od warunków prowadzenia testów, w tym od temperatury i rodzaju opakowania, w którym przechowywany był surowiec (Malekian i in., 2000).

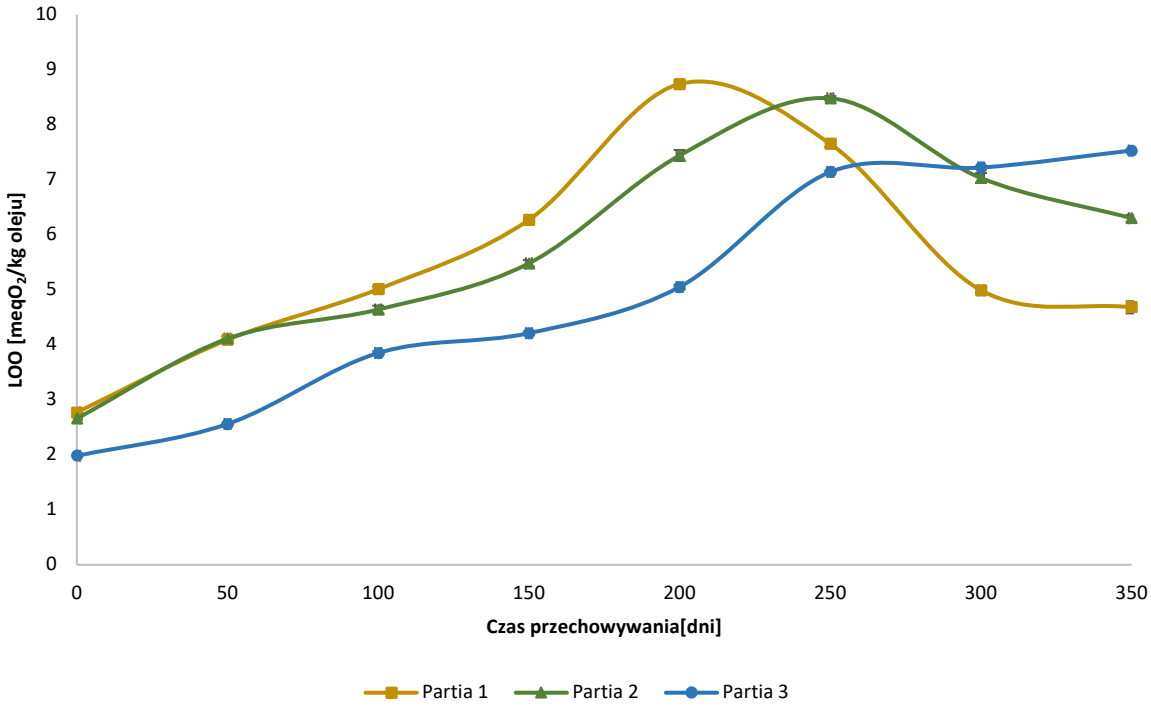


Rysunek 12. Zmiany aktywności lipooksygenazy w przechowywanych wytłokach z orzecha włoskiego

Stabilność oksydacyjna frakcji lipidowej wytłoków z orzecha włoskiego podczas przechowywania

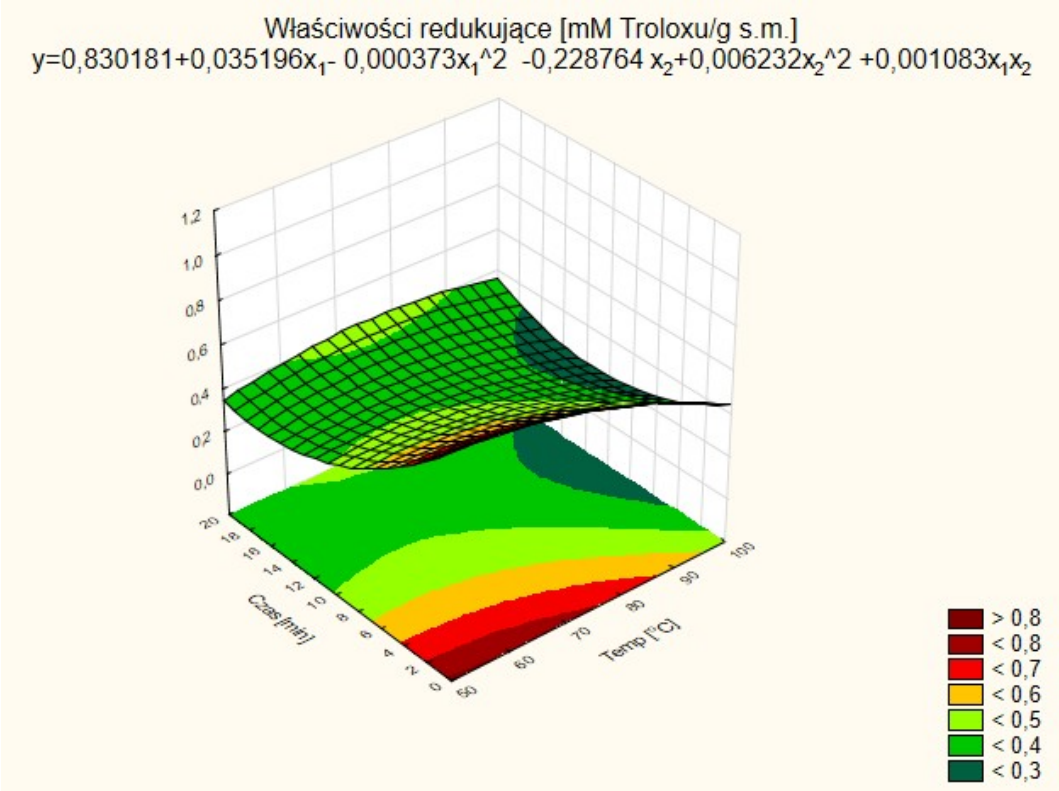
Równolegle do aktywności lipooksygenazy monitorowano stabilność oksydacyjną frakcji tłuszczowej wytłoków z orzecha włoskiego. Analizując tempo przyrostu zawartości nadtlenków można zauważyć niewielkie różnice w zależności od danej partii produkcyjnej (Rysunek 13). Najszybciej procesom utleniania ulegał surowiec pochodzący z partii 1. Przez pierwsze 150 dni frakcja tłuszczowa surowca utleniała się w tempie 0,02 meq O_2/kg na dzień, następnie dynamika wzrosła dwukrotnie i po osiągnięciu punktu maksymalnego poziom liczby nadtlenkowej zaczął stopniowo spadać. Przebieg zmian oksydacyjnych dla wytłoków pochodzących z partii 2 był bardziej umiarkowany – przez pierwsze 5 miesięcy średnie tempo utleniania wynosiło 0,02 meq O_2/kg, a przez kolejne 150 dni – 0,3 meq O_2/kg. Najwyższą stabilność oksydacyjną charakteryzował się surowiec pochodzący z sezonu 2016 (partia 3), co mogło być wynikiem niższego wyjściowego stopnia utlenienia ich frakcji tłuszczowej. W pierwszych miesiącach obserwowano wzrost liczby nadtlenkowej zbliżony przebiegiem do zmian zachodzących w partii 2 (0,02 meq O_2/kg na dzień), z wyraźnym nasileniem tworzenia nadtlenków pomiędzy 200 a 250 dniem (0,04 meq O_2/kg na dzień) oraz zahamowaniem dynamiki przyrostu zawartości nadtlenków w ostatnich miesiącach składowania (0,004 meq O_2/kg oleju). W przeciwieństwie jednak do wytłoków pochodzących z sezonów 2014 i 2015, dla partii 3 pochodzącej z sezonu 2016 nie zarejestrowano spadku stężenia nadtlenków w okresie trwania badań. Spadek liczby nadtlenkowej w ostatnich miesiącach składowania najprawdopodobniej jest konsekwencją nasilenia się procesów wtórnych, w których tempo przyrostu zawartości nadtlenków jest niższe od szybkości ich dekompozycji do nierodnikowych pochodnych, w tym odpowiedzialnych za nieprzyjemny zapach, związków karbonylowych. Jak podają Hu i Jacobsen (2017), spadek poziomu liczby nadtlenkowej w czasie przechowywania produktów o niskiej wilgotności można tłumaczyć wzmożonymi interakcjami natywnych białek surowca z generowanymi wodoronadtlenkami i heksanalem. Reakcje te prowadzą do zmniejszenia stężenia nadtlenków propagujących reakcje łańcuchowe, co odzwierciedlone jest w niższej wartości liczby nadtlenkowej. W przypadku badanych wytłoków, w których białka stanowią ponad 40% masy, takie uzasadnienie wydaje się znajdować potwierdzenie. Znacząco niższe tempo utleniania frakcji tłuszczowej orzechów włoskich stwierdził Hosseini i in. (2014).

Autorzy w trakcie rocznych testów przechowalniczych prowadzonych w temperaturze pokojowej zaobserwowali wzrost liczby nadltenkowej do 2,3 i 3,3 meq O_2/kg, kolejno dla całych orzechów i samych ich jąder (Hosseini i in, 2014). Dodatkowo przyjmuje się, że wartość graniczna liczby nadtlenkowej dla tego rodzaju orzechów nie powinna przekraczać 3,0 meq O_2/kg (Hosseini i in, 2014). Nie określono natomiast takiej wartości dla mąk wytłokowych, w których z uwagi na wysoki stopień rozwinięcia powierzchni oraz częściowo uszkodzoną strukturę tkankową tempo zachodzących zmian jest znacząco wyższe.



Rysunek 13. Zmiany zawartości nadtlenków (LOO) w przechowywanych wytłokach z orzecha włoskiego

Stwierdzona w powyższych badaniach wyższa dynamika przyrostu zawartości nadtlenków w porównaniu do szybkości wzrostu aktywności lipooksygenazy może wskazywać na zachodzenie w wytłokach z orzecha włoskiego procesów autooksydacji połączonych z procesami enzymatycznumi oraz antyoksydacyjnymi. Nie można jednoznacznie stwierdzić, który z procesów utleniania w wyższym stopniu wpływał na obniżenie ogólnej jakości surowca. Jedną z możliwości oceny byłoby monitorowanie zmian oksydacyjnych przy całkowitej inaktywacji enzymu, jednak w opinii autora próba taka nie zobrazowałaby w pełni rzeczywistych procesów zachodzących *in vivo*. Produkty generowane w wyniku utleniania enzymatycznego, jak i autooksydacji wykazują bowiem zdolność do inicjowania lub propagacji



Rysunek 35. Powierzchnia odpowiedzi dla zmian właściwości redukujących etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego w zależności od czasu i temperatury ogrzewania

Objaśnienia: y – właściwości redukujące [mM Troloxu/g s.m.]; x_1 – temperatura ogrzewania [°C]; x_2 – czas ogrzewania [min]

Podsumowując otrzymane powyżej wyniki można przyjąć, że ogrzewanie wytłoków z orzecha włoskiego przyczynia się do zmian jakościowo-ilościowych związków fenolowych surowca, przy zachowaniu zdolności redukujących i częściowej utracie aktywności przeciwrodnikowej. Do podobnych wniosków doszli również Fu i in. (2016). Davis i in. (2010) udowodnili natomiast liniową zależność między potencjałem antyoksydacyjnym wyrażonym m.in. zawartością związków fenolowych, a czasem prażenia mąki z orzechów ziemnych w temperaturze 166°C, przy czym efekt ten był widoczny przez pierwsze 10 minut, po przekroczeniu których następował stopniowy spadek właściwości przeciwutleniających. Autorzy zasugerowali, że otrzymane efekty stanowią wypadkową zachodzenia reakcji Maillarda, uwalniania wolnych związków fenolowych w początkowych fazach ogrzewania, a następnie ich stopniowej degradacji w dalszych etapach procesu (Davis i in., 2010).

Przeprowadzona analiza statystyczna konfrontująca otrzymane wyniki i uwzględniająca postawione na początku tego etapu badań założenia wykazała, że najbardziej uzasadnione jest zastosowanie ogrzewania wytłoków z orzechów włoskich w **temperaturze 90°C przez 2 minuty**. Takie warunki procesu zapewniły bowiem zahamowanie początkowej aktywności lipooksygenazy o 60% przy wzroście poziomu liczby nadtlenkowej do wartości 3,1 meq O_2/kg, tj. o 42% względem próbki kontrolnej. Równocześnie dla próbki ogrzewanej w opisywanych warunkach stwierdzono najwyższe stężenie związków fenolowych, o 30% wyższe w stosunku do próbek ekstraktów przygotowanych z wytłoków nieogrzewanych, przy nieznacznym spadku (8-procentowym) potencjału antyoksydacyjnego wyrażonego właściwościami redukującymi. Najbardziej niekorzystne zmiany wywołane obróbką termiczną zaobserwowano w przypadku aktywności przeciwrodnikowej, jednak dotyczyło to w podobnym stopniu wszystkich ocenianych wariantów próbek. Wybór warunków ogrzewania oparto również na głównych założeniach procesów temperaturowego utrwalania żywności – HTST (z ang. high temperature short time), zgodnie z którymi krótkotrwałe ogrzewanie produktów spożywczych w wysokiej temperaturze pozwala na uzyskanie pożądanego efektu ograniczenia aktywności enzymów tkankowych oraz degradacji mikroflory patogennej przy równoczesnym wysokim stopniu ochrony składników termolabilnych oraz walorów sensorycznych. Warto jednak podkreślić, że proponowane w niniejszej pracy warunki ogrzewania nie są uniwersalne i w zależności od cech wytłoków oraz założonego celu, mogą ulegać niewielkim fluktuacjom.

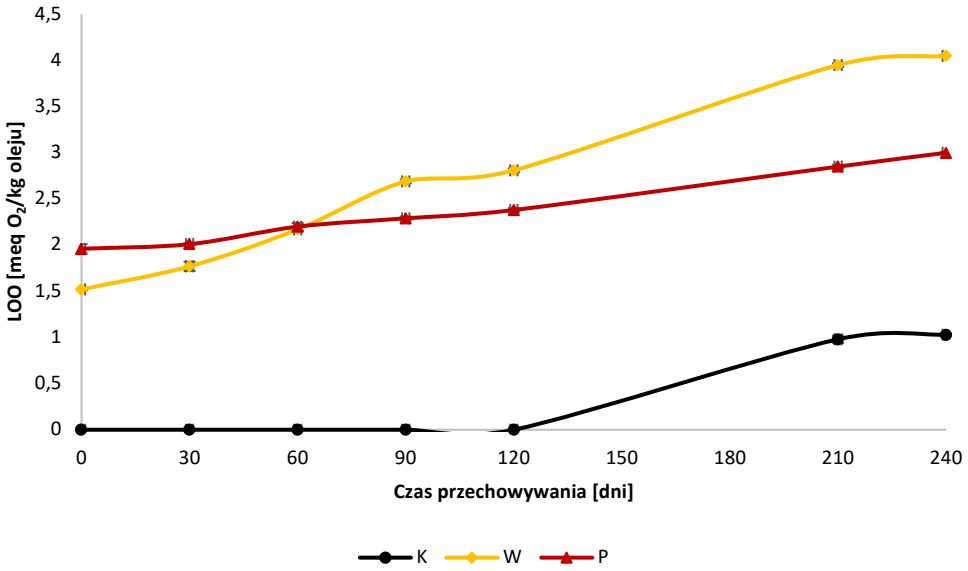
7.6.2. Wpływ procesu termicznej inaktywacji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego na stabilność oksydacyjną modelowego koncentratu ciasta w proszku

Ostatni z etapów badań był weryfikacją skuteczności przeprowadzonego procesu termicznej inaktywacji lipooksygenazy.

Pomimo, że wyniki badań *in vitro,* przeprowadzonych bezpośrednio po wykonanym procesie ogrzewania wykazały, że proces ten może wpływać korzystnie na stabilność oksydacyjną wytłoków z orzecha, pełne wnioskowanie powinno być oparte na ocenie zmian tej stabilności podczas przechowywania surowca. W związku z powyższym przeprowadzono badania przechowalnicze, podczas których porównywano zasięg i tempo zmian oksydacyjnych zachodzące w modelowych koncentratach ciasta w proszku, przygotowanych na bazie

wytłoków poddanych procesowi termicznej inaktywacji lipooksygenazy (P), niepoddanych takiemu zabiegowi (W) oraz w próbkach wykonanych z wykorzystaniem mąki pszennej (K).

W dniu rozpoczęcia badań najwyższym stopniem utlenienia frakcji tłuszczowej charakteryzowała się próbka przygotowana na bazie wytłoków ogrzewanych w 90°C przez 2 minuty, dla której poziom liczby nadtlenkowej wynosił 1,9 meq O_2/kg, co bezpośrednio wynikało z nieznacznego zainicjowania procesów oksydacyjnych w wyniku oddziaływania na surowiec podwyższoną temperaturą (badania opisane w rozdziale 7.6.1). W próbce tej stwierdzono stały przyrost zawartości nadtlenków w czasie składowania, co finalnie w dniu zakończenia testów skutkowało osiągnięciem wartości liczby nadtlenkowej na poziomie 3,0 meq O_2/kg, 1,5-krotnie wyższego w porównaniu do próbki świeżej (Rysunek 36). Dla próbek wytłoków nieogrzewanych początkowa zawartosc nadtlenków wynosiła 1,5 meq O_2/kg, równocześnie jednak charakteryzowała się ona najwyższą dynamiką zmian, wynoszącą średnio 0,01 meq O_2/kg na dzień. W konsekwencji po 8 miesiącach składowania próbek poziom liczby nadtlenkowej wzrósł ponad 2,5-krotnie i był o 25% wyższy w stosunku do próbek przygotowanych na bazie wytłoków, w których aktywność lipooksygenazy została częściwo ograniczona.



Rysunek 36. Zmiany oksydacyjne zachodzące w czasie przechowywania próbek modelowych koncentratów ciasta w proszku w warunkach normalnego składowania (21±2°C)

Objaśnienia: K - próbka kontrolna (koncentrat przygotowany na bazie mąki pszennej); W – koncentrat z dodatkiem wytłoków z orzecha włoskiego; P – koncentrat z dodatkiem wytłoków z orzecha włoskiego poddanych ogrzewaniu w temperaturze 90°C przez 2 minuty

W przypadku próbki kontrolnej pierwsze dające się zmierzyć zmiany oksydacyjne wystąpiły po czterech miesiącach przechowywania, a tempo kumulacji nadtlenków w dalszych dniach trwania badań było analogiczne do tempa zarejestrowanego dla próbek przygotowanych na bazie wytłoków niepoddanych procesowi termicznej inaktywacji lipooksygenazy.

Dodatkowo, wyniki badań wilgotności i aktywności wody (dane nieprzedstawione) jednoznacznie wskazują, że w próbkach bazujących na wytłokach ogrzewanych zmiany monitorowanych wyróżników miały mniejszy zasięg, niż te zachodzące w produktach zawierających wytłoki nieogrzewane. Biorąc wszystkie powyższe dane pod uwagę można uznać, że proces termicznej inaktywacji lipooksygenazy pozwala na obniżenie zasięgu i tempa procesów oksydacyjnych zachodzących we frakcji lipidowej modelowych koncentratów ciasta w proszku, co tym samym pozwala na wydłużenie ich okresu trwałości o 220 dni (ekstrapolacja).

7.6.3. Wpływ procesu termicznej inaktywacji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego na stabilność oksydacyjną tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich

Badania modelowe odnoszące się do potencjału antyoksydacyjnego nieogrzewanych wytłoków z orzecha włoskiego, uwzględniające również czas ich składowania wykazały znaczący wpływ zmian oksydacyjnych na wykazywane właściwości przeciwutleniające tego surowca (rozdział 7.3 i 7.4.2). Informacje te stały się przesłanką do wykonania analogicznych badań przechowalniczych, bazujących jednak na wytłokach, w których dokonano termicznej inaktywacji lipooksygenazy (ogrzewanych w temperaturze 90°C przez 2 minuty). Zachowano przy tym te same warunki pomiarowe oraz długość czasu składowania wytłoków (8 mięsiecy) przed wyodrębnieniem z nich etanolowych ekstraktów.

Ocena wpływu procesu termicznej inaktywacji lipooksygenazy nieprzechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego na ich potencjał przeciwutleniający

W pierwszym etapie badań w dniu rozpoczęcia testów wartość liczby nadtlenkowej świeżotłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich wynosiła 12,4 meq O_2/kg oleju spełniając tym samym dopuszczoną przez Kodeks Żywnościowy graniczną wartość 15 meq O_2/kg (Codex Standard 19-1981, 2017). Wykorzystany w badaniu olej z orzechów włoskich utleniał się średnio w tempie 2,0 meq O_2/kg oleju na dzień, osiągając w 15 dniu

testów wartość liczby nadtlenkowej na poziomie 42,8 meq O_2/kg oleju. Z szybkością niespełna 1,0 meq O_2/kg oleju na dzień utleniały się próbki z ekstraktami przygotowanymi na bazie dwóch wariantów wytłoków, dla których finalny poziom liczby nadtlenkowej wyniósł kolejno 27,9 meq O_2/kg oleju (W) i 27,0 meq O_2/kg oleju (P), przy czym różnice w stopniu utlenienia tych próbek były statystycznie nieistotne. Ponadto, przeciwutleniacze orzechów włoskich ograniczyły zasięg procesów oksydacyjnych w porównaniu do próbki kontrolnej o odpowiednio 35% i 37% oraz były 1,5-krotnie bardziej skuteczne niż syntetyczny przeciwutleniacz BHT (Tabela 18).

Tabela 18. Wpływ dodatku etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego na zasięg pierwotnych i wtórnych zmian oksydacyjnych w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C

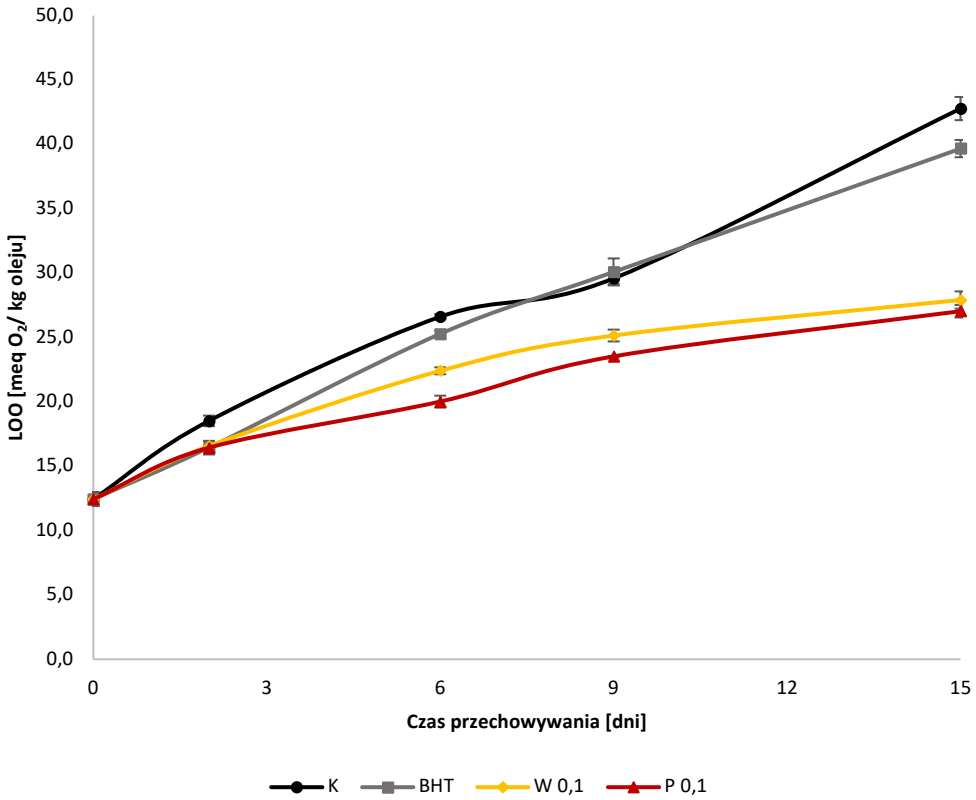
Wyróżnik	Czas [dni]	Próbka			
		K	BHT	W 0,1	P 0,1
LOO [meq O_2/kg oleju]	0	$12,4^{aA} \pm 0,5$	$12,4^{aA} \pm 0,5$	$12,4^{aA} \pm 0,5$	$12,4^{aA} \pm 0,5$
	2	$18,5^{bB} \pm 0,4$	$16,5^{bA} \pm 0,1$	$16,6^{bA} \pm 0,4$	$16,4^{bA} \pm 0,5$
	6	$26,6^{cD} \pm 0,2$	$25,3^{cC} \pm 0,3$	$22,4^{cB} \pm 0,3$	$20,0^{cA} \pm 0,5$
	9	$29,6^{dC} \pm 0,4$	$30,1^{dC} \pm 1,1$	$25,2^{dB} \pm 0,5$	$23,5^{dA} \pm 0,0$
	15	$42,8^{eC} \pm 0,9$	$39,7^{eB} \pm 0,7$	$27,9^{eA} \pm 0,7$	$27,0^{eA} \pm 0,5$
Heksanal [mg/kg]	0	$4,2^{aA} \pm 0,1$	$4,2^{aA} \pm 0,1$	$4,2^{aA} \pm 0,1$	$4,2^{aA} \pm 0,1$
	6	$9,5^{bC} \pm 1,0$	$5,4^{bA} \pm 0,1$	$7,6^{bB} \pm 0,8$	$9,1^{bC} \pm 0,2$
	15	$12,3^{cC} \pm 0,2$	$6,8^{bA} \pm 0,1$	$10,5^{cB} \pm 1,0$	$10,8^{bB} \pm 0,8$

Objaśnienia: K – próbka oleju bez dodatku przeciutleniaczy, BHT – próbka oleju z dodatkiem syntetycznego przeciwutleniacz; W 0,1 – próbka oleju z 0,1 procentowym dodatkiem ekstraktu z nieogrzewanych wytłoków z orzecha włoskiego; P 0,1 - próbka oleju z 0,1 procentowym dodatkiem ekstraktu z wytłoków z orzecha włoskiego poddanych ogrzewaniu w temperaturze 90°C przez 2 minuty

a, b, ... - średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie w kolumnach ($p<0,05$)

A, B, … - średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie w wierszach ($p<0,05$)

Wszystkie przygotowane próbki wykazały jednostajny przebieg zmian oksydacyjnych, co obrazują krzywe zmian liczby nadtlenkowej w funkcji czasu składowania (Rysunek 37), przy czym pogłębiające się różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami próbek zaczęły być rejestrowane dopiero w drugiej połowie czasu trwania testów przechowalniczych.



Rysunek 37. Wpływ dodatku etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego na zasięg pierwotnych zmian oksydacyjnych w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C

Objaśnienia: K – próbka oleju bez dodatku przeciutleniaczy, BHT – próbka oleju z dodatkiem syntetycznego przeciwutleniacz; W 0,1 – próbka oleju z 0,1 procentowym dodatkiem ekstraktu z nieogrzewanych wytłoków z orzecha włoskiego; P 0,1 - próbka oleju z 0,1 procentowym dodatkiem ekstraktu z wytłoków z orzecha włoskiego poddanych ogrzewaniu w temperaturze 90°C przez 2 minuty

Analizę porównawczą skuteczności etanolowych ekstraktów wytłoków uzupełniono o badania stężenia heksanalu jako markera wtórnych zmian oksydacyjnych. Próbki przygotowane na bazie obu wariantów wytłoków z orzecha włoskiego wykazały wzmożoną dynamikę zmian w pierwszych 6 dniach trwania testów, jednak wyższa była ona dla próbki z dodatkiem ekstraktu z wytłoków ogrzewanych (P), która wynosiła 0,8 mg/kg na dzień, przy 0,7 mg/kg dla próbki W. W kolejnych dniach testów procesy wtórne straciły na sile, dając przyrosty stężenia heksanalu na poziomie 0,2-0,3 mg/kg na dzień. Finalnie zastosowanie ekstraktów wyodrębnionych z wytłoków z orzecha włoskiego spowodowało ograniczenie wtórnych zmian oksydacyjnych o 15% (próbka W 0,1) oraz o 12% (próbka P 0,1), przy czym różnice w poziomie heksanalu w 15 dniu składowania pomiędzy tymi próbkami były nieistotne statystycznie. Średnie tempo przyrostu zawartości heksanalu w próbce zawierającej BHT wynosiło 0,2 mg/kg na dzień, co finalnie skutkowało 45-procentową skutecznością

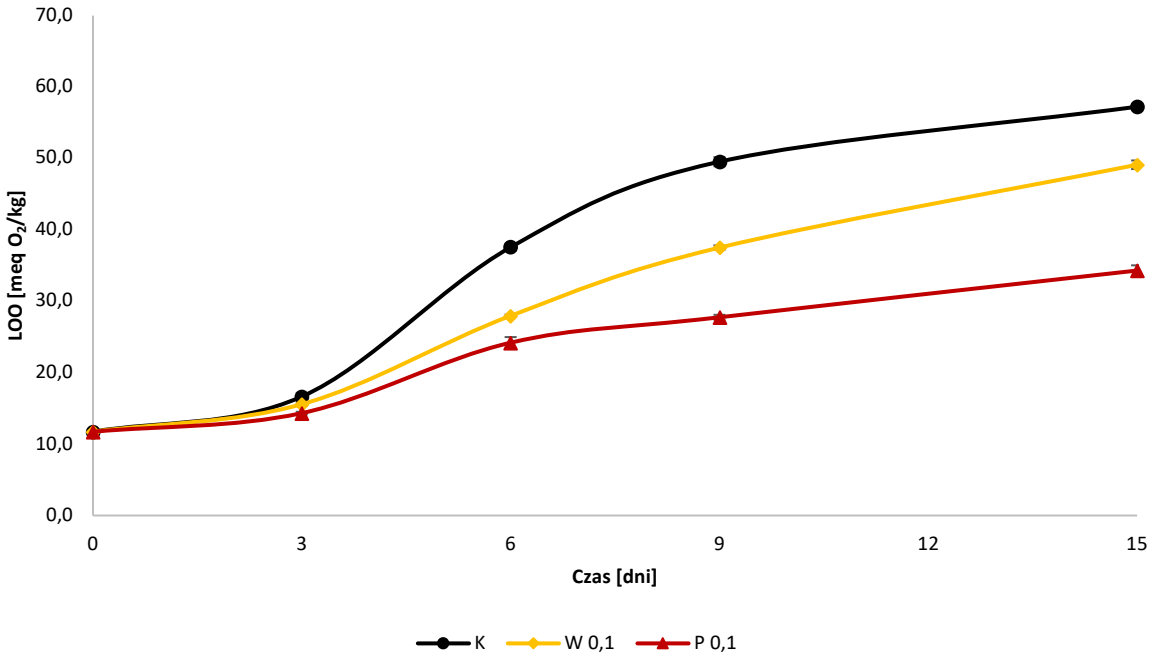
przeciwutleniacza względem próbki kontrolnej. Co więcej, w opozycji do procesów pierwotnych, przeciwutleniacz syntetyczny wykazał wyższą efektywność niż etanolowe ekstrakty pozyskane z wytłoków z orzecha włoskiego.

Otrzymane wyniki przedstawiające przebieg pierwotnych i wtórnych procesów utleniania nie pozwalają jednoznacznie wnioskować o kierunku i skuteczności oddziaływania związków fenolowych orzechów włoskich. Z pewnością można jednak uznać, że proces krótkotrwałego ogrzewania wytłoków nie wywarł wpływu na zmiany aktywności przeciwutleniającej surowca, o czym świadczy brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy oboma wariantami próbek zarówno w przypadku pierwotnych, jak i wtórnych procesów utleniania.

Ocena wpływu procesu termicznej inaktywacji lipooksygenazy przechowywanych przez 8 miesięcy wytłoków z orzecha włoskiego na ich potencjał przeciwutleniający

W testach przyśpieszonego starzenia wykonanych dla próbek oleju z orzechów włoskich stabilizowanych ekstraktami wyodrębnionymi z wytłoków nieogrzewanych i przechowywanych przez 8 miesięcy (W) oraz wytłoków poddanych procesowi termicznemu w temperaturze 90°C przez 2 minuty i przechowywanych w analogicznych do ww. warunkach (P) wykazała systematyczny przyrost zawartości pierwotnych produktów utleniania. W pierwszych trzech dniach trwania testów nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w ilości generowanych nadtlenków pomiędzy wszystkimi wariantami badanych próbek, a pierwsze znaczące zmiany zaczęły być rejestrowane dopiero w drugiej połowie testów przechowalniczych (Rysunek 38).

Próbka kontrolna utleniała się w tempie 3,0 meq O_2/kg oleju na dzień, przy czym największa dynamika zmian obserwowana była pomiędzy 3 a 9 dniem testów (4,6 meq O_2/kg na dzień). Najniższym postępem procesów oksydacyjnych (1,5 meq O_2/kg na dzień) i tym samym najniższą finalną wartością liczby nadtlenkowej charakteryzowała się natomiast próbka P 0,1 – stabilizowana ekstraktem pozyskanym z wytłoków ogrzewanych w temperaturze 90°C przez 2 minuty przed 8-miesięcznym przechowywaniem, dla której stwierdzono 40-procentowe ograniczenie procesów utleniania w stosunku do próbki kontrolnej i o niespełna 30-procentową wyższą skuteczność w odniesieniu do próbki W 0,1. W konsekwencji trwałość oleju stabilizowanego ekstraktami z wytłoków ogrzewanych została wydłużona o 14 dni (ekstrapolacja).



Rysunek 38. Wpływ dodatku etanolowych ekstraktów z przechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego na zasięg pierwotnych zmian oksydacyjnych w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C

Objaśnienia: K – próbka oleju bez dodatku przeciutleniaczy; W 0,1 – próbka oleju z 0,1 procentowym dodatkiem ekstraktu z nieogrzewanych wytłoków z orzecha włoskiego przechowywanych 8 miesięcy; P 0,1 - próbka oleju z 0,1 procentowym dodatkiem ekstraktu z wytłoków z orzecha włoskiego poddanych ogrzewaniu w temperaturze 90°C przez 2 minuty, przechowywanych przez 8 miesięcy

15-dniowe składowanie próbek oleju w temperaturze 50°C spowodowało nasilenie się w nich procesów wtórnych, przy czym w momencie zakończenia badań najniższe stężenie heksanalu stwierdzono dla próbki kontrolnej. Co więcej, charakteryzowała się ona wprost proporcjonalnym do czasu składowania tempem zmian, podczas gdy w próbkach z dodatkiem przeciwutleniaczy najwyższą dynamikę procesów zaobserwowano w pierwszych 6 dniach trwania testów. Oba zastosowane warianty ekstraktów spowodowały nasilenie procesów wtórnych względem próbki kontrolnej o kolejno 54% w przypadku próbki W 0,1 oraz 38% dla próbki P 0,1.

Tabela 19. Wpływ dodatku etanolowych ekstraktów z przechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego na zasięg pierwotnych i wtórnych zmian oksydacyjnych w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C

Wyróżnik	Czas [dni]	Próbka		
		K	W 0,1	P 0,1
LOO [meq O_2/kg oleju]	0	$11,7^{aA} \pm 0,2$	$11,7^{aA} \pm 0,2$	$11,7^{aA} \pm 0,2$
	3	$16,7^{bB} \pm 0,5$	$15,6^{bAB} \pm 0,2$	$14,3^{bA} \pm 0,2$
	6	$37,6^{cC} \pm 0,5$	$28,0^{cB} \pm 0,2$	$24,2^{cA} \pm 0,8$
	9	$49,5^{dC} \pm 0,7$	$37,5^{dB} \pm 0,3$	$27,8^{dA} \pm 0,3$
	15	$57,2^{eC} \pm 0,3$	$49,1^{eB} \pm 0,6$	$34,3^{eA} \pm 0,7$
Heksanal [mg/kg]	0	$6,2^{aA} \pm 0,5$	$6,2^{aA} \pm 0,5$	$6,2^{aA} \pm 0,5$
	6	$8,1^{aA} \pm 0,97$	$14,7^{bC} \pm 0,8$	$11,6^{bB} \pm 0,7$
	15	$10,0^{bA} \pm 0,27$	$15,4^{bC} \pm 1,0$	$13,8^{cB} \pm 0,8$

a, b, … - średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie między sobą w kolumnach ($p<0,05$)
A, B, ...- średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie między sobą w wierszach ($p<0,05$)

Przeprowadzone badania wykazały, że termiczny proces inaktywacji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego nie wpływa negatywnie na właściwości funkcjonalne tego surowca, ale pozwala na zachowanie ich na wyższym poziomie w czasie przechowywania. Dodatkowo biorąc pod uwagę dane dotyczące zasięgu pierwotnych i wtórnych zmian oksydacyjnych, stwierdzonych w obu etapach badań, z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że związki fenolowe orzechów włoskich działają selektywnie, opóźniając pierwotne procesy utleniania, ale w mniejszym stopniu chroniąc przed rozpadem powstających nadtlenków.

Przeprowadzone w tej fazie pracy badania miały na celu weryfikację słuszności zastosowania metody termicznej inaktywacji lipooksygenazy, w kontekście ograniczenia zasięgu zmian oksydacyjnych zachodzących w czasie składowania wytłoków z orzecha włoskiego oraz zachowania ich potencjału przeciwutleniającego. Otrzymane wyniki wskazują, że oddziaływanie na surowiec temperaturą 90°C przez 2 minuty wydłuża jego trwałości, co pozwala m.in. w dłuższym czasie wykorzystywać jego potencjał antyoksydacyjny. Wnioski te stanowią podstawę do pozytywnego zweryfikowania hipotezy drugiej.

8.Podsumowanie wyników i wnioski

Produkcja żywności stanowi jedno z podstawowych źródeł odpadów stałych o różnym stopniu oddziaływania na środowisko. Często pozostałości poprodukcyjne charakteryzują się wysoką wartością odżywczą bezpośrednio determinowaną analogicznym do surowca wyjściowego składem chemicznym, w tym zachowaniem wielu składników o właściwościach bioaktywnych. W obliczu postępującego problemu wyczerpywania się zasobów ziem uprawnych oraz wzmożonego marnotrawienia żywności w krajach rozwiniętych, podejmuje się próby waloryzacji generowanych przez przemysł spożywczy odpadów, poprzez wykorzystywanie ich jako składników recepturowych oraz surowców, z których pozyskuje się naturalne związki funkcjonalne, w tym błonnik pokarmowy, barwniki, witaminy oraz przeciwutleniacze. Sektorem, który dostarcza cennych pod kątem żywieniowym produktów ubocznych jest przemysł olejarski, gdzie w wyniku procesu tłoczenia otrzymywane są wytłoki, dotychczas niedoceniane przez producentów żywności i na szeroką skalę używane głównie przez przemysł paszowy. Prognozowany jednak na najbliższe lata spadek wykorzystania wytłoków w skarmianiu zwierząt implikuje konieczność znalezienia innych form ich zagospodarowania, wśród których jedną z najprostszych i jednocześnie najtańszych wydaje się być implementacja wytłoków do produktów przemysłu piekarskiego i cukierniczego, jako recepturowych składników całkowicie lub częściowo zastępujących powszechnie stosowane mąki.

Dotychczasowy niski stopień zainteresowania wytłokami roślin oleistych bezpośrednio przekłada się na wciąż niedostateczną wiedzę na temat ich trwałości, co jest z kolei kluczowe w obliczu zapewnienia ich wysokiego stopnia bezpieczeństwa żywieniowego i zdrowotnego oraz wartości odżywczej i walorów sensorycznych determinujących potencjalną komercjalizację. Charakterystyczny skład chemiczny, cechy fizyczne, w tym naruszona struktura tkankowa oraz wysoki stopień rozwinięcia powierzchni wskazują, że szczególną uwagę należy poświęcić procesom oksydacjnym zachodzącym we frakcji tłuszczowej, które mogą nasilać się w miarę upływu czasu składowania. Poznanie zasięgu i kierunku tych zmian jest niezbędne podczas prognozowania okresu trwałości wytłoków oraz produktów z nich otrzymanych. Dodatkowo swoiste, dość silnie zauważalne, właściwości organoleptyczne wytłoków sugerują, że na cele żywieniowe powinny być wykorzystywane przede wszystkim te produkty uboczne, które powstają w wyniku przerobu surowców oleistych o akceptowanym

przez konsumentów smaku i zapachu, w tym wytłoki dyniowe, sezamowe, słonecznikowe czy wreszcie wciąż mało popularne wytłoki z orzechów włoskich.

W literaturze przedmiotu tematyka utleniania kwasów tłuszczowych jest dokładnie opisana i odwołuje się do szeregu surowców i produktów spożywczych. Wciąż jednak prace skupiają się przede wszystkim na procesach chemicznych w dużym stopniu pomijając rolę natywnych enzymów. Bardzo często również procesy te rozważane są niezależnie od siebie, co w konsekwencji nie odzwierciedla rzeczywistych zmian. W niniejszej pracy skupiono się zatem na określeniu rodzaju czynników oraz kierunków w jakim determinują one trwałość wytłoków z orzecha włoskiego.

Materiał badany, jakim były wytłoki z orzecha włoskiego scharakteryzowano pod kątem udziału poszczególnych składników pokarmowych, profilu kwasów tłuszczowych oraz związków fenolowych. Przeprowadzone badania potwierdziły, że surowiec ten cechuje wysoka wartość odżywcza, dyktowana ponad 40-procentowym udziałem białka w składzie oraz blisko 10-procentowym udziałem błonnika pokarmowego. Co więcej, profil kwasów tłuszczowych jest analogiczny do profilu orzechów włoskich, w którym ponad 70% stanowią niezbędne wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Potwierdzono dominujący udział kwasu elagowego i jego pochodnych we frakcji związków fenolowych, co może warunkować potencjalnie prozdrowotny charakter omawianego surowca. Ponadto, w ekstraktach z orzecha włoskiego zidentyfikowano kwas galusowy, wanilinowy oraz (+)-katechinę. Twierdzi się, że produkty rozpadu kwasu elagowego w przewodzie pokarmowym wykazują silne właściwości antymutagenne, antykarcerogenne, przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe. Zapobiegają również rozwojowi chorób układu sercowo-naczyniowego oraz stymulują rozwój korzystnej mikroflory bakteryjnej przewodu pokarmowego.

Pierwszy etap badań stanowił diagnozę czynników determinujących trwałość wytłoków z orzecha włoskiego oraz zasięgu zmian nimi powodowanych podczas 12-miesięcznego przechowywania surowca w warunkach praktycznego składowania w temperaturze pokojowej. W wytłokach z orzecha włoskiego potwierdzono aktywność natywnej lipooksygenazy oraz systematyczny postęp procesów utleniania kwasów tłuszczowych. Procesy te miały podłoże chemiczne i enzymatyczne, przy czym aktywność lipooksygenazy przez okres roku utrzymywała się na realtywnie stabilnym poziomie, podczas gdy tempo autooksydacji wyrażone wzrostem pierwotnych produktów utleniania konsekwentnie wzrastało. Ponadto po ponad półrocznym składowaniu surowca nasileniu uległy procesy

wtórne, rejestrowane jako spadek wartości liczby nadtlenkowej, któremu towarzyszyło obniżenie aktywności przeciwutleniającej.

W testach przechowalniczych trwających 8 miesięcy opartych na badaniach modelowego koncentratu ciasta w proszku przygotowanego na bazie wytłoków z orzecha włoskiego oraz testach przyspieszonego starzenia przeprowadzonych na próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich stabilizowanych ekstraktami pozyskanymi z wytłoków wykazano, że czas przechowywania wytłoków wpływa niekorzystnie na wykazywane przez ten surowiec właściwości oraz ogranicza trwałość produktów powstałych na jego bazie.

Mając na uwadze założenia pracy dotyczące kształtowania jakości frakcji tłuszczowej przez czynniki o charakterze pro- i przeciwutleniającym, w kolejnym etapie badań oceniono wpływ modelowych fenolokwasów oraz natywnych związków fenolowych wytłoków z orzecha włoskiego na aktywność lipooksygenazy tego surowca. W badaniach zastosowano roztwory kwasu elagowego, galusowego, kawowego, ferulowego, synapinowego i wanilinowego. Stwierdzono skuteczność wyżej wymienionych substancji, zależną od stężenia przeciwutleniacza w układzie i w ściśle określonym zakresie – aktywność wszystkich zastosowanych związków początkowo rosła wraz ze wzrostem ich udziału w składzie mieszaniny reakcyjnej, a po osiągnięciu maksimum malała w tempie zależnym od związku. Najwyższą skutecznością cechowały się kwas galusowy i synapinowy, które w blisko 30% hamowały aktywność enzymu w warunkach *in vitro*. Kwas wanilinowy natomiast bez względu na stężenie działał proutleniająco. Dodatkowo udowodniono wzajemne interakcje pomiędzy związkami fenolowymi. Wykazano synergistyczne oddziaływanie kwasu kawowego i ferulowego z innymi kwasami, bez względu na zastosowane stężenie w układzie. Antagonistycznie w stosunku do pozostałych związków oddziaływał kwas galusowy.

Zasadniczą część badań stanowiła ocena możliwości wykorzystania procesów termicznych do ograniczania zmian oksydacyjnych zachodzących we frakcji tłuszczowej wytłoków z orzecha włoskiego w czasie ich składowania. Na podstawie opracowanych modeli regresji powierzchni odpowiedzi uznano, że najbardziej odpowiednimi warunkami, dającymi zadowalające efekty jest 2-minutowe ogrzewanie materiału badanego w temperaturze 90°C. Pozwoliło to na 60-procentowe zahamowanie początkowej aktywności lipooksygenazy, przy wzroście stopnia utlenienia frakcji tłuszczowej o 40%. Dodatkowo, zastosowana obróbka termiczna spowodowała wzrost zawartości związków fenolowych przy równoczesnym nieznacznym

spadku potencjału przeciwutleniającego wyrażonego siłą redukującą oraz właściwościami antyrodnikowymi.

Istotnym elementem pracy były badania modelowe mające na celu weryfikację skuteczności zastosowania termicznej inhibicji lipooksygenazy. O słuszność przyjętych założeń wnioskowano na podstawie oceny tempa zachodzenia procesów oksydacyjnych w modelowym koncentracie ciasta w proszku przygotowanym na bazie wytłoków z orzecha włoskiego oraz w tłoczonym na zimno oleju z orzechów włoskich stabilizowanym ekstraktami pozyskanymi z wytłoków. W badaniach uwzględniono również wpływ czasu składowania surowca przed jego wykorzystaniem. W przypadku koncentratów ciasta w proszku proces termicznej inaktywacji lipooksygenazy wpłynął na 25-procentowy wzrost stabilności oksydacyjnej tych produktów w czasie ich 8-miesięcznego przechowywania względem próbki kontrolnej. Ponadto, testy przyśpieszonego starzenia wykonane z wykorzystaniem próbek tłoczonego na zimno oleju stabilizowanych ekstraktami wytłoków wykazały zachowanie właściwości przeciwutleniających na poziomie wyższym niż 75% wartości początkowej i blisko 30-procentową wyższą skuteczność w odniesieniu do wytłoków niepoddanych procesom termicznej inaktywacji lipooksygenazy, co bezpośrednio wydłużało czas składowania oleju o 14 dni.

Wykazano, że termiczne ograniczenie aktywności lipooksygenazy wydłuża trwałość wytłoków, co bezpośrednio wydłuża czas, w którym mogą być one wykorzystywane w przemyśle spożywczym.

Uzyskane na wszystkich etapach przeprowadzonych badań informacje pozwoliły na pozytywne zweryfikowane postawionych hipotez badawczych.

Na podstawie analizy wyników otrzymanych z przeprowadzonych badań, sformułowano następujące wnioski:

1. Badane wytłoki z orzecha włoskiego stanowią źródło związków, które odpowiadają za ich wysoką wartość odżywczą i w konsekwencji implikują możliwość ich zagospodarowania na potrzeby przemysłu spożywczego.
2. W czasie składowania wytłoków z orzecha włoskiego zachodzą w nich zmiany oksydacyjne warunkowane procesami chemicznymi i enzymatycznymi. Zmiany te mogą ograniczać wykorzystanie wytłoków na szeroką skalę w przemyśle spożywczym. Są one częściowo hamowane przez aktywność natywnych związków fenolowych.

3. Związki fenolowe wykazują zdolność do ograniczania aktywności natywnej lipooksygenazy, która jest zależna od stężenia i rodzaju przeciwutleniaczy oraz interakcji między nimi.
4. Wytłoki z orzecha włoskiego poddane procesom termicznej inaktywacji lipooksygenazy wykazują wyższą stabilność oksydacyjną w czasie przechowywania nie tracąc przy tym swoich właściości przeciwutleniających.

Przeprowadzone badania mogą stanowić punkt wyjścia w kierunku prowadzenia prac rozwojowych nad wykorzystaniem wytłoków z orzecha włoskiego w przemyśle spożywczym.

Literatura

Abdallah, I. B., Macciola, V., Boukhchina, S., de La Torre Fornell, R. & De Leonardis, A. (2017). The negligible role of ellagic acid in preventing fat oxidation of Tunisian walnut (*Juglans regia* L.). *Food Measure, 11*, 1406-1411.

Abdallah, I. B., Tlili, N., Martinez-Force, E., Rubio, A. G. P., Perez-Camino, M. C., Albouchi, A. & Boukhcina, S. (2014). Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. Food Chemistry. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.095

Abramovič, H. (2015). Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acid Derivatives: A Focus on Biochemistry, Physicochemical Parameters, Reactive Species, and Biomolecular Interactions. W: *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier.

ACS (2011). Walnut are top nut for heart-healthy antioxidants. American Chemical Society News. Pobrane z: https://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/newsreleases/2011/march/walnuts-are-top-nut-for-heart-healthy-antioxidants.html [dostęp 12.03.2018]

Afsah-Hejri, L., Jinap, S., Hajeb, P., Radu, S. & Shakibazadeh, S. (2013). A review on mycotoxin in food and feed. Malaysia case study. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12*, 629-651.

Agbor, G. A., Oben, J. E., Ngogang, J. Y., Xinxing, C. & Vinson, J. A. (2005). Antioxidant capacity of some herbs/spices from Cameroon: a comparative study of two methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53*(17), 6819-6824.

Ahad, T., Masoodi, L., Nissar, J., Rather, A. H., Hussain, S. Z. & Maqbool, K. (2017). Effect of packaging and ambient temperature on organoleptic observations of inshelled walnuts under different various storage periods. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6*(6),1336-1339.

Akay, F., Kazan, A., Celiktas, M. S. & Yesil-Celiktas, O. (2015). A holistic engineering approach for utilization of olive pomace. *Journal of Supercritical Fluids, 99*, 1-7.

Al-Weshahy, A., El-Nokety, M., Bakhete, M. & Rao, V. (2013). Effect of storage on antioxidant activity of freeze-dried potato peels. *Food Research International 50*, 507-512.

Alajaji, S. A. & El-Adawy, T. A. (2006). Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis, 19*, 806-812.

Alfawaz, A. A. (2004). Chemical composition and oil characteristic of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds kernels. *Journal of Agriculture Science and Food Research, 129*, 5-18.

Alhendi, A., Yang, W., Goodrich-Schneider, R. & Sarnoski, P. J. (2017). Total inactivation of lipoxygenase in whole soya bean by pulsed light and the effect of pulsed light on the chemical properties of soya milk produced from the treated soya beans. *International Journal of Food Science and Technology*. doi: 10.1111/ijfs.13604

Aljuraiban, G. S., Griep, L. M., Chan, Q., Daviglus, M. L., Stamler, J., Van Horn, L., Elliott, P. & Frost, G. S. (2015). Total insoluble and soluble dietary fiber intake in relation to blood pressure: the inermap study. *British Journal of Nutrition, 114*(9), 1480-1486.

Alobo, A. P. (2001). Effect of sesame seed flour on millet biscuit characteristics, *Plant Foods for Human Nutrition, 56*, 195–202.

Ambroziak, Z. (2010). *Produkcja Piekarsko-Ciastkarska. Część 2.* Warszawa: WSiP Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne.

Andueza, S., Manzocco, L., de Peña, M.P., Cid, C. & Nicoli, C. (2009). Caffeic acid decomposition products: Antioxidants or pro-oxidants? *Food Research International, 1*(42), 51-55.

Anese, M. & Sovrano, S. (2006). Kinetic of thermal inactivation of tomato lipoxygenase. *Food Chemistry, 95,* 131-137.

Anthon, G. E. & Barrett, D. M. (2003). Thermal inactivation of lipoxygenase and hydroperoxytrienoic acid lyase in tomatoes. *Food Chemistry, 81,* 275-279.

AOAC International. (2000). Official Methods of Analysis (168th ed.). Washingtion: DC Association of Official Analytical Chemists.

Arab, L. & Ang, A. (2015). A cross sectional study of the association between walnut consumption and cognitive function among adults us populations represented in NHANES. *Journal of Nutrition Health and Aging, 19*(3), 284-290.

Arcan, I. & Yemenicioglu, A. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis, 22*(3), 184-188.

Arranz, S., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. (2008). Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *European Food Research and Technology, 227*, 425-431.

Askew, K. (2018a). *2018 and beyond: Five mega-trends set to shape the food industry*. Pobrane z: https://www.foodnavigator.com/Article/2018/01/03/2018-and-beyond-Five-mega-trends-set-to-shape-the-food-industry. [dostęp 28.01.2018]

Askew, K., (2018b). *The protein challenge: meeting global demand*. Pobrane z: https://www.foodnavigator.com/Article/2018/01/10/The-protein-challenge-meeting-global-demand. [dostęp 28.01.2018]

Ayo, J., Carballo, Serrano, J., Olmedilla-Alonso, B., Ruiz-Capillas, C. & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Effect of total replacement of pork backfat with walnut on the nutritional profile of frankfurters*. Meat Science, 77*, 173-181.

Azadmard-Damirichi, S., Emami, S., Hesari, J., Peighambardoust, S. H. & Nemati, M. (2011). Nuts Composition and their health benefits. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering, 5*(9), 67-71.

Aziz, S., Wu, Z. & Robinson, D. S. (1999). Potato lipoxygenase catalyzed co-oxidation of β-carotene. *Food Chemistry, 64,* 227-230.

Babenko, L. M., Kosakivska, I. V., Akimov, Y. A., Klymchuk, D. O. & Skaternya, T. D. (2014). Effect of temperature stress on pigment content, lipoxygenase activity and cel ultrastructure of winter wheat seedlings. *Genetic Plant Physiology, 4*(1-2), 117-125.

Baer, D. J., Gebauer, S. K. & Novotny, J. A. (2016). Walnuts consumed by healthy adults provide less available energy then predicted by the Atwater factors. *Journal of Nutrition, 146*(1), 9-13.

Bahaciu, G V., Segal, R. & Nicolae, C. G. (2015). Improvement of the antioxidant activity of soybean (*Glycine max*.) by biotechnological processing. *Romanian Biotechnological Letters, 20*(2), 10212-10220.

Bakkalbasi, E., Meral, R. & Dogan, I. S. (2015). Bioactive compounds, physical and sensory properties of cake made with walnut press-cake. *Journal of Food Quality, 38*, 422-430.

Bakkalbasi, E., Yilmaz, Q. M., Poyrazoglu, E. S. & Artik, N. (2012). Tocopherol contents of walnut varieties grown in Turkey and the effect of storage on tocopherol content. *Journal of Food Processing and Preservation, 38*, 518-526.

Banel, H. K. & Hu, F. B. (2009). Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: a meta-analysis and systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition, 90*(1), 56-63.

Banerjee, S. (2006). Inhibition of mackerel (*Scomber scombrus*) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols. *Food Research International, 39*, 486-491.

Baraniak, B. M. & Szymanowska, U. (2006). Lipooksygenaza w żywności pochodzenia roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2*(47), 29-45.

Baraniak, B. & Krzepiło, A. (2004). Inhibition of broccoli lipoxygenase by some phenolic compounds – a short report. *Polish Journal of Food Nutrition Science*, *13*(54), 339-342.

Barber, L. I. & Obinna-Echem, P. C. (2016). Nutrient composition, physical and sensory properties of wheat-African walnut cookies. *Journal of Food Science, 5*(4), 24-30.

Batna, A. & Spiteller, G. (1994). Effect of soybean lipoxygenase-1 on phosphatidylcholines contaning furan fatty acids. *Lipids, 29,* 397-403.

Baysal, T. & Demirdöven, A. (2007). Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and Microbial Technology, 40,* 491-496.

Beegum, S., Sharma, M., Manikantan, M. R. & Gupta, R. K. (2017). Effect of virgin coconut oil cake on physical, textural, microbial and sensory attributes of muffins. *International Journal of Food Science and Technology, 52*(2), 540-549.

Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*, BerlinHeidelberg. Springer-Verlag.

Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analitical Biochemistry, 239*, 70-76.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (s. 189-226). *Biochemia.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.

Bhise, S., Kaur, A., Ahluwali, P. & Thind, S. S. (2014). Texturization of deoiled cake of sunflower, soybean and flaxseed into food grade meal and its utilization in preparation of cookies. *Nutrition and Food Science, 44*(6), 576-585.

Biacs, P. A. & Daood, H. G. (2000). Lipoxygenase – catalyzed degradation of carotenoids from tomato in the presence of antioxidant vitamins. *Biochemical Society Transactions, 28,* 839.

Białek, M., Rutkowska, J., Adamska, A. & Bajdalow, E. (2016). Partial replacement of wheat flour with pumpkin seed flour in muffins offered to children. *CYTA – Journal of Food*, 14(3), 391-398.

Bińczak, O., Małecka, M. & Samotyja ,U. (2015). Characterisation of lipoxygenase activity in walnut cake. w: K. Juś, J. Jasnowska-Małecka, J., O. Bińczak O. (red.). *Current Trends in Commodity Science - New Trends in Food Quality, Packaging and Consumer Behavior.* (s. 7-20). Poznań: Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu.

Bińczak, O., Pawłowski, T., Jankowska, A. i Kowalski, D. (2016a). Wpływ dodatku wytłoków rzepakowych na jakość sensoryczną chleba. w: D. Górecka, E. Pospiech (red.). *Zagospodarowanie ubocznych produktów przemysłu spożywczego*. (s. 36-46). Poznań: Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.

Bińczak, O., Samotyja, U. i Małecka, M. (2016b). Aktywność przeciwutleniająca wytłoku z orzecha włoskiego w: D. Górecka, E. Pospiech (red.). *Zagospodarowanie ubocznych produktów przemysłu spożywczego*. (s. 15-24). Poznań: Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.

Bińczak, O. & Samotyja, U. (2018). Effect of long-term storage on antioxidant activity of walnut cake. *Towaroznawcze Problemy Jakości, 2*(55), 57-65.

Bisswanger, E. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science, 1*, 45-55.

Blomhoff, R., Carlsen, M. H., Andersen, L. F. & Jacobs, D. R. (2006). Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition, 96*, 52-60.

Borbulevych, O. Y., Jankun, J., Selman, S. & Skrzypezak-Jankun, E. (2004). Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-Ray structure at 2.1 A resolution. *Proteins, Structure, Function and Bioinformatic, 54,* 19.

Borchani, C., Besbes, S., Blecker, C. & Attia, H. (2010). Chemical Characteristics and Oxidative Stability of Sesame Seed, Sesame Paste, and Olive Oils. *Journal of Agricultural Science and Technology, 12*, 585-596.

Borecka, W., Walczak, Z. i Starzycki, M. (2013). Orzech włoski (*Juglans regia* L.) – naturalne źródło prozdrowotnych składników żywności. *Nauka Przyroda Technologie, 7*(2), 1-7.

Borys. B. (2014). Produkty uboczne biopaliw w żywieniu owiec – makuch rzepakowy i słonecznikowy. *Wiadomości Zootechniczne, LII*(4), 18-35.

Boussetta, N., Soichi, E., Lanoiselle, J. L. & Vorobiev, E. (2014). Valorization of oilseed residues: extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields. *Industrial Crop and Products, 52*, 347-353.

Brash, A. R. (1999). Lipoxygenase: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry, 274*, 23679-23682.

Breeze, M. L., Meng, C., Harrison, J. M., George, C. & Colyer, J. D. (2015). Relationship between composition of oilseed processed fractions and the whole oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 92*(2), 203-213.

Bujdosó, G., Végvári, G., Hajnal, V., Ficzek, G. & Tóth, M. (2014). Phenolic profile of the kernel of selected persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Not Bot Horti Agrobo, 42*(1), 24-29.

Buranasompob, A., Tang, J., Powers, J. R., Reyes, J., Clark, S. & Swanson, B. G. (2007). Lipoxygenase activity in walnuts and almonds. *LWT-Food Science and Technology, 40,* 893-899.

Busto, M. D., Owusu Apenten, R. K., Robinson, D. S., Wu, Z., Casey, R. & Hughes, R. K. (1999). Kinetic of thermal inactivation of pea seed lipoxygenase and the effect of additives on their thermostability. *Food Chemistry, 65,* 323-329.

Cai, K., Fang, Y., Xia, Y. & Su, Y. (2004). Effect of exogenous iron on aerobic catalytic mechanism of soybean lipoxygenase. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*, *32*, 21-26.

Casey, R. & Hughes, R. K. (2004). Recombinant Lipoxygenases and Oxylipin Metabolism in Relation to Food Quality. *Food Biotechnology, 18*(2), 135-170.

Casey, R., West, S. I., Hardy, D., Robinson, D. S., Wu, Z. & Hughes, R. K. (1999). New frontiers in food enzymology: recombinant lipoxygenases. *Trends in Food Science and Technology, 10,* 297-302.

Catalá, A (ed.) (2017). *Lipid Peroxidation: Inhibition, Effects and Mechanism.* Nova Science Publishers, Inc.

Centrum Badań Opinii Społecznej. (2014). *Zachowania żywieniowe Polaków*. Komunikat z badań CBOS. Warszawa: Fundacja Centrum Badań Opinii Społecznej.

Chambal, B., Bergenstähl, B. & Dejmek, P. (2012). Edible proteins from coconut milk press cake; one step alkaline extraction and characterization by electrophoresis and mass spectrometry. *Food Research International*, *47*(2), 146-151.

Chedea, V. S. & Jisaka, M. (2011). Inhibition of Soybean Lipoxygenases – Structural and Activity Models for the Lipoxygenase Isoenzymes Family. w: D. Krezhova (ed.) *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*, (s. 109-130). Pobrane z http://www.intechopen.com/books/recent-trends-for-enhancing-the-diversity-and-quality-of-soybeanproducts/inhibition-of-soybean-lipoxygenases-structural-and-activity-models-for-the-lipoxygenase-isoenzymesf

Chedea, V. S., Vicas, S. I., Oprea, C. & Socaciu, C. (2006). Lipoxygenase kinetic in relation with lipoxygenase's inhibition by quercetin. Proceedings of the XXXVI Annual Meeting of the European Society for New Methods in Agrcultural Research (ESNA), 10-14 września 2006, Iasi-Rumunia, 449-456.

Chee, K. L., Ling, H. K. & Ayob, M. K. (2012). Optimization of trypsin-assisted extraction, physico-chemical characterization, nutritional qualities and functionalities of palm kernel cake protein. *LWT-Food Science and Technology*, *46 (2),* 419-427.

Cheigh, H. S., Um, S. H. & Lee, C. Y. (1995). Antioxidant characteristics of melanin-related products from enzymatic browning reaction to catechin in a model system. ACS Symposium Series 600. *American Chemical Society*, 200–208.

Chibowski, P., Izdebski, W., Laskowska, E., Makarchuk, O., Skudlarski, J., Aleksandrovna Zaika, S. i Zając, S. (2016). Stan i perspektywy produkcji roślin oleistych w Polsce i na Ukrainie w kontekście rozwoju sektora biopaliw transportowych. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Problemy Rolnictwa Światowego, 16*(1), 60-70.

Chinma, C. E., Igbabul, B. D. & Omotayo, O. O. (2012). Quality characteristic of cookies prepared from unripe plantain and defatted sesame flour blends. *American Journal of Food Technology, 7*(7), 398-408.

Choe, E. & Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8*(4), 345-358.

Codex Standard 19-1981 – Codex Standard for edible fats and oils not covered by individual standards. (2017). FAO/WHO. Codex Stan 19-1981.

Coelho, M. S. & Salas-Mellado, M. D. L. M. (2015). Effects of substituting chia (*Salvia hispanica* L.) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. *Food Science and Technology, 60*, 729-726.

Cofrades, S., Serrano, A., Ayo, J., Carballo, J. & Jiménez-Colmenero, F. (2008). Characteristic of meat batters with added native and preheated defatted walnut. *Food Chemistry, 107*(4), 1506-1514.

Contreras, C., Tjellström, H. & Beaudry, R. M. (2016). Relationships between free and esterified fatty acids and LOX-derived volatiles during ripening in apple. *Postharvest Biology and Technology, 112,* 105-113.

Copolovici, D., Bungau, S., Boscencu, R., Tit, D. M. & Copolovici, L. (2017). The fatty acids composition and antioxidant activity of walnut cold press oil. *Revista de Chimie-Bucharest, 68*(3), 507-509.

Cosmulescu, S. & Trandafir, I. (2011). Variation of phenols content in walnut (*Juglans regia* L.). *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment, 2*(1), 25-33.

Costa, J., Carrapatoso, I., Oliveira, M. B. & Mafra, I. (2014). Walnut allergens: Molecular characterisation, detection and clinical relevance. *Clinical & Experimental Allergy*. doi: http://dx.doi.org/10.1111/cea.12267

Cozea, A., Ionescu, N., Popescu, M., Neagu, M. & Gruia, R. (2016). Comparative study concerning the composition of certain oil cakes with phytotherapeutical potential. *Revista de Chimie (Bucharest), 67*(3), 422-425.

Czyżyk, F. i Strzelczyk, M. (2015). Racjonalne wykorzystanie pozostałości poprodukcyjnych sektora rolno-spożywczego. *Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska, 17*(3), 99-106.

Czyżyk, F., Strzelczyk, M., Steinhoff-Wrześniewska, A., Godzwon, J., Rajmund, A., Kołdras, J. i Kaca. E. (2010). *Wytyczne w zakresie wykorzystania produktów ubocznych oraz zalecanego postępowania z odpadami w rolnictwie i przemyśle rolno-spożywczym*. Warszawa: Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Instytut Technologiczno-Przyrodniczy, Falenty.

Dahuja, A. & Madan, T. R. (2004). Off-flavor development in soybeans: comparative role of some antioxidants and related enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84,* 547-550.

Das, R. & Bhattacharjee, C. (2017). Agroindustrial waste valorization by application of membrane technology. *Research Paper. Agriculture, 3*(12), 26-28.

Davis, J.P., Dean, L.L., Price, K.M. & Sanders, T.H. (2010). Roast effect on the hydrophilic and lipophilic antioxidant capacities of peanut flours, blanched peanuts seed and peanut skins, *Food Chemistry, 119*, 539-547.

Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V. & Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry, 84*, 99-105.

Dhillon, G. S., Kaur, S. & Brar, S. K. (2013). Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27*, 789-805.

Dondee, S., Meeso, N., Soponronnarit, S. & Siramornpun, S. (2011). Reducing cracking and breakage of soybean under near-infrared radiation and fluidized-bed drying. *Journal of Food Engineering, 104*, 6-13.

Drzewieniecka, B. (2017). Wpływ czynników egzogennych w procesie przechowywania śruty sojowej. w: M. Miśniakiewicz, M. Halagarda (red.) *Jakość i bezpieczeństwo żywności – analizy, trendy, wyzwania*. (s. 93-103). Kraków: Polskie Towarzystwo Towaroznawcze.

Dyrektywa Komisji 2010/67/UE z dnia 20 października 2010 r. zmieniająca dyrektywę 2008/84/WE ustanawiającą szczególne kryteria czystości dla dodatków do środków spożywczych innych niż barwniki i substancje słodzące (Dz. U. UE z 2010 r., L 277/17).

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/32/WE z dnia 23 kwietnia 2009 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych państw członkowskich dotyczących rozpuszczalników do ekstrakcji stosowanych w produkcji środków spożywczych i składników żywności (Dz. I. UE, L 141/3).

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE z dnia 19 listopada 2008 r. w sprawie odpadów oraz uchylająca niektóre dyrektywy (Dz. U. UE z 2008 r., L 312/3).

Dzoyem, J. P., Kuete, V., McGaw, L. J. & Eloff, J. N. (2014). The 15-lipoxygenase inhibitory, antioxidant, antimycobacterial activity and cytotoxicity of fourteen ethnomedicinally used African spices and culinary herbs. *Journal of Ethnopharmacology, 156,* 1-8.

European Dairy Association Economic Report 2017/18 (2018). www.euromilk.org. [dostęp 26.05.2018]

FAOSTAT, 2018, http://www.fao.org/faostat/en/#data [dostęp 27.06.2018]

Fatima, T., Showkat, U. & Hussain, S. Z. (2018). Nutritional and health benefits of walnuts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7*(2), 1269-1271.

FEDOIL. , 2018, About our production. Pobrane z: http://www.fediol.eu/web/chemical%20refining/1011306087/list1187970119/f1.html [dostęp 12.03.2018].

Fialkow, J. (2016). Omega-3 fatty acid formulation in cardiovascular disease: dietary supplements ale not substitutes for prescription products, *American Journal of Cardiovasular Drugs, 16*, 229-239. doi: 10.1007/s40256-016-0170-7

Flis, Ł., Dobosz, R., Rybarczyk-Mydłowska, K., Wasilewska-Nascimento, B., Kubicz, M. i Winiszewska, G. (2018). First report of the lesion nematodes: *Pratylenchus brachyurus* and *Pratylenchus delattrei* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants in Cape Verde. *Helminthologia, 55*(1), 88-94. doi: https://doi.org/10.1515/helm-2017-0053

Folch, J., Less, M. & Sloane, S. G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry, 226*, s. 497-509.

Frankel, E. N. (1998). *Lipid Oxidation*. Dundee: The Oily Press Ltd.

Fu, M., Qu, Q., Yang, X. & Zhang, X. (2016). Effect of intermittent oven drying on lipid oxidation, fatty acids composition and antioxidant activities of walnut. *LWT - Food Science and Technology, 65*, 1126-1132.

Fukuda, T., Ito, H. & Yoshida, T. (2003). Antioxidative polyphenols from walnut (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry, 63*, 795-801.

Fukushige, H., Wang, C., Simpson, T. D., Gardner, H. W. & Hildebrand, D. F. (2005). Purification and Identification of Linoleic Acid Hydroperoxides Generated by Soybean Seed Lipoxygenases 2 and 3. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53,* 5691-5694.

Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology, 26*, 68-87.

Ganesan, K. & Xu, B. (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. Nutrients, 9(5). doi: 10.3390/nu9050455

Gawlik-Dziki, U., Świeca, M. & Dziki, D. (2012), Comparison of phenolic acids profile and antioxidant potential of six varieties of spelt (*Triticumspelta* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(18), 4603-4612.

Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Dziki, D., Kowalska, I., Pecio, Ł., Durak, A. & Sęczyk. Ł. (2014). Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee – mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. *Food Research International, 61,* 48-55.

Gawlik-Dziki, U., Świeca, M. & Sugier, D. (2012). Enhancement of antioxidant abilities and the lipoxygenase and xanthine oxidase inhibitory activity of broccoli sprouts by biotic elicitors. *Acta Scientiarum Polonorum – Hortorum Cultus, 11,* 13-25.

GlobalFoodForums® https://www.globalfoodforums.com [dostęp 28.01.2018].

Główny Urząd Statystyczny. (2017a). *Ochrona Środowiska.* Warszawa. Pobrane z www.stat.gov.pl [dostęp 15.07.2018].

Główny Urząd Statystyczny. (2017b). *Rocznik statystyczny przemysłu.* Warszawa: Zakład Wydawnictw Statystycznych.

Główny Urząd Statystyczny. (2017c). Wynikowy szacunek głównych ziemiopłodów rolnych i ogrodniczych w 2017 r., Warszawa, Pobrane z www.stat.gov.pl. [dostęp 22.05.2018 r.].

Główny Urząd Statystyczny. (2018). Użytkowanie gruntów i powierzchnia zasiewów w 2017 r. Warszawa 2018. Pobrane z: http://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/rolnictwo/uzytkowanie-gruntow-i-powierzchnia-zasiewow-w-2017-roku,8,13.html [dostęp 22.05.2018].

Gobbettia M., Erica Pontonio E., Filannino P., Rizzello C. G., De Angelis M. & Di Cagno R., (2017). How to improve the gluten-free diet: The state of the art from a food scienceperspective. *Food Research International*, Article in press.

Gomez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Segura-Carretero, A., Caboni, M. F. & Fernandez-Gutierrez, A. (2008). Development of rapid method to determine phenolic and other polar compounds in walnut by capillary electrophoresis-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1209*(1-2), 238-245.

Gökmen V., Savas Bahçeci K.S. & Acar J. (2002). Characterization of Crude Lipoxygenase Extract from Green Pea using a Modified Spectrophotometric Method. *European Food Research Technology, 215,* 42-45.

Gökmen, V., Savas Bahçeci, K. S., Serpen, A. & Acar, J. (2005). Study of lipoxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *LWT- Food Science and Technology, 38,* 903-908.

Gómez, M. & Martinez, M. M. (2017). Fruit and vegetable by-products as novel ingredients to improve the nutritional quality of baked goods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 31*, 1-17.

Górecka, D., Pachołek, B. & Dziedzic, K. (2010). Raspberry pomace as a potential fiber source for cookies enrichment. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 9*(4), 451-462.

Gorlov, I. F., Slozhenkina, M. I., Alekseev, A. L. & Sutorma, O. A. (2017). Use of by-products of the processing of pumpkin seeds in the ratio of bull-calves for the production of marbled beef. *Vestnik of the Russion Agricultural Science, ISSN:0869:3730*

Grabowska, B. i Wieczorek, J. (2017). Profil kwasów tłuszczowych w orzechach z upraw ekologicznych i konwencjonalnych dostępnych w obrocie handlowym. w: M. Miśniakiewicz, M. Halagarda (red.) (s. 59-67). *Jakość i bezpieczeństwo żywności – analizy, trendy, wyzwania*. Kraków: Polskie Towarzystwo Towaroznawcze.

Gramza-Michałowska, A. & Człapka-Matysiak, M. (2011). Evaluation of the antiradical potential of fruit and vegetable snacks. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 10(1)*, 61-72.

Grechkin, A. (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research, 37*(5), 317-352.

Greco, E., Winquist, A., Lee, T. J., Collins, S., Lebovic, Z., Zerbe-Kessinger, T. & Mihan, A. J. (2017). The role of source of protein in regulation of food intake, satiety, body weight and body composition. *Journal of Nutritional Health and Food Engineering, 6*(6), 1-9.

Grochowicz, J., Dominik, P. & Fabisiak, A. (2017). Możliwość wykorzystania żywności naturalnej jako efekt ogólnoświatowego trendu w zakresie zapotrzebowania na żywność prozdrowotną. *Zeszyty Naukowe Uczelni Vistula, 54*(3), 223-240.

Gu, M., Chen, H. P., Zhao, M.M., Wang, X., Yang, B., Ren, J. Y. & Su, G. W. (2015). Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans Sigillata Dode*) meal proteins with panacreatin. *LWT – Food Science and Technology, 60*, 213-220.

Gul. K., Singh, A. K. & Jabeen, R. (2016). Nutraceuticals and functional food: the food for future world. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56*(16). doi: https://doi.org/10.1080/10408398.2014.903384

Hadded, E. H., Gaban-Chong, N., Oda, K. & Sabate, J. (2014). Effect of walnut meal on postprandial oxidative stress and antioxidants in healthy individuals. *Nutrition Journal 13*, 1-9.

Hadnadev, M. S., Dapćević Hadnadev, T. R., Pojić, M. M., Sarić, B. M., Misan, A. C., Jovanov, P. T. & Sakac, M. B. (2017). Progress in vegetable proteins isolation techniques: a review. *Food and Feed Research, 44*(1), 11-21.

Hama, J. R. (2017). Comparison of fatty acid profile changes between unroasted and roasted brown sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds oil. *International Journal of Food Properties, 20*, 957-967.

Hamalo Okino Delgado, C. & Francisco Fleuri, M. (2016). Orange and mango by-products: agroindustrial waste as source of bioactive compound and botanical versus commercial description – a review. *Food Reviews International, 32*(1), 1-14.

Hamberg, M. (1993). Pathways in the biosynthesis of oxylipins in plant. *Journal of Lipid Mediators*, *6,* 375-384.

Hartman, L. R. (2017). *Emerging ingredients for 2018.* Food Processing. Pobrane z: https://www.foodprocessing.com/articles/2017/emerging-ingredients-for-2018/?start=2 [dostęp 28.01.2018].

Hartman, L.R. (2016). *Emerging healthful ingredients for 2017.* Food Processing. Pobrane z: https://www.foodprocessing.com/articles/2016/emerging-healthful-ingredients-for-2017/ [dostęp 28.01.2018].

Hayes, D., Angove, M. J., Tucci, J. & Dennis, C. (2016). Walnuts (*Juglans regia* L.) chemical composition and research in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56*, 1231-1241.

Hazai, E., Bikádi, Z., Zsila, F. & Lockwood, S. F. (2006). Molecular modeling of the non-covalent binding of the dietary tomato carotenoids lycopene and lycophyll, and selected oxidative metabolites with 5-lipoxygenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry, 14,* 6859–6867.

Henderson, H. M., Blank, G. & Sustackova, H. (1991). Thermal inactivation of pea flour lipoxygenase. *Journal of Food Biochemistry, 15*, 107-115.

Hong, J., Smith, T. J., Ho, C. T., August, D. A. & Yang, C. S. (2001). Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase and lipoxygenase – dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemical Pharmacology, 62,* 1175-1183.

Hosseini, H., Ghorbani, A., Sadeghi Mahoonak, A. & Maghsoudlou, Y. (2014). Monitoring hydroperoxides formation as a measure of predicting walnut oxidative stability. *Acta Alimentaria 43*(3), 412-418.

Hsieh, C. C. & McDonald, C. E. (1984). Isolation of lipoxygenase isoenzymes from flour of durum wheat endosperm. *Cereal Chemistry, 61*(5), 392-398.

Hu, J., Huang, Y., Xiong, M., Lou, S. & Chen, Y. (2006). The effect of natural falvonoids on lipoxygenase-mediated oxidation of compounds with benzene ring structure – a new possible mechanism of flavonoid anti-chemical carcinogenesis and other toxicities. *International Journal of Toxicology, 25,* 295-301.

Hu, M. & Jacobsen, C. (eds.). (2017). *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. London: Academic Press and AOCS Press.

Huang, D., Ou, B. & Prior, R L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*, 1841-1856.

Igual, M., Garcia- Martínez, E., Camacho, M. M. & Martínez-Navarrete, N. (2011). Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12*, 153-162.

Ingle, M. & Nawkar, R. (2016). Nutritional evaluation of low cost supplementary food. *Asian Journal of Dairy & Food Research, 35*(3), 247-250.

International Nut & Dried Fruit Council (2016). *Nuts & dried fruit. Global statistical review 2015/2016*. Pobrane z: https://www.nutfruit.org

Iqbal, M., Bhatti, I. A., Shahid, M. & Nisar, J. (2016). Physicochemical characterization, microbial decontamination and shelf life analysis of walnut (*Juglans regia* L) oil extract from gamma radiation treated seeds. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 6*, 116-122.

Ivanova, S., Marinova, G. & Batchvarov, V. (2016). Comparison of fatty acid composition of various types of edible oils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science, 22*(5), 849-856.

Jain. N. (2015). Removal of heavy metal by using different fruit peels, vegetable peels and organic waste – a review. *International Journal of Advanced Research, 3*(11), 916-920.

Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry,121* (1), 178-184.

Jankowski, J. (2017). Zasady profilaktyki chorób układu krążenia w 2018 roku. *Kardiologia inwazyjna, 5*(12), 42-48.

Janve, B. A., Yang, W., Marshall, M. R., Reyes-De-Corcuera, J. I. & Rababah, T. M. (2014). Nonthermal inactivation of soy (Glycine Max sp.) lipoxygenase by pulsed ultraviolet light. *Journal of Food Science, 79*(1), 8-18.

Jarjes, Z. A., Mahmood, Z. E., Danial, G. H., Ibrahim, H. A., Ibrahim, D. A. & Omar, M. S. (2017). Characterization of crude lipoxygenase activity from natural and callus extracts of carrot. *ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences, 29*(3), 128-134.

Jarosz, M. (red). (2017). *Normy żywienia dla populacji Polski*. Warszawa: Instytut Żywności i Żywienia.

Kachel-Jakubowska, M., Kraszkiewicz, A. & Krajewska, M. (2016). Possibilities of using waste after pressing oil from oilseeds for energy purposes. *Agricultural Engineering, 20*(1), 45-54.

Kaczmarek, P., Korniewicz, D., Lipiński, K. & Mazur, M., (2016). Chemical composition of rapeseed products and their use in pig nutrition. *Polish Journal of Natural Sciences, 31*(4), 545-562.

Kałużewicz, A., Lisiecka, J., Knaflewski, M., Gliszczyńska-Świgło, A., Klimczak, I. & Tyrakowska, B. (2012). The influence of short-term storage on the content of flavonoids and vitamin C in broccoli. *European Journal Horticultural Science 3*, 137-143.

Kasztelan, A. & Kierepka, M. (2014). Oddziaływanie przemysłu spożywczego na środowisko w Polsce. *Roczniki naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu, XVI*(2), 109-116.

Kaur, C., Kumar, S. & Kapoor, H. C. (1999). Heat stability of lipoxygenase and peroxidase during blanching of vegetables. *Journal of Scientific and Industrial Research, 58*, 1005-1009.

Kevers, C., Falkowski, M, Tabart J., Defraigne, J.O., Dommes, J. & Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 8596-8603.

Kiran, E. U., Trzcinski, A. P., Wun Jern, N. & Yu, L. (2014). Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. *Waste and Biomass Valorization, 5*(6), 903–917.

Kita, A., Górnicka, E., Wojdyło, A. i Drożdż, W. (2012). Wpływ dodatku wytłoków rzepakowych na właściwości smażonych chrupek ziemniaczanych. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXXIII*, 285-294.

Kita, A., Pęksa, A. i Gryszkin, A (2012). Chrupki ziemniaczane. PL 212826 B1

Kita, A. i Popiela-Kukuś, K. (2010). Wpływ dodatku wytłoków lnianych na wybrane właściwości smażonych chrupek ziemniaczanych. *Acta Agrophysica, 16*(1), 69-77.

Klensporf-Pawlik, D., Zmudzinski, W. i Bąkowska, A. (2018). Owady jadalne źródłem bioaktywnych lipidów. w: J. Słupski, T. Tarko i I. Dzóżdż (red.). *Żywność a składniki bioaktywne*. (s. 154-163). Kraków: Odział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, Kraków.

Klimczak. I. (2017). *Towaroznawcze aspekty kształtowania barwy soków na przykładzie mętnego soku jabłkowego*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.

Kmiecik, D., Korczak, J., Rudzińska, M., Gramza-Michałowska, A., Hęś, M. & Kobus-Cisowska, J. (2015). Stabilisation of phytosterosl by natural and synthetic antioxidants in high temperaturę conditions. *Food Chemistry, 173*, 966-971.

Koca, A. F. & Anil, M. (2007). Effect of flaxseed and wheat flour blends on dough rheology and bread quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 87*, 1172-1175.

Koca, N. & Karadeniz, F. (2008). Changes of bioactive compounds and antioxidant activity during cold storage of carrots. *International Journal of Food Science & Technology 43*, 2019−2025.

Kochhar, S. P. (2017). Processing coconut oil. *Fats and Oils International, 33*(1), 24-27.

Kojima, G., Avgerinou, C., Iliffe, S. & Walters, K. (2018). Adherence to Mediterranean Diet Reduces Incident Frailty Risk: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Geriatrics Society*. doi: 10.1111/jgs.15251

Komisja Europejska. (2011). *Zintegrowane zapobieganie zanieczyszczeniom i ich ograniczanie. Dokument referencyjny na temat najlepszych dostępnych technik w przemyśle spożywczym*.

Komisja Europejska. (2013). *Commission regulation (EU) no 68/2013 of 16 January 2013 on the Catalogue of feed materials* (Official Journal of the European Union, L29/1).

Komisja Wspólnoty Europejskiej. (2015). *Komunikat Komisji Zrównoważona Europa dla Lepszego Świata: Strategia Zrównoważonego Rozwoju Unii Europejskiej*. Propozycja Komisji dla Rady Europejskiej w Götenburgu, COM(2001) 264 final.

Kondratowicz-Pietruszka, E. (2017). Charakterystyka podatności na utlenianie wybranych olejów orzechowych. w: M. Miśniakiewicz, M. Halagarda (red.) *Jakość i bezpieczeństwo żywności – analizy, trendy, wyzwania*. (s. 81-92). Kraków: Polskie Towarzystwo Towaroznawcze.

Konstytucja Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 2 kwietnia 1997 r. (Dz. U. z 2009 r., nr 114, poz. 946. 21.10.2009).

Kornsteiner, M., Wagner, K. H. & Elmadfa, I. (2006). Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry, 98*, 381-387.

Kosary, J., Bujdoso, G., Szentivanyi, P., Rehus, D., Emmert, M. & Frakas, C. (2009). A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 10. A különböző diófajták (*Juglans regia* L.) avasodási hajlamának vizsgálata biokémiai módszerekkel. *Olaj, Szappan, Kozmetika, 58* (3), 27-36.

Kouba, M., Mhemdi, H. & Vorobiev, E. (2015). Seed oil polyphenol: Rapid and sensitive extraction method and high resolution – mass spectrometry identification. *Analytical Biochemistry, 476*, 91-93.

Kristott, J. (2010) Fats and oils. W: D. Kilcast & P. Subramaniam (eds.) (s. 279-310). *The stability and shelf-life of food.* Cambrige: Woodhead Publishing Limited and CRS Press LLC

Kryvoruchko, V., Andrea Machmüller, A., Amon, B. & Amon, T. (2009). Anaerobic digestion of by-products of sugar beet and starch potato processing. *Biomass and Bioenergy, 33*(4), 620-627.

Kubicka E. i Jędrychowski, L. (2001). Wpływ związków fenolowych ekstrahowanych z nasion dyni na aktywność natywnej lipooksygenazy*, Rośliny Oleiste, XXII,* 609-615.

Kubicka, E. i Jędrychowski, L. (1998). Activity and stability of lipoxygenase from sunflower and pumpkin seeds in relation to extraction mixtures used. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 7*(28), 423-429.

Kühn, H., Wiesner, R., Rathmann, J. & Schewe, T. (1991). Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids, 4,* 9-14.

Kulkarni, A. P. (2001). Lipoxygenase – a versatile biocatalyst for biotransformation of endobiotics and xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sci*ences, *58,* 1805-1825.

Kulkarni, A. S. & Joshi, D. C. (2013). Effect of replacement of wheat flour with pumpkin powder on texture and sensory qualities of biscuit. *International Food Research Journal, 20*, 587-591.

Kumar Sharma, S., Bansal, S., Mangal, M., Kimar Dixit, A., Gupta, R. K. & Mangal, A. K. (2015). Utilization of food processing by-products as dietary, functional and novel fiber: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56*(10), 1647-1661.

Kunachowicz, H., Przygoda, B., Nadolna, I. i Iwanow, K. (2017). *Tabele składu i wartości odżywczej żywności*. Warszawa: Państwowe Zakłady Wydawnictw Lekarskich (PZWL).

Łaba, S. (2012). Proekologiczne działania w zakresie zagospodarowania odpadów w przemyśle owocowo-warzywnym. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu, 14*(5), 133-138.

Labuckas, D. O., Maestri, D. M., Perelló, M., Martínez, M. L. & Lamarque, A. L. (2008). Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry, 107*, 607-612.

Labuckas, D., Maestri, D. & Lamarque, A. (2011). Lipid and protein stability of partially defatted walnut flour (*Juglans regia* L.) during storage. *International Journal of Food Science and Technology, 46*(7), 1388-1397.

Labuckas, D., Maestri, D. & Lamarque, A. (2014). Effect of different oil extraction methods on proximate composition and protein characteristics of walnut (*Juglans regia* L.) flour. *LWT – Food Science and Technology, 59*, 794 – 799.

Lago, J. H. G., Toledo-Arruda, A. C., Mernak, M., Barrosa, K. H., Martins, M. A., Tibero, L. F. L. C. & Prado, C. M. (2014). Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. *Molecules, 19,* 3570-3595.

Lai, W. T., Khong, N. M. H., Lim, S. S., Hee, Y. Y. & Sim, B. I. (2017). A review: Modified agricultural by-products for the development and fortification of food products and nutraceuticals. *Trends in Food Science and Technology, 59*, 148-160.

Lao, N., Lao. M., Lam, M., Agarwal, A. & Chow, E. (2017). The use of vitamins, minerals, herbal supplements and other dietary supplements as complementary and alternative therapies in cancer care: a literature review. *Journal of Pain Management, 10*(1), 15-22.

Lata, B. (2008). Apple peel antioxidant status in relation to genotype, storage type and time. *Scientia Horticulturae, 117* (1), 45−52.

Lattig, J., Bohl, M., Fischer, P., Tischer, S., Tietbohl, C., Menschikowski, M., Gutzeit, H. O., Metz, P. & Pisabarro, M. T. (2007). Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. *Journal of Computer-Aided Molecular Design, 21,* 473-483.

Lee, H. & Min, S. C. (2013). Antimicrobial edible defatted soybean meal-based films incorporating the lactoperoxidase system. *LWT - Food Science and Technology, 54*, 42-50.

Lee, I. M., Shiroma, E. J., Lobelo, F., Puska, F., Blair, S. N. & Katzmarzyk, P. T. (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet Physical Activity Series Working Group*. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61031-9

Lehto, S., Laakso, S. & Lehtinen, P. (2003). Enzymatic oxidation of hexanal by oat. *Journal of Cereal Science, 38*, 199-203.

Leja, M., Mareczek, A. & Ben, J. (2003). Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chemistry, 80*, 303−307.

Leo, L., Leone, A., Longo, C., Lombardi, D. A., Raimo, F. & Zacheo, G. (2008). Antioxidant compounds and antioxidant activity in early potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 56*(11), 4154−4163.

Li., Y., Hruby, A., Bernstein, A. M., Ley, S. H., Wang, D. D., Chiuve, S. E.Sampson, L., Rexrode, K. M., Rimm, E. B., Willett, W. C. & Hu, F. B. (2015). Saturated fats compared with unsaturated fats and sources of carbohydrates in relation to risk of coronary heart disease: a prospective cohort study. *Journal of the American College of Cardiology, 66*(14), 1538-1548.

Liavonchanka, A. & Feussner, I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology, 163,* 348-357.

Lima de Carvalho, W., Goreti de Almeida Oliveira, M., Gonçalves de Barros, E. & Alves Moreira, M. (1999). Lipoxygenases after protease inhibitor levels in soybean seeds. *Plant Physiology and Biochemistry, 37*(6), 497-501.

Lima, A. G. V. O., Oliveira, R. L., Silva, T. M., Barbosa, A. M., Nascimento, T. V. C., Oliveira, V. D., C., Ribeiro, R. D. X., Pereira, E. S. & Bezerra, L. R. (2018). Feeding sunflower cake from biodiesel production to Santa Ines lambs: physicochemical composition, fatty acid profile and sensory attributes of meat. *PLoS One,13*(1). doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188648

Lin, S., Chi, W., Hu, J., Pan, Q., Zheng, B. & Zeng, S. (2017). Sensory and nutritional properties of chinese olive pomace based high fiber biscuit. *Emirates Journal of Food and Agriculture, 29*(7), 495-501.

Ling, B., Hou, L., Li, R. & Wang, S. (2014). Thermal treatment and storage condition effects on walnut paste quality associated with enzyme inactivation. *LWT-Food Science and Technology, 59*, 786-793.

Liu, X. M., Liu, Y. J., Huang, Y., Yu, H. J., Yuan, S., Tang, B. W., Wang, P. G. & He, Q. Q. (2017). Dietary total flavonoids intake and risk of mortality from all causes and cardiovascular disease in the general population: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Molecular Nutrition Food Research*, *61*(6). doi: 10.1002/mnfr.201601003

Liu, Z., Quek, A. & Balasubramanian, R. (2014). Preparation and characterization of fuel pellets from woody biomass materials, agro-residues and their corresponding hydrochars. *Applied Energy, 113*, 1315-1322.

Lomnitski, L., Bar-Natan, R., Sklan, D. & Grossman, S. (1993). The interactions between β-carotene and lipoxygenase in plant and animal systems. *Biochimica Biophysica Acta*, *1167,* 331–338.

Longato, E., Meineri, G. & Peiretti, P. G. (2017). The effect of *Amaranthus caudatus* supplementation to diets containing linseed oil on oxidative status, blood serum metabolites, growth performance and meat quality characteristic in broilers. *Animal Science Papers and Reports, 35*(1), 71-86.

Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J. & Berti, L. (2006). Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry, 44*, 450-454.

Łucek, E. (2016). Bezpośrednie inwestycje zagraniczne w przemyśle spożywczym i ich uwarunkowania. *Progress in Economic Science. Roczniki Naukowe Instytutu Ekonomicznego Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej im. Stanisława Staszica w Pile*, 3, 171-183.

Mahesha, H. G., Singh, S. A. & Appu Rao, A.G. (2007). Inhibition of lipoxygenase by soy isoflavones: Evidence of isoflavones as redox inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 461*, 176-185.

Majoch, A. i Jabłońska, M. M. (2013). Bioodpady jako nowe źródło energii odnawialnej. *Nafta-Gaz, 9*, 673-682.

Małecka, M., Rudzińska, M., Pachołek, B. & Wąsowicz, E. (2003). The effect of raspberry, black currant and tomato seed extracts on oxyphytosterols formation in peanuts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 12*, 49-53.

Malekian, F., Rao, R. M., Prinyawiwatkul, W., Marshall, W. E., Windhauser, M. & Ahmedna, M. (2000). Lipase and lipoxygenase activity functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. Bulletin 870. LSU AgCentre Research & Extension.

Malomo, S. A. & Aluko, R. E. (2015). A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids, 43*, 743-752.

Man, S., Pâucean, A., Muste, S., Pop, A., Sturza, A., Muresan, V. & Salanta, L. C. (2017). Effect of incorporation of sunflower seed flour in the chemical and sensory characteristic of cracker biscuits. *Food Science and Technology, 74*(2), 95-98.

Manovski, L., Semedzieva, V. & Yotova, L. (2015). Investigation on isolated and purified lipoxygenase from avocado in the presence of linolenic acid. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 50*(3), 249-254.

Mao, X. & Hua, Y. (2012). Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.), *International Journal of Molecular Sciences, 13*(2), 1561-1581.

Marpalle, P., Sonawane, S. K. & Subhash Arya, S. (2014). Effect of flaxseed flour addition on physiochemical and sensory properties of functional bread. *Food Science and Technology, 58*, 614-619.

Martínez, M. L, Penci, M. C., Ixtaina, V., Ribotta, P. D. & Maestri, D. (2013). Effect of natural and synthetic antioxidant on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *LWT – Food Science and Technology, 51*, 44-50.

Martínez, M. L., Labuckas, D. O., Lamarque A. L. & Maestri, D. (2010). Walnut (*Juglans regia L.*): genetic resources, chemistry, by-product. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 90*, 1959-1967.

Martins, Z. E., Pinho, O. & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2017). Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. *Trends in Food Science & Technology, 67*, 106-128.

Marvian-Hosseini, Z. & Asoodeh, A. (2017). Biochemical characterization of purified lipoxygenase from seame (*Sesamum indicum*). *International Journal of Food Properties*. doi: 10.1080/10942912.2017.1318291.

Mata, T. M., Cardoso, N., Ornelas, M., Neves, S. & Caetano, N. S. (2011). Evaluation of two purification methods of biodiesel from beef tallow, pork lard, and chicken fat. *Energy Fuels, 25*(10), 4756-4762.

Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 5*(50), 3444-3452.

Matuszak-Flejszman, A. (red.) (2015). *Działalność środowiskowa przedsiębiorstw mikro, małych i średnich.* (s. 90-126). Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.

McNeil, D. L. & Evans, K. J. (2015). Improved management of walnut quality factors under grower control. Australia: Australian Walnut Industry Association.

Michalczuk, L. (2011). *Żywność i żywienie w XXI wieku. Scenariusze rozwoju polskiego sektora rolno-spożywczego.* Łódź: Społeczna Wyższa Szkoła Przedsiębiorczości i Zarządzania w Łodzi.

Mirabella, N., Castellani, V. & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production, 65*, 28-41.

Miraliakbari, H. & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry, 111*, 421-427.

Mohamed, G. A. (2016). Tagenols A and B: New lipoxygenase inhibitor flavonols from *Tagetes minuta*. *Phytochemistry Letters, 16,* 141-145.

Mojerlou, Z., Elhamirad, A. & Kenari, R. E. (2017). Comparing antioxidant activity of ethanolic olive cake extract with some synthetic antioxidants on oxidative stability of soybean oil. *International Journal of Pharmaceutica Analytica Acta, 1*(1), 9-12.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nuñez, M.J. & Parajò, J. C. (2001). Natural antioxidant from residual sources. *Food Chemistry, 72*, 145-171.

Mroczek, R. (red.) (2014). *Polski przemysł spożywczy w latach 2008-2013*. Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej. Warszawa: Państwowy Instytut Badawczy.

Muiño, I., Diaz, M. T., Apeleo, E., Pérez-Santaescolástica, C., Rivas-Cañedo, A., Pérez, C., Cañeque, V., Lauzurica, S. & de la Fuente, J. (2017). Valorisation of an extract from olive oil waste as natural antioxidant for reducing meat waste resulting from oxidative processes. *Journal of Cleaner Production, 140,* 924-932.

Müller, V., Amé, V., Carrari, V., Gieco, J. & Asis, R. (2014). Lipoxygenase Activation in Peanut Seed Cultivars resistant and Susceptible to *Aspergillus parasiticus* Colonization. *Postharvest Pathology and Mycotoxins, 104*(12), 1340-1348.

Nesterenko, A., Alric, I., Violleau, F., Silvestre, F. & Durrieu, V. (2013). A new way of valorizing biomaterials: The use of sunflower protein for α-tocopherol microencapsulation. *Food Research International, 53*, 115-124.

OECD/FAO. (2016). *Oilseeds and Oilseed Products.* w: OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025 (s. 101-125). Paris: OECD Publishing.

Offia-Olua, B. I. (2014). Chemical, functional and pasting properties of wheat (*Triticum spp)* – walnut (*Juglans regia*) flour. *Food and Nutrition Sciences, 5*(16), 1591-1604.

Olejarczyk, E. (2016). Zasada zrównoważonego rozwoju w systemie prawa polskiego – wybrane zagadnienia. *Przegląd Prawa Ochrony Środowiska, 2*, 119-140.

Oliveira, L. S., Rufino, M. S., Moura, C. F. H., Cavalcanti, F. R., Alves, R. E. & Miranda, M. R. A. (2011). The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata*) puree. *Brazilian Journal of Plant Physiology 23*(2), 151-160.

Oluyori, A., Adelani-Akande, T. & Inyinbor, A. (2017). Biomass valorizations: agricultural waste in environemntal protection, phytomedicine and biofuel production. w: J. Shankat Tumuluru (red). *Biomass volume estimation and valorization for energy*. doi: 10.5772/66102

Ordon, J. D., Gomez, M. A. & Vattuone, M. I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts, *Food Chemistry*, *97*, 452-458.

Oreaopoulou, V. & Tzia, C. (2007). Utilization of plant by-products for recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants and colorants. w: V. Oreopoulou & W. Russ (eds.). *Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food Industry*. (s.209-232). Nowy Jork: Springer Science and Business Media, LLC.

Oroian, M. & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*. doi: 10.1016/j.foodres.2015.04.018

Pachołek, B. i Małecka, M. (2000). Pestki czarnej porzeczki jako źródło naturalnych przeciwutleniaczy. *Rośliny Oleiste – Oilseed crops, 21,* 675-682.

Pałacha, Z. (2008). Aktywność wody - ważny parametr trwałości żywności. *Przemysł spożywczy, 4,* 22-26.

Panth, N., Paudel, K. R. & Karki, R. (2016). Phytochemical profile and biological activity of *Juglans regia*. *Journal of Integrative Medicine, 14*(5), 359-373.

Papaioannou, E. H. & Karabales, A. J. (2012). Lycopene recovery from tomato peel under mild conditions assisted by enzymatic pre-treatment and non-ionic surfactants. *Acta Biochimica Polonica, 59*, 71-74.

Parry, J. W., Cheng, Z., Moore, J. & Yu, L. L. (2008). Fatty acid composition, antioxidant properties and antiproliferative capacity of selected cold-pressed seed flours. *Journal of American Oil Chemists' Society, 85*, 457-464.

Pastore, D., Trono, D., Padalino, L., Simone, S., Valenti, D., Fronzo, N.D. & Passarella, S. (2000). Inhibition by α-tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and β-carotene bleaching activities in durum wheat semolina. *Journal of Cereal Science, 31,* 41–54.

Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitihamyong, A. & Sirichakwal, P. S. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis 21*, 241-248.

Peiretti, P. G., Meineri, G., Gai, F., Longato, E. & Amarowicz, R. (2017). Antioxidative activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural Product Research, 31*(18), 2178-2182.

Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A. & Estevinho, L. (2008). Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology, 46*, 2103-2111.

Pérez-Calderón, J., Califano, A., Santos, M. V. & Zaritzky, N. (2017). Kinetic parameters for the thermal inactivation of peroxidase and lipoxygenase in precooked frozen brassica species. *Journal of Food Science, 82*(6), 1378-1386.

PN-A-74780:1996 (1996). *Przetwory ziemniaczane. Smażone przekąski ziemniaczane.*

PN-EN ISO 3960:2012 .(2012). *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie liczby nadtlenkowej – Jodometryczne (wizualne) oznaczanie punktu końcowego.*

PN-ISO 5509-1996.(1996). *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych*.

Pojić, M., Dapćević Hadnadev, T., Hadnadev, M., Rakita, S. & Brlek, T. (2015). Bread supplementation with hemp seed cake: a by-product of hemp oil processing. *Journal of Food Quality, 38*, 431-440.

Polska Agencja Informacji i Handlu S.A. (2015). Sektor spożywczy w Polsce. Profil sektorowy. Warszawa.

Polskie Stowarzyszenie Producentów Oleju (PSPO). (2017). http://www.pspo.com.pl [dostęp 7.01.2018].

Popovici, C. & Deseatnicova, O. (2013). Oxidative storage stability of cold pressed walnut oil. *Journal of Food and Packaging Science, Technique and Technologies, 2*(2), 194-198.

Porta, H. & Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology, 130,* 15-21.

Przybyłowski, P.i Śmiechowska, M. (1996). *Chemia żywności z elementami biochemii*. Gdynia: Wydawnictwo WSM w Gdyni, Gdynia.

Qu, Q., Yang, X., Fu, M., Chen, Q., Zhang, X., He, Z. & Qiao, X. (2016). Effects of three conventional drying methods on the lipid oxidation, fatty acids composition, and antioxidant activities of walnut (*Juglans regia* L.). *Drying Technology, 34*(7), 822-829.

Rabadán, A., Álvarez-Ortí, M., Pardo, J. E. & Alvarruiz, A. (2018 a). Storage stability and composition changes of three cold-pressed nut oils under refrigeration and room temperature conditions. *Food Chemistry, 259*, 31-35.

Rabadán, A., Pardo, J. E., Gómez, R. & Álvarez-Ortí, M. (2018 b). Evaluation of physical parameters of walnut and walnut products obtained by cold pressing. *LWT- Food Science and Technology, 91*, 308-314.

Raczyk, M., Siger, A., Radziejewska-Kubzdela, E., Ratusz, K. & Rudzińska, M. (2017). Roasting pumpkin seeds and changes in the composition and oxidative stability of cold-pressed oils. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 16*(3), 293-301.

Ramachandran, S., Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Francis, F., Nagy,V., Szakacs, G. & Pandey, A. (2004). Coconut oil cake- a potential raw material for the production of α-amylase. *Bioresource Technology, 93*, 169-174.

Ramachandran, S., Singh, K. S., Larroche, C., Soccol, C. R. & Pandey, A. (2007). Oil cake and their biotechnological applications – a review. *Bioresource Technology, 98*, 2000-2009.

Rapisarda, P., Lo Bianco, M., Pannuzzo ,P. & Timpanaro, N. (2008). Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Postharvest Biology and Technology, 49*, 348-354.

Ravindran, R. & Jaiswal, A. K. (2016). Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology, 34*(1), 58-69.

Regueiro, J., Sánchez-González, C., Vallverdú-Queralt, A., Simal-Gándara, J., Lamuela-Raventós, R. & Izquierdo-Pulido, M. (2014). Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap – Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry, 152*, 340-348.

Reische, D. W., Lillard, D. A. & Eitenmiller, R. R. (2002). Antioxidants. w: C. C. Akoh & D. B. Min (red) *Food Lipids*. (s. 489-541). New York Basel. Marcel Dekker Inc.

Rękas, A., Siger, A., Wroniak, M., Ścibisz, I., Derwiaka, D. & Anders, A. (2017). Influence of dehulled rapeseed roasting on the physicochemical composition and oxidative state of oil. *Grasas Y Aceites, 68*(1), 1-10.

Revathy, M. N. & Sabitha, N. (2013). Development quality evaluation and popularization of pumpkin seed flour incorporated bakery products. *International Journal of Food and Nutritional Sciences, 2*, 40-45.

Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S. M., Silva, A. M. S., Porto, G., Cabrita, E. J., Marques, M. M. B. & Fernandes, E. (2014). Inhibition of LOX by flavonoids: a structure – activity relationship study. *European Journal of Medicinal Chemistry, 72,* 137-145.

Robinson, D.S., Wu, Z., Domoney, C. & Casey, R. (1995). Lipoxygenase and quality of food. Food Chem. 54, 33-43.

Rogall, H. (2010). *Ekonomia zrównoważonego rozwoju. Teoria i praktyka*. Poznań: Wydawnictwo Zysk i Spółka.

Rondanini, D. P., Borrás, L. & Savin, R. (2018). Improving grain quality in oil and cereal crops. W: R. Meyers (eds). Encyclopedia of Sustainability Science and Technology, Nowy Jork: Springer New York.

Rosell, C. M. (2011). The science of doughs and bread quality. W: V. Preedy, R. R. Watson & V. Patel (eds.) *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*. (s. 3-14). Oxford: Elsevier Inc.

Roselló-Soto, E., Poojary, M. M., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Mañes, J. & Moltó, J. C. (2018). Tiger nuts and its by-products valorization: from extraction of oil and valuable compounds to development of new healthy products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 45*, 306-312.

Rozporządzenie Komisji (UE) nr 116/2010 z dnia 9 lutego 2010 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1924/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do wykazu oświadczeń żywieniowych (Dz. U. UE z 2010 r, L37/16).

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności, zmiany rozporządzań Parlamentu Europejskiego i rady (WE) nr 1924/2006 i (WE) nr 1925/2006 oraz uchylające dyrektywy Komisji 87/250/EWG, dyrektywy Rady 90/496/EWG, dyrektywy Komisji 1999/10/WE, dyrektywy 2000/13/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, dyrektywy Komisji 2002/67/WE i 2008/5/WE oraz rozporządzenia Komisji (WE) nr 608/2004 (Dz. U. UE z 2011 r. L304/18).

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego) (Dz. U. UE z 2009 r., L300/1).

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 183/2005 z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz. (Dz.U. UE z 2005 r., L35/1).

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1924/2006 z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych dotyczących żywności (Dz. U. UE z 2006 r., L404/9).

Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 marca 2001 r. ustanawiającym zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczaniu niektórych przenoszonych encefalopatii (Dz. U. UE z 2001 r., L147/1).

Rozporządzenie Rady (EWG) nr 3035/80 z dnia 29 listopada 1980 r. ustanawiające ogólne zasady refundowania towarów nieobjętych załącznikiem II do Traktatu oraz kryteria ustalania wysokości takich refundacji (Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L323).

Sabate, J., Fraser, G. E., Burke, K., Knutsen, S. F., Bennett, H. & Lindsted, K. D. (1993). Effects of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal man. *The New England Journal of Medicine, 328*, 603-607.

Sadik, C. D., Sies, H. & Schewe, T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure – activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology, 65,* 773-781.

Sae-Leaw, T., Benjakul, S., Gokoglu, N. & Nalinanon, S. (2013). Changes in lipids and fish odour development in skin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored in ice. *Food Chemistry, 141*, 2466-2472.

Saha, P., Yeoh, B. S., Singh, R., Chandrasekar, B., Vermula, P. K., Haribabu, B., Vijay-Kumar, M. & Jala, V. R. (2016). Gut microbiota conversion of dietary ellagic acid into bioactive phytoceutical urolithin A inhibits heme peroxidases. *PLoS One, 11*(6), e0156811.

Sahin, S. & Elhussein, E. A. A. (2018). Valorization of biomass: phytochemicals in oilseed by-products. *Phytochemistry Reviews*, 1-12. doi: https://doi.org/10.1007/s1110

Salas, J. J., Williams, M., Harwood, J. L. & Sánchez, J. (1999). Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 76*(10), 1163-1168.

Salcedo, C. L., Lopez de Mishima, B. A. & Nazareno, M. A. (2010). Walnuts and Almonds as Model System of Food Constituted by Oxidisable, Pro-oxidant and Antioxidant Factors. *Food Research International*, 43, 1187-1197.

Salcedo, C. L. & Nazareno, M. A. (2015). Effect of phenolic compounds on the oxidative stability of ground walnuts and almonds. *RSC Advances, 57*, 1-33.

Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N. & Montero, M. P. (2012). Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food Hydrocolloids, 29*, 374-381.

Samotyja, U. i Jura. E. (2012). Ocena wpływu wybranych modyfikacji metody jodometrycznej na wynik oznaczenia liczby nadtlenkowej w olejach roślinnych. *Towaroznawcze Problemy Jakości, 4*, 29-36.

Sánchez-González, C., Ciudad, C. J., Izquierdo-Pulido, M. & Noé, V. (2016). Urolithin A causes p21 up-regulation in prostate cancer cells. *European Journal of Nutrition, 55*(3), 1099-1112.

Sánchez-González, C., Ciudad, C. J., Noé, V. & Izquierdo-Pulido, M. (2017). Health benefits of walnut polyphenols: an exploration beyond their lipid profile. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57*(16), 3373-3383.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 76*, 270-276.

Sandulachi, E., Chirita, E. & Costis, V. (2013). Storage stability of walnut oil. *Journal of Food and Packaging Science, Technique and Technologies, 2*(2), 209-214.

Santos, J., Alvarez-Ortí, M., Sena-Moreno, E., Rabadán, A., Pardo, J. E. & Oliveira, M. B. P.P. (2018). Effect of roasting conditions on the composition and antioxidant properties of defatted walnut flour. *Journal of Food Science and Agriculture, 99*, 1813-1820.

Sarwar, M.F., Sarwar, M.H., Sarwar, M., Qadri, N.A. & Moghal, S. (2013). The role of oilseeds nutrition in human health: A critical review. *Journal of Cereals and Oilseeds, 4*(8), 97-100.

Schellenberg, E. S., Dryden, D. M., Vandermeer, B., Ha, C. & Korownyk, C. (2013). Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine, 159*(8), 543-551.

Schewe, T. (2002). 15-lipoxygenase-1: A prooxidant enzyme. *Biological Chemistry, 383,* 365-374.

Schewe, T., Kühn, H. & Sies, H. (2002). Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *The Journal of Nutrition, 56,* 1825-1829.

Schewe, T. & Sies, H. (2003). Flavonoids as protectants against prooxidant enzymes, Research monographs, *Institut für Physiologische Chemie I;* Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Pobrane z: http://www.uniduesseldorf.de/WWW/MedFak/PhysiolChem/index.html.

Schneider, I. & Bucara F. (2005a). Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part I Medicinal plants with action on arachidonate 5-lipoxygenase. *Phytotherapy Research, 19,* 81-102.

Schneider, I. & Bucarb F. (2005b). Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part II Medicinal plants with action on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists. *Phytotherapy Research. 19,* 263-272.

Schweigger, U., Schieber, A. & Carle, R. (2005). Inactivation of peroxidase, polyphenoloxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 6,* 403-411.

Sea-Leaw, T., Benjakul, S., Gokoglu, N. & Nalinanon, S. (2013). Changes in lipids and fishy odor development in skin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored in ice. *Food Chemistry, 141,* 2466-2472.

Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, I. M., Chel-Guerrero, L. A. & Betancur-Ancona, D. A. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *Food Science and Technology, 50*(2), 723–731.

Selma, M. V., González-Sarrias, A., Salas-Salvado, J., Andrés-Lacueva, C., Alasalvar, C., Örem, A., Tomás-Barberán, F. A. & Espin, J. C. (2015). The gut microbiota metabolism of pomagranate or walnut ellagitannis yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: Comparison between normweight, overweight-obesity and metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*. doi: 10.1016/j.clnu.2017.03.012

Seneviratne, K. N., Prasadani, B. C. & Jayawardena, B. (2016). Phenolic extracts of coconut oil cake: a potential alternative for synthetic antioxidants. *Food Science and Technology, 36*(4), 591-597.

Serpen, A. & Gökmen, V. (2006). A proposed mechanism for the inhibition of soybean lipoxygenase by beta-carotene. *Journal Science of Food and Agriculture, 86,* 401-406.

Seta, A., Skórzyńska-Polit, E., Szczuka, E. i Giełwanowska, I. (2009). Lipooksygenaza w komórkach roślinnych. Budowa i funkcja. *Postępy Biologii Komórki, 36*(25), 69-83.

Shibata, D. & Axelrod, B. (1995). Plant lipoxygenase. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling, 12*(2-3), 213-228.

Shim, Y. Y., Gui, B., Wang, Y. & Reaney, M. J. T. (2015). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil processing and selected products. *Trends in Food Science and Technology, 43,* 162-177.

Shin, D. J., Kim, W. & Kim, Y. (2013). Physicochemical and sensory properties of soy bread made with germinated steamed and roasted soy flour. *Food Chemistry, 141*, 517-523.

Siegmund, B. & Murkovic, M. (2004). Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil. *Food Chemistry, 84*, 367-374.

Sielicka, M. & Małecka, M. (2016). Enhancement of oxidative stability of flaxseed oil through flaxseed, evening primrose and black cumin cake extracts. *Food Processing and Prexervation, 41*(4). doi: https://doi.org/10.1111/jfpp.13070

Siger, A., Jóźwiak, M. & Górnaś, P. (2017). Cold-pressed and hot-pressed rapseed oil. The effect of roasting and seed moisture on the antioxidant activity, canolol and tocopherol level. *Acta Scientiarum Polonium Technologia Alimentaria, 16*(1), 69-81.

Silva, A. S. Marques, T. R., Simão, A. A., Corrêa, A. D., Pinheiro, A. C. M. & Silva, R. L. (2014). Development and chemical and sensory characterization of pumpkin seed flour-based cereal bars. *Food Science and Technology, 34*(2), 346-352.

Singh, J., Paroha, S. & Prakash Mishra, R. (2018). Stability and seed quality assessment of niger (*Guizotia abyssinica*) seeds stored in ambient conditions. *International Journal of Recent Scientific Research, 9*(5), 26991-26996.

Singh, J., Paroha, S. & Prakash Mishra, R. (2017). Factors affecting oilseed quality during storage with special reference to soybean (*Glycine max*) and niger (*Guizotia abyssinica*) seeds. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6*(10), 2215-2226.

Singleton, V. L & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomylobdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture, 16,* 144- 158.

Skrbić, B. & Filipcev, B. (2008). Nutritional and sensory evaluation of wheat breads supplemented with oleic-rich sunflower seed. *Food Chemistry, 108*, 119-129.

Skrzypczak-Jankun, E., Chorostowska-Wynimko, J., Selman, S.H. & Jankun, J. (2007). Lipoxygenases – A challenging problem in enzyme inhibition and drug development. *Current Enzyme Inhibition, 3,* 119-132.

Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Verbic, R. & Solar, A. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.). *Food Research International, 67,* 255-263.

Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients, 5*(4), 1417-1435.

Smith, J. J., Linforth, R. & Tucker, G. A. (1997). Soluble lipoxygenase isoforms from tomato fruit. *Phytochemistry, 45*, 543-458.

Smulikowska, S. (2006). Wartość odżywcza wytłoków rzepakowych produkowanych w kraju dla drobiu. *Wiadomości Zootechniczne, XLIV*(3), 22-28.

Sobczak, A. i Błyszczek, E. (2009). Kierunki zagospodarowania produktów ubocznych przemysłu mięsnego. *Czasopismo Techniczne Politechniki Krakowskiej*, „Chemia", 141–151.

Sofi, F., Dinu, M., Pagliai, G., Cesari, F., Gori, A. M., Sereni, A., Becatti, M., Fiorillo, C., Marcucci, R. & Casini, A. (2018). Low-calorie vegetarian versus mediterranean diets for reducing body weight and improving cardiovascular risk profile. *Circulation, 137*. doi: 0.1161/CIRCULATIONAHA.117.030088.

Sojkin, B. (red.). (2009). *Konsument wobec innowacji produktowych na rynku żywności* (s. 1-10; 63-98). Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.

Srivastava, Y., Semwal, A. D., Sharma, G. K. & Bawa, A. S. (2010). Effect of virgin coconut meal (VCM) on textural, thermal and physico-chemical properties of biscuits. *Food and Nutrition Sciences, 1*(2), 38-44.

Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Verberic, R. & Colaric, M. (2006). Traditional walnut liqueur – cocktail of phenolics. *Food Chemistry, 95*, 627-631.

Standard ISO 21807 .(2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs- determination of water activity.*

Statista. (2018a). Production of major vegetable oils worldwide from 2012/13 to 2017/18, by the type (in million metric tons). Pobrane: https://www.statista.com/statistics/263933/production-of-vegetable-oils-worldwide-since-2000/ [dostęp 25.02.2018].

Statista.(2018b). Consumption of vegetable oils worldwide form 2013/14 to 2017/18, by the type (in million metric tons). Pobrane z: https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/ [dostęp 25.02.2018]

Statista.(2018c). Global gluten-free food market size. Pobrane: https://www.statista.com/statistics/248467/ [dostęp 20.02.2018].

Stephany, M., Bader-Mittermaier, S., Schweiggert-Weisz, U. & Carle, R. (2014). Lipoxygenase activity in different species of sweet lubin (*Lupinus* L.) seeds and flakes. *Food Chemistry*. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.029

Stevenson, J. L., Paton, C. M. & Cooper, J. A. (2017). Hunger and satiety responses to high-fat meals after a high-polyunsaturated fat diet: A randomized trial. *Nutrition, 41*, 14-23.

Stolarzewicz, A.I., Ciekot ,J., Fabiszewska, A.U. i Białecka-Florjańczyk, E. (2013). Roślinne i mikrobiologiczne źródła przeciwutleniaczy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 67*, 1359-1373.

Strati, I.F. & Oreopoulou, V. (2011). Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food Science and Technology, 46*, 23–29.

Strzetelski, J. (2006). Możliwości wykorzystania w żywieniu bydła produktów ubocznych powstających przy głębokim tłoczeniu oleju z nasion roślin oleistych i produkcji bioetanolu. *Wiadomości Zootechniczne, XLIV*(3), 56-66.

Sujirtha, N. & Mahendran, T. (2015). Production, quality assessment and shelf life evaluation of protein-rich biscuits made from blends of wheat and defatted coconut flours.

Proceeding of the 2nd International Conference on Agriculture and Forestry, 1,19-27.

Sunil, L., Appaiah, P., Prasanth Kumar, P. K. & Gopala Krishna, A. G. (2015). Preparation of food supplements from oilseed cakes. *Journal of Food Science and Technology, 52*(5), 2998-3005.

Szajner, P. (red.) (2015). *Sytuacja na światowym rynku zbóż, roślin oleistych, cukru i biopaliw oraz jej wpływ na krajowe rynki produktów roślinnych i możliwości ich rozwoju. Rolnictwo Polskie i UE 2020+.* Wyzwania, szanse, zagrożenia, propozycje. Projekt wieloletni 2015-2019. Warszawa: Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – Państwowy Instytut Badawczy.

Szymanowska, U., Jakubczyk, A., Baraniak, B. & Kur, A. (2009). Characterization of lipoxygenase from pea seeds (*Pisum sativum var. Telephone* L.). *Food Chemistry, 116,* 906-910.

Taga, S. M., Miller, E. E. & Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipids antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists` Society, 61,* 928-931.

Tańska, M i Rotkiewicz, D. (2003). Wpływ różnych czynników na jakość nasion rzepaku. Rośliny oleiste, XXIV, 595-616.

Tapia, M. I., Sánchez-Morgado, J. R., Garcia-Parra, J., Ramirez, R., Hernandez, T. & González - Gomez, D. (2013). Comparative study of the nutritional and bioactive compounds content of four walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Journal of Food Composition Analysis, 31*, 232–237.

Tarek-Tilistyák, J., Juhasz-Roman, M., Jeko, J. & Mathe, E. (2014). Short-term storability of oil seed and walnut cake - microbiological aspect. *Acta Alimentaria, 43*(4), 632-639.

Teh, S. S. (2015). Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils and functional properties of their seed cakes. Otago University Research Archive Pobrane: https://ourarchive.otago.ac.nz/handle/10523/5670 [dostęp 17.02.2018].

Teh, S. S., Niven, B. E., Bekhit, A E. D. A., Carne, A. & Birch, J. (2015). Optimization of polyphenol extraction and antioxidant activities of extracts from defatted flax seed cake (*Linum usitatissimum* L.) using microwave-assisted and pulsed electric field (PEF) technologies with response surface methodology. *Food Science and Biotechnology, 24*(5), 1649-1659.

Terpinc, P., Ćeh, B., Poklar Ulrih, N. & Abramović, H. (2012). Studies of the correlation between antioxidant properties and total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products, 39*, 210-217.

Traktat o Funkcjonowaniu Unii Europejskiej (wersja skonsolidowana) z dnia 26 października 2012 r. (Dz.U. UE z 2012 r., C 326/47).

Tseng, A. & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fiber for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry, 138*, 356-365.

Tsouko, E., Kachrimanidou, V., Fragoso dos Santos, A., do Nascimento Vitorino Lima, M. E., Papanikolaou, S., Machado de Castro, A., Guimaraes Freire, D. & Koutinas, A. A. (2017). Valorization of by-products from palm oil mills for the production of generic fermentation media for microbial oil synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 181*(4), 1241-1256.

Uchwała nr 88 Rady Ministrów z dnia 1 lipca 2016 w sprawie Krajowego planu gospodarki odpadami 2022. (MP. 2016 poz. 784).

Ustawa z dnia 24 listopada 2017 r. o zmianie ustawy o odpadach oraz niektórych innych ustaw. (Dz.U. 2017, poz. 2422).

Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska. (Dz.U. 2001 nr 62 poz. 627 z późn. zm.).

Uthumporn, U., Woo, L., Tajul, A. Y. & Fazilah, A. (2015). Physicochemical and nutritional evaluation of cookies with different levels of eggplant flour substitution. *CyTA- Journal of Food, 13*, 220-226.

Vaidya, B. & Eun, J. B. (2013). Effect of roasting on oxidative and tocopherol stability of walnut oil during storage in the dark. *European Journal of Lipid Science and Technology, 115*, 348-355.

Vaisali, C., Charanyaa, S., Belur, P. D. & Regupathi, I. (2014). Refining of edible oils: a critical appraisal of current and potential technologies. *International Journal of Food Science and Technology*. doi: 10.1111/ijfs.12657.

Vanhanen, L. P. & Savage, G. P. (2006). The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour at five different temperatures using three different types of packaging. *Food Chemistry, 99,* 64-69.

Vicaş, S. I., Chedea, V. S. & Socaciu, C. (2011). Inhibitory effects of isoflavones on soybean lipoxygenase-1 activity. *Journal of Food Biochemistry, 35*, 613-627.

Vinson, J. A. & Cai, Y. (2012). Nuts, especially walnuts, have antioxidant quantity and efficacy and exhibit significant potential health benefits. *Food & Function 3*, 134-140.

Wang, R. Y. (2013). Brief introduction of production and consumption of vegetable oils and oilseeds in China. *Farm Machinery, 14*, 15-19.

Waszkowiak, K. & Rudzińska, M. (2014). Effect of flaxseed meals and extracts on lipid stability in a stored meat product. *Journal of American Oil Chemists' Society, 91*(6), 979-987.

Watkins, C. (2005). The world of nut-often maligned for their high fat content, nuts are actually a good source of phytochemicals. *Inform-International News on Fats Oils and Related Materials, 16*(4), 200-203.

Weylandt, K. H. Serini, S., Chen, Y. Q., Su, H. M., Lim, K., Cittadini, A. & Calviello, G. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids: the way forward in times of mixed evidence. *BioMed Research International, 2015*. Doi: http://dx.doi.org/10.1155/2015/143109

Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K. & Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International, 46*,

505-513.

Williams, M., Morales, M. T., Aparicio, R. & Harwood J. L. (2002). Analysis of volatiles from callus cultures of olive *Olea europea* L. *Phytochemistry, 47*, 1253-1259.

Wnukowski, P. i Kozłowska, M. (2017). Patent USA, Mild fractionation of functional isolates derived from grains and oilseeds. US 2017/0318834 A1, wrzesień 2017. Pobrane: http://www.freepatentsonline.com/20170318834.pdf [dostęp 24.02.2018].

Wojdalski, J., Żelaziński, T., Konieczny, P., Dróżdż, B., Kupczyk, A., Golisz, E., Mroczek, E. i Mruk, R. (2015). Uwarunkowania gospodarki energią, wodą i środowiskiem w wybranych branżach przemysłu rolno-spożywczego oraz zarys problematyki zrównoważonego rozwoju. *Inżynieria Przetwórstwa Spożywczego, 1*(4), 34-51.

World Health Organization. (2009). *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*, Genewa.

World Health Organization. (2013). *Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases* 2013-2020. Genewa: WHO Document Production Services.

World Health Organization. (2016a). *Global report on diabetes*. Francja

World Health Organization. (2016b). *Diabetes country profiles – Poland.* Pobrane z: http://www.who.int/diabetes/country-profiles/pol_en.pdf?ua=1

Wroniak, M. i Rękas, A. (2016). Trendy w produkcji tłuszczów roślinnych. w: T. Tarko, I. Dróżdż, D. Najgebauer-Lejko i A. Duda-Chodak. *Innowacyjne rozwiązania w technologii żywności i żywieniu człowieka*. (s.69-79). Kraków: Oddział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności.

Wu, Z., Robinson, D. S., Hughes, R. K., Casey, R., Hardy, D. & West, S. (1999). Co-oxidation of β-carotene catalysed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47,* 4899- 4906.

Xanthopoulou, M. N., Nomikos, T. M, Fragopoulou, E. & Antonopoulou, S. (2009). Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Research International, 42*, 641-646.

Xie, P., Huang, H., Dong, X. & Zou, X. (2012). Evaluation of extruded or unextruded double-low rapeseed meal and multienzymes preparation in pig nutrition during the finishing phase of production. *Italian Journal of Animal Sciences, 11*(2), 34.

Xie, C., Ma, Z. F., Li, F., Zhang, H., Kong, L., Yang, Z. & Xie, W. (2018). Storage quality of walnut oil containing lycopene during accelerated oxidation. *Journal of Fodd Science and Technology, 55*(4), 1387-1395.

Xu, B., Wang, L. K., Miao, W. J., Wu, Q. F., Liu, Y. X., Sun, Y. & Gao, C. (2016). Thermal versus microwave inactivation kinetics of lipase and lipoxygenase from wheat germ. *Food Process Engineering, 39*(3), 247-255.

Xu, Y., Jiang, J., Meng, Z., Li, J. & Liu, Y. (2014). Effect of roasting conditions on the quality of walnut oil. China Oils and Fats (http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZYZZ201407004.htm).

Yalcin, S. & Basman, A. (2015). Effect of infrared treatment on urease, trypsin inhibitor and lipoxygenase activities of soybean samples. *Food Chemistry, 169,* 203-210.

Yanishlieva-Maslarova, N. V. (2001). Inhibiting oxidation. w: J. Pokorny, N. Yanishlieva & M. Gordon (red). *Antioxidants in food: Practical applications.* (s. 22-70). Cambridge. Woodhead Publishing Limited.

Yoshie-Stark, Y. Wada,Y. & Wäsche, A. (2008). Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry, 107*, 32-39.

Yoshie-Stark, Y. & Wäsche, A. (2004). Characterisation of crude lipoxygenase from commercially de-oiled lupin flakes for different types of lupin (*Lupinus albus, Lupinus angustifolius*). *Food Chemistry, 88*, 287-292.

Zacheo, G., Cappello, S., Gallo, A., Santino, A. & Cappello, A. R. (2000). Changes Associated with Post-harvest Ageing in Almond Seeds, *Food Science and Technology*, *33,* 415-423.

Zamindar, N., Bashash, M., Khorshidi, F., Serjouie, A., Shirvani, M. A., Abbasi, H. & Sedaghtdoost, A. (2017). Antioxidant efficacy of soybean cake extracts in soy oil protection. *Journal of Food Science and Technology, 54*(7), 2077-2084.

Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Liu, Q. & Tsao, R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α-glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, *172*, 862-872.

Zhong, Y. & Shahidi, F. (2012). Antioxidant behavior in bulk oil: limitations of polar paradox theory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60.* 4-6.

Zhou, L., Yan, T., Chen, X., Li, Z., Wu, D., Hua, S. & Jiang, L. (2018). Effect of high night temperature on storage lipids and transcriptome changes in developing seeds of oilseed rape. *Journal of Experimental Botany, 69*(7), 1721-1733.

Zhou, Y., Fan, W., Chu, F. & Pei, D. (2016). Improvement of the flavor and oxidative stability of walnut oil by microwave pretreatment. *Journal of American Oil Chemists' Society, 93*, 1563–1572.

Zhu, S., Riaz, M. N. & Lusas, E. W. (1996). Effect of different extrusion temperature and moisture content on lipoxygenase inactivation and protein solubility in soybeans. *Journal of Agricultural Food Chemistry, 44*(10), 3315-3318.

Zielińska, M., Rutkowska, R. i Antoniewska, A. (2017). Produkty utleniania lipidów – konsekwencje żywieniowe i zdrowotne. *Problemy Higieny i Epidemiologii, 98*(3), 203-211.

Zmudziński, W. (2012). *Studia nad zastosowaniem wybranych procesów fotokatalitycznych do poprawy jakości wód zużytych w zakładach mleczarskich.* Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.

Żbikowska, A. & Rutkowska, J. (2011). Quality of fats in cookies as affected by storage and addition of oat flakes. *Cereal Chemistry, 88*, 234-238.

Žilić, S. M., Šobajić, S. S., Mladenović Drinić, S. D., Kresović, B. J. & Vasić, M. G. (2010). Effects of heat processing on soya bean fatty acids content and the lipoxygenase activity. *Journal of Agricultural Sciences, 55*(1), 55-64.

Wykaz rysunków

Rysunek 1.	Korzyści ekoprojektowania……	13
Rysunek 2.	Światowa wielkość produkcji wybranych olejów jadalnych……	24
Rysunek 3.	Roczny zysk przedsiębiorstwa w zależności od formy zagospodarowania wytłoków roślin oleistych……	43
Rysunek 4.	Globalna wielkość produkcji orzechów włoskich (wyrażona masą orzechów w łupinach) w latach 2005-2015……..	46
Rysunek 5.	Możliwe kierunki zagospodarowania wytłoków z orzecha włoskiego w świetle obowiązujących trendów……	54
Rysunek 6.	Czynniki warunkujące stabilność oksydacyjną surowców i wytłoków oleistych…….	60
Rysunek 7.	Chromatogram kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej wytłoków z orzecha włoskiego……..	97
Rysunek 8.	Chromatogram związków lotnych próbki tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich stabilizowanego ekstraktami otrzymanymi z wytłoków z orzecha włoskiego……	109
Rysunek 9.	Wpływ pH mieszaniny ekstrakcyjnej na aktywność lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego……	118
Rysunek 10.	Wpływ pH mieszaniny reakcyjnej na aktywność lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego……..	120
Rysunek 11.	Wpływ stężenia lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego w mieszaninie reakcyjnej na wykazywaną przez nią aktywność……	120
Rysunek 12.	Zmiany aktywności lipooksygenazy w przechowywanych wytłokach z orzecha włoskiego……	122
Rysunek 13.	Zmiany zawartości nadtlenków (LOO) w przechowywanych wytłokach z orzecha włoskiego……	124
Rysunek 14.	Zmiany aktywności wody w czasie 12-miesięcznego przechowywania wytłoków z orzecha włoskiego……	125
Rysunek 15.	Zawartość związków fenolowych zidentyfikowanych w etanolowych ekstraktach wytłoków z orzecha włoskiego……..	126
Rysunek 16.	Ogólna zawartość związków fenolowych w etanolowych ekstraktach otrzymanych ze świeżych i przechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego……..	128
Rysunek 17.	Zawartość flawonoidów w etanolowych ekstraktach otrzymanych ze świeżych i przechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego……	129
Rysunek 18.	Właściwości redukujące etanolowych ekstraktów otrzymanych ze świeżych i przechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego……	130
Rysunek 19.	Kinetyka wygaszania rodnika DPPH w zależności od stężenia ekstraktu z wytłoków z orzecha włoskiego……..	131
Rysunek 20.	Kinetyka wygaszania β-karotenu w zależności od stężenia ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego w mieszaninie reakcyjnej	132
Rysunek 21.	Zmiany stężenia ditlenku węgla i tlenu w czasie składowania wytłoków z orzecha włoskiego……..	134
Rysunek 22.	Zmiany liczby nadtlenkowej w czasie przechowywania próbek modelowych koncentratów ciasta w proszku w warunkach normalnego składowania……	138

Rysunek 23. Przebieg procesów utleniania w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C…….. 141
Rysunek 24 Zależność stopnia inhibicji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego od stężenia etanolowych ekstraktów tych wytłoków……. 143
Rysunek 25. Zależność stopnia inhibicji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego od stężenia modelowych kwasów fenolowych (stężenie 0,05 mM)…… 145
Rysunek 26. Zależność stopnia inhibicji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego od stężenia modelowych kwasów fenolowych (stężenie 0,25 mM)…… 146
Rysunek 27. Zależność stopnia inhibicji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego od stężenia modelowych kwasów fenolowych (stężenie 0,40 mM)…… 146
Rysunek 28. Zależność aktywności lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego od czasu i temperatury ogrzewania…… 149
Rysunek 29. Powierzchnia odpowiedzi dla zmian aktywności lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego w zależności od czasu i temperatury ogrzewania…….. 152
Rysunek 30. Zależność zmian nadtlenków (LOO) od czasu i temperatury ogrzewania wytłoków z orzecha włoskiego…….. 154
Rysunek 31. Powierzchnia odpowiedzi dla zmian zawartości nadtlenków w wytłokach z orzecha włoskiego w zależności od czasu i temperatury ogrzewania…… 155
Rysunek 32. Ogólna zawartość związków fenolowych w etanolowych ekstraktach wyodrębnionych z nieogrzewanych (0) i poddanych ogrzewaniu wytłoków z orzecha włoskiego…….. 157
Rysunek 33. Powierzchnia odpowiedzi dla zmian ogólnej zawartości związków fenolowych w wytłokach z orzecha włoskiego w zależności od czasu i temperatury ogrzewania……. 158
Rysunek 34. Potencjał przeciwutleniający etanolowych ekstraktów wyodrębnionych z nieogrzewanych (0) i poddanych ogrzewaniu wytłoków z orzecha włoskiego …… 159
Rysunek 35. Powierzchnia odpowiedzi dla zmian właściwości redukujących etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego w zależności od czasu i temperatury ogrzewania…… 160
Rysunek 36. Zmiany oksydacyjne zachodzące w czasie przechowywania próbek modelowych koncentratów ciasta w proszku w warunkach normalnego składowania (21±2°C)…… 162
Rysunek 37. Wpływ dodatku etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego na zasięg pierwotnych zmian oksydacyjnych w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C…… 165
Rysunek 38. Wpływ dodatku etanolowych ekstraktów z przechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego na zasięg pierwotnych zmian oksydacyjnych w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C…… 167

Wykaz tabel

Tabela 1. Masa oraz sposób postępowania z odpadami w Polsce w zależności od kierunku działalności (2016 r.) (tys. ton)..... 16
Tabela 2. Zastosowanie wytłoków roślin oleistych w produktach przemysłu spożywczego..... 39
Tabela 3. Wpływ dodatku wytłoków roślin oleistych na właściwości gotowych produktów..... 41
Tabela 4. Skład chemiczny orzechów włoskich (w 100 g jąder)..... 47
Tabela 5. Najważniejsze trendy obowiązujące na rynku żywności w 2018 r..... 53
Tabela 6. Występowanie lipooksygenazy w surowcach przemysłu spożywczego... 67
Tabela 7. Charakterystyka typów lipooksygenazy..... 68
Tabela 8. Produkty przemian wodoronadtlenków..... 70
Tabela 9. Charakterystyka poszczególnych etapów badań..... 86
Tabela 10. Charakterystyka wartości odżywczej i energetycznej oraz wybranych właściwości fizykochemicznych wytłoków z orzecha włoskiego..... 115
Tabela 11. Skład kwasów tłuszczowych wytłoków z orzecha włoskiego (procentowy udział w puli wszystkich kwasów tłuszczowych [%]..... 116
Tabela 12. Aktywność lipooksygenazy w wytłokach z orzecha włoskiego..... 121
Tabela 13. Charakterystyka składu i wybranych cech fizykochemicznych modelowych koncentratów ciasta w proszku..... 137
Tabela 14. Wpływ dodatku przeciwutleniaczy na zawartość nadtlenków w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C..... 140
Tabela 15. Zależność stopnia inhibicji lipooksygenazy wytłoków z orzecha włoskiego przez wybrane kwasy fenolowe [%]..... 144
Tabela 16. Stopień zahamowania aktywności lipooksygenazy w zależności od warunków ogrzewania wytłoków z orzecha włoskiego [%]..... 150
Tabela 17. Wzrost liczby nadtlenkowej tłuszczu wyekstrahowanego z wytłoków z orzecha włoskiego w zależności od warunków ogrzewania [%]..... 155
Tabela 18. Wpływ dodatku etanolowych ekstraktów wytłoków z orzecha włoskiego na zasięg pierwotnych i wtórnych zmian oksydacyjnych w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C..... 164
Tabela 19. Wpływ dodatku etanolowych ekstraktów z przechowywanych wytłoków z orzecha włoskiego na zasięg pierwotnych i wtórnych zmian oksydacyjnych w próbkach tłoczonego na zimno oleju z orzechów włoskich przechowywanych w temperaturze 50°C..... 168