

Inga Klimczak

TOWAROZNAWCZE ASPEKTY
KSZTAŁTOWANIA BARWY SOKÓW
NA PRZYKŁADZIE MĘTNEGO SOKU JABŁKOWEGO



WYDAWNICTWO UEP



UNIwersytet
EKONOMICZNY
W POZNANIU

Inga Klimczak

TOWAROZNAWCZE ASPEKTY
KSZTAŁTOWANIA BARWY SOKÓW
NA PRZYKŁADZIE MĘTNEGO SOKU JABŁKOWEGO

WYDAWNICTWO UEP



UNIWERSYTET
EKONOMICZNY
W POZNANIU

Poznań 2017

KOMITET REDAKCYJNY

*Szymon Cyfert, Elżbieta Gołata (przewodnicząca), Jacek Lisowski, Ewa Małuszyńska,
Jerzy Schroeder (sekretarz), Krzysztof Walczak, Ryszard Zieliński*

RECENZENCI

Stanisław Popek, Aneta Wojdyło

PROJEKT OKŁADKI

Boobry Group

Marta Brzóstowicz

REDAKCJA

Anna Grześ

KOREKTA

Deal

© Copyright by Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu
Poznań 2017



Ta książka jest udostępniana na licencji Creative Commons – Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne-Bez utworów zależnych 4.0 Międzynarodowe

ISBN 978-83-7417-949-2

e-ISBN 978-83-66199-67-5

<https://doi.org/10.18559/978-83-66199-67-5>

WYDAWNICTWO UNIwersYTETU EKONOMICZNEGO W POZNANIU

ul. Powstańców Wielkopolskich 16, 61-895 Poznań

tel. 61 854 31 54, 61 854 31 55

www.wydawnictwo-ue.pl, e-mail: wydawnictwo@ue.poznan.pl

adres do korespondencji: al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań

Skład: Wydawnictwo eMPI²

Reginaldo Cammarano

Druk: Zakład Graficzny Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu

ul. Towarowa 53, 61-896 Poznań, tel. 61 854 38 06

SPIS TREŚCI

Wykaz używanych skrótów i symboli.....	5
Wstęp.....	7
1. Wybrane elementy rynku soków owocowych w Polsce	9
2. Czynniki warunkujące enzymatyczne brunatnienie żywności.....	18
2.1. Występowanie i funkcje biologiczne oksydazy polifenolowej	18
2.2. Mechanizm reakcji enzymatycznego brunatnienia.....	19
2.2.1. Substraty oksydazy polifenolowej	20
2.2.2. Optymalne pH i temperatura aktywności oksydazy polifenolowej.....	24
2.2.3. Syntetyczne i naturalne inhibitory enzymatycznego brązowienia.....	25
3. Czynniki wpływające na przebieg procesu enzymatycznego brunatnienia męt- nego soku jabłkowego	34
4. Cel badań i hipotezy badawcze	43
5. Badany materiał, zakres badań i metody badań.....	45
5.1. Materiał badany	45
5.2. Zakres badań	46
5.3. Metody badań	49
5.4. Analiza statystyczna	51
6. Wyniki badań własnych i dyskusja.....	52
6.1. Wpływ naturalnych przeciwutleniaczy na aktywność oksydazy polifenolowej – badania modelowe.....	52
6.1.1. Wpływ ekstraktów roślinnych na aktywność oksydazy polifenolowej .	52
6.1.2. Wpływ soków z owoców cytrusowych na aktywność oksydazy polife- nolowej	62
6.2. Wpływ odmiany jabłek i dodatku kwasu askorbinowego na barwę mętnego soku jabłkowego	69
6.2.1. Wpływ odmiany jabłek na barwę mętnego soku jabłkowego	69
6.2.2. Wpływ dodatku kwasu askorbinowego na barwę mętnego soku jabłko- wego	72

6.3. Wpływ ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych na brunatnienie mętnego soku jabłkowego.....	76
6.3.1. Charakterystyka chemiczna mętnego soku jabłkowego	76
6.3.2. Wpływ ekstraktów roślinnych na brunatnienie mętnego soku jabłkowego	82
6.3.3. Wpływ soków z owoców cytrusowych na brunatnienie mętnego soku jabłkowego	106
6.4. Ocena pożądalności barwy mętnego soku jabłkowego z dodatkiem ekstraktów roślinnych oraz soków z owoców cytrusowych	125
6.4.1. Wpływ ekstraktów roślinnych oraz soków z owoców cytrusowych na pożądalność barwy nieprzechowywanego soku jabłkowego	126
6.4.2. Wpływ ekstraktów roślinnych oraz soków z owoców cytrusowych na pożądalność barwy przechowywanego soku jabłkowego.....	129
Podsumowanie i wnioski.....	136
Aneks	143
Bibliografia.....	144
Spis tabel.....	164
Spis rysunków	167

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

BI	- indeks brązowienia
C	- (+)-katechina
DOPA	- 3,4-dihydroksyfenyloalanina
EC	- (-)-epikatechina
ECG	- (-)-galusan epikatechiny
EGC	- (-)-epigalokatechina
EGCG	- (-)-galusan epigalokatechiny
EH1-EH5	- ekstrakty z zielonej herbaty
EPW	- ekstrakt z pestek winogron
ER	- ekstrakt z rokitnika
FC	- sok odtworzony z soku zagęszczonego
GC	- (-)-galokatechina
GCG	- galusan galokatechiny
KA	- kwas askorbinowy
KK	- kwas kojowy
NFC	- sok bezpośredni, wyprodukowany bezpośrednio z soków surowych
SJ	- sok jabłkowy
SG	- sok z grejpfruta
SM	- sok z mandarynek
SP	- sok z pomarańczy
PPO	- polifenolooksydaza (oksydaza polifenolowa)
YI	- indeks zażółcenia
ΔE^*_{ab}	- całkowita różnica barwy

WSTĘP

Barwa owoców, warzyw oraz ich przetworów jest ważnym wyróżnikiem jakości i cechą organoleptyczną, która w pierwszej kolejności podlega ocenie przez konsumenta podczas decyzji zakupowych. Jest wskaźnikiem stopnia dojrzałości, świeżości, sugeruje odczuwanie określonego smaku i zapachu owoców i warzyw, a także przetworów owocowo-warzywnych. Ta sama barwa w przypadku różnych produktów może być różnie postrzegana. Kojarzona z danym produktem, może się spotkać z brakiem akceptacji konsumentkiej w sytuacji, gdy jest inna niż oczekiwana. Jest związana z występowaniem w produktach naturalnych związków barwnych, takich jak chlorofile, karotenoidy, antocyjany oraz betalainy. Niewłaściwe warunki przechowywania oraz przetwarzania żywności mogą powodować obniżenie zawartości lub zmiany w strukturze tych związków, a tym samym niekorzystne zmiany barwy. Wpływ na zmianę barwy mogą też mieć produkty reakcji brązowienia enzymatycznego i nieenzymatycznego. Przy tzw. przejrzeniu owoców i warzyw, a także podczas ich mechanicznego uszkodzenia, przechowywania oraz przetwarzania, zachodzi brązowienie miąższu katalizowane przez polifenolooksydazę (PPO). W wyniku tego procesu następuje utlenienie polifenoli, pociemnienie barwy produktu i w konsekwencji obniżenie jego jakości.

Brązowienie stanowi poważny problem dla przetwórstwa owocowo-warzywnego, stąd też uwaga zarówno środowiska naukowców, jak i producentów żywności jest skierowana na poszukiwanie sposobów zapobiegania lub ograniczania tego zjawiska. W ciągu ostatnich kilkunastu lat pojawiło się wiele publikacji z zakresu kontrolowania czy hamowania aktywności PPO w owocach, warzywach oraz ich przetworach. Liczne badania wykazały, że niektóre związki polifenolowe wykazują właściwości inhibicyjne wobec tyrozynazy z grzyba (*Agaricus bisporus*). Ze względu na zapotrzebowanie konsumenta na naturalne dodatki do żywności badania naukowców są skierowane na poszukiwanie naturalnych inhibitorów brązowienia enzymatycznego. Ekstrakty polifenolowe, wyodrębnione z roślin, mogą mieć zastosowanie jako efektywne i bezpieczne inhibitory tyrozynazy.

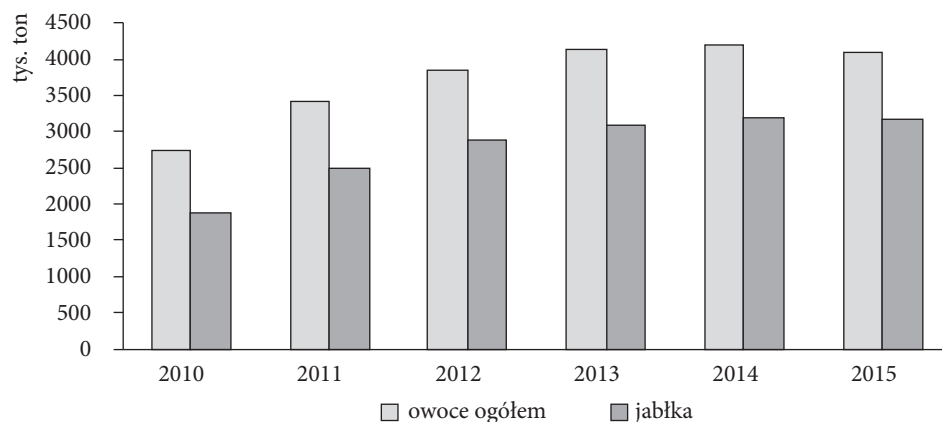
Znaczący wzrost zainteresowania wpływem diety na zdrowie i zwiększone w związku z tym oczekiwania konsumentów wymuszają na producentach soków

zwrócenie większej uwagi na wartość biologiczną, prozdrowotną tych produktów. Trendem obserwowanym od kilku lat na rynku napojów bezalkoholowych jest zwiększona popularność produktów *premium*, do których są zaliczane soki NFC (ang. *not from concentrate*). Soki NFC to soki bezpośrednio, wyprodukowane w wyniku tłoczenia lub wyciskania surowych owoców lub warzyw [Oszmiański 2009]. W Polsce spośród soków NFC najczęściej produkuje się soku jabłkowego. Naturalnie mętne soki jabłkowe są alternatywą dla soków klarowanych i odpowiadają wymaganiom świadomego konsumenta. Soki te są otrzymywane z pominięciem obróbki enzymatycznej, procesu klarowania i filtracji, zawierają więcej składników bioaktywnych, takich jak pektyny i związki polifenolowe, niż soki klarowane. Brak procesu klarowania, usuwającego brunatne produkty enzymatycznego utleniania polifenoli, sprzyja jednak szybkiemu ciemnieniu soków. Dlatego też, w celu zapobiegania stratom związków polifenolowych oraz niekorzystnym zmianom barwy soków, w procesie otrzymywania soku mętnego najważniejsza jest ochrona polifenoli przed utlenieniem w obecności PPO. Proces produkcji mętnych soków jabłkowych prowadzi się w środowisku gazu obojętnego, poza tym stosuje się niskie temperatury przechowywania soków. Dodaje się także kwas askorbinowy do miazgi na etapie rozdrabniania i (lub) bezpośrednio do soku przed rozlewem.

Zagadnieniu brązowienia enzymatycznego mętnego soku jabłkowego poświęcono wiele prac naukowych, niewiele jest jednak badań na temat możliwości wykorzystania np. ekstraktów z roślin czy innych soków do przedłużania trwałości mętnych soków jabłkowych w aspekcie ich barwy. Obserwowane w literaturze przedmiotu zainteresowanie naturalnymi inhibitorami tyrozynazy oraz trwające intensywne badania mające na celu znalezienie skutecznych inhibitorów brązowienia enzymatycznego mętnych soków jabłkowych wskazują na konieczność poszukiwania tego typu związków. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wpisują się w nurt badań dotyczących roli naturalnych przeciwutleniaczy jako inhibitorów brązowienia enzymatycznego.

1. WYBRANE ELEMENTY RYNKU SOKÓW OWOCOWYCH W POLSCE

Polska jest czwartym na świecie i największym w Europie producentem jabłek. Największymi konkurentami są Chiny, Stany Zjednoczone, Turcja, Francja oraz Włochy [ARR¹ 2015]. W Polsce produkcja owoców charakteryzuje się sezonowością i dużymi wahaniami plonów w poszczególnych latach spowodowanymi panującymi warunkami klimatycznymi. W 2010 roku, w wyniku niekorzystnych dla upraw ogrodniczych warunków pogodowych, zbiory owoców były o 25% niższe w niż w roku poprzednim (w tym jabłek o 30%) [ARR 2014]. W latach 2011–2014 produkcja owoców, w tym jabłek, wykazywała tendencję wzrostową. Według danych GUS zbiory jabłek w 2015 roku wyniosły 3169 tys. ton i były nieznacznie mniejsze (o 0,8%) niż w 2014 roku. Produkcja jabłek stanowi około 70% ogólnej produkcji owoców krajowych (rysunek 1).



Rysunek 1. Zbiory owoców w Polsce w latach 2010–2015

Źródło: Na podstawie: [Rocznik Statystyczny Rolnictwa GUS 2014, 2016]

¹ Agencja Rynku Rolnego.

Produkcja soków owocowych

Szacuje się, że około 90% jabłek (w tym udział jabłek krajowych wynosi 55–60%) przerabia się na zagęszczony sok jabłkowy, którego Polska jest pierwszym w Unii Europejskiej i drugim (po Chinach) na świecie producentem [ARR 2015; Nosecka 2015]. Według danych IERiGŻ-PIB² produkcja zagęszczonego soku jabłkowego wytwarzanego z krajowego surowca w sezonie 2014/2015 wyniosła 285 tys. ton i była o 21% wyższa w stosunku do sezonu poprzedniego. Wzrost podaży jabłek do przetwórstwa był spowodowany przede wszystkim mniejszym eksportem owoców (o około 20%), na co wpływ miało wprowadzenie przez Rosję od sierpnia 2014 roku embarga na przywóz świeżych owoców (a także warzyw, mrożonek i suszy) z krajów Unii Europejskiej [IERiGŻ-PIB 2015]. Z 290 do 325 tys. ton wzrosła również łączna produkcja koncentratu jabłkowego powstałego w wyniku zmieszania soków z jabłek krajowych z zagęszczonymi sokami importowanymi, głównie z Ukrainy. W sezonie 2015/2016 produkcja zagęszczonego soku jabłkowego pozostała na tym samym poziomie co w sezonie poprzednim (325 tys. ton; tabela 1).

Tabela 1. Produkcja wybranych przetworów owocowych w Polsce w latach gospodarczych [tys. ton]

Produkt	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016 ^a
Soki zagęszczone	190	261	363	333	365	372
– sok jabłkowy	155	225	325	290	325	325
Soki pitne, nektary i napoje ^b	1580	1485	1430	1525	1600	1650

^a Szacunek IERiGŻ-PIB.

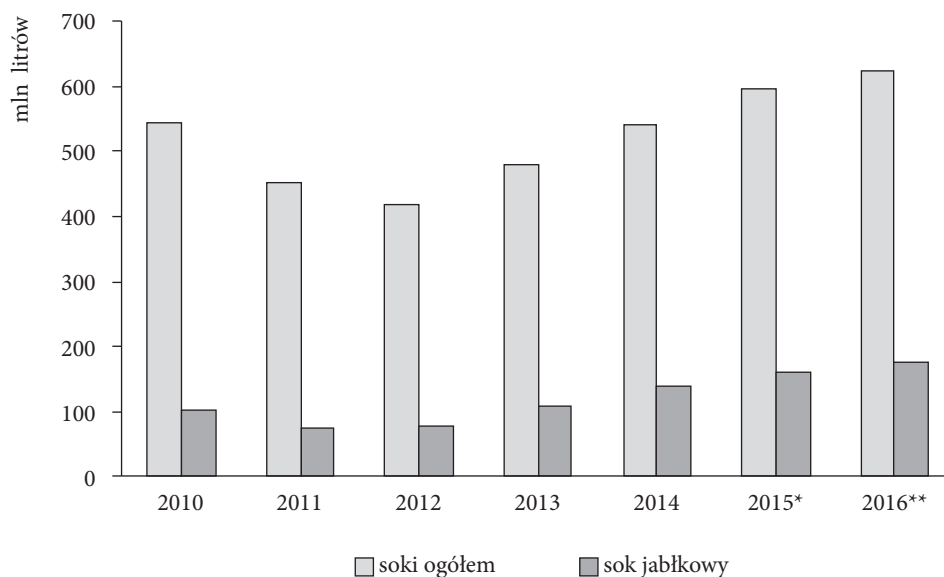
^b Łącznie z warzywnymi.

Źródło: Na podstawie: [IERiGŻ-PIB 2015, 2016].

Pomimo mniejszych w 2015 roku zbiorów owoców, w tym jabłek, produkcja przetworów owocowych w sezonie 2015/2016 wzrosła o 25 tys. ton w odniesieniu do sezonu poprzedniego i wynosiła 1,1 mln ton [IERiGŻ-PIB 2016]. Wzrost podaży jabłek do przetwórstwa wynikał z wciąż relatywnie dużych zapasów tego surowca na krajowym rynku, a także był odzwierciedleniem wzrostu popytu polskich konsumentów na przetwory z jabłek [Nosecka i Szczepaniak 2016]. W sezonie tym zwiększyła się łączna produkcja soków, nektarów oraz napojów owocowych i warzywnych z 1,60 do 1,65 mln ton (tabela 1), o której w dużej mierze zdecydował wzrost produkcji o około 40 mln litrów soków odtworzonych z koncentratu (FC; ang. *from concentrate*) oraz soków bezpośrednich (NFC; ang. *not from concentrate*). Warto podkreślić, że w grupie tej największy wzrost produkcji odnotowano w przypadku soków jabłkowych, które w latach 2015–2016 stanowiły około 30% ogólnej produkcji soków (rysunek 2). Soki jabłkowe dominują w produkcji soków NFC,

² Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – Państwowy Instytut Badawczy.

których produkcja w ostatnich latach dynamicznie wzrasta. W sezonie 2015/2016 łączna produkcja soków NFC zwiększyła się o około 11% w odniesieniu do sezonu poprzedniego i wynosiła 150 ml litrów. Prognozuje się, że w Polsce w najbliższych latach zostanie zachowana tendencja wzrostowa produkcji soków owocowych, w tym przede wszystkim soków NFC [Trojanowicz 2015; Nosecka i Szczepaniak 2016].



* Szacunek IERiGŻ-PIB

** Prognoza IERiGŻ-PIB

Rysunek 2. Produkcja soków owocowych w Polsce w latach 2010–2016

Źródło: Na podstawie: [IERiGŻ-PIB 2015, 2016]

Handel zagraniczny

Po przystąpieniu Polski do UE nastąpił wzrost popytu na polskie produkty, w tym przetwory owocowo-warzywne. Po 2004 roku eksport krajowych przetworów owocowych wzrósł o 44%, osiągając wielkość 864 tys. ton w 2013 roku, podwajając swoją wartość do 1,1 mld euro [IERiGŻ-PIB]. W strukturze towarowej eksportu artykułami rolno-spożywczymi w 2015 roku owoce, warzywa, przetwory i soki stanowiły 13% [Bórawski i Bełdycka-Bórawska 2016]. Dominujące znaczenie w strukturze towarowej eksportu owoców i ich przetworów (pod względem wolumenu) miały mrożone owoce (30% eksportu) oraz soki zagęszczone i pitne (32%) [MRiRW³ 2016].

³ Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Polska od 2013 roku, zaraz po Chinach, jest czołowym eksporterem zagęszczonego soku jabłkowego, a głównymi rynkami zbytu dla tego produktu są Niemcy (59% łącznego wolumenu eksportu), Wielka Brytania (15%) oraz Holandia (7%) [ARR 2014]. Według danych Eurostatu od lipca do października 2014 roku wolumen eksportu krajowego zagęszczonego soku jabłkowego zwiększył się ponad 6-krotnie, podczas gdy w tym samym czasie w UE-28 odnotował 9-procentowy spadek. Rekordowy eksport tego produktu odnotowano w sezonie 2014/2015 (312,4 tys. ton wobec 234 tys. ton w sezonie poprzednim), co było spowodowane wzrostem produkcji krajowej oraz sprzedażą dużych zapasów z sezonu poprzedniego. Wzrostowi eksportu sprzyjało zwiększenie zapotrzebowania na polski koncentrat w USA i Rosji. W sezonie 2015/2016, w wyniku wyższych cen eksportowych polskiego soku zagęszczonego w porównaniu z ofertą z Chin, odnotowano spadek sprzedaży tego produktu o około 13% [tabela 2; IERiGŻ-PIB 2016].

Istotne znaczenie w handlu zagranicznym mają także soki pitne, nektary i napoje, których sprzedaż zagraniczna w ostatnich latach wahała się w przedziale od 87 do 135 tys. ton (tabela 2). Rosnąca konsumpcja na rynku krajowym wpłynęła na spadek eksportu soków, nektarów i napojów owocowych w sezonie 2014/2015 o 19,5 tys. ton w porównaniu z sezonem poprzednim. W sezonie 2015/2016 eksport tej grupy produktów zwiększył się o około 20% i wyniósł 135 tys. ton. Wpływy z eksportu zwiększyły się z 50 do 59 mln euro. Głównie wzrosła sprzedaż soku jabłkowego NFC (z 60 do 76 tys. ton) [Nosecka 2016]. W strukturze eksportu sok jabłkowy zajmuje dominującą pozycję, stanowiąc 25% łącznej wartości eksportu przetworów owocowych [ARR 2014].

Rosyjskie embargo spowodowało nasilenie działań w kierunku poszukiwania nowych rynku zbytu dla owoców oraz przetworów owocowych (kraje Afryki Północnej, Bliskiego Wschodu, Indie, Wietnam) [Bugala 2015]. W 2015 roku wartość eksportu tych produktów do Rosji obniżyła się w stosunku do roku poprzedniego o ponad 80% do 43 mln euro. Wartość eksportu do krajów UE zwiększyła się o 15% i wyniosła 1,32 mld euro, natomiast do krajów Wspólnoty Niepodległych Państw (WNP) obniżyła się o około 50% do 232 mln euro [MRiRW 2016].

W strukturze towarowej importu artykułami rolno-spożywczymi w 2015 roku, owoce, warzywa, przetwory i soki stanowiły 16%. W latach 2007–2015 odnotowano spadek importu tej grupy produktów o 3,8 punktu procentowego [Bórawski i Bedycka-Bórawska 2016]. W tabeli 2 przedstawiono dane dotyczące importu wybranych przetworów owocowych. Lata 2011–2016 były zróżnicowane pod kątem importu soków zagęszczonych i pitnych. W sezonie 2015/2016 import zagęszczonego soku jabłkowego zmniejszył się o 9,6% (z 78,6 do 57 tys. ton), w odniesieniu do sezonu poprzedniego. Spowodowane to było przede wszystkim mniejszym przywozem koncentratu z Ukrainy, na co wpływ miała wyższa niż w sezonie 2014/2015 jego cena. Zwiększył się natomiast import soku jabłkowego NFC z 11,6 do 13 tys. ton [Nosecka 2016].

Tabela 2. Eksport i import wybranych przetworów owocowych w Polsce w latach gospodarczych [tys. ton]

Produkt	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016
Eksport [tys. t]					
Soki zagęszczone	238,3	319,5	286,0	376,6	335,0
– sok jabłkowy	196,1	280,1	234,0	312,4	273,0
Soki pitne, napoje i nektary	87,0	102,5	133,9	114,3	135,0
Import [tys. t]					
Soki zagęszczone i pitne	117,6	167,3	184,0	179,3	162,0
– sok jabłkowy	48,8	92,8	103,4	90,2	70,0

Źródło: Na podstawie: [IERiGŻ-PIB 2015, 2016].

W 2015 roku wartość importu owoców i ich przetworów z krajów UE i WNP wzrosła w stosunku do roku poprzedniego odpowiednio o 5 i 4%. Głównymi dostawcami tych produktów były Hiszpania, Niemcy i Włochy [MRiRW 2016].

Handel w Polsce

Od kilku lat poziom sprzedaży napojów bezalkoholowych utrzymuje się na relatywnie stabilnym poziomie, przy równoczesnych niewielkich wzrostach jej wartości, co ściśle wynika ze zmian w spożyciu zachodzących w obrębie tej grupy, tj. wzrost spożycia jednego rodzaju produktu następuje kosztem drugiego. Największą grupą asortymentową wyróżnianą w tym segmencie są napoje oraz pitne soki owocowe i warzywne (ponad 45% udziału), a następnie wody mineralne (17%) i napoje orzeźwiający (38%) [Grzybowski 2013]. Krajowe ceny soków owocowych, według danych GUS, zmniejszyły się średnio o 0,3–0,4% w 2015 roku w stosunku do 2014 roku.

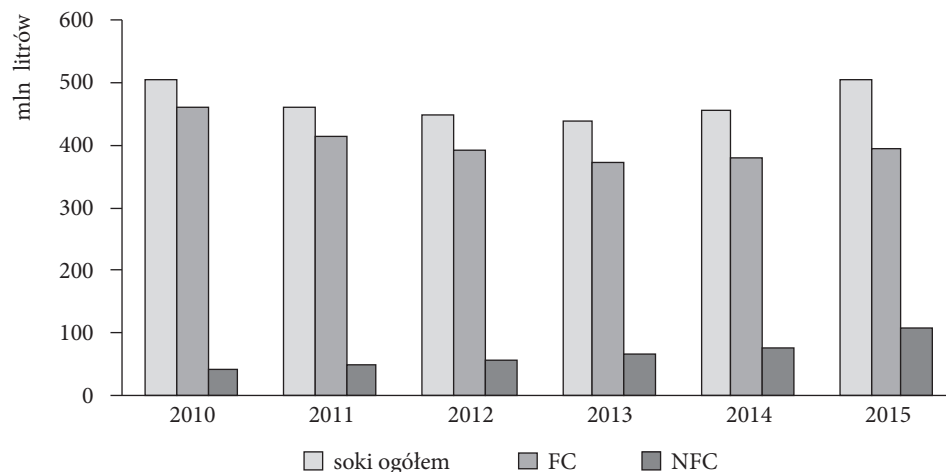
Cechą charakterystyczną dla tego sektora produktów spożywczych jest sezonowość. Sprzedaż napojów orzeźwiających zwiększa się w okresie letnim, a soków owocowo-warzywnych w okresie wiosny i jesieni. Niemniej, dobra koniunktura, wzrost PKB, obniżający się poziom bezrobocia oraz wzrost płac realnych w istotny sposób przyczyniają się do systematycznego rozwoju rynku napojów bezalkoholowych [Chrościcki 2016]. Nie bez znaczenia dla rozwoju jest również wzrost oczekiwań konsumentów w stosunku do jakości oferowanych produktów. Według Grzybowskiego [2013] rozwój branży soków i napojów jest ściśle uzależniony od stopnia modernizacji, automatyzacji oraz komputeryzacji zakładów i prowadzonych przez nie procesów produkcyjnych, a także dostosowania do wymogów higieniczno-sanitarnych. Istotne jest także podążanie za ewoluującymi trendami światowymi.

Szanse w utrzymaniu się w branży, ze względu na rosnącą przewagę podaży nad popytem oraz niewielki dynamizm we wzroście cen, mają przedsiębiorstwa o silnej pozycji rynkowej, oferujące coraz to nowe produkty o wysokiej jakości. W Polsce rynek soków owocowych i warzywnych jest wart ponad 2 mld zł. Wśród producentów soków FC dominującą pozycję zajmują duże przedsiębiorstwa, w większości

kontrolowane przez kapitał krajowy. Ponad 60% udziałów rynku soków i napojów owocowych jest skupionych w rękach trzech wiodących producentów: Grupa Maspex Wadowice (35,2%), Hortex Holding (13,3%) i Agros Nova (11,6%) [Trojanowicz 2015]. Biorąc pod uwagę udziały w wolumenie sprzedaży marek soków w okresie od marca 2015 roku do lutego 2016 roku, na pierwszym i drugim miejscu plasowały się produkty z portfolio Maspexu: Tymbark (31%) i Kubuś (22%). Na dalszej pozycji była marka Hortex (13%, firma Hortex Holding), Fortuna (6%, firma Agros Nova) i Cappy (4,5%, firma Coca Cola). Pozostałe marki stanowiły łącznie około 23% wolumenu sprzedaży [Szarejko 2016].

Spożycie soków owocowych

Spożycie pitnych soków owocowych w Polsce w 2012 roku wynosiło 8,52 l/osobę i było najniższe w latach 2010–2014. W 2013 roku konsumpcja wzrosła o 0,12 l, a w 2014 roku o 0,34 l, osiągając poziom 8,88 l/osobę [Rocznik Statystyczny Rolnictwa GUS 2014]. W 2015 roku, według raportu Europejskiego Stowarzyszenia Producentów Soków (AIJN), średnie spożycie soków owocowych w przeliczeniu na 1 mieszkańca wynosiło 13 l. Konsumpcja soków owocowych wynosiła 504 mln l, co stanowiło 10,6-procentowy wzrost w stosunku do 2014 roku (rysunek 3). Coraz większą popularnością cieszą się soki owocowe bezpośrednie (NFC). W latach 2010–2015 konsumpcja tych soków dynamicznie rosła i w 2015 roku wynosiła 108 mln litrów (2,6-krotny wzrost). Spożycie soków NFC stanowiło 21% ogólnej konsumpcji soków owocowych. W krajach Europy około 32% konsumpcji soków stanowią soki NFC, a najbardziej rozwinięty rynek tej kategorii produktów jest we Francji (63%) i Wielkiej Brytanii (42%) [AIJN 2016].



Rysunek 3. Spożycie soków owocowych w Polsce w latach 2010–2015

Źródło: [AIJN 2015, 2016]

W 2015 roku łączne spożycie soków i nektarów w Unii Europejskiej spadło o 0,73% w stosunku do roku 2014 i wyniosło 9631 mln l, z czego około 6142 mln l stanowiły soki owocowe. Najwyższe spożycie soków i nektarów owocowych w Europie występuje w Niemczech (2391 mln l), Francji (1505 mln l), Wielkiej Brytanii (1140 mln l), Hiszpanii (941 mln l) oraz Polsce (757 mln l) [AIJN 2016].

Polscy konsumenci najchętniej spożywają soki i nektary o smaku pomarańczowym (24,5%). Na drugim miejscu znajdują się soki i nektary jabłkowe (23,1%), a zaraz za nimi warzywne, w tym marchwiowe (17,1%), wieloowocowe (12,6%) oraz grejpfrutowe (8%) [AIJN 2016].

Trendy na rynku soków owocowych

Dynamiczny rozwój spożycia soków owocowych jest uwarunkowany przede wszystkim zmianą zachowań żywieniowych ludności, ukierunkowanych na zwiększenie spożycia żywności o charakterze prozdrowotnym [Babicz-Zielińska i Zabrocki 2007; Sojkin i in. 2009]. Według badań przeprowadzonych przez KPMG [2016] 65% konsumentów, wybierając soki, nektary i napoje owocowe, kieruje się względami zdrowotnymi. Włodarska i in. [2015] w badaniach nad motywami wyboru żywności przez konsumentów soków, wskazali czynniki w największym stopniu decydujące o wyborze produktów – są to: smak, relacja ceny do jakości oraz wygląd. Badania przeprowadzone przez Balona i in. [2017] także wykazały, że walory sensoryczne, w tym głównie smak, są głównymi determinantami zakupu soków.

Istotny wpływ na konsumpcję owoców, warzyw oraz ich przetworów mają finansowane z Funduszy Unijnych kampanie promujące polską żywność. Po akcesji Polski do Unii Europejskiej Komisja Europejska przyznała łącznie 16,7 mln euro na przeprowadzenie kampanii informacyjnych, takich jak m.in.: „5 porcji warzyw i owoców lub soku” (prowadzona przez Stowarzyszenie Krajowa Unia Producentów Soków KUPS), „Jabłka każdego dnia”, „Europejskie jabłka dwukolorowe”. Ponadto szans w rozwoju polskiego rynku owocowo-warzywnego należy upatrywać w akcjach promocyjno-informacyjnych realizowanych w ramach Programu rozwoju obszarów wiejskich finansowanego przez Agencję Rynku Rolnego oraz w propagacji produktów regionalnych, tradycyjnych, a także ekologicznych [ARR 2014; Zambrzycki 2015].

Trendem obserwowanym od kilku lat na rynku napojów bezalkoholowych jest wzmożona popularność produktów *premium*, do których są zaliczane soki NFC, napoje funkcjonalne oraz soki z dużymi kawałkami owoców, tzw. *smoothies*. Soki NFC to soki bezpośrednio, wyprodukowane w wyniku tłoczenia lub wyciskania surowych owoców lub warzyw [Frącek 2007; Oszmiański 2009; Jaworska i Olczak 2010]. Trend produkcji soków tłoczonych został zainicjowany w Ameryce Północnej, która jest liderem w spożyciu tego typu produktów. W 2014 roku aż 61,1% nowo wprowadzonych soków na świecie trafiło na rynek amerykański, 25,5% na rynki Europy Zachodniej oraz około 6,5% do Azji [Oleksy 2015]. Istotne

zmiany w profilu spożycia w obrębie grupy napojów bezalkoholowych obserwuje się od 2010 roku. Wyraźnie zmniejsza się spożycie soków FC (ponad 20% w całej Europie Zachodniej) na korzyść soków NFC oraz wody mineralnej. W USA oraz Japonii udział soków bezpośrednich w łącznym spożyciu soków wynosi już blisko 80% [Trojanowicz 2015]. W Europie najczęściej soków NFC spożywa się w Irlandii (9,6 l *per capita*), Francji (8,9 l *per capita*) oraz Wielkiej Brytanii (6,8 *per capita*). W Polsce spożycie soków NFC *per capita* szacowane jest na poziomie 0,3 litra (2015 rok), jednak przypuszcza się, że rynek polski z tendencją wzrostową będzie dążył do osiągnięcia przynajmniej średnich poziomów europejskich [KPMG 2016].

W Polsce najczęściej soków NFC produkuje się z jabłek (25% rynku) lub na bazie soku jabłkowego z dodatkiem innych soków owocowych. Produkty te są dostępne w aseptycznych kartonach i opakowaniach typu PET oraz w szklanych butelkach. W swojej ofercie posiadają je wszyscy najwięksi producenci soków owocowych. Liderem jest przedsiębiorstwo Marwit z 34,1% udziałów, wytwarzające soki niepasteryzowane, tzw. jednodniowe, wymagające warunków chłodniczych w trakcie przechowywania. Drugie co do udziałów w rynku są zakłady grupy Maspex, w tym przede wszystkim marka Tymbark z 16,9-procentowym udziałem. Następnie wymieniane są marki własne sieci handlowych (9%), Victoria Cymes (8,1%) oraz Ogrody Natury (7,4%) [Trojanowicz 2015].

Szczególną popularność w ostatnich latach zyskują soki NFC oferowane w opakowaniach typu *bag-in-box* o pojemności 3 i 5 litrów. Ich roczna wielkość produkcji jest szacowana na 45,3 ml litrów i odbywa się w blisko 120 zakładach, będących w posiadaniu osób prywatnych i grup producenckich owoców i warzyw. Ponadto około 50 przedsiębiorstw zlokalizowanych na terenie całego kraju dokonuje usługowego rozlewu soków, zgodnie z formułą $7 + 8 = 5$, oznaczającą, że dostarczając 7 kg surowca przy koszcie 8 zł za usługę tłoczenia, otrzymuje się 5 litrów soku. Rynek soków NFC w Polsce, w przeciwieństwie do rynku soków FC, gdzie większość udziału rynku jest skupiona w rękach trzech przedsiębiorstw, charakteryzuje się wysokim stopniem rozdrobnienia. Niemniej jednak wśród dużych producentów liderem produkcji soków w opakowaniach *bag-in-box* jest firma Bewa Sp. z o.o. oraz działająca od 2014 roku rozlewnia należąca do przedsiębiorstwa Appol Sp. z o.o [Trojanowicz 2015]. Duży stopień rozproszenia rynku wynika przede wszystkim ze zmian legislacyjnych, umożliwiających rolnikom produkcję oraz sprzedaż prostych przetworów owocowo-warzywnych. Nie bez znaczenia dla dynamiki rozwoju produkcji soków NFC pozostaje wsparcie finansowe rolników w ramach Programu rozwoju obszarów wiejskich na lata 2014–2020 skierowane na rozwój małych i średnich przedsiębiorstw, niskie bariery wejścia na rynek spowodowane stosunkowo niskimi kosztami uruchomienia produkcji (około 1,5 mln zł) oraz wzmoczony od kilku lat proces konsolidacji sadowników w grupy producentów

[ARiMR⁴ 2016]. Prognozuje się, że w najbliższych latach w Polsce produkcja soków bezpośrednich będzie wciąż dynamicznie się rozwijać, głównie ze względu na wysoką wartość odżywczą produktów połączoną z systematycznym wzrostem wiedzy żywieniowej społeczeństwa, w tym chęcią spożywania żywności jak najmniej przetworzonej, regionalnej, o wysokich walorach zdrowotnych i organoleptycznych. Istotnym czynnikiem stymulującym produkcję soków NFC jest wprowadzone w 2014 roku przez Federację Rosyjską embarga na polskie produkty żywnościowe, skutkujące nadwyżką owoców. W obliczu takiego problemu proces tłoczenia, postrzegany jako element poprawiający rentowność oraz efektywność, ściśle związany z przechowywalnością surowca, nabiera dużego znaczenia. Ponadto szans rozwoju należy upatrywać we wciąż wysokich cenach detalicznych tych soków, wynikających jedynie z wysokości marży. Przy różnicach w kosztach produkcji równych około 0,50 zł marża producentów soków naturalnych wynosi obecnie 31%, przy tylko 3% dla producentów soków FC [Oleksy 2015]. Polityka głównych sieci handlowych powinna jednak stopniowo wymuszać na producentach zmniejszanie nakładanej marży. Dzięki niższej cenie detalicznej soki NFC mają szansę chociaż w części wyprzeć z rynku soki FC. Ekspertki podkreślają jednak, że znaczne rozdrobnienie rynku ma swoje negatywne konsekwencje. W przyszłości będzie następować systematyczne nasycenie rynku skutkujące obniżaniem się ogólnej liczby przedsiębiorstw. Przypuszcza się także, że wynikająca ze specyfiki produkcji, trudna do utrzymania jakość produktu finalnego będzie jednak w przyszłości popychać konsumentów ku produktom markowym, produkowanym w dużych zakładach, które skutecznie zarządzają reklamą i promocją własnych artykułów. Niemniej jednak tendencja i prognozy rozwoju polskiego rynku soków NFC są korzystne. Szacuje się, że wartość segmentu soków NFC wzrośnie z 26,5 mln euro w 2015 roku do 39,7 mln euro w 2020 roku [Trojanowicz 2015; KPMG 2016].

⁴ Agencja Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa.

2. CZYNNIKI WARUNKUJĄCE ENZYMATYCZNE BRUNATNIENIE ŻYWNOŚCI

2.1. Występowanie i funkcje biologiczne oksydazy polifenolowej

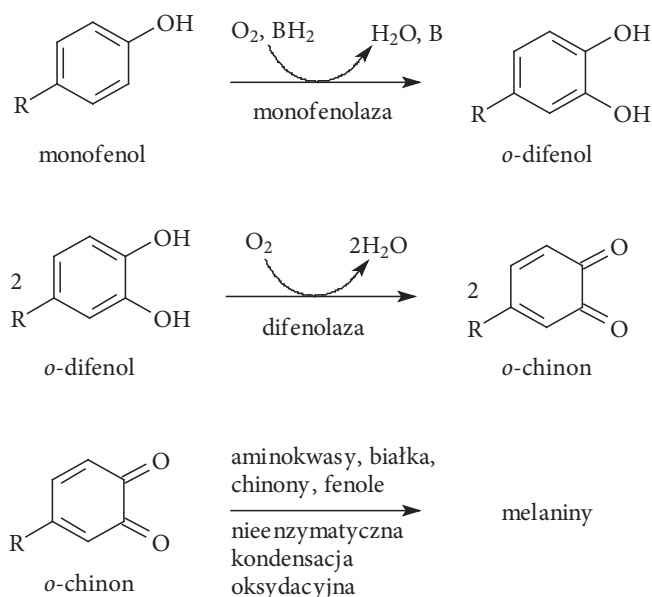
Oksydaza polifenolowa (polifenolooksydaza, PPO), zwana też tyrozinazą, jest szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie endogennym enzymem z grupy oksydoreduktaz, zawierającym w centrum aktywnym jony miedzi. Występuje w różnych mikroorganizmach (grzybach, bakteriach, glonach), owadach, skorupiakach, ssakach i roślinach [Whitaker i Lee 1995; Marshall, Kim i Wei 2000; Mayer 2006; Aniszewski, Lieberei i Gulewicz 2008]. U ssaków, w tym u ludzi, PPO uczestniczy w procesie melanogenezy, czyli w biosyntezie barwników melaninowych decydujących o zabarwieniu skóry, włosów i oczu [Marczyńska i Przybyło 2013]. Obecna w kutikule owadów PPO bierze udział w procesie jej twardnienia, czyli sklerotyzacji [Andersen 2010]. Odgrywa także ważną rolę w mechanizmie obronnym roślin i grzybów przeciw czynnikom chorobotwórczym (patogenom), a w roślinach także przeciw organizmom roślinożernym [Mayer 2006].

Przy zaburzeniach metabolizmu i tzw. przejrzeniu owoców i warzyw, a także podczas ich mechanicznego uszkodzenia, przechowywania oraz przetwarzania, zachodzi brązowienie mięszu pod wpływem polifenolooksydazy. Brązowienie enzymatyczne zachodzące w owocach (jabłka, gruszki, banany), warzywach (ziemniaki, sałata), a także skorupiakach (krewetki, homary) wpływa niekorzystnie na jakość produktów, powodując ich ciemnienie, a także zmiany w teksturze, smakowości i wartości odżywczej [Vámos-Vigyázó 1981; Komthong i in. 2006; Jiang i in. 2004, Nirmal i in. 2015]. Z drugiej strony brązowienie enzymatyczne wywiera pożądany efekt w procesie otrzymywania takich produktów, jak czarna herbata, kawa czy kakao [Stodt i in. 2014; Selamat, Bakar i Nazamid 2002].

2.2. Mechanizm reakcji enzymatycznego brunatnienia

PPO w obecności tlenu powoduje dwa typy reakcji: hydroksylację monofenoli do odpowiednich *o*-difenoli oraz utlenianie *o*-difenoli do *o*-chinonów. Powstałe chinony są bardzo reaktywne i ulegają dalszym przemianom o charakterze nieenzymatycznym. W wyniku oksydatywnej polimeryzacji i kondensacji, w obecności aminokwasów, białek i związków fenolowych, powstają nierozpuszczalne polimery o ciemnym zabarwieniu, nazywane melaninami (rysunek 4) [Matheis i Whitaker 1984; Porębska-Budny i Dworzański 1988; Nicolas i in. 1994; Jimémez-Atiénzar i in. 2004].

PPO, która katalizuje zarówno hydroksylację monofenoli do *o*-difenoli, jak i utlenianie difenoli do *o*-chinonów, występuje pod nazwą krezolaza, monofenolaza lub tyrozynaza (EC 1.14.18.1). Natomiast katecholaza, oksydaza katecholowa lub difenolaza (EC 1.10.3.1) to enzym, który katalizuje tylko oksydację *o*-difenoli (rysunek 4) [Porębska-Budny i Dworzański 1988; Nicolas i in. 1994; Yoruk i Marshall 2003].



Rysunek 4. Schemat reakcji enzymatycznego brunatnienia

Źródło: Na podstawie: [Nicolas i in. 1994]

Wciąż nie jest jasne, czy pojedynczy system enzymatyczny wykazuje aktywność zarówno mono-, jak i difenolooksydazy. Jednak gdy zarówno mono-, jak

i difenolooksydazy są obecne w roślinach, stosunek aktywności monofenolooksydazy do difenolooksydazy wynosi zwykle 1:10 lub nie więcej niż 1:40. Wynika z tego, że aktywność katecholazy (difenolooksydazy) ma większe znaczenie w żywności, co wiąże się również ze znacznie częstszym występowaniem w niej dihydroksyfenoli niż monofenoli [Nicolas i in. 1994; Martinez i Whitaker 1995].

Do grupy enzymów z klasy oksydaz należy także lakaza (oksydaza *p*-difenolowa, *p*-difenolaza EC 1.10.3.2.), występująca głównie w grzybach i niektórych roślinach wyższych [Messerschmidt i Huber 1990]. Z wyjątkiem moreli, brzoskwiń i mango enzym ten nie występuje w owocach i warzywach [Harel, Mayer i Lerner 1970; Dijkstra i Walker 1991; Robinson, Loveys i Chacko 1993]. Lakaza pod względem struktury chemicznej różni się od innych oksydaz fenolowych, zawiera bowiem cztery atomy miedzi w centrum aktywnym. Katalizuje utlenianie zarówno *o*-difenoli, jak i *p*-difenoli [Aniszewski, Lieberei i Gulewicz 2008].

Stopień enzymatycznego brunatnienia zależy od stężenia polifenolooksydazy i substratów (związków fenolowych), a także od pH, temperatury, dostępności tlenu oraz enzymatycznych inhibitorów [Martinez i Whitaker 1995].

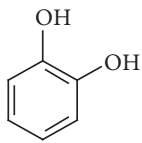
2.2.1. Substraty oksydazy polifenolowej

Polifenolooksydaza jest wysoce specyficzna wobec dwóch typów substratów: krezolazowych (monofenole) oraz katecholazowych (difenole). Wiązanie substratów i właściwa reakcja następuje w specyficznej części cząsteczki enzymu, nazywanej miejscem (centrum) aktywnym.

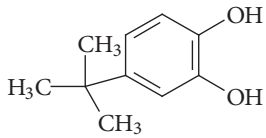
Spośród związków difenolowych najlepszymi substratami dla PPO jest katechol, 4-metylokatechol, 4-tercbutylokatechol, L-DOPA, (+)-katechina i (-)-epikatechina [Labus i Bryjak 2012; Espin i in. 2000; Muñoz-Muñoz i in. 2008b; Selinheimo i in. 2007] (rysunek 5). Związki te są powszechnie stosowane w badaniach modelowych, w testach aktywności PPO. Niektóre z nich są naturalnymi składnikami owoców i warzyw.

Znaczący wpływ na aktywność katalityczną PPO ma natura łańcucha bocznego, liczba grup hydroksylowych i ich pozycja w pierścieniu benzenowym związku fenolowego (substratu) [Espin i in. 2000]. Badania prowadzone przez Muñoz-Muñoz i inni [2008b] wykazały, że (-)-epikatechina w porównaniu z (+)-katechiną jest nieco lepszym substratem PPO ze względu na położenie grupy OH w pierścieniu C w pozycji *cis* względem pierścienia B.

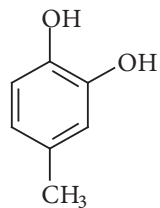
Spośród związków fenolowych o charakterze monofenoli, L-tyrozyna (rysunek 5) jest najważniejszym substratem tyrozynazy (monofenolazy). Enzym ten katalizuje jego dwie pierwsze reakcje: hydroksylację tyrozyny do 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA) i utlenienie DOPA do dopachinonu. Dalsze przemiany mają charakter nieenzymatyczny, w wyniku których tworzą się barwniki melaninowe [Sánchez-Ferrer i in. 1995; Labus i Bryjak 2012; Selinheimo i in. 2007].



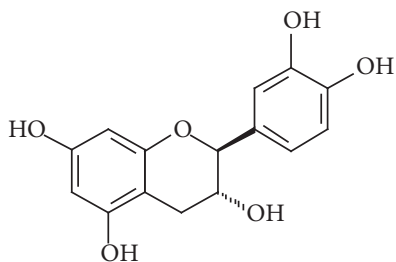
katechol



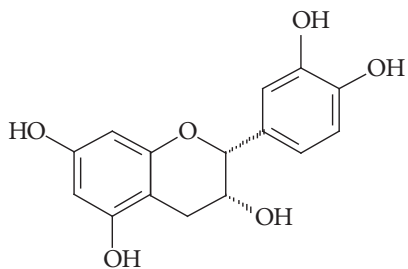
4-tetrybutylokatechol



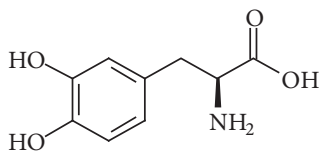
4-metylokatechol



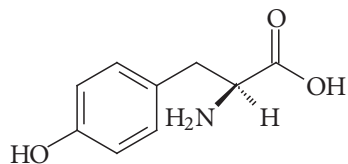
katechina



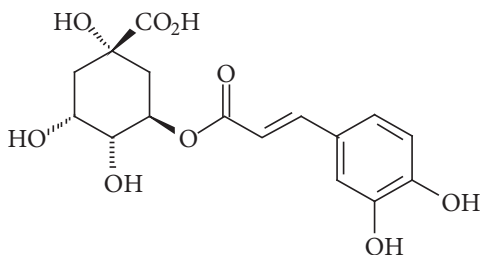
(-)-epikatechina



DOPA



tyrozyna



kwas chlorogenowy

Rysunek 5. Wzory strukturalne wybranych substratów polifenolooksydazy

Oksydaza fenolowa wyizolowana z roślin wykazuje bardzo zróżnicowaną specyficzność substratową w stosunku do difenoli. Dlatego też wyznaczone wartości stałej Michaelisa-Menten (K_m)⁵ i maksymalnej szybkości (V_m) dla PPO pochodzących z różnych roślin są zróżnicowane i zależą od natury chemicznej podstawników w pierścieniu benzenowym [Porębska-Budny i Dworzański 1988]. Z danych literaturowych wynika, że wartości stałej K_m dla substratów fenolowych są bardzo zróżnicowane i zależą nie tylko od struktury związku, ale również od metody wyznaczania wartości K_m [Nicolas i in. 1994]. Szczegółowe zestawienie substratów w owocach, warzywach i owocach morza przedstawił Marshall i współpracownicy w swojej pracy przeglądowej [Marshall, Kim i Wei 2000].

Niektóre substraty dla PPO występują naturalnie w owocach i warzywach. W jabłkach, gruszkach i śliwkach głównym substratem dla PPO jest kwas chlorogenowy oraz (+)-katechina [Oszmiański i Lee 1990; Amiot i in. 1995; Siddiq, Sinha i Cash 1992; Rocha, Cano i Galeazzi 1998; Podsędek i in. 2000; Siddiq i Cash 2000; Carbonaro i Mattera 2001; Gomes i in. 2014]. Kwas chlorogenowy także odpowiada za brązowienie brzoskwiń i nektarynek [Cheng i Crisoto 1995; Carbonaro i Mattera 2001]. Natomiast kwas kawowy i kwas chlorogenowy są najlepszym substratem dla PPO z borówek [Kader i in. 1997]. (+)-Katechina, (-)-epikatechina oraz kwas kawowy są substratami dla PPO z winogron [Macheix, Sapis i Fleurier 1991; Nokthai, Lee i Shank 2010]. Ciemnienie bulw ziemniaka jest wynikiem enzymatycznego procesu utleniania głównie tyrozyny oraz kwasów fenolowych: chlorogenowego i kawowego [Lærke, Christiansen i Veierskov 2002].

Dla PPO wyizolowanej z niektórych owoców najlepszymi substratami są związki fenolowe niebędące składnikami tych owoców [Trejo-Gonzalez i Soto-Valdez 1991; Rocha i Morais 2001]. Obecność potencjalnego substratu nie gwarantuje jego udziału w reakcji fenolazy prowadzącej do enzymatycznego brązowienia [Vámos-Vigyázó 1981].

Udział danego substratu w procesie brązowienia enzymatycznego zależy od jego stężenia i obecności innych substratów występujących w tkance. W jabłkach (+)-katechina, (-)-epikatechina i kwas chlorogenowy zostały określone jako substraty PPO. Oszmiański i Lee [1990] wykazali co najmniej dwukrotnie większą aktywność PPO w reakcji z kwasem chlorogenowym niż z katechinami. Natomiast w mieszaninie katechin z kwasem chlorogenowym szybkość utleniania katechin była większa niż samego związku, a w przypadku kwasu chlorogenowego była mniejsza niż oddzielnie. Oleszek, Lee i Price [1989] badali szybkość utleniania kwasu chlorogenowego, katechin, procyanidyn (B2 i C1) oraz dihydrochalkonów przez PPO. Badania przeprowadzono w układzie modelowym każdego związku

⁵ Stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej wynosi połowę szybkości maksymalnej.

oddzielnie, przy długości fali 420 nm. Spośród badanych związków fenolowych, (+)-katechina i (-)-epikatechina utleniały się najszybciej. Procyjanidyna B2 i C1 ulegały utlenieniu w najmniejszym stopniu, co sugeruje, że związki te nie są dobrymi substratami PPO. Natomiast wykazano, że florydzyzna i ksyloglukozyd floretyny są dobrymi substratami PPO, a w mieszaninie z kwasem chlorogenowym albo z (+)-epikatechiną związki te wykazują działanie synergistyczne. Szybkość utleniania kwasu chlorogenowego przez pierwsze 48 h była porównywalna do obserwowanej dla katechin, a potem osiągnęła stały poziom. Ponadto intensywność barwy powstałych produktów utlenienia kwasu chlorogenowego była 3-krotnie mniejsza niż katechin. Podobne obserwacje odnośnie do intensywności barwy utlenionych substratów poczynił Oszmiański i Lee [1990]. Stwierdzono, że maksimum absorpcji w przypadku utlenionych katechin wynosi około 400 nm, podczas gdy utleniony kwas chlorogenowy przyjmuje żółtawą barwę z maksimum absorpcji na poziomie około 320 nm, czyli niewidzialnym.

Powstające w wyniku utleniania substratów difenolowych *o*-chinony są niezwykle reaktywne i zdolne do utleniania innych związków fenolowych. Przykładowo *o*-chinony kwasu chlorogenowego mogą utleniać katechiny do *o*-chinonów, a same regenerują się do formy pierwotnej związku, czyli kwasu chlorogenowego. Obserwowany w jabłkach i sokach jabłkowych, w warunkach utleniania enzymatycznego, znaczący spadek zawartości flawan-3-oli może być zatem spowodowany bezpośrednim ich utlenianiem przez PPO, a także wspomnianą wyżej oksydacją przez *o*-chinony powstałe z kwasu chlorogenowego [Kuczyński, de Baerdemaeker i Oszmiański 1994; Guyot i in. 2003]. Najmniejsze straty, w porównaniu z katechinami i procyjanidynami, stwierdzono w przypadku dihydrochalkonów, co sugeruje, że związki te nie są bezpośrednim substratem w reakcji sprzęgania z *o*-chinonami i nie biorą ilościowo udziału w tworzeniu produktów utleniania [Guyot i in. 2003].

Związkami fenolowymi, które podobnie jak polimeryczne procyjanidyny nie są bezpośrednio utleniane przez PPO, ale mogą być utleniane przez chinony, są antocyjany. Oksydacyjną degradację antocyjanów obserwowano w owocach oraz sokach z owoców jagodowych, takich jak borówki, truskawki i winogrono [Yokotsuka i Singleton 1997; Kader i in. 1998; Skrede, Wrolstad i Durst 2000].

Z drugiej strony liczne badania wykazują, że niektóre związki polifenolowe, głównie flawonoidy, działają hamująco na aktywność PPO i mogą mieć zastosowanie w technologii żywności przy kontrolowaniu czy zapobieganiu procesowi brązowienia, szczególnie owoców i warzyw minimalnie przetworzonych oraz soków naturalnie mętnych [Kim i in. 2006; Chiabrando i Giacalone 2012]. Polifenolowe inhibitory PPO znalazły także zastosowanie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym jako substancje wybielające stosowane w leczeniu przebarwień skórnych. Ich działanie polega na hamowaniu syntezy melaniny poprzez inhibowanie aktywności PPO [Sato i Toriyama 2009].

2.2.2. Optymalne pH i temperatura aktywności oksydazy polifenolowej

Większość PPO pochodzenia roślinnego wykazuje optimum działania w zakresie pH od 4,0 do 8,0. Przykładowo optymalne pH dla PPO z brzoskwiń, moreli, truskawek i borówek kształtuje się w zakresie od 4,0 do 5,5 [Fraignier i in. 1995; Kader i in. 1997; Dalmadi i in. 2006]. PPO ze śliwek wykazuje optymalne działanie w zakresie pH od 5,8 do 7,0 [Siddiq, Sinha i Cash 1992; Weemaes i in. 1998]. Gomes i in. [2014] określili dla PPO z gruszek optymalne pH w zakresie od 5,0 do 7,0, w zależności od zastosowanego substratu fenolowego. Natomiast PPO z malin wykazuje dwa optymalne pH: jedno w pH 5,5, a drugie w pH 8,0 [González, de Ancos i Cano 1999]. Optymalne pH dla aktywności PPO z jabłek wynosi około 7,0 i 5,0, odpowiednio dla PPO uzyskiwanej z mitochondriów i chloroplastów jabłek [Harel, Mayer i Shain 1965, Stelzig, Akhtar i Ribeiro 1972; Weemaes 1998]. Jednakże polifenolooksydaza z całych jabłek wykazuje pH optymalne w zakresie od 4,0 do 7,5 [Janovitz-Klapp, Richard i Nicolas 1989; Trejo-Gonzalez i Soto-Valdez 1991; Zhou, Smith i Lee 1993; Oktay i in. 1995; Weemaes i in. 1998; Rocha i Morais 2001; Ni Eidhin, Murphy i O'Beirne 2006; Selinheimo i in. 2007; Soysal 2009; Aka i in. 2013; Chen i in. 2014]. Przy pH 2,0 następuje całkowita inaktywacja PPO z jabłek [Zemel i in. 1990].

Optymalna wartość pH dla aktywności PPO pochodzenia roślinnego zależy nie tylko od źródła pochodzenia enzymu, ale także od kilku innych czynników doświadczalnych, takich jak metoda ekstrakcji enzymu, temperatura, rodzaj i stężenie buforu oraz rodzaj i stężenie substratu [Stelzig, Akhtar i Ribeiro 1972; Janovitz-Klapp, Richard i Nicolas 1989; Zhou, Smith i Lee 1993].

Większość PPO roślinnych wykazuje optymalną aktywność w zakresie temperatur od 20 do 40°C, która podobnie jak w przypadku optymalnego pH może się różnie kształtować w zależności od użytego substratu. Optymalna temperatura dla PPO z moreli i bananów wynosi 30°C [Ünal 2007; Demir, Çimen i Çelikezen 2012], z wiśni 40°C [Kumar, Mohan i Murugan 2008], a dla PPO ze śliwek 20°C [Siddiq, Sinha i Cash 1992]. PPO z truskawek jest stabilna w temperaturze 25°C [Dalmadi i in. 2006]. Optymalna temperatura dla PPO z gruszek wynosi 20°C i 40°C, w zależności od odmiany [Siddiq i Cash 2000]. Dla PPO z jabłek wyznaczono optymalną aktywność w temperaturze 18°C [Oktay i in. 1995], 30°C [Zhou, Smith i Lee 1993; Ni Eidhin, Murphy i O'Beirne 2006] oraz 35°C [Trejo-Gonzalez i Soto-Valdez 1991]. Większość oznaczeń aktywności PPO z jabłek przeprowadza się w temperaturze od 25 do 35°C.

Szczegółowe omówienie optymalnego pH i temperatury dla PPO z różnych surowców roślinnych zostało przedstawione w pracach przeglądowych Ioniță [2013], Yoruk i Marshall [2003] oraz Queiroz i in. [2008].

2.2.3. Syntetyczne i naturalne inhibitory enzymatycznego brązowienia

Niekorzystne zmiany zabarwienia owoców i warzyw, zachodzące pod wpływem PPO, obserwowane podczas mechanicznego uszkodzenia, a także podczas przechowywania i procesu technologicznego przetwarzania tych surowców, stanowią poważny problem dla przetwórstwa owocowo-warzywnego. Szacuje się, że proces brązowienia może być odpowiedzialny za prawie 50% wszystkich strat, jakie zachodzą w przetwórstwie owoców i warzyw [Whitaker i Lee 1995, Marshall, Kim i Wei 2000]. Barwa istotnie wpływa na ocenę jakości produktu i może decydować o jego wyborze przez konsumenta. Brązowa barwa owoców, warzyw oraz ich przetworów jest nieakceptowana przez konsumentów, kojarząca się z gorszą jakością produktu [Turk, Vorobiev i Baron 2012; Włodarska i in. 2016]. Stąd też uwaga zarówno środowiska naukowców, jak i producentów żywności jest skierowana na poszukiwanie sposobów zapobiegania lub ograniczania tego zjawiska.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat pojawiło się wiele publikacji z zakresu kontrolowania czy inhibowania aktywności polifenolooksydazy w żywności. Zostały opracowane i zaproponowane różne metody (fizyczne, chemiczne) oraz techniki przetwarzania pozwalające na ograniczanie niepożądanego brązowienia żywności [Queiroz i in. 2008; Buckow, Weiss i Knorr 2009; Turk, Vorobiev i Baron 2012]. Obecnie prowadzi się wiele badań nad zastosowaniem chemicznych związków hamujących proces brązowienia enzymatycznego. Oczekuje się także, że oprócz inhibicji brązowienia związki te będą minimalizować niekorzystne zmiany organoleptyczne i zachowywać cechy świeżego surowca czy produktu. Związki te, zwane inhibitorami, mogą działać bezpośrednio na enzym, substrat (tlen, związek fenolowy) albo produkty reakcji [Marshall, Kim i Wei 2000]. Kategorie i przykłady inhibitorów enzymatycznego brunatnienia przedstawiono w tabeli 3.

W licznych badaniach wykazano, że stosowanie różnych kombinacji związków ograniczających brązowienie enzymatyczne pozwala uzyskać lepszy efekt niż obserwowany dla pojedynczych związków [Chang 2009; Gacche, Zore i Ghore 2003; Íyidoğan i Bayındırlı 2004].

Zastosowanie niektórych inhibitorów procesu brązowienia w przemyśle spożywczym jest ograniczone ze względu na ich ewentualną toksyczność, niską aktywność i wpływ na cechy organoleptyczne żywności oraz koszt [McEvily, Iyengar i Otwell 1992; Yoruk i Marshall 2003]. Przykładowo 4-heksylorezorcynol i cysteina w dużych stężeniach mogą powodować powstawanie niepożądanego zapachu [Richard-Forget i in. 1991; Monsalve-Gonzalez i in. 1993]. Kwas askorbinowy redukuje *o*-chinony do ich pierwotnej postaci, jednak w trakcie procesu może zostać całkowicie utleniony do kwasu dehydroaskorbinowego, przez co, po jego wyczerpaniu, następuje reakcja brązowienia [Ros, Rodriguez-López i Garcia-Cánovas 1993]. Natomiast

Tabela 3. Kategorie i przykłady inhibitorów enzymatycznego brunatnienia

Kategoria	Przykład inhibitora	Literatura
Substancje redukujące <i>o</i> -chinony do pierwotnych związków fenolowych (1) oraz tzw. „zmiatacze” chinonów, które poprzez nieodwracalną reakcję z <i>o</i> -chinonami tworzą stabilne bezbarwne produkty (2)	kwask askorbinowy i jego pochodne (1), siarczyny (1, 2), związki zawierające grupę sulfonową np. L-cysteina, glutation, produkty reakcji Maillarda (1, 2)	Hsu i in. 1988; Ros, Rodríguez-López i García-Cánovas 1993; Friedman i Bautista 1995; Özoğlu i Bayindirli 2002; Gonzalez-Aguilar i in. 2004; Eissa i in. 2006; Mogol, Yoldirim i Gökmen 2010; Oliveira i in. 2011; Kuijpers i in. 2012
Substancje chelatujące – tworzą kompleksy z jonami miedzi enzymu	kwasy polikarboksylowe (kwask cytrynowy, kwask jabłkowy, kwask szczawiowy), polifosforany, EDTA, kwask kojowy, makrocząsteczki (polisacharydy, białka)	Chen i in. 1991; Tochi i in. 2009; Denoya i in. 2012; Du, Dou i Wu 2012
Substancje zakwaszające – niespecyficzne inaktywatory, powodujące denaturację białka enzymowego	kwask cytrynowy, kwask jabłkowy, kwask fosforowy	Chen i in. 2014
Substancje kompleksujące – hamują brązowienie poprzez tworzenie kompleksów z substratami PPO (1); mogą także wykazywać zdolność do koagulacji cząstek stałych powiązanych z procesem brązowienia (2)	cyklodekstryny (1), chitosan (2)	Sapers 1992; Özoğlu i Bayindirli 2002; López-Nicolás i in. 2007; Abd i Niamah 2012
Specyficzne inaktywatory PPO, powodujące tzw. samobójczą inaktywację enzymu. Mechanizm reakcji opiera się na ataku nukleofilowym tlenu pochodzącego z grupy OH substratu w centrum aktywnym PPO	substraty zawierające co najmniej dwie grupy hydroksylowe w pozycjach orto w pierścieniu benzenowym: katechol, 4-metylokatechol, 4-chlorokatechol, pirogalol, hydroksyhydrochinon (HHQ)	Land, Ramsden i Riley 2007; Muñoz-Muñoz i in. 2008a; Muñoz-Muñoz i in. 2010; del Mar García-Molina i in. 2014
Specyficzne inhibitory PPO, które odwracalnie wiążą się z cząsteczką enzymu i hamują jego aktywność	podstawione rezorcynole (4-heksylorezorcynol), aromatyczne kwasky karboksylowe, flawonoidy, stilbeny, kwasky fenolowe, aldehyd benzoesowy i jego pochodne	Jiménez i in. 2001; Nerya i in. 2004; Alvarez-Parilla i in. 2007; Likhitwitayawuid 2008; Sonmez i in. 2011

w przypadku kwasu kojowego jego zastosowanie jest ograniczone możliwościami produkcji na szeroką skalę i wysokim kosztem [McEvily, Iyengar i Otwell 1992]. Siarczyny są bardzo skuteczne w kontrolowaniu brązowienia, jednak ich stosowanie jest ograniczone przepisami prawnymi, z powodu ich negatywnego wpływu na zdrowie. Wiele doniesień dotyczy reakcji alergicznych oraz zaburzeń astmatycznych u ludzi po spożyciu żywności traktowanej siarczynami [Nowak-Węgrzyn i in.

2009; Mattison i in. 2014; Guerrero i Cantos-Villar 2015]. Warunki stosowania siarczynów (E221–228), a także innych substancji dodatkowych w żywności są regulowane obecnie obowiązującym rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności.

Zdarza się, że stosowana w literaturze przedmiotu definicja „inhibitora PPO” może wprowadzać w błąd. Wielu autorów używa tej terminologii w odniesieniu do inhibitorów melanogenezy, których działanie polega głównie na zakłócaniu procesu powstawania melaniny, niezależnie od bezpośredniej interakcji inhibitor/enzym [Rescigno i in. 2002]. Zdaniem Changa [2009] i Rescigno i in. [2002], pojęcie „inhibitor PPO” powinno się odnosić tylko do tych związków, które rzeczywiście wiążą się z enzymem i hamują jego aktywność (tabela 3, kategoria – specyficzne inaktywatory i inhibitory PPO). Wśród tych „prawdziwych” inhibitorów można spotkać podział na chelatory miedzi (konkurencyjne w stosunku do tlenu) i analogi substratów (konkurencyjne wobec fenolowych substratów). Taka klasyfikacja ma jednak charakter tylko orientacyjny, ponieważ wielu inhibitorów nie można przypisać do konkretnej grupy, część z nich wykazuje działanie mieszane [Rescigno i in. 2002].

PPO może być hamowana przez różne związki nieodwracalnie lub odwracalnie. W inhibicji nieodwracalnej inhibitor łączy się z enzymem kowalencyjnie i w ten sposób trwale unieczynnia cząsteczkę enzymu. W przypadku inhibicji odwracalnej usunięcie inhibitora ze środowiska reakcji powoduje odzyskanie przez enzym częściowej aktywności. Podstawą katalitycznej reakcji enzymatycznej zaproponowanej przez Michaelisa i Mentena jest (odwracalne) wzajemne oddziaływanie substratu (S) z enzymem (E), przy którym powstaje nietrwały kompleks (ES), który może z powrotem dysocjować na enzym i substrat lub przekształcać się w produkt (P) i wolny enzym. Aktywność katalityczna enzymu może zostać zmniejszona poprzez przyłączenie się cząsteczek inhibitora. Rysunek 6 przedstawia mechanizm działania inhibitorów odwracalnych. Można wyróżnić cztery rodzaje inhibitorów powodujących inhibicję odwracalną, mianowicie:

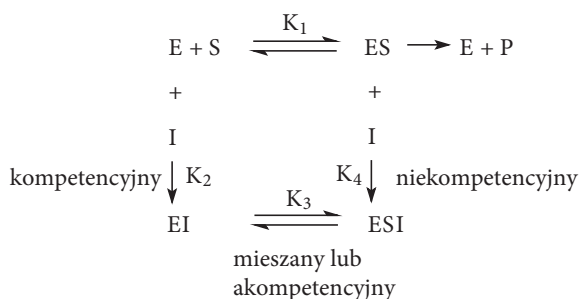
- inhibitor kompetycyjny,
- inhibitor niekompetycyjny,
- mieszany typ inhibitora (kompetycyjny i niekompetycyjny),
- inhibitor akompetycyjny [Chang 2009, 2012; Kączkowski 2012].

Inhibitor kompetycyjny (współzawodniczący, konkurencyjny) to substancja, która wiąże się z enzymem i w ten sposób zapobiega wiązaniu substratu przez cząsteczkę enzymu (E). Inhibitor (I) i substrat (S) współzawodniczą ze sobą o to samo miejsce aktywne enzymu. Taki mechanizm wynika z podobieństwa w strukturze inhibitora i substratu. Inhibitor kompetycyjny może być niemetalizowanym analogiem lub pochodną substratu oraz chelatorem jonów miedzi. Przykładem takiego inhibitora jest kemferol, kwercetyna, 4-heksylrezorcynol, galusan epigallokatechiny (EGCG).

W przeciwieństwie do inhibitora kompetycyjnego **inhibitor niekompetycyjny** nie ma wpływu na wiązanie substratu przez enzym. Inhibitor i substrat są wiązane przez enzym niezależnie, w różnych miejscach, nie konkurują ze sobą. Powstaje nieaktywny kompleks enzymatyczny: enzym-inhibitor-substrat (EIS). Niekompetycyjnie działa na przykład resweratrol, kwas 3,4-dihydroksycynamonowy (kwas kawowy).

Inhibitor mieszany – działając inhibitor kompetycyjny i niekompetycyjny. Przykładem inhibitora typu mieszanego jest kwas kojowy i kwas cynamonowy.

Inhibitor akompetycyjny wiąże się tylko z kompleksem enzym-substrat (ES), tworząc nieaktywny kompleks enzym-substrat-inhibitor (ESI). Ten sposób inhibicji jest rzadko spotykany w układach z jednym substratem (rysunek 6).



E – enzym, S – substrat, P – produkt, I – inhibitor, ES – kompleks enzym-substrat, EI – kompleks enzym-inhibitor, ESI – kompleks enzym-substrat-inhibitor, K_1 - K_4 – stałe szybkości reakcji

Rysunek 6. Schemat działania inhibitorów odwracalnych

Źródło: Na podstawie: [Chang 2009]

Substancje pochodzenia naturalnego wzbudzają w ostatnich latach duże zainteresowanie. Liczne badania wykazały, że niektóre z nich mogą mieć zastosowanie jako efektywne i bezpieczne inhibitory PPO. W tabeli 4 zestawiono wybrane inhibitory PPO pochodzącej z grzyba.

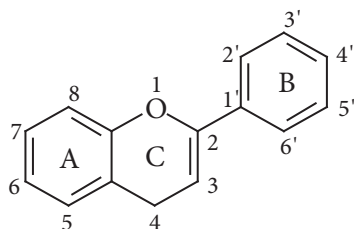
Związki fenolowe to duża grupa związków organicznych będących wtórnymi metabolitami roślinnymi (drugorzędowymi metabolitami przemian zachodzących w organizmach roślinnych). Występują w owocach, warzywach, zbożach, ziołach, przyprawach, kawie, herbacie, a także w liściach i kwiatach, stanowiąc nieodłączny składnik naszej diety [Klimczak, Małecka i Pacholek 2002; Manach i in. 2004; Gliszczyńska-Świątło 2010; Klimczak 2010]. Ze względu na strukturę podstawowego szkieletu węglowego dzieli się je na następujące klasy: kwasy fenolowe, flawonoidy, stilbeny i lignany. Flawonoidy stanowią najliczniejszą grupę roślinnych związków fenolowych, wśród których, ze względu na strukturę, wyróżnia się: flawanole, flawanole, flawony, izoflawony, flawanony, antocyjany i chalkony. Związki te zawierają w cząsteczce układ difenylopropanu (C_6 - C_3 - C_6) o różnym stopniu utlenienia centralnego pierścienia piranowego [Gliszczyńska-Świątło 2010, rysunek 7].

Tabela 4. Wybrane inhibitory PPO z grzyba (tyrozynazy) i ich stężenia powodujące spadek aktywności enzymu o 50%

Inhibitory PPO	Źródło pochodzenia inhibitora	Rodzaj inhibicji	IC ₅₀ [mM]	Źródło
Flawonole				
Kwercetyna (3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroksyflawonol)	arnika meksykańska <i>Heterotheca inuloides</i>	kompetycyjna ^a	0,07	Kubo i in. 2000a; Chen i Kubo 2002
Kemferol (5, 7, 4'-trihydroksyflawonol)	szafiran <i>Croci stigma</i>	kompetycyjna ^a	0,23	Kubo i in. 2000b
Moryna (3, 5, 7, 2', 4'-pentahydroksyflawon)	arnika meksykańska <i>Heterotheca inuloides</i>	kompetycyjna ^a	2,32	Kubo i in. 2000a
Rutyna (3-rutynozyd 3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroksyflawonolu)	czysty związek	kompetycyjna ^a	6,80	Si i in. 2012b
Kwercytryna (3-O-ramnozyd kwercetyny)	oczar <i>Distylium racemosum</i>	nie ustalono ^b	0,084	Ko i in. 2011
Flawan-3-ole				
Galokatechina GC	oczar <i>Distylium racemosum</i>	nie ustalono ^b	0,016	Ko i in. 2011
Galusan epikatechiny ECG (3, 5, 7, 3', 4', 5'-pentahydroksyflawanol)	zielona herbata karob <i>Ceratonia siliqua</i>	kompetycyjna ^b nie ustalono	0,035 0,090	No i in. 1999; Lall i in. 2015
Galusan galokatechiny GCG	zielona herbata <i>Camellia Sinensis</i> karob <i>Ceratonia siliqua</i>	kompetycyjna ^b nie ustalono	0,017 0,062	No i in. 1999; Lall i in. 2015
Galusan epigalokatechiny EGCG (3, 5, 7, 3', 4', 5', 3'', 4'', 5''-nonahydroksyflawanol)	zielona herbata oczar <i>Distylium racemosum</i>	kompetycyjna ^b nie ustalono ^b	0,034 0,066	No i in. 1999; Ko i in. 2011
Flawanony				
Hesperetyna (3', 5, 7-trihydroksy-4'-metoksyflawanon)	czysty związek	kompetycyjna ^a	11,25	Si i in. 2012a
Hesperydyna (7-ramnoglukozyd hesperetyny)	czysty związek	nie ustalono ^a niekompetycyjna ^a	> 5 16,08	Itoh i in. 2009; Zhang i in. 2007
Naryngina (7-neohesperozyd naryngenyiny)	czysty związek	nie ustalono ^a	1,90	Itoh i in. 2009
Narirutyna (7-O-rutynozyd naryngenyiny)	mandarynka <i>Citrus unshiu</i>	nie ustalono ^a	2,00	Itoh i in. 2009

Inhibitory PPO	Źródło pochodzenia inhibitora	Rodzaj inhibicji	IC ₅₀ [mM]	Źródło
Nobiletyna (3, 4', 5, 6, 7, 8-heksametoksyflawon)	skórki cytrusów czyste związki	nie ustalono ^a kompetycyjna ^a	0,046 1,49	Sasaki i Yoshizaki 2002; Zhang i in. 2007
Flawony				
Luteolina (5, 7, 3', 4'-tetrahydroksyflawon)	czyste związki	niekompetycyjna ^a	0,19	Kubo i in. 2000b
7-O-glukozyd luteoliny	czyste związki	niekompetycyjna ^a	0,50	Kubo i in. 2000b
Bajkaleina (5, 6, 7-trihydroksyflawon)	czyste związki	nie ustalono ^a nie ustalono	0,29 0,27	Kubo i in. 2000b; Gao i in. 2007
Izoflawony				
Genistyna (7-O-glukozyd 5, 4'-dihydroksyizoflawon)	fermentowane kielki soi <i>Fermented soygerm</i>	kompetycyjna ^b	0,343	Chang i in. 2007
Daidzeina (7, 4'-dihydroksyizoflawon)	fermentowane kielki soi	kompetycyjna ^b	0,203	Chang i in. 2007
Pochodne chalkonów				
4-hydroksychalkon	czyste związki	kompetycyjna ^b	0,022	Nerya i in. 2004
2', 4', 4-trihydroksychalkon	czyste związki	kompetycyjna ^b	0,008	Nerya i in. 2004
Stilbeny				
Resweratrol (3, 4', 5-trihydroksystilben)	ciemniżąca biała <i>Veratrum album</i>	niekompetycyjna ^a	0,155	Shin i in. 1998
Oksyresweratrol (2, 3', 4, 5'-tetrahydroksystilben)	morwa biała <i>Morus alba</i>	niekompetycyjna ^a kompetycyjna ^a	0,001 0,021	Shin i in. 1998; Shimizu, Kondo i Sakai 2000
Kwas cynamonowy i jego pochodne				
Kwas cynamonowy	czyste związki	niekompetycyjna ^a	2,10	Shi i in. 2005
Kwas 4-hydroksycynamonowy (<i>p</i> -kumarowy)	czyste związki	kompetycyjna ^a	0,50	Shi i in. 2005
Kwas 4-metokscynamonowy	czyste związki	niekompetycyjna ^a	0,42	Shi i in. 2005
Kwas elagowy	czyste związki	nie ustalono ^a	0,225	Özer, Mutlu i Kivçak 2007
Kwas kojowy (5-hydroksy-2-hydroksymetylo-4-piron)	czyste związki	mieszana ^a	0,017 0,058 0,020 0,077 0,037 0,053	Shimizu, Kondo i Sakai 2000; Chang i in. 2007; Itoh i in. 2009; Sasaki i Yoshizaki 2002; Zhang i in. 2007; Khanom, Kayhara, i Tadasa 2000

^a Substrat L-DOPA.^b Substrat L-tyrozyna.

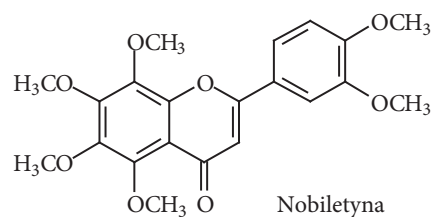
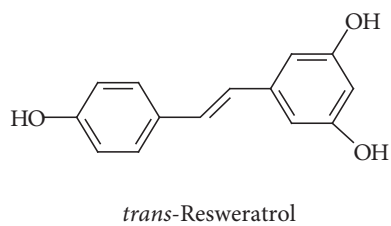
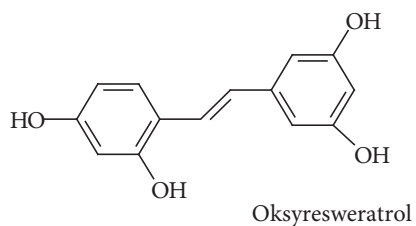
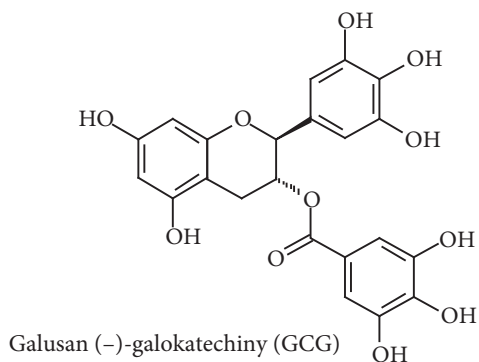
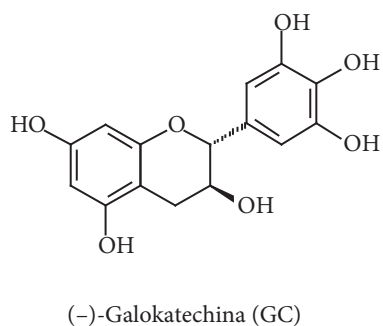
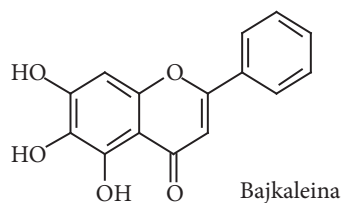
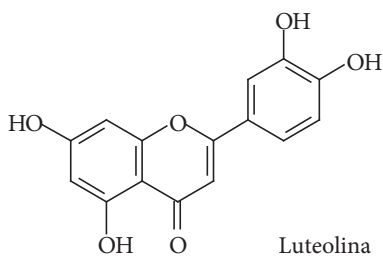
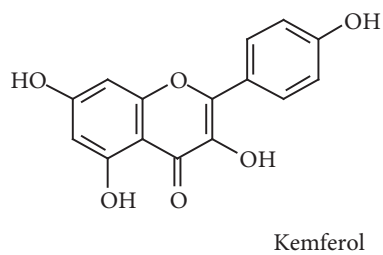
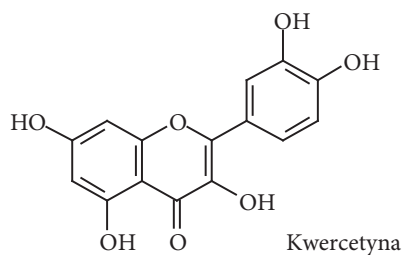


Rysunek 7. Podstawowa struktura flawonoidów

Istnieją badania wskazujące, że niektóre flawonoidy hamują aktywność PPO poprzez chelatowanie miedzi, inne flawonoidy działają jako kofaktory i (lub) substraty w stosunku do tyrozynazy [Kubo i in. 2000b; Xie i in. 2003; Gao i in. 2007].

Przeprowadzono liczne badania mające na celu ustalenie zależności pomiędzy strukturą chemiczną flawonoidów a ich aktywnością inhibicyjną w stosunku do PPO z grzyba (tyrozynazy). Na wysoką aktywność inhibicyjną flawonoidów mają wpływ następujące elementy ich struktury:

- Wolne grupy C3-hydroksy i C4-keto w pierścieniu C, obecne np. w kwercetynie i kemferolu (rysunek 8) [Kubo i in. 2000b; Badria i el Gayyar 2001]. Około 30-krotnie niższa aktywność inhibicyjna moryny w porównaniu z kwercetyną wynika z wpływu podstawników w pierścieniu B. Wiąże się to z obecnością wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy grupami hydroksylowymi w pozycji C-3 i C-2' [Kubo i in. 2000b; Xie i in. 2003]. 3-O-glikozydy kwercetyny (np. rutyna) i kemferolu w mniejszym stopniu hamują aktywność tyrozynazy, co wskazuje na wpływ wolnej grupy hydroksylowej w pierścieniu C na aktywność inhibicyjną flawonoidu [Xie i in. 2003; Si i in. 2012b]. Wykazano jednak, że nie zawsze obecność wolnej grupy hydroksylowej w pierścieniu C jest warunkiem koniecznym inhibicji PPO przez flawonoid. Stwierdzono bowiem, że flawony (luteolina, bajkaleina) również hamują aktywność tyrozynazy, ale nie poprzez chelatowanie jonów miedzi (rysunek 8) [Kubo i in. 2000b].
- Ugrupowanie galusowe w pozycji C-3 obecne w flawan-3-olach. Przykładem związków o wysokiej aktywności inhibicyjnej, porównywalnej z kwasem kojowym, jest galokatechina (GC) i galusan galokatechiny (GCG) (rysunek 8) [Kubo i in. 2000b; Ko i in. 2011].
- Położenie grup hydroksylowych w pierścieniu benzenowym. Wykazano, iż grupy hydroksylowe w pierścieniu A i B biorą udział w hamowaniu aktywności tyrozynazy, natomiast grupy hydroksylowe w pierścieniu C zmniejszają działanie inhibicyjne flawonoidów [Nerya i in. 2004; Kim i in. 2006; Chang i in. 2007].
- Grupa metoksylova w pierścieniu flawonu, obecna np. w nobiletynie (rysunek 8) [Zhang i in. 2007].



Rysunek 8. Struktury wybranych związków fenolowych

Ponadto stwierdzono, że zdolność hamowania aktywności PPO przez stilbeny wynika z obecności w ich cząsteczce ugrupowania rezorcynowego podstawionego w pozycji C-4 [Shin i in. 1998; Shimizu, Kondo i Sakai 2000]. Określona przez Shin i in. [1998] około 150-krotnie wyższa aktywność inhibicyjna oksyresweratrolu w porównaniu z resweratrole wskazuje na znaczenie liczby i położenia grup hydroksylowych w pierścieniu benzenowym (rysunek 8).

W przypadku kwasu galusowego i jego estrów wykazano, iż kwas galusowy i jego krótkołańcuchowe estry alkilowe ($C < 10$) są przez tyrozynazę utleniane, a dopiero długołańcuchowe estry alkilowe ($C > 10$) hamują aktywność enzymu. Świadczy to o tym, że właściwości inhibicyjne zależą od długości łańcucha węglowego. Kwas galusowy może także hamować aktywność tyrozynazy poprzez redukcję dopachinonu ponownie do L-DOPA ($IC_{50} = 4,5$ mM) [Kubo i in. 2000b].

Zdolność do hamowania aktywności PPO przez kwasy fenolowe i ich pochodne zależy od podstawionych grup znajdujących się w pozycji *para* w pierścieniu benzenowym [Lim, Ishiguro i Kubo 1999; Shi i in. 2005]. Shi i in. [2005] wykazali, że obecność grupy hydroksylowej i metyloksylowej (OCH_3) w pozycji *para* sprzyja wiązaniu cząsteczek pochodnych kwasu cynamonowego przez enzym i hamowaniu aktywności enzymu.

Parametr IC_{50} (ang. *inhibition concentration*) jest często stosowany przy porównaniu aktywności inhibitorów PPO. Wyraża on stężenie inhibitora, przy którym następuje 50-procentowy spadek aktywności enzymu. Jednak wykorzystywanie podawanych w literaturze wartości IC_{50} jako wskaźnika aktywności inhibicyjnej związku czy substancji jest problematyczne, gdyż wartości te ściśle zależą od warunków eksperymentu, w tym rodzaju i stężenia substratu, czasu inkubacji oraz pochodzenia i partii handlowej tyrozynazy. Dlatego też w większości badań, w celu normalizacji aktywności hamującej inhibitorów, stosuje się jako związek kontrolny dobrze znany inhibitor tyrozynazy, jakim jest kwas kojowy (5-hydroksy-2-hydroksymetylo-4-piron) [Chang 2009; Lee, Baek i Nam 2016]. Jest on naturalnym związkiem hydrofilowym wytwarzanym przez gatunki rodzaju *Acetobacter*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Związek ten zawiera ugrupowanie 3-hydroksy-4-keto (podobnie jak kwercetyna) i hamuje aktywność tyrozynazy poprzez wiązanie jonów miedzi w miejscu aktywnym enzymu [Burdock, Soni i Carabin 2001; Selinheimo i in. 2007]. Według danych literaturowych wyznaczone wartości IC_{50} kwasu kojowego w obecności substratu L-Dopa kształtują się w zakresie od 0,017 do 0,077 mM, w zależności od warunków eksperymentu (tabela 4) [Shimizu, Kondo i Sakai 2000; Sasaki i Yoshizaki 2002; Chang i in. 2007; Zhang i in. 2007; Itoh i in. 2009].

3. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA PRZEBIEG PROCESU ENZYMATYCZNEGO BRUNATNIENIA MĘTNEGO SOKU JABŁKOWEGO

Jabłka (*Malus Domestica* Borkh. L) są korzystnym pod względem zdrowotnym składnikiem diety. Właściwości prozdrowotne jabłka zawdzięczają głównie obecnym w nich związkom polifenolowym oraz błonnikowi [Boyer i Liu 2004; Gerhauser 2008; Candrawinata i in. 2013]. Głównymi związkami fenolowymi występującymi w jabłkach są:

- a) monomeryczne flawanole: (+)-katechina i (-)-epikatechina oraz polimeryczne procyjanidyny, stanowiące prawie 80% polifenoli jabłek. Wśród nich dominuje (-)-epikatechina i jej dimer procyjanidyna B2;
- b) kwasy hydroksycynamonowe: głównie kwas chlorogenowy, w mniejszych ilościach kwas *p*-kumarylochinowy;
- c) dihydrochalkony: florydzyina i floretyno-ksyloglukozyd;
- d) flawonole: pochodne kwercetyny (galaktozyd, arabinozyd, ramnozyd i ksylozyd) [Oszmiański i Lee 1994; Kosmala i Kołodziejczyk 2006; Wojdyło, Oszmiański i Laskowski 2008; Duda-Chodak i in. 2010; Duda-Chodak, Tarko i Tuszyński 2011; Wojdyło 2011].

Zawartość związków polifenolowych w jabłkach jest zróżnicowana w poszczególnych częściach owocu. Glikozydy kwercetyny występują głównie w skórce owocu [Oszmiański i Lee 1994; Duda-Chodak, Tarko i Tuszyński 2011; Jakobek i Barron 2016]. Wykazano 2-, 3-krotnie wyższą zawartość procyjanidyn w skórce niż w miąższu [Kosmala i Kołodziejczyk 2006; Jakobek i Barron 2016]. Głównym flawonoidem występującym w nasionach jest florydzyina (stanowiąc od 72 do 84% polifenoli). Natomiast kwas chlorogenowy znajduje się głównie w nasionach, w mniejszych ilościach w skórce i miąższu owoców [Duda-Chodak i in. 2010]. Antocyjany, głównie galaktozyd-3-cyjanidyny, zasadniczo występują w skórce, a w innych częściach owocu stanowią mniej niż 1% całkowitej zawartości polifenoli [Award i de Jager 2000; Wojdyło, Oszmiański i Laskowski 2008; Jakobek i Barron 2016].

Na zawartość polifenoli w jabłkach wpływa wiele czynników, takich jak: odmiana, rejon uprawy, termin zbioru oraz warunki przechowywania owoców [Nicolas

i in. 1994; Award i de Jager 2000; Wojdyło, Oszmiański i Laskowski 2008; Duda-Chodak i in. 2010; Duda-Chodak, Tarko i Tuszyński 2011]. Zaobserwowano spadek zawartości kwasu chlorogenowego i (-)-epikatechiny wraz ze stopniem dojrzałości jabłek. Natomiast przechowywanie w chłodni skutkowało zwiększeniem zawartości procyanidyn, (+)-katechiny i (-)-epikatechiny [Duda-Chodak, Tarko i Tuszyński 2011]. Z kolei Award i de Jager [2000] podają, że przechowywanie jabłek w chłodniach typu ULO (ang. *ultra low oxygen*) i w zwykłych chłodniach nie wpływa znacząco na zawartość katechin, florydżyny i kwasu chlorogenowego w skórkach owoców. Badania przeprowadzone przez Wojdyło, Oszmiańskiego i Bielickiego [2010] wskazują, że system uprawy ma także bezpośredni związek z zawartością związków polifenolowych w jabłkach. Owoce odmiany 'Szampion' i 'Topaz' pochodzące z uprawy ekologicznej zawierały odpowiednio o 16 i 30% więcej polifenoli ogółem w porównaniu z jabłkami z uprawy konwencjonalnej. Natomiast owoce ekologiczne odmiany 'Pinova' charakteryzowały się mniejszą zawartością polifenoli w stosunku do owoców z systemu konwencjonalnego.

Proces technologiczny przetwarzania soku jabłkowego wpływa niekorzystnie na zawartość związków polifenolowych. Obserwowane straty polifenoli dotyczą głównie (-)-epikatechiny i jej polimerów (procyanidyn) oraz pochodnych kwercetyny. Najbardziej znaczące różnice w składzie chemicznym w stosunku do surowca obserwuje się przy produkcji klarownego soku jabłkowego. Straty związków polifenolowych w czasie rozdrabniania jabłek, obróbki enzymatycznej miazgi oraz procesu tłoczenia są związane z ich utlenianiem przez PPO. W wytlókach pozostają pochodne kwercetyny znajdujące się w skórkach jabłek, a jest to związane z trudnością ich wydobycia w procesie tłoczenia. Natomiast w procesie klarowania usuwane są cenne procyanidyny, związane z polisacharydami ścian komórkowych, a także pektyny [Van der Sluis i in. 2002; Guyot i in. 2003; Markowski i Płocharski 2006; Oszmiański i Wojdyło 2006; Oszmiański 2007].

Alternatywą soków klarownych są soki naturalnie mętne. Soki te są produkowane z pominięciem obróbki enzymatycznej, klarowania i filtracji. Stanowią, w porównaniu do soków klarownych, bogatsze źródło bioaktywnych polifenoli [Markowski i Płocharski 2006; Oszmiański i in. 2007; Markowski i in. 2015]. Jednak ze względu na brak tych procesów, a szczególnie procesu klarowania usuwającego brunatne produkty utlenienia, miazga i sok powinny być chronione przed utlenieniem na każdym etapie produkcji. Niezwykle ważny jest odpowiedni dobór surowca. Zagadnienie to zostało szerzej opisane w rozdziale 6.2.

Markowski i Płocharski [2006] badali zawartość związków polifenolowych w jabłkach z odmiany 'Jonagold', 'Idared', 'Szampion' i 'Topaz' oraz w otrzymanych z nich sokach klarownych i mętnych. Wykazali wpływ procesu przetwarzania jabłek na zawartość polifenoli w sokach. Soki mętne miały średnio 53% zawartości związków fenolowych obecnych w jabłkach. Natomiast soki klarowne po obróbce miazgi w temperaturze 20 i 50°C zawierały odpowiednio 19 i 40% początkowej ilości

polifenoli obecnych w owocach. Średnia zawartość polifenoli w sokach mętnych wynosiła 462 mg/l, a w sokach klarownych 160 i 341 mg/l, odpowiednio po obróbce miazgi w temp. 20 i 50°C. Soki klarowne po obróbce w 20°C, w porównaniu z sokami mętными, charakteryzowały się mniejszą ilością katechin, kwasów fenolowych i dihydrochalkonów. Depektynizacja miazgi w 50°C wpłynęła na lepszą ekstrakcję dihydrochalkonów z owoców. Zawartość tych związków w sokach klarownych była wyższa niż w sokach mętnych. Wpływ procesu obróbki miazgi na zawartość polifenoli był także przedmiotem badań Van der Sluisa i in. [2002]. Wykazano mniejsze zawartości florydżyny (o 31%), kwasu chlorogenowego (o 44%) i katechin (o 58%) w pulpie jabłkowej poddanej obróbce enzymatycznej w porównaniu z pulpą bez dodatku enzymów pektynolitycznych. Oszmiański i inni [2007] wykazali większą zawartość związków polifenolowych w sokach mętnych z odmiany 'Szampion' i 'Idared' niż w sokach klarownych z tych samych odmian. Największą różnicę w zawartości polifenoli zaobserwowano w przypadku polimerycznych procyanidyn. Mętne soki w porównaniu z sokami klarownymi zawierały 2–5 razy więcej tych związków. Przykładowo zawartość procyanidyn w mętym soku z odmiany 'Szampion' wynosiła 523,8 mg/l, natomiast w soku klarownym tylko 197,5 mg/l.

Związki polifenolowe obecne w sokach jabłkowych odgrywają znaczącą rolę w kształtowaniu cech organoleptycznych tych produktów [Lesschaeve i Noble 2005; Mitek i Gasik 2009]. Za gorzki i cierpki smak soków odpowiedzialne są flawan-3-ole. Wraz ze stopniem ich polimeryzacji wzrasta ich cierpkość, a maleje gorzkość. (-)-Epikatechina jest bardziej gorzka i cierpka niż jej stereoisomer (+)-katechina. Na cierpkość i gorzkość dimerów i trimerów flawan-3-oli ma wpływ położenie i rodzaj jednostek monomerycznych [Lesschaeve i Noble 2005]. Polimeryczne procyanidyny są również odpowiedzialne za powstawanie zmętnień i osadów w sokach poprzez tworzenie kompleksów z białkami i polisacharydami [Renard i in. 2001].

Głównym zadaniem w technologii produkcji mętnego soku jabłkowego jest zapewnienie wysokiej stabilności zmętnienia oraz ochrona barwy przed niekorzystnymi zmianami. Szybkie ciemnienie naturalnie mętnych soków jabłkowych jest związane z utlenieniem zawartych w nich związków fenolowych na drodze reakcji enzymatycznego brązowienia. Reakcjom tym sprzyja brak procesu klarowania, filtracji i obróbki enzymatycznej przy produkcji soków mętnych. Soki tego typu, w porównaniu z sokami klarownymi, są z jednej strony bogatsze w związki polifenolowe i pektyny, co stanowi o ich wyższej wartości żywieniowej, a z drugiej strony są bardziej podatne na brązowienie (niekorzystne zmiany barwy) [Oszmiański i in. 2007; Gasik i Mitek 2012].

Ważnym czynnikiem pozwalającym na zachowanie pożądanego koloru soków, a tym samym ich wysokiej jakości, jest odpowiedni dobór surowca, mianowicie użycie odmian jabłek charakteryzujących się niską podatnością na brunatnienie z racji niskiej aktywności enzymatycznej [Oszmiański 2007]. Kołodziejczyk i in. [2010] badali wpływ odmiany jabłek na szybkość ich brązowienia. Spośród przebadanych 22 odmian, odmiany 'Szampion', 'Rebella', 'Topaz', 'Rewena', 'Enterprise'

i 'Gerlinde' charakteryzowały się najniższą aktywnością PPO. W badaniach prowadzonych przez Jabłońską-Ryś, Gustawa i Latoch [2014] odmiana 'Szampion' również charakteryzowała się najniższą podatnością na reakcje brązowienia. Istotne znaczenie w przebiegu procesu enzymatycznego brunatnienia odgrywa także zawartość substratów PPO w jabłkach. Wykazano intensywniejszy przebieg brunatnienia jabłek i soków przy wysokiej zawartości kwasu chlorogenowego, jako głównego substratu polifenolooksydazy, oraz wysokiej aktywności enzymu. Kwas chlorogenowy, ulegając utlenieniu z udziałem PPO wspomaga utlenianie trudniej utlenianych polifenoli i przyspiesza brązowienie. Zmiana barwy tych produktów jest także zależna od zawartości monomerycznych flawan-3-oli oraz ich proporcji do kwasów hydroksycynamonowych. Przy wyższych stężeniach katechin, w wyniku ich utleniania, obserwowane jest powstawanie intensywniejszej brązowej barwy [Oszmiański i Lee 1990; Amiot i in. 1992; Nicolas i in. 1994; Podśędek i in. 2000; Seliwanowicz i in. 2005]. O współdziałaniu substratów fenolowych oraz innych związków fenolowych obecnych w jabłkach i sokach jabłkowych pisano szerzej w rozdziale 2.2.1.

Kolejnym czynnikiem wpływającym na jakość mętnego soku jabłkowego jest odpowiedni stopień dojrzałości surowca. Jabłka niedojrzałe szybciej ciemnieją niż dojrzałe wskutek większej aktywności PPO [Oszmiański 2007]. Ponadto sok otrzymany z jabłek niedojrzałych charakteryzuje się dużymi wymiarami zawieszonych w nich cząstek, które sedimentują w postaci osadu. Stabilność zmętnienia takiego soku jest niska, co jest związane z obecnością skrobi w owocach. Wskazuje się także na istotną rolę związków fenolowych w powstawaniu zmętnień i osadów w czasie przechowywania soku jabłkowego. Głównymi związkami odpowiedzialnymi za to zjawisko są polimeryczne procyjanidyny, które mają zdolność do asocjacji ze składnikami ścian komórkowych (białkami i polisacharydami). Kwasy hydroksycynamonowe i (-)-epikatechina nie wykazują takich właściwości. Jednak związki te pod wpływem utleniania i ogrzewania kondensują do form typowych garbników, które reagują z białkami. Kompleksy tego typu wypadają z roztworu głównie podczas pasteryzacji soków [Renard i in. 2001; Mitek i Gasik 2009]. Na wzrost stabilności zmętnienia soku może wpływać dodatek kwasu askorbinowego [Teleszko, Kolniak i Oszmiański 2010; Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło 2013]. Teleszko, Kolniak i Oszmiański 2010 [2010] zaobserwowali wzrost stabilności zmętnienia świeżych pasteryzowanych mętnych soków jabłkowych z dodatkiem kwasu askorbinowego w ilości 500 mg/kg jabłek, w porównaniu z sokami bez dodatku tego kwasu. Natomiast po sześciu miesiącach przechowywania soków stwierdzono większy spadek zmętnienia w sokach z dodatkiem kwasu askorbinowego niż w sokach bez tego kwasu. Z drugiej strony, soki z witaminą C były mniej podatne na sedimentację cząstek zawieszonych w serum niż soki bez tego dodatku. W badaniach przeprowadzonych przez Tetik i in. [2013] nie zaobserwowano wpływu dodatku kwasu askorbinowego (500 mg/kg) i stosowania azotu w procesie produkcji soku mętnego

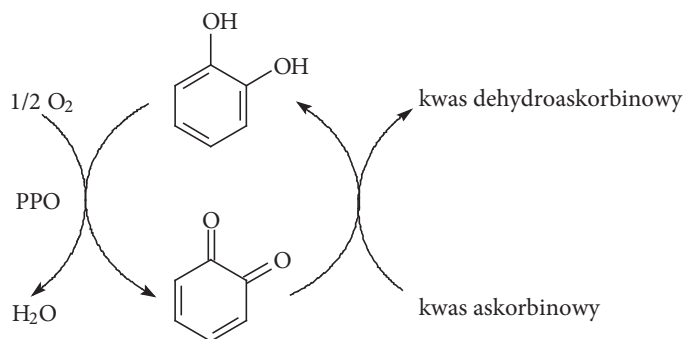
na stabilność zmętnienia soku. Jednak w połączeniu z przechowywaniem w niskiej temperaturze (5°C) uzyskano satysfakcjonujące wyniki. Zastosowane warunki wpłynęły także korzystnie na stabilność barwy soków w czasie ich przechowywania.

Mając na uwadze ochronę związków fenolowych przed utlenieniem przez PPO, zazwyczaj proces produkcji mętnych soków jabłkowych prowadzi się w środowisku gazu obojętnego oraz stosuje się niskie temperatury przechowywania soków. Brunatnienie miazgi i soku można także ograniczyć poprzez krótkotrwałe przetrzymywanie miazgi w zbiorniku buforującym przed tłoczeniem oraz maksymalne skrócenie czasu ekstrakcji soku. Idealnym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie dekanterów zamiast procesu tłoczenia na prasach koszowych czy taśmowych. Urządzenia te są coraz częściej stosowane w przemyśle sokowniczym, a ich wielką zaletą jest możliwość pracy w atmosferze gazu obojętnego oraz krótki czas procesu technologicznego. Często stosuje się także dodatek kwasu askorbinowego do miazgi na etapie rozdrabniania i/lub bezpośrednio do soku przed rozlewem. Jego dawka (200–600 mg/kg jabłek) jest zależna od tendencji jabłek do ciemnienia enzymatycznego. Zbyt duża dawka kwasu askorbinowego może jednak niekorzystnie wpływać na cechy organoleptyczne soku [Oszmiański i Wojdyło 2006; Komthong, Igura i Shimoda 2007; Jarczyk i Płocharski 2010; Gasik i Mitek 2012].

Wiele prac naukowych poświęcono zagadnieniu brązowienia enzymatycznego mętnego soku jabłkowego. Badano wpływ różnych metod obróbki technologicznej na ciemnienie soków [Queiroz i in. 2008]. Wykazano korzystny wpływ nietermicznych metod utrwalania soków z wykorzystaniem wysokich ciśnień hydrostatycznych (*high pressure processing* – HPP), ditlenku węgla pod wysokim ciśnieniem (*high pressure carbon dioxide* – HPCD) oraz pulsującego pola elektrycznego na stabilność barwy soków [Buckow, Weiss i Knorr 2009; Xu i in. 2011; Turk, Vorobiev i Baron 2012]. Testowano także różne związki, zarówno pochodzenia syntetycznego, jak i naturalnego, jako czynniki hamujące ten proces (tabela 5). Spośród nich kwas askorbinowy, 4-heksylorzecynol, cysteina, kwas cynamonowy i kwas fitowy najskuteczniej przeciwdziałają brązowieniu soku jabłkowego [Íyidoğan i Bayındırlı 2004; Tochi i in. 2009; Du, Dou i Wu 2012].

Badania niektórych autorów [Golan-Goldhirsch, Whitaker i Kahn 1984; Senol i in. 2014] wykazały, że KA wykazuje silne działanie hamujące aktywność tyrozynazy, jednak w zapobieganiu reakcji brązowienia żywności jego działanie odpowiada za redukcję *o*-chinonów do ich pierwotnej formy (związki fenolowe) [Nicolas i in. 1994; Tochi i in. 2009; Aka i in. 2013]. Aktywność KA w hamowaniu brunatnienia jest przejściowa, gdyż w trakcie procesu utlenienia się on do kwasu dehydroaskorbinowego. Po wyczerpaniu jego zawartości postępuje reakcja brązowienia enzymatycznego (rysunek 9) [Marshall, Kim i Wei 2000; Özoğlu i Bayındırlı 2002].

Większą stabilnością i efektywnością w hamowaniu PPO charakteryzują się fosforanowe pochodne kwasu askorbinowego [Gacche, Zore i Ghore 2003]. Wykazano także, że kwas askorbinowy w połączeniu z kwasem cytrynowym, cysteiną,



Rysunek 9. Mechanizm zapobiegania brązowieniu enzymatycznemu przez kwas askorbinowy

Źródło: Na podstawie: [Marshall, Kim i Wei 2000]

kwasm cynamonowym, 4-heksylorezorcynolem czy z EDTA wykazuje działanie synergistyczne w hamowaniu aktywności PPO [Özoğlu i Bayindirli 2002; Li i in. 2007; Denoya i in. 2012].

Należy także wspomnieć o innych korzyściach wynikających z wysokiej zawartości kwasu askorbinowego w sokach. Dodatek tego kwasu podczas procesu produkcji mętnego soku jabłkowego wpływa korzystnie na zawartość związków fenolowych, zwiększając ich stabilność w soku [Oszmiański, Sokół-Łętowska i Kuczyński 1994; Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło 2012, 2013]. Obecność kwasu askorbinowego w sokach pozwala także na zachowanie innych obecnych w soku przeciwutleniaczy, przy czym obserwuje się także działanie odwrotne, polegające na ochronnym wpływie obecnych w sokach związków fenolowych wobec witaminy C [Mitek i Kalisz 2003; Klimczak i in. 2007].

Coraz częściej w produkcji żywności rezygnuje się ze syntetycznych dodatków. W związku z regulacjami prawnymi wprowadzonymi w 2008 roku stosowanie syntetycznych związków przeciwutleniających (z wyjątkiem kwasu askorbinowego) w produkcji soków jabłkowych jest zakazane [Rozporządzenie PE i Rady (WE) nr 1333/2008 z 16 grudnia 2008]. Dlatego też zasadne jest szukanie i stosowanie naturalnych substancji do produkcji soków mętnych, zapobiegających niekorzystnym zmianom barwy soków.

W literaturze niewiele jest badań na temat możliwości wykorzystania np. ekstraktów z roślin czy innych soków do przedłużania trwałości mętnych soków jabłkowych w aspekcie ich barwy. Jako potencjalne inhibitory brązowienia soku jabłkowego testowano ekstrakt z miodu, cynamonu, morwy białej, szczawiu kędzierzawego, wybranych warzyw, grzyba ('Bocznik ostrygowaty', 'Enokitake') oraz sok z rabarbaru czy granatu [Oszmiański, Sokół-Łętowska i Kuczyński 1994; Li i in. 2007; Suh, Park i Park 2011; Klimczak i Ćwiklińska 2013; Thada i in. 2013; Eissa i in. 2014]. Wyniki z tych badań zestawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Inhibitory brązowienia mętnego soku jabłkowego

Inhibitor	Wynik/rezultat	Literatura
<ol style="list-style-type: none"> 1. 4-Heksyloresorcyrol: 0,0005–0,01% 2. Oksyresweratrol: 0,0005–0,01% 3. Kwas L-askorbinowy: 0,02% 4. Ekstrakt z gałązek i owoców <i>Morus alba</i> L. (morwa biała): 0,001–0,02% 	<ul style="list-style-type: none"> – 0,01-procentowy oksyresweratrol i 0,01-procentowy ekstrakt <i>Morus alba</i> L. w znaczący sposób wpłynął na hamowanie brązowienia soku jabłkowego z odmiany 'Fuji' w czasie 5 dni przechowywania (4°C). Efekt był porównywalny do działania 0,01-procentowego 4-heksyloresorcyrolu w badanych soku – w sokach z dodatkiem kwasu askorbinowego (0,02%) efektywność działania oksyresweratrolu, ekstraktu <i>Morus alba</i> L. oraz 4-heksyloresorcyrolu zależała od stężenia tych związków w soku – wnioskowanie przeprowadzono na podstawie zmian parametrów barwy (L^*, a^*, b^*, ΔE^*_{ab}) – bromelaina w porównaniu z L-cysteina i kwasem askorbinowym okazała się znacznie mniej efektywna w hamowaniu brązowienia soku jabłkowego z odmiany 'Golden Delicious' (10 h, 25°C) – cysteina w stężeniu 0,7 i 1 mM była najskuteczniejsza (odpowiednio 91 i 100% inhibicji) – kwas askorbinowy wykazywał działanie inhibujące przez pierwsze 5 h przechowywania, a potem jego aktywność spadała 	Li i in. 2007
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bromelaina: 0,175; 0,350 i 0,700 g/l 2. L-cysteina: 0,3; 0,7 i 1,0 mM 3. Kwas askorbinowy: 0,3; 0,7 i 1,0 mM 	<ul style="list-style-type: none"> – L-cysteina, 4-heksyloresorcyrol i kwas kojowy skutecznie hamowały brązowienie soku jabłkowego z odmiany 'Amasya'. Mieszanina tych inhibitorów w kombinacji: 3,96 mM L-cysteiny, 2,78 mM kwasu kojowego i 2,34 mM 4-heksyloresorcyrolu działała najefektywniej (89,2% inhibicji, sok przechowywany 24 h, 25°C) – mieszanina inhibitorów: 0,49 mM kwas askorbinowy, 0,42 mM L-cysteina i 0,05 mM kwas cynamonowy, była najbardziej efektywna w zapobieganiu brązowieniu soku jabłkowego z odmiany 'Golden Delicious' (2 h, 25°C) – kwas askorbinowy (1,8 mM) w porównaniu z kwasem izoaskorbinowym (1,8 mM) był bardziej skuteczny w hamowaniu brunatnienia – nieefektywnym inhibitorem w zakresie zastosowanych stężeń okazała się β-cyklodekstryna 	Tochi i in. 2009
<ol style="list-style-type: none"> 1. L-cysteina 2. 4-heksyloresorcyrol 3. Kwas kojowy 4. Stężenie w soku: 1, 2 i 4 mM 	<ul style="list-style-type: none"> – L-cysteina, 4-heksyloresorcyrol i kwas kojowy skutecznie hamowały brązowienie soku jabłkowego z odmiany 'Amasya'. Mieszanina tych inhibitorów w kombinacji: 3,96 mM L-cysteiny, 2,78 mM kwasu kojowego i 2,34 mM 4-heksyloresorcyrolu działała najefektywniej (89,2% inhibicji, sok przechowywany 24 h, 25°C) 	İyidoğan i Bayındırlı 2004
<ol style="list-style-type: none"> 1. Kwas L-askorbinowy i izoaskorbinowy 2. L-cysteina 3. Kwas cynamonowy 4. Kwas sorbowy 5. Kwas benzoesowy 6. β-cyklodekstryna 7. Stężenie w soku: 0,3; 1 i 1,8 mM 	<ul style="list-style-type: none"> – kwas askorbinowy (1,8 mM) w porównaniu z kwasem izoaskorbinowym (1,8 mM) był bardziej skutecznym w hamowaniu brunatnienia – nieefektywnym inhibitorem w zakresie zastosowanych stężeń okazała się β-cyklodekstryna 	Özoğlu i Bayındırlı 2004
<ol style="list-style-type: none"> 1. Kwas fitowy 2. Kwas askorbinowy 3. Kwas cytrynowy 4. Siarczyn sodu <p>Stężenie w soku: 0,01–50 mM</p>	<ul style="list-style-type: none"> – spośród badanych związków, kwas fitowy (0,1 mM) hamował aktywność PPO z soku jabłkowego w największym stopniu (99,2%) – dodatek kwasu fitowego okazał się także skuteczny w hamowaniu brązowienia soku jabłkowego (6 h, 25°C) 	Du, Dou i Wu 2012

<p>1. β-cyklodekstryna 2. L-askorbinian 2, 3 -fosforu (L-AAATP) Stężenie w soku: 1–5 mM</p>	<p>– β-cyklodekstryna w porównaniu z L-AAATP w większym stopniu hamowała aktywność PPO w soku jabłkowym – zastosowanie mieszaniny obu związków w proporcji 1:1 wpłynęło na zwiększenie efektywności hamowania aktywności PPO w porównaniu z działaniem pojedynczych związków – glutation (inhibitor niekompetycyjny) w porównaniu z kwasem cynanomonowym (inhibitor kompetycyjny) skuteczniej hamował aktywność PPO w soku jabłkowym</p>	<p>Gacche, Zore i Ghore 2003 Gacche, Wārangkar i Ghole 2004</p>
<p>1. Glutation (zredukowana forma) 2. Kwas cynanomonowy Stężenie w soku: 1–5 mM</p>	<p>– ekstrakt z miodu hamował aktywność PPO w soku jabłkowym, jednakże jego efektywność była mniejsza w porównaniu z 4-heksyloresorcynolem i L-cysteina – ester fenetylowy kwasu kawowego okazał się być mniej efektywny. Jego działanie było ograniczone z powodu jego słabej rozpuszczalności</p>	<p>de la Rosa i in. 2011</p>
<p>4. Ester fenetylowy kwasu kawowego (CAPE): 0,7; 1,4; 2,8 g/l</p>	<p>– zarówno ekstrakt z cynamonu zawierający kumarynę, jak i czysta kumaryna hamowała aktywność PPO w soku jabłkowym z odmiany 'Red Delicious'. W porównaniu z próbą kontrolną odnotowano 73-procentowy (sok z ekstraktem z cynamonu) i 77,5-procentowy (sok z kumaryną) spadek aktywności PPO</p>	<p>Thada i in. 2013</p>
<p>1. Ekstrakt z cynamonu: 2–12 μg 2. Kumaryna: 12 μg</p>	<p>– Ekstrakt z nasion <i>Rumex crispus</i> L. (0,3 mg/ml) uzyskany przy użyciu butanolu i octanu etylu efektywnie hamował brązowienie soku (6 h, dostęp światła). Efektywność działania ekstraktów była porównywalna do kwasu askorbinowego (0,3 mg/ml) – Wnioskowanie przeprowadzono na podstawie zmian parametrów barwy (L^*, a^*, b^*, ΔE^*_{ab}) – badane ekstrakty hamowały aktywność PPO w soku oraz brązowienie soku jabłkowego z odmiany 'Red Delicious' (24 h, 25°C) – stopień inhibicji brązowienia zależał od metody otrzymywania ekstraktów (woda, metanol, ultrafiltracja) – 1-procentowy ekstrakt z kabaczka (ultrafiltracja) wykazywał najlepszą efektywność w hamowaniu ciemnienia soku – wnioskowanie przeprowadzono na podstawie zmian parametrów barwy L^*, a^*, b^*, ΔE^*_{ab}, ΔBI oraz ΔA_{420}</p>	<p>Suh, Park i Park 2011 Eissa i in. 2014</p>
<p>1. Ekstrakty z warzyw (ogórek, zielona papryka, kabaczek) 2. Ekstrakt z grzyba ('bocznik ostrzygowaty') Stężenie w soku: 1%</p>	<p>– Ekstrakt z nasion <i>Rumex crispus</i> L. (szczaw kędzierzawy): 0,15; 0,3 i 0,6 mg/ml</p>	

Inhibitor	Wynik/rezultat	Literatura
1. Ekstrakt z grzyba ('Enokitake'): 0,07; 0,13; 0,33; 0,67 g/ml	<ul style="list-style-type: none"> - zarówno acetonowy, jak i wodny ekstrakt z grzyba hamował aktywność tyrozynazy w układzie modelowym - wodny ekstrakt z grzyba w ilości 0,67 g/ml w największym stopniu hamował brązowanie soku jabłkowego z odmiany 'Starking' (6h, 27°C) - wnioskowanie przeprowadzono na podstawie zmian parametrów barwy a^* i b^* 	Jang i in. 2002
1. Sok z rabarbaru: 0,25–3% 2. Kwas L-askorbinowy: 0,5%	<ul style="list-style-type: none"> - sok z rabarbaru (2–3%) dodany do miążgi jabłkowej (odmiany 'Kronselska', 'Antonówka' i 'Golden Delicious') skutecznie chronił obecne w nim związki polifenolowe przed utlenieniem oraz hamował brązowanie soku - sok z rabarbaru (2% – odmiana 'Antonówka' oraz 3% – odmiana 'Kronselska') hamował reakcje brunatnienia w stopniu porównywalnym z 0,5-procentowym dodatkiem kwasu askorbinowego 	Oszmiański, Sokół-Łętowska i Kuczynski 1994
1. Sok z granatu: 25, 35 i 50%	<ul style="list-style-type: none"> - sok z granatu dodany o soku jabłkowego w ilości 25% i 35% hamował brązowanie soku w większym stopniu niż 50-procentowy sok z granatu. Po 48 h przechowywania (4°C) stopień inhibicji brązowania wynosił odpowiednio 79 i 76%, w odniesieniu do soku jabłkowego 	Klimczak i Ćwiklińska 2013

4. CEL BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE

Przyczyną niekorzystnych zmian barwy mętnych soków jabłkowych są głównie procesy enzymatycznego brunatnienia katalizowane przez polifenolooksydazę. W związku z tym, że barwa soku jest ważnym wyróżnikiem jakości wpływającym na decyzje nabywcze konsumentów, celem badań podjętych w ramach niniejszej pracy była ocena wpływu ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych bogatych w przeciwutleniacze, w tym związki polifenolowe, na barwę nieprzechowywanego i przechowywanego mętnego soku jabłkowego.

Na podstawie danych literaturowych i wstępnych badań sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. Związki o właściwościach przeciwutleniających zawarte w ekstraktach roślinnych oraz sokach z owoców cytrusowych hamują aktywność tyrozynazy katalizującej procesy brunatnienia.
2. Bogate w przeciwutleniacze ekstrakty roślinne oraz soki z owoców cytrusowych wpływają na stabilizację barwy mętnego, niepasteryzowanego soku jabłkowego.

Według obecnie obowiązującego prawa, tj. rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 195/2006 z dnia 20 grudnia 2006 roku w sprawie dodawania do żywności witamin i składników mineralnych oraz niektórych innych substancji, oraz rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności (Dz.U. L 354 z 31.12.2008, s. 16 z późn. zm.) w produkcji soku jabłkowego dopuszcza się użycie tylko witamin i składników mineralnych. Zastosowanie innych dodatków niż witaminy i/lub składniki mineralne sprawia, że otrzymany produkt powinno się określać mianem „napój” a nie „sok”.

W ramach niniejszej pracy zaprojektowano eksperymentalne soki jabłkowe z dodatkiem ekstraktów roślinnych, które w myśl obowiązujących przepisów należy traktować jako napoje. Celem ułatwienia dyskusji otrzymanych wyników z analizy tych produktów pozostawiono nazwę „sok”. Podobne rozwiązania są stosowane w wielu pracach na temat właściwości soków, do których wprowadza się dodatki inne niż wskazane w rozporządzeniu.

Weryfikacja hipotez wymagała wykonania następujących zadań badawczych:

1. Charakterystyka handlowych ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych pod względem aktywności inhibicyjnej wobec handlowej tyrozynazy z grzyba (*Agaricus bisporus*) oraz zawartości związków fenolowych ogółem.
2. Identyfikacja i określenie zawartości związków polifenolowych oraz witaminy C w wybranych ekstraktach roślinnych i sokach z owoców cytrusowych.
3. Ocena wpływu wybranych odmian jabłek oraz dodatku kwasu askorbinowego na brunatnienie mętnego soku jabłkowego.
4. Charakterystyka mętnego soku jabłkowego pod względem zawartości związków polifenolowych, witaminy C oraz aktywności polifenolooksydazy w soku (PPO).
5. Określenie wpływu dodatku ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych na aktywność PPO w soku oraz barwę nieprzechowywanego mętnego soku jabłkowego.
6. Ocena wpływu warunków przechowywania (24 i 48 h, 4°C) na aktywność PPO w soku oraz barwę otrzymanych soków.
7. Ocena pożądalności barwy nieprzechowywanych i przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych.

5. BADANY MATERIAŁ, ZAKRES BADAŃ I METODY BADAŃ

5.1. Badany materiał

W badaniach wykorzystano:

1. Ekstrakty roślinne, rozpuszczalne w wodzie, zakupione w sklepie internetowym lub u producenta dodatków do żywności:
 - acerola (*Malpighia gabra* L.), EAc, sklep internetowy Natura dla piękna,
 - borówka (*Vaccinium* L.), EB, sklep internetowy Natura dla piękna,
 - papaja (*Carica papaya* L.), EP, sklep internetowy Natura dla piękna,
 - zielona kawa (*Coffea canephora*), EK, sklep internetowy Natura dla piękna,
 - ananas (*Ananas P. Miller*), EAn, sklep internetowy Natura dla piękna,
 - skórki winogron (*Vitis vinifera*L.), EW, sklep internetowy Natura dla piękna,
 - guarana (*Paullinia cupana* Kunth), EG, sklep internetowy Natura dla piękna,
 - acai (*Euterpe oleracea* Mart), EA, sklep internetowy Natura dla piękna,
 - ostrokrzew paragwajski (*Ilex paraguariensis* L.), EOP, producent C.E. Roeper, GmbH, Hamburg, Niemcy,
 - rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides* L.), ER, producent C.E. Roeper, GmbH, Hamburg, Niemcy, standaryzowany na flawonoidy (10%),
 - pestki winogron (*Vitis vinifera* L.), EPW, producent Martin Bauer Group, Niemcy,
 - zielona herbata (*Camellia sinensis* L.), EH5, producent C.E. Roeper, GmbH, Hamburg, Niemcy, standaryzowany na polifenole (10%).

Wszystkie zakupione w internecie ekstrakty posiadały świadectwo kontroli jakości produktu wydane dla NVC "NATURVITCHEM" Dorota Lebidzińska.
2. Ekstrakty z zielonej herbaty, oznaczone symbolem EH1-EH4 otrzymano w warunkach laboratoryjnych [Klimczak i Gliszczyńska-Świągło 2017], zgodnie z normą PN-ISO 3103:1996.
3. Świeże niepasteryzowane soki z owoców cytrusowych: pomarańczy (SP), mandarynek (SM) i czerwonego grejpfruta (SG). Soki zakupiono bezpośrednio u producenta soków Victoria Cymes Sp. z o.o.

4. Mętne, niepasteryzowane soki jabłkowe z odmiany ‘Szampion’, ‘Ligol’, ‘Golden Delicious’ oraz sok będący mieszaniną jabłek z odmiany ‘Szampion i ‘Idared’ (80:20), otrzymane w skali laboratoryjnej. Jabłka zakupiono w Rolniczo-Sadowniczym Gospodarstwie Doświadczalnym Przybroda Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

5.2. Zakres badań

Podjęte w ramach niniejszej pracy badania eksperymentalne przebiegały trój etapowo. Schemat eksperymentu wraz z zakresem wykonywanych badań przedstawiono na rysunku 10.

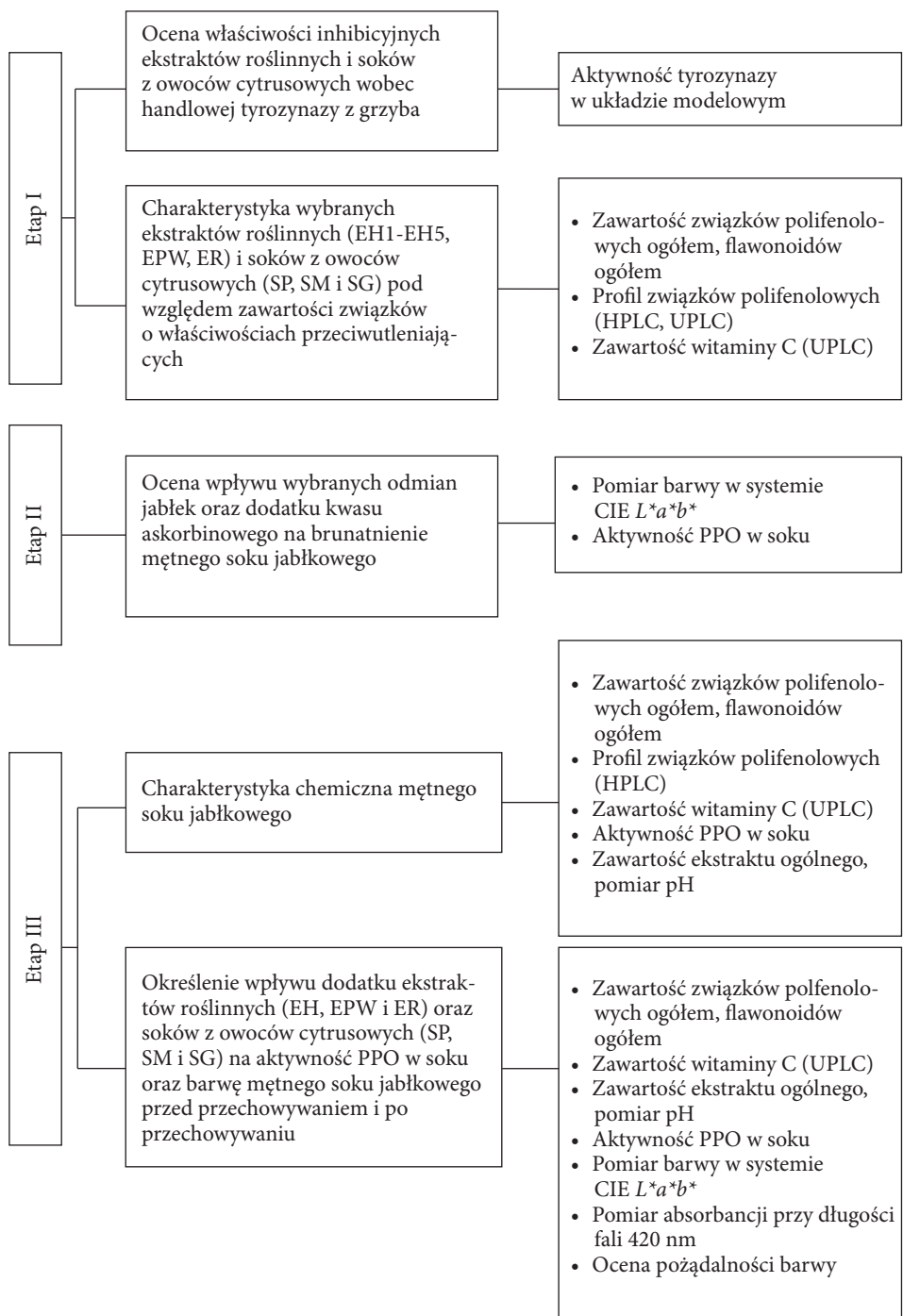
Etap I. Wpływ naturalnych przeciwutleniaczy na aktywność oksydazy polifenolowej

Realizacja pierwszego etapu pracy miała na celu:

- określenie właściwości inhibicyjnych ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych wobec handlowej tyrozynazy pochodzącej z grzyba (*Agaricus bisporus*);
- scharakteryzowanie wybranych ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych pod względem zawartości związków o właściwościach przeciwutleniających.

W celu określenia wpływu ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych na aktywność handlowej tyrozynazy (EC 1.14.18.1) zaplanowano doświadczenie w układach modelowych. Przebadano 16 ekstraktów roślinnych i 3 soki z owoców cytrusowych. Określono stężenia ekstraktów oraz soków, przy których następował 50-procentowy spadek aktywności tyrozynazy (IC_{50}). Wartość IC_{50} oszacowano przez wyznaczenie względnej aktywności enzymatycznej (WA_E) przy różnych stężeniach inhibitora. Dla ekstraktów roślinnych stężenia te wynosiły: 0,01; 0,02; 0,05; 0,75 i 0,1% wag./obj., natomiast w przypadku soków cytrusowych: 1, 2, 5, 7,5 i 10% wag./obj. Zbadano także aktywność inhibicyjną wzorcowych inhibitorów tyrozynazy, tj. kwasu askorbinowego (KA) i kwasu kojowego (KK). Ponadto w badanych ekstraktach i sokach cytrusowych oznaczono ogólną zawartość związków polifenolowych metodą Folina-Ciocalteu.

W wybranych ekstraktach roślinnych (EH1-EH5, EPW, ER) o najwyższej aktywności inhibicyjnej względem tyrozynazy oraz w sokach cytrusowych określono zawartość związków polifenolowych metodą wysokosprawnej i ultrasprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, UPLC), zawartość flawonoidów ogółem metodą spektrofotometryczną oraz zawartość witaminy C metodą UPLC. Ekstrakty te i soki cytrusowe wykorzystano do realizacji III etapu pracy.



Rysunek 10. Schemat przeprowadzonych badań

Etap II. Wpływ odmiany jabłek oraz dodatku kwasu askorbinowego na brunatnienie mętne soku jabłkowego

W doświadczeniu tym wykorzystano jabłka z odmiany ‘Szampion’, ‘Ligoł’, ‘Idared’, ‘Golden Delicious’, z których przygotowano w warunkach laboratoryjnych soki naturalnie mętne. Soki przygotowano w dwóch wariantach: bez dodatku i z dodatkiem kwasu askorbinowego (0,05, 0,18 i 0,32 g/l). Badaniami objęto soki nieprzechowywane i przechowywane przez 24 i 48 h w 4°C. Owoce zostały umyte, pokrojone na ćwiartki i usunięto z nich gniazda nasienne. Następnie wyciśnięto z nich sok w sokowirówce Easy Fruit 5813 firmy Moulinex. Otrzymany sok rozlano do butelek szklanych (250 ml) i dodano odpowiednią ilość kwasu askorbinowego (KA). Tak przygotowane produkty analizowano bezpośrednio po otrzymaniu oraz po przechowywaniu w temperaturze 4°C przez 24 i 48 h. Doświadczenie przeprowadzono w dwukrotnym powtórzeniu.

Wykonano pomiar barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$ badanych nieprzechowywanych i przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem i bez dodatku KA. Oznaczono aktywność PPO w sokach przed przechowywaniem. Na podstawie uzyskanych wyników badań wytypowano odmianę ‘Golden Delicious’ do dalszych badań.

Etap III. Wpływ dodatku ekstraktów roślinnych oraz soków z owoców cytrusowych na barwę mętne soku jabłkowego

Trzeci etap pracy obejmował trzy zadania badawcze:

- charakterystykę mętne soku jabłkowego pod względem zawartości związków polifenolowych, witaminy C oraz aktywności PPO w soku;
- określenie wpływu dodatku ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych na aktywność PPO w soku oraz barwę nieprzechowywanego i przechowywanego mętne soku jabłkowego;
- ocenę pożądalności barwy nieprzechowywanych i przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów roślinnych, soków mieszanych i soków z owoców cytrusowych.

Badania prowadzono w latach 2013–2014. Materiałem badanym był mętne sok jabłkowy z odmiany ‘Golden Delicious’, który przygotowano w sposób opisany powyżej (etap II), w wariantach bez i z dodatkiem wybranych ekstraktów roślinnych. Dodatek ekstraktów z herbat (EH1-EH5) oraz ekstraktu z pestek winogron (EPW) do soku jabłkowego wynosił 1, 2 i 3 g/l, natomiast ekstraktu z rokitnika (ER) 2, 3 i 5 g/l. Przygotowano także soki mieszane poprzez dodanie do 4 lub 3 części objętościowych soku jabłkowego odpowiednio 1 lub 2 części objętościowych soku z owoców cytrusowych (SP, SM i SG). Soki mieszane oznaczono: jabłkowo-pomarańczowy: SJ2+20%SP lub SJ2+40%SP, jabłkowo-mandarynkowy: SJ2+20%SM lub SJ2+40%SM, jabłkowo-grejpfrutowy: SJ2+20%SG lub SJ2+40%SG. Tak przygotowane próbki soków jabłkowych bez dodatku i z dodatkiem badanych ekstraktów roślinnych,

soki mieszane oraz soki z owoców cytrusowych poddano analizie (rysunek 10). Pozostałe próbki soków przechowywano przez 24 i 48 h w 4°C. W celu określenia stopnia brązowienia badanych soków jabłkowych podczas przechowywania i wpływu zastosowanych inhibitorów na zmiany brązowienia soków wyznaczono różnicę: ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔBI , ΔYI oraz zmianę absorbancji przy długości fali 420 nm (ΔA_{420}).

Dokonano także oceny pożądalności barwy badanych próbek soków z wykorzystaniem 9-stopniowej skali hedonicznej.

Doświadczenia przeprowadzono w dwukrotnym powtórzeniu.

5.3. Metody badań

1. Zawartość ekstraktu ogólnego z wykorzystaniem refraktometru Abbego [PN-EN 12143:2000].
2. Pomiar pH z wykorzystaniem pehametru S220 SevenCompact™ firmy Mettler Toledo.
3. Aktywność tyrozynazy w układzie modelowym według Zocca, Lomolino i Lante [2011].
4. Aktywność polifenolooksydazy (PPO) w soku według de la Rosa i in. [2011].
5. Zawartość związków polifenolowych ogółem metodą spektrofotometryczną z odczynnikami Folina-Ciocalteu według Singleton i Rossi [1965]. Wynik wyrażono w mg kwasu galusowego na 1 g ekstraktu lub 1 l soku.
6. Zawartość flawonoidów ogółem metodą spektrofotometryczną według Karadeniz i in. [2005]. Wynik wyrażono w mg katechiny na 1 g ekstraktu lub 1 l soku.
7. Zawartość witaminy C metodą UPLC według Klimczak i Gliszczyńska-Świąło [2015]. Wynik podano w mg/l soku.
8. Analiza profilu związków polifenolowych w ekstraktach roślinnych metodą HPLC według Enko i Gliszczyńska-Świąło [2015]. Wyniki podano w mg/g ekstraktu.
9. Analiza profilu związków polifenolowych w sokach jabłkowych metodą UPLC. Analiza jakościowo-ilościowa związków fenolowych w sokach jabłkowych została wykonana za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Acquity™ (Waters, MA, USA). Do rozdzielania wykorzystano kolumnę Kinetex™ XB-C18 (100 × 2,1 mm; 1,7 μm) firmy Phenomenex (Torrence, USA). Fazę ruchomą stanowiły rozpuszczalniki: acetonitryl [A] oraz 0,1-procentowy kwas trifluoroctowy [B]. Rozdział miał charakter gradientowy i przebiegał według następującego programu: liniowo od 5% do 15% [A] w ciągu 5 minut, izokratycznie 15% [A] do 7 minuty, liniowo do 25% [A] w ciągu następnych 8 minut, następnie liniowo do 80% [A] w ciągu 1 minuty, izokratycznie 80% [A] do 17 minuty, powrót na warunków początkowych w ciągu następnej 1 minuty. Prędkość przepływu wynosiła 0,3 ml/min. Detekcję katechin i dihydrochalkonów

proawodono przy $\lambda = 280$ nm, kwasów hydroksycynamonowych przy $\lambda = 320$ nm, natomiast flawonoli przy $\lambda = 360$ nm. Identyfikacji związków fenolowych dokonano przez porównanie czasów retencji pików rozdzielonych związków i ich widm UV z czasami retencji i widmami UV dostępnych substancji wzorcowych. Stężenie zidentyfikowanych związków oznaczono metodą kalibracji bezwzględnej. Stężenie związków, dla których wzorce nie są dostępne, tj. floretyno-2-ksyloglukozydu i kwasu *p*-kumaryochinowego, oznaczono w przeliczeniu odpowiednio na florydzynę i kwas *p*-kumarowy. Wyniki podano w mg/l soku.

10. Analiza profilu związków polifenolowych w sokach cytrusowych metodą UPLC. Analizę przeprowadzono zgodnie z warunkami opisanymi przy analizie związków fenolowych w sokach jabłkowych. Detekcję kwasów hydroksycynamonowych prowadzono przy $\lambda = 320$ nm, natomiast flawanonów przy $\lambda = 280$ nm. Wyniki podano w mg/l soku.

11. Pomiar barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$ wykonano przy użyciu aparatu CM-5 (Konica Minolta) wykonano na Wydziale Chemii w Pracowni Fotochemii Stosowanej na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pomiaru dokonano w świetle przechodzącym, dla obserwatora 2° z iluminantem D65. Próbkę umieszczono w szklanych kuwetach CM-A98 o długości drogi optycznej 10 mm. Pomiar wykonano w trzech powtórzeniach dla każdego soku.

Oznaczenie parametrów:

L^* – jasność w skali od 0 (ciało idealnie czarne) do 100 (ciało idealnie białe),

a^* – barwa od zielonej ($-a^*$) do czerwonej (a^*),

b^* – barwa od niebieskiej ($-b^*$) do żółtej (b^*).

Na podstawie parametrów L^*, a^*, b^* wyznaczono:

a) całkowitą różnicę barwy ΔE^*_{ab} :

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5},$$

gdzie $\Delta L^*, \Delta b^*, \Delta a^*$ – różnica pomiędzy wartością dla soku przechowywanego a wartością dla soku nieprzechowywanego;

b) indeks brązowienia BI [Buera, Lozano i Petriella 1985]:

$$BI = \frac{100(x - 0,31)}{0,172},$$

$$\text{gdzie } x = \frac{a + 1,75L^*}{5,64L^* + a - 3,012b^*};$$

c) indeks zażółcenia YI [Francis i Clydesdale 1975]

$$YI = 142,86 b^*/L^*.$$

12. Pomiar absorbancji przy długości fali 420 nm według Özoğlu i Bayindirli [2002].

13. Ocena pożądalności barwy.

Badania zostały przeprowadzone przez członków 7-osobowego zespołu oceniającego, przeszkolonego i monitorowanego zgodnie z wymaganiami norm [PN-EN ISO 8586-1:1996; PN-EN ISO 8586: 2014-03].

Ocenę pożądalności barwy badanych próbek soków przeprowadzono przy użyciu 9-stopniowej skali hedonicznej, gdzie 9 oznaczało barwę wyjątkowo pożądaną, a 1 – wyjątkowo niepożądaną. Próbkę soków prezentowano w 100 ml butelkach szklanych z nienaoliwionymi szlifowanymi korkami. Podczas jednej sesji oceniano barwę 4 próbek soków prezentowanych zgodnie z układem kompletnie zrandomizowanym. Jedną próbką był zawsze sok jabłkowy, a 3 pozostałe próbki to soki z dodatkiem tych samych ekstraktów roślinnych (1, 2 i 3 g/l) lub 2 próbki soków z dodatkiem tego samego soku z owoców cytrusowych (20 i 40%) i sok cytrusowy. Oceniono pożądalność barwy soków przed i po przechowywaniu przez 24 i 48 h w 4°C.

5.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu Statistica 12.0 (StatSoft Polska).

W celu porównania wartości średnich przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA). Dla zweryfikowania istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano testy post-hoc Tukeya HSD oraz Dunnetta (z wydzieloną grupą kontrolną). Jako krytyczny poziom istotności przyjęto $\alpha = 0,05$. Prezentowane wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech powtórzeń dla dwóch niezależnych próbek ($n = 3 \times 2$).

Określono zależność pomiędzy stopniem brązowienia a aktywnością PPO oraz badanymi parametrami (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI , ΔA_{420}) soków z dodatkiem EH5, EPW, ER i soków z owoców cytrusowych (SP, SM i SG), przechowywanych przez 24 i 48 h. Do określenia stopnia wzajemnych powiązań pomiędzy badanymi parametrami obliczono współczynnik korelacji r Pearsona.

W celu zbadania podobieństwa pomiędzy przechowywanymi sokami jabłkowymi bez dodatków i z dodatkami ekstraktów lub soków z owoców cytrusowych i wyodrębnienia grup soków charakteryzujących się podobnymi zmianami parametrów barwy ($L^*a^*b^*$), stopnia brązowienia (BI , ΔE_{ab}^* , A_{420}) i zażółcenia (YI) oraz aktywności PPO w sokach zastosowano analizę skupień AHC (ang. *agglomerative hierarchical clustering*). W metodzie aglomeracji przy formowaniu skupień wykorzystywano odległość Euklidesową i metodę łączenia minimalnej wariancji Warda. Aby ujednoczyć wnioskowanie statystyczne i określić siłę wpływu różnych zmiennych wyrażonych w różnych jednostkach pomiaru, przeprowadzono standaryzację zmiennych. W celu porównania wartości średnich przeprowadzono analizę wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Jako krytyczny poziom istotności przyjęto $\alpha = 0,05$.

6. WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH I Dyskusja

6.1. Wpływ naturalnych przeciwutleniaczy na aktywność oksydazy polifenolowej – badania modelowe

6.1.1. Wpływ ekstraktów roślinnych na aktywność oksydazy polifenolowej

Liczne badania wykazały, że ekstrakty roślinne wykazują zdolność hamowania aktywności PPO [Kim i Uyama 2005; Özer, Mutlu i Kivçak 2007; Chen i in. 2009; Jo i in. 2012b; Loizzo, Tundis i Menichini 2012; Kuijpers i in. 2014; Zamani, Gazali i Batubara 2015]. Z punktu widzenia zdrowotnego i żywieniowego naturalne ekstrakty roślinne, zawierające substancje biologicznie czynne, są bezpieczniejszą alternatywą dla syntetycznych dodatków. Ponadto dodatki pochodzenia naturalnego są bardziej akceptowalne przez konsumentów niż syntetyczne [Carocho, Morales i Ferreira 2015]. Dlatego też wciąż istnieje potrzeba poszukiwania inhibitorów tyrozynazy z naturalnych źródeł, takich jak rośliny.

W tabeli 6 przedstawiono wyniki badań własnych nad wpływem wybranych ekstraktów roślinnych na aktywność handlowej tyrozynazy z grzyba (*Agaricus bisporus*). Badania przeprowadzono w układach modelowych, stosując katechol jako substrat [Zocca, Lomolino i Lante 2011]. Określono stężenia ekstraktów, przy których następował 50-procentowy spadek aktywności tyrozynazy (IC_{50}). Wartość IC_{50} oszacowano przez wyznaczenie względnej aktywności enzymatycznej (WA_E) przy różnych stężeniach inhibitora (0,01; 0,02; 0,05; 0,75 i 0,1% wag./obj.). Zbadano także aktywność inhibicyjną wzorcowych inhibitorów tyrozynazy, tj. kwasu askorbinowego (KA) i kwasu kojowego (KK). Wstępnie przebadano 16 wodnych ekstraktów roślinnych (tabela 6).

W zastosowanych warunkach doświadczenia ekstrakty z aceroli, borówki, papai i zielonej kawy nie hamowały działania tyrozynazy. Ponadto badane ekstrakty charakteryzowały się niską zawartością związków polifenolowych ogółem, oznaczoną metodą Folina-Ciocalteu. Zawartość polifenoli ogółem w ekstrakcie z aceroli, borówki, papai i zielonej kawy wynosiła odpowiednio 34, 11, 3 i 29 mg/g ekstraktu (tabela 6).

Tabela 6. Hamowanie aktywności tyrozynazy przez ekstrakty roślinne w układach modelowych oraz zawartość polifenoli w ekstraktach

Nazwa	Źródło pochodzenia	IC ₅₀ [g/l] [mg/l] ¹	Związki polifenolowe ogółem [mg kwasu galusowego/g ekstraktu]
Acerola (EAc)	<i>Malpighia gabra</i> L.	brak aktywności	34,1 ± 1,3
Borówka (EB)	<i>Vaccinium</i> L.	brak aktywności	11 ± 0
Papaja (EP)	<i>Carica papaya</i> L.	brak aktywności	3 ± 0
Zielona kawa (EK)	<i>Coffea canephora</i>	brak aktywności	29 ± 1
Ananas (EAn)	<i>Ananas</i> P. Miller	inhibicja ok. 15%, brak zależności od stężenia	2 ± 0
Skórki winogron (EW)	<i>Vitis vinifera</i> L.	inhibicja ok. 45%, brak zależności od stężenia	246 ± 12
Guarana (EG)	<i>Paullinia cupana</i> Kunth	3,91±0,12 ^a	25 ± 1
Acai (EA)	<i>Euterpe oleracea</i> Mart.	3,89±0,13 ^a	36 ± 1
Ostrokrzew paragwajski (EOP)	<i>Ilex paraguariensis</i> L.	1,77±0,08	92 ± 2
Rokitnik zwyczajny (ER)	<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	1,44±0,07	62 ± 1
Pestki winogron (EPW)	<i>Vitis vinifera</i> L.	0,77±0,05 ^b	280 ± 6 ^a
Zielona herbata (EH)	<i>Camellia sinensis</i> L.		
(EH1)		0,46±0,01 ^c	370 ± 10
(EH2)		0,47±0,01 ^c	417 ± 10
(EH3)		0,73±0,02 ^b	289 ± 7 ^a
(EH4)		0,73±0,01 ^b	223 ± 9 ^b
(EH5)		0,52±0,01	220 ± 10 ^b
Kwas askorbinowy (KA)		0,22±0,02	
Kwas kojowy (KK)		7,25±0,12 ¹	

n = 3.

^{a-c} Wartości średnie w kolumnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie (test Tukeya, $p > 0,05$).

Źródło: Na podstawie: [badania własne; ¹Klimczak i Gliszczyńska-Świgło 2017].

W przypadku ekstraktu z ananasa (EAn) i skórek winogron (EW), inhibicja enzymu nie zależała od stężenia ekstraktu w mieszaninie reakcyjnej. W badanym zakresie stężeń ekstraktów (od 0,01 do 0,1%) stwierdzono 15-procentową (EAn) i 45-procentową (EW) inhibicję aktywności tyrozynazy. Zawartość polifenoli ogółem w tych ekstraktach wynosiła odpowiednio 2 i 246 mg/g.

W przypadku pozostałych ekstraktów skuteczność hamowania enzymu zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów w mieszaninie reakcyjnej. Najniższą wartość IC₅₀ uzyskano w testach z użyciem ekstraktów z herbaty zielonej EH1

(0,46 g/l), EH2 (0,47 g/l) i EH5 (0,52 g/l). Zaobserwowano, że efektywność hamowania enzymu przez EH3 i EH4 była porównywalna z EPW (IC_{50} ok. 0,7 g/l; tabela 6). Zawartość polifenoli ogółem w ekstraktach z zielonej herbaty i pestek winogron była wyższa niż w pozostałych ekstraktach (tabela 6).

Ekstrakty z guarany i acai charakteryzowały się najslabszymi właściwościami inhibicyjnymi wobec tyrozynazy (odpowiednio $IC_{50} = 3,91$ g/l i $IC_{50} = 3,39$ g/l; tabela 6). Zawartość związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z guarany wynosiła 25 mg/g, natomiast w ekstrakcie z acai 36 mg/g (tabela 6).

Standaryzowany ekstrakt z rokitnika (ER) odznaczał się większą efektywnością w hamowaniu aktywności enzymu ($IC_{50} = 1,44$ g/l) w porównaniu z ekstraktem yerba mate (EOP; $IC_{50} = 1,77$ g/l; tabela 6), pomimo mniejszej zawartości związków polifenolowych ogółem (tabela 6). Należy zaznaczyć, że w dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących wpływu ekstraktu z rokitnika na aktywność PPO.

Uzyskane wartości IC_{50} kwasu askorbinowego i kwasu kojowego, wzorcowych inhibitorów tyrozynazy, były niższe w porównaniu z wartościami IC_{50} badanych ekstraktów i porównywalne z danymi literaturowymi [Khanom, Kayhara, i Tadasa 2000; Chang i in. 2007; Jo i in. 2012a; Zocca, Lomolino i Lante 2011].

Przeprowadzona analiza korelacji wykazała istnienie silnej współzależności pomiędzy parametrem IC_{50} a zawartością związków polifenolowych ogółem w badanych ekstraktach roślinnych ($r = -0,82$). Podobną zależność wykazali w swoich badaniach Jo i in. [2012b] oraz Zamani, Gazali i Batubara [2015].

Na podstawie uzyskanych wyników z badań modelowych, do dalszych badań wybrano ekstrakty o najwyższej aktywności inhibicyjnej względem tyrozynazy, czyli ekstrakty z zielonej herbaty (EH1-EH5), pestek winogron (EPW) oraz rokitnika zwyczajnego (ER).

Zdolność hamowania PPO z grzyba przez ekstrakty z zielonej herbaty i pestek winogron została także wykazana przez Kuijpersa i in. [2014]. Efektywność działania tych ekstraktów była porównywalna. Ekstrakt z zielonej herbaty był również jednym z najlepszych inhibitorów tyrozynazy w badaniach przeprowadzonych przez Chen i in. [2009]. Jego wartość IC_{50} wynosiła 0,24 g/l. Natomiast Jo i in. [2012b] wykazali, że ekstrakt z nasion zielonej herbaty również hamuje aktywność enzymu ($IC_{50} = 4,32$ g/l). W badaniach przeprowadzonych przez Altunkaya [2014] wykazano, że ekstrakt z liści winogron jest dobrym inhibitorem PPO z sałaty. Natomiast niską efektywność działania ekstraktu z acai na PPO z grzyba wykazał także Kuijpers i in. [2014].

Zmierzona niska zawartość polifenoli w ekstrakcie z ananasa (EAn) oraz efektywność działania tego ekstraktu względem tyrozynazy niezależna od stężenia ekstraktu sugeruje, że związki polifenolowe nie odgrywają większej roli w hamowaniu aktywności tyrozynazy. W badaniach prowadzonych przez Chaisakdanugulla, Theerakulkaita i Wrolstada [2007] stwierdzono, że właściwości inhibicyjne soku z ananasa są głównie związane z obecnością kwasów organicznych, takich jak kwas

malonowy i cytrynowy. Nie wykazano znaczącego wpływu bromelainy z ananasa na aktywność PPO w soku jabłkowym [Tochi i in. 2009].

W zastosowanych warunkach doświadczenia ekstrakty z borówki i zielonej kawy nie hamowały działania tyrozynazy. Można to wytłumaczyć obecnością w nich, obok inhibitorów tyrozynazy, substancji będących potencjalnymi substratami tego enzymu, takich, jak kwas kawowy i chlorogenowy [Kader i in. 1997; Jeszka-Skowron i in. 2016]. Występując w znaczącym stężeniu, mogą wpływać na efektywność działania związków wykazujących zdolność hamowania tyrozynazy [Kubo i in. 2000b; Kuijpers i in. 2014].

Nie zdecydowano się na ekstrakt z ostrokrzewu paragwajskiego EOP (potocznie zwanego *yerba mate*) ze względu na wysoką zawartość w nim kwasu chlorogenowego i jego izomerów [Heck i de Mejia 2007]. Kwas chlorogenowy jest potencjalnym substratem dla PPO z jabłek, zatem dodatek EOP do soku jabłkowego mógłby przyspieszyć jego brązowienie. Kuijpers i współpracownicy [2014] wykazali, że ekstrakt z *yerba mate* aktywował PPO z ziemniaka. Ziemniaki, podobnie jak jabłka, zawierają kwas chlorogenowy. Inkubacja PPO z ziemniaka z kwasem chlorogenowym potwierdziła, że związek ten jest substratem dla tego enzymu.

Właściwości inhibicyjne ekstraktów roślinnych wynikają z obecności w nich związków biologicznie aktywnych, wśród których związki polifenolowe odgrywają główną rolę. Liczne badania wykazały, że związki te hamują aktywność PPO, zapobiegając tym samym tworzeniu produktów brunatnienia enzymatycznego (tabela 4, rozdział 2.2.3).

W ekstraktach wytypowanych do dalszych badań oznaczono profil związków polifenolowych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), ogólną zawartość związków polifenolowych i flawonoidów metodą spektrofotometryczną oraz zawartość witaminy C z wykorzystaniem UPLC. Wyniki badań zestawiono w tabelach 7–10.

Zielona herbata jest bogatym źródłem związków polifenolowych, szczególnie katechin, które stanowią około 30% suchej masy liści herbaty [Graham 1992]. Liczne badania wykazały korzystny wpływ zielonej herbaty na zdrowie człowieka. Jej właściwości prozdrowotne są ściśle związane z obecnością związków polifenolowych. Wykazano, że polifenole zielonej herbaty posiadają właściwości przeciwutleniające, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i antybiotykowe. Badania także dowodzą, że zmniejszają one ryzyko występowania chorób cywilizacyjnych, takich jak choroby sercowo-naczyniowe czy nowotwór żołądka, jelita grubego, przełyku, płuc [Gramza, Korczak i Amarowicz 2005; Muzolf, Gliszczyńska-Świągło, Tyrakowska 2007; Adak i Gabar 2011; Perumalla i Hettiarachchy 2011].

W tabeli 7 przedstawiono zawartość kwasu galusowego, katechin oraz alkaloidów w badanych ekstraktach z zielonej herbaty (EH1-EH5). Badane ekstrakty różniły się zarówno pod względem składu, jak i zawartości oznaczanych związków.

Analiza wariancji ANOVA wykazała wpływ rodzaju ekstraktu na zawartość oznaczanych związków ($p < 0,05$).

Ogólna ilość polifenoli oznaczona chromatograficznie wynosiła od 160,4 (EH4) do 330,7 mg/g ekstraktu (EH1). (-)-Epigalokatechina (EGC), (-)-galusan epigalokatechiny (EGCG) oraz (-)-galusan epikatechiny (ECG) stanowiły główną frakcję flawan-3-oli badanych ekstraktów z zielonej herbaty. Zawartość tych katechin stanowiła od około 73% (EH1) do 86% (EH3) całkowitej ilości związków polifenolowych oznaczonych metodą HPLC. W próbkach ekstraktu EH3-EH5 nie stwierdzono obecności (+)-katechiny (tabela 7). Zawartość kwasu galusowego wynosiła od 0,8 (EH5) do 3,5 (EH4) mg/g ekstraktu. Ponadto w badanych ekstraktach zidentyfikowano i oznaczono ilościowo dwa alkaloidy, spośród których kofeina była dominującym związkiem i stanowiła średnio 95% całkowitej ilości alkaloidów.

Tabela 7. Zawartość kwasu galusowego, katechin i alkaloidów w ekstraktach z zielonych herbat (EH1-EH5) [mg/g ekstraktu]

Związek	Zawartość [mg/g ekstraktu]				
	EH1	EH2	EH3	EH4	EH5
Kwas galusowy	1,8 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,1 ^d	2,5 ± 0,0 ^b	3,5 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^d
GC	12,6 ± 1,3 ^b	16,2 ± 0,5 ^a	5,7 ± 0,4 ^d	5,4 ± 0,4 ^d	8,8 ± 0,4 ^c
EGC	66,9 ± 2,1 ^b	62,6 ± 4,3 ^b	72,6 ± 0,4 ^a	54,0 ± 1,5 ^c	43,9 ± 2,5 ^d
C	21,1 ± 1,0 ^a	15,4 ± 1,0 ^b	n.s.	n.s.	n.s.
EC	42,3 ± 0,7 ^a	38,5 ± 1,7 ^b	15,5 ± 0,7 ^c	14,7 ± 0,6 ^c	10,6 ± 0,5 ^d
EGCG	105,0 ± 2,8 ^a	98,9 ± 4,1 ^b	104,0 ± 2,0 ^a	58,7 ± 2,0 ^d	86,1 ± 1,2 ^c
GCG	11,7 ± 0,3 ^a	10,3 ± 0,2 ^b	7,9 ± 0,2 ^c	5,3 ± 0,5 ^d	12,4 ± 0,2 ^a
ECG	69,3 ± 2,3 ^a	60,6 ± 2,5 ^b	24,7 ± 0,8 ^c	18,9 ± 0,4 ^d	23,1 ± 0,7 ^c
Suma katechin i kwasu galusowego	330,7 ± 8,3^a	303,3 ± 10,9^b	232,9 ± 1,1^c	160,4 ± 2,0^e	185,8 ± 3,4^d
Kofeina	73,0 ± 1,8 ^a	73,5 ± 2,8 ^{ab}	72,3 ± 2,4 ^{ab}	67,5 ± 2,8 ^b	44,7 ± 2,0 ^c
Teobromina	6,4 ± 0,2 ^a	5,6 ± 0,3 ^b	2,8 ± 0,1 ^c	2,1 ± 0,1 ^d	1,0 ± 0,0 ^e
Suma alkaloidów	79,4 ± 2,0^a	79,1 ± 3,1^a	75,4 ± 2,4^{ab}	69,6 ± 2,8^b	45,8 ± 2,0^c

GC – (-)-galokatechina; EGC – (-)-epigalokatechina; C – (+)-katechina; EC – (-)-epikatechina; EGCG – (-)-galusan epigalokatechiny; GCG – (-)-galusan galokatechiny; ECG – (-)-galusan epikatechiny; n.s. – nie stwierdzono.

^{a-d} Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie, w obrębie wierszy ($p < 0,05$).

Źródło: Na podstawie: [badania własne; Klimczak i Gliszczyńska-Święto 2017].

Uzyskane wyniki korespondują z wynikami uzyskanymi przez innych autorów [Henning i in. 2003; Gramza-Michałowska 2011; Enko i Gliszczyńska-Święto 2015].

Gramza-Michałowska [2011] przeprowadziła analizę składu związków fenolowych (katechiny, flawonole i kwasy fenolowe) w ekstrakcie wodnym z zielonej herbaty. Ponadto oznaczyła także w ekstrakcie zawartość kofeiny. Stwierdziła, że katechiny stanowiły 70% oznaczonych związków. Wśród tych związków dominowały:

EGCG, EGC i ECG, które stanowiły odpowiednio 50,6, 22,3 i 9,8% całkowitej ilości związków polifenolowych. W badanym ekstrakcie nie wykryto obecności (+)-katechiny. Zawartość związków polifenolowych oznaczonych metodą HPLC wynosiła 182,19 mg/g ekstraktu. Wyniki badań tej autorki w zakresie analizy zawartości katechin i kwasu galusowego w ekstrakcie z zielonej herbaty są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Enko i Gliszczyńska-Świgło [2015], a także z prezentowanymi w niniejszym opracowaniu. Wyższą zawartość związków fenolowych w ekstrakcie z zielonej herbaty (612,2 mg/g) uzyskali Henning i in. [2003], którzy analizowali skład katechin i kwasu galusowego w handlowym ekstrakcie z zielonej herbaty. Dominującym związkiem w ekstrakcie badanym przez tych autorów był także EGCG (48,8%), a w dalszej kolejności GCG (25,8%) oraz ECG (12,3%).

Zawartość polifenoli ogółem w badanych ekstraktach, oznaczona metodą Folinia-Ciocalteu, wynosiła od 220 (EH5) do 417 (EH2) mg/g ekstraktu (tabela 6). Natomiast zawartość flawonoidów ogółem oznaczona metodą spektrofotometryczną mieściła się w zakresie od 77 (EH3) do 198 mg/g ekstraktu (EH2) (tabela 8).

Tabela 8. Ogólna zawartość flawonoidów w ekstraktach z zielonej herbaty (EH1-EH5) [mg/g]

Ekstrakt z zielonej herbaty	Flawonoidy ogółem [mg katechiny/g]
EH1	193 ± 4 ^a
EH2	198 ± 7 ^a
EH3	77 ± 4
EH4	83 ± 2
EH5	95 ± 3

^a Wartości średnie w kolumnie, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie ($p > 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Uzyskane wyniki korespondują z wynikami Muzolf, Gliszczyńska-Świgło i Tyrakowska [2007], którzy w wodnych ekstraktach z herbaty zielonej określili zawartość polifenoli ogółem na poziomie od 220,4±19,5 do 348,2±29,8 mg kwasu galusowego/g. W badaniach przeprowadzonych przez Satoha, Tohyama i Nishimura [2005] zawartość związków fenolowych ogółem w wodnym ekstrakcie z herbaty zielonej wynosiła 312,5 mg kwasu galusowego/g.

No i in. [1999] badali wpływ związków polifenolowych ekstraktu z zielonej herbaty na aktywność tyrozynazy. Wykazali, że za właściwości inhibicyjne ekstraktu z zielonej herbaty odpowiadają katechiny, a zwłaszcza GCG ($IC_{50} = 0,017$ mM), ECG ($IC_{50} = 0,035$ mM) oraz EGCG ($IC_{50} = 0,034$ mM). Wysoką efektywnością hamowania aktywności tyrozynazy charakteryzuje się również GC ($IC_{50} = 0,016$ mM; Ko i in. 2011). Natomiast kwas galusowy może działać jako inhibitor ($IC_{50} = 4,5$ mM), ale także może być substratem dla tyrozynazy [Kubo i in. 2000b]. W niniejszej

pracy wykazano, że ekstrakty EH3 oraz EH4 charakteryzowały się najslabszymi, spośród badanych ekstraktów z zielonej herbaty, właściwościami inhibicyjnymi ($IC_{50} = 0,73 \text{ mg/l}$). Warto zauważyć, że zawartość katechin o wysokiej aktywności względem tyrozynazy, tj. GC i GCG, w tych ekstraktach była najniższa [Klimczak i Gliszczyńska-Świągło 2017].

Kolejnym ekstraktem, który przebadano pod kątem zawartości naturalnych przeciwutleniaczy, był ekstrakt z pestek winogron. Ekstrakt ten jest produktem ubocznym otrzymywanym w czasie produkcji soku winogronowego oraz wina. Wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwutleniające i przeciwnowotworowe, wynikające z obecności w nich związków polifenolowych [Baydar, Özkan i Sagdiç 2004; Kaur, Agarwal i Agarwal 2009; Perumalla i Hettiarachchy 2011]. Pestki winogron stanowią bowiem bogate źródło monomerycznych flawanoli takich, jak (+)-katechina i (–)-epikatechina oraz procyanidyn B1, B2 i ich izomerów [Baydar, Özkan i Sagdiç 2004; Davidov-Pardo, Arozarena i Marín-Arroyo 2011; Villani i in. 2015].

W tabeli 9 przedstawiono zawartość kwasu galusowego oraz katechin w badanym ekstrakcie z pestek winogron. Spośród katechin w największych ilościach występowały C, EGC oraz EC, które stanowiły 80% całkowitej ilości związków polifenolowych oznaczonych chromatograficznie. W mniejszych ilościach zidentyfikowano GC, EGCG oraz GCG. Nie stwierdzono obecności ECG.

Tabela 9. Zawartość związków polifenolowych w ekstrakcie z pestek winogron (EPW) [mg/g ekstraktu]

Związek	Zawartość [mg/g ekstraktu]
Kwas galusowy	2,1 ± 0,0
GC	2,7 ± 0,0
EGC	25,8 ± 1,8
C	37,6 ± 0,8
EC	23,5 ± 0,6
EGCG	0,5 ± 0,0
GCG	6,7 ± 0,1
ECG	n.s.
Procyjanidyna B2	9,5 ± 0,14
Suma polifenoli	108,4 ± 3,5

Oznaczenia jak pod tabelą 7; n.s. – nie stwierdzono.

Źródło: Badania własne.

Spośród dimerycznych procyanidyn, wykryto procyanidynę B2, której zawartość stanowiła 9% całkowitej ilości związków fenolowych. Kwas galusowy, który jest głównym kwasem fenolowym w pestkach winogron, stanowił około 2% całkowitej ilości polifenoli. Nie stwierdzono obecności witaminy C.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zbliżone do rezultatów uzyskanych przez innych autorów [Baydar, Özkan i Sagdiç 2004; Davidov-Pardo, Arozarena i Marín-Arroyo 2011; Villani i in. 2015]. Villani i in. [2015] przebadali trzy handlowe ekstrakty z pestek winogron na zawartość związków fenolowych. W badanych ekstraktach zidentyfikowali i oznaczyli ilościowo zawartość kwasu galusowego, (+)-katechiny, (-)-epikatechiny oraz oligomeryczne procyanidyny. Dimery i trimery procyanidyn występowały w największych ilościach i stanowiły 63,4% całkowitej ilości związków fenolowych, a (+)-katechina i (-)-epikatechina w sumie stanowiły 32,3% całkowitej ilości polifenoli. Zawartość kwasu galusowego kształtowała się na poziomie od 0,4 do 35,5 mg/g ekstraktu. Wyniki tych autorów były odmienne od rezultatów uzyskanych przez Davidov-Pardo, Arozarena i Marrín-Arroyo [2011], którzy w pięciu handlowych ekstraktach z pestek winogron zmierzili największą zawartość (+)-katechiny i (-)-epikatechiny (71,1%). Dimery procyanidyny B1 i B2 stanowiły odpowiednio 9,9 i 12,6% całkowitej ilości polifenoli. Ponadto oznaczono w ekstraktach zawartość GC, EGC, EGCG oraz ECG, które w sumie stanowiły 10,1%. Galusan epikatechiny (ECG) występował tylko w dwóch na pięć ekstraktów (ok. 1%). Oznaczono także kwas galusowy, który stanowił 1,3% całkowitej ilości związków fenolowych.

Zawartość związków polifenolowych ogółem oraz flawonoidów ogółem w EPW była na zbliżonym poziomie (280 ± 6 i 285 ± 2 mg/g, odpowiednio; tabela 6). Świadczy to o tym, że flawonoidy stanowiły dominującą frakcję związków polifenolowych obecnych w ekstrakcie. Znacznie wyższą, od prezentowanych w niniejszej pracy zawartość związków fenolowych ogółem w ekstraktach z pestek winogron stwierdzili Baydar, Özkan i Sagdiç [2004], która wynosiła od 627 do 667 mg/g ekstraktu.

Na podstawie przeprowadzonej charakterystyki związków występujących w ekstrakcie z pestek winogron można stwierdzić, że właściwości inhibicyjne EPW wobec tyrozynazy były związane głównie z obecnością w ekstrakcie katechin.

Rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides*) należy do rodziny oliwnikowatych (*Elaeagnaceae* L.). Owoce rokitnika są bogate w związki biologicznie czynne, takie jak witaminy (C, A, E, K, z grupy B), związki fenolowe, fosfolipidy, sterole i kwasy tłuszczowe [Rösch i in. 2004; Zu i in. 2006; Teleszko i in. 2015]. Wykazuje właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Unikalny skład chemiczny rokitnika sprawia, że jest wykorzystywany zarówno w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, jak i kosmetycznym [Khan, Akhtar i Mahmood 2010; Saikia i Handique 2013].

Pośród badanych ekstraktów ekstrakt z rokitnika (ER) zawierał najmniej związków polifenolowych oznaczonych metodą chromatograficzną ($2,14 \pm 0,04$ mg/g) i spektrofotometryczną (62 ± 1 mg/g) oraz flawonoidów ogółem oznaczonych metodą spektrofotometryczną (52 ± 0 mg/g) (tabele 6 i 10). Należy jednak podkreślić, że był to ekstrakt standaryzowany na polifenole, których zawartość w ekstrakcie, według danych producenta, wynosiła tylko 10%.

Tabela 10. Zawartość związków polifenolowych w ekstrakcie z rokitnika (ER) [mg/g ekstraktu]

Związek	Zawartość [mg/g ekstraktu]
Kwas galusowy	n.s.
GC	0,48 ± 0,0
EGC	n.s.
C	0,47 ± 0,0
EC	0,36 ± 0,0
EGCG	0,15 ± 0,0
GCG	n.s.
ECG	n.s.
Rutyna	0,16 ± 0,0
Hiperozyd	0,14 ± 0,0
Izokwercytryna	0,20 ± 0,0
Kwercytryna	0,15 ± 0,00
Kemferol	0,01 ± 0,00
Suma	2,14 ± 0,04

Oznaczenia jak pod tabelą 7; n.s. – nie stwierdzono.

Źródło: Badania własne.

W badanym ekstrakcie zidentyfikowano cztery katechiny (GC, C, EC i EGCG), które stanowiły około 68% całkowitej ilości polifenoli oznaczonych metodą chromatograficzną.

Wykryto także obecność związków należących do grupy flawonoli, takich jak rutyna, hiperozyd, izokwercytryna, kwercytryna oraz kemferol. W ER nie stwierdzono obecności kwasu galusowego, epigalokatechiny (EGC), galusanu galokatechiny (GCG) oraz galusanu epikatechiny (ECG).

Teleszko i in. [2015] przebadali osiem odmian rokitnika na zawartość liofilowych i hydrolilowych składników. Wykazali duże zróżnicowanie w składzie i ilości oznaczanych związków w obrębie odmian. Głównymi przedstawicielami flawonoidów owoców rokitnika były flawonole, spośród których w największych ilościach występowały pochodne izoramnetyny, kwercetyny i kemferolu. W znaczących ilościach występowały też flawan-3-ole. Badania Michalaka, Podsędek i Glinki [2016] również wykazały, że flawonole były dominującym polifenolem w glikolowym ekstrakcie z rokitnika. Rösch i in. [2004], spośród katechin (flawan-3-oli), zidentyfikowali w wyciekach z rokitnika głównie galokatechinę, a następnie (+)-katechinę i (-)-epikatechinę. Kwas galusowy był dominującym fenolokwasem w ekstrakcie z wycieków rokitnika [Arimboor, Kumar i Arumughan 2008].

Saikia i Handique [2013] badali ogólną zawartość związków fenolowych w ekstraktach metanolowych, acetonowych, chloroformowych i eterowych wyizolowanych z liści, kory, miąższu i nasion rokitnika. Zaobserwowali, że zawartość

związków fenolowych była zróżnicowana w zależności od rodzaju ekstrahenta, jak i części rośliny, z której pozyskano ekstrakt. Najwięcej polifenoli ogółem uzyskano w ekstraktach metanolowych (od 85,3 w ekstrakcie z kory do 156,7 mg kwasu galusowego/g w ekstrakcie z nasion). Arora i in. [2012] badali zawartość związków fenolowych ogółem w metanolowym i wodnym ekstrakcie z rokitnika. Stwierdzili niższą zawartość polifenoli ogółem w ekstrakcie wodnym niż metanolowym, która wynosiła 87,4, 109,6 i 148,9 mg/g odpowiednio w ekstrakcie z wyłoków, nasion i liści.

Zawartość witaminy C w badanym ER wynosiła $1,89 \pm 0,06$ mg/g ekstraktu. Na zawartość witaminy C w owocach rokitnika, która może się wahać od 28 do 2500 mg/100 g owocu, wpływa wiele czynników, np. odmiana, region uprawy i termin zbioru [Bal i in. 2011; Teleszko i in. 2015]. Na niską zawartość witaminy C w ekstrakcie wykorzystanym w badaniach własnych mógł wpłynąć proces otrzymywania ekstraktu, który był głównie ukierunkowany na związki polifenolowe.

Na podstawie określonego profilu polifenoli można stwierdzić, że właściwości inhibicyjne ER wobec tyrozynazy były związane głównie z obecnością w ekstrakcie GC i EGCG oraz flawonoli (tabela 4). Przykładowo, rutyna i kwercytryna wykazują zdolność hamowania tyrozynazy, a wyznaczone wartości IC_{50} tych związków wynoszą odpowiednio 6,8 i 0,084 mM [Ko i in. 2011; Si i in. 2012a]. W przypadku izokwercytryny nie stwierdzono jej właściwości inhibicyjnych wobec PPO [Kubo i in. 2000b].

W celu określenia współzależności pomiędzy parametrem IC_{50} a zawartością związków polifenolowych w badanych ekstraktach roślinnych obliczono współczynniki korelacji r Pearsona (tabela 11).

Analiza korelacji wykazała, że zawartość związków polifenolowych ogółem oznaczona metodą spektrofotometryczną i przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej w istotny sposób wpłynęła na kształtowanie wartości parametru IC_{50} badanych ekstraktów. Nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy wartością parametru IC_{50} a zawartością flawonoidów ogółem ($r = -0,44$, $p > 0,05$).

Tabela 11. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy parametrem IC_{50} a zawartością związków polifenolowych ogółem oznaczonych metodą Folina-Ciocalteu i HPLC lub zawartością flawonoidów ogółem w badanych ekstraktach roślinnych

Parametr	Współczynnik korelacji r Pearsona
Polifenole ogółem ¹	-0,86*
Flawonoidy ogółem	-0,44
Suma polifenoli ²	-0,87*

* Korelacje istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

¹ Zawartość polifenoli ogółem oznaczona metodą Folina-Ciocalteu.

² Suma polifenoli oznaczona chromatograficznie.

6.1.2. Wpływ soków z owoców cytrusowych na aktywność oksydazy polifenolowej

W tabeli 12 przedstawiono wyniki badań własnych nad wpływem wybranych soków z owoców cytrusowych na aktywność handlowej tyrozynazy z grzyba (*Agaricus bisporus*). Badane świeże, niepasteryzowane soki z pomarańczy, mandarynki i grejfruta czerwonego zakupiono bezpośrednio u producenta soków.

Tabela 12. Hamowanie aktywności tyrozynazy przez wybrane soki z owoców cytrusowych, w układach modelowych

Sok z owoców cytrusowych	IC ₅₀ [g/100 ml]
Sok pomarańczowy (SP)	13,31 ± 0,25 ^a
Sok mandarynkowy (SM)	13,58 ± 0,29 ^a
Sok grejfrutowy (SG)	17,69 ± 0,39

n = 4.

^a Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie ($p > 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Skuteczność hamowania enzymu przez soki z owoców cytrusowych zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia soków w mieszaninie reakcyjnej. Zaobserwowano, że efektywność hamowania enzymu przez sok pomarańczowy (SP) i mandarynkowy (SM) była porównywalna. Uzyskane wartości parametru IC₅₀ nie różniły się istotnie statystycznie ($p > 0,05$; tabela 12). Sok grejfrutowy (SG), w porównaniu z tymi sokami, wykazywał nieznacznie słabsze właściwości inhibicyjne (IC₅₀ = 17,69 g/100 ml; tabela 12).

Do związków polifenolowych soków z owoców cytrusowych należą kwasy fenolowe (głównie kwasy hydroksycynamonowe) i flawonoidy, wśród których dominują flawanony. Flawanony w sokach cytrusowych występują głównie w formie glikozydów, w mniejszych ilościach jako aglikony. Liczne badania epidemiologiczne wskazują, że flawanony, a szczególnie hesperydyna i naryngina, odgrywają ważną rolę w mechanizmie obronnym organizmu przeciwko chorobom wywołanym stresem oksydacyjnym. Ich zdolność do wychwytywania reaktywnych form tlenu (RFT), wynikająca z ich właściwości przeciwutleniających, może się przyczyniać do zmniejszenia ryzyka rozwoju nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych oraz neurodegeneracyjnych. Ponadto związki te wykazują właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwalergiczne, działają moczopędnie oraz obniżają poziom całkowitego cholesterolu [Erlund 2004; Zhang i in. 2007; Khan, Huma, Dangles 2014; Devi i in. 2015]. Badania wskazują także na znaczącą rolę polifenoli z cytrusów w leczeniu otyłości, poprzez zmniejszenie różnicowania adipocytów oraz zawartości lipidów w komórce [Nakajima, Macedo i Macedo 2014].

W tabeli 13 przedstawiono zawartość kwasów fenolowych i flawanonów w badanych sokach z owoców cytrusowych (SP, SM i SG). Badane soki różniły się zarówno pod względem składu, jak i zawartości oznaczanych związków. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała wpływ typu soku na zawartość związków polifenolowych ($p < 0,05$).

Tabela 13. Zawartość kwasów fenolowych oraz flawanonów w badanych sokach z owoców cytrusowych [mg/l]

Związek	Zawartość [mg/l]		
	SP	SM	SG
Kwas kawowy	3,3 ± 0,0	2,3 ± 0,0	2,7 ± 0,0
Kwas ferulowy	1,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Kwas <i>p</i> -kumarowy	1,2 ± 0,0	ślady	ślady
Kwas synapinowy	1,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0	ślady
Narirutyna	38,0 ± 0,3	49,9 ± 0,3	12,3 ± 0,2
Naryngina	n.s.	8,4 ± 0,2	235,4 ± 4,6
Hesperydyna	101,3 ± 2,3	87,7 ± 0,9	n.s.
Dydymina	6,7 ± 0,1	9,6 ± 0,1	5,1 ± 0,1
Suma	153,1 ± 2,8	158,6 ± 1,5	255,6 ± 4,9

SP – sok pomarańczowy, SM – sok mandarynkowy, SG – sok grejfrutowy; n.s. – nie stwierdzono.

Źródło: Badania własne.

W badanych sokach ogólna ilość polifenoli oznaczona chromatograficznie wynosiła od 153,1 (SP) do 255,6 (SG) mg/l soku (tabela 13). Flawanony stanowiły główną frakcję polifenoli (od 95,4% (SP) do 98,9% (SG)).

W soku pomarańczowym (SP) dominującym flawanonem była hesperydyna (101,3 mg/l), która stanowiła 69% całkowitej ilości flawanonów. Wykryto także obecność narirutyny (38,0 mg/l) i dydyminy (6,7 mg/l). Nie stwierdzono obecności narynginy.

W soku mandarynkowym (SM) w największych ilościach występowała hesperydyna (87,7 mg/l) i narirutyna (49,9 mg/l), stanowiąc 86,8% całkowitej ilości flawanonów. Stwierdzono również obecność narynginy (8,4 mg/l).

W przypadku soku grejfrutowego (SG) dominującym flawanonem była naryngina (235,4 mg/l), która stanowiła 92,1% całkowitej ilości flawanonów. Nie stwierdzono obecności hesperydyny.

Spośród kwasów fenolowych w badanych sokach z owoców cytrusowych kwas kawowy występował w największych ilościach, stanowiąc od 46,5% (SP) do 96,4% (SG) ogólnej ilości wolnych kwasów. W soku pomarańczowym zidentyfikowano i oznaczono ilościowo także kwas ferulowy, *p*-kumarowy i synapinowy. W soku mandarynkowym, obok kwasu kawowego, zidentyfikowano także obecność kwasu

ferulowego i sinapinowego. Natomiast kwas *p*-kumarowy występował jedynie w śladowych ilościach (< 0,05 mg/l). W przypadku soku grejpfrutowego, oprócz kwasu kawowego, zidentyfikowano także obecność kwasu ferulowego oraz śladowe ilości kwasu *p*-kumarowego i sinapinowego.

Uzyskane w niniejszej pracy zawartości flawanonów w badanych sokach cytrusowych znajdują się w zakresach podawanych we wcześniejszych doniesieniach innych autorów, jednak trudno je bezpośrednio porównywać ze sobą ze względu na brak wiedzy o odmianach owoców użytych do produkcji soków oraz ze względu na odmienny sposób otrzymywania soków. W dostępnej literaturze niewiele jest danych o profilu związków fenolowych handlowych niepasteryzowanych mętnych soków (NFC).

Dane literaturowe potwierdzają, że głównym flawanonem w sokach z pomarańczy (*Citrus sinensis*) jest hesperydyna, której stężenie w świeżo wyciśniętym soku kształtuje się w szerokim zakresie, określanym przez różnych autorów jako: 35,1–552,0 mg/l [Gattuso i in. 2007], 427,8–533,6 mg/l [Xu i in. 2008], 164,3–376,0 mg/l [Rapisarda i in. 2009], 257,0–552,0 [Dhuique-Mayer i in. 2005], w zależności od odmiany owoców. W mniejszych ilościach występuje narirutyna (5,5–142,0 mg/l) oraz dydymina (8,0–31,0 mg/l) [Dhuique-Mayer i in. 2005; Gattuso i in. 2007; Xu i in. 2008; Rapisarda i in. 2009]. Naryngina nie występuje w świeżych sokach z pomarańczy, jednak wykryto jej obecność w handlowych sokach pomarańczowych, co mogło sugerować, że analizowane soki nie były czystymi sokami pomarańczowymi i mogły zawierać dodatek soku z grejpfruta [Gattuso i in. 2007]. Peterson i inni [2006] w swojej pracy przeglądowej porównywali zawartość hesperydyny i narirutyny w świeżo wyciśniętych i handlowych sokach z pomarańczy otrzymanych z koncentratu (FC – *made from concentrate*) i nie z koncentratu (NFC – *not from concentrate*). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w zawartości tych związków we wspomnianych sokach. Zawartość hesperydyny w sokach kształtowała się w zakresie 2,56–39,26 mg/100 g, natomiast narirutyny 0,00–6,87 mg/100g soku. Vanamala i inni [2006] analizowali zawartość flawanonów w handlowych pasteryzowanych sokach pomarańczowych FC i NFC. W sokach pomarańczowych FC wykazano wyższą zawartość hesperydyny (329,0–548,0 mg/l) i narirutyny (44,0–80,0 mg/l) niż w sokach pomarańczowych NFC (180,0–428,0 mg/l i 29,5–54,1 mg/l, odpowiednio). Znacznie niższą zawartość hesperydyny, w porównaniu do wyników badań uzyskanych przez Vanamala i inni [2006], uzyskali Klimczak i inni [2007]. Badacze ci określili ilość tego związku w dwóch handlowych sokach pomarańczowych na podobnym poziomie około 76,0 mg/l. Zawartość narirutyny kształtowała się natomiast na poziomie 50,6 i 70,2 mg/l, a w przypadku dydyminy na poziomie 6,9 i 9,9 mg/l.

Profil flawanonów w soku z mandarynek (*Citrus reticulata*) jest podobny do soku z pomarańczy. Głównym flawanonem jest hesperydyna, której zawartość

w świeżo wyciśniętym soku mieści się w szerokim zakresie, przez różnych autorów określanym jako: 8,1–458,0 mg/l [Gattuso i in. 2007], 304,5–450,6 mg/l [Xu i in. 2008], 105,4–872,9 mg/l [Sdiri i in. 2012], 767,0 mg/l [Dhuique-Mayer i in. 2005], w zależności od odmiany owoców. W mniejszych ilościach występuje narirutyna (1,2–288,1 mg/l) oraz dydymina (0,5–31,0 mg/l) [Gattuso i in. 2007; Xu i in. 2008; Sdiri i in. 2012]. Obecność narynginy w soku z mandarynek zależy od odmiany owoców. Xu i inni [2008] badali skład świeżo wyciśniętych soków pochodzących z sześciu odmian mandarynek ('Wase-Satsuma', 'Satsuma', 'Ponkan', 'Bendiazō', 'Manju', 'Zhuhong') i nie stwierdzili w nich obecności narynginy. Z kolei Sdiri i inni [2012] określili ilość narynginy w soku mandarynkowym z odmiany 'Murcott' i 'Fortune' na poziomie 3,8 i 15,1 mg/l, nie wykryto jej w sokach z odmiany 'Kara'. Natomiast w soku analizowanym w niniejszej pracy wykryto obecność narynginy (8,4 mg/l, tabela 13). Niestety nie uzyskano od producenta soku informacji o odmianie mandarynek użytej do otrzymania soku badanego w niniejszej pracy.

Do mandarynek zaliczana jest także 'Klementynka' (*Citrus clementina*), będąca mieszańcem mandarynki (*Citrus deliciosa*) ze słodką pomarańczą (*Citrus sinensis*) [Dhuique-Mayer i in. 2005]. W świeżo wyciśniętym soku z tej odmiany zawartość hesperydyny wynosiła 52,1–861,0 mg/l [Dhuique-Mayer i in. 2005; Gattuso i in. 2007; Rapisarda i in. 2009], narirutyny 14,10 mg/l i 46,4 mg/l [Dhuique-Mayer i in. 2005; Rapisarda i in. 2009], a dydyminy 1,56 mg/l [Rapisarda i in. 2009].

W sokach z grejpfruta (*Citrus paradisi*) białego, różowego czy czerwonego głównym flawanonem jest naryngina. Jej zawartość w świeżo wyciśniętym soku, podawana przez różnych autorów, mieści się w zakresie: 45,0–602,0 [Gattuso i in. 2007], 270,2–464,1 [Kelebek 2010], 73,0–307,0 (mg/l) [Zhang i in. 2007]. Z analizy danych literaturowych przeprowadzonych przez Zhanga i in. [2007] wynika, że zawartość narynginy w sokach handlowych jest wyższa niż w sokach bezpośrednio wyciśniętych i wynosi 101,0–867,0 mg/l soku. Natomiast Vanamala i inni [2006] podają, że ilość narynginy w handlowych pasteryzowanych sokach NFC wynosi 235,0–372,0 mg/l. W mniejszych ilościach występują pozostałe flawanony. W świeżo wyciśniętym soku z grejpfruta zawartość narirutyny, dydyminy i hesperydyny mieści się odpowiednio w zakresie: 23,0–170,0 [Gattuso i in. 2007; Zhang i in. 2007; Kelebek 2010], 2,7–12,5 [Gattuso i in. 2007; Kelebek 2010] i 2,5–17,9 (mg/l) [Gattuso i in. 2007; Zhang i in. 2007; Kelebek 2010]. W poddanych analizie w niniejszej pracy próbkach soku grejpfrutowego nie stwierdzono obecności hesperydyny. Vanamala i inni [2006] w badaniach na handlowych sokach grejpfrutowych NFC również nie wykryli hesperydyny. W soku grejpfrutowym wykryto także obecność neohesperydyny (4,0–24,2 mg/l) [Gattuso i in. 2007; Zhang i in. 2007; Kelebek 2010].

Kwasy hydroksycynamonowe (kawowy, ferulowy, *p*-kumarowy i synapinowy) występują w sokach cytrusowych głównie w formie związanej, w postaci estrów.

Dominującym fenolokwasem w sokach pomarańczowych, mandarynkowych i grejpfrutowych jest kwas ferulowy [Arena, Fallico i Maccarone 2001; Klimczak i in. 2007; Xu i in. 2008; Rapisarda i in. 2009; Kelebek 2010].

W tabeli 14 przedstawiono zawartość związków polifenolowych ogółem, flawonoidów ogółem oraz zawartość witaminy C w badanych sokach z owoców cytrusowych (SP, SM i SG).

Tabela 14. Zawartość związków polifenolowych ogółem, flawonoidów ogółem oraz witaminy C w badanych sokach z owoców cytrusowych

Sok z owoców cytrusowych	Związki polifenolowe ogółem [mg kwasu galusowego/l]	Flawonoidy ogółem [mg katechiny/l]	Witamina C [mg/l]
SP	532 ± 11 ^a	161 ± 5 ^c	359 ± 10 ^a
SM	425 ± 11 ^b	172 ± 3 ^b	261 ± 5 ^b
SG	464 ± 10 ^c	261 ± 7 ^a	220 ± 3 ^c

Objaśnienia jak pod tabelą 13.

^{a-c} Wartości średnie w kolumnie, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Badane soki różniły się pod względem zawartości oznaczanych związków. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała wpływ typu soku na zawartość oznaczanych związków ($p < 0,05$). Ogólna zawartość polifenoli w badanych sokach z owoców cytrusowych wynosiła 425,3 (SM) – 532,0 (SP) mg/l soku. Natomiast zawartość flawonoidów ogółem mieściła się w zakresie 160,6 (SP) – 261,1 (SG) mg/l soku (tabela 14).

Uzyskane wyniki odnoszące się do zawartości związków polifenolowych ogółem w sokach cytrusowych są zgodne z danymi literaturowymi, chociaż dane te charakteryzuje duży rozrzut. Zawartość polifenoli w sokach cytrusowych zależy bowiem od odmiany owoców, stopnia ich dojrzałości, regionu uprawy, a także od procesu technologicznego i warunków przechowywania soków [Klimczak i in. 2007; Xu i in. 2008; Fattahi i in. 2011]. Fattahi i in. [2011] wykazali różnice w zawartości polifenoli ogółem i flawonoidów ogółem w świeżych sokach pomarańczowych w zależności od odmiany owocu oraz jego stadium dojrzałości. W przypadku zawartości związków polifenolowych wartości te mieściły się w szerokim zakresie 60–1160 mg kwasu galusowego/l, a flawonoidów ogółem 230–640 mg kwercetyny/l. Abirami, Nagarani i Siddhuraju [2014] określili zawartość związków polifenolowych i flawonoidów w świeżym soku z pomarańczy olbrzymiej (*C. maxima*) odpowiednio 769,1–909,5 mg kwasu kawowego/l i 245,8–262,2 mg rutyny/l. Według Xu i in. [2008] oraz Rapisarda i in. [1999] zawartość polifenoli ogółem w świeżo wyciśniętym soku z pomarańczy, w zależności od odmiany owocu, wynosiła

odpowiednio 1173,1–1499,7 mg kwasu galusowego/l oraz 361,4–1147,2 mg kwasu ferulowego/l. Natomiast w handlowych, pasteryzowanych sokach pomarańczowych zawartość polifenoli określono na poziomie 227,3–755,0 mg kwasu galusowego/l [Gardner i in. 2000; Gliszczyńska i in. 2004; Klimczak i in. 2007]. W przypadku świeżego soku z mandarynek zawartość związków polifenolowych ogółem wynosiła 529,1–1109,2 mg kwasu galusowego, w zależności od odmiany owocu [Rapisarda i in. 2009; Sdiri i in. 2012; Xu i in. 2008]. Wysoką zawartość polifenoli (1241,5 mg kwasu galusowego/l) w świeżym soku grejpfrutowym wykazali Xu i inni [2008]. Natomiast w handlowych, pasteryzowanych sokach grejpfrutowych zawartość polifenoli określono na poziomie 537,0–651,6 mg kwasu galusowego/l [Gardner i in. 2000; Klimczak i Małecka 2008].

Owoce cytrusowe i otrzymywane z nich soki stanowią bogate źródło witaminy C. Spośród badanych soków sok pomarańczowy zawierał najwięcej witaminy C (359 mg/l), najmniej sok grejpfrutowy (220 mg/l) (tabela 14). Na opakowaniach soków nie była podana informacja o zawartości tej witaminy. Według danych literaturowych zawartość tej witaminy w świeżo wyciśniętych sokach z pomarańczy kształtuje się na poziomie 355,0–781,4 mg/l [Arena, Fallico i Maccarone 2001; Dhuique-Mayer i in. 2005; Rapisarda i in. 1999; Xu i in. 2008]. Nieco mniej witaminy C zawiera świeży sok z mandarynek (218,8–531,0 mg/l) [Dhuique-Mayer i in. 2005; Rapisarda i in. 2009; Xu i in. 2008; Sdiri 2012]. Natomiast w świeżo wyciśniętym soku z grejfruta określono jej zawartość na poziomie 278,3 mg/l [Aadil i in. 2013] oraz 429,4 mg/l [Xu i in. 2008]. Lebedzińska i inni [2012] badali zawartość witaminy C w świeżych handlowych sokach cytrusowych. Wyniki uzyskane przez tych autorów są znacznie niższe od prezentowanych w niniejszej pracy i wynosiły 247,8 mg/l soku z pomarańczy, 141,1 mg/l soku z mandarynki i 161,4 mg/l soku z grejfruta. Według badań przeprowadzonych przez Meléndez-Martíneza, Vicario i Heredia [2007] zawartość witaminy C w świeżych handlowych sokach pomarańczowych, pochodzących od pięciu producentów, mieści się w zakresie 197–440 mg/l. Oznaczono także zawartość tej witaminy w świeżym handlowym soku mandarynkowym, która wynosiła 350 mg/l.

Na zawartość witaminy C w sokach cytrusowych mogą wpływać różne czynniki, takie jak odmiana owoców, stopień ich dojrzałości, warunki uprawy, a także proces technologiczny i warunki przechowywania soków [Arena, Fallico i Maccarone 2001; Klimczak i in. 2007; Martí i in. 2009]. Arena, Fallico i Maccarone [2001] oceniali zawartość kwasu askorbinowego w sokach pomarańczowych świeżo wyciśniętych oraz handlowych otrzymanych z koncentratu (FC) i nie z koncentratu (NFC) i stwierdzili wyższą zawartość witaminy C w sokach świeżo wyciśniętych w porównaniu z sokami handlowymi oraz w sokach NFC w porównaniu z sokami FC.

Na podstawie przeprowadzonej charakterystyki związków występujących w badanych sokach cytrusowych stwierdzono, że właściwości inhibicyjne soków

cytrusowych wobec tyrozynazy były związane głównie z obecnością w sokach witaminy C i flawanonów (tabela 4, rozdział 2.2.3). Sok z grejpfruta, pomimo najwyższej zawartości flawanonów (narynginy i narirutyny) i zawartości witaminy C porównywalnej do soku z mandarynek, wykazywał nieznacznie słabsze właściwości inhibicyjne wobec tyrozynazy w porównaniu z pozostałymi sokami (tabela 12, 13). Może to wskazywać na antagonistyczne oddziaływanie pomiędzy kwasem askorbinowym i flawanonami. Interakcje pomiędzy narynginą lub hesperydyną a kwasem askorbinowym, wyrażające się w różnej aktywności przeciwrodnikowej mierzonej przy użyciu np. testu DPPH, badała Gliszczyńska-Świągło [2010]. Autorka ta wykazała oddziaływania antagonistyczne pomiędzy narynginą i kwasem askorbinowym, które najbardziej uwidaczniały się w mieszaninie, w której naryngina ilościowo przeważała nad kwasem askorbinowym. Natomiast oddziaływania pomiędzy hesperydyną i kwasem askorbinowym względem rodnika DPPH określono jako addytywne.

W dostępnej literaturze niewiele jest danych dotyczących wpływu soków z owoców cytrusowych na aktywność PPO z grzyba. Abirami, Nagarani i Siddhuraju [2014] badali wpływ świeżych soków z limonki (*Citrus hystrix*) oraz pomarańczy olbrzymiej czerwonej i białej (*Citrus maxima*) na aktywność tyrozynazy w układzie modelowym. Wykazano, że badane soki z owoców cytrusowych skutecznie hamowały aktywność tyrozynazy, w zakresie od 77 do 81%.

Natomiast badania przeprowadzone przez Zhanga i in. [2007] oraz Sasaki i Yoshizaki [2002] wykazały, że ekstrakty pozyskiwane ze skórek owoców cytrusowych (*Citrus unshiu*), stanowiących produkt uboczny przy produkcji soków, wykazują zdolność hamowania aktywności tyrozynazy (IC_{50} odpowiednio 4,80 i 2,43 mg/ml). Wyizolowana z tych ekstraktów nobiletyna była efektywnym inhibitorem tyrozynazy. Natomiast hesperydyna wykazywała umiarkowane właściwości inhibicyjne. Itoh i in. [2009] przebadali wpływ ekstraktu z niedojrzałych pomarańczy (*Citrus hussaku*) na aktywność PPO pochodzącej z grzyba. Właściwości inhibicyjne ekstraktu z pomarańczy wobec tyrozynazy ($IC_{50} = 4,70$ mg/ml) były związane z obecnością w ekstrakcie flawanonów (naringina, neohesperydyna, narirutyna i hesperydyna). Spośród tych związków najbardziej skutecznymi inhibitorami tyrozynazy były naringina ($IC_{50} = 1,9$ mM) i narirutyna ($IC_{50} = 2,0$ mM). Oprócz ekstraktów hydrolaty cytrusowe, będące produktem ubocznym przy destylacji z parą wodną owoców, również wykazują zdolność hamowania aktywności tyrozynazy. Wykazano, że właściwości te wynikają z obecności w hydrolatach terpenów [Lante i Tinello 2014].

Podsumowując uzyskane w niniejszej pracy wyniki, stwierdzono, że badane ekstrakty i soki cytrusowe wykazywały zdolność hamowania aktywności tyrozynazy, co było związane z zawartością w nich naturalnych przeciwutleniaczy. W dalszej części pracy omówiono wyniki badań własnych dotyczących ich skuteczności w hamowaniu brązowienia mętnego soku jabłkowego przed przechowywaniem i po przechowywaniu (rozdział 6.3).

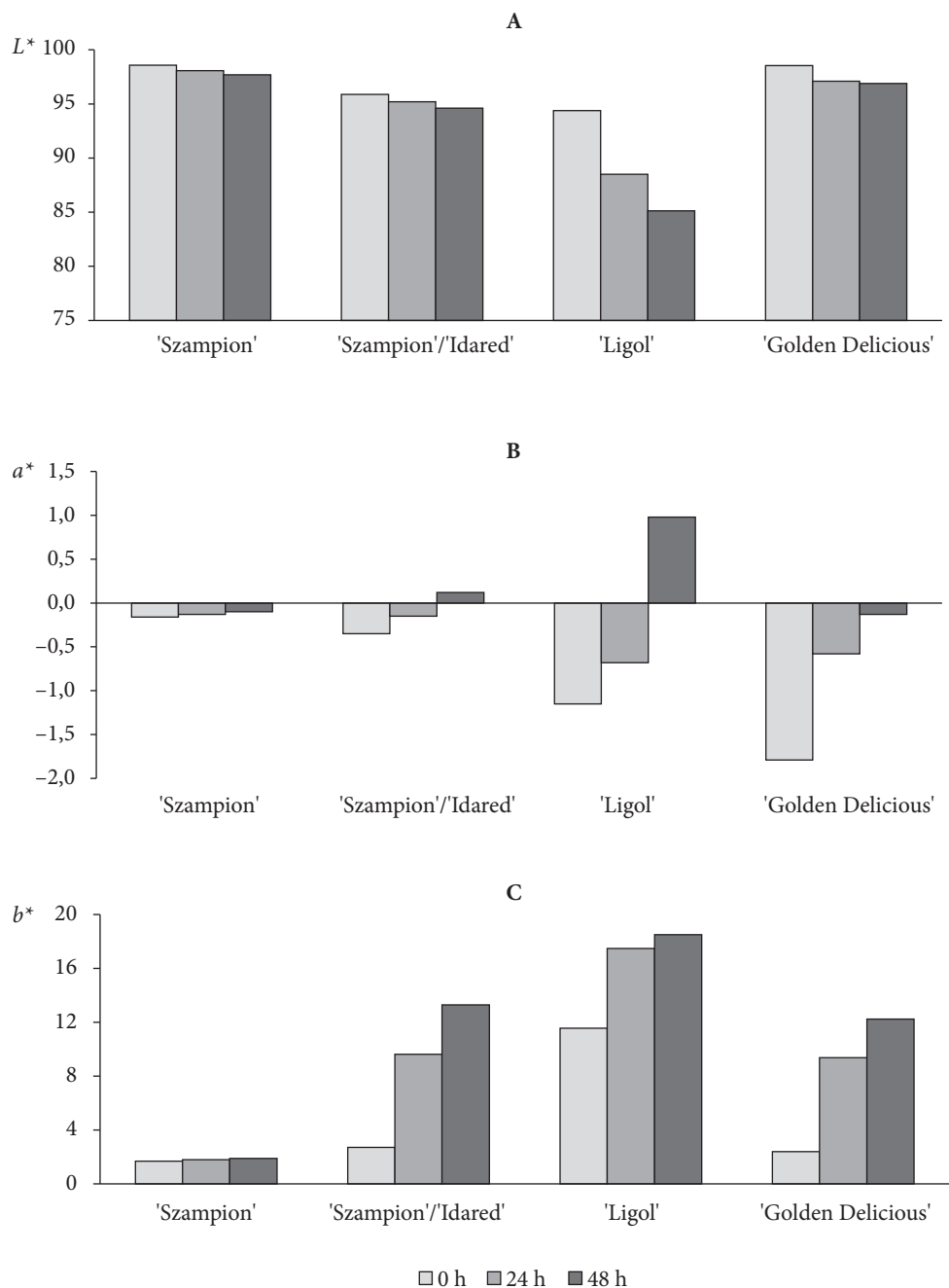
6.2. Wpływ odmiany jabłek i dodatku kwasu askorbinowego na barwę mętnego soku jabłkowego

6.2.1. Wpływ odmiany jabłek na barwę mętnego soku jabłkowego

Skłonność do ciemnienia miąższu jabłek oraz soków jabłkowych najczęściej jest oceniana na podstawie parametrów barwy w układzie CIE $L^*a^*b^*$. Zazwyczaj obserwowane zmiany parametrów barwy, w kierunku obniżenia wartości parametru L^* (jasność) oraz wzrostu parametru a^* (barwa czerwona) i ΔE^*_{ab} (całkowita różnica barwy), są związane z brązowieniem tych produktów [Oszmianski, Sokół-Łętowska i Kuczyński 1994; Özoğlu i Bayındırlı 2002; Soysal 2009; Suh, Park i Park 2011; Klimczak i Ćwiklińska 2013; Jabłońska-Ryś, Gustaw i Latoch 2014]. Według Li i in. [2007] najlepszym parametrem przy kontroli brązowienia plasterów jabłek oraz mętnych soków jabłkowych jest parametr a^* oraz ΔE^*_{ab} . Suh, Park i Park [2011] wykazali także przydatność parametru b^* w monitorowaniu brązowienia soku jabłkowego odmiany Fuji. Hirschler [2012] zaleca ostrożność w interpretacji parametru ΔE^*_{ab} w badaniach nad brązowieniem żywności. Parametr ten, używany do opisywania zmian barwy, pokazuje jedynie „ilość” różnicy barwy, natomiast nie przedstawia kierunku jej zmian. Dlatego jeśli istotne jest pokazanie, w jakim kierunku przebiegają zmiany barwy, lepiej jest stosować jeden z indeksów: bieli (WI; ang. *whiteness index*), żółtocienia (YI; ang. *yellowness index*) czy brązowienia (BI; ang. *browning index*) [Hirschler 2012]. Indeks brązowienia (BI) stosuje się w celu scharakteryzowania ogólnych zmian barwy podczas jej ciemnienia. Wyznacza się go na podstawie parametrów barwy L^* , a^* i b^* albo jako zmianę absorbancji badanych próbek w czasie [Palou i in. 1999; Hirschler 2012; Pathare, Opara i Al.-Said 2013].

Na rysunku 11 oraz w tabeli w aneksie przedstawiono wyniki badań własnych nad wpływem odmiany na zmiany barwy wybranych mętnych soków jabłkowych w czasie 48 h przechowywania w temperaturze 4°C. Na podstawie wyznaczonych wartości L^* , a^* i b^* obliczono parametr ΔE^*_{ab} , BI oraz YI (tabela 15). Ponadto oznaczono aktywność PPO w otrzymanych sokach przed przechowywaniem.

Badaniami objęto mętne soki jabłkowe przed przechowywaniem i po przechowywaniu (48 h 4°C), przygotowane w warunkach laboratoryjnych z odmiany ‘Szampion’, ‘Ligol’, ‘Golden Delicious’, oraz sok będący mieszaniną jabłek z odmiany ‘Szampion’ i ‘Idared’ (80:20). Wynikało to z faktu, że sok z odmiany ‘Idared’ w ciągu kilku minut po otrzymaniu wyraźnie zmieniał barwę, więc zdecydowano się użyć go jedynie jako dodatek do soku z odmiany ‘Szampion’. Dużą podatność jabłek odmiany ‘Idared’ na ciemnienie wykazali w swoich badaniach Biegańska-Marecik i Czapski [2003] oraz Seliwanowicz i in. [2005].



Rysunek 11. Zmiany parametrów barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) mętnych soków jabłkowych podczas przechowywania

Źródło: Badania własne

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała wpływ odmiany oraz czasu przechowywania na wartości parametrów L^* , a^* i b^* . Soki przed przechowywaniem z odmiany ‘Szampion’ i ‘Golden Delicious’ charakteryzowały się najwyższą jasnością ($L^* = 98,60$), natomiast najniższą – sok z odmiany ‘Ligol’ ($L^* = 94,38$) oraz sok mieszany ($L^* = 95,88$). Podczas przechowywania obserwowano we wszystkich sokach obniżenie wartości parametru L^* (rysunek 11, tabela w aneksie).

Tabela 15. Zmiany parametrów barwy (ΔL^* , Δa^* , Δb^*), całkowitej różnicy barwy ΔE^*_{ab} , indeksu brązowienia (ΔBI) oraz indeksu zażółcenia (ΔYI) mętnych soków jabłkowych podczas przechowywania

Czas przechowywania [h]	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}	ΔBI	ΔYI
‘Szampion’						
24	-0,50	0,03	0,10	0,5	0,1	0,2
48	-0,89	0,06	0,20	0,9	0,3	0,3
‘Szampion’/‘Idared’						
24	-0,67	0,20	6,91	7,0	7,7	10,4
48	-1,26	0,47	10,59	10,7	12,2	16,0
‘Ligol’						
24	-5,88	0,47	5,91	8,4	8,9	10,7
48	-9,26	2,13	6,94	11,8	12,8	13,6
‘Golden Delicious’						
24	-1,44	1,21	6,98	7,2	8,3	10,3
48	-1,65	1,66	9,84	10,1	11,9	14,6

Źródło: Badania własne.

Najmniejsze pociemnienie, wyrażone jako ΔL^* (różnica pomiędzy wartością parametru L^* soku przechowywanego a wartością dla soku nieprzechowywanego), stwierdzono w próbkach soku z odmiany ‘Szampion’ (-0,89), natomiast największe w sokach z odmiany ‘Ligol’ (-9,26) (tabela 15).

W badanych nieprzechowywanych sokach jabłkowych zauważalny był udział barwy zielonej (ujemne wartości a^*) (rysunek 11, tabela w aneksie). Podczas przechowywania próbek soków zaobserwowano zmianę wartości parametru a^* w kierunku barwy czerwonej. Najmniejsze pociemnienie, wyrażone jako Δa^* , stwierdzono w soku z odmiany ‘Szampion’ (0,06), zaś największe w soku z odmiany ‘Ligol’ (2,13) (tabela 15).

Wartości parametru b^* soków przed przechowywaniem kształtowały się w zakresie od 1,69 (‘Szampion’) do 12,67 (‘Ligol’). W sokach przechowywanych zaobserwowano zwiększenie intensywności barwy żółtej (rysunek 11, tabela w aneksie).

Przy analizie parametru ΔE^*_{ab} , informującego o całkowitej różnicy barwy posłużono się interpretacją tego parametru podaną przez Cserhalmi i in. [2006]: 0–0,5 (niezauważalna zmiana barwy), 0,5–1,5 (nieznacznie zauważalna zmiana barwy),

1,5–3,0 (zauważalna zmiana barwy), 3,0–6,0 (dobrze widoczna zmiana barwy) i > 6,0 (duża różnica barwy). Po 48 h przechowywania, podobnie jak w przypadku analizy parametrów ΔL^* i Δa^* , najmniejsze zmiany barwy nastąpiły w sokach z odmiany 'Szampion' (0,9 – różnica barw nieznacznie zauważalna). W przypadku pozostałych soków wartość $\Delta E^*_{ab} > 6,0$, co świadczyło o wyraźnie przebiegającym procesie brunatnienia (tabela 15).

Podczas przechowywania we wszystkich sokach obserwowano wzrost wartości indeksu brązowienia (BI) (tabela 15). Po 48 h przechowywania najmniejsze zmiany wartości BI stwierdzono w soku 'Szampion' ($\Delta BI = 0,3$). W przypadku pozostałych soków zaobserwowany wzrost BI świadczył o postępującym procesie brunatnienia soków.

Wyznaczono także indeks zażółcenia (YI), dla którego obserwowano podobną tendencję zmian jak w przypadku ΔE^*_{ab} i ΔBI (tabela 15). Po 48 h przechowywania sok z odmiany 'Szampion' charakteryzował się najmniejszym stopniem zażółcenia ($\Delta YI = 0,3$), natomiast sok mieszany ('Szampion'/'Idared') – największym ($\Delta YI = 16,0$).

W niniejszej pracy oznaczono także aktywność PPO w badanych nieprzechowywanych sokach. PPO wykazywała najniższą aktywność w soku z odmiany 'Szampion' (3,4 j/min), który w najmniejszym stopniu ulegał brązowieniu w trakcie przechowywania, natomiast najwyższą w soku 'Ligol' (9,8 j/min). W soku z odmiany 'Golden Delicious' i mieszanym ('Szampion'/'Idared') zmierzona aktywność PPO była porównywalna i wynosiła odpowiednio 6,5 i 6,3 j/min.

Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy [Biegańska-Marecik i Czapski 2003; Jabłońska-Ryś, Gustaw i Latoch 2014], którzy ocenili odmianę 'Szampion' jako najmniej podatną na brunatnienie oraz 'Ligol' jako odmianę bardzo szybko ciemniejącą. Wykazano, że niska podatność na brunatnienie jabłek i soków z odmiany 'Szampion' związana jest z niską aktywnością polifenolooksydazy oraz z małą zawartością kwasu chlorogenowego, w porównaniu do jabłek z innych odmian [Podsędek i in. 2000; Kołodziejczyk i in. 2010].

6.2.2. Wpływ dodatku kwasu askorbinowego na barwę mętnego soku jabłkowego

Badania dotyczące wpływu dodatku kwasu askorbinowego na brązowienie enzymatyczne mętnego soku jabłkowego były prowadzone przez wielu badaczy [Oszmiański, Sokół-Łętowska i Kuczyński 1994, Özoğlu i Bayindirli 2002; Li i in. 2007; Tochi i in. 2009; Teleszko, Kolniak i Oszmiański 2010; Suh, Park i Park 2011]. Jednak niewiele jest danych na temat wpływu dodatku KA na zmiany barwy niepasteryzowanego mętnego soku jabłkowego podczas przechowywania w warunkach chłodniczych. Większość badań obejmujących soki niepasteryzowane była prowadzona w temperaturze pokojowej, nie dłużej niż 24 h [Özoğlu i Bayindirli 2002; Tochi i in. 2009; Suh, Park i Park 2011].

W tabeli w aneksie zestawiono wyniki badań własnych nad wpływem dodatku kwasu askorbinowego na zmiany barwy (parametr L^* , a^* i b^*) wybranych mętnych soków jabłkowych w czasie 48 h przechowywania w temperaturze 4°C. Badaniami objęto soki z odmiany ‘Szampion’, ‘Ligoł’, ‘Golden Delicious’ oraz sok będący mieszaniną soku ‘Szampion’ i ‘Idared’ (80 : 20). Zastosowano dodatek kwasu askorbinowego do soków w ilości 0,05, 0,18 i 0,32 g/l. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała wpływ odmiany, ilości kwasu askorbinowego oraz czasu przechowywania na wartości parametrów L^* , a^* i b^* .

Dodatek kwasu askorbinowego w ilości 0,05 i 0,18 g/l nie wpłynął istotnie na jasność badanych nieprzechowywanych soków jabłkowych (tabela w aneksie). Zaobserwowano nieznaczne pojaśnienie nieprzechowywanych soków z odmiany ‘Szampion’/‘Idared’ oraz ‘Ligoł’ z dodatkiem 0,32 g KA/l. Na podstawie wyznaczonego parametru ΔL^* stwierdzono, że dodatek tego inhibitora w ilości 0,32 g/l powodował wolniejsze ciemnienie soków w czasie przechowywania w porównaniu z sokami niewzbogaconymi. Dodatek KA na poziomie 0,32 g/l hamował brązowienie soków przechowywanych (48 h) w 42, 75, 56 i 36% (odpowiednio ‘Szampion’, ‘Szampion’/‘Idared’, ‘Ligoł’ oraz ‘Golden Delicious’) w stosunku do soku bez dodatku.

Takie same stężenia KA jak w prezentowanych badaniach (0,3 mM – 0,05 g/l, 1 mM – 0,18 g/l, 1,8 mM – 0,32 g/l) dodawał Özoğlu i Bayindirli [2002] do soku z odmiany ‘Golden Delicious’. Zmiany jasności soku (L^*) obserwowano przez 24 h w temperaturze 25°C. Stwierdzono, że KA dodany do soku w ilości 0,32 g/l skutecznie hamował brązowienie soku przez pierwsze 4 h (inhibicja 100%). Po 24 h odnotowano zmniejszenie efektywności KA (inhibicja 40%). Natomiast Tochi i in. [2009] wykazali, że 1 mM (0,18 g/l) KA spowodował zahamowanie brązowienia (na podstawie wartości parametru L^*) soku z odmiany ‘Golden Delicious’ o 78% (10 h, 25°C).

Rozpatrując wpływ dodatku KA na parametr a^* i b^* , stwierdzono, że wraz ze zwiększeniem ilości KA w soku wartość a^* i b^* ulegała zmniejszeniu, czyli w przeciwieństwie do soków niewzbogaconych, soki z dodatkiem KA były po przechowywaniu bardziej zielone niż czerwone i mniej żółte. Wyjątek stanowił sok z odmiany ‘Ligoł’ w którym wartość a^* uległa zwiększeniu.

Zmiany całkowitej różnicy barwy ΔE^*_{ab} , indeksu brązowienia (ΔBI) oraz indeksu zażółcenia (ΔYI) w czasie 48 h przechowywania mętnych soków jabłkowych z dodatkiem kwasu askorbinowego przedstawiono w tabeli 16.

Dodatek kwasu askorbinowego do soku z odmiany ‘Szampion’ w ilości 0,05, 0,18 i 0,32 g/l nie wpłynął istotnie na wartość parametru ΔE^*_{ab} . Zmiana barwy tych soków podczas przechowywania była nieznacznie zauważalna ($\Delta E^*_{ab} < 1,0$), podobnie jak dla soku bez dodatku KA. W przypadku soku wzbogaconego w 0,32 g kwasu askorbinowego po 48 h przechowywania wykazano zmniejszenie brązowienia o 41% w stosunku do soku bez dodatku. W pozostałych badanych sokach wraz ze

wzrostem ilości KA obserwowano zmniejszenie całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}). KA w ilości 0,05 g/l nie wpłynął na hamowanie brązowienia soków (wartości ΔE^*_{ab} w tych sokach były porównywalne do wartości soków bez dodatku KA). Największy stopień inhibicji reakcji brązowienia soków przechowywanych wykazano przy zastosowaniu dodatku KA w ilości 0,32 g/l, który wynosił 79, 42 i 76 odpowiednio w soku z odmian 'Szampion'/'Idared', 'Ligol' i 'Golden Delicious'.

Tabela 16. Zmiany całkowitej różnicy barwy ΔE^*_{ab} , indeksu brązowienia (ΔBI) oraz indeksu zażółcenia (ΔYI) mętnych soków jabłkowych z dodatkiem kwasu askorbinowego (KA) podczas przechowywania

KA [g/l]	ΔE^*_{ab}		ΔBI		ΔYI	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
'Szampion'						
0	0,51	0,91	0,13	0,26	0,16	0,31
0,05	0,42	0,95	0,08	0,43	0,04	0,53
0,18	0,78	0,93	0,03	0,07	0,02	0,06
0,32	0,44	0,54	0,05	0,17	0,04	0,14
'Szampion'/'Idared'						
0	6,95	10,68	7,66	12,21	10,40	16,04
0,05	6,83	9,80	7,44	11,07	10,22	14,72
0,18	1,20	3,70	1,17	4,10	1,58	5,44
0,32	0,52	2,26	0,01	2,66	-0,39	3,54
'Ligol'						
0	8,35	11,77	8,94	12,81	10,70	13,55
0,05	8,01	11,53	8,85	11,88	10,51	12,38
0,18	5,99	11,28	4,93	8,29	6,23	9,11
0,32	5,59	6,75	6,50	7,46	8,28	8,74
'Golden Delicious'						
0	7,23	10,11	8,29	11,86	10,32	14,57
0,05	6,99	9,95	8,05	11,65	9,96	14,31
0,18	3,47	8,61	4,12	10,22	4,79	12,17
0,32	0,99	2,39	0,83	2,49	0,17	1,71

Źródło: Badania własne.

Najmniejszą zmianę wartości indeksu brązowienia (ΔBI) uzyskano, podobnie jak w przypadku parametru ΔE^*_{ab} , w soku z odmiany 'Szampion' (tabela 16). Uzyskane wartości ΔBI w tym soku były bardzo niskie i wynosiły od 0,07 (0,18 g KA/l) do 0,43 (0,05 g KA/l). Najbardziej efektywny w hamowaniu ciemnienia tego soku był KA dodany w ilości 0,18 g/l (72-procentowa inhibicja). Zwiększenie dodatku kwasu askorbinowego nie wpłynęło na obniżenie wartości BI ($p > 0,05$). Po 48 h przechowywania stopień hamowania brązowienia soku z dodatkiem 0,32 g KA/l wynosił około 35%. W przypadku pozostałych soków przechowywanych z dodatkiem

KA w ilości 0,18 i 0,32 g/l zaobserwowano znacznie mniejszy wzrost wartości indeksu brązowienia (ΔBI) w porównaniu z sokami bez dodatku KA (tabela 16). Kwas askorbinowy w ilości 0,05 g/l nie wpłynął w znaczącym stopniu na hamowanie brązowienia soków mierzonego poprzez wartość BI ($p > 0,05$). Stopień brązowienia tych soków ulegał zmniejszeniu wraz ze wzrostem dodatku inhibitora. KA dodany w ilości 0,32 g/l zmniejszał brązowienie przechowywanych próbek soków z odmian 'Szampion'/'Idared', 'Ligo' i 'Golden Delicious' o 78, 42 i 79%, odpowiednio. Uzyskane wyniki dla soków z odmian 'Szampion'/'Idared', 'Ligo' i 'Golden Delicious' były porównywalne z wynikami uzyskanymi dla parametru ΔE^*_{ab} .

Rozpatrując zmiany parametru YI podczas przechowywania, stwierdzono, że spośród badanych soków wzbogaconych w kwas askorbinowy sok z odmiany 'Szampion' charakteryzował się najmniejszym stopniem zażółcenia (tabela 16). Wartości ΔYI dla tego soku po 48 h przechowywania kształtowały się od 0,06 (0,18 g/l KA) do 0,53 (0,05 g/l KA). Najbardziej efektywną dawką KA w zmniejszaniu stopnia zażółcenia soku z odmiany 'Szampion' okazało się 0,18 g/l (80-procentowy spadek). W przypadku pozostałych soków najmniejszy stopień zażółcenia, wyznaczony na podstawie parametru ΔYI , zaobserwowano przy stężeniu 0,32 g/l kwasu askorbinowego. Analizując wyniki badań innych autorów, Hirschler [2012] wysunął wniosek, że lepszym parametrem w ocenie zażółcenia jest YI niż b^* , ponieważ bierze się w nim pod uwagę również jasność próbki.

Ponadto stwierdzono, że w przypadku soku z odmiany 'Golden Delicious' wyznaczony stopień hamowania brązowienia soku przez KA (0,32 g/l) na podstawie parametru ΔL^* (36%) był znacznie niższy w porównaniu z uzyskanym na podstawie parametrów ΔE^*_{ab} i ΔBI (76 i 79%, odpowiednio). Było to związane z tym, że jasność tego soku (L^*) praktycznie nie ulegała zmianie podczas przechowywania. Obserwowane zmiany brązowienia tego soku były związane ze zmianami parametru a^* i b^* . Zatem w tym przypadku ocena stopnia brązowienia na podstawie tylko parametru ΔL^* doprowadziłaby do błędnych wniosków.

Podsumowując, dobór odpowiedniej odmiany jabłek do produkcji soków mętnych oraz zastosowanie dodatku kwasu askorbinowego w procesie ich otrzymywania są jednymi z najprostszych i najczęstszych sposobów kontroli ciemnienia tego rodzaju soków. Spośród przebadanych soków sok z odmiany 'Szampion' charakteryzował się minimalnym stopniem brunatnienia podczas 48 h przechowywania w temperaturze 4°C. Natomiast sok z odmiany 'Ligo' ciemniał najszybciej i w największym stopniu, co świadczy o jego nikłej przydatności do produkcji soków mętnych.

Dawka kwasu askorbinowego pozwalająca na zahamowanie enzymatycznego brązowienia (na podstawie parametru ΔE^*_{ab} , ΔBI i ΔYI) zależała od odmiany i wynosiła 0,18 g/l (odmiana 'Szampion') i 0,32 g/l (odmiany 'Szampion'/'Idared', 'Ligo', 'Golden Delicious'). Najbardziej podatny na działanie KA o tym stężeniu był sok z odmiany 'Golden Delicious' i sok mieszany.

Wyniki niniejszego badania potwierdziły, że YI jest dobrym parametrem do śledzenia zmiany barwy przechowywanego mętnego soku jabłkowego. Wraz z parametrem ΔE^*_{ab} i BI powinien być stosowany w kontroli jakości tego produktu. Na podstawie powyższych badań do dalszych badań wytypowano sok z odmiany ‘Golden Delicious’.

6.3. Wpływ ekstraktów roślinnych i soków z owoców cytrusowych na brunatnienie mętnego soku jabłkowego

6.3.1. Charakterystyka chemiczna mętnego soku jabłkowego

Wykorzystywane do badań w ramach niniejszej pracy mętne soki jabłkowe otrzymano w warunkach laboratoryjnych. Surowcem były jabłka z odmiany ‘Golden Delicious’. Badania prowadzono w latach 2013–2014. Próbkę soków jabłkowych poddano analizie obejmującej badania wyszczególnione na rysunku 10 (rozdział 5.2).

W tabeli 18 przedstawiono zawartość wybranych związków polifenolowych w nieprzechowywanych mętnych sokach jabłkowych.

Tabela 17. Zawartość wybranych związków polifenolowych w badanych sokach jabłkowych w latach 2013–2014 [mg/l]

Związek	SJ1 (2013)	SJ2 (2014)	SJ3 (2014)
Flawan-3-ole			
(+)-katechina	5,2 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,0 ± 0,1
(-)-epikatechina	30,4 ± 0,6	22,8 ± 0,5	20,3 ± 0,3
Kwasy hydroksycynamonowe			
Kwas chlorogenowy	144,8 ± 4,9	125,0 ± 2,4	98,1 ± 1,9
Kwas <i>p</i> -kumarylochinowy	5,5 ± 0,1 ^a	5,3 ± 0,2 ^a	7,4 ± 0,2
Dihydrochalkony			
Florydzyna	9,5 ± 0,3	5,6 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Floretyno-2'-ksyloglukozyd	3,3 ± 0,1	4,5 ± 0,1 ^a	4,5 ± 0,1 ^a
Flawonole			
Kwercetyno-3- <i>O</i> -galaktozyd	0,6 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,0
Kwercetyno-3- <i>O</i> -ramnozyd	1,6 ± 0,0	2,6 ± 0,1	1,5 ± 0,0
Kwercetyno-3- <i>O</i> -glukozyd	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,0 ^a
Suma	201,4 ± 6,2	169,6 ± 3,4	144,2 ± 2,6

SJ1 – mętny sok jabłkowy wykorzystywany w doświadczeniu z ekstraktami z zielonej herbaty; SJ2 – mętny sok jabłkowy wykorzystywany w doświadczeniu z sokami cytrusowymi; SJ3 – mętny sok jabłkowy wykorzystywany w doświadczeniu z ekstraktem z rokitnika i pestek winogron.

^a Wartości średnie w wierszach nie różnią się istotnie statystycznie ($p > 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała, że na zawartość związków fenolowych w mętnych sokach jabłkowych istotny wpływ miał okres zbioru owoców ($p < 0,05$). W badanych mętnych sokach jabłkowych zidentyfikowano i określono ilościowo związki polifenolowe z grupy flawan-3-oli, kwasów hydroksycynamono- wych, dihydrochalkonów i flawonoli. Spośród flawonoli oznaczono (+)-katechinę i (-)-epikatechinę (tabela 17). W pracy skupiono się tylko na monomerycznych flawanolach z uwagi na ich decydujący udział w brązowieniu soku jabłkowego.

W badanych sokach ogólna ilość polifenoli oznaczona chromatograficznie wynosiła od 144,2 (SJ3) do 201,4 (SJ1) mg/l soku (tabela 17). Największą zawartością flawan-3-oli charakteryzował się sok jabłkowy 1 (35,7 mg/l). Kwas chlorogenowy w największych ilościach występował również w SJ1 (144,8 mg/l), stanowiąc 72% ogólnej ilości polifenoli. Najmniej tego związku stwierdzono w soku SJ3 (98,1 mg/l). Spośród dihydrochalkonów, florydzyina występowała w badanych sokach w większych ilościach niż floretyno-2'-ksyloglukozyd, stanowiąc średnio 65% całkowitej ilości dihydrochalkonów. Najwyższą zawartością florydzyiny odznaczał się sok SJ1 (9,5 mg/l). Flawonole w badanych sokach występowały w najmniejszych ilościach. Dominującym związkiem był kwercetyno 3-O-ramnozyd, którego najwięcej oznaczono w soku SJ2 (2,6 mg/l).

Oznaczanie oraz identyfikacja związków polifenolowych w mętnych sokach jabłkowych była przedmiotem wielu badań [Kahle, Kraus i Richling 2005; Oszmiański in. 2007; Guo i in. 2013; Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło 2013; Teleszko, Nowicka i Wojdyło 2016]. Główną frakcję związków polifenolowych w mętnych sokach jabłkowych stanowią flawan-3-ole oraz kwasy hydroksycynamono- we. Wśród flawonoli dominuje (-)-epikatechina i jej dimer procyanidyna B2. (+)-Katechina przeważnie występuje w mniejszych ilościach, a jej stosunek do (-)-epikatechiny mieści się w szerokim zakresie, określony przez różnych autorów wynosi: od 1:2 do 1:6 [Guo i in. 2013], od 1:3 do 1:11 [Markowski i in. 2015], od 1:3 do 1:16 [Kahle, Kraus i Richling 2005], od 1:6 do 1:31 [Teleszko, Nowicka i Wojdyło 2016] w zależności od odmiany owoców. Spośród fenolokwasów najpowszechniej występującymi są kwas chlorogenowy oraz kwas *p*-kumarylochinonowy, przy czym kwas chlorogenowy jest dominującym związkiem. Jego zawartość w mętnych sokach jabłkowych kształtuje się w szerokim zakresie w zależności od odmiany jabłek: 47,0 ('Starkimson') – 73,0 ('Gala') mg/l [Guo i in. 2013], 83,3 ('Szampion') i 129,9 ('Idared') mg/l [Oszmiański i in. 2007], 114,5 ('Fiesta') – 160,9 ('Gloster') mg/l [Teleszko, Nowicka i Wojdyło 2016]. Kahle, Kraus i Richling [2005] wykazali większą zawartość kwasu chlorogenowego w sokach otrzymanych z jabłek cydrowych (81–488 mg/l) niż deserowych (33–54 mg/l). Autorzy ci, przebadali także 21 handlowych soków mętnych pod kątem profilu związków fenolowych i stwierdzili, że kwas chlorogenowy stanowił główną frakcję polifenoli. Dihydrochalkony występują w mętnych sokach jabłkowych w mniejszych ilościach, stanowiąc 1–4% całkowitej ilości polifenoli [Teleszko, Nowicka i Wojdyło 2016]. Spośród nich

florydzyina i floretyno-2'-ksyloglukozyd są związkami dominującymi. Teleszko, Nowicka i Wojdyło [2016], Markowski i in. [2015] oraz Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło [2013] wykazali, że w mętnych sokach jabłkowych zawartość florydzyiny jest większa niż floretyno-2'-ksyloglukozydu. Z kolei Kahle, Kraus i Richling [2005] oraz Guyot i in. [2003] podają, że w niektórych odmianach istnieje zależność odwrotna. Stwierdzono większą zawartość floretyno-2'-ksyloglukozydu w sokach otrzymanych z jabłek cydrowych oraz deserowych, takich jak 'Golden Delicious' i 'Granny Smith'. Również w sokach handlowych związek ten dominował [Kahle, Kraus i Richling 2005]. Flawonole w mętnych sokach jabłkowych występują w małych ilościach, w formie glikozydowej, w postaci pochodnych kwercetyny, jako galaktozyd, glukozyd, arabinozyd, ksylozyd i ramnozyd. Spośród tych pięciu flawonoli kwercetyno-3-O-galaktyzyd i kwercetyno-3-O-ramnozyd są związkami najpowszechniej występującymi i dominującymi. Obecność pozostałych flawonoli w sokach zależy od odmiany jabłek [Guo i in. 2013; Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło 2013; Teleszko, Nowicka i Wojdyło 2016]. Kahle Kraus i Richling [2005] wykazali wyższą zawartość glikozydów kwercetyny w sokach otrzymanych z jabłek cydrowych (0,4–26,7 mg/l) niż deserowych (0,4–3,6 mg/l). Cyjanidyno-3-O-galaktozyd jest głównym związkiem z grupy antocyjanów zidentyfikowanym w owocach i mętnych sokach jabłkowych. Jego obecność i ilość zależy od odmiany jabłek. Teleszko, Nowicka i Wojdyło [2016] określili zawartość cyjanidyno-3-O-galaktozydu w czterech przebadanych sokach mętnych na poziomie od 0,18 ('Pinova' i 'Fiesta') do 0,60 ('Alwa') mg/l. Nie zidentyfikowali antocyjanów w soku z odmiany 'Golden Delicious' oraz 'Matsu'. Kahle Kraus i Richling [2005] również nie wykryli cyjanidyno-3-O-galaktozydu w soku z odmiany 'Golden Delicious', a także w innych analizowanych sokach. Średnia zawartość antocyjanów (suma cyjanidyno-3-O-galaktozydu i cyjanidyno-3-O-glukozydu) w 14 sokach jabłkowych otrzymanych z różnych odmian jabłek przez Kolniak-Ostek, Oszmiańskiego i Wojdyło [2013] wynosiła 0–0,5 mg/l, co stanowiło 0,1% całkowitej ilości polifenoli. Z kolei Mieszczakowska-Frać i in. [2015] podają, że soki z odmian czerwonomięzszowych stanowią bogate źródło antocyjanów.

Całkowita zawartość związków polifenolowych oznaczona chromatograficznie w mętnych sokach jabłkowych mieści się w szerokim zakresie, przez różnych autorów określanym jako: 86,0–305,0 mg/l [Guo i in. 2013], 250,1–1044,4 mg/l [Oszmiański i in. 2007], 154,4–970,0 mg/l [Kahle, Kraus i Richling 2005]. Markowski i in. [2015] wykazali znaczne zróżnicowanie w zawartości związków fenolowych w mętnych sokach jabłkowych nie tylko w zależności od odmiany, ale także od regionu uprawy owoców oraz zastosowanego procesu technologicznego. Średnia zawartość związków polifenolowych w sokach otrzymanych z jabłek odmian hodowanych we Francji wynosiła 581 mg/l i była wyższa niż w sokach z tych samych odmian pochodzących z Polski (343 mg/l). Soki z odmian uprawianych we Francji zawierały znacznie większe ilości (+)-katechiny, (-)-epikatechiny oraz

procyjanidyn w porównaniu z sokami tych samych odmian pochodzących z Polski. Z kolei Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło [2013] wskazali, że okres zbioru jabłek istotnie determinuje zawartość polifenoli w mętnych sokach jabłkowych. Całkowita zawartość polifenoli, oznaczona chromatograficznie, w badanych przez tych autorów sokach mieściła się w zakresie 168,3–1114,7 mg/l.

Wyniki analiz zawartości związków polifenolowych w mętnych sokach jabłkowych z odmiany 'Golden Delicious' są zbieżne z danymi literaturowymi [Kahle, Karus i Richling 2005; Guo i in. 2013; Teleszko, Nowicka i Wojdyło 2016]. Podobny sposób otrzymywania soków jak w niniejszej pracy (przy użyciu sokowirówki), stosowali w swoich badaniach Guo i inni [2013]. Autorzy ci przebadali 10 świeżo wyciśniętych soków uzyskanych z jabłek pochodzących z sześciu regionów Chin. W tabeli 18 zestawiono dane literaturowe dotyczące zawartości polifenoli w mętym soku jabłkowym z odmiany 'Golden Delicious'. Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło [2013], prowadząc trzyletnie badania nad składem związków fenolowych w mętnych sokach jabłkowych otrzymanych z 14 odmian, również wskazali, że lata zbioru owoców istotnie determinowały zawartość poszczególnych polifenoli w otrzymanych sokach.

Tabela 18. Zawartość związków polifenolowych w mętnych sokach jabłkowych z odmiany 'Golden Delicious' [mg/l]

Związek	Guo i in. [2013]	Kahle, Kraus i Richling [2005]	Teleszko, Nowicka i Wojdyło [2016]
Flawan-3-ole			
(+)-katechina	1,1–6,2	3,8	1,8
Procyjanidyna B1	0,5–7,5	5,5	10,9
Procyjanidyna B2	11,0–49,0	38,7	64,5
(–)-epikatechina	6,7–30,0	46,6	33,3
Procyjanidyna C1	0,7–2,14	n.o.	21,4
Kwasy hydroksycynamonowe			
Kwas chlorogenowy	40,0–84,0	37,6	135,3
Kwas <i>p</i> -kumarylochinowy	5,7–10,0	14,4	11,2
Dihydrochalkony			
Florydzyina	3,0–8,8	4,1	13,2
Floretyno-2'-ksyloglukozyd	3,2–8,1	7,6	4,7
Flawonole			
Kwercetyno-3-O-galaktozyd	0,5–1,1	< 0,4	1,0
Kwercetyno-3-O-ramnozyd	3,0–4,9	1,6	2,8
Kwercetyno-3-O-glukozyd	0,6–1,2	< 0,4	0,5
Kwercetyno-3-O-ksylozyd	0,5–0,9	< 0,4	0,6
Kwercetyno-3-O-arabinozyd	0,4–1,2	< 0,4	n.s.

+ – poniżej limitu oznaczania; n.o. – nie oznaczano; n.s. – nie stwierdzono.

W tabeli 19 przedstawiono wyniki badań własnych związanych z określeniem zawartości polifenoli ogółem, flawonoidów ogółem oraz zawartości witaminy C w badanych sokach jabłkowych (SJ1-SJ3). Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała, że na zawartość analizowanych parametrów w mętnych sokach jabłkowych istotny wpływ miał okres zbioru owoców ($p < 0,05$). Ogólna zawartość polifenoli w badanych sokach wynosiła od 322,6 (SJ3) do 434,8 (SJ1) mg/l soku. Natomiast zawartość flawonoidów ogółem mieściła się w zakresie od 242,9 (SJ3) do 302,6 (SJ1) mg/l soku. W badanych sokach stwierdzono niewielką ilość witaminy C, która wynosiła średnio 1,1 mg/l. Zmierzona aktywność PPO w soku SJ2 i SJ3 była porównywalna i wynosiła około 7 j/min PPO, natomiast w soku SJ1 aktywność tego enzymu była najwyższa (8,9 j/min; tabela 19).

Tabela 19. Zawartość związków polifenolowych ogółem, flawonoidów ogółem, witaminy C oraz aktywność PPO w badanych sokach jabłkowych

Sok jabłkowy	Związki polifenolowe ogółem [mg kwasu galusowego/l]	Flawonoidy ogółem [mg katechiny/l]	Witamina C [mg/l]	Aktywność PPO [j/min]
SJ1	434,8 ± 13,2 ^a	302,6 ± 11,0	0,6 ± 0,0	8,9 ± 0,33
SJ2	424,7 ± 13,8 ^a	246,1 ± 8,7 ^a	1,2 ± 0,0	6,7 ± 0,32 ^a
SJ3	322,6 ± 12,0	242,9 ± 8,1 ^a	1,5 ± 0,0	7,0 ± 0,40 ^a

Objaśnienia jak pod tabelą 17.

^a Wartości średnie w kolumnie, nie różnią się istotnie statystycznie ($p > 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Według danych literaturowych ogólna ilość polifenoli, oznaczona metodą Folina-Ciocalteu, w mętnych sokach jabłkowych kształtuje się w dość szerokim zakresie 59–1161 mg/l, w zależności od odmiany i sposobu uprawy owoców [Wojdyło, Oszmiański i Bielicki 2010; Begić-Akagić i in. 2011; Włodarska i in. 2016]. Włodarska i in. [2016] wykazali wyższą zawartość polifenoli ogółem w mętnych sokach jabłkowych z koncentratu FC (490–557 mg/l) w porównaniu z sokami otrzymanymi nie z koncentratu NFC (380–419 mg/l) i sokami świeżymi (483–507 mg/l). Soki jabłkowe nie należą do zasobnych w witaminę C. Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło [2013] podają, że średnia zawartość tej witaminy w mętnych sokach jabłkowych wynosi 7,0–12,5 mg/l, w zależności od odmiany jabłek. Jednak największą ilość witaminy C określono w soku z odmiany 'Szampion' (46,6 mg/l). Z kolei Mieszczakowska-Frać i in. [2015] nie stwierdzili obecności witaminy C w soku z odmiany 'Idared', natomiast w soku z odmiany 'Szampion' oznaczyli zawartość tej witaminy na podobnym poziomie jak w badaniach Kolniak-Ostek, Oszmiański i Wojdyło [2013] (51,8 mg/l).

Trudno jest bezpośrednio porównywać wyniki badań dotyczące aktywności PPO soków. Wynika to ze stosowania różnych metod oznaczania aktywności PPO, jak również możliwości oznaczania aktywności enzymu w soku lub aktywności PPO

soków. Wyniki uzyskane w badaniach własnych były niższe niż uzyskane przez Seliwanowicz i in. [2005], gdyż dotyczyły aktywności PPO w soku, a nie aktywności PPO soków jabłkowych. Seliwanowicz i in. [2005] badali aktywność PPO soków otrzymanych z sześciu odmian jabłek. Autorzy ci wykazali, że najwyższą aktywnością PPO charakteryzował się sok z jabłek 'Paula Red' (42 j/ml) i 'Lobo' (13,2 j/ml), najniższą sok z odmiany 'Szampion' (1,2 j/ml). Zaobserwowali także, że zawartość związków polifenolowych ogółem oraz (+)-katechiny, (-)-epikatechiny i kwasu chlorogenowego była zazwyczaj odwrotnie proporcjonalna do aktywności PPO. Zależności te nie były jednak istotne statystycznie. Z kolei Klimczak i Ćwiklińska [2013] w badaniach nad aktywnością PPO w mętym soku jabłkowym otrzymanym ze starych odmian jabłoni 'Grey Reneta', 'Żelazniak' i 'Cytrynowka' uzyskały wynik podobny do prezentowanych w niniejszej pracy (8,4 j/min). Autorki te, oznaczyły także zawartość związków fenolowych ogółem na poziomie 502 mg/l.

Zawartość ekstraktu ogólnego oraz kwasowość pH soku jabłkowego zależą od cech odmianowych owoców oraz czasu i warunków ich przechowywania [Nadulski, Strzałkowska i Kobus 2012]. Zawartość ekstraktu (w stopniach Brix) w badanych sokach wynosiła 13,0–13,5, natomiast wartość pH badanych soków wynosiła 3,60–3,70 (tabela 20).

Tabela 20. Zawartość ekstraktu oraz wartość pH w badanych sokach jabłkowych

Sok jabłkowy	Ekstrakt [^o Brix]	pH
SJ1	13,1 ± 0,2 ^{ab}	3,68 ± 0,02 ^b
SJ2	13,0 ± 0,1 ^b	3,70 ± 0,02 ^a
SJ3	13,5 ± 0,2 ^a	3,60 ± 0,01 ^c

Objaśnienia jak pod tabelą 17.

^{a-c} Wartości średnie w kolumnie, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Zgodnie z wytycznymi Kodeksu Praktyki AIJN [2013] minimalny poziom zawartości ekstraktu ogólnego w soku jabłkowym otrzymanym ze świeżego surowca wynosi 10,0 ^oBrix. Wszystkie badane soki spełniały te wymagania.

Podobne wyniki do uzyskanych w niniejszej pracy podczas badania mętnego soku jabłkowego z odmiany 'Golden Delicious' otrzymali Nadulski, Strzałkowska i Kobus [2012]. Zawartość ekstraktu i wartość pH soku wynosiła odpowiednio 13,1^oBx i 3,76. Z kolei Klimczak i Ćwiklińska [2013] w mętym soku jabłkowym otrzymanym ze starych odmian jabłoni oznaczyły zawartość ekstraktu i wartość pH na poziomie odpowiednio, 12 ^oBrix i 3,31. Włodarska i in. [2016] przebadali handlowe mętne soki jabłkowe (pasteryzowane i świeże) pochodzące od różnych producentów pod kątem zawartości ekstraktu i wartości pH. Oznaczony poziom badanych parametrów w świeżych sokach jabłkowych wynosił odpowiednio 10,6–11,7^oBrix oraz 3,33–3,63. Badania przeprowadzone przez Kudełka i Głuszek [2014] wykazały, że na omawiane parametry jakościowe nieklarowanego soku jabłkowego

wpływa także system uprawy owoców. Soki ekologiczne charakteryzowały się wyższą zawartością ekstraktu (12,09%) i niższą wartością pH (3,48) w porównaniu z sokami konwencjonalnymi (odpowiednio, 11,78% i 3,73).

6.3.2. Wpływ ekstraktów roślinnych na brunatnienie mętnego soku jabłkowego

Zaplanowano i przeprowadzono doświadczenie, którego celem było określenie wpływu wybranych ekstraktów roślinnych na brunatnienie mętnego soku jabłkowego z odmiany 'Golden Delicious' przed przechowywaniem i po przechowywaniu przez 48 h w temperaturze 4°C. Zastosowane ekstrakty roślinne (zielone herbaty, pestki winogron, rokitnik) zostały przebadane pod kątem zawartości związków polifenolowych oraz ich wpływu na aktywność PPO. Wyniki tych badań zaprezentowano w rozdziale 6.1.1. Dodatek ekstraktów z herbat (EH1-EH5) oraz ekstraktu z pestek winogron (EPW) do soku jabłkowego wynosił 1, 2 i 3 g/l, natomiast ekstraktu z rokitnika (ER) 2, 3 i 5 g/l. Próbkę soków jabłkowych bez dodatku i z dodatkiem ekstraktów roślinnych przed przechowywaniem i po przechowywaniu poddano analizie obejmującej badania wyszczególnione na rysunku 10 (rozdział 5.2). W doświadczeniu przechowalniczym spośród badanych ekstraktów z zielonych herbat zastosowano ekstrakt EH5 (handlowy, standaryzowany na zawartość polifenoli).

Wpływ dodatku ekstraktów roślinnych na zawartość związków polifenolowych ogółem i flawonoidów ogółem w nieprzechowywanym soku jabłkowym

W tabeli 21 przedstawiono wyniki badań własnych nad wpływem dodatku ekstraktów roślinnych na zawartość polifenoli ogółem i flawonoidów ogółem w nieprzechowywanym soku jabłkowym. Dodatek ekstraktu z zielonej herbaty (EH1-EH5) w ilości 1g/l wpłynął na zwiększenie zawartości polifenoli i flawonoidów ogółem w soku jabłkowym odpowiednio od około 35% (EH5) do 124% (EH1) i od 17% (EH5) do 89% (EH1).

Spśród badanych ekstraktów z zielonej herbaty EH1 zawierał najwięcej polifenoli oznaczonych metodą chromatograficzną (330,7 mg/g), natomiast EH5 – prawie dwukrotnie mniej w porównaniu z EH1 (tabela 7, rozdział 6.1.1).

Dodatek ekstraktu z pestek winogron (EPW) o stężeniu 1 g/l zwiększył zawartość związków polifenolowych ogółem i flawonoidów w badanych sokach o około 1,1 raza w odniesieniu do próby kontrolnej. Najmniejszy wzrost zawartości tych związków w soku zmierzono przy dodatku ekstraktu z rokitnika (ER), w ilości 2 g/l. Zawartość polifenoli ogółem w soku SJ3 wzrosła o około 26%, natomiast flawonoidów ogółem o 32%. Wraz ze wzrostem stężenia wszystkich badanych ekstraktów obserwowano wzrost zawartości tych związków w sokach.

Tabela 21. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na zawartość związków polifenolowych ogółem i flawonoidów ogółem w nieprzechowywanym soku jabłkowym

Sok jabłkowy z ekstraktami roślinnymi (g/l)	Związki polifenolowe ogółem [mg/l]	Flawonoidy ogółem [mg/l]
SJ1	435 ± 13	303 ± 11
SJ1+EH1		
1	975 ± 29	572 ± 15
2	1541 ± 53	772 ± 26
3	1803 ± 59	897 ± 31
SJ1+EH2		
1	757 ± 26	476 ± 9
2	1255 ± 28	629 ± 16
3	1509 ± 29	699 ± 16
SJ1+EH3		
1	809 ± 29	476 ± 12
2	1326 ± 39	596 ± 15
3	1579 ± 43	607 ± 13
SJ1+EH4		
1	640 ± 23	405 ± 6
2	976 ± 31	495 ± 11
3	1122 ± 23	538 ± 14
SJ1+EH5		
1	588 ± 19	355 ± 7
2	761 ± 19	399 ± 11
3	877 ± 12	454 ± 10
SJ3	323 ± 12	243 ± 8
SJ3+EPW		
1	678 ± 23	516 ± 11
2	1030 ± 30	750 ± 20
3	1456 ± 41	878 ± 26
SJ3+ER		
2	405 ± 7	320 ± 8
3	601 ± 21	386 ± 7
5	1030 ± 27	519 ± 12

SJ1 – mętny sok jabłkowy wykorzystywany w doświadczeniu z ekstraktami z zielonej herbaty; SJ3 – mętny sok jabłkowy wykorzystywany w doświadczeniu z ekstraktem z rokitnika i pestek winogron; SJ1 + EH1-EH5 – mętny sok jabłkowy z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty; SJ3 + EPW – mętny sok jabłkowy z dodatkiem ekstraktu z pestek winogron; SJ3 + ER – mętny sok jabłkowy z dodatkiem ekstraktu z rokitnika.

Źródło: Badania własne.

Pomimo że kolorymetryczna metoda Folina-Ciocalteu budzi wiele zastrzeżeń, jest powszechnie stosowana do oznaczania związków polifenolowych ogółem. Odczynnik Folina-Ciocalteu reaguje nie tylko ze związkami polifenolowymi, ale także z innymi redukującymi związkami, takimi jak: aminokwasy, cukrowce i witamina C. Klimczak i in. [2007] oraz Escarpa i González [2001] wykazali, że wyniki oznaczeń tą metodą są zwykle zawyżone w porównaniu z zawartością związków fenolowych oznaczoną metodą chromatograficzną.

Wpływ dodatku ekstraktów roślinnych na zawartość ekstraktu ogólnego i wartość pH nieprzechowywanego soku jabłkowego

Dodatek badanych ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5) i pestek winogron (EPW) w ilości 1 i 2 g/l oraz ekstraktu z rokitnika (ER) w ilości 2 i 3 g/l nie wpłynął w znaczący sposób na zawartość ekstraktu ogólnego i wartość pH soku jabłkowego (tabela 22). Zwiększenie dodatku EH1-EH5 i EPW do 3 g/l oraz ER do

Tabela 22. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na zawartość ekstraktu ogólnego i wartość pH nieprzechowywanego soku jabłkowego

Sok jabłkowy z ekstraktami roślinnymi (g/l)	Ekstrakt [°Brix]	pH
SJ1	13,1 ^a	3,68 ^a
SJ1+EH1		
1	13,0 ^a	3,70 ^a
2	13,1 ^a	3,72 ^a
3	13,6	3,75
SJ1+EH2		
1	13,0 ^a	3,70 ^a
2	13,1 ^a	3,70 ^a
3	13,6	3,74
SJ1+EH3		
1	13,1 ^a	3,69 ^a
2	13,1 ^a	3,70 ^a
3	13,6	3,74
SJ1+EH4		
1	12,9 ^a	3,68 ^a
2	13,0 ^a	3,70 ^a
3	13,5	3,73
SJ1+EH5		
1	12,9 ^a	3,69 ^a
2	12,9 ^a	3,69 ^a
3	13,5	3,73
SJ3	13,5 ^a	3,60 ^a
SJ3+EPW		
1	13,5 ^a	3,60 ^a
2	13,6 ^a	3,62 ^a
3	13,8	3,64
SJ3+ER		
2	13,5 ^a	3,61 ^a
3	13,6 ^a	3,63 ^a
5	13,9	3,65

Objaśnienia jak pod tabelą 21.

^a Wartości średnie w kolumnie, dla danego stężenia ekstraktu, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie, w porównaniu z danym sokiem jabłkowym bez dodatku ekstraktów (SJ1, SJ3) (test Dunnetta, $p > 0,05$).

Źródło: Badania własne.

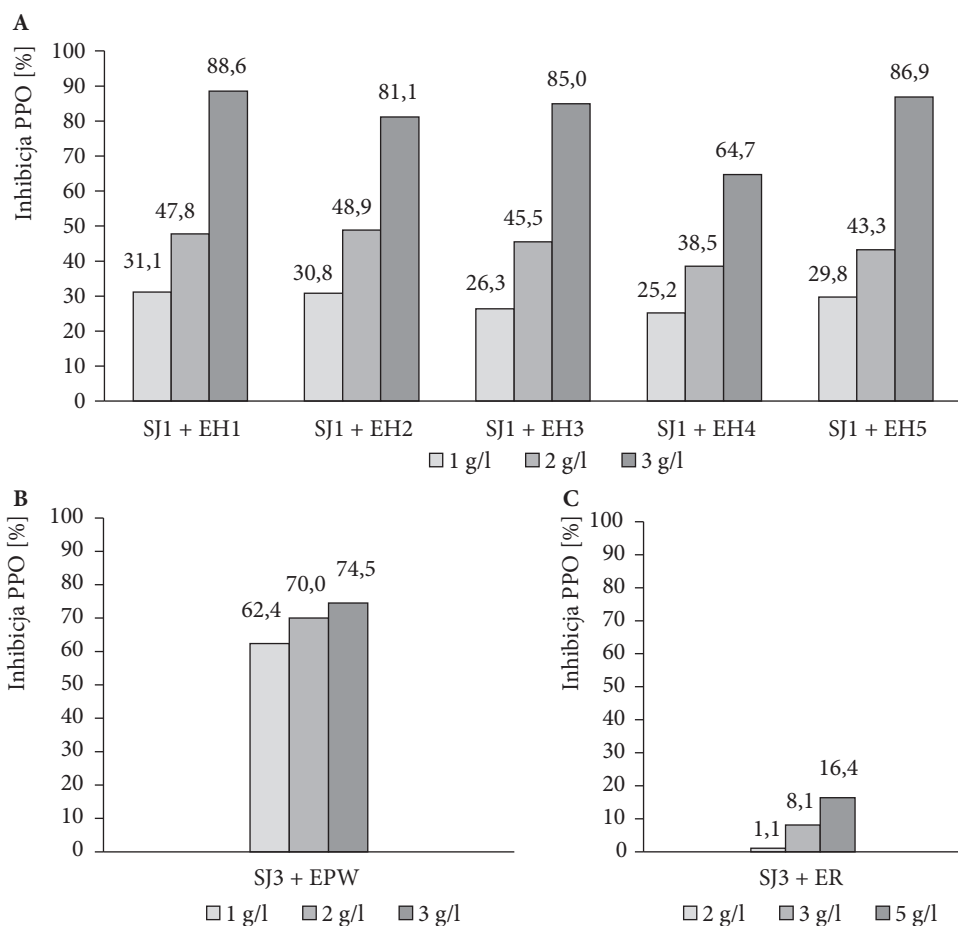
5 g/l spowodowało istotny statystycznie wzrost wartości tych parametrów w soku w porównaniu z sokiem jabłkowym bez tych ekstraktów. W przypadku ekstraktów z herbat analiza statystyczna nie wykazała wpływu rodzaju ekstraktu na zawartość ekstraktu i wartość pH ($p > 0,05$). Warto jednak zwrócić uwagę, że obserwowany wzrost wartości pH soków mieszanych był niewielki, porównywalny we wszystkich próbkach i średnio wynosił około 1,3%. Podczas 48 h przechowywania badanych soków nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian zawartości ekstraktu oraz wartości pH (dane nieprezentowane).

Wpływ dodatku ekstraktów roślinnych na aktywność PPO w nieprzechowywanym soku jabłkowym

Na kolejnym etapie pracy analizowano wpływ dodatku ekstraktów roślinnych na aktywność PPO w nieprzechowywanym soku jabłkowym. Wyniki tych badań przedstawiono na rysunku 12. W przypadku próbek soku jabłkowego z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5) zaobserwowano wzrost hamowania aktywności PPO w soku wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów (rysunek 12A [Klimczak i Gliszczyńska-Świągło 2017]). W soku z dodatkiem różnych ekstraktów z zielonej herbaty w ilości 1 g/l stopień hamowania aktywności PPO był porównywalny i wynosił około 29%. Inhibicja PPO w soku zawierającym 2 g/l ekstraktu wynosiła od 39% (EH4) do 49% (EH2). Dodatek do soku jabłkowego ekstraktów z herbaty EH1, EH2, EH3 i EH5 w ilości 3 g/l wpłynął na zahamowanie aktywności PPO w soku w około 85%. Jedynie ekstrakt EH4 wykazywał słabszy wpływ na aktywność enzymu (inhibicja około 65%). Ekstrakt ten, spośród badanych ekstraktów z zielonej herbaty, zawierał najmniejszą ilość katechin (tabela 7, rozdział 6.1.1) [Klimczak i Gliszczyńska-Świągło 2017], będących potencjalnymi inhibitorami PPO (tabela 4, rozdział 2.2.3). Badane ekstrakty z zielonej herbaty były efektywnymi inhibitorami PPO w soku, a ich skuteczność wzrastała wraz z ich stężeniem w soku. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Soysal [2009], który wykazał efekt inhibujący ekstraktu z zielonej herbaty, wraz ze wzrostem jego stężenia, na PPO z jabłek. Ekstrakt ten w ilości 30 mg/l hamował aktywność PPO w około 42%. Ekstrakt z zielonej herbaty hamował także aktywność PPO z białych krewetek [Nirmal i Benjakul 2011].

Zaskakujące wyniki uzyskano, badając wpływ ekstraktu z pestek winogron na aktywność PPO w soku jabłkowym (rysunek 12B). Ekstrakt ten dodany do soku w ilości 1 g/l, hamował PPO aż w 62,4%. Natomiast w soku z dodatkiem 2 i 3 g/l EPW stwierdzono inhibicję PPO na podobnym poziomie, która wynosiła średnio około 72%. Pomimo że w porównaniu z ekstraktami z zielonej herbaty zawartość katechin w EPW była 1,5–3-krotnie niższa (tabela 9, rozdział 6.1.1), ekstrakt ten był dobrym inhibitorem PPO w soku jabłkowym. Natomiast zawartość związków fenolowych ogółem w EPW (280,0 mg/g) nie różniła się istotnie statystycznie od

zawartości polifenoli w EH3 (tabela 6, rozdział 6.1.1). Ekstrakt ten charakteryzował się także bardzo dobrą efektywnością w hamowaniu tyrozynazy z grzyba ($IC_{50} = 0,77$ g/l), porównywalną z EH3 i EH4 (tabela 6, rozdział 6.1.1).



Objaśnienia jak pod tabelą 21

Rysunek 12. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (A), pestek winogron (B) i rokitnika (C) na aktywność PPO w nieprzechowywanym soku jabłkowym

Źródło: Na podstawie: [badania własne; Klimczak i Gliszczynska-Świągło 2017]

Kolejnym ekstraktem roślinnym, który przebadano pod kątem wpływu na aktywność PPO w soku jabłkowym, był ekstrakt z rokitnika (ER). Ekstrakt ten był najsłabszym inhibitorem PPO w soku (rysunek 12C). Dodany do soku w ilości 2 g/l praktycznie nie hamował aktywności PPO (inhibicja 1%). Wraz ze wzrostem jego stężenia w soku wrastał stopień inhibicji PPO. Dodatek 3 i 5 g ER /l hamował PPO w soku odpowiednio o około 8 i 16%. Spośród badanych ekstraktów ekstrakt

z rokitnika był także najmniej efektywny w hamowaniu tyrozynazy oraz zawierał najmniejszą ilość polifenoli oznaczoną metodą chromatograficzną oraz przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu (tabele 6 i 10, rozdział 6.1.1).

W dostępnej literaturze przedmiotu brak jest badań nad wpływem zarówno ER, jak i EPW na aktywność PPO z jabłek oraz w soku jabłkowym.

De la Rosa i in. [2011] wykazali, że ekstrakt z miodu z odmiany ‘Palo Fierro’ wykazuje zdolność hamowania PPO w soku jabłkowym z odmiany ‘Red Delicious’ ($IC_{50} < 0,87$ g/l), jednak inhibicja enzymu nie zależała od stężenia ekstraktu. Zdaniem Oszmiańskiego i Lee [1990a], hamowanie aktywności PPO przez miód jest związane głównie z obecnością w miodzie peptydów o przybliżonej masie cząsteczkowej 600 Da. Potwierdziły to również wyniki badań uzyskane przez Atesa, Pekyardimci i Cokmusa [2001]. Natomiast Eissa i inni [2014] badali wpływ 1-procentowego dodatku ekstraktu z ogórka, kabaczka i zielonej papryki na aktywność PPO w soku jabłkowym. Spośród badanych ekstraktów metanolowy ekstrakt z kabaczka był najbardziej efektywny w hamowaniu aktywności PPO w soku. Nie przeprowadzono identyfikacji związków obecnych w ekstraktach z warzyw, które odpowiadały za właściwości inhibicyjne PPO.

W celu określenia zależności pomiędzy inhibicją PPO a zawartością polifenoli ogółem i flawonoidów ogółem w sokach nieprzechowywanych przeprowadzono analizę korelacji r Pearsona (tabela 23).

Tabela 23. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy stopniem inhibicji PPO a zawartością polifenoli ogółem i flawonoidów ogółem w badanych sokach jabłkowych z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER)

Parametr	Współczynnik korelacji r Pearsona
Polifenole ogółem	0,70*
Flawonoidy ogółem	0,67*

* Korelacje istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$; $n = 54$.

Źródło: Badania własne.

Stwierdzono istnienie dodatniej korelacji pomiędzy analizowanymi parametrami. Stopień hamowania aktywności PPO w sokach był istotnie związany z zawartością związków polifenolowych. Wzrostowi zawartości tych związków w sokach towarzyszył wzrost inhibicji PPO.

Jednym z czynników wpływających na aktywność PPO jest pH. Jak już wcześniej wspomniano, optymalne pH dla PPO z jabłek, podawane przez różnych autorów, mieści się w szerokim zakresie 4,0–7,0 (rozdział 2.2.2). Hamowanie brązowienia soku jabłkowego poprzez jego zakwaszenie jest trudne, ponieważ enzym ten toleruje kwaśne pH. Przy pH 2,5 aktywność PPO stanowi 34% początkowej aktywności, a dopiero przy pH 2,0 następuje całkowita inaktywacja enzymu [Zemel i in. 1990].

Ponadto, jak wykazał w swoich badaniach Zemel i in. [1990], zakwaszenie próbek soku jabłkowego do pH 2,5, 2,25 i 2,50 wpływa na spadek akceptacji smaku soku przez konsumentów. Zastosowane w niniejszej pracy ekstrakty roślinne nie wpłynęły na obniżenie pH soku jabłkowego. Dlatego też można stwierdzić, że obserwowana inhibicja PPO w sokach była związana z zawartością polifenoli występujących w ekstraktach, a nie z pH środowiska.

Wpływ dodatku ekstraktów roślinnych na aktywność PPO w przechowywanym soku jabłkowym

W tabeli 24 przedstawiono zmiany aktywności PPO w sokach jabłkowych z dodatkiem ekstraktów roślinnych podczas przechowywania w 4°C przez 48 h. Aktywność PPO w sokach z ekstraktami po 24 i 48 h przechowywania porównano z początkową aktywnością enzymu w tych sokach oraz z początkową aktywnością enzymu w soku jabłkowym bez dodatku ekstraktów. Spośród badanych ekstraktów z zielonej herbaty do śledzenia zmian aktywności PPO w trakcie przechowywania wybrano ekstrakt handlowy, standaryzowany na zawartość polifenoli (EH5). Aktywność PPO zarówno w sokach jabłkowych bez (SJ1 – sok wykorzystywany w doświadczeniu z ekstraktem z zielonej herbaty EH5; SJ3 – sok wykorzystywany w doświadczeniu z ekstraktem z rokitnika ER i pestek winogron EPW), jak i z dodatkami ekstraktów uległa obniżeniu podczas przechowywania. Po 48 h przechowywania spadek aktywności PPO w soku jabłkowym SJ1 i SJ3 bez dodatku ekstraktu wynosił odpowiednio 7 i 8%. Podobne wartości uzyskały w swoich badaniach Klimczak i Ćwiklińska [2013]. Po 48 h przechowywania w 4°C mętnego soku jabłkowego inhibicja PPO w soku wynosiła 10%. Obniżenie aktywności PPO w soku jabłkowym prawdopodobnie było związane z obecnością w soku procyjanidyn oraz produktów utleniania procyjanidyn, monomerycznych katechin. Le Bourvellec i in. [2004] wykazali inhibicyjne właściwości tych związków w stosunku do PPO z jabłek. Efektywność hamowania enzymu wzrastała wraz ze wzrostem stopnia polimeryzacji procyjanidyn. Produkty utleniania (+)-EC w większym stopniu hamowały aktywność PPO niż produkty utleniania kwasu chlorogenowego. Jednak autorzy nie zaobserwowali zależności liniowej pomiędzy stopniem inhibicji a stężeniem tych produktów utleniania.

Dodatek ekstraktów do soków jabłkowych spowodował większe obniżenie aktywności PPO w przechowywanych sokach niż stwierdzono to w sokach bez dodatku ekstraktów (z wyjątkiem soku z 2 g ER/l). W przypadku soku jabłkowego z dodatkiem EH5 stopień hamowania aktywności enzymu zależał od stężenia ekstraktu (tabela 24). Po 48 h przechowywania inhibicja PPO w tych sokach wyniosła około 53% (dla 1 g/l), 74% (dla 2 g/l) i 96% (dla 3 g/l) w stosunku do świeżego SJ1. W przechowywanym przez 48 h soku z 1 g EPW/l aktywność PPO uległa obniżeniu o 72% w odniesieniu do soku nieprzechowywanego SJ3. Natomiast w soku z dodatkiem 2 i 3 g EPW/l stwierdzono inhibicję PPO na podobnym poziomie i wynosiła ona odpowiednio 78% i 79%.

Tabela 24. Wpływ dodatku ekstraktu z zielonej herbaty (EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na aktywność PPO w przechowywanym soku jabłkowym

Sok jabłkowy z ekstraktami roślinnymi (g/l)	Inhibicja PPO [%] w odniesieniu do			
	nieprzechowywanego soku jabłkowego bez ekstraktów		nieprzechowywanego soku jabłkowego z ekstraktami	
	24 h	48 h	24 h	48 h
SJ1	2,6	6,6	–	–
SJ1+EH5				
1	38,3	52,6	5,1	13,9
2	46,7	74,2	1,8	12,1
3	88,3	96,0	0,8	4,7
SJ3	2,0	7,7	–	–
SJ3+EPW				
1	70,8	71,5	7,8	8,5
2	72,3	78,0	1,9	6,6
3	76,2	79,2	1,3	3,6
SJ3+ER				
2	2,3	6,8	1,1	5,8
3	14,3	23,0	6,7	16,3
5	23,8	32,4	8,8	19,2

Objaśnienia jak pod tabelą 21.

Źródło: Na podstawie: [badania własne; Klimczak i Gliszczyńska-Świągło 2017].

W przechowywanym soku z dodatkiem ekstraktu z rokitnika zaobserwowano najmniejsze obniżenie aktywności enzymu w porównaniu z pozostałymi badanymi ekstraktami. Ponadto po 48 h przechowywania soku z 2 g/l ekstraktu z rokitnika odnotowano niższy spadek aktywności PPO (około 7%) niż w przypadku soku jabłkowego bez dodatku ekstraktu (około 8%), co świadczy o tym, że ekstrakt ten nie hamował aktywności PPO. Natomiast w soku z dodatkiem 3 i 5 g ER/l stopień inhibicji PPO wynosił odpowiednio 23 i 32% w stosunku do soku nieprzechowywanego SJ3.

W celu określenia wpływu samego ekstraktu na aktywność PPO w przechowywanych sokach obliczono procentową zmianę aktywności enzymu w stosunku do nieprzechowywanych soków z ekstraktami (tabela 24). W przypadku przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktu EH5 i EPW zaobserwowano, że zwiększenie stężenia ekstraktu obniża stopień inhibicji PPO w sokach. Odwrotną zależność stwierdzono w soku jabłkowym z dodatkiem ekstraktu ER.

Thada i in. [2013] wykazali, że ekstrakt z cynamonu skutecznie hamuje brązowienie soku jabłkowego z odmiany 'Red Delicious'. W przechowywanym przez 48 h soku z 12 µg ekstraktu z cynamonu aktywność PPO uległa obniżeniu o 73% w odniesieniu do soku jabłkowego bez dodatku ekstraktu. Właściwości inhibicyjne ekstraktu z cynamonu wobec PPO były związane z obecnością w ekstrakcie kumaryny.

Wpływ dodatku ekstraktów roślinnych na parametry barwy nieprzechowywanego soku jabłkowego

W otrzymanych sokach jabłkowych i sokach z dodatkiem ekstraktów zmierzono barwę w systemie $L^*a^*b^*$. Wyniki badań zaprezentowano w tabeli 25. Próbką odniesienia był sok jabłkowy SJ1 i SJ3 bez dodatku ekstraktów.

Tabela 25. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na parametry barwy nieprzechowywanego soku jabłkowego

Sok jabłkowy z ekstraktami roślinnymi (g/l)	Parametry barwy		
	L^*	a^*	b^*
SJ1	91,85 ^a	-1,05 ^a	16,08 ^a
SJ1+EH1			
1	94,81	-1,04 ^a	8,80
2	93,55	-0,95	14,13
3	92,74 ^a	1,33	21,80
SJ1+EH2			
1	91,93 ^a	0,17	19,59
2	90,58 ^a	0,21	22,80
3	89,75	0,79	25,91
SJ1+EH3			
1	93,20 ^a	-0,80	14,83
2	91,02 ^a	-0,36	23,98
3	90,88 ^a	1,35	28,86
SJ1+EH4			
1	89,30	0,70	27,71
2	86,95	1,95	38,36
3	84,36	2,96	45,69
SJ1+EH5			
1	90,69 ^a	0,77	29,31
2	89,91	1,04	34,70
3	89,76	2,08	39,80
SJ3	94,88 ^a	-1,25 ^a	13,55 ^a
SJ3+EPW			
1	91,77 ^a	2,44	18,14
2	90,56	2,57	19,77
3	87,58	5,29	22,93
SJ3+ER			
2	93,80 ^a	-0,05	11,34
3	92,84 ^a	0,79	16,81
5	91,82	1,55	22,14

Objaśnienia jak pod tabelą 21.

^a Wartości średnie w kolumnie, dla danego stężenia ekstraktu w soku, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie w odniesieniu do soku jabłkowego bez dodatku (SJ1, SJ3) (test Dunnetta, $p > 0,05$).

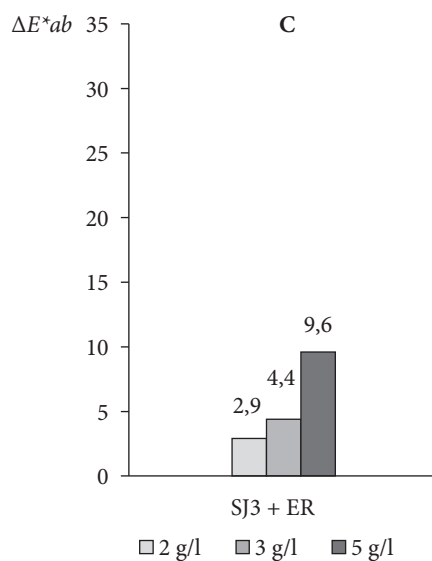
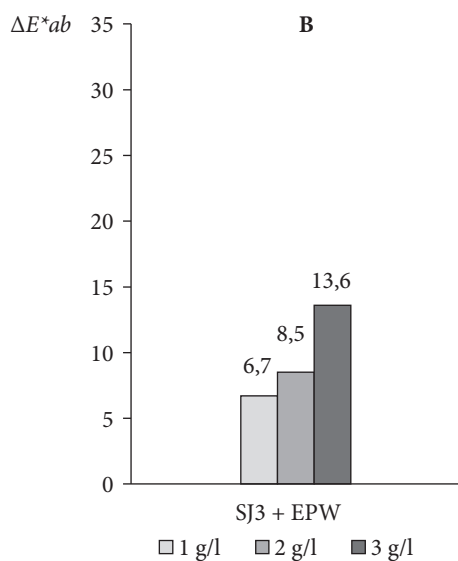
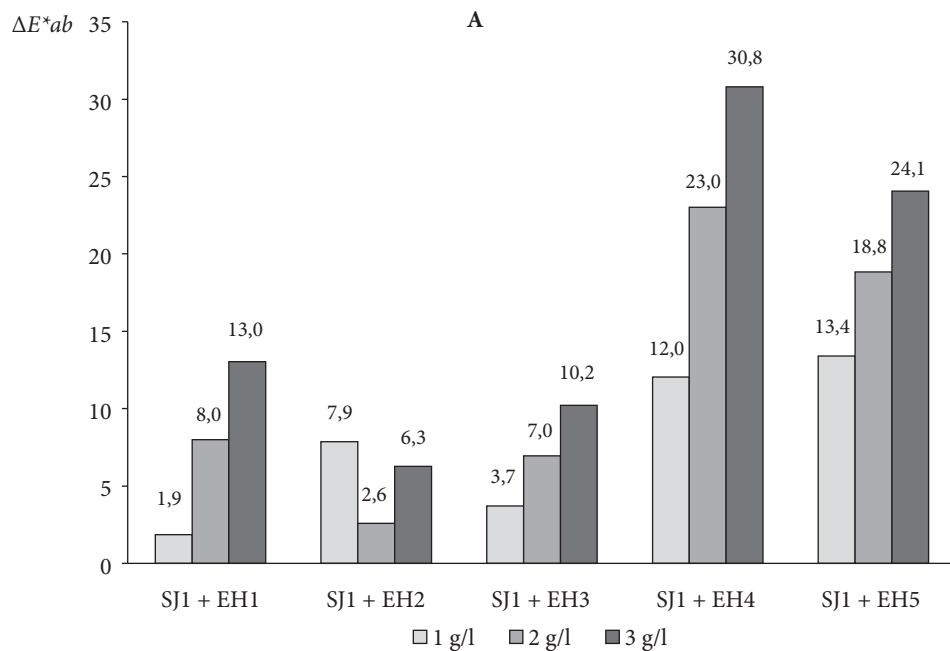
Źródło: Na podstawie: [badania własne; Klimczak i Gliszczyńska-Świgło 2017].

Nieprzechowywany sok jabłkowy SJ1 bez dodatku ekstraktów z zielonej herbaty charakteryzował się następującymi parametrami: $L^* = 91,85$; $a^* = -1,05$ i $b^* = 16,08$. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ rodzaju oraz stężenia ekstraktu z zielonej herbaty na parametry barwy soku jabłkowego ($p < 0,05$). Stwierdzono także istotną statystycznie interakcję pomiędzy rodzajem i stężeniem ekstraktu ($p < 0,05$). Wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów EH1-EH5 w badanych sokach jabłkowych zwiększył się udział barwy czerwonej (a^*) oraz żółtej (b^*), jednak barwa żółta była barwą dominującą. Największą zmianę tych parametrów barwy stwierdzono w sokach z dodatkiem ekstraktów EH4 i EH5 (tabela 25) [Klimczak i Gliszczyńska-Świgło 2017]. Dodatek ekstraktów z zielonej herbaty w ilości 1 g/l wpłynął w różnicowany sposób na jasność soku jabłkowego. W próbce soku z dodatkiem EH1 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost wartości parametru L^* decydującego o jasności soku (z 91,85 do 94,81), natomiast w próbce z ekstraktem EH4 wartość parametru L^* uległa obniżeniu (z 91,85 do 89,30).

W przypadku pozostałych próbek dodatek ekstraktów w ilości 1 g/l nie wpłynął w istotny sposób na ich jasność. Wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów z zielonej herbaty w soku jabłkowym wartość parametru L^* ulegała obniżeniu.

Również dodatek ekstraktów z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) istotnie zmienił barwę soków jabłkowych. Sok SJ3 bez dodatku tych ekstraktów charakteryzował się, podobnie jak sok SJ1, zielono-żółtawym odcieniem barwy ($a^* = -1,25$, $b^* = 13,55$). Wartość parametru L^* wynosiła 94,88 (tabela 24). Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ stężenia ekstraktów ER i EPW na parametry barwy soku jabłkowego ($p < 0,05$). Podobnie jak w przypadku ekstraktów z herbat, wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów z pestek winogron i rokitnika w badanych sokach jabłkowych zwiększył się udział barwy czerwonej (a^*) oraz żółtej (b^*). Soki z dodatkiem EPW w porównaniu z sokami z ER, a także z EH1-EH5 charakteryzowały się większym udziałem barwy czerwonej. Dodatek do soku jabłkowego EPW w ilości 1 g/l oraz ER w ilości 2 i 3 g/l nie wpłynął w istotny sposób na jasność tych soków. Natomiast przy większych stężeniach tych ekstraktów obserwowano obniżenie wartości parametru L^* .

Zmierzone wartości parametrów L^* , a^* , b^* w badanych próbkach soków pozwoliły na obliczenie całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}). Ogólnie, wraz ze wzrostem stężenia badanych ekstraktów w próbkach soku jabłkowego odnotowano wzrost parametru ΔE^*_{ab} (rysunek 13). Spośród wszystkich badanych próbek największą zmianę barwy soku jabłkowego stwierdzono w przypadku dodatku ekstraktu z herbaty EH4 i EH5 (rysunek 13A), a najmniejszą w przypadku soku jabłkowego z dodatkiem ER (rysunek 13C).



Objaśnienia jak pod tabelą 21

Rysunek 13. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (A), pestek winogron (B) i rokitnika (C) na zmianę całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) nieprzechowywanego soku jabłkowego

Źródło: Na podstawie: [badania własne; Klimczak i Głiszczyńska-Świągło 2017]

Wpływ dodatku ekstraktów roślinnych na parametry barwy przechowywanego soku jabłkowego

Podczas 48-godzinnego przechowywania badanych próbek soków jabłkowych oraz soków z dodatkiem ekstraktów w temperaturze 4°C nastąpiły istotne zmiany parametrów barwy. Wyniki badań zaprezentowano na rysunkach 14–16. Próbką odniesienia był sok jabłkowy SJ1 i SJ3 bez dodatku ekstraktów. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ czasu przechowywania oraz stężenia ekstraktów (EH5, EPW i ER) na parametry barwy soku jabłkowego ($p < 0,05$).

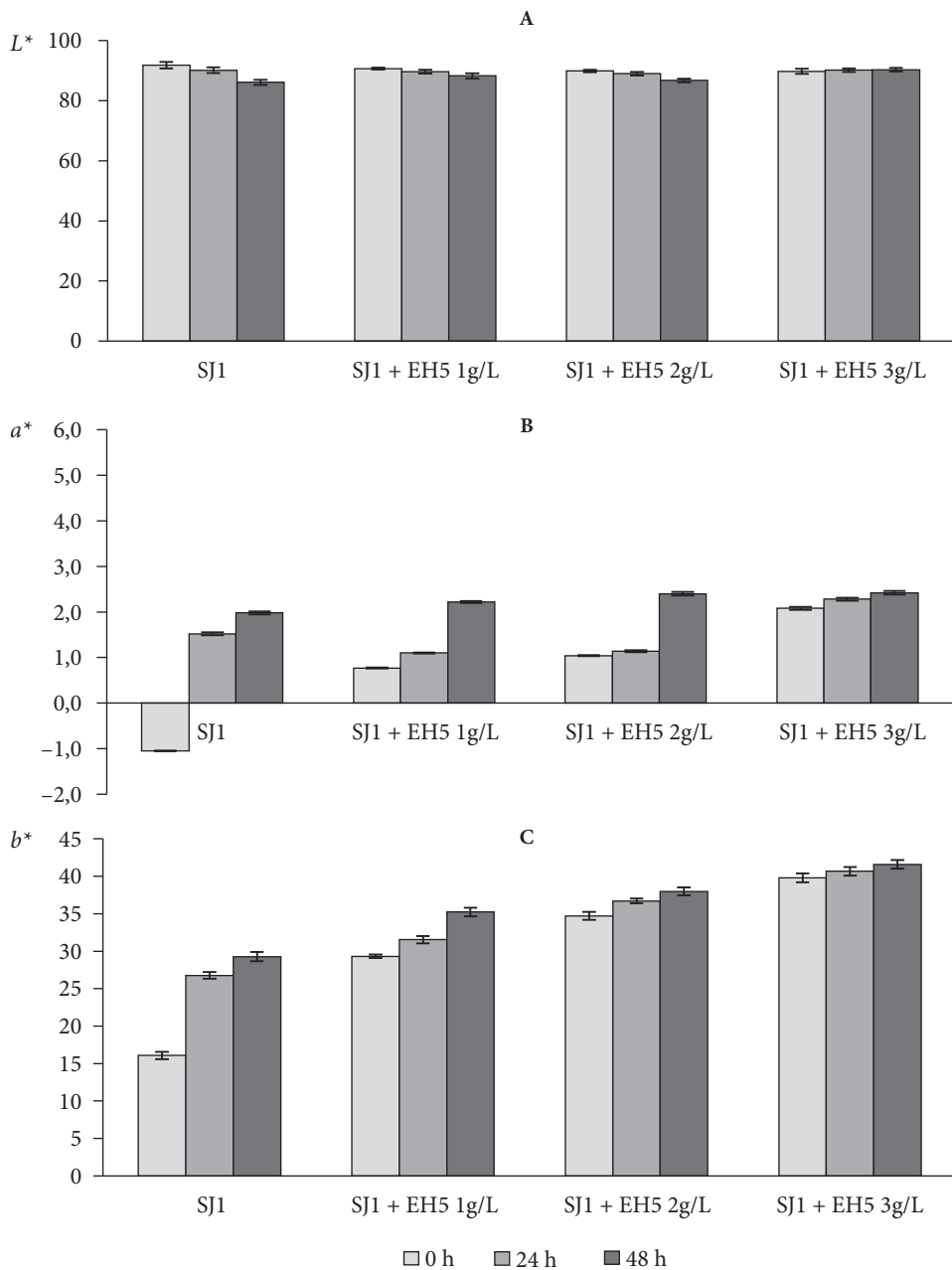
W próbkach kontrolnych SJ1 i SJ3 przechowywanych przez 24 h nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian wartości parametru L^* świadczącego o jasności. Po 48 h wartość parametru L^* uległa obniżeniu. W próbce SJ1 zaobserwowano większą zmianę jasności (obniżenie L^* z 91,85 do 86,10; $\Delta L^* = -5,75$) w porównaniu z próbką SJ3 (obniżenie L^* z 94,88 do 91,77; $\Delta L^* = -3,12$; rysunek 14A).

Podczas przechowywania próbek soków jabłkowych zaobserwowano zmianę wartości parametru a^* w kierunku barwy czerwonej. Wartość tego parametru, mierzona po 48 h, w SJ1 i SJ3 wynosiła odpowiednio: 1,98 i 1,36 (rysunek 14B, 15B). Nieznacznie większą skłonność do ciemnienia, wyrażoną jako Δa^* , stwierdzono w soku SJ1 (3,03) niż w soku SJ3 (2,61). Wraz ze wzrostem czasu przechowywania obserwowano także zwiększenie intensywności barwy żółtej soków jabłkowych (rysunek 14C, 15C).

Podobną tendencję zmian parametrów barwy przechowywanego niepasteryzowanego soku jabłkowego wykazały badania innych autorów [Jang i in. 2002; Tochi i in. 2009; Suh, Park i Park 2011; Eissa i in. 2014]. Natomiast Klimczak i Ćwiklińska [2013] nie stwierdziły istotnych statystycznie zmian jasności mętnego soku jabłkowego, otrzymanego z owoców starych odmian jabłoni, w trakcie 48 h przechowywania w 4°C. W przypadku parametru a^* i b^* odnotowano wzrost wartości tych parametrów.

W próbkach soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów roślinnych tendencja zmian parametrów barwy podczas przechowywania była podobna (rysunki 14–16). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian jasności próbek soków z dodatkiem 1–3 g EPW/l, 2–5 g ER/l oraz 3 g EH5/l. W próbkach z dodatkiem 1 i 2 g EH5/l przechowywanych przez 24 h również nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian wartości parametru L^* , ale po 48 h wartość parametru L^* uległa nieznacznemu obniżeniu (o około 3%; rysunek 14A) [Klimczak i Gliszczyńska-Świętło 2017].

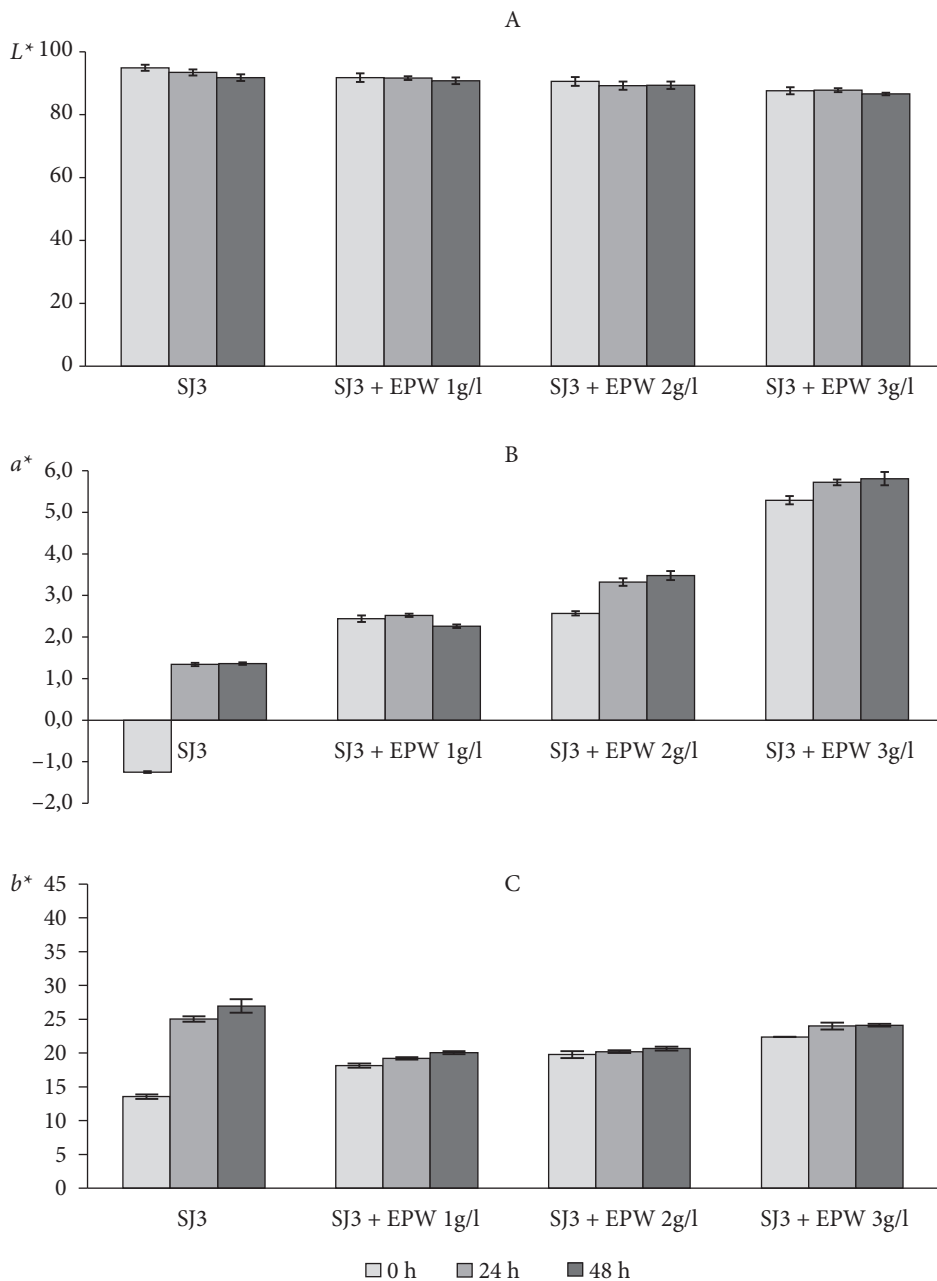
We wszystkich przechowywanych próbkach soków zaobserwowano zwiększenie intensywności barwy czerwonej i żółtej (rysunki 14–16B i C). Wyjątek stanowił sok z dodatkiem 1 g EPW/l, w którym po 48 h przechowywania odnotowano obniżenie wartości parametru a^* (rysunek 15B). Zaobserwowano także mniejszy wzrost wartości parametru a^* i b^* wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów w soku (rysunek 15B i C).



Objaśnienia jak pod tabelą 21

Rysunek 14. Wpływ dodatku ekstraktu z zielonej herbaty (EH5) na parametry barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) przechowywanego soku jabłkowego

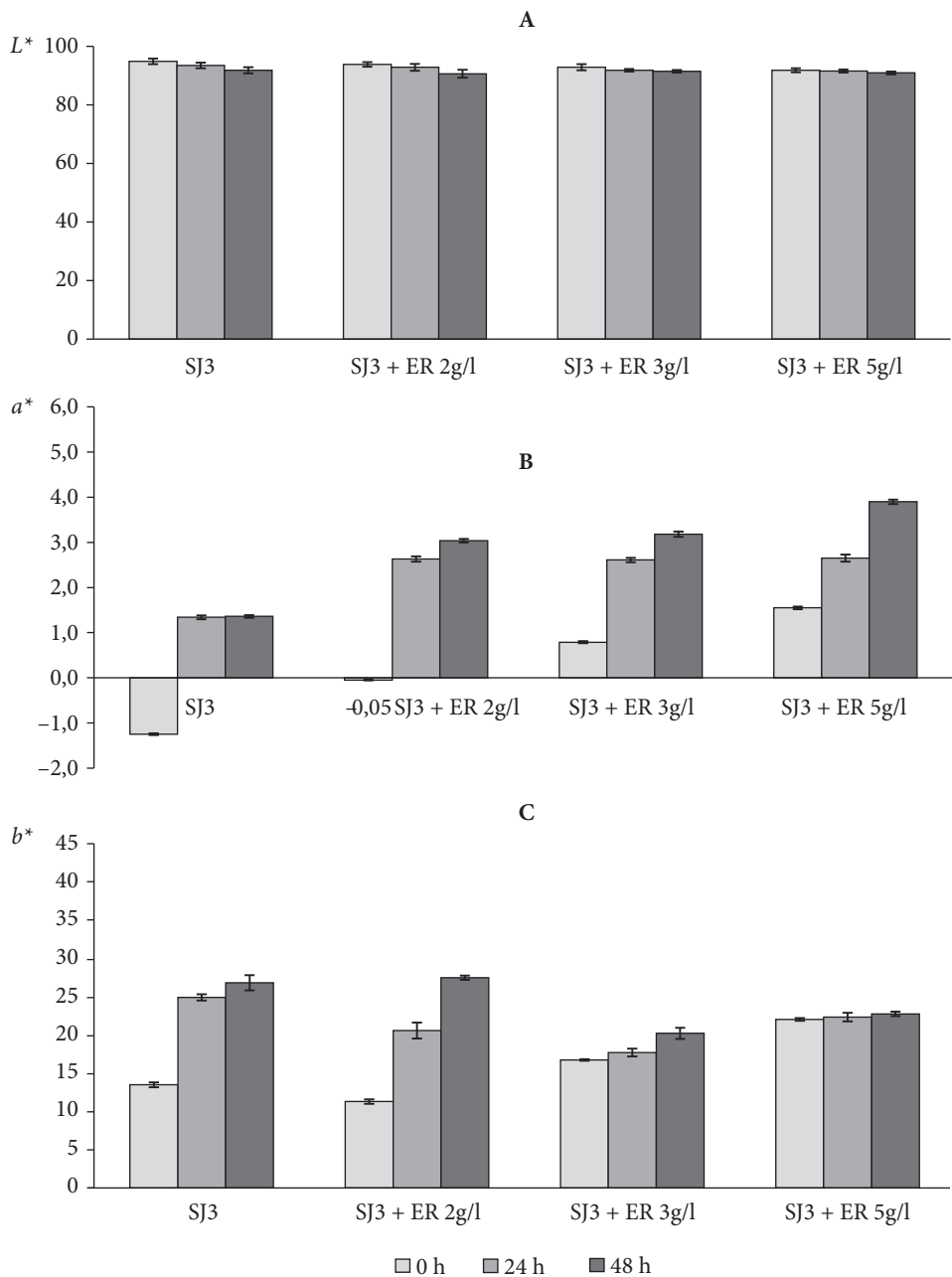
Źródło: Na podstawie: [badania własne; Klimczak i Gliszczyńska-Świągło 2017]



Objaśnienia jak pod tabelą 21

Rysunek 15. Wpływ dodatku ekstraktu z pestek winogron (EPW) na parametry barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) przechowywanego soku jabłkowego

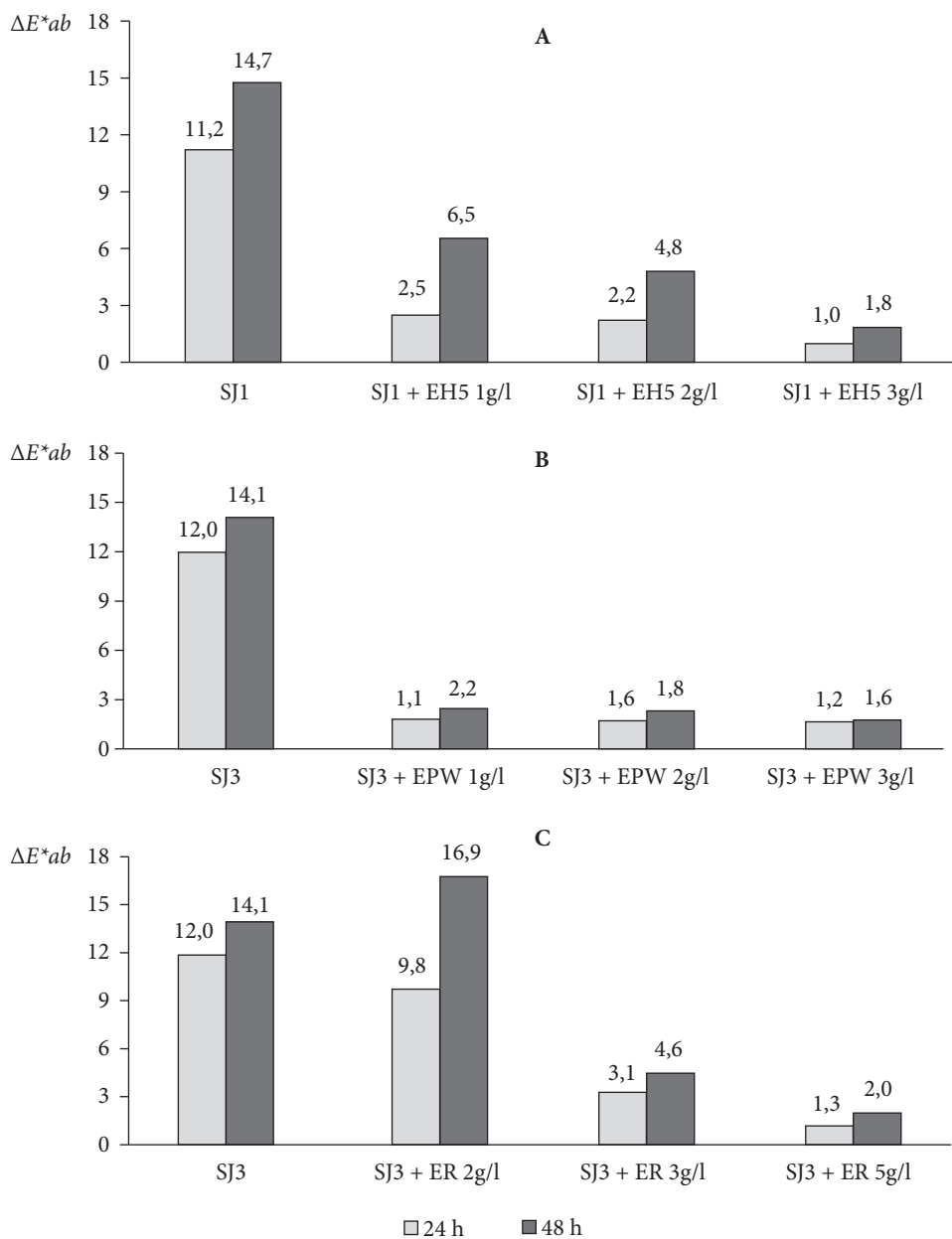
Źródło: Badania własne



Objaśnienia jak pod tabelą 21

Rysunek 16. Wpływ dodatku ekstraktu z rokitnika (ER) na parametry barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) przechowywanego soku jabłkowego

Źródło: Badania własne



Objaśnienia jak pod tabelą 21

Rysunek 17. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH5) (A), pestek winogron (EPW) (B) i rokitnika (ER) (C) na zmianę całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) przechowywanego soku jabłkowego

Źródło: Na podstawie: [badania własne; Klimczak i Głiszczyńska-Świgło 2017]

Najmniejsze zmiany barwy czerwonej zmierzono w przechowywanym soku jabłkowym z dodatkiem 3 g/l EH5 (wzrost a^* z 2,08 do 2,42; $\Delta a^* = 0,35$; rysunek 14B), zaś największy wzrost wartości parametru a^* stwierdzono w próbce z ekstraktem z rokitnika w ilości 5 g/l (wzrost a^* z 1,35 do 3,90; $\Delta a^* = 2,35$; rysunek 16B).

Dodatek badanych ekstraktów roślinnych do soku jabłkowego wpłynął na zmniejszenie brązowienia soku podczas przechowywania, o czym świadczy istotnie mniejszy wzrost udziału barwy czerwonej i brak różnic w jasności w porównaniu z sokiem jabłkowym bez dodatków (próbka kontrolna).

Na rysunku 17 przedstawiono zmiany parametru ΔE^*_{ab} w trakcie przechowywania soków. Stwierdzono, że we wszystkich próbkach soków wraz ze wzrostem czasu przechowywania nastąpił wzrost wartości tego parametru. Po 48 h przechowywania największą całkowitą różnicę barwy zmierzono w próbkach soku jabłkowego z 2 g ER/l (wg Cserhalmi i in. [2006] $\Delta E^*_{ab} > 6$, duża różnica barwy). Ponadto uzyskana wartość ΔE^*_{ab} tego soku (16,9) była wyższa niż soku jabłkowego SJ3 bez dodatku ekstraktu (14,1), co pozwala na stwierdzenie, że ekstrakt z rokitnika w ilości 2 g/l nie hamował brązowienia soku (rysunek 17C).

Ogólnie wraz ze wzrostem ilości badanych ekstraktów w próbkach soku jabłkowego obserwowano mniejszy wzrost wartości parametru ΔE^*_{ab} w trakcie przechowywania. Wyjątek stanowiły próbki z dodatkiem ekstraktu z pestek winogron, w których zwiększenie stężenia ekstraktu z 2 g/l do 3 g/l nie wpłynęło w znaczący sposób na zmianę całkowitej różnicy barwy, odpowiednio $\Delta E^*_{ab} = 1,8$ i $1,6$ (rysunek 17B). Po 48 h w sokach z dodatkiem 3 g EH5/l, 2 i 3 g EPW/l oraz 5 g ER/l wartości ΔE^*_{ab} kształtowały się na podobnym poziomie, zmiana barwy była niewielka (rysunek 17A–C).

Na podstawie parametru ΔE^*_{ab} obliczono stopień hamowania brązowienia przechowywanych próbek soków jabłkowych przez badane ekstrakty. Dodatek ekstraktu z EH5 w ilości 1, 2 i 3 g/l hamował brązowienie soku odpowiednio o około 56, 67 i 88% w stosunku do próby kontrolnej soku jabłkowego. W przypadku soku jabłkowego z dodatkiem EPW stopień hamowania ciemnienia soku nie zależał w znaczący sposób od stężenia ekstraktu. Po 48 h przechowywania inhibicja brązowienia w tych sokach była na podobnym poziomie i wyniosła około 84% (1 g/l), 87% (2 g/l) i 89% (3 g/l), w stosunku do soku jabłkowego bez dodatku ekstraktu. W przechowywanym soku z dodatkiem 3 g ekstraktu z rokitnika/l zmierzono najmniejsze hamowanie brunatnienia soku (68%) w porównaniu z EH5 i EPW o tym samym stężeniu w soku. Dopiero ER w ilości 5 g/l hamował brązowienie soku na podobnym poziomie, tj. 86%.

Oceny stopnia brązowienia badanych soków jabłkowych podczas przechowywania (48 h, 4°C) i wpływu zastosowanych inhibitorów na zmiany brązowienia soków dokonano także poprzez przesledzenie zmian parametru BI (indeks brązowienia), YI (indeks zażółcenia) oraz wartości absorbancji przy długości fali 420 nm w badanych próbkach soków. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 26.

W trakcie przechowywania we wszystkich badanych próbkach soków obserwowano wzrost wartości indeksu brązowienia (BI). Po 48 h przechowywania

największe zmiany wartości BI stwierdzono w próbkach soków jabłkowych bez dodatku ekstraktów (SJ1 i SJ3) oraz w soku z dodatkiem ER w ilości 2 g/l, co świadczyło o postępującym procesie brązowienia tych soków. Uzyskana w próbkach soku z ER wartość ΔBI (26,8) była wyższa niż samego soku SJ3 (22), co pozwala stwierdzić, że ekstrakt ten nie wpłynął na hamowanie brązowienia soku jabłkowego. W próbkach pozostałych soków zaobserwowano mniejszy wzrost wartości BI w porównaniu z sokami bez dodatku ekstraktów. Ponadto w przypadku próbek z dodatkiem EH5 (1, 2 i 3 g/l) i ER (3 i 5 g/l) stopień brązowienia tych soków ulegał zmniejszeniu wraz ze wzrostem ilości dodanych ekstraktów. Nie zaobserwowano takiej zależności tylko w badanych sokach z dodatkiem EPW. Ekstrakt z zielonej herbaty w ilości 1, 2 i 3 g/l zmniejszał brązowienie soku odpowiednio o około 48, 60 i 86% w stosunku do soku jabłkowego bez dodatku. Zwiększenie dodatku EPW do soku nie wpłynęło na obniżenie wartości BI. Stopień hamowania brązowienia soku przez EPW w ilości 1, 2 i 3 g/l (około 87%) był porównywalny do działania EH5 w ilości 3 g/l (około 86%). Najmniej efektywny w hamowaniu ciemnienia soku jabłkowego okazał się ER. Po 48 h przechowywania inhibicja brązowienia tych soków wynosiła 64% (3 g/l) i 80% (5 g/l) w stosunku do soku jabłkowego bez dodatku ekstraktu. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi otrzymanymi na podstawie analizy parametru ΔE_{ab}^+ .

Tabela 26. Wpływ dodatku ekstraktu z zielonej herbaty (EH5), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na zmianę indeksu brązowienia (ΔBI), indeksu zażółcenia (ΔYI) oraz wartości absorbancji przy 420 nm (ΔA_{420}) przechowywanego soku jabłkowym

Sok jabłkowy z ekstraktami roślinnymi (g/l)	ΔBI		ΔYI		ΔA_{420}	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
SJ1	17,5	24,0	17,4	23,6	0,215	0,228
SJ1+EH5						
1	4,4	12,5	4,1	10,8	0,008	0,044
2	4,2	9,5	3,8	7,4	0,005	0,008
3	1,4	3,4	1,1	2,7	0,008	0,002
SJ3	18,5	22,0	17,9	21,6	0,110	0,195
SJ3+EPW						
1	1,6	2,7	1,7	3,3	0,014	0,025
2	2,0	2,8	1,2	1,9	0,009	0,011
3	2,1	3,0	1,6	2,4	0,007	0,011
SJ3+ER						
2	15,2	26,8	14,6	26,3	0,052	0,067
3	5,1	8,0	3,4	5,9	0,014	0,020
5	2,0	4,4	0,6	1,5	0,005	0,009

Objaśnienia jak pod tabelą 21.

Źródło: Na podstawie: [badania własne; Klimczak i Gliszczyńska-Świąto 2017].

Podczas przechowywania soki jabłkowe SJ1 i SJ3 ulegały większemu zażółceniu niż soki z dodatkiem badanych ekstraktów (tabela 26) [Klimczak i Gliszczyńska-Swigoł 2017]. Wyjątek stanowił sok z 2 g ER/l. Po 48 h nastąpił w próbce SJ1 i SJ3 wzrost stopnia zażółcenia odpowiednio o 94% (zmiana wartości YI z 25,0 na 48,6) i około 1,1 razy (zmiana wartości YI z 20,4 na 42,0). Wraz ze wzrostem ilości ekstraktów w próbkach soku jabłkowego obserwowano mniejszy wzrost wartości parametru YI w trakcie przechowywania. Po 48 h przechowywania najmniejszym stopniem zażółcenia charakteryzował się sok z dodatkiem 3 g EH5/l (wzrost o 4,2%), 2 i 3 g EPW/l (wzrost o ok. 6%) oraz 5 g ER/l (wzrost o 4,4%).

Wpływ ekstraktów roślinnych na zmiany brązowienia przechowywanych soków określono także poprzez zmierzenie zmiany absorbancji przy długości fali 420 nm (ΔA_{420}). W nieprzechowywanych sokach jabłkowych SJ1 i SJ3 bez dodatku ekstraktów wartość absorbancji A_{420} wynosiła odpowiednio $0,123 \pm 0,003$ i $0,171 \pm 0,004$. Wraz z czasem przechowywania obserwowano wzrost wartości tego parametru (tabela 26). Po 48 h wartość absorbancji A_{420} próbki soku SJ1 wzrosła około 1,9 raza, natomiast próbki SJ3 1,1 raza. Wzrost tego parametru świadczył o postępującym procesie brązowienia soków. Dodatek ekstraktów roślinnych (EH5, EPW i ER) do soku jabłkowego wpłynął na mniejszy wzrost absorbancji w sokach podczas przechowywania w porównaniu do soków bez ekstraktów. Ponadto wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów odnotowano mniejszy wzrost tego parametru w trakcie przechowywania. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ czasu przechowywania oraz stężenia ekstraktów (EH5, EPW i ER) na wartość absorbancji 420 nm soku jabłkowego ($p < 0,05$). Po 48 h przechowywania próbek soków SJ1 z dodatkiem 1 i 2 g/l EH5 wartość absorbancji wzrosła odpowiednio o około 35 i 9%. Nie zaobserwowano istotnych zmian wartości absorbancji w sokach przechowywanych zawierających EH5 w ilości 3 g/l, co świadczyło o hamowaniu brązowienia przez ten ekstrakt. W przypadku próbek soku SJ3 z dodatkiem ekstraktu z rokitnika po 48 h przechowywania wartość A_{420} wzrosła o 68% (2 g ER/l) i 14% (3 g ER/l). W sokach z ER w ilości 5 g/l zmiany absorbancji podczas przechowywania były nieistotne statystycznie ($p > 0,05$). Spośród badanych ekstraktów, ekstrakt z pestek winogron był najbardziej efektywny w hamowaniu brązowienia soków w trakcie przechowywania. W soku z 1 g EPW/l, przechowywanym przez 48 h wartość A_{420} wzrosła tylko o 6%, natomiast w soku z dodatkiem 2 i 3 g EPW/l nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian absorbancji w trakcie przechowywania ($p > 0,05$).

Na podstawie prześlędzonych zmian parametru A_{420} można wnioskować, że najlepszymi właściwościami inhibującymi brązowienie soków w trakcie przechowywania charakteryzował się ekstrakt EH5 w ilości 3 g/l, ER w ilości 5 g/l i EPW w ilości 2 i 3 g/l. W próbkach tych soków nie stwierdzono zmian parametru A_{420} podczas przechowywania.

Wartości uzyskane na podstawie parametru A_{420} są porównywalne z wynikami uzyskanymi na podstawie analizy ΔE_{ab}^* , BI i YI. Jedynie w przypadku ekstraktu

z rokitnika w ilości 2 g/l stwierdzono hamowanie brązowienia soków wyrażone jako A_{420} , natomiast brak jego inhibującego działania wyrażonego jako wartość ΔE^*_{ab} i BI.

W dostępnej literaturze niewiele jest danych dotyczących wpływu ekstraktów roślinnych na brązowienie niepasteryzowanego soku jabłkowego. Zmiany wybranych parametrów barwy oraz wskaźników brązowienia (ΔE^*_{ab} , ΔBI , ΔA_{420}) w przechowywanych sokach jabłkowych z dodatkiem ekstraktów roślinnych oraz grzybów były przedmiotem badań Janga i in. [2002], Li i in. [2007], Suh, Park i Park [2011] oraz Eissa i in. [2014]. Generalnie zmiany parametrów barwy przechowywanych mętnych, niepasteryzowanych soków jabłkowych przebiegające w kierunku obniżenia wartości parametru L^* oraz wzrostu parametru a^* i ΔE^*_{ab} świadczą o przebiegającym procesie brązowienia soków [Oszmianski, Sokół-Łętowska i Kuczyński 1994; Özoğlu i Bayındırlı 2002; İyidoğan i Bayındırlı 2004; Tochi i in. 2009; Suh, Park i Park 2011; Klimczak i Ćwiklińska 2013; Klimczak i Gliszczyńska-Świgło 2017]. Ponadto w badaniach nad wpływem odmiany na brunatnienie mętnego soku jabłkowego przeprowadzonych w ramach w niniejszej pracy (rozdział 6.2.1) wykazano także przydatność monitorowania parametru BI oraz YI (do oceny jakości tych soków).

Suh i in. [2011] na podstawie prześledzonych zmian wartości parametrów barwy (L^* , a^* i b^*) oraz ΔE^*_{ab} w trakcie przechowywania (6 h, temperatura pokojowa) stwierdzili, że dodatek 0,3 mg/ml ekstraktu ze szczawiu kędzierzawego (uzyskany przy użyciu butanolu oraz octanu etylu) efektywnie hamował brązowienie soku jabłkowego. W przechowywanych próbkach z dodatkiem ekstraktu zmiany parametrów barwy (obniżenie wartości L^* , wzrost a^* i b^*) były mniejsze w porównaniu z próbką soku bez dodatku ekstraktu. Zmiany wartości parametru ΔE^*_{ab} były nieistotne statystycznie ($\Delta E^*_{ab} < 1$).

Li i in. [2007] badali wpływ dodatku dwóch ekstraktów (A i B) z morwy białej (0,001–0,02%) na zmiany parametru a^* i ΔE^*_{ab} soku jabłkowego z dodatkiem kwasu askorbinowego (0,02%) przechowywanego przez 5 dni w temperaturze 4°C. 0,01-procentowy ekstrakt B o wyższej zawartości oksyresweratrolu, będącego potencjalnym inhibitorem PPO, był najbardziej efektywny w hamowaniu brązowienia soku jabłkowego. Ponadto jego skuteczność działania inhibicyjnego była porównywalna do 0,01-procentowego 4-heksyloresorcynolu w badanym soku.

Natomiast Jang i in. [2002] na podstawie zmian parametru a^* i b^* stwierdzili, że ekstrakt z grzyba ('Enokitake') dodany do soku jabłkowego z odmiany 'Starking' w ilości 0,67 g/ml skutecznie hamował brązowienie soku przechowywanego przez 6 h w temperaturze 27°C. Zmiany wartości tych parametrów były nieistotne statystycznie. Wykazano także, że ekstrakt ten hamował aktywność tyrozynazy w układzie modelowym.

Bardziej kompleksowe podejście do określenia stopnia brązowienia soku jabłkowego podczas przechowywania (24 h, 25°C) i wpływu ekstraktów z warzyw (ogórek, papryka zielona, kabaczek) oraz ekstraktu z grzyba (bocznik ostrogowaty)

zastosowali w swoich badaniach Eissa i in. [2014]. Wnioskowanie przeprowadzono na podstawie zmian parametrów barwy (L^* , a^* , b^*), ΔE_{ab}^* , ΔBI oraz ΔA_{420} . Dodatek 1-procentowego ekstraktu z kabaczka, uzyskany w procesie ultrafiltracji, wykazywał najlepszą efektywność w hamowaniu ciemnienia soku. W przechowywanym soku jabłkowym z dodatkiem tego ekstraktu zmiany wartości parametru a^* były nieznaczne. Po 24 h przechowywania wartość ΔE_{ab}^* dla tego soku (2,8) była niższa niż dla soku jabłkowego bez dodatku ekstraktu (14,4). Podobną zależność stwierdzono także w przypadku parametru BI. Wyznaczony na podstawie parametru L^* oraz A_{420} oraz stopień hamowania brązowienia w tym soku wynosił odpowiednio około 89 i 70%.

Natomiast Soysal [2009] badał wpływ ekstraktu z zielonej herbaty na ciemnienie plasterów jabłek. W trakcie przechowywania (145 min, 20°C) jabłka zanurzone w roztworze ekstraktu z zielonej herbaty (15 mg/ml) wolniej ciemniały w porównaniu z próbką kontrolną jabłek. W przechowywanych próbkach traktowanych ekstraktem stwierdzono mniejszy spadek wartości parametru L^* (około 2 razy) oraz mniejszy wzrost wartości parametru ΔE_{ab}^* (około 2 razy) i ΔBI (1,4 raza) w stosunku do próbek nietraktowanych ekstraktem z zielonej herbaty.

W celu określenia powiązań między stopniem brązowienia (wyrażonym jako parametr ΔA_{420}) a aktywnością PPO oraz badanymi parametrami barwy (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) soków z dodatkiem ekstraktów roślinnych (EH5, EPW, ER) przechowywanych przez 24 i 48 h obliczono współczynnik korelacji r Pearsona. Wyniki zaprezentowano w tabeli 27.

Stwierdzono istnienie dodatniej korelacji pomiędzy zmianami parametru A_{420} przechowywanych soków a aktywnością PPO. Zmiana stopnia brązowienia soków przechowywanych przez 24 i 48 h, wyrażona jako A_{420} , w największym stopniu była związana ze zmianami parametru b^* (odpowiednio, $r = 0,722$ i $r = 0,650$).

Tabela 27. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy ΔA_{420} a aktywnością PPO w sokach, wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER)

Parametr	Współczynnik korelacji r Pearsona	
	24 h	48 h
Aktywność PPO	0,541*	0,519*
ΔL^*	-0,198	-0,503*
Δa^*	0,675*	0,335
Δb^*	0,722*	0,650*
ΔE_{ab}^*	0,720*	0,643*
ΔYI	0,723*	0,674*
ΔBI	0,720*	0,671*

* Korelacje istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$; $n = 18$.

Źródło: Badania własne.

Nie stwierdzono współzależności pomiędzy obserwowanymi zmianami jasności soków przechowywanych przez 24 h a zmianami wartości parametru A_{420} ($p > 0,05$; tabela 27). W przypadku soków przechowywanych przez 48 h wykazano ujemną korelację pomiędzy ΔA_{420} a parametrem ΔL^* ($r = -0,503$), natomiast nie stwierdzono współzależności pomiędzy zmianami parametru a^* a stopniem brązowienia soków ($p > 0,05$).

Wykazano także współzależność pomiędzy parametrem ΔA_{420} a innymi parametrami określającymi stopień brązowienia (ΔE_{ab}^* , ΔBI) oraz stopień zażółcenia ΔYI próbek soków (korelacja dodatnia; $r > 0,6$; tabela 27). Nie obliczono korelacji pomiędzy ΔBI a parametrem ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* i ΔYI , ponieważ parametry te były powiązane z sobą obliczeniowo.

Przeprowadzona analiza wykazała także istnienie dodatniej korelacji pomiędzy aktywnością PPO w przechowywanych sokach a parametrami Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI , ΔA_{420} (tabela 28). Zmiany aktywności PPO w badanych sokach miały największy wpływ na wartości parametru a^* oraz ΔBI w sokach przechowywanych przez 24 h (odpowiednio $r = 0,680$ i $r = 0,667$). W przypadku soków przechowywanych przez 48 h stwierdzono istnienie dodatniej, bardzo wysokiej korelacji pomiędzy aktywnością PPO a parametrem Δa^* ($r = 0,728$). Aktywność PPO była także ujemnie skorelowana z parametrem ΔL^* , jednak w przypadku soków przechowywanych przez 48 h zmiany aktywności PPO nie miały istotnego wpływu na zmiany jasności soków ($p > 0,05$; tabela 28).

Tabela 28. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy aktywnością PPO a wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔBI , ΔYI , ΔA_{420} przechowywanych sokach jabłkowych z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER)

Parametr	Współczynnik korelacji r Pearsona	
	24 h	48 h
ΔL^*	-0,431*	-0,275
Δa^*	0,680*	0,728*
Δb^*	0,581*	0,619*
ΔE_{ab}^*	0,625*	0,648*
ΔYI	0,605*	0,595*
ΔBI	0,667*	0,585*
ΔA_{420}	0,541*	0,519*

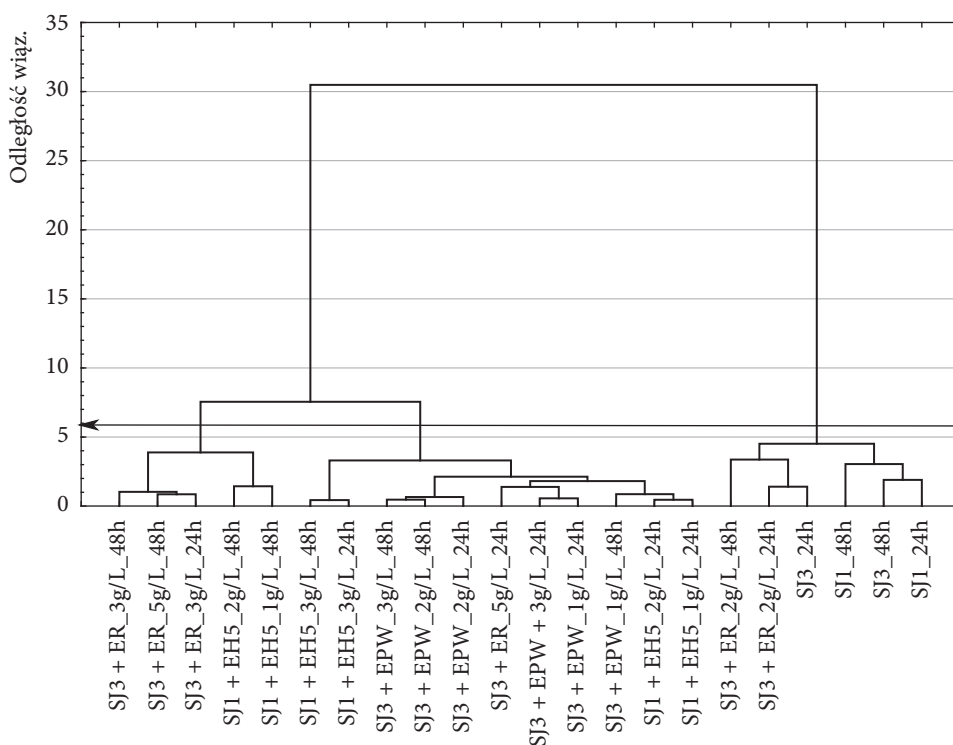
* Korelacje istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$; $n = 18$.

Źródło: Badania własne.

W celu zbadania podobieństwa pomiędzy badanymi sokami jabłkowymi bez dodatku i z dodatkami ekstraktów roślinnych przechowywanymi przez 24 i 48 h zastosowano analizę skupień (CA, ang. *cluster analysis*). Wyniki CA pozwoliły na

wyodrębnienie trzech skupień. Otrzymany dendrogram przedstawia rysunek 18. Następnie przeprowadzono analizę wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa w celu zbadania istotności różnic między średnimi rangami analizowanych parametrów (aktywność PPO, Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI , ΔA_{420}) pomiędzy skupieniami (tabela 29). Wszystkie zmienne w istotny statystycznie sposób różnicowały wyodrębnione skupienia ($p < 0,05$).

Pierwsze skupienie odbiegające od pozostałych (najniższa średnia ranga parametru ΔL^* , najwyższe średnie rang pozostałych parametrów) tworzyły soki jabłkowe bez dodatku ekstraktów roślinnych SJ1 i SJ3 przechowywane przez 24 i 48 h oraz soki z dodatkiem 2 g ER/l przechowywane przez 24 i 48 h (rysunek 18). Próbkami te charakteryzowały się w porównaniu z próbkami z grupy II najwyższą aktywnością PPO oraz największymi zmianami parametru ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , indeksu zażółcenia (ΔYI), indeksu brązowienia (ΔBI) oraz największymi zmianami absorbancji przy długości fali 420 nm (ΔA_{420}) w trakcie przechowywania ($p < 0,05$).



Objaśnienia jak pod tabelą 21

Rysunek 18. Dendrogram grupowania przechowywanych próbek soków jabłkowych bez i z dodatkiem ekstraktów roślinnych

Źródło: Badania własne

Natomiast w porównaniu z sokami zaklasyfikowanymi do III klastru średnie rangi analizowanych parametrów tych próbek nie różniły się istotnie statystycznie ($p > 0,05$; tabela 29).

Ogólnie, soki należące do I klastru w największym stopniu ulegały brązowieniu podczas przechowywania, co wykazano wcześniej w szczegółowej analizie zmian poszczególnych parametrów w przechowywanych sokach jabłkowych.

Skupienie II zawierało próbki soków jabłkowych SJ1 z dodatkiem EH5 w ilości 1 g/l (przechowywane przez 24 h), 2 g/l (24 h) oraz 3 g/l (24 i 48 h). W klastrze tym znalazły się także soki SJ3 z 1, 2 i 3 g EPW/l (przechowywane przez 24 i 48 h) oraz z ER w ilości 5 g/l (24 h) (rysunek 18). Próbki te, w porównaniu z próbkami soków z grupy I i III, charakteryzowały się najmniejszymi zmianami analizowanych parametrów w trakcie przechowywania. Jednak w porównaniu z próbkami z klastru III różnice były nieistotne statystycznie ($p > 0,05$; tabela 29). Obserwowane zmiany brązowienia w tych sokach były najmniejsze, co było związane z właściwościami inhibicyjnymi zastosowanych ekstraktów roślinnych.

Tabela 29. Średnie rangi analizowanych parametrów przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów roślinnych (EH5, EPW i ER) w grupach wyodrębnionych przy użyciu analizy skupień

Parametr	Grupa		
	I	II	III
PPO [j/min]	19,5 ^a	7,5 ^b	10,6 ^{ab}
ΔL^*	5,8 ^a	15,8 ^b	8,8 ^{ab}
Δa^*	19,5 ^a	6,0 ^b	14,0 ^{ab}
Δb^*	19,5 ^a	7,0 ^b	11,0 ^{ab}
ΔE_{ab}^*	19,5 ^a	6,3 ^b	13,4 ^{ab}
ΔYI	19,5 ^a	6,8 ^b	12,2 ^{ab}
ΔBI	19,5 ^a	6,1 ^b	13,8 ^{ab}
ΔA_{420}	19,5 ^a	7,1 ^b	11,5 ^{ab}

^{a-b} Wartości średnie w wierszach, w obrębie danego parametru, oznaczone tymi różnymi literami różnią się istotnie statystycznie (test wielokrotnych porównań, statystyka z' ; $p < 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Skupienie III tworzyły próbki soków SJ3 z dodatkiem ER w ilości 3 g/l (przechowywane przez 24 i 48 h) i 5 g/l (48 h) oraz SJ1 z 1 i 2 g EH5/l przechowywane przez 48 h (rysunek 18).

Wszystkie zmienne (parametry) były ze sobą skorelowane, dlatego przy interpretacji wyników uzyskanych w analizie skupień należy zachować szczególną ostrożność. Przeprowadzona analiza nie wykazała istotnych różnic w średnich rangach analizowanych parametrów próbek soków zaklasyfikowanych do skupienia II i III ($p > 0,05$; tabela 29), co sugeruje, że ilość dodanego ekstraktu do soku

jabłkowego nie wpływa w istotny sposób na zmiany aktywności PPO oraz barwy przechowywanych soków. Jednak analizując poszczególne wartości wskaźników brązowienia (ΔE_{ab}^* , ΔBI , ΔA_{420}) oraz parametrów ΔL^* , Δa^* tych próbek, stwierdzono, że optymalnym stężeniem EH5, EPW i ER wpływającym na hamowanie brązowienia soków, a tym samym na utrzymanie barwy przechowywanych soków, jest odpowiednio, 3, 2 i 5 g/l soku. W próbkach tych soków nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian parametru A_{420} podczas przechowywania ($p > 0,05$, tabela 26, rozdział 6.3.2).

Ponadto w soku jabłkowym z dodatkiem 3 g EH5/l nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian jasności soku w trakcie 48 h przechowywania ($p > 0,05$, rysunek 14A, rozdział 6.3.2). W próbce tego soku nastąpił około 4-krotnie mniejszy wzrost parametru a^* w porównaniu z próbkami soku z dodatkiem 1 i 2 g tego ekstraktu, odpowiednio $\Delta a^* = 0,35$, 1,36 i 1,45 (rysunek 14B). Wartość parametru ΔE_{ab}^* i ΔBI tego soku była około 3-krotnie mniejsza niż soku z dodatkiem EH5 w ilości 2 g/l (rysunek 17, tabela 26, rozdział 6.3.2). Także aktywność PPO uległa największemu obniżeniu w soku z dodatkiem EH5 w ilości 3 g/l (inhibicja 96%, tabela 24).

W próbkach soku jabłkowego z dodatkiem 2 g EPW/l, w porównaniu z sokiem z EPW w ilości 1 g/l, wartość parametru ΔE_{ab}^* była niższa o około 20% (rysunek 17). Stopień hamowania brązowienia w tym soku wynosił około 90%, natomiast w soku z 1 g EPW/l około 80%. Ponadto stopień inhibicji PPO w soku z dodatkiem 2 g EPW/l był większy (około 80%) niż w soku, do którego dodano ten ekstrakt w ilości 1 g/l (około 70%).

Zwiększenie ilości ekstraktu z rokitnika w soku jabłkowym (z 3 do 5 g/l) spowodowało około 2 razy mniejszy wzrost parametru ΔE_{ab}^* i ΔBI w trakcie przechowywania (rysunek 17, tabela 26). Stopień inhibicji PPO był także większy w soku, do którego dodano ekstrakt z rokitnika w ilości 5 g/l (32%) niż w soku z 3 g ER/l soku (23%).

Ponadto próbki soków jabłkowych z dodatkiem 3 g EH5/l, 2 g EPW/l oraz 5 g ER/l po 48 h przechowywania charakteryzowały się najmniejszym stopniem zażółcenia (tabela 26).

6.3.3. Wpływ soków z owoców cytrusowych na brunatnienie mętneho soku jabłkowego

Kolejnym etapem badań prezentowanych w niniejszej pracy było przeprowadzenie doświadczenia, którego celem było określenie wpływu wybranych soków z owoców cytrusowych na brunatnienie mętneho soku jabłkowego z odmiany 'Golden Delicious' przed przechowywaniem i po przechowywaniu przez 48 h w temperaturze 4°C. Zastosowane soki z owoców cytrusowych (pomarańczowy, mandarynkowy i grejpfrutowy) zostały przebadane pod kątem zawartości związków fenolowych, witaminy C oraz ich wpływu na aktywność PPO. Wyniki tych badań zaprezentowano

wano w rozdziale 6.1.2. Próbki soku jabłkowego, soków z owoców cytrusowych oraz soków mieszanych przed przechowywaniem i po przechowywaniu poddano analizie obejmującej badania wyszczególnione na rysunku 10 (rozdział 5.2).

Wpływ dodatku soku z owoców cytrusowych na zawartość związków fenolowych ogółem i flawonoidów ogółem w nieprzechowywanym soku jabłkowego

W tabeli 30 przedstawiono wyniki badań własnych nad wpływem dodatku soku z owoców cytrusowych na zawartość polifenoli ogółem i flawonoidów ogółem w nieprzechowywanym soku jabłkowym. Dodatek soku z pomarańczy (SP) w ilości 20 i 40% wpłynął na zwiększenie zawartości polifenoli ogółem w stosunku do soku jabłkowego odpowiednio o około 6 i 15%. Natomiast zawartość polifenoli w soku jabłkowym z dodatkiem soku z mandarynki (SM) i grejpfruta (SG) (20 i 40%) nie różniła się istotnie statystycznie od zawartości tych związków w soku jabłkowym bez dodatków ($p > 0,05$).

Tabela 30. Zawartość związków polifenolowych ogółem, flawonoidów ogółem oraz witaminy C w soku jabłkowym, sokach cytrusowych i sokach mieszanych przed przechowywaniem

Sok jabłkowy z sokami z owoców cytrusowych (%)	Związki polifenolowe ogółem [mg/l]	Flawonoidy ogółem [mg /l]	Witamina C [mg/l]
SJ2	425 ± 14 ^a	246 ± 9 ^a	1,2 ± 0,0
SP	532 ± 11	161 ± 5	359 ± 10
SJ2+SP			
20	452 ± 10	238 ± 7 ^a	68 ± 3
40	490 ± 10	215 ± 7	140 ± 5
SM	425 ± 11 ^a	172 ± 3	261 ± 5
SJ2+SM			
20	415 ± 11 ^a	242 ± 9 ^a	49 ± 2
40	420 ± 12 ^a	223 ± 6	98 ± 3
SG	464 ± 10	261 ± 7 ^a	220 ± 3
SJ2+SG			
20	426 ± 8 ^a	255 ± 9 ^a	40 ± 2
40	442 ± 9 ^a	262 ± 9 ^a	85 ± 3

SJ2 – mętny sok jabłkowy wykorzystywany w doświadczeniu z sokami cytrusowymi; SJ2+SP – mętny sok jabłkowo-pomarańczowy; SJ2+SM – mętny sok jabłkowo-mandarynkowy; SJ2 +SG – mętny sok jabłkowo-grejpfrutowy.

^a Wartości średnie w kolumnie, przy danym udziale soku z owoców cytrusowych w soku mieszanym, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie, w porównaniu z sokiem jabłkowym bez dodatku soków cytrusowych (SJ2) (test Dunnetta, $p > 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Zawartość flawonoidów ogółem w sokach mieszanych: SJ2+20%SP, SJ2+20%SM oraz SJ2+SG (20 i 40%) nie różniła się istotnie statystycznie w porównaniu z sokiem jabłkowym ($p > 0,05$). Zwiększenie udziału soku SP i SM w soku mieszanym, z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego, wpłynęło na obniżenie zawartości flawonoidów ogółem odpowiednio o około 13 i 9%.

Wraz ze zwiększeniem udziału badanych soków cytrusowych w soku mieszanym obserwowano znaczący wzrost zawartości witaminy C w sokach. Największą zawartość tej witaminy odnotowano w sokach jabłkowo-pomarańczowych (tabela 30).

Wpływ dodatku soku z owoców cytrusowych na zawartość ekstraktu ogólnego i wartość pH nieprzechowywanego soku jabłkowego

Zawartość ekstraktu w nieprzechowywanych sokach cytrusowych SP, SM i SG wynosiła 11,1–12,9 °Brix, natomiast wartość pH 3,29–3,61 (tabela 31). Wyniki te są zbliżone z danymi literaturowymi [Cortés, Esteve i Frigola 2008; Xu i in. 2008; Pyryt i Wilkowska 2012; Sdiri i in. 2012].

Zgodnie z wytycznymi Kodeksu Praktyki AIJN [2013], minimalny poziom zawartości ekstraktu ogólnego w sokach cytrusowych wynosi 10,0 °Brix (sok pomarańczowy), 10,5 °Brix (sok mandarynkowy) i 9,5 °Brix (sok grejpfrutowy). Wszystkie badane soki spełniały te wymagania.

Tabela 31. Zawartość ekstraktu ogólnego i wartość pH soku jabłkowego, soków cytrusowych oraz soków mieszanych przed przechowywaniem

Sok jabłkowy z sokami z owoców cytrusowych (%)	Ekstrakt [°Brix]	pH
SJ2	13,0 ^a	3,70 ^a
SP	12,8	3,55
SJ2+SP		
20	13,0 ^a	3,68 ^a
40	12,9 ^a	3,64
SM	12,9	3,61
SJ2+SM		
20	13,0 ^a	3,66 ^a
40	13,1 ^a	3,64
SG	11,1	3,29
SJ2+SG		
20	12,6	3,60
40	12,3	3,54

Objaśnienia jak pod tabelą 30.

^a Wartości średnie w kolumnie, przy danym udziale soku z owoców cytrusowych w soku mieszanym, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie, w porównaniu z sokiem jabłkowym bez dodatku soków cytrusowych (SJ2) (test Dunnetta, $p > 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Zawartość ekstraktu ogólnego w sokach mieszanych SJ2+SP (20 i 40%), SJ2+SM (20 i 40%) i SJ2 była na podobnym poziomie ($p > 0,05$; tabela 31). Natomiast w sokach z dodatkiem 20 i 40% SG odnotowano niższą zawartość ekstraktu ogólnego w porównaniu z SJ2.

Wartość pH soków z dodatkiem SP i SM w ilości 20% nie różniła się istotnie statystycznie od wartości pH soku jabłkowego ($p > 0,05$). Zwiększenie udziału tych soków do 40% spowodowało nieznaczne obniżenie wartości tego parametru o 1,6%. Wartość pH soków SJ2+SG była niższa w porównaniu z sokiem jabłkowym o 2,7% (20%) i 4,3% (40%).

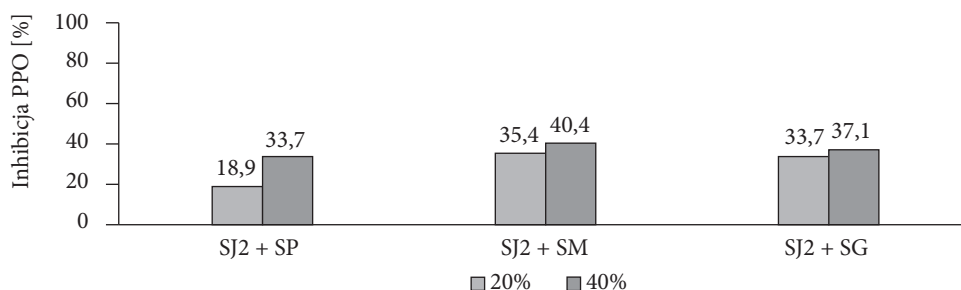
W trakcie przechowywania badanych soków nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian zawartości ekstraktu. Natomiast wartość pH nieznacznie wzrastała, ale zmiany te były nieistotne statystycznie (dane nieprezentowane).

Wpływ dodatku soków z owoców cytrusowych na aktywność PPO w nieprzechowywanym soku jabłkowym

Wpływ dodatku soków z owoców cytrusowych na aktywność PPO w nieprzechowywanym soku jabłkowym przedstawiono na rysunku 19. W badanych nieprzechowywanych sokach cytrusowych (SP, SM i SG) polifenolooksydaza była nieaktywna. W sokach mieszanych zaobserwowano hamowanie aktywności PPO. W soku z dodatkiem SM i SG w ilości 20% stopień hamowania PPO był porównywalny i wynosił około 34%. Sok, do którego dodano 20% SP, wykazywał słabszy wpływ na aktywność enzymu (inhibicja około 19%). Zwiększenie udziału soku pomarańczowego w soku mieszanym, z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego, wpłynęło znacząco na wzrost stopnia inhibicji PPO w soku (33,7%; $p < 0,05$). W przypadku próbek soków SJ2+SM i SJ2+SG wzrost stopnia hamowania aktywności PPO był niewielki, porównywalny w tych sokach (o około 12%). Soki te, dodane do soku jabłkowego w ilości 40%, hamowały aktywność PPO w soku o około 39% (rysunek 19).

Sok grejpfrutowy, mimo że w porównaniu z sokiem pomarańczowym i mandarynkowym wykazywał słabsze właściwości inhibicyjne wobec PPO z grzyba ($IC_{50} = 17,69$ g/100 ml; tabela 12, rozdział 6.1.2), hamował aktywność PPO w soku w stopniu porównywalnym do SP i SM. Natomiast zawartość flawanonów w SG, będących potencjalnymi inhibitorami PPO, oznaczona chromatograficznie, była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu z SP i SM (tabela 13, rozdział 6.1.2). Sok ten charakteryzował się też najwyższą zawartością flawonoidów ogółem (tabela 14, rozdział 6.1.2).

W dostępnej literaturze przedmiotu brak jest badań nad wpływem SP, SM i SG na aktywność PPO w soku jabłkowym.



Objaśnienia jak pod tabelą 30

Rysunek 19. Stopień inhibicji PPO w sokach mieszanych przed przechowywaniem

Źródło: Badania własne

W celu określenia zależności pomiędzy inhibicją PPO a zawartością polifenoli ogółem, flawonoidów ogółem i witaminy C w sokach nieprzechowywanych przeprowadzono analizę korelacji *r* Pearsona (tabela 32).

Tabela 32. Współczynnik korelacji *r* Pearsona pomiędzy stopniem inhibicji PPO a zawartością polifenoli ogółem, flawonoidów ogółem i witaminy C w badanych sokach mieszanych

Parametr	Współczynnik korelacji <i>r</i> Pearsona
Polifenoli ogółem	-0,32
Flawonoidy ogółem	-0,53
Witamina C	0,20

n = 36.

Źródło: Badania własne.

Nie zaobserwowano istotnych zależności pomiędzy stopniem hamowania aktywności PPO w sokach a ogólną zawartością związków polifenolowych, flawonoidów oraz zawartością witaminy C. Obliczone współczynniki korelacji pomiędzy analizowanymi parametrami były nieistotne statystycznie ($p > 0,05$). Najprawdopodobniej obecność naturalnej witaminy C w sokach cytrusowych nie była wystarczająca do hamowania aktywności PPO w soku jabłkowym.

W badaniach przeprowadzonych przez Klimczak i Gliszczyńską-Świągło [2017] dodatek 0,3 g kwasu askorbinowego/l hamował aktywność PPO w świeżym soku jabłkowym w 45,4%. Dodatek 2 i 3 g ekstraktu z zielonej herbaty/l do soku jabłkowego spowodował inhibicję PPO w soku o odpowiednio o 43,3 i 65,4%. Natomiast mieszanina ekstraktu i kwasu askorbinowego (KA) hamowała aktywność PPO o 65,4% (2 g ekstraktu/l) i 68,5% (3 g ekstraktu/l). Uzyskane niższe wartości stopnia inhibicji PPO (mieszanina z 3 g ekstraktu/l), niż się spodziewano na podstawie sumy pojedynczych efektów ekstraktu i kwasu askorbinowego, sugerowały, że KA i ekstrakt z zielonej herbaty oddziałują ze sobą w sposób antagonistyczny.

Natomiast Soysal [2009] wykazał, że dodatek kwasu askorbinowego w ilości 5 g/l hamował aktywność PPO w świeżych plastrach jabłek w 88,1%.

Wpływ dodatku soków z owoców cytrusowych na aktywność PPO w przechowywanym soku jabłkowym

W tabeli 33 przedstawiono zmiany aktywności PPO w sokach mieszanych podczas przechowywania. Aktywność PPO w sokach po 24 i 48 h przechowywania porównano z początkową aktywnością enzymu w tych sokach oraz z początkową aktywnością enzymu w soku jabłkowym bez dodatku soków cytrusowych. W badanych przechowywanych sokach cytrusowych (SP, SM i SG), podobnie jak w przypadku nieprzechowywanych soków, polifenolooksydaza była nieaktywna.

Aktywność PPO zarówno w soku jabłkowym SJ2 bez dodatku, jak i z dodatkiem soków SP, SM i SG uległa obniżeniu podczas przechowywania. Po 48 h przechowywania aktywność PPO w SJ2 obniżyła się o 8%. Dodatek badanych soków cytrusowych do soków jabłkowych z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego spowodował większe obniżenie aktywności PPO w przechowywanych sokach niż w soku SJ2. Zaobserwowano jednak, że stopień hamowania aktywności enzymu w przechowywanych próbkach soków nie zależał od udziału danego soku cytrusowego w soku mieszanym (tabela 33). Po 48 h przechowywania inhibicja PPO w sokach z dodatkiem 20 i 40% soku cytrusowego była podobna i wynosiła średnio 36% (SP), 42% (SM) i 38% (SG) w stosunku do nieprzechowywanego soku jabłkowego bez dodatku soku cytrusowego.

Tabela 33. Stopień inhibicji PPO w przechowywanych próbkach soku jabłkowego i soków mieszanych

Sok jabłkowy z sokami z owoców cytrusowych (%)	Inhibicja PPO [%] w odniesieniu do			
	nieprzechowywanego soku jabłkowego		nieprzechowywanego soku mieszanego	
	24 h	48 h	24 h	48 h
SJ2	2,9	8,3	–	–
SJ2+SP				
20	28,3	34,8	11,6	19,6
40	35,3	36,3	2,3	3,9
SJ2+SM				
20	37,3	40,6	2,9	8,1
40	41,8	44,2	2,4	6,2
SJ2+SG				
20	36,8	38,2	8,0	10,0
40	37,8	39,0	2,2	4,1

Objaśnienia jak pod tabelą 30.

Źródło: Badania własne.

Pozwala to na stwierdzenie, że wystarczającym udziałem soków cytrusowych w soku mieszanym, wpływającym na hamowanie aktywności PPO w przechowywanych sokach, a tym samym zapobiegającym utlenieniu związków polifenolowych, jest udział 20-procentowy.

W celu określenia wpływu samego soku cytrusowego na aktywność PPO w przechowywanych sokach obliczono procentową zmianę aktywności enzymu w stosunku do nieprzechowywanych soków jabłkowych z SP, SM i SG (tabela 33). Zaobserwowano większy stopień inhibicji PPO w sokach z dodatkiem soków cytrusowych w ilości 20% w porównaniu z sokami z 40-procentowym udziałem tych soków. Po 48 h przechowywania największy stopień hamowania aktywności PPO odnotowano w próbce soku SJ2+SP (20%) (inhibicja 19,6%).

Wpływ dodatku soku z soków z owoców cytrusowych na parametry barwy nieprzechowywanego soku jabłkowego

W otrzymanym soku jabłkowym SJ2, sokach cytrusowych oraz sokach mieszanych zmierzono barwę w systemie CIE $L^*a^*b^*$. Wyniki badań zaprezentowano w tabeli 34. Próbką odniesienia do soków z SP, SM i SG był sok jabłkowy SJ2 bez dodatku soków cytrusowych.

Tabela 34. Parametry barwy soku jabłkowego, soków cytrusowych oraz soków mieszanych przed przechowywaniem

Sok jabłkowy z sokami z owoców cytrusowych (%)	Parametry barwy		
	L^*	a^*	b^*
SJ2	93,68	- 1,17	17,11
SP	56,81	11,89	80,19
SJ2+SP			
20	85,91	0,71	30,37
40	77,18	1,60	44,31
SM	67,45	8,76	71,24
SJ2+SM			
20	88,33	0,30	22,68
40	82,55	2,31	36,41
SG	65,47	11,34	38,53
SJ2+SG			
20	88,42	1,53	14,37
40	83,01	2,72	22,74

Objaśnienia jak pod tabelą 30.

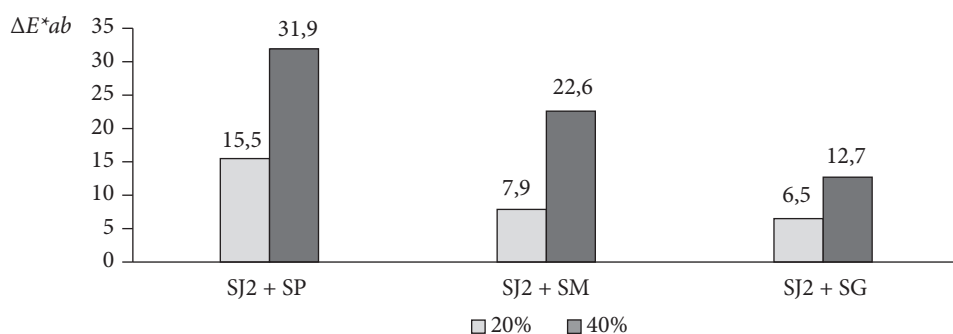
Źródło: Badania własne.

Nieprzechowywany sok jabłkowy SJ2 bez dodatku soków z owoców cytrusowych charakteryzował się zielono-żółtawym odcieniem barwy ($a^* = -1,17$, $b^* = 17,11$). Wartość parametru L^* wynosiła 93,68.

Próbki soków cytrusowych (SP, SM, SG), w porównaniu z SJ2 charakteryzowały się mniejszą jasnością (niższa wartość parametru L^*), dużym udziałem barwy czerwonej (od $a^* = 8,76$ (SM) do $a^* = 11,62$ (SP i SG) oraz żółtej (b^*), przy czym w SP i SM barwa żółta była barwą dominującą ($b^* = 80,19$ i $71,24$, odpowiednio). Barwa soków z owoców cytrusowych jest związana z zawartością karotenoidów, a w przypadku soku otrzymanego z pomarańczy z czerwonym miąższem z zawartością antocyjanów [Lee i Coates 1999; Choi, Kim i Lee 2002; Wibowo i in. 2015].

Dodatek soków cytrusowych do soku jabłkowego istotnie zmienił jego barwę. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ typu oraz udziału soku cytrusowego w soku mieszanym na parametry barwy soku jabłkowego ($p < 0,05$). Stwierdzono także istotną statystycznie interakcję pomiędzy tymi parametrami ($p < 0,05$). Soki mieszane SJ2+SP, SJ2+SM i SJ2+SG z 20-procentowym udziałem soków cytrusowych charakteryzowały się mniejszą jasnością ($L^* = 85,91$, $88,33$ i $88,42$, odpowiednio) w stosunku do soku jabłkowego SJ2 ($L^* = 93,68$). W sokach tych, w porównaniu z SJ2, stwierdzono także istotny statystycznie wzrost wartości parametru a^* oraz b^* . Soki z dodatkiem SP i SM w porównaniu z sokiem z SG odznaczały się większym udziałem barwy żółtej (b^*). Natomiast udział barwy czerwonej był większy w soku z SG niż w sokach z SP i SM. Zwiększenie udziału soków cytrusowych w soku mieszanym wpłynęło na dalsze obniżenie jasności soków oraz zintensyfikowanie udziału barwy czerwonej ($+a^*$) i żółtej ($+b^*$).

Zmierzone wartości parametrów L^* , a^* , b^* w badanych próbkach soków pozwoliły na obliczenie całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}). Ogólnie, wraz ze wzrostem udziału soku cytrusowego w soku mieszanym, z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego, odnotowano wzrost parametru ΔE^*_{ab} (rysunek 20). Spośród badanych próbek największą zmianę barwy soku mieszanego w stosunku do soku jabłkowego stwierdzono w przypadku próbek soków jabłkowo-pomarańczowych, a najmniejszą w przypadku jabłkowo-grejpfrutowych.



Objaśnienia jak pod tabelą 30

Rysunek 20. Zmiana całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) soków mieszanych przed przechowywaniem

Źródło: Badania własne

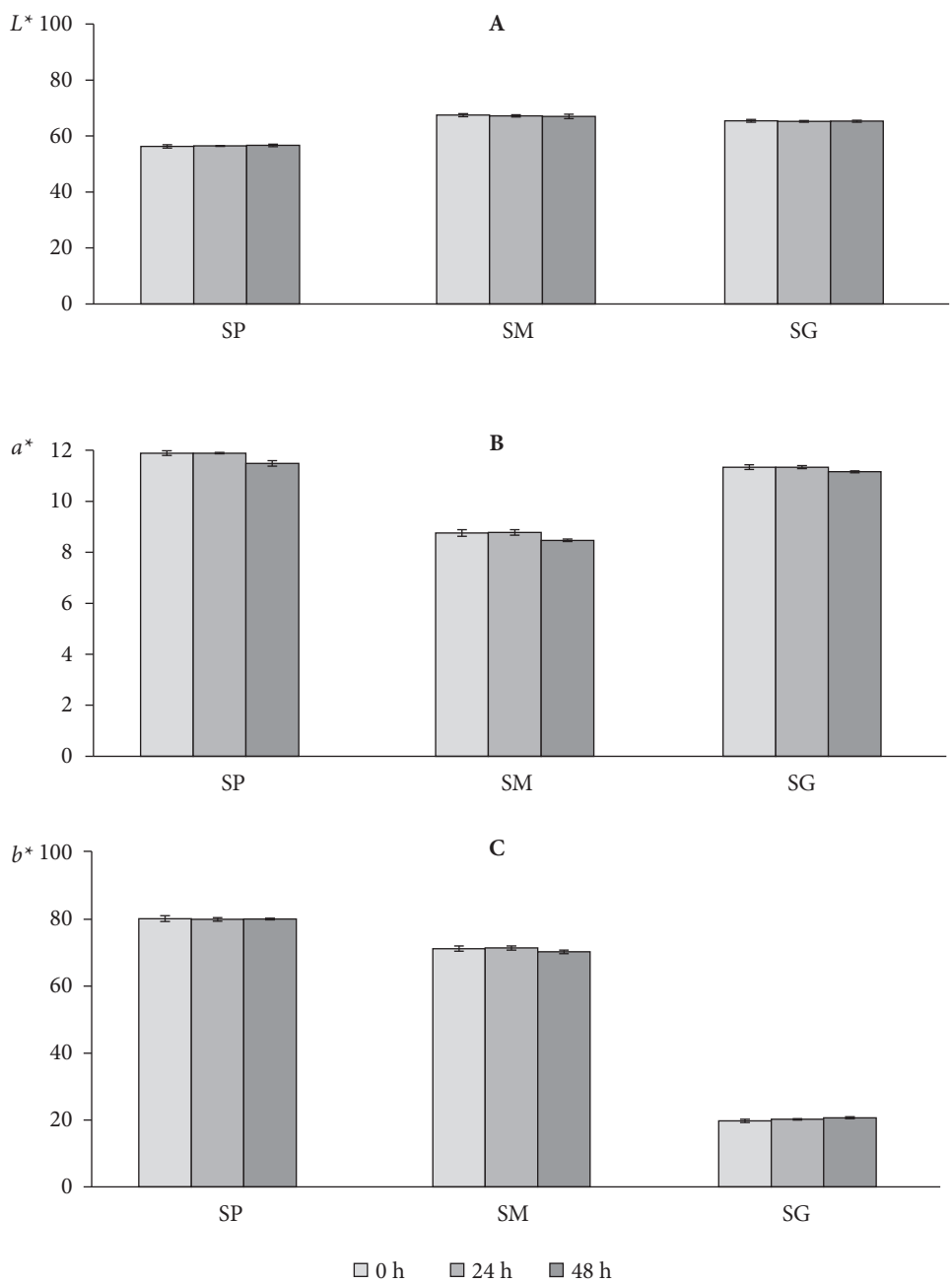
Wpływ dodatku soków z owoców cytrusowych na parametry barwy przechowywanego soku jabłkowego

Na rysunku 21 przedstawiono zmiany parametrów barwy badanych soków z owoców cytrusowych (SP, SM i SG) w trakcie 48-godzinnego przechowywania w temperaturze 4°C. Parametry barwy przechowywanych soków praktycznie nie uległy zmianie. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA nie wykazała istotnego wpływu czasu przechowywania oraz typu soku cytrusowego (SP, SM i SG) na jasność soków (L^*) oraz wartość parametru b^* ($p > 0,05$). W przechowywanym soku grejpfrutowym nie zaobserwowano także istotnych statystycznie zmian wartości parametru a^* ($p > 0,05$). Również w przechowywanych przez 24 h sokach pomarańczowym i mandarynkowym nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian wartości parametru a^* , natomiast po 48 h wartość parametru a^* uległa nieznacznemu obniżeniu (o około 3%).

Analiza danych literaturowych dotyczących zmian parametrów barwy soków pomarańczowych wskazuje na pewną tendencję. W sokach przechowywanych w temperaturze poniżej 4°C (7 tygodni) zaobserwowano wzrost wartości parametru a^* i obniżenie wartości parametru b^* . Natomiast w sokach przechowywanych w temperaturze powyżej 4°C (do 10°C) stwierdzono tendencję odwrotną (obniżenie a^* i wzrost b^*). Wraz ze wzrostem temperatury przechowywania soków (20–42°C, 32 tygodnie) wykazano obniżenie jasności soków, wartości parametru b^* oraz wzrost a^* [Choi, Kim i Lee 2002; Esteve i in. 2005; Cortés, Esteve i Frígola 2008; Wibowo i in. 2015]. Istotne obniżenie wartości parametru b^* odnotowano w przechowywanym przez 7 h w 34°C niepasteryzowanym soku pomarańczowym [Zhang, Luo i Wang 2014]. Natomiast Beltrán-González i in. [2008] donoszą, że w soku mandarynkowym przechowywanym przez 18 dni w temperaturze 4°C zmiany parametrów barwy były nieistotne statystycznie, jednak dalsze przechowywanie (do 90 dni) spowodowało istotne obniżenie wartości wszystkich parametrów barwy próbek soków. Podobną tendencję zmian parametrów barwy zaobserwowali w swoich badaniach Jaworska i in. [2014]. W przechowywanym przez 12 miesięcy (6–8°C) nektarze grejpfrutowym wykazano niewielki spadek jasności soku (około 6%) oraz obniżenie wartości parametru a^* (30%) i b^* (4%).

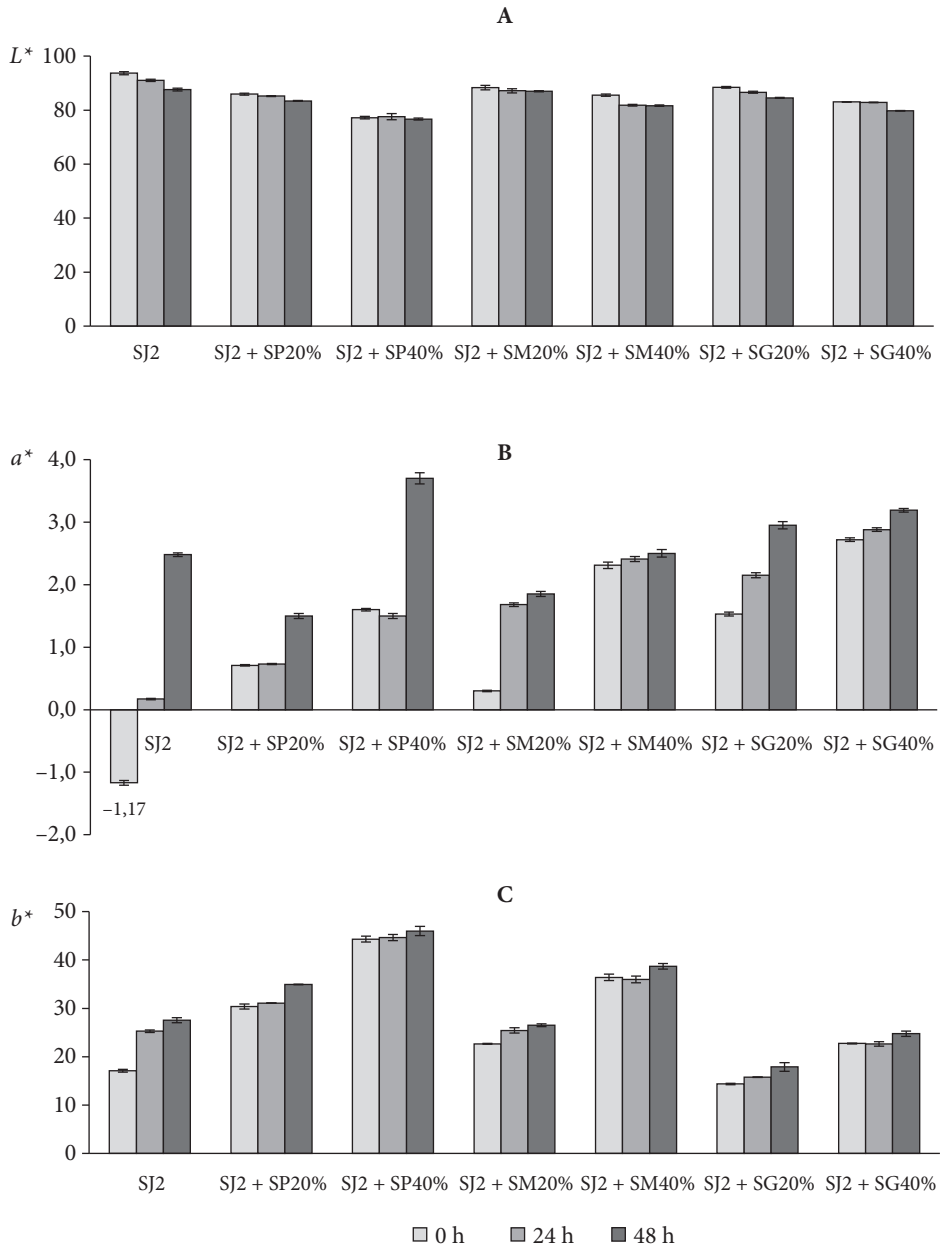
Natomiast podczas 48-godzinnego przechowywania badanych próbek soków jabłkowych oraz soków mieszanych w temperaturze 4°C nastąpiły istotne zmiany parametrów barwy. Wyniki badań zaprezentowano na rysunku 22. Próbką odniesienia do soków mieszanych był sok jabłkowy SJ2 bez dodatku soków cytrusowych. Przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotny wpływ czasu przechowywania, typu oraz udziału soku cytrusowego na parametry barwy soku jabłkowego ($p < 0,05$).

W próbce kontrolnej SJ2 przechowywanej przez 48 h stwierdzono istotne statystycznie zmiany wartości parametru L^* świadczącego o jasności. Po 48 h wartość parametru L^* uległa obniżeniu o około 7% (obniżenie L^* z 93,68 do 87,58;



Rysunek 21. Zmiany parametrów barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) soków z owoców cytrusowych (SP, SM, SG) podczas przechowywania

Źródło: Badania własne



Objaśnienia jak pod tabelą 30

Rysunek 22. Zmiany parametrów barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) soku jabłkowego oraz soków mieszanych podczas przechowywania

Źródło: Badania własne

$\Delta L^* = -6,10$ rysunek 22A). Zaobserwowano także zmianę wartości parametru a^* w kierunku barwy czerwonej (wzrost a^* z $-1,17$ do $2,48$; $\Delta a^* = 3,65$; rysunek 22B). Wraz ze wzrostem czasu przechowywania obserwowano również zwiększenie intensywności barwy żółtej soku jabłkowego (rysunek 22 C).

W próbkach soków mieszanych tendencja zmian parametrów barwy podczas przechowywania była podobna (rysunek 22). Jednak intensywność zmian tych parametrów była mniejsza w porównaniu z SJ2. Po 48 h przechowywania jasność próbek soków z 20-procentowym udziałem SP, SM i SG uległa nieznacznemu obniżeniu, odpowiednio o około 3, 2 i 4% (rysunek 22A). W próbkach z dodatkiem 40% SP i SM przechowywanych przez 48 h nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian wartości parametru L^* . Natomiast w przechowywanym soku z SG w ilości 40% wartość parametru L^* uległa nieznacznemu obniżeniu (o około 4%; rysunek 22A).

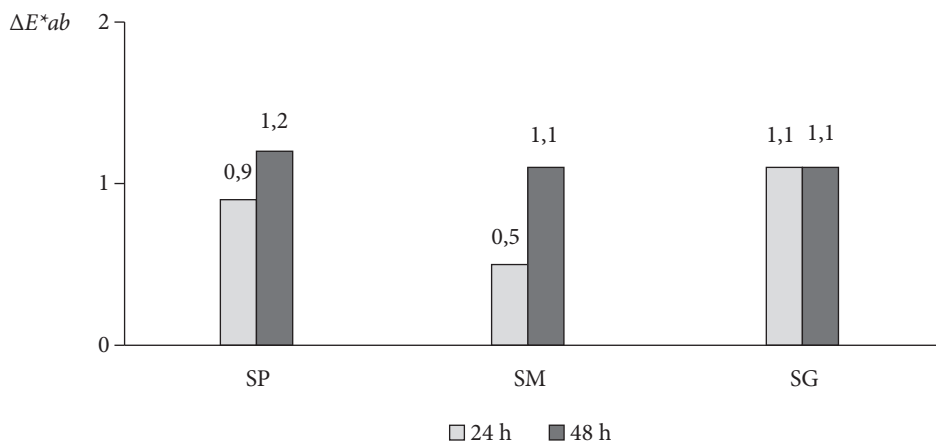
We wszystkich przechowywanych próbkach soków zaobserwowano zwiększenie intensywności barwy czerwonej i żółtej (rysunek 22B i C). Po 48 h przechowywania największy wzrost udziału barwy czerwonej zaobserwowano w próbce z SP w ilości 40% (wzrost a^* z $1,60$ do $3,70$; $\Delta a^* = 2,10$; rysunek 22B), zaś najmniejszy wzrost wartości parametru a^* stwierdzono w próbce z 40-procentowym udziałem SM (wzrost a^* z $2,31$ do $2,50$; $\Delta a^* = 0,19$; rysunek 22B). Zaobserwowano, że zwiększenie udziału soku cytrusowego w soku mieszanym wpłynęło na mniejszy wzrost parametru a^* i b^* w przechowywanych sokach. Wyjątek stanowił sok jabłkowo-pomarańczowy, zmiany parametru a^* były mniejsze w przypadku dodatku SP w ilości 20%, w porównaniu z 40% (odpowiednio $\Delta a^* = 0,79$ i $2,10$).

Dodatek badanych soków z owoców cytrusowych do soku jabłkowego, z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego, wpłynął na zmniejszenie brązowienia otrzymanego soku mieszanego podczas przechowywania, o czym świadczył istotnie mniejszy wzrost udziału barwy czerwonej i nieznaczące zmiany w jasności w porównaniu z próbką kontrolną soku jabłkowego.

Na rysunku 23 przedstawiono zmiany parametru ΔE^*_{ab} w trakcie przechowywania soków cytrusowych. Wartość parametru ΔE^*_{ab} soku SG nie zmieniła się, natomiast w przypadku próbek SP i SM wartość tego parametru wzrosła odpowiednio około 1-krotnie i 2-krotnie. Po 48 h przechowywania zmiana barwy wszystkich próbek soków była niewielka ($\Delta E^*_{ab} < 1,5$).

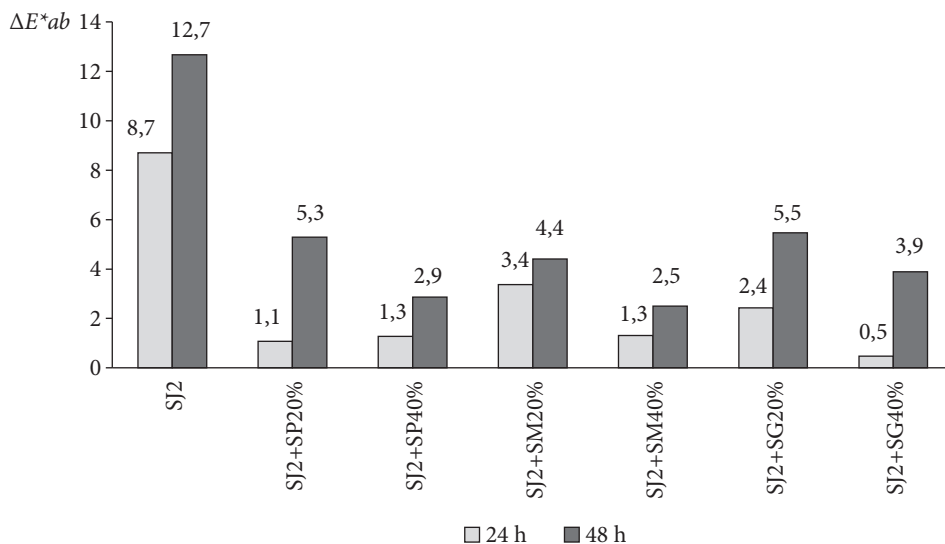
Zmiany parametru ΔE^*_{ab} w trakcie przechowywania SJ2 bez dodatku i z dodatkiem soków cytrusowych przedstawiono na rysunku 24. We wszystkich próbkach soków wraz ze wzrostem czasu przechowywania obserwowano wzrost wartości tego parametru. Po 48 h przechowywania największe zmiany barwy nastąpiły w próbkach soku jabłkowego bez dodatku soków cytrusowych ($\Delta E^*_{ab} = 12,7$). W przypadku próbek soków mieszanych zmiany całkowitej różnicy barwy były znacznie mniejsze w porównaniu z SJ2, co pozwala na stwierdzenie, że badane soki z owoców cytrusowych wpłynęły na hamowanie brązowienia soku jabłkowego. Ogólnie, zwiększenie udziału soku cytrusowego w soku mieszanym, z jednoczesnym

zmniejszeniem udziału soku jabłkowego, spowodowało mniejszy wzrost wartości parametru ΔE^*_{ab} w trakcie przechowywania. Po 48 h w sokach z dodatkiem 40% SP i SM zmiana barwy była niewielka (odpowiednio $\Delta E^*_{ab} = 2,9$ i $2,5$; rysunek 24).



Rysunek 23. Zmiany całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) soków z owoców cytrusowych (SP, SM, SG) podczas przechowywania

Źródło: Badania własne



Oobjaśnienia jak pod tabelą 30

Rysunek 24. Zmiana całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) soku jabłkowego oraz soków mieszanych podczas przechowywania

Źródło: Badania własne

Na podstawie parametru ΔE^*_{ab} obliczono stopień hamowania brązowienia przechowywanych próbek soków mieszanych. Zaobserwowano, że stopień hamowania ciemnienia soku zależał od udziału soku cytrusowego. Stopień inhibicji brązowienia soków mieszanych na bazie pomarańczy i grejpfruta (20%) był podobny i wynosił około 58% w stosunku do próbki kontrolnej soku jabłkowego. W przechowywanym soku z dodatkiem SM w ilości 20% stwierdzono nieznacznie większy stopień hamowania brązowienia (65%). W przypadku soków z 40-procentowym udziałem soków cytrusowych po 48 h przechowywania inhibicja brązowienia tych soków wynosiła około 79% (SP i SM) i 69% (SG) w stosunku do SJ2.

Oceny stopnia brązowienia badanych próbek soków podczas przechowywania i wpływu zastosowanych inhibitorów na zmiany brązowienia soków dokonano także poprzez przesłedzenie zmian parametru BI (indeks brązowienia), YI (indeks zażółcenia) oraz wartości absorbancji przy długości fali 420 nm badanych próbek soków. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 35. W tabeli tej zestawiono także wyniki omawianych parametrów dla przechowywanych soków cytrusowych. Uzyskane dla soków SP, SM i SG ujemne wartości ΔBI i ΔA_{420} świadczyły o tym, że w sokach tych nie przebiegał proces brązowienia. Wyniki są zgodne z danymi otrzymanymi na podstawie analizy aktywności PPO w sokach (brak aktywności PPO w przechowywanych sokach). Ponadto, w trakcie przechowywania próbki soków SP, SM i SG nie ulegały zażółceniu (ujemne wartości ΔYI).

Tabela 35. Zmiana indeksu brązowienia (ΔBI), indeksu zażółcenia (ΔYI) oraz wartości absorbancji przy 420 nm soku jabłkowego, soków cytrusowych i soków mieszanych podczas przechowywania

Sok jabłkowy z sokami z owoców cytrusowych (%)	ΔBI		ΔYI		ΔA_{420}	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
SJ2	13,6	22,0	13,6	18,9	0,128	0,198
SP	-13,1	-19,1	-1,2	-1,6	-0,006	-0,054
SJ2+SP						
20	1,7	11,3	1,2	9,4	0,007	0,022
40	0,1	9,5	0,2	3,7	0,001	0,004
SM	3,6	-4,5	1,0	-1,1	-0,025	-0,199
SJ2+SM						
20	6,6	8,6	4,5	6,9	0,019	0,027
40	0,0	5,9	-0,2	4,7	0,006	0,003
SG	-1,9	-2,9	-1,2	-1,8	-0,045	-0,091
SJ2+SG						
20	3,1	7,9	2,3	7,0	0,007	0,014
40	0,2	5,8	-0,1	5,2	0,006	0,007

Objaśnienia jak pod tabelą 30.

Źródło: Badania własne.

Podczas przechowywania w próbkach soków jabłkowych SJ2 i mieszanych zaobserwowano wzrost indeksu brązowienia (BI). Po 48 h przechowywania największe zmiany wartości BI stwierdzono w soku jabłkowym bez dodatku soków cytrusowych ($\Delta BI = 22$), co świadczyło o postępującym procesie brązowienia soku. W próbkach pozostałych soków zaobserwowano mniejszy wzrost wartości BI w porównaniu z SJ2. Ponadto zwiększenie udziału soku cytrusowego w soku mieszanym z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego SP, SM i SG spowodowało mniejszy wzrost wartości parametru ΔBI w trakcie przechowywania. Hamowanie brązowienia w sokach mieszanych SJ2+SM i SJ2+SG było zbliżone i wynosiło 63% (20%) i 74% (40%), w stosunku do próbki kontrolnej soku jabłkowego. Natomiast stopień hamowania brązowienia próbek soków, do których dodano SP w ilości 20 i 40%, był mniejszy i wynosił odpowiednio około 49% i 57%, w stosunku do SJ2 (tabela 35).

Podczas przechowywania sok jabłkowy SJ2 ulegał istotnie większemu zażółczeniu niż soki z SP, SM i SG ($p < 0,05$, tabela 35). Po 48 h odnotowano w próbce SJ2 wzrost stopnia zażółcenia o 72% (zmiana wartości YI z 26,1 na 45,0). Wraz ze wzrostem udziału soku cytrusowego w soku mieszanym, z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego, obserwowano mniejszy wzrost wartości parametru YI w trakcie przechowywania. Po 48 h przechowywania najmniejszym stopniem zażółcenia charakteryzował się sok z dodatkiem SP w ilości 40% (zmiana wartości YI z 82,0 na 85,7, wzrost o 4,5%).

Wpływ soków z owoców cytrusowych na zmiany brązowienia przechowywanych soków jabłkowych określono także poprzez zmierzenie zmiany absorbancji przy długości fali 420 nm (ΔA_{420}). Wartość absorbancji A_{420} soku jabłkowego SJ2 przed przechowywaniem wynosiła $0,155 \pm 0,004$. Wraz ze wzrostem czasu przechowywania obserwowano wzrost wartości tego parametru (tabela 35). Po 48 h wartość absorbancji A_{420} próbki soku SJ2 wzrosła około 1,3 raza ($\Delta A_{420} = 0,198$). Obserwowany wzrost tego parametru świadczył o postępującym procesie brązowienia soku jabłkowego. Dodatek soków z owoców cytrusowych (SP, SM i SG) do soku jabłkowego wpłynął na mniejszy wzrost absorbancji w sokach podczas przechowywania. Ponadto wraz ze zwiększeniem udziału soku cytrusowego w sokach mieszanych i zmniejszeniem udziału soku jabłkowego odnotowano mniejszy wzrost tego parametru w trakcie przechowywania. Przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotny wpływ czasu przechowywania, typu oraz udziału soku cytrusowego (SP, SM i SG) na wartość absorbancji A_{420} soku jabłkowego ($p < 0,05$). Po 48 h przechowywania w próbkach soków SJ2 z dodatkiem SP, SM i SG w ilości 20% wartość absorbancji wzrosła odpowiednio o około 24, 13 i 7%. Natomiast w próbkach o większym udziale soku cytrusowego w sokach mieszanych nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian absorbancji w trakcie przechowywania ($p > 0,05$), co świadczyło o hamowaniu brązowienia przez badane soki cytrusowe.

Podsumowując wszystkie uzyskane wyniki badań, można stwierdzić, że optymalnym udziałem soków cytrusowych (SP, SM i SG) w soku mieszanym wpływającym na hamowanie brązowienia soków było 40%.

W badaniach przeprowadzonych przez Klimczak i Ćwiklińską [2013] na mętym soku jabłkowym z dodatkiem soku z granatu (PJ) nie wykazano zależności ilości dodatku PJ od stopnia hamowania brązowienia soku (na podstawie parametru ΔE^*_{ab}). Po 48 h przechowywania w 4°C inhibicja brązowienia soku z dodatkiem PJ w ilości 25 i 35 i 50% wynosiła odpowiednio 79, 76 i 61% w stosunku do próby kontrolnej soku jabłkowego. Ponadto zmiany barwy nie były związane ze zmianami zawartości antocyjanów i ich oksydacyjną degradacją przez chinony, co mógł sugerować mniejszy stopień inhibicji PPO przy większym udziale PJ w soku mieszanym. W trakcie przechowywania zmiany zawartości tych związków były nieistotne statystycznie. Obserwowana stabilność antocyjanów w soku mieszanym prawdopodobnie była związana z ochronnym działaniem polifenoli jabłek na barwniki antocyjanowe, a także z niską temperaturą przechowywania [Oszmiański 2002; Castañeda-Ovando i in. 2009].

Oszmiański, Sokół-Łętowska i Kuczyński [1994] badali wpływ dodatku soku z rabarbaru (0,25–3%) do miazgi jabłek odmian ‘Antonówka’, ‘Kronselska’ i ‘Golden Delicious’ na brunatnienie mętnego soku jabłkowego. W badanych próbkach soku zmierzono wartość parametru L^* . Soki z udziałem soku z rabarbaru porównano z sokami z dodatkiem 0,5-procentowego kwasu askorbinowego. Wraz ze wzrostem dodatku soku z rabarbaru barwa soku ulegała pojaśnieniu. Najbardziej efektywny w hamowaniu brązowienia soku jabłkowego okazał się 2-procentowy (‘Antonówka’) i 3-procentowy (‘Kronselska’) sok z rabarbaru. Sok ten, dodany do miazgi jabłek, hamował reakcję brunatnienia w stopniu porównywalnym z 0,5-procentowym dodatkiem kwasu askorbinowego.

W celu określenia powiązań pomiędzy stopniem brązowienia (wyrażonym jako parametr ΔA_{420}) a aktywnością PPO oraz badanymi parametrami barwy (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) soków mieszanych przechowywanych przez 24 i 48 h obliczono współczynnik korelacji r Pearsona. Wyniki zaprezentowano w tabeli 36.

Nie stwierdzono liniowej zależności pomiędzy zmianami parametru A_{420} przechowywanych soków a aktywnością PPO w sokach. Zmiana stopnia brązowienia soków przechowywanych przez 24 h była związana ze zmianami parametru a^* i b^* . Współczynniki korelacji kształtowały się na podobnym poziomie $r = 0,708$.

Wykazano także współzależność pomiędzy stopniem brązowienia określonym przez parametr ΔA_{420} a ΔBI ($r = 0,786$). Stwierdzono również istnienie dodatniej korelacji pomiędzy zmianami parametru A_{420} a stopniem zażółcenia ΔYI próbek soków ($r = 0,771$; tabela 36).

Tabela 36. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy ΔA_{420} a aktywnością PPO, wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI przechowywanych soków mieszanych

Parametr	Współczynnik korelacji r Pearsona	
	24 h	48 h
Aktywność PPO	-0,014	0,036
ΔL^*	-0,158	0,077
Δa^*	0,708*	-0,282
Δb^*	0,708*	0,009
ΔE_{ab}^*	0,379	0,556*
ΔYI	0,771*	0,564*
ΔBI	0,786*	0,358

* Korelacje istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$; $n = 12$.

Źródło: Badania własne.

W przypadku soków przechowywanych przez 48 h nie stwierdzono zależności pomiędzy ΔA_{420} a zmianami parametrów barwy L^* , a^* i b^* ($p > 0,05$; tabela 36). Wykazano natomiast dodatnią korelację pomiędzy zmianami wartości parametru A_{420} a parametrem ΔE_{ab}^* określającym także stopień brązowienia ($r = 0,556$) oraz stopniem zażółcenia ΔYI próbek soków ($r = 0,564$).

Nie obliczono korelacji pomiędzy ΔBI a parametrem ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* i ΔYI , ponieważ parametry te były powiązane z sobą obliczeniowo.

Przeprowadzona analiza korelacji nie wykazała współzależności pomiędzy aktywnością PPO w przechowywanych przez 24 h sokach a zmianami parametrów barwy L^* , a^* , b^* , parametrów określających stopień brązowienia (ΔE_{ab}^* , ΔBI , ΔA_{420}) oraz stopień zażółcenia (ΔYI) (tabela 37).

Tabela 37. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy aktywnością PPO a wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔBI , ΔYI , ΔA_{420} przechowywanych soków mieszanych

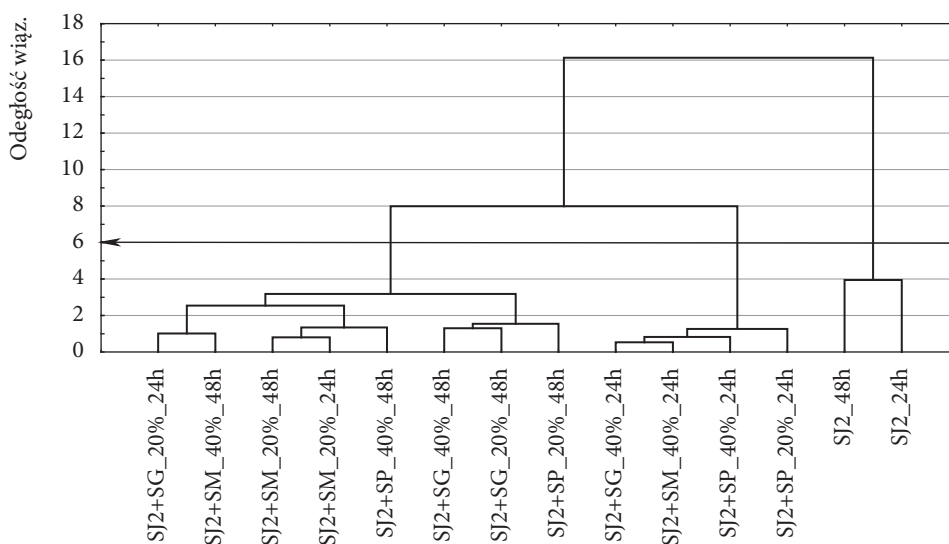
Parametr	Współczynnik korelacji r Pearsona	
	24 h	48 h
ΔL^*	-0,017	-0,236
Δa^*	-0,207	0,564*
Δb^*	0,140	0,433
ΔE_{ab}^*	-0,168	0,289
ΔYI	0,098	0,259
ΔBI	0,087	0,526*
ΔA_{420}	-0,014	0,036

* Korelacje istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$; $n = 12$.

Źródło: Badania własne.

W celu zbadania podobieństwa pomiędzy badanymi sokami jabłkowymi i sokami mieszanymi przechowywanymi przez 24 i 48 h zastosowano analizę skupień (CA, ang. *cluster analysis*). Wyniki CA pozwoliły na wyodrębnienie trzech skupień. Otrzymany dendrogram przedstawia rysunek 25. Następnie przeprowadzono analizę wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa w celu zbadania istotności różnic między średnimi rangami analizowanych parametrów (aktywność PPO, ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI , ΔA_{420}) pomiędzy skupieniami (tabela 38). Wszystkie zmienne w istotny statystycznie sposób różnicowały wyodrębnione skupienia ($p < 0,05$). Ze względu na małą liczebność próbek (skupienie I) nie określano istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi rang. Przy interpretacji wyników posłużono się analizą wykresów *ramka-wąsy* uwzględniających w każdej zmiennej medianę, rozstęp ćwiartkowy (percentyl 25 i 75) oraz rozstęp (wartość minimalną i maksymalną).

Pierwsze skupienie, zdecydowanie odbiegające od pozostałych (najniższa średnia ranga parametru ΔL^* oraz najwyższe średnie rang pozostałych parametrów), tworzyły soki jabłkowe bez dodatku soków z owoców cytrusowych SJ2 przechowywane przez 24 i 48 h (rysunek 25). Próbki te charakteryzowały się, w porównaniu z próbkami z grupy II i III, najwyższą aktywnością PPO, największymi zmianami parametru ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , indeksu zażółcenia (ΔYI), indeksu brązowienia (ΔBI) oraz absorbancji przy długości fali 420 nm (ΔA_{420}) w trakcie przechowywania (tabela 38).



Objaśnienia jak pod tabelą 30

Rysunek 25. Dendrogram grupowania przechowywanych próbek soków jabłkowych i soków mieszaných

Źródło: Badania własne

Ogólnie, soki należące do I klastru w największym stopniu ulegały brązowieniu podczas przechowywania, co wykazano wcześniej w szczegółowej analizie zmian poszczególnych parametrów przechowywanych soków jabłkowych.

Skupienie II obejmowało próbki soków jabłkowych SJ2 z dodatkiem SP w ilości 20 i 40% (przechowywane przez 24 h) oraz SJ2+SM i SJ2+SG z 40-procentowym udziałem soków cytrusowych (24 h). Próbki te, w porównaniu z próbkami soków z grupy I i III charakteryzowały się najmniejszymi zmianami analizowanych parametrów w trakcie przechowywania. Jednak aktywność PPO w tych sokach (8,2–10,1 j/min) była porównywalna do wartości tego parametru uzyskanego w próbkach soków zaklasyfikowanych do klastru III (8,3–9,2 j/min). Podobne zależności obserwowano w przypadku parametru ΔL oraz zmian wartości absorbancji przy długości fali 420 nm. Obserwowane zmiany brązowienia w tych sokach były najmniejsze, co było związane z właściwościami inhibicyjnymi zastosowanego dodatku soków z owoców cytrusowych oraz ze zmniejszeniem udziału soku jabłkowego w soku mieszanym.

Tabela 38. Średnie rangi analizowanych parametrów przechowywanych próbek soków jabłkowych i mieszanych, w grupach wyodrębnionych przy użyciu analizy skupień

Parametr	Grupa		
	I	II	III
PPO [j/min]	13,5	7,2	6,1
ΔL^*	2,5	12,0	6,5
Δa^*	11,5	2,5	9,0
Δb^*	13,5	2,5	8,5
ΔE_{ab}^*	13,5	2,5	8,5
ΔYI	13,5	2,5	8,5
ΔBI	13,5	2,5	8,5
ΔA_{420}	13,5	4,1	7,7

Źródło: Badania własne.

Skupienie III tworzyły próbki soków SJ2 z dodatkiem SP, SM i SG w ilości 20 i 40% (przechowywane przez 48 h) oraz SJ2 z 20% SM i SG (24 h). Wszystkie zmienne (parametry) były ze sobą skorelowane, dlatego przy interpretacji wyników uzyskanych w analizie skupień należy zachować szczególną ostrożność. Mimo że przechowywane przez 48 h próbki soków z 20- i 40-procentowym udziałem soków cytrusowych zostały zaklasyfikowane do jednego klastru, analizując poszczególne wartości wskaźników brązowienia (ΔE_{ab}^* , ΔBI , ΔA_{420}) oraz parametrów ΔL^* , Δa^* tych próbek, stwierdzono, że optymalnym udziałem soków cytrusowych (SP, SM i SG) w soku mieszanym wpływającym na hamowanie brązowienia soków, a tym samym na stabilizację barwy przechowywanych soków, jest udział 40-procentowy.

Zmiany absorbancji przy długości fali 420 nm w trakcie przechowywania próbek soku z 40-procentowym udziałem SP, SM i SG były nieistotne statystycznie (tabela 35, rozdział 6.3.3). W soku z dodatkiem SP w ilości 40% w porównaniu z 20% SP stwierdzono 5-krotnie mniejszy spadek jasności soków, odpowiednio $\Delta L^* = -0,2$ i $-2,5$. Wartość parametru ΔE_{ab}^* tego soku była około 2-krotnie mniejsza (rysunek 24, rozdział 6.3.3).

W próbkach soku z 40-procentowym udziałem SM nastąpił 8-krotnie mniejszy wzrost parametru a^* niż w sokach z dodatkiem SM w ilości 20%, odpowiednio $\Delta a^* = 0,19$ i $1,55$. Spadek jasności w próbkach soku SJ2+40% M był 1,5-krotnie mniejszy ($\Delta L^* = -0,91$) w porównaniu z SJ2+20% M ($\Delta L^* = -1,39$). Soki te odznaczały się też około 1,5 raza mniejszą wartością parametrów ΔE_{ab}^* i ΔBI (rysunek 24, tabela 35).

W próbkach soku z 40-procentowym udziałem SG w porównaniu z sokiem z 20% SG wartość parametru a^* była 3-krotnie mniejsza, odpowiednio $\Delta a^* = 0,47$ i $1,42$. Zwiększenie udziału soku SG w soku mieszanym z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego spowodowało także mniejszy wzrost wartości parametru ΔE_{ab}^* i ΔBI w trakcie przechowywania (około 1,5 raza; rysunek 24, tabela 35).

Ponadto próbki soku z 40-procentowym udziałem soków cytrusowych charakteryzowały się od 1,3 (SG) do 2,5 (SP) raza mniejszym stopniem zażółcenia w porównaniu z sokami z 20% SP, SM i SG (tabela 36). Natomiast stopień hamowania aktywności PPO w przechowywanych próbkach soków nie zależał od udziału soku cytrusowego w soku mieszanym.

6.4. Ocena pożądalności barwy mętnego soku jabłkowego z dodatkiem ekstraktów roślinnych oraz soków z owoców cytrusowych

Wśród metod analitycznych stosowanych w ocenie jakości żywności metody analizy sensorycznej zajmują ważne miejsce. Podczas gdy metody chemiczne, fizyczne czy mikrobiologiczne dostarczają informacji o określonych właściwościach samego produktu, metody sensoryczne informują o tym, jak te właściwości są odbierane przez zmysły człowieka i jakie wrażenia wywołują. Percepcję sensoryczną uważa się za najważniejszy, obok ceny i marki, czynnik wpływający na zachowania konsumenta odnośnie do wyboru żywności i jej spożycia [Baryłko-Pikielna i Matuszewska 2009; Włodarska i in. 2016; Balon i in. 2017].

Sensoryczne badania konsumenckie mają wiele zastosowań. W literaturze przedmiotu podkreśla się ich znaczenie przy opracowywaniu i wprowadzaniu na rynek nowych produktów żywnościowych. Produkty spełniające oczekiwania

konsumentów, szczególnie w zakresie ich jakości sensorycznej, są bardziej przez nich akceptowane i zapewniają rynkowy sukces i zyskowność podejmowanych przez przedsiębiorstwa działań [Baryłko-Pikielna i Matuszewska 2009; Czajkowska, Kowalska i Piotrowski 2013; Sielicka i Klimczak 2017].

Barwa mętneho soku jabłkowego jest jednym z najważniejszych wyróżników jego jakości. Z punktu widzenia konsumenta jest cechą podlegającą ocenie w pierwszej kolejności podczas jego decyzji zakupowej. Barwa soku jabłkowego powinna być w miarę jasna, wywoływać skojarzenie z miąższem świeżego jabłka. Soki o pociemniałej barwie wyglądają niekorzystnie i nie są akceptowane przez konsumentów [Turk, Vorobiev i Baron 2012; Kudełka i Głuszek 2014; Włodarska i in. 2016].

Ostatnim etapem niniejszej pracy było zaplanowanie i przeprowadzenie oceny pożądalności w zakresie barwy badanych próbek soków. Wykonanie klasycznych sensorycznych badań konsumenckich nie było możliwe ze względu na specyfikę badań przechowalniczych. Jednak wykonano konsumencką ocenę pożądalności barwy badanych próbek soków przez siedmioosobowy zespół oceniający. Ocena taka w praktycznej realizacji badań sensorycznych bywa przeprowadzana i może dostarczać cennych informacji, jednak zawsze o charakterze orientacyjnym. Do ostatecznego wnioskowania jej wyniki muszą być potwierdzone badaniami na dużej grupie konsumentów (~100 osób) [Baryłko-Pikielna i Matuszewska 2000].

Ocenę pożądalności barwy próbek soku jabłkowego bez i z dodatkiem ekstraktów roślinnych, soków mieszanych oraz soków z owoców cytrusowych przeprowadzono z wykorzystaniem 9-stopniowej skali hedonicznej, gdzie 9 oznaczało barwę wyjątkowo pożądaną, 1 – wyjątkowo niepożądaną. Badaniami objęto soki przed przechowywaniem i po przechowywaniu przez 48 h w 4°C. Wyniki badań zaprezentowano w tabelach 39 i 40 i na wykresach 26 i 27. Należy zaznaczyć, że wszystkie badane próbki były akceptowane przez oceniających w zakresie smaku i zapachu.

6.4.1. Wpływ ekstraktów roślinnych oraz soków z owoców cytrusowych na pożądalność barwy nieprzechowywanego soku jabłkowego

Wyniki związane z oceną pożądalności barwy nieprzechowywanych soków jabłkowych bez dodatku i z dodatkiem ekstraktów EH5, EPW i ER przedstawiono w tabeli 39.

Stopień pożądalności barwy soków jabłkowych bez dodatku ekstraktów kształtował się na podobnym poziomie i wynosił $6,6 \pm 0,5$ (SJ1) i $6,1 \pm 0,7$ (SJ3). Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że na stopień pożądalności barwy próbek soku jabłkowego miał istotny wpływ rodzaj i stężenie ekstraktu roślinnego ($p < 0,05$). Spośród badanych soków SJ1 z dodatkiem 3 g EH5/l oraz SJ3 z 1 g EPW/l odznaczały się wyższą pożądalnością barwy w porównaniu z sokiem jabłkowym bez dodatku ekstraktów (odpowiednio noty 8,0 i 7,4).

Tabela 39. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na pożądalność barwy soku jabłkowego przed przechowywaniem

Sok jabłkowy z ekstraktami roślinnymi (g/l)	Pożądalność barwy [j.u]
SJ1	6,6 ^a
SJ1+EH5	
1	6,9 ^a
2	7,0 ^a
3	8,0
SJ3	6,1 ^a
SJ3+EPW	
1	7,4
2	6,6 ^a
3	6,6 ^a
SJ3+ER	
2	6,9 ^a
3	6,9 ^a
5	6,1 ^a

Objaśnienia jak pod tabelą 21.

^a Wartości średnie, dla danego stężenia ekstraktu, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie, w porównaniu z danym sokiem jabłkowym bez dodatku ekstraktów (SJ1, SJ3) (test Dunnetta, $p < 0,05$).

Źródło: Badania własne.

W przypadku pozostałych próbek zmianę barwy soku jabłkowego poprzez zastosowanie dodatku ekstraktów oceniający określili również jako korzystną, jednak stopień pożądalności tych próbek nie różnił się istotnie statystycznie w porównaniu z próbką soku jabłkowego bez dodatku ekstraktów ($p > 0,05$). Najniższą notę uzyskał sok SJ3 z dodatkiem 5 g ER/l (6,1). Jednak zaobserwowano, że stopień pożądalności barwy próbek z dodatkiem PW i ER nie zależał od ilości danego ekstraktu w soku ($p > 0,05$).

Warto nadmienić, że soki z dodatkiem EPW w porównaniu z sokami z ER, EH5 oraz sokiem jabłkowym charakteryzowały się większym udziałem barwy czerwonej (a^*). Natomiast dominująca barwą soków z dodatkiem EH5 była barwa żółta (tabela 25, rozdział 6.3.2).

Wyniki związane z oceną pożądalności barwy nieprzechowywanych soków mieszanych oraz soków z owoców cytrusowych przedstawiono w tabeli 40. Najwyższą pożądalnością barwy odznaczały się nieprzechowywane soki cytrusowe SP, SM i SG. Średnia ocena pożądalności tych próbek była porównywalna i wynosiła 7,6 (tabela 40). Najniższą notę oceniający przyznali próbce soku jabłkowego SJ2 (5,9).

Tabela 40. Pożądalność barwy soku jabłkowego, soków cytrusowych i soków mieszanych przed przechowywaniem

Sok jabłkowy z sokami z owoców cytrusowych (%)	Pożądalność barwy [j.u]
SJ2	5,9 ^a
SP	7,6
SJ2+SP	
20	6,7 ^a
40	7,0 ^a
SM	7,7
SJ2+SM	
20	7,1 ^a
40	7,4
SG	7,6
SJ2+SG	
20	6,4 ^a
40	7,3

Objaśnienia jak pod tabelą 30.

^a Wartości średnie przy danym udziale soku z owoców cytrusowych w soku mieszanym, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie, w porównaniu z sokiem jabłkowym bez dodatku soków cytrusowych (SJ2) (test Dunnetta, $p > 0,05$).

Źródło: Badania własne.

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała statystycznie istotny wpływ typu oraz udziału soku cytrusowego na stopień pożądalności barwy próbek soku jabłkowego ($p < 0,05$). Dodatek SP, SM i SG do soku jabłkowego wpłynął na wzrost pożądalności barwy w odniesieniu do soku jabłkowego, jednak nie w każdym przypadku różnice te były istotne statystycznie (tabela 40).

Pożądalność próbek soków mieszanych z 20-procentowym udziałem soku cytrusowego wynosiła od 6,4 (SG) do 7,1 (SM). Zwiększenie udziału soku cytrusowego w soku mieszanym wpłynęło na wzrost pożądalności próbek soków (w odniesieniu do próbki kontrolnej soku jabłkowego), jednak różnice te w soku danego typu były nieistotne statystycznie ($p > 0,05$).

Warto nadmienić, że stopień pożądalności próbek SJ2 z dodatkiem SP, SM i SG w ilości 20 i 40% oraz soków cytrusowych nie różnił się istotnie statystycznie ($p > 0,05$). Natomiast w porównaniu z próbką SJ2 próbki SJ2 +SM i SJ2+SG z 40-procentowym udziałem soku cytrusowego odznaczały się wyższym stopniem pożądalności barwy (noty 7,4 i 7,3, odpowiednio). Próbki te charakteryzowały się większym udziałem barwy czerwonej (a^*) i mniejszym barwy żółtej (b^*) niż próbka SJ2 z dodatkiem SP w ilości 40% (tabela 34, rozdział 6.3.3).

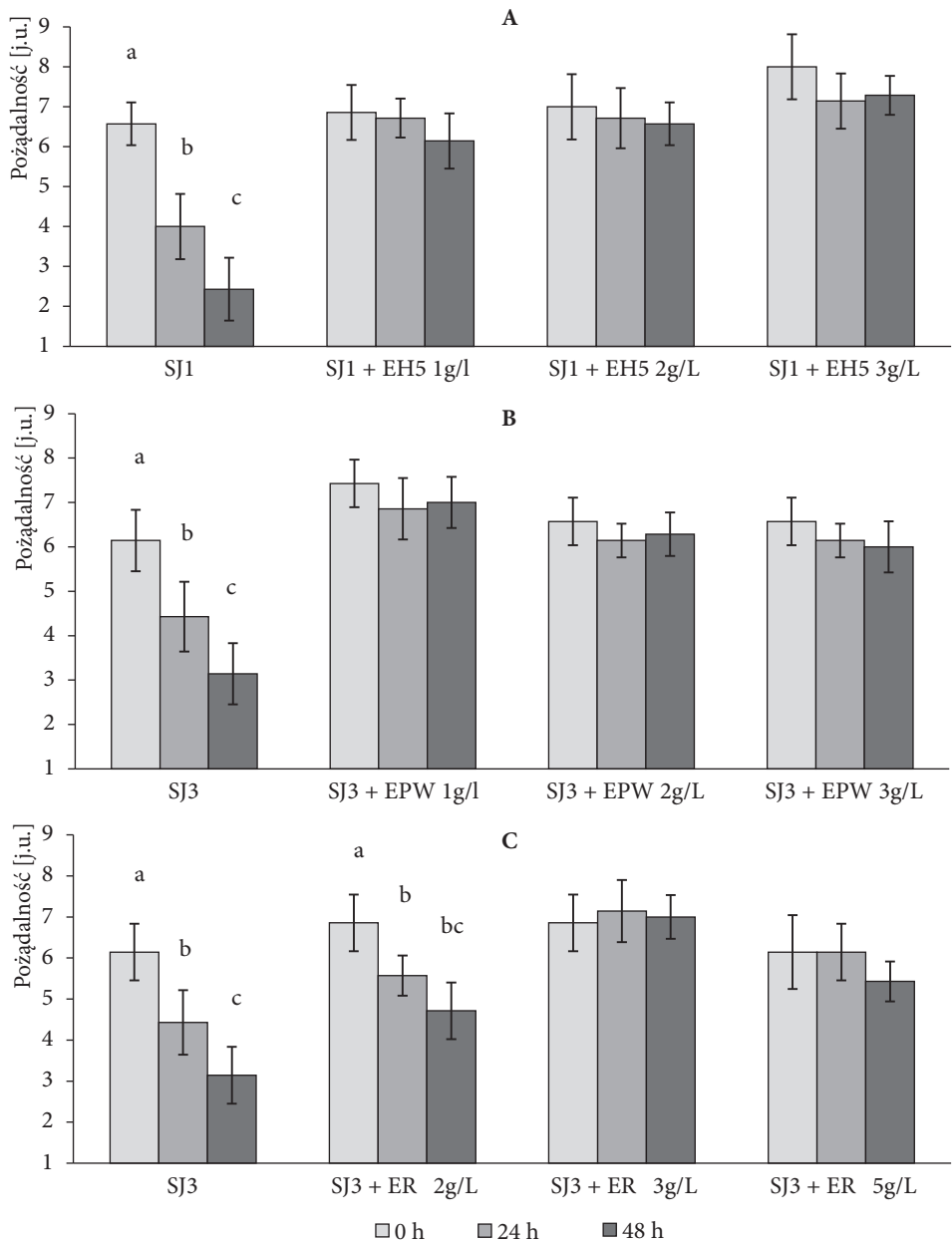
Barwa żywności, w tym soków owocowych, wpływa na percepcję smakowitości, sugerując odczuwanie określonego smaku i zapachu, oraz na akceptację konsumentką [Zampini i in. 2007; Barrett, Beaulieu i Shewfelt 2010; Fernández-Vázquez i in. 2014]. Fernández-Vázquez i in. [2014] badali wpływ modyfikacji barwy soku pomarańczowego poprzez dodatek barwników spożywczych (czerwonego i zielonego) na pożądalność tego soku. Ocena pożądalności próbek była przeprowadzona przed konsumpcją i po konsumpcji soków. Dodatek barwnika czerwonego do soku pomarańczowego wpłynął na wzrost akceptacji konsumenckiej. Natomiast próbki z dodatkiem barwnika zielonego otrzymały niższe noty w porównaniu z sokiem bez dodatku barwnika. Oceniający zasugerowali się tym, że owoce na pierwszym etapie ich dojrzewania są zielone i mniej słodkie. Noty pożądalności tych próbek wzrosły po ich konsumpcji.

Ocena wpływu dodatku różnych owoców (20%) na cechy organoleptyczne mętnego soku jabłkowego z odmiany 'Szara Reneta' była przedmiotem badań Wojdyło [2011]. Zakres badań obejmował ocenę wyglądu, barwy, smaku i zapachu sporządzonych soków przy użyciu skali 5-punktowej, gdzie wartość 1 oznaczała wyróżnik bardzo niepożądany, 5 – bardzo pożądaną. Sok jabłkowy z dodatkiem rokitnika, a także czarnej porzeczki i aronii odznaczał się najwyższą pożądalnością w zakresie barwy (odpowiednio, noty 4,9, 5,0 i 4,7). Jednak pod względem smaku i zapachu soki z rokitnikiem oraz jarzębiną uzyskały najniższe noty i nie były akceptowane przez oceniających.

W badaniach przeprowadzonych przez Łysoniewską, Kalisza i Mitek [2011] wzbogacenie napoju truskawkowego ekstraktem z zielonej herbaty (1 g/kg) wpłynęło na poprawę cech organoleptycznych napoju, w tym barwę. Napój ten, w porównaniu z napojem truskawkowym z dodatkiem ekstraktu z miodokrzewu oraz bez dodatku ekstraktu, uzyskał wyższe noty w ocenie pożądalności konsumentki.

6.4.2. Wpływ ekstraktów roślinnych oraz soków z owoców cytrusowych na pożądalność barwy przechowywanego soku jabłkowego

Przechowywanie próbek SJ1 i SJ3 spowodowało istotne statystycznie zmiany w ocenie pożądalności barwy w porównaniu z pożądalnością soków nieprzechowywanych. Po 48 h przechowywania ocena pożądalności została obniżona z „nieco pożądana” (nota 6,6) na „bardzo niepożądana” (nota 2,4) w przypadku próbki SJ1 oraz z „nieco pożądana” (nota 6,1) na „niepożądana” (nota 3,1) dla SJ3 w odniesieniu do próbek nieprzechowywanych (rysunek 26). Soki te praktycznie zostały zdyskwalifikowane przez oceniających ze względu na nieatrakcyjną brązową barwę.



Objaśnienia jak pod tabelą 21

^{a-c} Wartości średnie, w obrębie danego soku, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie (test Tukeya, $p < 0,05$)

Rysunek 26. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (A), z pestek winogron (B) i rokitnika (C) na pożądalność barwy przechowywanego soku jabłkowego

Źródło: Badania własne

W trakcie przechowywania próbek z dodatkiem ekstraktów EH5 (1, 2 i 3 g/l), EPW (1, 2 i 3 g/l) i ER (3 i 5 g/l) nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w pożądalności barwy (rysunki 26A, B i C). Według oceniających po 48 h przechowywania najkorzystniejszą barwą charakteryzowała się próbka soku jabłkowego z dodatkiem EH5 i ER w ilości 3 g/l (noty 7,3 i 7,0, odpowiednio) oraz sok z 1 g EPW/l (nota 7,0). Jak wykazano we wcześniejszych badaniach pomiaru barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$ oraz absorbancji przy 420 nm (rozdział 6.3.2), ekstrakty te skutecznie hamowały brązowienie soku jabłkowego. Należy jednak dodać, że stopień pożądalności barwy przechowywanych soków z dodatkiem EPW i EH5 nie zależał od ilości danego ekstraktu w soku ($p > 0,05$).

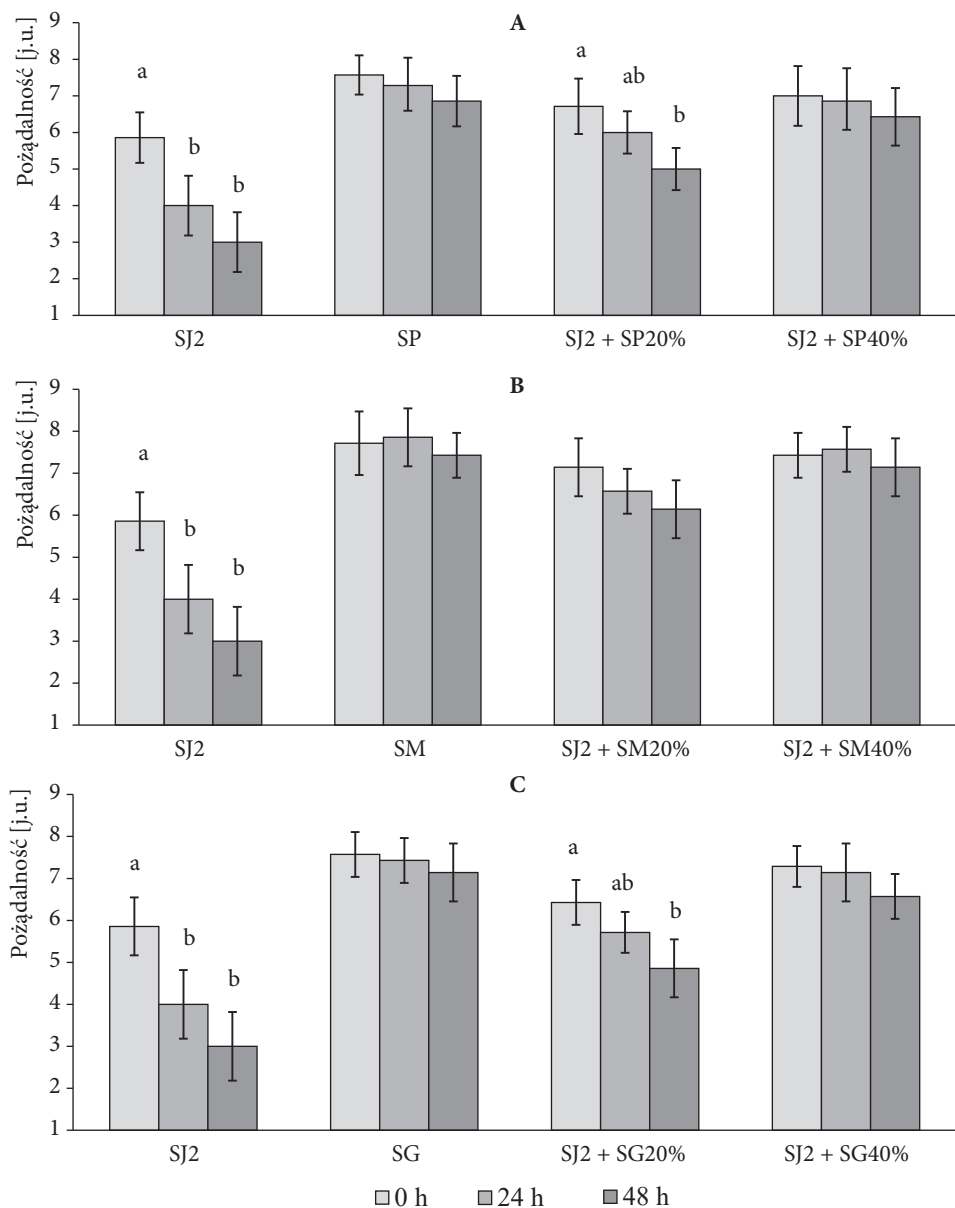
Wyjątek stanowiła próbka soku jabłkowego z dodatkiem 2 g ER/l (rysunek 27C). Po 48 h przechowywania próbka ta była „nieco niepożądana” przez oceniających (nota 4,7). Przechowywany sok z dodatkiem ER w ilości 2 g/l, w porównaniu z innymi sokami z dodatkiem ekstraktów, w największym stopniu ulegał brązowieniu, o czym świadczyły wysokie wartości parametru ΔE^*_{ab} oraz ΔBI (rozdział 6.3.2).

Tendencja zmian pożądalności barwy próbki SJ2 w trakcie przechowywania była podobna jak w przypadku próbek SJ1 i SJ3. Po 48 h przechowywania średnia wartość oceny pożądalności tej próbki została obniżona do 3,0 w odniesieniu do próbki nieprzechowywanej (rysunek 27). Brązowa barwa soku SJ2 nie była akceptowana przez oceniających.

W trakcie przechowywania soków cytrusowych nie zaobserwowano istotnych zmian pożądalności barwy ($p > 0,05$). Parametry barwy (L^* , a^* , b^*) przechowywanych soków cytrusowych nie ulegały istotnej zmianie, wartość parametru ΔE^*_{ab} była niska i wynosiła $< 1,5$ (różnica barwy nieznacznie zauważalna wg Cserhalmi i in. [2006]). Uzyskane w próbkach ujemne wartości ΔBI i ΔA_{420} świadczyły o tym, że w sokach tych nie przebiegał proces brązowienia (rozdział 6.3.2).

W przechowywanych próbkach soków jabłkowych z dodatkiem SM w ilości 20 i 40% oraz SP i SG w ilości 40% również nie zaobserwowano istotnych zmian pożądalności barwy ($p > 0,05$). Po 48 h przechowywania najkorzystniejszą barwą według oceniających charakteryzowała się próbka soku mieszanego z 40-procentowym udziałem SM (nota 7,1). Sok ten w porównaniu z sokami z 40% SP i SG odznaczał się najmniejszą zmianą barwy ($\Delta E^*_{ab} = 2,5$) oraz najmniejszym wzrostem parametru a^* ($\Delta a^* = 0,19$; rysunki 22 i 24B, rozdział 6.3.3). Warto zauważyć, że stopień pożądalności próbek SJ2 z 20- i 40-procentowym udziałem SM nie różnił się istotnie statystycznie ($p > 0,05$). Przechowywanie soku SJ2 z dodatkiem SP oraz SG w ilości 20% spowodowało istotne obniżenie pożądalności barwy. Po 48 h średnia wartość oceny tych próbek była na podobnym poziomie i wynosiła około 5,0 (rysunek 27B i C). Jednak stopień pożądalności przechowywanego soku z dodatkiem SP w ilości 20- i 40% nie różnił się istotnie statystycznie ($p > 0,05$).

Po 48 h przechowywania zmiany całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) próbek z 20-procentowym dodatkiem SP i SG były większe w porównaniu z innymi



Objaśnienia jak pod tabelą 30

^{a-c} Wartości średnie, w obrębie danego soku, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie (test Tukeya, $p < 0,05$)

Rysunek 27. Zmiany pożądalności barwy soku jabłkowego, soków cytrusowych oraz soków mieszanych: jabłkowo-pomarańczowych (A), jabłkowo-mandarynkowych (B) i jabłkowo-grejpfrutowych (C) podczas przechowywania

Źródło: Badania własne

próbkami (odpowiednio $\Delta E_{ab}^* = 5,3$ i $5,5$; rysunek 24, rozdział 6.3.3). Ponadto sok SJ2 z 20% SP odznaczał się największym stopniem zażółcenia (tabela 35, rozdział 6.3.3).

Fernández-Vázquez i in. [2014] w badaniach na sokach pomarańczowych wykazali zależność pomiędzy oceną różnicy barwy postrzeganą wizualnie przez oceniających a zmierzoną metodą instrumentalną. Wartość ΔE_{ab}^* wynosząca 2,8 została zaproponowana jako próg różnicy percepcji barwy konsumenta. W niniejszej pracy wartość tę osiągnęły próbki soków mieszanych na bazie pomarańczy po 48 h, jednak w przypadku soku SJ2+SP (3:2) stopień akceptacji barwy przez oceniających nie różnił się istotnie statystycznie w porównaniu z sokiem nieprzechowywanym ($p > 0,05$).

Zhang, Luo i Wang [2014] śledzili zmiany pożądalności barwy niepasteryzowanego soku pomarańczowego w trakcie przechowywania w 34°C przez 7 h. Nie wykazano istotnych zmian w stopniu akceptacji soków przez pierwsze 30 minut przechowywania. Po 7 h odnotowano istotne obniżenie pożądalności barwy badanych próbek soków (zmiana noty z około 9 na około 2).

W celu określenia powiązań pomiędzy stopniem pożądalności a parametrami barwy (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) soków z dodatkiem ekstraktów roślinnych (EH5, EPW, ER) oraz soków mieszanych, przechowywanych przez 24 i 48 h, obliczono współczynnik korelacji r Pearsona. Ponadto zbadano zależność pomiędzy pożądalnością a poszczególnymi parametrami określającymi stopień brązowienia (ΔE_{ab}^* , ΔBI , ΔA_{420}) oraz stopień zażółcenia ΔYI przechowywanych próbek soków. Wyniki zaprezentowano w tabelach 41 i 42 i dotyczą one tylko soków przechowywanych przez 48 h, ponieważ w przypadku soków przechowywanych przez 24 h nie stwierdzono istotnych statystycznie współzależności pomiędzy badanymi parametrami ($p > 0,05$).

Tabela 41. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy pożądalnością barwy a wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI , ΔA_{420} przechowywanych przez 48 h soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER)

Parametr	Współczynnik korelacji r Pearsona
ΔL^*	0,515
Δa^*	-0,664*
Δb^*	-0,626
ΔE_{ab}^*	-0,652*
ΔYI	-0,625
ΔBI	-0,662*
ΔA_{420}	-0,405

* Korelacje istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$; $n = 22$.

Źródło: Badania własne.

Rozpatrując powyższe zależności, stwierdzono istnienie ujemnej korelacji pomiędzy stopniem pożądalności barwy przechowywanych próbek soków z dodatkiem badanych ekstraktów roślinnych a parametrem Δa^* ($r = -0,664$).

Wykazano także współzależność pomiędzy pożądalnością a stopniem brązowienia (ΔE_{ab}^* , ΔBI) próbek soków (korelacja ujemna; $r > 0,6$; tabela 41).

W przypadku przechowywanych przez 48 h soków mieszanych nie stwierdzono zależności pomiędzy stopniem pożądalności barwy a zmianami parametrów barwy L^* , a^* i b^* ($p > 0,05$; tabela 42). Wykazano natomiast ujemną korelację pomiędzy pożądalnością a parametrem ΔE_{ab}^* określającym stopień brązowienia ($r = -0,930$) oraz stopniem zażółcenia ΔYI próbek soków ($r = -0,796$).

Tabela 42. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy pożądalnością a wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI , ΔA_{420} przechowywanych przez 48 h soków mieszanych

Parametr	Współczynnik korelacji r Pearsona
ΔL^*	0,322
Δa^*	-0,044
Δb^*	-0,009
ΔE_{ab}^*	-0,930*
ΔYI	-0,796*
ΔBI	-0,632
ΔA_{420}	-0,577

* Korelacje istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$; $n = 14$.

Źródło: Badania własne.

Określenie zależności pomiędzy oceną konsumentką a właściwościami fizykochemicznymi soków, w tym parametrami barwy, było przedmiotem badań Fernández-Vázquez i in. [2011], Wei i in. [2012], Fernández-Vázquez i in. [2014], Zhang, Luo i Wang [2014] oraz Włodarska i in. [2016].

Włodarska i in. [2016] zastosowali metodę regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów PLS1 do skonstruowania modeli umożliwiających przewidywanie ocen konsumentek na podstawie obiektywnych właściwości soków jabłkowych. Zidentyfikowali kluczowe wyróżniki jakości soków jabłkowych determinujące oceny wyodrębnionych segmentów (grup) konsumentów. Wykazano m.in., że ocena hedoniczna konsumentów segmentu 1 (preferujących soki mętne NFC oraz soki mętne odtworzone z koncentratu) była ujemnie skorelowana z parametrem barwy L^* . Natomiast w przypadku konsumentów segmentu 2, którzy wysoko ocenili jakość soków z koncentratu oraz soków świeżych, a także segmentu 3, preferujących soki klarowne, nie stwierdzono tej zależności.

W badaniach przeprowadzonych przez Fernández-Vázquez i in. [2011] wykazano, że najbardziej preferowanym (45% oceniających; w wieku poniżej 20 i powyżej

30 lat) pod względem barwy sokiem pomarańczowym był sok charakteryzujący się największym udziałem barwy czerwonej ($a^* = 24,60$). Stwierdzono istotną korelację pomiędzy tonem i jasnością soków ocenionymi wizualnie przez oceniających a zmierzonymi metodą instrumentalną.

Zhang, Luo i Wang [2014] badali zależność pomiędzy stopniem akceptacji barwy a parametrami barwy przechowywanych (7 h w 34°C) niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych (sok z pomidorów, ogórków, ananasa, pomarańczowy, melona i marchwi). W przypadku soku pomarańczowego wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy oceną pożądalności barwy a parametrem b^* ($r^2 = 0,752$). Nie wykazano takiej zależności dla parametru L^* i a^* . W przechowywanych próbkach soku wraz ze wzrostem czasu przechowywania obserwowano obniżenie stopnia akceptacji barwy przez oceniających oraz obniżenie wartości parametru b^* .

Wei i in [2012] badali zależność pomiędzy parametrami barwy zmierzonymi w systemie CIE $L^*a^*b^*$ a cechami sensorycznymi (smakowitość słodka, kwaśna, gorzka, świeżość, ogólna smakowitość) soku pomarańczowego. Na podstawie przeprowadzonej przez zespół oceny akceptacji barwy 174 próbek soków, w powiązaniu z wynikami barwy zmierzonej przy użyciu kolorymetru, określono parametry L^* , a^* , b^* idealnego soku. Stwierdzono, że barwa soku będzie akceptowana, jeżeli różnica barwy w odniesieniu do soku idealnego jest mniejsza niż 12,50 (ΔE^*_{ab}). Autorzy zaobserwowali także odwrotną zależność pomiędzy stopniem akceptacji barwy a parametrem ΔE^*_{ab} . Zbudowano również nowy model określający zależność pomiędzy akceptowanymi parametrami barwy a oczekiwanymi cechami sensorycznymi i na tej podstawie zmodyfikowano wzór na różnicę barwy. Według badaczy zaproponowana przez nich metodologia może mieć zastosowanie do optymalizacji postrzeganych wzrokowo oczekiwanych cech sensorycznych także i innych produktów.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie wyników badań własnych nad wpływem wybranych ekstraktów roślinnych na aktywność handlowej tyrozynazy z grzyba (*Agaricus bisporus*) wykazano, że ekstrakty z zielonej herbaty (EH1-EH5), pestek winogron (EPW) oraz rokitnika (ER) odznaczały się aktywnością inhibicyjną względem enzymu. Skuteczność hamowania tyrozynazy zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia tych ekstraktów w mieszaninie reakcyjnej. Najniższą wartość IC_{50} uzyskano w próbkach z dodatkiem ekstraktów z herbaty zielonej EH1 (0,46 g/l), EH2 (0,47 g/l) i EH5 (0,52 g/l). ER w porównaniu z ekstraktami EH1-EH5 i EPW odznaczał się najsłabszymi właściwościami inhibicyjnymi wobec tyrozynazy ($IC_{50} = 1,44$ mg/l). Należy zaznaczyć, że w dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących wpływu ekstraktu z rokitnika na aktywność PPO.

Istnieją badania wskazujące, że niektóre związki polifenolowe wykazują zdolność hamowania aktywności tyrozynazy z grzyba. W związku z tym, przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej, oznaczono skład polifenoli w badanych ekstraktach i wskazano związki w nich dominujące. Główną frakcją polifenoli w badanych ekstraktach roślinnych stanowiły flawan-3-ole, będące potencjalnymi inhibitorami tyrozynazy. Główną frakcją polifenoli w ekstraktach EH1-EH5 stanowiły flawan-3-ole: EGC, EGCG oraz ECG. Flawan-3-ole były także dominującymi związkami w EPW, spośród których w największych ilościach występowały: C, EGC oraz EC. ER zawierał najmniej związków polifenolowych oznaczonych metodą HPLC, a także metodą spektrofotometryczną. W ekstrakcie tym zidentyfikowano flawan-3-ole (GC, C, EC i EGCG) oraz flawonole (rutynę, hiperozyd, izokwercytrynę, kwercytrynę). Przeprowadzona analiza korelacji wykazała, że zawartość związków polifenolowych ogółem oznaczona metodą Folina-Ciocalteu lub z wykorzystaniem HPLC w istotny sposób wpłynęła na kształtowanie wartości parametru IC_{50} opisującego zdolność hamowania tyrozynazy przez badane ekstrakty w układach modelowych.

W dostępnej literaturze niewiele jest danych dotyczących wpływu soków z owoców cytrusowych na aktywność tyrozynazy. W niniejszej pracy wykazano, że soki z owoców cytrusowych (SP, SM i SG) hamowały aktywność enzymu. Skuteczność

hamowania tyrozynazy przez soki z owoców cytrusowych zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia soków w mieszaninie reakcyjnej. Zaobserwowano, że efektywność hamowania enzymu przez SP i SM była porównywalna (średnia wartość $IC_{50} = 13,45$ g/100 ml). Sok grejpfrutowy (SG) wykazywał w porównaniu z tymi sokami nieznacznie słabsze właściwości inhibicyjne ($IC_{50} = 17,69$ g/100 ml). Flawanony stanowiły główną frakcję polifenoli w badanych sokach. W SP i SM głównym flawanolem była hesperydyna, a w SG naryngina. Soki te charakteryzowały się także wysoką zawartością witaminy C. Według danych literaturowych flawanony, obok witaminy C, wykazują właściwości inhibicyjne wobec tyrozynazy. W badaniach modelowych przeprowadzonych w niniejszej pracy potwierdzono, że kwas askorbinowy wywiera hamujący wpływ na tyrozynazę ($IC_{50} = 0,22$ g/l).

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy pozwoliły na pozytywne zweryfikowanie hipotezy badawczej 1, mówiącej, że związki o właściwościach przeciwutleniających zawarte w ekstraktach roślinnych oraz sokach z owoców cytrusowych hamują aktywność tyrozynazy katalizującej procesy brunatnienia.

Na podstawie uzyskanych wyników należy także przyjąć założenie hipotezy 2, mówiące, że ekstrakty roślinne oraz soki z owoców cytrusowych, bogate w przeciwutleniacze, wpływają na stabilizację barwy mętnego, niepasteryzowanego soku jabłkowego. Wykazano bowiem, że zarówno ekstrakty EH1-EH5, EPW, ER, jak i soki SP, SM i SG hamowały aktywność PPO w nieprzechowywanym i przechowywanym soku jabłkowym.

Zaplanowano doświadczenie, w którym do soku jabłkowego z odmiany 'Golden Delicious' dodano analizowane powyżej ekstrakty (EH1-EH5, EPW w ilości 1, 2 i 3 g/l, ER w ilości 2, 3 i 5 g/l) i badano ich skuteczność w hamowaniu brązowienia soku. Analizie poddano także soki mieszane jabłkowo-cytrusowe z 20- i 40-procentowym udziałem soków cytrusowych (SP, SM i SG). Badaniami objęto soki nieprzechowywane i po przechowywaniu przez 24 i 48 h w temperaturze 4°C. Spośród badanych ekstraktów roślinnych ekstrakty z zielonej herbaty oraz EPW były najbardziej efektywnymi inhibitorami PPO w soku. W przypadku próbek soku jabłkowego z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5) zaobserwowano wzrost hamowania aktywności PPO w soku wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów. Dodatek do soku jabłkowego ekstraktów z herbaty EH1, EH2, EH3 i EH5 w ilości 3 g/l wpłynął na zahamowanie aktywności PPO w soku w około 85%. Natomiast w przypadku EPW efekt hamujący nie zawsze zależał od stężenia ekstraktu. W soku z dodatkiem 2 i 3 g/l EPW stwierdzono inhibicję PPO na podobnym poziomie, która wynosiła średnio około 72%. ER był najsłabszym inhibitorem PPO w soku. Dodany do soku w ilości 2 g/l nie hamował aktywności PPO. W soku z dodatkiem 5 g ER/l zmierzono inhibicję enzymu na poziomie 32%.

Stwierdzono istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stopniem inhibicji PPO a zawartością związków fenolowych ogółem i flawonoidów ogółem w badanych sokach jabłkowych z dodatkiem badanych ekstraktów roślinnych. Stopień hamowania

aktywności PPO w sokach był zatem istotnie związany z zawartością związków polifenolowych.

Po 48 h przechowywania spadek aktywności PPO w sokach jabłkowych bez dodatku ekstraktu wynosił około 8%. Dodatek ekstraktów do soków jabłkowych spowodował większe obniżenie aktywności PPO w przechowywanych sokach, niż stwierdzono w próbkach soków bez dodatku ekstraktów (z wyjątkiem soku z 2 g ER/l). Po 48 h przechowywania największe obniżenie aktywności enzymu zmierzono w próbkach soku z dodatkiem 3 g EH5/l (inhibicja 96% w stosunku do nieprzechowywanego soku jabłkowego) oraz soku z 2 i 3 g EPW/l (inhibicja około 80%). Natomiast w próbkach soku z 5 g ER/l, w porównaniu z tymi próbkami, stopień hamowania PPO był odpowiednio 3- i 2,5-krotnie niższy.

Dodatek badanych ekstraktów do soku jabłkowego wpłynął w istotny sposób na parametry barwy soku. Wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów w badanych sokach jabłkowych zwiększył się udział barwy czerwonej (a^*) oraz żółtej (b^*). Jednak w przypadku soków z dodatkiem EH1-EH5 barwa żółta była barwą dominującą, natomiast soki z EPW, w porównaniu z EH1-EH5 i ER, charakteryzowały się większym udziałem barwy czerwonej. W trakcie przechowywania we wszystkich próbkach zaobserwowano zwiększenie intensywności barwy czerwonej i żółtej. Wyjątek stanowił sok z dodatkiem 1 g EPW/l, w którym po 48 h przechowywania odnotowano istotne statystycznie obniżenie wartości parametru a^* . W porównaniu z sokiem jabłkowym w sokach z ekstraktami zaobserwowano istotnie mniejszy wzrost udziału barwy czerwonej i brak różnic w jasności. Po 48 h przechowywania największą całkowitą różnicę barwy zmierzono w próbkach soku jabłkowego bez dodatków ekstraktu oraz z 2 g ER/l. Ponadto uzyskana wartość ΔE^*_{ab} tego soku była wyższa niż soku jabłkowego SJ3 bez dodatku ekstraktu, co pozwala na stwierdzenie, że ekstrakt z rokitnika w ilości 2 g/l nie hamował brązowienia soku. Po 48 h w sokach z dodatkiem 3 g EH5/l, 2 i 3 g EPW/l oraz 5 g ER/l wartość parametru ΔE^*_{ab} była na podobnym poziomie. Stopień hamowania brązowienia w tych sokach wynosił od 86% (ER) do 88% (EH5) w odniesieniu do soku jabłkowego. Podobne wyniki uzyskano na podstawie analizy parametru indeksu brązowienia (BI). W próbkach tych soków nie stwierdzono zmian parametru A_{420} podczas przechowywania. Ponadto soki te po 48 h przechowywania charakteryzowały się również najmniejszym stopniem zażółcenia.

Stwierdzono istnienie istotnej zależności pomiędzy stopniem brązowienia (ΔA_{420}) przechowywanych soków z dodatkiem ekstraktów roślinnych a aktywnością PPO, zmianami parametru b^* i L^* .

W celu wyodrębnienia grup soków charakteryzujących się podobnymi zmianami parametrów barwy ($L^*a^*b^*$), stopnia brązowienia (ΔE^*_{ab} , ΔBI , ΔA_{420}) i zażółcenia (ΔYI) oraz aktywności PPO w sokach przeprowadzono analizę skupień. Pierwsze skupienie tworzyły soki jabłkowe bez dodatku ekstraktów roślinnych przechowywane przez 24 i 48 h oraz soki z dodatkiem 2 g ER/l przechowywane przez 24 i 48 h.

Soki te w największym stopniu ulegały brązowieniu podczas przechowywania. Skupienie II zawierało próbki soków jabłkowych SJ1 z dodatkiem EH5 w ilości 1 g/l (przechowywane przez 24 h), 2 g/l (24 h) oraz 3 g/l (24 i 48 h). W klastrze tym znalazły się także soki SJ3 z 1, 2 i 3 g EPW/l (24 i 48 h) oraz z ER w ilości 5 g/l (24 h). Obserwowane zmiany brązowienia w tych sokach były najmniejsze, co było związane z właściwościami inhibicyjnymi zastosowanych ekstraktów roślinnych. Skupienie III tworzyły pozostałe próbki soków, czyli SJ3 z dodatkiem ER w ilości 3 g/l (24 i 48 h) i 5 g/l (48 h) oraz SJ1 z 1 i 2 g EH5/l przechowywane przez 48 h. Nie stwierdzono istotnych różnic w średnich wysokościach analizowanych parametrów próbek soków zaklasyfikowanych do skupienia II i III ($p > 0,05$). Jednak na podstawie prześlędzonych zmian parametru ΔE^*_{ab} , BI oraz A_{420} stwierdzono, że najlepszymi właściwościami inhibicyjnymi brązowienie soków w trakcie przechowywania charakteryzował się ekstrakt EH5 w ilości 3 g/l, EPW – 2 g/l i ER w ilości 5 g/l soku.

W dostępnej literaturze przedmiotu brak jest badań nad wpływem SP, SM i SG na aktywność PPO w soku jabłkowym. Stopień hamowania aktywności PPO w próbkach soku z dodatkiem SP w ilości 40% był porównywalny do stopnia inhibicji tego enzymu w próbkach soku z 20-procentowym udziałem SM i SG (inhibicja około 34%). Zwiększenie udziału SM i SG w soku mieszanym, z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego, nie wpłynęło w istotny sposób na stopień hamowania PPO.

Zaobserwowano także, że dodatek SM i SG do soku jabłkowego nie wpłynął w istotny sposób na ogólną zawartość związków fenolowych w porównaniu z sokiem jabłkowym bez dodatków ($p > 0,05$). Przeprowadzona analiza korelacji nie wykazała istotnych zależności pomiędzy stopniem hamowania PPO a zawartością związków fenolowych w sokach mieszanych. Nie stwierdzono także istotnych zależności pomiędzy stopniem hamowania PPO a zawartością witaminy C w sokach. Najprawdopodobniej obecność naturalnej witaminy C w sokach cytrusowych nie była wystarczająca do hamowania aktywności PPO w soku jabłkowym. Po 48 h przechowywania spadek aktywności PPO w SJ2 kształtował się na podobnym poziomie jak w sokach jabłkowych wykorzystywanych w doświadczeniu z ekstraktami (8%). Dodatek badanych soków cytrusowych do soków jabłkowych spowodował większe obniżenie aktywności PPO w przechowywanych sokach niż w soku jabłkowym. Zaobserwowano jednak, że stopień hamowania aktywności enzymu w przechowywanych próbkach soków nie zależał od udziału badanych soków cytrusowych w soku mieszanym. Po 48 h przechowywania stopień inhibicji PPO w sokach z dodatkiem 20 i 40% soku cytrusowego był podobny i wynosił 36% (SP), 42% (SM) i 38% (SG) w stosunku do nieprzechowywanego soku jabłkowego bez dodatku soku cytrusowego.

Dodatek soków cytrusowych do soku jabłkowego istotnie zmienił barwę soków jabłkowych. Wraz ze zwiększeniem udziału soków z owoców cytrusowych w soku

mieszanym obserwowano obniżenie jasności soków (parametr L^*) oraz zintensyfikowanie udziału barwy czerwonej ($+a^*$) i żółtej ($+b^*$). Soki z dodatkiem SP i SM w porównaniu z sokiem z SG charakteryzowały się większym udziałem barwy żółtej (b^*). Natomiast udział barwy czerwonej był większy w próbkach soku SJ2 z SG niż w SJ2 z SP i SM. Stwierdzono, że zwiększenie udziału soków cytrusowych w soku mieszanym z 20 do 40% wpłynęło na mniejszy wzrost parametru a^* i b^* w przechowywanych sokach (z wyjątkiem soku z SP). Zmiany jasności przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem soków z owoców cytrusowych były nieznaczne.

Zmiany całkowitej różnicy barwy (ΔE_{ab}^*) przechowywanych soków z SP, SM i SG były znacznie mniejsze w porównaniu z sokiem jabłkowym, co pozwala na stwierdzenie, że badane soki z owoców cytrusowych hamowały brązowienie soku jabłkowego. Wykazano, że stopień hamowania ciemnienia soku jabłkowego zależał od udziału soku cytrusowego w soku mieszanym. W sokach z dodatkiem soków cytrusowych w ilości 40% stopień inhibicji brązowienia wynosił około 79% (SP i SM) i 69% (SG) w porównaniu do soku jabłkowego. W sokach tych uzyskano także najmniejszy wzrost wartości indeksu brązowienia (BI). Wyznaczony na podstawie tego parametru stopień hamowania brązowienia soków wynosił 74% (SM i SG) i 57% (SP), w porównaniu do soku jabłkowego. Nie zmierzono także istotnych zmian wartości absorpcji (A_{420}) w sokach przechowywanych zawierających SP, SM i SG w ilości 40%, co świadczyło o inhibicji brązowienia przez te soki. Po 48 h przechowywania najmniejszym stopniem zażółcenia charakteryzował się sok z 40-procentowym udziałem SP.

Przeprowadzona analiza korelacji nie wykazała istotnej zależności pomiędzy stopniem brązowienia (ΔA_{420}) przechowywanych soków a aktywnością PPO, zmianami parametrów barwy L^* , a^* i b^* ($p > 0,05$).

Na podstawie analizy skupień wyodrębniono trzy grupy soków charakteryzujących się podobnymi zmianami badanych parametrów podczas przechowywania. Pierwsze skupienie tworzyły soki jabłkowe bez dodatku soków z owoców cytrusowych przechowywane przez 24 i 48 h. Soki te, podobnie jak w doświadczeniu z ekstraktami roślinnymi, w największym stopniu ulegały brązowieniu. Skupienie II zawierało próbki soków mieszanych z 20- i 40-procentowym udziałem SP (przechowywane przez 24 h) oraz 40-procentowym udziałem SM i SG (24 h). Obserwowane zmiany brązowienia w tych sokach były najmniejsze, co było związane z właściwościami inhibicyjnymi zastosowanych soków z owoców cytrusowych. Skupienie III tworzyły próbki soków SP, SM i SG z 20- i 40-procentowym udziałem soków cytrusowych (48 h) oraz soki z 20-procentowym udziałem SM i SG (24 h). Mimo że przechowywane przez 48 h próbki soków z 20- i 40-procentowym udziałem soków cytrusowych, zostały zaklasyfikowane do jednego klastru, analizując poszczególne wartości wskaźników brązowienia tych próbek, stwierdzono, że optymalnym udziałem soków cytrusowych (SP, SM i SG) w soku mieszanym wpływającym na hamowanie brązowienia soków jest 40%.

Przeprowadzono także ocenę pożądalności barwy badanych soków jabłkowych z dodatkiem i bez dodatku ekstraktów i soków z owoców cytrusowych, z wykorzystaniem 9-stopniowej skali hedonicznej. Zmianę barwy soku jabłkowego poprzez zastosowanie badanych dodatków oceniający określili jako korzystną, jednak nie w każdym przypadku stopień pożądalności różnił się istotnie statystycznie w porównaniu z sokiem jabłkowym bez dodatków. Spośród badanych próbek soków soki z dodatkiem 3 g EH5/l oraz SJ3 z 1 g EPW/l odznaczały się wyższą pożądalnością barwy w porównaniu z sokiem jabłkowym bez dodatku ekstraktów. Po 48 h przechowywania soki jabłkowe zostały zdyskwalifikowane przez oceniających ze względu na nieatrakcyjną brązową barwę. W trakcie przechowywania próbek z dodatkiem ekstraktów EH5 (1, 2 i 3 g/l), EPW (1, 2 i 3 g/l) i ER (3 i 5 g/l) nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w pożądalności barwy ($p > 0,05$). Wykazano, że stopień pożądalności barwy przechowywanych soków z dodatkiem EPW i EH5 nie zależał od ilości danego ekstraktu w soku ($p > 0,05$).

W przypadku nieprzechowywanych soków jabłkowo-cytrusowych próbki soków z dodatkiem SM i SG w ilości 40% odznaczały się wyższym stopniem pożądalności barwy w porównaniu z sokiem jabłkowym. Po 48 h przechowywania barwa soku jabłkowego nie była akceptowana przez oceniających, podobnie jak barwa soków jabłkowych wykorzystywanych w doświadczeniu z ekstraktami roślinnymi. W przechowywanych próbkach soków mieszanych z 20- i 40-procentowym udziałem SM oraz sokach z dodatkiem SP i SG w ilości 40% nie zaobserwowano istotnych zmian pożądalności barwy ($p > 0,05$).

Wykazano korelację pomiędzy stopniem pożądalności barwy przechowywanych soków z dodatkiem badanych ekstraktów roślinnych a parametrem Δa^* oraz stopniem brązowienia (ΔE_{ab}^* , ΔBI) soków. W przypadku przechowywanych soków mieszanych stwierdzono zależność pomiędzy pożądalnością a wskaźnikiem brązowienia (ΔE_{ab}^*) oraz stopniem zażółcenia (ΔYI) próbek soków.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Badane ekstrakty roślinne i soki z owoców cytrusowych wywierały zróżnicowany wpływ na aktywność tyrozynazy w badaniach modelowych. Stopień hamowania aktywności enzymu był związany z zawartością związków o właściwościach przeciwutleniających, takich jak związki polifenolowe i witamina C. Spośród badanych ekstraktów roślinnych ekstrakty z zielonej herbaty (EH1-EH5) oraz pestek winogron (EPW), w których główną frakcją polifenoli stanowiły flawan-3-ole, odznaczały się najlepszymi właściwościami inhibicyjnymi wobec tyrozynazy. W przypadku soków z owoców cytrusowych (SP, SM i SG) wykazano, że zdolność hamowania aktywności enzymu przez te soki była związana z obecnością w sokach flawanonów i witaminy C.
2. Dodatek ekstraktów roślinnych wpłynął na stabilizację barwy przechowywanego przez 24 i 48 h w temperaturze 4°C mętnego soku jabłkowego. Stopień hamowania brązowienia soku zależał od rodzaju ekstraktu oraz jego stężenia

- w soku. Wykazano, że optymalnym stężeniem ekstraktu z zielonej herbaty, pestek winogron i rokitnika wpływającym na hamowanie brązowienia soku jabłkowego, a tym samym na stabilizację barwy przechowywanego soku, jest odpowiednio 3, 2 i 5 g ekstraktu/l soku.
3. Soki mieszane (jabłkowo-cytrusowe) w porównaniu z sokiem jabłkowym odznaczały się większą stabilnością barwy w trakcie przechowywania. Stopień hamowania brązowienia przechowywanych mieszanych soków zależał od typu i udziału soku cytrusowego w soku mieszanym. Zwiększenie udziału soku cytrusowego (SP, SM i SG) w soku mieszanym (z 20 do 40%), z jednoczesnym zmniejszeniem udziału soku jabłkowego, wpłynęło na większe hamowanie brązowienia próbek soków.
 4. Wykazano zależność pomiędzy stopniem brązowienia (ΔA_{420}) a zmianami parametru L^* oraz b^* soków jabłkowych z dodatkiem badanych ekstraktów roślinnych. Parametr ΔA_{420} był także skorelowany z innymi parametrami określającymi stopień brązowienia (ΔE_{ab}^* , ΔBI) oraz stopień żółknięcia ΔYI próbek soków. W przypadku soków mieszanych nie stwierdzono zależności pomiędzy stopniem brązowienia a zmianami parametrów barwy. Wykazano natomiast korelację pomiędzy wartościami parametru ΔA_{420} a parametrem ΔE_{ab}^* oraz ΔYI próbek soków.
 5. Wyniki badań wskazują, że ΔE_{ab}^* , BI oraz pomiar absorbancji przy długości fali 420 nm są dobrymi parametrami do śledzenia zmiany barwy przechowywanego mętnego soku jabłkowego. Wraz z parametrem YI powinny być stosowane w kontroli jakości tego produktu.
 6. Nieprzechowywane soki z dodatkiem badanych ekstraktów roślinnych oraz soki mieszane charakteryzowały się wysokim stopniem akceptowalności barwy. Wykazano istotny wpływ rodzaju ekstraktu oraz udziału soku cytrusowego na stopień pożądalności barwy badanych próbek soków. W przechowywanych sokach z dodatkiem ekstraktów EH5 i EPW oraz sokach mieszanych SM i SP zmiany pożądalności barwy soków były nieistotne statystycznie. Wykazano istnienie współzależności pomiędzy stopniem akceptacji barwy przez oceniających a stopniem brązowienia badanych próbek soków, zmierzonym przy wykorzystaniu metod instrumentalnych.
 7. Uzyskane wyniki mogą znaleźć praktyczne zastosowanie przy opracowywaniu nowych produktów na bazie mętnego niepasteryzowanego soku jabłkowego o dobrej stabilności barwy w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C przez 48 h, wynikającej z zahamowania enzymatycznego brunatnienia poprzez dodatek ekstraktów roślinnych lub mieszanie z sokami cytrusowymi. Producenci, decydując się na rodzaj oraz ilość dodatku ekstraktów roślinnych oraz soków z owoców cytrusowych, powinni wziąć pod uwagę zawartość w nich związków o właściwościach przeciwutleniających, w szczególności związków fenolowych.

ANEKS

Zmiany parametrów L^* , a^* , b^* mętnych soków jabłkowych w czasie 48 h przechowywania w temperaturze 4°C

Czas przechowywania [h]	Dodatek kwasu askorbinowego [g/L]											
	bez dodatku			0,05			0,18			0,32		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
‘Szampion’												
0	98,58 ^a	-0,16 ^a	1,69 ^a	98,52 ^a	-0,18 ^a	1,66 ^a	98,94 ^a	-0,19 ^a	1,47 ^a	98,98 ^a	-0,24 ^a	1,45 ^a
24	98,08 ^a	-0,13 ^a	1,79 ^a	98,11 ^a	-0,10	1,68 ^a	98,16 ^a	-0,16	1,47 ^a	98,54 ^a	-0,20 ^a	1,47 ^a
48	97,69	-0,10	1,89 ^a	97,64 ^a	-0,09	2,01	98,01 ^a	-0,15	1,50 ^a	98,46 ^a	-0,14	1,54
‘Szampion’/‘Idared’												
0	95,88 ^a	-0,35 ^a	2,71 ^a	95,78 ^a	-0,50 ^a	1,97 ^a	96,06 ^a	-0,88 ^a	2,21 ^a	98,04 ^a	-1,19 ^a	2,56 ^a
24	95,21	-0,35 ^a	9,62	95,10 ^a	-0,32	8,76	96,58 ^a	-0,79	3,29	97,82 ^a	-0,81	2,29
48	94,62	-0,12	13,30	94,52	-0,03	11,68	95,41	-0,52	5,83	97,72	-0,57	4,71
‘Ligol’												
0	94,38 ^a	-1,15 ^a	11,57 ^a	94,18 ^a	-1,11 ^a	12,73 ^a	95,21 ^a	-0,81 ^a	8,47 ^a	96,06 ^a	-0,51 ^a	7,63 ^a
24	88,50	-0,68	17,48	88,64	-0,70	18,50	90,36	-0,53	11,98	94,50	-0,21	12,98
48	85,12	0,98	18,51	84,56	0,91	18,76	84,99	0,76	12,98	92,05	0,55	12,94
‘Golden Delicious’												
0	98,55 ^a	-1,79 ^a	2,40 ^a	98,62 ^a	-1,81 ^a	2,36 ^a	98,64 ^a	-2,30 ^a	1,91 ^a	98,81 ^a	-2,42 ^a	1,82 ^a
24	97,11 ^a	-0,58	9,38	97,37 ^a	-0,56	9,12	98,47 ^a	-1,23	5,21	98,79 ^a	-1,44	1,94 ^a
48	96,90	-0,13	12,24	97,01	-0,16	12,04	97,30	-0,29	10,17	97,76 ^a	-0,61	2,97

^{a-c} wartości średnie oznaczone tymi samymi literami, w obrębie danego parametru barwy, nie różnią się statystycznie istotnie w odniesieniu do soku jabłkowego nieprzechowywanego (test Dunnetta, $p < 0,05$).

BIBLIOGRAFIA

- Aadil, R.M., Zeng, X.-A., Han, Z., Sun, D.-W., 2013, *Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice*, Food Chemistry, vol. 141, s. 3201–3206.
- Abd, A.J., Niamah, A.K., 2012, *Effect of chitosan on apple juice quality*, International Journal of Agricultural and Food Science, vol. 2 (4), s. 153–157.
- Abirami, A., Nagarani, G., Siddhuraju, P., 2014, *In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from Citrus hystrix and C. maxima fruits*, Food Science and Human Wellness, vol. 3, s. 16–25.
- Adak, M., Gabar, M.A., 2011, *Green tea as a functional food for better health: a brief review*, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, vol. 2, s. 645–664.
- AIJN, 2013, *Kodeks Praktyki do oceny soków owocowych i warzywnych*, European Fruit Juice Association.
- AIJN, 2015, *Liquid Fruit Market Report*. European Fruit Juice Association.
- AIJN, 2016, *Liquid Fruit Market Report*. European Fruit Juice Association.
- Aka, J.P., Courtois, F., Nicolas, J., Billaud, C., 2013, *Modelling the interactions between free phenols, L-ascorbic acid, apple polyphenoloxidase and oxygen during a thermal treatment*, Food Chemistry, vol. 138, s. 1289–1297.
- Altunkaya, A., 2014, *Effect of grape leaf extract on phenolic profile and browning of fresh-cut lettuce (Lactuca Sativa)*, Journal of Food Processing and Preservation, vol. 38, 527–534.
- Alvarez-Parilla, E., de la Rosa, L.A., Rodrigo-García, J., Escobedo-González, R., Mercado-Mercado, G., Moyers-Montoya, E., Vázquez-Flores, A., González-Aguilar, G.A., 2007, *Dual effect of β -cyclodextrin (β -CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ)*, Food Chemistry, vol. 101, s. 1346–1356.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S.Y., Nicolas, J., 1992, *Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity*, Journal of Food Science, vol. 57, s. 958–962.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S.Y., Oleszek, W., 1995, *Influence of cultivar, maturity stage, and storage condition on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 43, s. 1132–1137.
- Andersen, S.O., 2010, *Insect cuticular sclerotization: A review*, Insect Biochemistry and Molecular Biology, vol. 40, s. 166–178.
- Aniszewski, T., Lieberei, R., Gulewicz, K., 2008, *Research on catecholases, laccases and cresolases in plants. Recent progress and future needs*, Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 50, s. 7–18.

- Arena E., Fallico B., Maccarone E., 2001, *Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage*, *Food Chemistry*, vol. 74, s. 423–427.
- Arimboor, R., Sarin Kumar, K., Arumughan, C., 2008, *Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 4, s. 31–38.
- ARiMR, 2016, *Pomagamy, Zainwestuj w sukces. Co dla kogo w PROW 2014–2020*, Magazyn informacyjny Agencji Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa, s. 2–7.
- Arora, R., Mundra, S., Yadav, A., Srivastava, R.B., Stobdan, T., 2012, *Antimicrobial activity of seed, pomace and leaf extracts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against foodborne and food spoilage pathogens*, *African Journal of Biotechnology*, vol. 11 (45), s. 10424–10430.
- ARR Agencja Rynku Rolnego, 2014, *Rynek owoców w Polsce*.
- ARR Agencja Rynku Rolnego, 2015, *Rynek owoców i warzyw*, Biuletyn informacyjny, nr 3.
- Ates, S., Pekyardimci, S., Cokmus, C., 2001, *Partial characterization of a peptide from honey that inhibits mushroom polyphenol oxidase*, *Journal of Food Biochemistry*, vol. 25, s. 127–137.
- Award, M.A., de Jager, A., 2000, *Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage*, *Postharvest Biology and Technology*, vol. 20, s. 15–24.
- Babicz-Zielińska, E., Zabrocki, R., 2007, *Postawy konsumentów wobec prozdrowotnej wartości żywności*, *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, nr 6, 81–89.
- Badria, F.A., el Gayyar, M.A., 2001, *A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation*, *Bolletino Chimico Farmaceutico*, vol. 140, s. 267–271.
- Bal, L.M., Meda, V., Naik, S.N., Satya, S., 2011, *Sea buckthorn berries: a potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals*, *Food Research International*, vol. 44, s. 1718–1727.
- Balon, U., Dziadkowiec, J.M., Kafel, P., Nowicki, P., Prusak, A., Sikora, T., 2017, *Zachowania konsumentów na rynku soków i ich wybrane uwarunkowania*, *Handel Wewnętrzny*, nr 2, s. 28–44.
- Barrett, D., Beaulieu, J.C., Shewfelt, R., 2010, *Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 50, s. 369–389.
- Baryłko-Pikielna, N., Matuszewska, I., 2000, *Sensory analysis in food research, quality assurance and product development*, *Acta Alimentaria*, 29, 3, 255–271.
- Baryłko-Pikielna, N., Matuszewska, I., 2009, *Sensoryczne badania żywności. Podstawy – metody – zastosowania*, Wydawnictwo Naukowe PTTŻ, Kraków.
- Baydar, N.G., Özkan, G., Sagdiç, O., 2004, *Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera*, L.) extracts*, *Food Control*, vol. 15, s. 335–339.
- Begić-Akagić, A., Spaho, N., Oručević, S., Drkenda, P., Kurtović, M., Gaši, F., Kopjar, M., Piližota, V., 2011, *Influence of cultivar, storage time, and processing on the phenol content of cloudy apple juice*, *Croatian Journal of Food Science and Technology*, vol. 3, s. 1–8.
- Beltrán-González, F., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M., Carbonell-Barrachina, Á.A., 2008, *Effect of packaging materials on color, vitamin C and sensory quality of refrigerated mandarin juice*, *Journal of Food Quality*, vol. 31, s. 596–611.

- Biegańska-Marecik, R., Czapski, J., 2003, *Porównanie przydatności odmian jabłek do produkcji plastrów o małym stopniu przetworzenia*, Acta Scientiarum, Technologia Alimentaria vol. 2 (2), s. 115–127.
- Boyer, J., Liu, R.H., 2004, *Apple phytochemicals and their health benefits*, Nutrition Journal, vol. 3, s. 1–15.
- Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D., 2009, *Inactivation kinetics of apple polyphenols oxidase in different pressure-temperature domains*, Innovative Food Science and Emerging Technologies, vol. 10, s. 441–448.
- Buera, M.P. P., Lozano, R.D., Petriella, C., 1985, *Definition of color in the non-enzymatic browning process*, Die Farbe 32, s. 318–322.
- Bugała, A., 2015, *Owoce i przetwory*, Handel zagraniczny produktami rolno-spożywczymi, Stan i perspektywy, Analizy Rynkowe, nr 42, s. 38–41.
- Burdock, G.A., Soni, M.G., Carabin, I.G., 2001, *Evaluation of health aspects of kojic acid in food*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 33 (1), s. 80–101.
- Bórawski, P., Beldycka-Bórawska, A., 2016, *Polski handel zagraniczny artykułami rolno-spożywczymi i jego prognoza*, Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, t. 16, s. 48–59.
- Candrawinata, V.I., Golding, J.B., Roach, P.D., Stathopoulos, C.S., 2013, *From apple to juice – the fate of polyphenolic compounds*, Food Reviews International, vol. 29, s. 276–293.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.A., 2015, *Natural food additives: Quo vadis?*, Trends in Food Science and Technology, vol. 45, s. 284–295.
- Carbonaro, M., Mattera, M., 2001, *Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (Prunus persica L., cv. Regina bianca) and pear (Pyrus communis L., cv. Williams)*, Food Chemistry, vol. 72 (4), s. 419–424.
- Castañeda-Ovando A., de Lourdes Pacheco-Hernández Ma., Pérez-Hernández Ma. E., Rodríguez J.A., Galán-Vidal C.A., 2009, *Chemical studies of anthocyanins: a review*, Food Chemistry, 113, 856–871.
- Chaisakdanugull, C., Theerakulkait, C., Wrolstad, R.E., 2007, *Pineapple Juice and Its Fractions in Enzymatic Browning Inhibition of Banana [Musa (AAA Group) Gros Michel]*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 55, s. 4252–4257.
- Chang, T.M., 2012, *Tyrosinase and tyrosinase inhibitors*, Journal of Biocatalysis and Bio-transformation, vol. 1 (2), s. 1–2.
- Chang, T.S., 2009, *An update review of tyrosinase inhibitors*, International Journal of Molecular Sciences, vol. 10, s. 2440–2475.
- Chang, T.S., Ding, H.Y., Tai, S.S.K., Wu C.Y., 2007, *Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with Aspergillus oryzae BCRC 32288*, Food Chemistry, vol. 105, s. 1430–1438.
- Chen, C.H., Chan, H.C., Chu, Y.T., Ho, H.Y., Chen, P.Y., Lee, T.H., Lee, C.K., 2009, *Antioxidant activity of some plant extract towards xanthine oxidase, lipoxygenase and tyrosinase*, Molecules, vol. 14, s. 2947–2958.
- Chen, J., Sun, H., Wang, Y., Wang, S., Tao, X., Sun, A., 2014, *Stability of apple polyphenols as a function of temperature and pH*, International Journal of Food Properties, vol. 17, s. 1742–1749.

- Chen, J.S., Wei, C.I., Rolle, R.S., Otwell, W.S., Balaban, M.O., Marshall, M.R., 1991, *Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenoloxidases*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 39, s. 1396–1401.
- Chen, Q.X., Kubo, I., 2002, *Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 50, s. 4108–4112.
- Cheng, G.W., Crisoto, C.H., 1995, *Browning potential, phenolic composition and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue*, Journal of American Society for Horticultural Science, vol. 120, s. 835–838.
- Chiabrando, V., Giacalone, G., 2012, *Effect of antibrowning agents on color and related enzymes in fresh-cut apple during cold storage*, Journal of Food Processing and Preservation, vol. 36, s. 133–140.
- Choi, M.H., Kim, G.H., Lee, H.S., 2002, *Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (Citrus sinensis) juice during refrigerated storage*, Food Research International, vol. 35, s. 753–759.
- Chrościcki, T., 2016, *Uwarunkowania makroekonomiczne*, Rynek owoców i warzyw, Stan i perspektywy, Analizy rynkowe, 48, 7–8.
- Cortés, C., Esteve, M.J., Frígola, A., 2008, *Color of orange juice treated by High Intensity Pulsed Electric Fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice*, Food Control, vol. 19, 151–158.
- Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, A., Tóth-Markus, M., Lechner, N., 2006, *Study of pulsed electric field treated citrus juices*, Innovative Food Science and Emerging Technologies, vol. 7, s. 49–54.
- Czajkowska, K., Kowalska, H., Piotrowski, D., 2013, *Rola konsumenta w procesie projektowania nowych produktów spożywczych*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, nr 575, s. 23–32.
- Dalmadi, I., Rapeanu, G., van Loey, A., Smout, C., Hendrickx, M., 2006, *Characterisation and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (FRAGARIA ANANASSA) polyphenols oxidase: a kinetic study*, Journal of Food Biochemistry, vol. 30 (1), s. 56–76.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., Marín-Arroyo, M.R., 2011, *Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments*, European Food Research and Technology, vol. 232, s. 211–220.
- Demir, H., Çimen, C., Çelikezen, F.Ç., 2012, *Purification and characterization of polyphenol oxidase enzyme from Iğdır apricot (Prunus armeniaca L.)*, Bitlis Eren University Journal of Science and Technology, vol. 2, s. 22–26.
- Denoya, G.I., Ardanaz, M., Sancho, A.M., Benítez, C.E., González, C., Guidi, S., 2012, *Effect of the application of combined treatments of additives on the inhibition of enzymatic browning in minimally processed apples cv. Granny Smith*, RIA, vol. 39 (1), <http://ria.inta.gov.ar>.
- Devi, K.P., Rajavel, T., Nabavi, S.F., Setzer, W.N., Ahmadi, A., Mansouri, K., Nabavi, S.M., 2015, *Hesperidin: A promising anticancer agent from nature*, Industrial Crops and Products, vol. 76, s. 582–589.
- Dhuique-Mayer, Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F., Amiot, M.-J., 2005, *Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the mediterranean area*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53, s. 2140–2145.

- Dijkstra, L., Walker, J.R.L., 1991, *Enzymatic browning in apricots (Prunus armeniaca)*, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 54, s. 229–234.
- Du, Y., Dou, S., Wu, S., 2012, *Efficacy of phytic acid as an inhibitor of enzymatic and non-enzymatic browning in apple juice*, Food Chemistry, vol. 135, s. 580–582.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., Sroka, P., Tuszyński, T., 2010, *The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected Apple cultivars grown in Poland*, Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, vol. 18, s. 39–50.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Tuszyński, T., 2011, *Antioxidant activity of apples – an impact of maturity stage and fruit part*, Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria, vol. 10, s. 443–454.
- Eissa, H.A., Fadel, H.H.M., Ibrahim, G.E., Hassan, I.M., Elrashid, A.A., 2006, *Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products*, Food Research International, vol. 39, s. 855–863.
- Eissa, H.A., Mostafa, B.M., Bareh, G.F., Shouk, A.A., 2014, *Effect of extraction method of some natural extracts on enzymatic browning of apple juice*, International Journal of Food and Nutritional Science, vol. 3, s. 54–62.
- Enko, J., Gliszczynska-Świgło, A., 2015, *Influence of the interactions between tea (Camellia sinensis) extracts and ascorbic acid on their antioxidant activity. Analysis with interaction indexes and isobolograms*, Food Additives and Contamination, Part A, 32, s. 1234–1242.
- Erlund, I., 2004, *Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. dietary sources, bioactivities*, Bioavailability and Epidemiology. Nutrition Research, vol. 24, s. 851–874.
- Escarpa, A., González, M.C., 2001, *Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods*, Analytica Chimica Acta, vol. 427, s. 119–127.
- Espin, J.C., Varón, L.G., Gilabert, M.A., Fenoll, L.G., Gilabert, M.A., García-Ruíz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F., 2000, *Kintetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase*, European Journal of Biochemistry, vol. 267, s. 1270–1279.
- Esteve, M.J., Frígola, A., Rodrigo, C., Rodrigo, D., 2005, *Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and colour of Spanish refrigerated orange juices*, Food and Chemical Toxicology, vol. 43, s. 1413–1422.
- Fattahi, J., Hamidoghli, Y., Fotouhi, R., Ghasemnejad, M., Bakhshi, D., 2011, *Assessment of fruit quality and antioxidant activity of three citrus species during ripening*, South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment, vol.2 , s. 113–128.
- Fernández-Vázquez, R., Stinco, C.M., Meléndez-Martínez, A.J., Heredia, F.J., Vicario, I.M., 2011, *Visual and instrumental evaluation of orange juice color: A consumers' preference study*, Journal of Sensory Studies, vol. 26, s. 436–444.
- Fernández-Vázquez, R., Hewson, L., Vila, D.H., Mira, J.H., Vicario, I.M., Hort, J., 2014, *Colour influences sensory perception and liking of orange juice*, Flavour, vol. 3, s. 1–8, <https://doi.org/10.1186/2044-7248-3-1>.
- Fraignier, M.P., Marques, L., Fleuriet, A., Macheix, J.J., 1995, *Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of prunus*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 43 (9), s. 2375–2380.

- Francis, F.J., Clydesdale, F.M., 1975, *Food colorimetry: theory and applications*, Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company.
- Frącek G., 2007, *Trend produktów premium w sokołnictwie. Zainteresowanie sokami NFC dowodem dojrzałości rynku i polskiego konsumenta*, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 9, s. 2–4
- Friedman, M., Bautista, F.F., 1995, *Inhibition of polyphenoloxidase by thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 43, s. 69–76.
- Gacche, R.N., Warangkar, S.C., Ghole, V.S., 2004, *Glutathione and cinnamic acid: natural dietary components used in preventing the process of browning by inhibition of polyphenol oxidase in apple juice*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, vol. 19, s. 175–179.
- Gacche, R.N., Zore, G.B., Ghole, V.S., 2003, *Kinetics of inhibition of polyphenol oxidase mediated browning in apple juice by β -cyclodextrin and L-ascorbate-2-triphosphate*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, vol. 18, s. 1–5.
- Gao, H., Nishida, J., Saito, S., Kawabata, J., 2007, *Inhibitory effects of 5,6,7-trihydroxyflavones on tyrosinase*, Molecules, vol. 12, s. 86–97.
- Gardner, P.T., White, T.A.C., Phail, D.B., Duthie, G.G., 2000, *The relative contribution of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices*, Food Chemistry, vol. 68, s. 471–474.
- Gasik, A., Mitek, M., 2012, *Przydatność technologiczna owoców do produkcji soków*, w: *Przydatność owoców na poziomie gospodarstwa*, Copyright by Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Druk Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Oddział w Radomiu, s. 18–39.
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., Caristi, C., 2007, *Flavonoid composition of citrus juices*, Molecules, 12, 1641–1673.
- Gerhauser, C., 2008, *Cancer chemopreventive potential of apples, apples juice, and apple components*, Planta Medica, vol. 74, s. 1608–1624.
- Gliszczynska-Świągło, A., 2010, *Przeciwutleniające i pro utleniające właściwości wybranych składników żywności jako wyróżnik jej jakości*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań.
- Gliszczynska-Świągło, A., Wróblewska, J., Lemańska, K., Klimczak, I., Tyrakowska, B., 2004, *The contribution of polyphenols and vitamin C to the antioxidant activity of commercial orange juices and drinks*, Proceedings of the 14th IGWT Symposium, Focusing New Century: Commodity – Trade – Environment, Beijing, China, s. 121–126.
- Golan-Goldhirsch, A., Whitaker, J.R., Kahn, V., 1984, *Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning*, Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 177, s. 437–456.
- Gomes, M.H., Vieira, T., Fundo, J.F., Almeida, D.P.F., 2014, *Polyphenoloxidase activity and browning in fresh-cut 'Rocha' pear as affected by pH, phenolic substrates, and antibrowning additives*, Postharvest Biology and Technology, vol. 91, s. 32–38.
- González, E.M., de Ancos, B., Cano, M.P., 1999, *Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 47, s. 4068–4072.

- Gonzalez-Aguilar, G.A., Ruiz-Cruz, S., Cruz-Valenzuela, R., Rodriguez-Felix, A., Wang, C.Y., 2004, *Physiological and quality changes of fresh-cut pineapple treated with anti-browning agents*, LWT – Food Science and Technology, vol. 37, s. 369–376.
- Graham, H.N., 1992, *Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry*, Preventive Medicine, vol. 21, s. 334–350.
- Gramza, A., Korczak, J., Amarowicz, R., 2005, *The polyphenols – their antioxidant properties and biological activity – a review*, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, vol. 14, s. 219–235.
- Gramza-Michałowska, A., 2011, *Badania nad potencjałem przeciwutleniającym ekstraktów z liści herbaty Camellia sinensis i ich wykorzystaniem do kształtowania trwałości tłuszczów*, Rozprawy naukowe nr 435, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań.
- Grzybowski, R.A., 2013, *Kierunki rozwoju przemysłu rolno-spożywczego i biotechnologii żywności*, I Kongres Nauk Rolniczych Nauka – Praktyce, s. 23–36.
- Guerrero, R.F., Cantos-Villar, E., 2015, *Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review*, Trends in Food Science & Technology, vol. 42, s. 27.
- Guo, J., Yue, T., Yuan, Y., Wang, Y., 2013, *Chemometric classification of apple juices according to variety and geographical origin based on polyphenolic profiles*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 61, s. 6949–6963.
- Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., Drilleau, J., 2003, *Variability of the polyphenolic composition of old cider apple (Malus domestica) fruits and juices*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 51, s. 6240–6241.
- Harel, E., Mayer, A.M., Lerner, H.R., 1970, *Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches*, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 21, s. 542–544.
- Harel, E., Mayer, A.M., Shain, Y., 1965, *Purification and multiplicity of catechol oxidase from apple chloroplasts*, Phytochemistry, vol. 4, s. 783–790.
- Heck, C.I., de Mejia, E.G., 2007, *Yerba mate tea (Ilex paraguariensis): a comprehensive review on chemistry, health implication, and technological considerations*, Journal of Food Science, vol. 72, s. 138–151.
- Henning, S.M., Fajardo-Lira, C., Lee, H.W., Youssefian, A.A., Go, V.L.W., Heber, D., 2003, *Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity*, Nutrition and Cancer, vol. 45, s. 226–235.
- Hirschler, R., 2012, *Whiteness, yellowness and browning in food colorimetry. A critical review*, w: Caivano, J.L., del Pilar Buera, M. (Eds.), *Color in food: technological and psychophysical aspects*, CRC Press, London, s. 93–103.
- Hsu, A.F., Shieh, J.J., Bills, D.D., White, K., 1988, *Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives*, Journal of Food Science, vol. 53, s. 765–767, 771.
- IERiGŻ-PIB, Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – Państwowy Instytut Badawczy, 2015, Rynek owoców i warzyw. Stan i perspektywy, nr 46–47.
- IERiGŻ-PIB, Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – Państwowy Instytut Badawczy, 2016, Rynek owoców i warzyw. Stan i perspektywy, nr 48.
- Ionitã, E., 2013, *Plant polyphenols oxidases: isolation and characterization*, Innovative Romanian Food Biotechnology, vol. 13, s. 1–10.

- Itoh, K., Hirata, N., Masuda, M., Naruto, S., Murata, K., Wakabayashi, K., Matsuda, H., 2009, *Inhibitory effects of Citrus hassaku extract and its flavanone glycosides on melanogenesis*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, vol. 32, s. 410–415.
- Íyidoğan, N.F., Bayindirli, A., 2004, *Effect of cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice*, Journal of Food Engineering, vol. 62, s. 299–304.
- Jabłońska-Ryś, E., Gustaw, W., Latoch, A., 2014, *Ocena przydatności technologicznej wybranych jabłek pod względem potencjału brązowienia*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, vol. 1, s. 114–123.
- Jakobek, L., Barron, A.R., 2016, *Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds*, Journal of Food Composition and Analysis, vol. 45, s. 9–15.
- Jang, M., S., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M., Ohshima, T., 2002, *Inhibitory effects of 'Enokitake' mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning*, vol. 35, s. 697–702.
- Janovitz-Klapp, A., Richard, F., Nicolas, J., 1989, *Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties*, Phytochemistry, vol. 28, s. 2903–2907.
- Jarczyk, A., Płocharski, W., 2010, *Technologia produktów owocowych i warzywnych*, t. 1, Wydawnictwo Wyższej szkoły Ekonomiczno-Humanistycznej im. prof. Szczepana A. Pieniążka w Skierniewicach, Skierniewice.
- Jaworska, G., Gwóźdź, E., Pogoń, K., Klimek, M., 2014, *Zmiany jakości napoju grejpfrutowego w czasie przechowywania*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, nr 4, s. 889–896.
- Jaworska, G., Olczak, A., 2010, *Napoje bezalkoholowe; nowe tendencje w produkcji*, Przemysł Spożywczy, nr 64, s. 36–40.
- Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrżyńska, K., Paz De Peña, M., 2016, *Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation*, European Food Research and Technology, vol. 242, s. 1403–1409.
- Jiang, Y., Duan, X., Joyce, D., Zhang, Z., Li, J., 2004, *Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit*, Food Chemistry, vol. 88, s. 443–446.
- Jiménez, M., Chazarra, S., Escribano, J., Cabanes, J., García-Carmona, F., 2001, *Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 49, s. 4060–4063.
- Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Gandia-Herrero, F., García-Carmona, F., 2004, *Kinetic analysis of catechin oxidation by polyphenols oxidase at neutral pH*, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 319, s. 902–910.
- Jo, Y.-H., Seo, G.-U., Yuk, H.-G., Lee, S.-C., 2012a, *Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of methanol extracts from Magnolia denudata and Magnolia denudata var. purpurascens flowers*, Food Research International, vol. 47, s. 197–200.
- Jo, Y.H., Yuk, H.-G., Lee, J.-H., Kim, J.-C., Kim, R., Lee, S.-C., 2012b, *Antioxidant, tyrosinase inhibitory and acetylcholinesterase inhibitory activities of Green tea (Camellia sinensis L) seed and its pericarp*, Food Science and Biotechnology, vol. 21, s. 761–768.
- Kader, F., Haluk, J.P., Nicolas, J.P., Metche, M., 1998, *Degradation of cyanidin 3-glucoside by blueberry polyphenoloxidase: Kinetic studies and mechanisms*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 46, s. 3060–3065.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., Metche, M., 1997, *Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (Vaccinium corymbosum L). Partial purification and characterisation of*

- blueberry polyphenol oxidase*, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 73, s. 513–516.
- Kahle, K., Kraus, M., Richling, E., 2005, *Polyphenol profiles of apple juices*, Molecular Nutrition and Food Research, vol. 49, s. 797–806.
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N., Soyer, Y., 2005, *Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey*, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, vol. 29, s. 297–303.
- Kaur, M., Agarwal, C., Agarwal, R., 2009, *Anti-cancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products*, J. Nutrition, vol. 139, s. 1806S–1812S.
- Kączkowski, J., 2012, *Podstawy biochemii*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- Kelebek, H., 2010, *Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (Citrus paradisi) cultivars grown in Turkey*, Industrial Crops and Products, vol. 32, s. 269–274.
- Khan, B.A., Akhtar, N., Mahmood, T., 2010, *A comprehensive review of a magic plant, hippophae rhamnoides*, Pharmacognosy Journal, vol. 2, s. 65–68.
- Khan, M.K., Huma, Z.-E., Dangles, O., 2014, *A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols*, Journal of Food Composition and Analysis, vol. 33, s. 85–104.
- Khanom, F., Kayhara, H., Tadasa, K., 2000, *Tyrosinase inhibitory activity of Bangladeshi indigenous medicinal plants*, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, vol. 64, s. 1967–1969.
- Kim, D., Park, J., Han, C., Yoon, J., Kim, N., Seo, J., Lee, C., 2006, *Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 54, s. 935–941.
- Kim, Y.J., Uyama H., 2005, *Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future*, Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 62, s. 1707–23.
- Klimczak, I., 2010, *Wpływ związków fenolowych na kształtowanie jakości i właściwości prozdrowotnych soków owocowych*, w: Małecka, M., *Prozdrowotne składniki żywności*, Wydawnictwo Akademia Ekonomiczna, Poznań, s. 41–54.
- Klimczak, I., Ćwiklińska, P., 2013, *The effect of pomegranate juice on enzymatic browning of cloudy apple juice*, *Current trends in commodity sciences: analysis and consumer acceptance of food products*, Poznań University of Economics Faculty of Commodity Science, s. 125–139.
- Klimczak, I., Gliszczyńska-Świągło, A., 2015, *Comparison of UPLC and HPLC method for determination of vitamin C*, Food Chemistry, vol. 175, s. 100–105.
- Klimczak, I., Gliszczyńska-Świągło, A., 2017, *Green tea extract as an anti-browning agent for cloudy apple juice*, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 97, s. 1420–1426.
- Klimczak, I., Małecka, M., 2008, *Wpływ warunków przechowywania na profil związków polifenolowych i jakość sensoryczną wybranych soków cytrusowych*, *Zastosowanie metod statystycznych w badaniach naukowych III*, StatSoft Polska, s. 311–319.
- Klimczak I., Małecka M., Pachołek B., 2002, *Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds*, *Nahrung/Food*, vol. 46, s. 184–186.
- Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., Gliszczyńska-Świągło, A., 2007, *Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices*, Journal of Food Composition and Analysis, vol. 20, s. 313–322.

- Ko, R.K., Kim, G.-O., Hyun, C.-G., Jung, D.S., Lee, N.H., 2011, *Compounds with tyrosinase inhibition, elastase inhibition and DPPH radical scavenging activities from the branches of Distylium racemosum Sieb. et Zucc.*, *Phytotherapy Research*, vol. 25, s. 1451–1456.
- Kolniak-Ostek, J., Oszmiański, J., Wojdyło, A., 2012, *Kwas askorbinowy i związki fenolowe w produkcji świeżo tłoczonych soków jabłkowych*, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, nr 10, s. 16–18.
- Kolniak-Ostek, J., Oszmiański, J., Wojdyło, A., 2013, *Effect of L-ascorbic acid addition on quality, polyphenolic compounds and antioxidant capacity of cloudy apple juices*, *European Food Research and Technology*, vol. 236, s. 777–798.
- Kołodziejczyk, K., Milala, J., Sójka, M., Kosmala, M., Markowski, J., 2010, *Polyphenol oxidase activity in selected apple cultivars*, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, vol. 18, s. 51–61.
- Komthong, P., Igura, N., Shimoda, M., 2007, *Effect of ascorbic acid on the odours of cloudy apple juice*, *Food Chemistry*, vol. 100, s. 1342–1349.
- Komthong, P., Katoh, T., Igura, N., Shimoda, M., 2006, *Changes in odour of apple juice during enzymatic browning*, *Food Quality and Preference*, vol. 17, s. 497–504.
- Kosmala, M., Kołodziejczyk, K., 2006, *Procyjanidyny najpopularniejszych w Polsce desero- wych odmian jabłek*, *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, vol. 2, s. 124–134.
- KPMG, 2016, *Rynek napojów bezalkoholowych w Polsce*. Soki, nektary i napoje owocowe, s. 37–46.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., Sánchez, Y., Ogura, T., 2000a, *Flavonols from Heterotheca inuloides: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 8, s. 1749–1755.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Kubo, Y., Yamagiwa, Y., Kamikawa, T., Haraguchi, H., 2000b, *Molecular design of antibrowning agents*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, s. 1393–1399.
- Kuczyński, A., de Baerdemaeker, J., Oszmiański, J., 1994, *An optical reflectance method for studying the enzymatic browning reaction in apple*, *International Agrophysics*, vol. 8, s. 421–425.
- Kudelka, W., Głuszek, D., 2014, *Quality assessment of apple juices and consumer acceptance thereof*, *Towaroznawcze problem Jakości, Polish Journal of Commodity Science*, 2, 108–116.
- Kuijpers, T.F.M., Narváez-Cuenca, C.-E., Vincken, J.P., Verloop, A.J.W., van Berkel, W.J.H., Gruppen, H., 2012, *Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid by sulfur-containing compounds*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, s. 3507–3514.
- Kuijpers, T.F.M., van Herk, T., Vincken, J.-P., Janssen, R.H., Narh, D.L., van Berkel, W.J.H., Gruppen, H., 2014, *Potato and mushroom polyphenols oxidase activities are differently modulated by natural plant extracts*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, s. 214–221.
- Kumar, V.B., Mohan, T.C., Murugan, K., 2008, *Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (Malpighia glabra L.)*, *Food Chemistry*, vol. 15, s. 328–333.
- Labus, K.I., Bryjak, J., 2012, *Kinetyka utleniania związków fenolowych z udziałem tyrozy-nazy natywnej i im mobilizowanej*, *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, vol. 51, s. 145–147.

- Lærke, P.E., Christiansen, J., Veierskov, B., 2002, *Colour of blackspot bruises in potato tubers during growth and storage compared to their discolouration potential*, Postharvest Biology and Technology, vol. 26, s. 99–111.
- Lall, N., Kishore, N., Momtaz, S., Hussein, A., Naidoo, S., Nqephe, M., Crampton, B., 2015, *Extract from Ceratonia siliqua exhibits depigmentation properties*, Phytotherapy Research, vol. 29, s. 1729–1736.
- Land, E.J., Ramsden, C.A., Riley, P.A., 2007, *The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: a substrate structure investigation*, The Tohoku Journal of Experimental Medicine, vol. 212, s. 341–348.
- Lante, A., Tinello, F., 2014, *Citrus hydrosols as useful by-products for tyrosinase inhibition*, Innovative Food Science and Emerging Technologies, vol. 27, s. 154–159.
- Lebiedzińska, A., Czaja, J., Petrykowska, K., Szefer, P., 2012, *Soki i nektary owocowe źródłem witaminy C*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, vol. 3, 390–396.
- Le Bourvellec, C., Le Quéré, J.-M., Sanoner, P., Drilleau, J.-F., Guyot, S., 2004, *Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52, s. 122–130.
- Lee, S.Y., Baek, N., Nam, T.-G., 2016, *Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, vol. 31, s. 1–13.
- Lee, H.S., Coates, G.A., 1999, *Thermal pasteurization effects on color of red grapefruit juices*, Journal of Food Science, vol. 64, s. 663–666.
- Lesschaeve, E., Noble, A.C., 2005, *Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences*, The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 81, s. 330S–335S.
- Li, H., Cheng, K.-W., Cho, C.-H., He, Z., Wang, M., 2007, *Oxyresveratrol as an antibrowning agent for cloudy apple juices and fresh-cut apples*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 55, s. 2604–2610.
- Likhitwitayawuid, K., 2008, *Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity*, Current Science, vol. 94, s. 44–52.
- Lim, J.-Y., Ishiguro, K., Kubo, I., 1999, *Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves*, Phytotherapy Research, vol. 13, s. 371–375.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., 2012, *Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol. 11, s. 378–397.
- López-Nicolás, J.M., Núñez-Delicato, E., Sánchez-Ferrer, Á., García-Carmona, F., 2007, *Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosyl- β -cyclodextrin as secondary antioxidant*, Food Chemistry, vol. 101, s. 1164–1171.
- Łysoniewska, E., Kalisz, S., Mitek, M., 2011, *Analiza sensoryczna i barwa jako wskaźniki jakości napojów truskawkowych wzbogacanych ekstraktami z zielonej herbaty i miodokrzewu*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, XLV, s. 1023–1028.
- Macheix, J.J., Sapis, J.C., Fleuriet, A., 1991, *Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 30, s. 441–486.
- Manach, C., Scallbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L., 2004, *Polyphenols: food sources, bioavailability*, The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 79, s. 727–747.

- Marczyńska, D., Przybyło, M., 2013, *Melanocyty – komórki barwnikowe o wielu obliczach*, Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych, vol. 62, s. 491–499.
- Markowski, J., Baron, A., Le Quéré, J.-M., Plocharski, W., 2015, *Composition of clear and cloud juice from French and Polish apples in relation to processing technology*, LWT-Food Science and Technology, vol. 62, s. 813–820.
- Markowski, J., Plocharski, W., 2006, *Determination of phenolic compounds in apples and processed apple products*, Journal of Food and Ornamental Plant Research, vol. 14, s. 133–142.
- Marshall, M.R., Kim, J., Wei, Ch.I., 2000, *Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, s. 1–38. <http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html> [dostęp: 16.10.2009].
- del Mar García-Molina, M., Muñoz-Muñoz, J.L., Berna, J., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-Lopez, J.N., García-Canovas, F., 2014, *Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on hydroxyhydroquinone*, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 66 (2), s. 122–127.
- Martí, N., Mena, P., Cánovas, J.A., Micol, V., Saura, D., 2009, *Vitamin C and the role of citrus juices as functional food*, Natural Product Communications, vol. 4, s. 591–748.
- Martinez, M.V., Whitaker, J.R., 1995, *The biochemistry of enzymatic browning in foods and beverages*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 32, s. 53–273.
- Matheis, G., Whitaker, J.R., 1984, *Modification of proteins by polyphenols oxidase and peroxidase and their products*, Journal of Food Biochemistry, vol. 8, s. 137–162.
- Mattison, C.P., Desormeaux, W.A., Wasserman, R.L., Grimm, C.C., 2014, *Characterizing the effect of sodium sulfite on cashew allergens*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 133, AB115.
- Mayer, A.M., 2006, *Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review*, Phytochemistry, vol. 67, s. 2318–2331.
- McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S., 1992, *Inhibition of enzymatic browning of foods and beverages*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 32, s. 253–273.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J., 2007, *Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain*, Food Chemistry, vol.101, s. 177–184.
- Messerschmidt, A., Huber, R., 1990, *The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships*, European Journal of Biochemistry, vol. 187, s. 341–352.
- Michalak, M., Podśędek, A., Glinka, G., 2016, *Potencjał przeciwutleniający oraz związki polifenolowe glikolowych ekstraktów z Hippophae rhamnoides L. i Vaccinium oxycoccos L.*, Postepy Fitoterapii, nr 17, s. 33–38.
- Mieszczakowska-Frąć, M., Buczek, M., Kruczyńska, D., Markowski, J., 2015, *Cloudy red-fleshed apple juice production and quality*, Polish Journal of Natural Sciences, vol. 30, s. 59–725.
- Mitek, M., Gasik, A., 2009, *Polifenole w żywności. Wpływ na cechy organoleptyczne żywności*, Przemysł Spożywczy, nr 5, s. 34–39.
- Mitek, M., Kalisz, S., 2003, *Współczesne poglądy na właściwości przeciwutleniające soków owocowych i warzywnych*, Przemysł Spożywczy, nr 5, s. 37–39.

- Mogol, B.A., Yoldirim, A., Gökmen, V., 2010, *Inhibition of enzymatic browning in actual food systems by the Maillard reaction products*, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 90, s. 2556–2562.
- Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Cavalieri, R.P., McEvily, R.J., Iyengar, R., 1993, *Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-Hexylresorcinol as anti-browning agents*, Journal of Food Science, vol. 58, s. 797–800.
- MRiRW Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, 2016, *Rolnictwo i gospodarka żywnościowa w Polsce*, praca zbiorowa, Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej, Warszawa, s. 1–192.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García Ruíz, P.A., Molina-Alarcón, M., Tudela, J., García-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N., 2008a, *Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: kinetics and mechanism*, Biochemical Journal, vol. 416, s. 431–440.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Molina-Alarcón, M., Tudela, J., García-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N., 2008b, *Kinetic characterization of the enzymatic and chemical oxidation of the catechins in green tea*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 56, s. 9215–9224.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Varon, R., García Ruíz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N., 2010, *Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase*, IUBMB Life, vol. 62, s. 539–547.
- Muzolf, M., Gliszczynska-Świgło, A., Tyrakowska, B., 2007, *The radical scavenging capacity of green tea*, Polish Journal of Natural Sciences, vol. 4, s. 63–69.
- Nadulski, R., Strzałkowska, K., Kobus, Z., 2012, *Wpływ czasu i warunków przechowywania wybranych odmian jabłek na wydajność tłoczenia*, Inżynieria Rolnicza, 3, s. 157–164.
- Nakajima, V.M., Macedo, G.A., Macedo, J.A., 2014, *Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment*, LWT – Food Science and Technology, vol. 59, 1205–1212.
- Nerya, O., Musa, R., Khatib, S., Tamir, S., Vaya, J., 2004, *Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers*, Phytochemistry, vol. 65, s. 1389–1395.
- Ni Eidhin, D.M., Murphy, E., O’Beirne, D., 2006, *Polyphenol oxidase from apple (malus domestica borkh. cv bramley’s seedling): purification strategies and characterization*, Journal of Food Science, vol. 71, s. 51–58
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J., Aubert, S.Y., 1994, *Enzymatic browning reaction in apple and apple products*, Critical Reviews in Food and Nutrition, vol. 34, s. 109–157.
- Nirmal, N.P., Benjakul, S., 2011, *Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage*, LWT-Food Science and Technology, 44, s. 924–932.
- Nirmal, N.P., Benjakul, S., Ahmad, M., Arfat, Y.A., Panichayupakaranand, P., 2015, *Undesirable enzymatic browning in crustaceans: Causative effects and its inhibition by phenolic compounds*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 55, s. 1992–2003.
- No, J.K., Soung, D.Y., Kim, Y.J., Shim, K.H., Jun, Y.S., Rhee, S.H., 1999, *Inhibition of tyrosinase by green tea components*, Life Sciences, vol. 65, s. 241–246.
- Nokthai, P., Lee, V.S., Shank, L., 2010, *Molecular modeling of peroxidase and polyphenols oxidase: substrate specificity and active site comparison*, International Journal of Molecular Sciences, vol. 11, s. 3266–3276.

- Nosecka, B., 2015, *Handel zagraniczny*, Rynek owoców i warzyw, Analizy rynkowe, Stan i perspektywy, nr 46, s. 17–25.
- Nosecka, B., 2016, *Handel zagraniczny*, Rynek owoców i warzyw, Analizy rynkowe, Stan i perspektywy, nr 48, s. 19–26.
- Nosecka, B., Szczepaniak, I., 2016, *Przetwórstwo*, Rynek owoców i warzyw, Stan i perspektywy, Analizy rynkowe, nr 48, 14–19.
- Nowak-Węgrzyn, A., Assaad, A.H., Bahna, S.L., Bock, A., Sicherer, S.H., Teuber, S.S., 2009, *Work group report: oral food challenge testing*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 123 (6), s. 365–383.
- Oleksy, K., 2015, *Soki Cold Press – światowy trend w sokołnictwie*, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 4, s. 8.
- Oktay, M., Küfrevioliu, I., Kocaçalışkan, I., Şakırolu, H., 1995, *Polyphenoloxidase from Amasya Apple*, Journal of Food Science, vol. 60 (3), s. 494–496.
- Oleszek, W., Lee, C.Y., Price, K.R., 1989, *Apple phenolics and their contribution to enzymatic browning reactions*, Acta Scientiarum Botanicorum Poloniae, vol. 58, 273–283.
- Oliveira, C.M., Ferreira, A.C.S., De Freitas, V., Silva, A.M.S., 2011, *Oxidation mechanisms occurring in wines*, Food Research International, vol. 44, s. 1115–1126.
- Oszmiański, J., 2002, *Stabilizacja i zastosowanie barwnika antocyjanowego aronii do barwienia napoi*, Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, vol.1, s. 37–45.
- Oszmiański, J., 2007, *Soki owocowe o wysokiej wartości odżywczej*, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, nr 4, s. 12–15.
- Oszmiański, J., 2009, *Nowe trendy w produkcji soków i nektarów jabłkowych*, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 4, s. 12.
- Oszmiański, J., Lee, C.Y., 1990, *Enzymatic oxidative reaction of catechine and chlorogenic acid in a model system*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 38, s. 12020–1204.
- Oszmiański, J., Lee, C.Y., 1990a, *Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 38, s. 1892–1895.
- Oszmiański, J., Lee, C.Y., 1994, *Frakcjonowanie i hydroliza niektórych glikozydów flawonoidowych ze skórek jabłkowych*, Zeszyty Naukowe AR Wrocław, nr 244, Technologia Żywności, nr 7, s. 105–112.
- Oszmiański, J., Sokół-Łętowska, A., Kuczyński, A., 1994, *Effect of rhubarb juice on phenolics and colour stability of unclarified apple juice*, Polish Journal of Food and Nutritional Science, vol. 3, s. 83–92.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., 2006, *Soki naturalnie mętne – dobry kierunek w przetwórstwie jabłek*, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, nr 2, nr s. 20–22.
- Oszmiański, J., Wolniak, M., Wojdyło, A., Wawer, I., 2007, *Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 87, s. 573–579.
- Özer, Ö., Mutlu, B., Kivçak, B., 2007, *Antityrosinase activity of some plant extracts and formulations containing ellagic acid*, Pharmaceutical Biology, vol. 45 (6), s. 519–524.
- Özoğlu, H., Bayindirli, A., 2002, *Inhibition of enzymatic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents*, Food Control, vol. 13, s. 213–221.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., Swanson, B.G., 1999, *Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree*, Journal of Food Science, vol. 64, s. 42–45.

- Pathare, P.B., Opara, U.L., Al-Said, F.A.J., 2013, *Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review*, Food and Bioprocess Technology, vol. 6, s. 36–60.
- Perumalla, A.V.S., Hettiarachchy, N.S., 2011, *Green tea and grape seed extracts – Potential application in food safety and quality*, Food Research International, vol. 44, s. 827–839.
- Peterson, J.J., Dwyer, J.T., Beecher, G.R., Bhagwat, S.A., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D.B., Holden, J.M., 2006, *Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature*, Journal of Food Composition and Analysis, vol. 19, s. S66–S73.
- PN-EN 12143:2000, Soki owocowe i warzywne – Oznaczanie zawartości substancji rozpuszczalnych metodą refraktometryczną.
- PN-EN ISO 8586-1:1996, *Analiza sensoryczna – Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania oceniających – Wybrani oceniający*.
- PN-EN ISO 8586:2014-03, *Analiza sensoryczna – Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania wybranych oceniających i ekspertów oceny sensorycznej*.
- PN-ISO 3103:1996, *Herbata. Przygotowanie naparu do badań sensorycznych*.
- Podśedek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B., Markowski, J., 2000, *Compositional characterization of some apple varieties*, European Food Research Technology, vol. 210, s. 268–272.
- Porebska-Budny, M., Dworzański, J.P., 1988, *Tyrozynaza-oksydoreduktaza; monofenol, o-difenol: O₂*, Postępy Biochemii, vol. 34, s. 375–394.
- Pyryt, B., Wilkowska, D., 2012, *Ocena jakości wybranych soków pomarańczowych*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, XLV, s. 248–253.
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2008, *Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control*, Food Reviews International, vol. 24, s. 361–375.
- Rapisarda, P., Fabroni, S., Peterek, S., Russo, G., Mock, H.-P., 2009, *Juice of new hybrids (Citrus clementina Hort. Ex Tan.x C.sinensis L. Osbeck) as a source of natural antioxidants*, Food Chemistry, vol. 117, s. 212–218.
- Rapisarda, P., Tomaino, A., Cascio, R.L., Boninia, F., de Pasquale, A., Saija, A., 1999, *Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 47, s. 4718–4723.
- Renard, C.M., Baron, A., Guyot, S., Drilleau, J.F., 2001, *Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences*, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 29, s. 115–125.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., Sanjust, E., 2002, *Tyrosinase inhibition: general and applied aspects*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, vol. 17, s. 207–218.
- Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Nicolas, J.J., Lacombe, J.M., Pavia, A.A., 1991, *Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenols oxidase*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 39, s. 841–847.
- Robinson, S.P., Loveys, B.R., Chacko, E.K., 1993, *Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit*, Australian Journal of Plant Physiology, vol. 20, s. 99–107.
- Rocha, A.M.C.N., Cano, N.P., Galeazzi, M.A.M., 1998, *Characterisation of 'starking' apple polyphenoloxidase*, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 77, s. 527–534.
- Rocha, A.M.C.N., Morais, A.M.M.B., 2001, *Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from Jonagored apple*, Food Control, vol. 12, s. 85–90.

- Rocznik Statystyczny Rolnictwa, GUS 2014, Warszawa
- Rocznik Statystyczny Rolnictwa, GUS 2016, Warszawa
- Ros, J.R., Rodriguez-López, J.N., Garcia-Cánovas, F., 1993, *Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase*, *Biochemical Journal*, vol. 295, s. 309–312.
- de la Rosa, L.A., Alvarez-Parilla, E., Moyers-Montoya, E., Villegas-Ochoa, M., Aya-Zavala, J.F., Hernández, J., Ruiz-Cruz, S., González-Aguilar, G.A., 2011, *Mechanism for the inhibition of apple juice enzymatic browning by Palo Fierro (desert ironweed) honey extract and other natural compounds*, *LWT – Food Science and Technology*, 44, s. 269–276.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 195/2006 z dnia 20 grudnia 2006 roku w sprawie dodawania do żywności witamin i składników mineralnych oraz niektórych innych substancji
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z 16 grudnia 2008 w sprawie dodatków do żywności, zmiany rozporządzenia Komisji (UE) nr 1129/2011 z dnia 11 listopada 2011.
- Rösch, D., Mügge, C., Fogliano, V., Kroh, L.W., 2004, *Antioxidant oligomeric proanthocyanidins from sea buckthorn (Hippophaë rhamnoides) pomace*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, s. 6712–6718.
- Saikia, M., Handique, P.J., 2013, *Antioxidant and antibacterial activity of leaf, bark, pulp and seed extracts of seabuckthorn (Hippophae salicifolia D. Don) of Sikkim Himalayas*, *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 7, s. 1330–1338.
- Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., García-Carmona, 1995, *Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism*, *Biochimica Acta*, vol. 1247, s. 1–11.
- Sapers, G., 1992, *Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration*, *Journal of Food Science*, vol. 57, s. 1192–1193.
- Sasaki, K., Yoshizaki, F., 2002, *Nobiletin as tyrosinase inhibitor from the peel of citrus fruit*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 25, s. 806–808.
- Sato, K., Toriyama, M., 2009, *Depigmenting effect of catechins*, *Molecules*, vol. 14, s. 4425–4432.
- Satoh, E., Tohyama, N., Nishimura, M., 2005, *Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas*, *International Journal of Food Science and Nutrition*, vol. 56, s. 551–559.
- Sdiri, S., Bermejo, A., Aleza, P., Navarro, P., Salvador, A., 2012, *Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins*, *Food research International*, vol. 49, s. 462–468.
- Selamat, M.J., Bakar, J., Nazamid, S., 2002, *Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenols oxidase and tyrosinase*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 82, s. 559–566.
- Selinheimo, E., NiEidhin, D., Steffensen, C., Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaoui, S., Record, E., O’Beirne, D., Buchert, J., Kruus, K., 2007, *Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases*, *Journal of Biotechnology*, vol. 130, s. 471–480.
- Seliwanowicz, B., Hałasińska, A.G., Trzcińska, M., Jakubowski, A., Lipowski, J., Skąpska, S., 2005, *Zmiany wybranych związków fenolowych, parametrów barwy i aktywności przeciwutleniającej w czasie przechowywania soków z wybranych odmian jabłek*, *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, vol. 4, s. 83–91.

- Senol, F.S., Khan, M.T.H., Orhan, G., Gurkas, E., Orhan, I.E., Oztekin, N.S., Ak, F., 2014, *In silico approach to inhibition of tyrosinase by ascorbic acid using molecular docking simulation*, Current Topics in Medicinal Chemistry, vol. 14, s. 1469–1472.
- Shi, Y., Hen, Q.X., Wang, Q., Song, K.K., Qiu, L., 2005, *Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (Agaricus bisporus) tyrosinase*, Food Chemistry, vol. 92, s. 707–712.
- Shimizu, K., Kondo, R., Sakai, K., 2000, *Inhibition of tyrosinase by flavonoid, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations*, Planta Medica, vol. 66, s. 11–15.
- Shin, M.H., Ryu, S.Y., Choi, E.J., Kang, S.H., Chang, I.M., Min, K.R., Kim, Y., 1998 *Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase*, Biochemical and Biophysical Research Communication, vol. 243, s. 801–803.
- Si, Y.X., Wang, Z.J., Park, D., Chung, H.Y., Wang, S.F., Yan, L., Yang, J.M., Qian, G.Y., Yin, S.J., Park, Y.D., 2012a, *Effect of hesperetin on tyrosinase: Inhibition kinetics integrated computational simulation study*, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 50, s. 257–262.
- Si, Y.X., Yin, S.J., Oh, S., Wang, Z.J., Ye, S., Yan, L., Yang, J.M., Park, Y.D., Lee, J., Qian, G.Y., 2012b, *An integrated study of tyrosinase inhibition by rutin: Progress using a computational simulation*, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, vol. 5, s. 999–1012.
- Siddiq, M.I., Cash, J.N., 2000, *Physio-chemical properties of polyphenols oxidase from d'Anjou and Bartlett pears (Pyrus Communis L.)*, Journal of Food Processing and Preservation, vol. 24, s. 353–364.
- Siddiq, M., Sinha, N.K., Cash, J.N., 1992, *Characterisation of polyphenoloxidase from Stanley plums*, Journal of Food Science, vol. 57, s. 1177–1179.
- Sielicka, M., Klimczak, I., 2017, *The role of sensory evaluation in a new food product development*, w: Somatyja, U., Zmudziński, W. (eds.), *Current trends in commodity science. Challenges in food development and processing*, Poznań University of Economics and Business, s. 57–74.
- Singelton, V.L., Rossi, J.A. J., 1965, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagent*, American Journal of Enology and Viticulture, 16, s. 144–158.
- Skrede, D., Wrolstad, R.E., Durst, R.W., 2000, *Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (Vaccinium corymbosum L.)*, Journal of Food Science, vol. 65, s. 357–364.
- Sojkin, B., Małecka, M., Olejniczak, T., Bakalarska, M., 2009, *Konsument wobec innowacji produktowych na rynku żywności w latach 2006–2008*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań
- Sonmez, F., Sevmezler, S., Atahan, A., Ceylan, M., Demir, D., Gencer, N., Arslan, O., Kucukislamoglu, M., 2011, *Evaluation of new chalcone derivatives as polyphenols oxidase inhibitors*, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 21, s. 7479–7482.
- Soysal, Ç., 2009, *Effects of green tea extract on “Golden Delicious” apple polyphenoloxidase and its browning*, Journal of Food Biochemistry, vol. 33, s. 134–148.
- Stelzig, D.A., Akhtar, S., Ribeiro, S., 1972, *Catechol oxidase of red delicious apple peel*, Phytochemistry, vol. 11, s. 535–539.
- Stodt, U.W., Blauth, N., Niemann, S., Stark, J., Pawar, V., Jayaraman, S., Koek, J., Engelhardt, U.H., 2014, *Investigation of processes in black tea manufacture through model ferment-*

- tation (oxidation) experiments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, s. 7854–7861.
- Suh, H.-J., Park, S., Park, S., 2011, *Inhibition of browning fresh apple juices by natural phytochemicals from Rumex crispus L. seed*, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, vol. 54, s. 524–530.
- Szarejko, E., 2016, *Napoje bezalkoholowe*, *Poradnik handlowca, Branżowy Miesięcznik Ogólnopolski dla Sklepów i Hurtownii FMCG*, nr 4, s. 108.
- Teleszko, M., Kolniak, J., Oszmiański, J., 2010, *Wpływ odmiany jabłek na zmętnienie i barwę naturalnie mętnych soków*, w: Wojtatowicz, M., Kawa-Rygielska, J. (red.), *Jakość i prozdrowotne cechy żywności*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, s. 27–38.
- Teleszko, M., Nowicka, P., Wojdyło, A., 2016, *Chemical, enzymatic and physical characteristic of cloudy apple juices*, *Agricultural and Food Science*, vol. 25, s. 35–43.
- Teleszko, M., Wojdyło, A., Rudzińska, M., Oszmiański, J., Golis, T., 2015, *Analysis of lipophilic and hydrophilic bioactive compounds content in sea buckthorn (Hippophaë rhamnoides L.) Berries*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 29, s. 4120–4129.
- Tetik, N., Karhan, M., Turhan, I., Aksu, M., Oziyci, H.R., 2013, *A large-scale study on storage stability of cloudy apple juice treated by N₂ and ascorbic acid*, *Journal of Food Quality*, vol. 36, s. 121–126.
- Thada, R., Chockalingam, S., Dhandapani, K., Panchamoorthy, R., 2013, *Extraction and quantitation of coumarin from cinnamon and its effect on enzymatic browning in fresh apple juice: A bioinformatics approach to illuminate its antibrowning activity*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, s. 5385–5390.
- Tochi, B.N., Wang, Z., Xu, S.Y., Zhang, W., 2009, *Effect of stem bromelain on the browning of apple juice*, *American Journal of Food Technology*, vol. 4, s. 146–153.
- Trejo-Gonzalez, A., Soto-Valdez, H., 1991, *Partial characterization of polyphenoloxidase extracted from 'Anna' apple*, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 116, s. 672–675.
- Trojanowicz, P., 2015, *Soki NFC*, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 7–8, s. 60–65.
- Turk, M.F., Vorobiev, E., Baron, A., 2012, *Improving apple juice expression and quality by pulsed electric field on an industrial scale*, *LWT – Food Science and Technology*, vol. 49, s. 245–250.
- Ünal, M.Ü., 2007, *Properties of polyphenols oxidase from Anamur banana (Musa cavendishii)*, *Food Chemistry*, vol. 100, s. 909–913.
- Vámos-Vigyázó, L., 1981, *Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 15, s. 49–127.
- Vanamala, J., Reddivari, L., Yoo, K.S., Pike, L.M., Patil, B.S., 2006, *Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices*, *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, s. 157–166.
- Van der Sluis, A.A., Dekker, M., Skrede, G., Jongen, W.M.F., 2002, *Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, s. 7211–7219.
- Villani, T.S., Reichert, W., Ferruzzi, W.G., Pasinetti, G.W., Simon, J.E., 2015, *Chemical investigation of commercial grape seed derived products to assess quality and detect adulteration*, *Food Chemistry*, vol. 170, s. 271–280.

- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Hendrickx, M.E., Tobback, P.P., 1998, *Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums*, LWT – Food Science and Technology, vol. 31, s. 44–49.
- Wei, S.-T., Ou, L.-C., Luo, M.R., Hutchings, J.B., 2012, *Optimisation of food expectations using product colour and appearance*, Food quality and Preference, vol. 23, s. 49–62.
- Whitaker, J.R., Lee, C.Y., 1995, *Recent advances in chemistry of enzymatic browning. An overview*, w: Lee, C. i in., *Enzymatic browning and its prevention*, ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, vol. 1, s. 1–7.
- Wibowo, S., Vervoort, L., Tomic, J., Santiago, J.S., Lemmens, L., Panozzo, A., Grauwet, T., Hendrickx, M., Loey, A.V., 2015, *Colour and carotenoids changes of pasteurized orange during storage*, Food Chemistry, vol. 171, s. 330–340.
- Włodarska, K., Pawlak-Lemańska, K., Górecki, T., Sikorska, E., 2015, *Motywy wyboru żywności przez konsumentów soków – badania pilotażowe*, Journal of Agribusiness and Rural Development, vol. 4, s. 839–847.
- Włodarska, K., Pawlak-Lemańska, K., Górecki, T., Sikorska, E., 2016, *Perception of apple juice: A comparison of physicochemical measurements, descriptive analysis and consumer responses*, Journal of Food Quality, vol. 39, s. 351–361.
- Woźdyło, A., 2011, *Ocena możliwości zastosowania owoców pigwy pospolitej w produkcji przetworów o wysokiej zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław.
- Woźdyło, A., Oszmiański, J., Bielicki, P., 2010, *Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant activity of three varieties of apple from organic and conventional farming*, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, vol. 55, s. 173–177.
- Woźdyło, A., Oszmiański, J., Laskowski, P., 2008, *Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 56, s. 6520–6530.
- Xie, L.P.; Chen, Q.X.; Huang, H.; Wang, H.Z.; Zhang, R.Q., 2003, *Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase*, Biochemistry (Moscow), vol. 68, s. 487–491.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma Y., Shi, J., 2008, *Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China*, Food Chemistry, vol. 106, s. 545–551.
- Xu, Z., Zhang, L., Wang, Y., Bi, X., Buckow, R., Liao, X., 2011, *Effects of high pressure CO₂ treatments on microflora, enzymes and some quality attributes of apple juice*, Journal of Food Engineering, vol. 104, s. 577–584.
- Yokotsuka, K., Singleton, V.L., 1997, *Disappearance of anthocyanins as grape juice if prepared and oxidized with PPO and PPO substrates*, American Journal of Enology and Viticulture, vol. 48, s. 13–25.
- Yoruk, R., Marshall, M.R., 2003, *Physicochemical properties and function of plant polyphenols oxidase: a review*, Journal of Food Biochemistry, vol. 27, s. 361–422.
- Zamani, N.P., Gazali, M., Batubara, I., 2015, *The study of tyrosinase and antioxidant activity of Xylocarpus Granatum Koenig Seed Kernel extract toward evidence based indigenous knowledge from Togean Archipelago, Indonesia*, Journal of Marine Science: Research and Development, vol.5, doi:10.4172/2155-9910.1000168.

- Zambrzycki, P., 2015, *Owocna promocja, Rynek owoców i warzyw*, Biuletyn Informacyjny, Agencja Rynku Rolnego, nr 3, s. 30–34.
- Zampini, M., Sanabria, D., Phillips, N., Spence, C., 2007, *The multisensory perception of flavor: Assessing the influence of color cues on flavor discrimination responses*, Food Quality and Preference, vol. 18, s. 975–984.
- Zemel, G.P., Sims, C.A., Marshall, M.R., Balaban, M., 1990, *Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice*, Journal of Food Science, vol. 55, s. 562–563.
- Zhang, C., Lu, Y., Tao, L., Su, X., Wei, D., 2007, *Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, vol. 22, s. 83–90.
- Zhang, Y., Luo, S., Wang, W., 2014, *Stability and sensory quality of fresh fruit and vegetable juices: evaluated with chromatic aberration*, Journal of Food Processing and Preservation, 38, 1259–1268.
- Zhou, P., Smith, N.L., Lee, C.Y., 1993, *Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 41, s. 532–536.
- Zocca, F., Lomolino, G., Lante, A., 2011, *Dog rose and pomegranate extracts as agents to control enzymatic browning*, Food Research International, vol. 44, s. 957–963.
- Zu, Y., Li, C., Fu, Y., Zhao, C., 2006, *Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin In the extract of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves by RP-HPLC with DAD*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 41, s. 714–719.
- <http://ec.europa.eu/eurostat>
<http://www.e-sadownictwo.pl>
<http://www.izz.waw.pl/pl/>
<http://www.mf.gov.pl/ministerstwo-finansow>
<http://www.who.int/en/>

SPIS TABEL

1. Produkcja wybranych przetworów owocowych w Polsce w latach gospodarczych [tys. ton]	10
2. Eksport i import wybranych przetworów owocowych w Polsce w latach gospodarczych [tys. ton]	13
3. Kategorie i przykłady inhibitorów enzymatycznego brunatnienia	26
4. Wybrane inhibitory PPO z grzyba (tyrozynazy) i ich stężenia powodujące spadek aktywności enzymu o 50%	29
5. Inhibitory brązowienia mętnego soku jabłkowego	40
6. Hamowanie aktywności tyrozynazy przez ekstrakty roślinne w układach modelowych oraz zawartość polifenoli w ekstraktach	53
7. Zawartość kwasu galusowego, katechin i alkaloidów w ekstraktach z zielonych herbat (EH1-EH5) [mg/g ekstraktu]	56
8. Ogólna zawartość flawonoidów w ekstraktach z zielonej herbaty (EH1-EH5) [mg/g]	57
9. Zawartość związków polifenolowych w ekstrakcie z pestek winogron (EPW) [mg/g ekstraktu]	58
10. Zawartość związków polifenolowych w ekstrakcie z rokitnika (ER) [mg/g ekstraktu]	60
11. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy parametrem IC_{50} a zawartością związków polifenolowych ogółem oznaczonych metodą Folina-Ciocalteu i HPLC lub zawartością flawonoidów ogółem w badanych ekstraktach roślinnych	61
12. Hamowanie aktywności tyrozynazy przez wybrane soki z owoców cytrusowych, w układach modelowych	62
13. Zawartość kwasów fenolowych oraz flawanonów w badanych sokach z owoców cytrusowych [mg/l]	63
14. Zawartość związków polifenolowych ogółem, flawonoidów ogółem oraz witaminy C w badanych sokach z owoców cytrusowych	66
15. Zmiany parametrów barwy (ΔL^* , Δa^* , Δb^*), całkowitej różnicy barwy ΔE^*_{ab} , indeksu brązowienia (ΔBI) oraz indeksu zażółcenia (ΔYI) mętnych soków jabłkowych podczas przechowywania	71

16. Zmianycałkowitej różnicy barwy ΔE^*_{ab} , indeksu brązowienia (ΔBI) oraz indeksu zażółcenia (ΔYI) mętnych soków jabłkowych z dodatkiem kwasu askorbinowego (KA) podczas przechowywania	74
17. Zawartość wybranych związków polifenolowych w badanych sokach jabłkowych w latach 2013–2014 [mg/l]	76
18. Zawartość związków polifenolowych w mętnych sokach jabłkowych z odmiany 'Golden Delicious' [mg/l]	79
19. Zawartość związków polifenolowych ogółem, flawonoidów ogółem, witaminy C oraz aktywność PPO w badanych sokach jabłkowych	80
20. Zawartość ekstraktu oraz wartość pH w badanych sokach jabłkowych	81
21. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na zawartość związków polifenolowych ogółem i flawonoidów ogółem w nieprzechowywanym soku jabłkowym	83
22. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na zawartość ekstraktu ogólnego i wartość pH nieprzechowywanego soku jabłkowego	84
23. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy stopniem inhibicji PPO a zawartością polifenoli ogółem i flawonoidów ogółem w badanych sokach jabłkowych z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER)	87
24. Wpływ dodatku ekstraktu z zielonej herbaty (EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na aktywność PPO w przechowywanym soku jabłkowym	89
25. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH1-EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na parametry barwy nieprzechowywanego soku jabłkowego	90
26. Wpływ dodatku ekstraktu z zielonej herbaty (EH5), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na zmianę indeksu brązowienia (ΔBI), indeksu zażółcenia (ΔYI) oraz wartości absorbancji przy 420 nm (ΔA_{420}) przechowywanego soku jabłkowym	99
27. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy ΔA_{420} a aktywnością PPO w sokach, wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^*_{ab} , ΔYI , ΔBI przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER)	102
28. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy aktywnością PPO a wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^*_{ab} , ΔBI , ΔYI , ΔA_{420} przechowywanych sokach jabłkowych z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER)	103
29. Średnie rangi analizowanych parametrów przechowywanych soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów roślinnych (EH5, EPW i ER) w grupach wyodrębnionych przy użyciu analizy skupień	105
30. Zawartość związków polifenolowych ogółem, flawonoidów ogółem oraz witaminy C w soku jabłkowym, sokach cytrusowych i sokach mieszanych przed przechowywaniem	107

31. Zawartość ekstraktu ogólnego i wartość pH soku jabłkowego, soków cytrusowych oraz soków mieszanych przed przechowywaniem	108
32. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy stopniem inhibicji PPO a zawartością polifenoli ogółem, flawonoidów ogółem i witaminy C w badanych sokach mieszanych	110
33. Stopień inhibicji PPO w przechowywanych próbkach soku jabłkowego i soków mieszanych	111
34. Parametry barwy soku jabłkowego, soków cytrusowych oraz soków mieszanych przed przechowywaniem	112
35. Zmiana indeksu brązowienia (ΔBI), indeksu zażółcenia (ΔYI) oraz wartości absorbancji przy 420 nm soku jabłkowego, soków cytrusowych i soków mieszanych podczas przechowywania	119
36. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy ΔA_{420} a aktywnością PPO, wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI przechowywanych soków mieszanych ..	122
37. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy aktywnością PPO a wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔBI , ΔYI , ΔA_{420} przechowywanych soków mieszanych ..	122
38. Średnie rangi analizowanych parametrów przechowywanych próbek soków jabłkowych i mieszanych, w grupach wyodrębnionych przy użyciu analizy skupień	124
39. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH5), z pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER) na pożądalność barwy soku jabłkowego przed przechowywaniem	127
40. Pożądalność barwy soku jabłkowego, soków cytrusowych i soków mieszanych przed przechowywaniem	128
41. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy pożądalnością barwy a wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI , ΔA_{420} przechowywanych przez 48 h soków jabłkowych z dodatkiem ekstraktów z zielonej herbaty (EH), pestek winogron (EPW) i rokitnika (ER)	133
42. Współczynnik korelacji r Pearsona pomiędzy pożądalnością a wartościami ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE_{ab}^* , ΔYI , ΔBI , ΔA_{420} przechowywanych przez 48 h soków mieszanych	134

ANEKS

1. Zmiany parametrów L^* , a^* , b^* mętnych soków jabłkowych w czasie 48 h przechowywania w temperaturze 4°C	143
---	-----

SPIS RYSUNKÓW

1. Zbiory owoców w Polsce w latach 2010–2015	9
2. Produkcja soków owocowych w Polsce w latach 2010–2016	11
3. Spożycie soków owocowych w Polsce w latach 2010–2015	14
4. Schemat reakcji enzymatycznego brunatnienia	19
5. Wzory strukturalne wybranych substratów polifenolooksydazy	21
6. Schemat działania inhibitorów odwracalnych	28
7. Podstawowa struktura flawonoidów	31
8. Struktury wybranych związków fenolowych	32
9. Mechanizm zapobiegania brązowieniu enzymatycznemu przez kwas askorbinowy	39
10. Schemat przeprowadzonych badań	47
11. Zmiany parametrów barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) mętnych soków jabłkowych podczas przechowywania	70
12. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (A), pestek winogron (B) i rokitnika (C) na aktywność PPO w nieprzechowywanym soku jabłkowym	86
13. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (A), pestek winogron (B) i rokitnika (C) na zmianę całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) nieprzechowywanego soku jabłkowego	92
14. Wpływ dodatku ekstraktu z zielonej herbaty (EH5) na parametry barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) przechowywanego soku jabłkowego	94
15. Wpływ dodatku ekstraktu z pestek winogron (EPW) na parametry barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) przechowywanego soku jabłkowego	95
16. Wpływ dodatku ekstraktu z rokitnika (ER) na parametry barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) przechowywanego soku jabłkowego	96
17. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (EH5) (A), pestek winogron (EPW) (B) i rokitnika (ER) (C) na zmianę całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) przechowywanego soku jabłkowego	97
18. Dendrogram grupowania przechowywanych próbek soków jabłkowych bez i z dodatkiem ekstraktów roślinnych	104
19. Stopień inhibicji PPO w sokach mieszanych przed przechowywaniem	110
20. Zmiana całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) soków mieszanych przed przechowywaniem	113

21. Zmiany parametrów barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) soków z owoców cytrusowych (SP, SM, SG) podczas przechowywania	115
22. Zmiany parametrów barwy L^* (A), a^* (B), b^* (C) soku jabłkowego oraz soków mieszanych podczas przechowywania	116
23. Zmiany całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) soków z owoców cytrusowych (SP, SM, SG) podczas przechowywania	118
24. Zmiana całkowitej różnicy barwy (ΔE^*_{ab}) soku jabłkowego oraz soków mieszanych podczas przechowywania	118
25. Dendrogram grupowania przechowywanych próbek soków jabłkowych i soków mieszanych	123
26. Wpływ dodatku ekstraktów z zielonej herbaty (A), z pestek winogron (B) i rokitnika (C) na pożądalność barwy przechowywanego soku jabłkowego	130
27. Zmiany pożądalności barwy soku jabłkowego, soków cytrusowych oraz soków mieszanych: jabłkowo-pomarańczowych (A), jabłkowo-mandarynkowych (B) i jabłkowo-grejpfrutowych (C) podczas przechowywania	132

Publikacja jest obszernym i wartościowym opracowaniem naukowym traktującym kompleksowo zagadnienia związane z możliwością zastosowania naturalnych przeciwutleniaczy jako inhibitorów brązowienia enzymatycznego w przemyśle owocowo-warzywnym. Jest twórczym osiągnięciem Autorki mającym istotny wpływ na stan wiedzy i kierunki dalszych badań w zakresie regulacji barwy mętnych soków, które cieszą się coraz większą popularnością wśród konsumentów ze względu na wzrost ich wiedzy na temat relacji żywność-żywnienie-zdrowie.

(z recenzji prof. dr. hab. Stanisława Popka)

Monografia obejmuje szereg istotnych kwestii związanych ze współczesną technologią przetwórstwa surowców na produkty charakteryzujące się wysoką akceptowalnością sensoryczną przez konsumentów poprzez modulację jednego z głównych czynników jakości – barwy. Jej główną wartością jest nie tylko to, iż Autorka podjęła się wskazania, w jaki sposób należy tego dokonać, ale również potwierdziła to w swoich badaniach.

(z recenzji prof. dr. hab. Anety Wojdyło)

ISBN 978-83-7417-949-2



9 788374 179492