

Grażyna Pokorska-Lis, Andrzej Tokarz, Katarzyna Florczykiewicz

WPŁYW TERMOOKSYDACYJNYCH ZMIAN NA PROCES TRAWIENIA *IN VITRO* OLEJU RZEPAKOWEGO I FRYTURY „PAN MAX” W OBECNOŚCI RESWERATROLU I AZOTANÓW

Katedra i Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. nadzw. dr hab. *A. Tokarz*

Podjęto próbę analizy interakcji zachodzących między składnikami odżywczymi – olejami, substancjami obcymi – azotanami oraz bioflawonoidami: resweratrolem w etapie trawienia tłuszczów świeżych oraz poddanych procesom termicznym.

Hasła kluczowe: azotany, resweratrol, olej rzepakowy, frytura PAN MAX, dializa.
Key words: nitrate, resveratrol, rapeseed oil, PAN MAX oil, dialysis.

Tłuszcze spożywane w codziennej zróżnicowanej diecie są najbardziej skoncentrowanym źródłem energii, witamin A, D, E, K oraz wielonienasyconych niezbędnych kwasów tłuszczowych. Kwasy tłuszczowe są budulcem błon i organelli komórkowych, wpływając tym samym na ich przepuszczalność dla substancji odżywczych dostarczanych do komórek organizmu. Warto zaznaczyć, że kwasy tłuszczowe są również ważnym substratem dla syntezy substancji biologicznie czynnych takich, jak eikozanoidy. Jako źródło energii wykorzystywane są przez wszystkie komórki organizmu z wyjątkiem komórek mózgu i czerwonych krwinek, dla których rolę tę spełnia glukoza (1).

Na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań dotyczących składników odżywczych i azotanów(V) i azotanów(III) stwierdzono ich negatywne oddziaływanie na trawienie tłuszczów (2, 3). Może wpływać to niekorzystnie na gospodarkę lipidową organizmu. Jednocześnie, znanych jest wiele prozdrowotnych działań bioflawonoidów a zwłaszcza ich antyoksydacyjnych efektów. Aby wyjaśnić czy azotany, które spożywane w codziennej diecie stanowią potencjalne ryzyko zaburzenia trawienia tłuszczów oraz w jakim stopniu obecność bioflawonoidów może korzystnie wpływać na ten proces, przeprowadzono złożony eksperyment.

Celem pracy było zbadanie zależności między azotanami(V) i azotanami(III) a bioflawonoidami, na przykładzie resweratrolu, w procesie enzymatycznego trawienia *in vitro* wybranych tłuszczów śledząc efektywność uwalniania się kwasów tłuszczowych w tych warunkach. Ponadto, analizowano zmiany zachodzące w olejach będące następstwem działania wysokich temperatur (obróbka kulinarna) w różnych przedziałach czasowych.

Podczas badań dokonano oceny:

– zawartości kwasów tłuszczowych w badanych produktach tłuszczowych (oleju rzepakowym i fryturze „Pan Max”) świeżych i ogrzewanych;

- parametrów zmian zachodzących podczas ogrzewania w/w. tłuszczów w różnych przedziałach czasowych;
- stopnia hydrolizy triacylogliceroli badanych olejów podczas trawienia enzymatycznego w obecności bioflawonoidu – resweratrolu i azotanów;
- stopnia dializy azotanów z badanych układów oraz wpływu resweratrolu na ten proces.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowił olej rzepakowy (olej Kujawski) naturalny, uzyskany z pierwszego tłoczenia nasion rzepaku *Brassica napus* v. *oleifera* *Cruciferae*, z ponad 50% przewagą kwasu oleinowego, o temp. dymienia 238°C oraz frytura „Pan Max” rafinowany tłuszcz płynny z naturalnym osadem, wyprodukowany na bazie oleju rzepakowego, bez zapachu, przeznaczony do wielokrotnego głębokiego smażenia m.in. wyrobów cukierniczych, mięs, ryb, frytek o temp. dymienia > 320°C.

Badano oleje świeże i ogrzewane przez 10 min, 2 godz. oraz przez 5 dni, w temp. 180–200°C. Oznaczano w nich wolne kwasy tłuszczowe powstałe w wyniku enzymatycznej hydrolizy olejów spożywczych, za pomocą miareczkowania roztworem NaOH o stęż. 0,05 mol/dm³ oraz przeprowadzono dializę wprowadzonych do układów reakcyjnych azotanów(III) i (V) przez błonę półprzepuszczalną. W celu zrealizowania założeń pracy stworzony został model doświadczalny *in vitro*, zawierający badany olej, enzym pankreatynę pozyskiwaną z trzustki, chlorek wapnia (niezbędny do uzyskania pełnej aktywności procesu), żółć wieprzową (celem emulsyfikacji) a optymalne środowisko reakcji zapewniał bufor fosforanowy o pH = 7,4. Do poszczególnych układów dodawano azotany(V) lub (III) bądź resweratrol sam lub z azotanami. Po 2 godz. procesie enzymatycznego trawienia oznaczano powstałe wolne kwasy tłuszczowe, bądź przenoszono układy reakcyjne do worków dializacyjnych i po 1 godz. dializie oznaczano zawartość azotanów.

W badaniach zastosowano średnie stężenia azotanów i resweratrolu spotykane w codziennej diecie: 1000 mg NO₃⁻/dm³ i 12,5 mg NO₂⁻/dm³ oraz resweratrolu – 5 mg/cm³.

Oznaczanie zawartości azotanów(III) i (V) przeprowadzono wg Polskiej Normy PN-92/A-75112 (4).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W codziennej diecie organizmowi dostarczane są mniejsze lub większe ilości różnorodnych substancji obcych oraz naturalnych związków nieodżywczych. Źródłem tych ostatnich, m.in. bioflawonoidów są głównie owoce i warzywa (5, 6). W diecie obecne są także ksenobiotyki – azotany(III) i (V) o działaniu niekorzystnym dla naszego organizmu (7, 8). Ze względu na istotny wpływ tych substancji na stan zdrowia człowieka stały się one przedmiotem prowadzonego eksperymentu.

Do badań zastosowano dwa gatunki olejów, odznaczające się odmiennymi cechami fizykochemicznymi oraz składem procentowym kwasów tłuszczowych zarówno świeżych, jak i po 5-dniowym ogrzewaniu (tab. I).

Tab e l a I. Procentowa zawartość kwasów tłuszczowych w olejach świeżych i ogrzewanych przez 5 dni

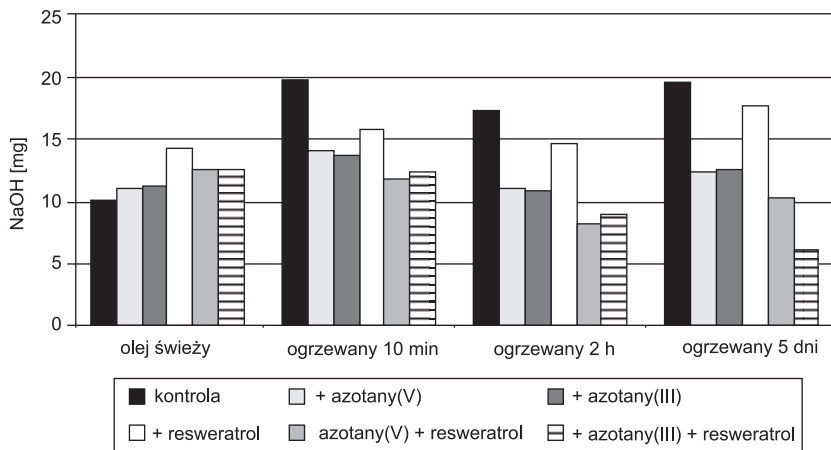
Table I. Percentage content of fatty acids in oil, fresh and heated for 5 days

Kwasy tłuszczowe	Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych			
	olej rzepakowy świeży	olej rzepakowy ogrzewany 5 dni	frytura „Pan Max” świeża	frytura „Pan Max” ogrzewana 5 dni
C _{14:0} kwas mirystynowy	–	0,87	0,16	0,18
C _{16:0} kwas palmitynowy	4,68	6,96	7,12	8,07
C _{18:0} kwas stearynowy	2,36	2,18	3,19	3,54
C _{18:1n 9 c} kwas oleinowy	57,14	61,52	46,96	48,29
C _{18:1n 9 t} kwas elaidynowy	–	0,79	18,71	19,63
C _{18:2n 6 c} kwas linolowy	21,16	13,01	6,63	5,08
C _{18:2n 6 t} kwas linolowy	–	–	1,73	1,8

Na podstawie analizy chromatograficznej w świeżym oleju rzepakowym stwierdzono, że przeważającą ilość kwasów tłuszczowych stanowią: kwas oleinowy (57,14%) oraz linolowy (21,16%) podczas gdy palmitynowy i stearynowy występują w niewielkiej ilości (4,68% i 2,36%). W oleju ogrzewanym przez 5 dni zaobserwowano pojawienie się kwasu elaidynowego w ilości 0,79%. Natomiast frytura „Pan Max” będąca rafinowanym tłuszczem na bazie oleju rzepakowego, w przeważającej ilości zawiera kwas oleinowy (46,96%). Stwierdzono również obecność (18,71%) izomerów *trans* kwasu oleinowego w badanej fryturze, których ilość wzrasta podczas procesów ogrzewania (19,63%). Kwas stearynowy i palmitynowy, podobnie jak w oleju rzepakowym, występują w mniejszych ilościach (7,12% i 3,19%). Zaletą frytury „Pan Max” jest brak zapachu i efektu dymienia w temp. powyżej 320°C. Produkt ten, przeznaczony jest do tzw. głębokiego smażenia m.in. wyrobów cukierniczych, mięs, ryb i frytek. Jednak ze względu na obecność izomerów *trans* i udokumentowane ich niekorzystne działanie budzi szereg zastrzeżeń (1, 9, 10). Dlatego też godną polecenia jest frytura palmowa (11).

Pierwszy etap eksperymentu obejmował badanie biodostępności kwasów tłuszczowych uwalnianych w procesie enzymatycznego trawienia olejów, uprzednio poddanych ogrzewaniu w różnych przedziałach czasowych w obecności resweratrolu oraz azotanów(III) i (V). Interpretację graficzną wyników oznaczeń końcowych produktów enzymatycznej hydrolizy oleju rzepakowego i frytury „Pan Max”, wolnych kwasów tłuszczowych, przedstawiono kolejno na ryc. 1 i 2.

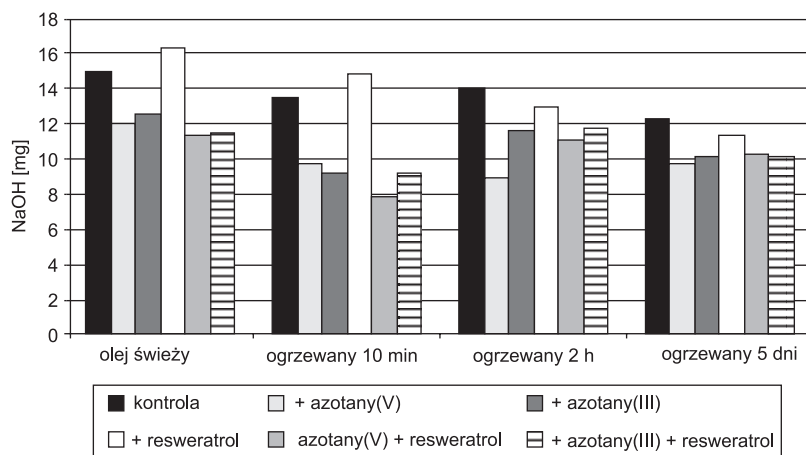
Liczba wolnych kwasów tłuszczowych uwalnianych w procesie enzymatycznej hydrolizy oleju rzepakowego jest różna i zależy od czasu ogrzewania. Należy zatem stwierdzić, że zawartość ich zmniejsza się z wydłużaniem czasu ogrzewania oleju, chociaż krótkotrwałe ogrzewanie (10 min) może ułatwiać proces trawienia (ryc. 1). Największe zmiany wystąpiły w układach z udziałem azotanów i resweratrolu osobno bądź razem. Przy czym największą aktywność hydrolityczną wykazywał sam resweratrol, chociaż wolne kwasy tłuszczowe w układach z udziałem ogrzewanych tłuszczów są poniżej zawartości w próbach kontrolnych (ryc. 1).



Ryc. 1. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych uwalnianych w procesie enzymatycznego trawienia oleju rzepakowego ogrzewanego w różnych przedziałach czasowych i układach reakcyjnych.

Fig. 1. Content of free fatty acids released during enzymatic digestion of rapeseed oil heated for different time periods in different reactive systems.

Nieco inaczej przebiega proces trawienia frytury „Pan Max”. Jest on bardziej dynamiczny i otrzymane wyniki wskazują na niższą biodostępność wolnych kwasów tłuszczowych w porównaniu z olejem rzepakowym. Proces krótkiego ogrzewania frytury spowodował największe zmiany ilościowe w procesie trawienia. Długotrwałe ogrzewanie daje efekt hydrolityczny podobny do trawienia frytury świeżej. Natomiast zauważalny jest wpływ obecności resweratrolu na końcową ilość wolnych

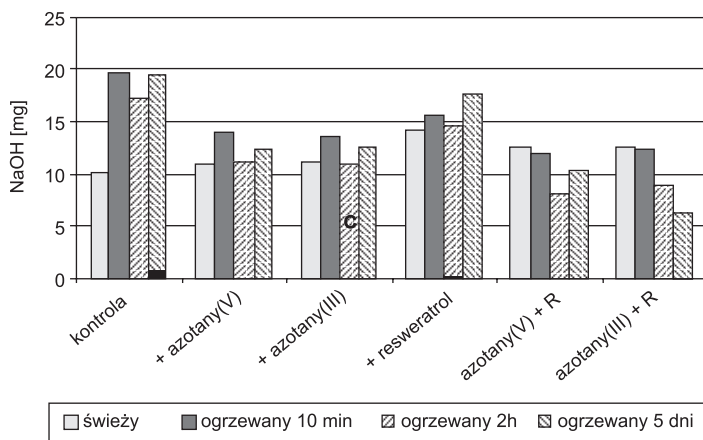


Ryc. 2. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych uwalnianych w procesie enzymatycznego trawienia frytury „Pan Max” ogrzewaney w różnych przedziałach czasowych i układach reakcyjnych.

Fig. 2. Content of free fatty acids released during enzymatic digestion of “Pan Max” oil heated for different time periods in reactive systems.

kwasów tłuszczowych. Najsilniejszy efekt wystąpił podczas trawienia frytury świeżej oraz ogrzewanej 10 min (ryc. 2).

Zmiany w biodostępności kwasów tłuszczowych będące następstwem ich ilości uwolnionych w procesie trawienia oleju rzepakowego w obecności azotanów(III) i (V) oraz resweratrolu przedstawiono na ryc. 3.



Ryc. 3. Biodostępność kwasów tłuszczowych uwolnionych w procesie enzymatycznego trawienia oleju rzepakowego w obecności azotanów oraz resweratrolu.

Fig. 3. Bioavailability of fatty acids released during rapeseed oil enzymatic digestion in the presence of nitrates and resveratrol.

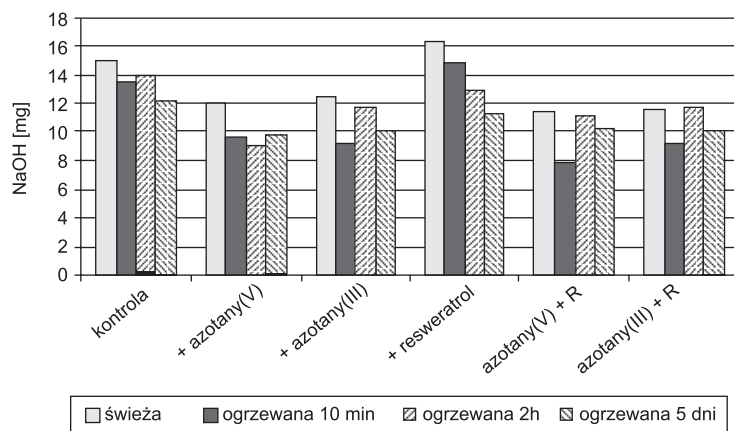
Wyniki wskazują na inhibujący, niewielki wpływ azotanów(III) i (V) na ilość wolnych kwasów tłuszczowych uwalnianych w procesie trawienia tłuszczów poddanych uprzednio ogrzewaniu w różnych warunkach temperaturowych. Niemniej potwierdza się kierunek zmian świadczący o zmniejszającej się biodostępności kwasów wraz ze wzrastającym okresem ogrzewania tłuszczów.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że resweratrol słabiej hamuje proces trawienia tłuszczu w porównaniu z azotanami. Przy czym jego aktywność wobec tłuszczu dłużej ogrzewanego wyraźnie podwyższa się. Podany jednak łącznie z azotanami(III) i (V) znacząco osłabia proces trawienia oleju rzepakowego zwłaszcza dłużej ogrzewanego.

Proces ten w przypadku frytury „Pan Max” przebiega z pewnym podobieństwem, aczkolwiek zmiany są mniej charakterystyczne, co może świadczyć o mniejszej podatności tego oleju na substancje towarzyszące procesom trawienia – ryc. 4.

Otrzymane wyniki wskazują na niższą biodostępność kwasów tłuszczowych frytury w porównaniu z olejem rzepakowym. Jest to zjawisko korzystne biorąc pod uwagę aspekty zdrowotne. W przypadku azotanów(III) i (V) podobnie, jak w oleju rzepakowym, nie stwierdzono znaczącej różnicy między nimi w zakresie wpływu na proces trawienia tłuszczów, jakkolwiek w porównaniu z grupą kontrolną wykazują pewną zdolność hamowania trawienia.

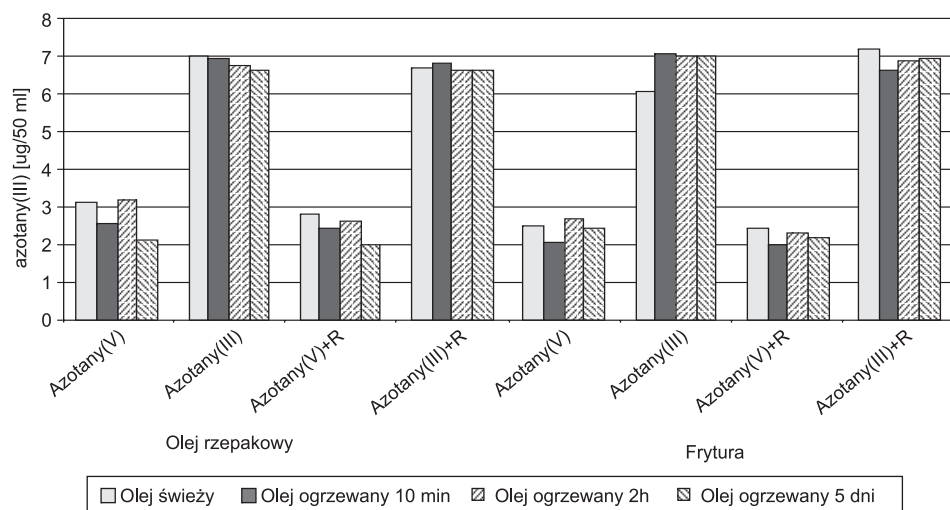
Eksperyment potwierdził natomiast, informacje dotyczące działania bioflawonoidu (resweratrolu), obecnego w znacznej ilości w takich produktach, jak czerwono-



Ryc. 4. Biodostępność kwasów tłuszczowych uwolnionych w procesie enzymatycznego trawienia frytury „Pan Max” w obecności azotanów oraz resweratrolu.

Fig. 4. Bioavailability of fatty acids released during “PAN MAX” oil enzymatic digestion in the presence of nitrates and resveratrol.

ne wino i winogrona (12, 13). W układach zawierających dodatek tej substancji, w ilości odpowiadającej przeciętnemu spożyciu w diecie europejskiej, wpływał on korzystnie na procesy trawienne tłuszczów. Badania przeprowadzone z udziałem frytury „Pan Max” potwierdzają wyniki uzyskane dla oleju rzepakowego. Resweratrol w tym przypadku również wyraźnie stymulował proces trawienia tłuszczów.



Ryc. 5. Zawartość azotanów(III) oraz azotanów(V) po redukcji w dializatach z olejem rzepakowym i fryturą Pan Max.

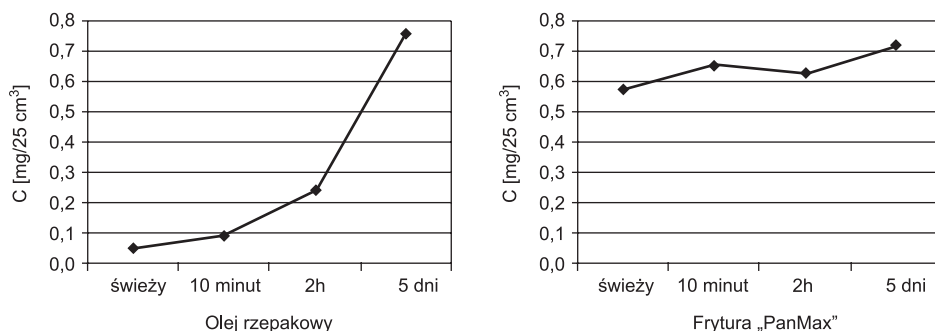
Fig. 5. Amounts of nitrates(III) and nitrates(V) after reduction in dialysates with rapeseed and “Pan Max” oil.

Badania przeprowadzone z udziałem frytury „Pan Max” potwierdziły także aktywność oksydoredukcyjną resweratrolu, przejawiającą się w neutralizowaniu efektów działania azotanów(III) i (V) na proces trawienia tłuszczów.

Drugim etapem eksperymentu była dializa azotanów. Procesowi temu zostały poddane układy zawierające dodatek azotanów(V)/azotanów(III) oraz azotanów(V)/azotanów(III) z resweratrole. Badano stopień przechodzenia tych ksenobiotyków przez tofianową błonę półprzepuszczalną do buforu fosforanowego. Wyniki uzyskane dla oleju rzepakowego i frytury przedstawiono na ryc. 5.

Należy stwierdzić, że azotany(III) znacznie łatwiej przekraczają granicę błony półprzepuszczalną niż azotany(V). W aspekcie zdrowotnym jest to zjawisko niekorzystne, gdyż zgodnie z danymi literaturowymi azotany(III) są bardziej toksyczne od azotanów(V) (8). Czas ogrzewania olejów obecnych w badanych układach wydaje się nie mieć wpływu na intensywność tego procesu. Na podstawie analizy otrzymanych wyników można stwierdzić, że obecność resweratrolu nie wpływa znacząco na proces dializy azotanów(V) i azotanów(III) przez błonę półprzepuszczalną.

W celu potwierdzenia zmian zachodzących podczas ogrzewania tłuszczów, przeprowadzono oznaczanie sprzężonych dienów, które wykazują zwiększoną absorpcję przy dł. fali $\lambda = 243 \text{ nm}$ (ryc. 6).



Ryc. 6. Zawartość sprzężonych dienów w świeżych i ogrzewanych tłuszczach.

Fig. 6. Content of conjugated dienes in fresh and heated fats.

Należy stwierdzić, że w miarę wydłużania czasu ogrzewania oleju rzepakowego, ilość dienów wzrasta. Świadczy to o zachodzących zmianach oksydoredukcyjnych nawet podczas krótkotrwałej obróbki termicznej. W przypadku frytury, już w oleju świeżym stwierdzono obecność sprzężonych dienów.

Obecność sprzężonych wiązań dienowych w świeżej fryturze można wyjaśnić sposobem jej wytwarzania. Frytura „Pan Max” uzyskiwana jest bowiem na drodze utwardzania oleju rzepakowego. W trakcie tego procesu może dochodzić do powstawania form dienowych. Ich liczba w miarę wydłużania czasu ogrzewania tłuszczu rośnie. Należy zauważyć, że zawartość sprzężonych wiązań wzrasta z niewielką wydajnością w miarę przedłużającego się czasu ogrzewania (od 0,58 mg w produkcie świeżym do 0,72 mg w oleju ogrzewanym przez 5 dni) w odróżnieniu od procesu zachodzącego w oleju rzepakowym, gdzie wzrost ten jest bardzo dynamiczny. W oleju świeżym stwierdza się dieny w ilości 0,05 mg, a w próbkach ogrzewanych 5 dni 0,76 mg.

W badanych próbkach olejów oznaczono ponadto liczbę nadtlennkową (*L. Lea*). W oleju rzepakowym ogrzewanym 10 min i 2 godz. liczba *Lea* przekraczała dopuszczalną wartość – 3. Liczba nadtlennków ulegała zmniejszeniu w oleju rzepakowym ogrzewanym 5 dni, co spowodowane jest ich rozkładem i tworzeniem się nowych wtórnych produktów. Inna zależność występuje we fryturze. Liczba *Lea* rośnie do wartości 4,3 po 10 min ogrzewaniu. Po 2. godz. ogrzewania liczba nadtlennków spada (2,65), a następnie znowu wzrasta (5,75) w oleju ogrzewanym przez 5 dni. Obecność relatywnie niedużej ilości form nadtlennkowych we fryturze dłużej ogrzewanej świadczy o wysokiej oporności tłuszczu na procesy oksydacyjne i może wynikać z charakterystyki fizykochemicznej produktu.

Ponadto, wykonano próby na obecność aldehydu epihydrynowego w badanych olejach, poddanych obróbce termicznej. Proces jęlczenia aldehydowego rozpoczął się już w świeżym oleju rzepakowym. Spowodowane jest to znaczną obecnością w nim jednonienasyconego kwasu oleinowego, który jest wrażliwy na procesy utleniania. We fryturze świeżej nie stwierdzono obecności aldehydu epihydrynowego.

WNIOSKI

1. Stwierdzono niewielki inhibujący wpływ azotanów(III) i (V) na biodostępność kwasów tłuszczowych w procesie enzymatycznego trawienia badanych olejów.
2. Resweratrol stymuluje proces trawienia tłuszczów. Skuteczność jego działania zależy od stopnia zmian, jakie wystąpiły w ogrzewanym tłuszczu.
3. Dializa NO_2^- przez błonę półprzepuszczalną zachodzi z większą wydajnością niż NO_3^- . Na proces biernego transportu NO_2^- i NO_3^- nie mają wpływu na zmienione jakościowo tłuszcze w wyniku ich ogrzewania i obecności w układzie resweratrolu.
4. W obu produktach stwierdzono zmiany procentowej zawartości kwasów tłuszczowych oraz powstawanie produktów świadczących o zachodzącym procesie utleniania (min. sprzężonych dienów) pod wpływem ich ogrzewania.
5. Niepokojącym jest fakt obecności izomerów *trans* w badanej fryturze.

G. Pokorska-Lis, A. Tokarz, K. Florczykiewicz

THE INFLUENCE OF THERMOOXIDATIVE CHANGES ON *IN VITRO* DIGESTION OF RAPESEED OIL AND "PAN MAX" OIL IN THE PRESENCE OF RESVERATROL AND NITRATES

Summary

The aim of this study was to analyse interactions occurring during consumable fats digestion: rapeseed oil and "Pan Max" oil (rectified rapeseed oil) in the presence of resveratrol and nitrates (III) and (V). Fresh oils as well as heated at 180-200°C for 10 minutes, 2 hours and 5 days, respectively, were analysed. *In vitro* model was used, in which enzymatic hydrolysis of triacylglycerols in the presence of resveratrol and nitrates (III) and (V) as well as dialysis of nitrates (III) and (V) to external compartment (buffer solution) were both possible. The study revealed that enzymatic hydrolysis effectiveness is increased by resveratrol and decreased by nitrates (III) and (V). Digestion of fats heated to high temperatures leads to decreased effectiveness of this process. No significant correlation between content of studied systems nor duration of oil heating and the amount of nitrates (III) and (V) in the dialysate was observed. Presence of *trans* isomers in studied "Pan Max" oil (both fresh and long heated) is alarming.

PIŚMIENICTWO

1. Ziemiański Ś.: Tłuszcze w żywieniu człowieka. Żywnienie człowieka i metabolizm, 1997; 24(2): 35-36,45-46. – 2. Woźniak J., Pokorska-Lis G., Olędzka R.: Azotany i azotyny w procesie trawienia tłuszczów i węglowodanów. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1995; 28(1): 5-10. – 3. Woźniak J., Pokorska-Lis G., Olędzka R., Wilińska A.: Oddziaływanie azotanów i azotynów z substratami enzymatycznego trawienia oleju sojowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1997; 30(2): 113-117. – 4. Polski Komitet Normalizacji, Miar i Jakości, PN-92/A-75112: Owoce, warzywa i ich przetwory. Oznaczanie zawartości azotynów i azotanów. – 5. Olędzka R.: Flawonoidy w żywności i ich zdrowotne znaczenie. *Roczniki Warszawskiej Szkoły Zdrowia*, 2005; 5(1): 58-63. – 6. Kowalczyk E., Fijałkowski P., Błaszczuk-Suszyńska J., Błaszczuk J., Popińska M., Andrykowski G., Kopff A., Kopff M., Rapacka E.: Porównanie antyoksydacyjnego wpływu resweratrolu i antocjanin na peroksydację lipidów w tkankach zwierząt doświadczalnych. *Żywnienie człowieka i metabolizm*, 2007; 34(3/4): 1285-1287. – 7. Szponar L., Mielezko T., Kierzkowska E.: Azotany i azotyny w pożywieniu a stan zdrowia. *Polski Tygodnik Lekarski*, 1981; 36(33): 1279-1282. – 8. Majchrzak D.: Wpływ azotanów i azotynów na organizm ludzi i zwierząt. *Żywnienie człowieka i metabolizm*, 1985; 12(4): 298-302. – 9. Tokarz A.: Współczesne poglądy na rolę żywieniową tłuszczów. *Farmacja Polska*, 1994; 60(9): 382-388. – 10. Ziemiański Ś., Socha P.: Normy i zalecenia dotyczące spożycia tłuszczów ze szczególnym uwzględnieniem dzieci oraz kobiet ciężarnych i karmiących. *Pediatría współczesna. Gastroenterologia, hepatologia i żywienie dziecka*, 1999; 2(3): 140-141, 143-145.
11. Tokarz A., Pokorska-Lis G., Gawkowska K.: Wpływ azotanów i resweratrolu na procesy trawienne *in vitro* oleju słonecznikowego i frytury palmowej poddanych procesom termo oksydacyjnym. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009; 42(3): 525-531. – 12. Grajek W.: Przeciwtleniacze w żywności – aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007; 150-151, 157, 262-268. – 13. Signorelli P., Ghidoni R.: Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005; 16: 450-456.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.