

*Andrzej Ochrem, Piotr Zapletal, Henryk Pustkowiak,
Justyna Żychlińska-Buczek*

PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH I POJEMNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA SERÓW PODPUSZCZKOWYCH I TWAROGOWYCH*)

Zakład Hodowli Bydła Instytutu Nauk o Zwierzętach
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Kierownik : Prof. dr hab. Z. Gil

Celem badań było określenie zawartości kwasów tłuszczowych i pojemności przeciwutleniającej w wybranych serach dojrzewających i twarogowych. Statystycznie istotne różnice między twarogami i serami dojrzewającymi stwierdzono dla następujących rodzin kwasów tłuszczowych: nasycone, nienasycone, jedno i wielonienasycone oraz kwasów z rodziny n-3. W badaniach wykazano, że wyższą pojemność przeciwutleniającą uzyskuje się przeprowadzając ekstrakcję metanolem.

Hasła kluczowe: sery podpuszczkowe, twarogi, kwasy tłuszczowe, przeciwutlenia-
cze.

Key words: rennet cheese, curd cheese, fatty acids, antioxidants.

Produkcja serów sięga VIII w. przed naszą erą. Już wówczas ceniono je za wartości odżywcze i cechy smakowo-zapachowe. Sery podpuszczkowe dojrzewające są to świeże lub dojrzałe produkty o stałej lub półstałej konsystencji, w których stosunek białek serwatkowych do kazeiny jest wyższy niż w mleku (1)

Dojrzewanie serów związane jest z występowaniem bakterii kwasu mlekowego, bakterii peptonizujących, laseczek beztlenowych, drożdżaków i pleśni. W procesie dojrzewania wyróżnia się trzy okresy: wstępne, główne i dodatkowe. Procesy te obejmują powstawanie kwasu mlekowego, rozszczepienie białek i tworzenie tzw. „oczek” oraz enzymatyczny rozkład substancji serowej, aż do otrzymania gotowego produktu (2).

Proteoliza prowadzi również do powstania różnych peptydów, które wykazują znaczną aktywność biologiczną. Podczas fermentacji zachodzi uwalnianie z kazeiny peptydów o charakterze antyoksydacyjnym, a bakterie kwasu mlekowego przyczyniają się do degradacji anionów nadtlenkowych oraz nadtlenku wodoru (3).

Mleko i produkty mleczne są bogatym źródłem kwasu linolowego, a zwłaszcza jego sprzężonej formy (CLA) syntetyzowanej z udziałem bakterii w krowim żwaczu. Wyniki badań wskazują na jego prozdrowotne właściwości (4). CLA to grupa pozycyjnych i geometrycznych izomerów kwasu linolowego, w którym wiązanie

*) Badania finansowe z Działalności Statutowej DS 3245/KHB/13

podwójne oddzielone jest pojedynczym wiązaniem nasyconym. Wiązania podwójne występują między pozycjami 6–8 i 12–14. W sumie może występować 28 izomerów kwasu linolowego (5).

Ponadto, twarogi są uboższe od serów dojrzewających w związki wapnia, z powodu ich odczepienia od białka w czasie kwaszenia pod wpływem kwasu mlekowego. W serach podpuszczkowych cała kazeina występująca w formie kazeinianu wapnia przechodzi w parakazeinian wapnia, zatrzymując w ten sposób cały wapń w serze. Twarogi zawierają również mniejszą ilość tłuszczu, fosforu, magnezu i cynku (1).

Celem badań było określenie pojemności przeciwutleniającej frakcji wodnej i metanolowej oraz profilu kwasów tłuszczowych serów twarogowych i podpuszczkowych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły sery twarogowe: „Smakosz z ziołami”, „Hajnowka 4%”, „Limanowski 7%” i „Skała 9%” i podpuszczkowe: „Tylżycki Nowy Targ”, „Edamski Limanowa”, „Gouda Mońki”, „Edamski Hajnowka” i „Gouda Limanowa, zakupione w okresie jesennym.

Ekstrakcję lipidów przeprowadzono zgodnie z metodą przedstawioną przez *Folch'a* i współpr. (6) z modyfikacjami. Próbkę sera była homogenizowana z 17-krotnie większą ilością mieszaniny chloroformu i metanolu (v/v 2:1). Estryfikację i oznaczenie zawartości kwasów tłuszczowych wykonano zgodnie z metodą zaproponowaną przez *de Man* (7).

Kwasy tłuszczowe analizowano za pomocą chromatografu gazowego Trace GC Ultra (Thermo Electron Corp., Waltham, USA) wyposażonego w kolumnę Supelcowax 10 (o wymiarach 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Jako gaz nośny zastosowano hel 5.0 (Linde Gaz Polska sp. z o.o., Kraków, Polska). Szybkość przepływu gazu wynosiła 1 cm³/min. Dozownik i detektor miały temp. odpowiednio 220°C i 250°C. Temperaturę kolumny utrzymywano na poziomie 60°C przez 3 min, następnie podnoszono w tempie 7°C/min do 200°C pozostawiano w tej temp. przez 20 min. Kwasy tłuszczowe identyfikowano przez porównanie ze standardami estrów metylowych: „Linoleic acid, conjugated methyl esters” (Sigma) – dla CLA oraz „Supelco 37 Component FAME Mix” (Sigma) – dla pozostałych kwasów tłuszczowych.

Oznaczenie pojemności przeciwutleniającej za pomocą metody TEAC z rodniem ABTS polegało na spektrofotometrycznym pomiarze wygaszenia rodników ABTS przez przeciwutleniacze zawarte w próbce, przy długości fali 734 nm (8).

Pojemność przeciwutleniającą oznaczono w dwóch frakcjach: wodnej i metanolowej. Wynik wyrażono w μM TE (Trolox Equivalent)/g m.m. produktu.

Analiza statystyczna Analizę statystyczną przeprowadzono w programie STATISTICA 10. Do porównania pojemności przeciwutleniającej między frakcjami: wodną i metanolową użyto testu T dla par skorelowanych przy $p < 0,05$ i $0,01$. Do porównania zawartości kwasów tłuszczowych wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji i test post-hoc Tukey'a przy $p < 0,05$; $0,01$ i $0,001$. Wykresy sporządzono w arkuszu kalkulacyjnym Excel.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Różnice w procentowej zawartości kwasów tłuszczowych przedstawiono w tab. I. Najwyższe statystycznie różnice między twarogami i serami dojrzewającymi ($p < 0,001$) stwierdzono dla następujących rodzin kwasów tłuszczowych: nasycone, nienasycone, jedno i wielonienasycone oraz kwasów z rodziny n-3. Wysoce istotnie różnice ($p < 0,01$) odnotowano dla stosunku kwasów z rodzin n-3 do n-6. Nie stwierdzono natomiast istotnie statystycznych różnic w przypadku: kwasów z rodziny n-6, długo i krótkołańcuchowych.

Tab e l a I. Rodziny kwasów tłuszczowych serów podpuszczkowych i twarogów oraz poziom istotności między nimi

Tab l e I. Fatty acid families of rennet and curd cheeses and level of significance

Kwasy tłuszczowe	Twarogi	Dojrzewające	p
Nasycone	73,91 ± 0,80	69,14 ± 1,37	***
Nienasycone	25,64 ± 0,76	29,90 ± 1,15	***
Jednonienasycone MUFA	23,72 ± 0,70	27,57 ± 0,89	***
Wielonienasycone PUFA	1,92 ± 0,06	2,33 ± 0,27	***
n3	0,40 ± 0,11	0,71 ± 0,19	***
n6	1,52 ± 0,11	1,62 ± 0,09	ns
n3/n6	0,27 ± 0,09	0,43 ± 0,10	**
n6/n3	4,16 ± 1,28	2,42 ± 0,59	**
Krótkołańcuchowe SCFA	10,15 ± 0,81	10,47 ± 0,37	ns
Długołańcuchowe LCFA	89,81 ± 0,80	89,47 ± 0,36	ns

* przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$;

ns – brak statystycznie istotnych różnic

Między twarogami, a serami podpuszczkowymi wykazano statystycznie wysoce istotne różnice ($p < 0,001$) w przypadku kwasów: mirystynowego, palmitynowego, palmitooleinowego, stearynowego, oleinowego, wakcenenowego, α -linolenowego (ALA) i CLA. Istotne różnice ($p < 0,01$) dotyczyły kwasów: masłowego, oleomirystynowego, γ -linolenowego (GLA), arachidowego i gadoleinowego. Istotnie statystycznie różnice na poziomie $p < 0,05$ notowano dla kwasów laurynowego i *cis*-7 heksadekanowego. Dla pozostałych kwasów tłuszczowych nie wykazano istotnie statystycznych różnic między twarogami i serami dojrzewającymi.

Sery twarogowe posiadały większy udział kwasów tłuszczowych nasyconych (73,91±0,80%), w porównaniu z serami podpuszczkowymi (69,14±1,37%). Największy udział w tej grupie stanowił kwas palmitynowy (C16:0) (37,31±0,86%). Największą zawartością kwasów nasyconych spośród poszczególnych serów twarogowych odznaczał się Skała (9%), który zawierał 38,13±0,27%, a najmniejszą Hajnówka (4%) – 36,02±0,02%.

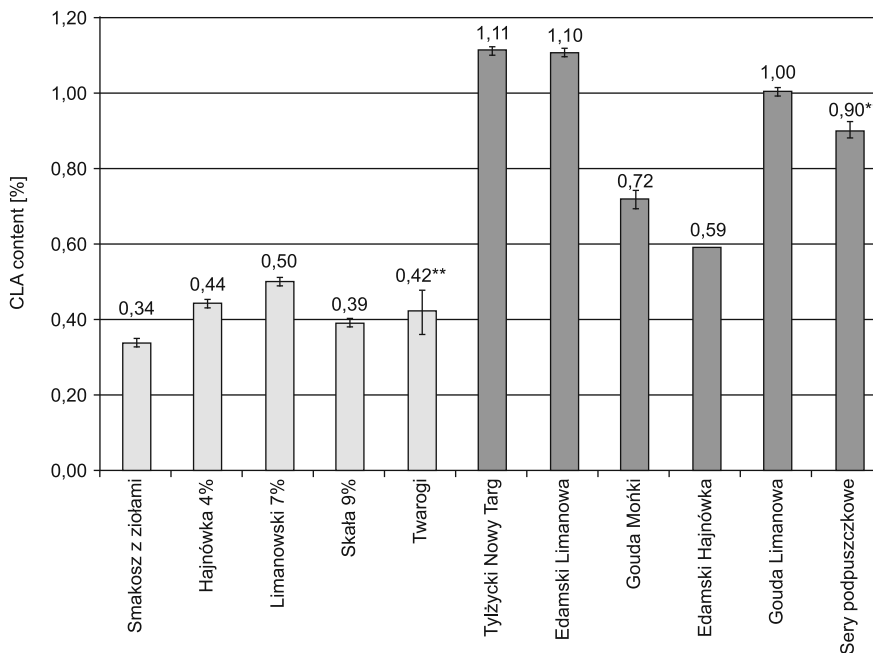
Sery podpuszczkowe zawierały więcej kwasów tłuszczowych nienasyconych (29,90±1,15%), w porównaniu z twarogami (25,64±0,76%). Dominującym kwasem w grupie serów podpuszczkowych był kwas oleinowy (C18:1 n-9), którego najwyższy poziom zanotowano w serze Tylżyckim z Nowego Targu (21,39±0,07%), a najniższy

dla Goudy z Moniek ($20,12 \pm 0,31\%$). Sery twarogowe zawierały średnio o $3,02\%$ mniej tego kwasu.

Jak wykazali *Prandini* i współpracownicy (9) zawartość kwasów tłuszczowych w serach podpuszczkowych uzależniona jest też od gatunku zwierzęcia, z którego pozyskano mleko do przerobu. Zawartość kwasu wakcenenowego (*trans* 11-18:1) dla sera koziego wynosiła $0,92\%$, krowiego $0,95\%$, a dla owczego $1,70\%$, natomiast zawartość CLA wynosiła: $0,71\%$ dla sera koziego, $1,09\%$ dla owczego i $0,57\%$ dla krowiego. Autorzy niniejszej publikacji badając sery podpuszczkowe otrzymywane z mleka krowiego wykazali $2,94 \pm 0,65\%$ udział kwasu wakcenenowego oraz $0,90 \pm 0,22\%$ CLA. W twarogach zawartość kwasu wakcenenowego wynosiła $1,59 \pm 0,14\%$ ($p < 0,001$), a CLA była równa $0,42 \pm 0,06\%$. Jak podają *Bonanno* i współpracownicy (10) statystycznie istotne różnice notowane są dla kwasów: stearynowego, CLA i ALA (α -linolenowego) w zależności od systemu wypasu krów, a odnośnie czasu dojrzewania sera tylko w odniesieniu do zmian w zawartości kwasu palmitynowego.

W prezentowanych badaniach stosunek kwasów n-6/n-3 wyniósł $2,42:1$. Podobną wartość ($2,25:1$) dla serów dojrzewających przez 354 dni otrzymali *Marrone* i współpracownicy (11). Odnotowali oni jednak znacznie mniejszy udział kwasów nasyconych ($51,3\%$), jednonienasyconych ($19,8\%$) i CLA ($0,52\%$), a większy poziom zanolali dla kwasów wielonienasyconych ($4,30\%$).

Na uwagę zasługuje również fakt większego udziału CLA w serach dojrzewających ($0,90 \pm 0,22\%$) w porównaniu z twarogami ($0,42 \pm 0,06\%$) (ryc. 1). Największy



** przy $p < 0,01$

Ryc. 1. Zawartość kwasu CLA w serach twarogowych i podpuszczkowych.

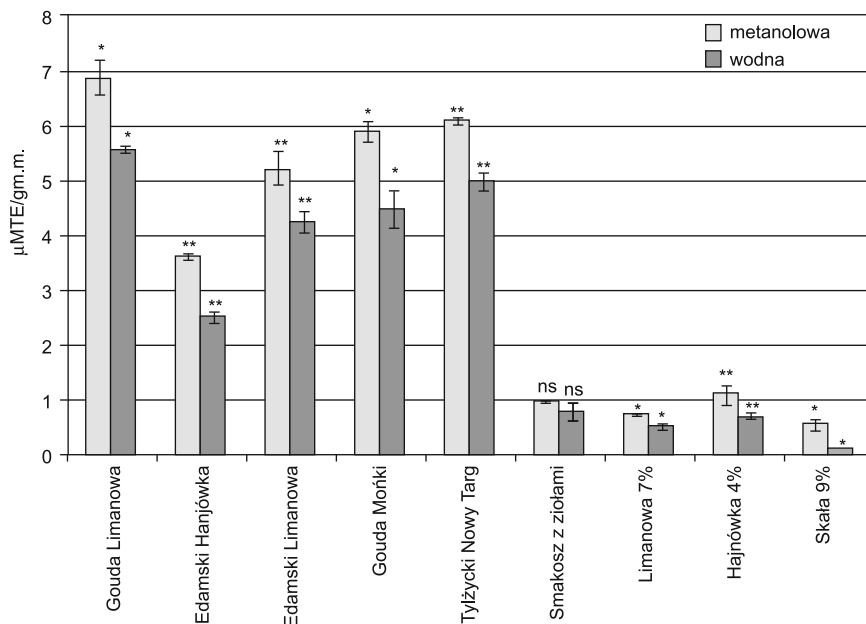
Fig. 1. CLA content of curd and rennet cheeses.

udział tego kwasu zanotowano w serze „Tylżyckim z Nowego Targu” ($1,11 \pm 0,01\%$), a najmniejszy w twarogu „Smakosz z ziołami” ($0,34 \pm 0,01\%$).

W badaniach *Domagały* i współprac. (5) wykazano zróżnicowany udział izomeru kwasu linolowego w serach dojrzewających. Najwyższą wartość oznaczono w serze Rokpol (1,31%), a najniższą w Parmezanie (0,44%). Wartość średnia dla sera Gouda wynosiła 1,20%.

Rutkowska i współprac. (12) oceniali zawartość kwasów tłuszczowych w serach dojrzewających. W serze Gouda stwierdzili wyższą zawartość kwasów jednonienasyconych (30,0–32,8%). Autorzy odnotowali jednak duże rozbieżności w zawartości poszczególnych grup kwasów tłuszczowych, jak i konkretnych kwasów tłuszczowych w zależności od pory roku kiedy je wytwarzano. Najwyższą zawartość CLA stwierdzono w produktach pochodzących z sierpnia (1,3%), a najniższą z miesięcy zimowych (styczeń, luty) – 0,3%. Wyniki własnych badań serów Gouda z Mońki i Limanowej wskazują na wyższą zawartość tego kwasu, odpowiednio 0,72% i 1,00%. Autorzy wyjaśniają, że wyższy poziom CLA w serach z okresu letniego spowodowany był pobieraniem przez zwierzęta świeżych traw, bardzo bogatych w kwas linolowy i α -linolenowy.

Wyniki pojemności przeciwutleniającej serów dojrzewających i twarogów przedstawiono na ryc. 2. W ekstraktach metanolowych serów podpuszczkowych najwyż-



* przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; ns – brak statystycznie istotnych różnic.

Ryc. 2. Pojemność przeciwutleniająca ($\mu\text{M TE/g m.m.}$) dla ekstraktów wodnych i metanolowych serów twarogowych i podpuszczkowych.

Fig. 2. Antioxidant capacity ($\mu\text{M TE/g wet.wt}$) for water and methanol extracts of curd and rennet cheese.

szą pojemnością odznaczał się ser Gouda z Limanowej (6,88 $\mu\text{M TE/g m.m.}$), a najniższą Edamski z Hajnówki (3,6 $\mu\text{M TE/g m.m.}$). Wśród ekstraktów metanolowych serów twarogowych Hajnówka 4% posiadał najwyższą wartość równą 1,12 $\mu\text{M TE/g m.m.}$, a najniższą Skała 9% 0,52 $\mu\text{M TE/g m.m.}$

Ekstrakty wodne odznaczały się w znacznej częstotliwości istotnie statystycznie niższymi wartościami. Najwyższą wartość odnotowano dla sera Gouda z Limanowej (5,56 $\mu\text{M TE/g m.m.}$), a najniższą dla twarogu Skała 9% (0,1 $\mu\text{M TE/g m.m.}$).

Wyższa pojemność przeciwutleniająca serów podpuszczkowych ekstrahowanych metanolem spowodowana jest zapewne występowaniem w nich większej ilości izomerów CLA, które cechuje stukrotnie większa aktywność przeciwutleniająca w porównaniu z wit. E. Oddziaływanie tego izomeru na organizm człowieka przejawia się również w hamowaniu rozwoju komórek nowotworowych, opóźnianiu powstawania zmian miażdżycowych i redukcji tkanki tłuszczowej (13).

Meister-Meira i współpr. (14) w swoich badaniach zaobserwowali wyższą efektywność w wiązaniu wolnych rodników w przypadku serów z większą zawartością białek rozpuszczalnych w wodzie (WSE; water soluble extract). Wykazali ponadto statystycznie istotne korelacje pomiędzy proteolizą a aktywnością wygaszania rodnika ABTS (r^2 od 0,93 do 0,98). Wykorzystując również test DPPH do oceny pojemności przeciwutleniającej, tylko w przypadku sera Roquefort wykazali statystycznie istotne różnice między próbką badaną, a kontrolną. W związku z tym autorzy uznali, że metoda z ABTS jest bardziej czuła i odpowiednia do oznaczania pojemności przeciwutleniającej wodnych roztworów białek.

Pomimo że mleko zawiera nieduże ilości antyoksydantów, to jednak dzięki możliwości tworzenia kompleksów zachodzi wzajemna ich regeneracja (np. α -tokoferol regeneruje β -karoten) (13). Jak podają *Franczyk-Żarów* i współpr. (15) liczne badania dowiodły inhibicji autooksydacji lipidów przez kazeinę i białka serwatkowe.

Ponadto wg *Flaczyk* i współpr. (1) zawartość witaminy A dla twarogów mieści się w granicach 5–83 $\mu\text{g}/100$ g produktu a dla serów podpuszczkowych 135–382 $\mu\text{g}/100$ g. Różnice występują również w zawartości witaminy E (0,01–0,17 mg/100 g w porównaniu do 0,38–0,70 mg/100 g) oraz witaminy B₁₂ (0,70–0,90 $\mu\text{g}/100$ g do 1,10–2,10 $\mu\text{g}/100$ g) i D. Witaminy A, D i E są rozpuszczalne w tłuszczach, w które bogatsze są sery dojrzewające.

Koenzym Q występujący w serach podpuszczkowych (1) również należy do przeciwutleniaczy fazy lipidowej. Ubihydrochinon (zredukowana forma koenzymu Q) wykazuje zdolność zmiatania rodnika LOO^{*} i przyczynia się do regeneracji rodnika α -tokoferylowego (15).

WNIOSKI

1. Spośród kwasów tłuszczowych obecnych w serach podpuszczkowych i dojrzewających największy udział odnotowano dla rodziny kwasów nasyconych.
2. Sery podpuszczkowe zawierały większe ilości jedno i wielonienasyconych, a mniejsze ilości nasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu do twarogów.
3. Sery podpuszczkowe odznaczały się większą zawartością CLA.

4. Sery dojrzewające odznaczały się istotnie wyższym poziomem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w tym kwasów z rodziny n-3, w stosunku do twarogów.
5. Wyższą pojemnością przeciwutleniającą odznaczały się sery dojrzewające.
6. Wyższą pojemnością przeciwutleniającą odznaczał się metanолоwy ekstrakt w porównaniu do wodnego. Powodem tego są prawdopodobnie zawarte w nim witaminy rozpuszczalne w tłuszczach.

A. Ochrem, P. Zapletal, H. Pustkowiak, J. Żychlińska-Buczek

FATTY ACID PROFILE AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF RENNET AND CURD CHEESE

Summary

The aim of the research was to determine the fatty acid content and antioxidant capacity of selected rennet and curd cheeses. Statistically significant differences between curd and rennet cheese were found for the following fatty acid families: saturated, unsaturated, mono and polyunsaturated, and acids from the n-3 family. Rennet cheeses are characterized by a higher proportion of CLA ($0.90 \pm 0.22\%$) compared to curd cheese ($0.42 \pm 0.06\%$). The antioxidant capacity determined by TEAC method with ABTS radical (in methanol extract) was $5.53 \pm 1.15 \mu\text{M TE/g wet wt.}$ for rennet cheese and $0.94 \pm 0.02 \mu\text{M TE/g wet wt.}$ for curd cheese. The higher antioxidant capacity is probably due to the higher proportion of CLA in rennet cheese and higher value of fat, in which vitamins A, D, E and K are soluble. Furthermore, studies have shown that a higher antioxidant capacity was determined by extraction of antioxidants from cheese with methanol.

PIŚMIENNICTWO

1. Flaczyk E., Górecka D., Korczak J.: Sery. W: Towaroznawstwo żywności pochodzenia zwierzęcego. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2011; ss. 107-131. – 2. Krauze S.: Ser. W: Zarys nauki o środkach żywności. PZWL, Warszawa 1975; ss. 139-151. – 3. Kullisaar T., Songisepp E., Mikelsaar M., Zilmer K., Vihalemm T., Zilmer M.: Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Br. J. Nutr.*, 2003; 90(2): 449-456. – 4. Song H.J., Grant I., Rotondo D., Mohede I., Sattar N., Heys S.D., Wahle K.W.J.: Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2005; 59(4): 508-517. – 5. Domagala J., Sady M., Grega T., Pustkowiak H., Florkiewicz A.: The influence of cheese type and fat extraction method on the content of conjugated linoleic acid. *J. Food Compos. Anal.*, 2010; 23(3): 238-243. – 6. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 1957; 226(1): 497-509. – 7. de Man, J.M.: Determination of fatty acid composition of milk fat by dual column temperature programmed gas liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, 1964; 47(5): 546-547. – 8. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 1999; 26(9-10): 1231-1237. – 9. Prandini A., Sigolo S., Piva G.: A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. *J. Food Compos. Anal.*, 2011; 24(1): 55-61. – 10. Bonanno A., Tornambò G., Bellina V., De Pasquale C., Mazza F., Maniaci G., Di Grigoli A.: Effect of farming system and cheesemaking technology on the physicochemical characteristics, fatty acid profile, and sensory properties of Caciocavallo Palermitano cheese. *J. Dairy Sci.*, 2013; 96(1): 710-724.

11. Marrone R., Balestrieri A., Pepe T., Vollano L., Murru N., D'Occhio M.J., Anastasio A.: Physicochemical composition, fatty acid profile and cholesterol content of "Pecorino Carmasciano" cheese, a traditional Italian dairy product. *J. Food Compos. Anal.*, 2014; 36(1,2): 85-89. – 12. Rutkowska J., Sadowska A., Tabaszewska M., Stołyhwo A.: Skład kwasów tłuszczowych serów podpuszczkowych pochodzących z rejonów polski: północnego, wschodniego i centralnego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009;

42(3): 263-269. – 13. *Cichosz G., Ambroziak A., Kowalska M., Aljewicz M.*: Produkty mleczarskie jako źródło antyoksydantów w diecie człowieka. *Przegląd Mleczarski*, 2011; 6: 4-8. – 14. *Meister Meira S. M., Daroit D. J., Helfer V. E., Folmer Corrêa A. P., Segalin J., Carro S., Brandelli A.*: Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Res. Int.*, 2012; 48(1): 322-329. – 15. *Franczyk-Żarów M., Kostogrys R.B., Pisulewski P.*: Naturalne przeciwutleniacze występujące w żywności. W: *Przeciwutleniacze w żywności*. Red. W. Grajka. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007; ss. 141-235.

Adres: 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 24/28