

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze

Fauna i flora



www.mlodzi naukowcy.com

Poznań 2021

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66392-91-5)

ISBN (wydanie online 978-83-66743-29-8)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-30-4)

Ilość znaków w książce: 513 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 12.8

Data wydania: maj 2021

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Czynniki modyfikujące zawartość cholesterolu w żółtku jaja kurzego	7
<i>Natalia Kanadys, Jakub Chalimoniuk, Małgorzata Stopyra, Damian Spustek, Dominika Krakowiak, Monika Śmiech, Kamil Drabik, Justyna Batkowska</i>	
2. Charakterystyka cholesterolu w jajach wybranych gatunków drobiu	13
<i>Natalia Kanadys, Jakub Chalimoniuk, Małgorzata Stopyra, Damian Spustek, Dominika Krakowiak, Monika Śmiech, Kamil Drabik, Justyna Batkowska</i>	
3. Jaja ekologiczne – hit czy kit?	19
<i>Dawid Ziobro, Anna Kłos, Małgorzata Stopyra, Karolina Wengerska, Magdalena Kutrzuba, Justyna Batkowska</i>	
4. Wybrane pasze gospodarskie w żywieniu drobiu a ich wpływ jakośc pozyskiwanego surowca	25
<i>Dawid Ziobro, Kinga Rokicka, Małgorzata Stopyra, Dominika Krakowiak, Damian Spustek, Justyna Batkowska</i>	
5. Lizozym białka jaja – czynniki modyfikujące jego aktywność	31
<i>Dominika Krakowiak, Damian Spustek, Małgorzata Stopyra, Kinga Rokicka, Monika Śmiech, Kamil Drabik, Justyna Batkowska</i>	
6. Forma mieszanki paszowej a efektywność chowu kurcząt brojlerów	37
<i>Karolina Wengerska, Yaroslava Bandarenka, Dawid Ziobro, Damian Spustek, Kinga Rokicka, Mateusz Selwa, Kamil Drabik, Justyna Batkowska</i>	
7. Inseminacja u ptaków gospodarskich	43
<i>Łukasz Czerniawski, Kostiantyn Vasiukov, Marta Kosińska, Ewelina Misiec, Jakub Łukaszczyk, Kamil Drabik, Justyna Batkowska</i>	
8. Choroby drobiu wpływające na jakośc jaj	49
<i>Łukasz Czerniawski, Marta Kosińska, Jakub Łukaszczyk, Kostiantyn Vasiukov, Ewelina Misiec, Kamil Drabik, Justyna Batkowska</i>	
9. Behawior pokarmowy młodych alpaka (<i>Vicugna pacos</i>)	55
<i>Joanna Kapustka</i>	
10. Zaburzenia behawioralne u psów. Rozpoznanie i terapia.	62
<i>Aleksandra Garbiec</i>	
11. Lateralizacja motoryczna i sensoryczna – asymetria półkul mózgu u zwierząt towarzyszących	68
<i>Aleksandra Garbiec</i>	
12. Zastosowanie krzemu w namnażaniu winogron (<i>Vitis vinifera</i> L.) w kulturach <i>in vitro</i>	75
<i>Weronika Bil, Monika Figiel-Kroczyńska, Arleta Kruczek, Marcelina Krupa- Małkiewicz</i>	
13. Zastosowanie mleczka kokosowego i wody kokosowej w namnażaniu winogron (<i>Vitis vinifera</i> L.) w kulturach <i>in vitro</i>	82
<i>Weronika Bil, Monika Figiel-Kroczyńska, Arleta Kruczek, Marcelina Krupa- Małkiewicz</i>	
14. Charakterystyka i możliwości aplikacyjne wierzbówki koprzy (<i>Epilobium angustifolium</i> L.)	89
<i>Karolina Ferysiuk, Karolina M. Wójciak</i>	
15. Zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z tymianku (<i>Thymus vulgaris</i> L.) otrzymanych za pomocą różnych rozpuszczalników	98
<i>Jakuć Piotr, Purkiewicz Aleksandra, Zakrzewski Arkadiusz, Wiśniewski Patryk</i>	

16. Charakterystyka kapusty głowiastej czerwonej (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>)	105
<i>Kapusta-Duch Joanna</i>	
17. Pozyskiwanie, właściwości fizykochemiczne i funkcjonalne inuliny oraz jej wykorzystanie w przemyśle spożywczym, kosmonautycznym i paszowym	112
<i>Małecki Jan, Szafrńska Jagoda O., Małecki Tomasz</i>	
18. Regulacja rozwoju brodawek korzeniowych za pośrednictwem wybranych fitohormonów	118
<i>Olechnik Przemysław</i>	
19. Rola izomeraz peptydyloprolilowych w epigenetycznej regulacji ekspresji genów	124
<i>Olechnik Przemysław</i>	
20. Biofortyfikacja agronomiczna sposobem wzbogacania roślin w cynk, selen i żelazo	131
<i>Szerement Justyna, Szatanik-Kloc Alicja, Jarosz Renata, Juda Michał, Marcińska-Mazur Lidia, Trusilewicz Lidia-Natalia, Mierzwa-Hersztek Monika</i>	
21. Zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki <i>Listeria monocytogenes</i> izolowane z warzyw mrożonych	138
<i>Zakrzewski Arkadiusz, Wiśniewski Patryk, Purkiewicz Aleksandra, Jakuć Piotr</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika monografię dotyczącą nauk przyrodniczych, a w szczególności fauny i flory. Prezentowana monografia liczy 21 rozdziałów w których poruszane jest dość szerokie spektrum zagadnień związanych z zarówno z chowem zwierząt gospodarskich jak i towarzyszących oraz uprawą i wykorzystaniem roślin.

Pierwszych kilka rozdziałów dotyczy problemów związanych z hodowlą drobiu, czyli karmieniem, chorobami oraz jakością i właściwościami jaj kurzych. Poruszono m.in. bardzo społecznie interesujące zagadnienie żywności ekologicznej, a w tym przypadku jaj pochodzących od tzw. szczęśliwych kur, czyli kur z wolnego wybiegu. Autorzy prześledzili literaturę z tym związaną i stwierdzili, że nie da się jednoznacznie stwierdzić, czy jaja ekologiczne cechują się wyższą jakością w porównaniu do jaj pochodzących z innych systemów hodowli. Na korzyść jaj ekologicznych przemawia niższy poziom cholesterolu, korzystny stosunek kwasów tłuszczowych, intensywniejsze zabarwienie żółtka, a także większy jego procentowy udział w jajku. Problemem jest jednak ograniczona kontrola nad żywieniem ptaków i ich zachowaniem. Przy czym ptaki na wolnym wybiegu mogą podlegać też szeregu czynników stresujących, co oznacza, że niekoniecznie są „szczęśliwsze” niż te hodowane w zamknięciu. Problemem jest też obniżony poziom higieny pozyskiwanych jaj oraz możliwość pojawieniu się w nich substancji szkodliwych, które kura zjadła w niekontrolowany sposób.

Jeden z rozdziałów traktuje o aplikacyjnych możliwościach zastosowanie ekstraktu z wierzbowki koprzyca. Jest to zioło o właściwościach antyoksydacyjnych dzięki zdolności do neutralizacji wolnych rodników oraz chelatowania metali, występujący w ziele składnik – oenoteina B – wykazuje szereg właściwości prozdrowotnych (przede wszystkim antykancerogennych), ważne jest też, że ekstrakt nie wykazuje cech toksycznych. Podobnie jak ekstrakt z rozmarynu dodawany do wyrobów mięsnych mógłby znaleźć swoje miejsce jako przeciwutleniacz. Niestety nie znalazł jak dotąd szerszego zastosowania w produkcji żywności.

Kolejnym interesującym rozdziałem jest tekst o biofortyfikacji agronomicznej jako sposobem wzbogacania roślin w cynk, selen i żelazo. Autorzy zauważyli, że około 30% ludności na świecie cierpi z powodu tzw. „ukrytego głodu” – niedożywienia, spowodowanego m.in. niedoborem kluczowych mikroelementów, takich jak cynk, selen i żelazo. Jednym ze skutecznych metod wprowadzenia wspomnianych mikroelementów do diety człowieka jest biofortyfikacja agronomiczna, dzięki której przy pomocy nawozów w sposób bezpośredni można zwiększyć zawartość mikroelementów w częściach jadalnych nawożonych roślin. W pracy omówiono główne czynniki wpływające na efektywność biofortyfikacji agronomicznej wybranymi mikroelementami. Nie jest to prosta metoda, wymaga stosowania nowych rodzajów nawozów i dostosowania nawożenia do uprawianych roślin, ale może zwiększyć efektywność bez dodatkowego obciążania środowiska.

Powyżej przedstawiłem tylko kilka wybranych zagadnień poruszonych w monografii z zakresu nauk przyrodniczych. Proszę nie traktować, że te omówione tematy/prace są najlepsze, ale wydawały mi się najbardziej interesujące z punktu widzenia moich zainteresowań naukowych. Czytelnicy o innych zainteresowaniach zapewne też znajdą ciekawe dla nich tematy badań naukowych. Życzę wielu przemyśleń związanych z tematyką prezentowanych prac badawczych. Ja uważam, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa Młodzi Naukowcy, pozwoli im efektywnie doskonalić swój warsztat pracy.

dr hab. Jacek Leśny
prof UPWR

1. Czynniki modyfikujące zawartość cholesterolu w żółtku jaja kurzego

Factors modifying the cholesterol content in chicken egg yolk

Natalia Kanadys⁽¹⁾, Jakub Chalimoniuk⁽¹⁾, Małgorzata Stopyra⁽¹⁾, Damian Spustek⁽¹⁾,
Dominika Krakowiak⁽¹⁾, Monika Śmiech⁽¹⁾, Kamil Drabik⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie *

⁽²⁾Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Natalia Kanadys: nataliakanadys@gmail.com

Słowa kluczowe: steroidy, jajo kurze, gatunek drobiu

Streszczenie

Cholesterol to organiczny związek chemiczny z grupy sterydów. Jest tłuszczową substancją niezbędną do poprawnego funkcjonowania organizmu zwierzęcego. Spożycie cholesterolu zawartego w pokarmach jest niezmiernie ważne w żywieniu człowieka. W zależności od diety do organizmu wraz z pokarmem dostarczane jest ok. 300-500 mg cholesterolu dziennie. Jednym z doskonałych produktów dostarczających cholesterol do organizmu ludzkiego są powszechnie obecne w diecie jaja. W dobie obecnego zainteresowania badaniami dotyczącymi wpływu cholesterolu na choroby układu sercowo-naczyniowego człowieka, konsumenci skupiają również swoją uwagę na zawartości tego steroidu w jajach. Istotne zatem zdaje się być poznanie czynników wpływających na zawartość tego związku w żółtku jaja kurzego. W pracy zaprezentowano czynniki genetyczne i środowiskowe oraz ich wpływ na zawartość cholesterolu w żółtkach jaj kurzych.

1. Wstęp

Jaja kurze są popularnym produktem spożywczym w diecie człowieka, zawierają wszystkie niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego substancje. Nic więc dziwnego, że zainteresowanie badaniami na temat składników tego produktu jest tak duże. Jedną z substancji wchodzących w skład jaja kurzego, a dokładnie jego żółtka, jest cholesterol. Jest on lipidem steroidowym o wysokim znaczeniu biologicznym. Jako składnik błon komórkowych nadaje im odpowiednią sztywność, natomiast w procesach związanych z biosyntezą jest substratem lub prekursorem dla powstawania wielu związków w tym kwasów tłuszczowych oraz hormonów steroidowych.

Cholesterol cieszy się jednak złą sławą ze względu na możliwe przyczynianie się do występowania chorób serca. Można wyróżnić dwie jego formy: HDL (*high density lipoprotein* - potocznie nazywaną „dobrym” cholesterolem) oraz LDL (*low density lipoprotein* - potocznie nazywaną „złym” cholesterolem). Miażdżycą jest jedną z chorób cywilizacyjnych wywoływaną przez „zły” cholesterol. Choroba ta powstaje na skutek modyfikacji cząsteczki LDL, w wyniku czego dochodzi do reakcji zapalnej, a następnie do powstawania komórek piankowych i pozakomórkowych złogów lipidowych lub do proliferacji mięśni gładkich i włóknienia. Prowadzi to do odkładania się blaszki miażdżycowej, która zwęża światło tętnic i utrudnia przepływ krwi (Gieroba 2016). W 1972 roku American Heart Association (Stowarzyszenie Kardiologów USA) oświadczyło, że nie należy spożywać więcej niż trzy jaja tygodniowo z uwagi na wzrost poziomu cholesterolu we krwi. Spowodowało to znaczne obniżenie konsumpcji jaj. Obecnie jaja nie są wymieniane w oświadczeniach stowarzyszenia jako czynnik powodujący wzrost ryzyka chorób serca i układu naczyniowego (Kijowski i in. 2013). Warty uwagi jest fakt, że konsumpcja jaj w Polsce pomimo tego, że nadal utrzymuje się na niższym poziomie niż 10 lat temu nieznacznie wzrasta. Cholesterol jednak, tak jak każda substancja zawarta w jajach, podlega czynnikom zewnętrznym oddziałującym przede wszystkim na noskę przed zniesieniem jaja. Celem pracy było przybliżenie wpływu czynników genetycznych i środowiskowych na zawartość cholesterolu w żółtkach jaj kurzych.

* SKN działa pod patronatem Krajowej Rady Drobiarstwa, Izba Gospodarcza w Warszawie

2. Czynniki warunkujące zawartość cholesterolu w jajach

Główną funkcją cholesterolu jest zależna od temperatury modulacja płynności błon komórkowych, w niskich temperaturach ich ochrona przed powstawaniem fazy krystalicznej, podczas gdy w wysokich zapobieganie dezorganizacji. Związek ten stanowi istotny prekursor lub substrat dla powstawania wielu związków w tym hormonów steroidowych produkowanych przez gonady i korę nadnerczy, a także warunkuje właściwy przebieg rozwoju embrionalnego.

Panująca obecnie moda na zdrowe odżywianie, w tym m. in. zwracanie uwagi na zawartość cholesterolu w posiłkach, napędza badania nad wpływem genotypu drobiu na zawartość tej substancji w żółtkach jaj. W badaniach dotyczących tego zagadnienia (Sheridan i in. 1982; Calik 2011; Calik 2016; Antova i in. 2019) wykazano istotne różnice między gatunkami, rasami czy rodami drobiu. Największa ilość cholesterolu znajduje się w jajach gęsich, a jaja strusie w porównaniu do kurzych zawierają mniejszą ilość tego steroidu (Adabi i in. 2011). Należy jednocześnie zaznaczyć, że różnice w zawartości cholesterolu często wynikały z różnic w wielkości jaja oraz udziale żółtka w jego masie.

2.1 Genetyczne uwarunkowania zawartości cholesterolu w żółtkach jaj

Wykazano ujemną fenotypową korelację między nieśnością drobiu (ilością zniesionych jaj), a zawartością cholesterolu w jaju (Harris i Wilcox 1963; Washburn i Nix 1974a; Cunningham i in. 1974). Turk i Barnett (1971) stwierdzili, że jaja pochodzące od linii kur nieśnych zawierają mniejsze ilości cholesterolu, niż jaja pochodzące od mieszańców typowo mięsnych.

Odziedziczalność zawartości cholesterolu w jaju jest niska. Według różnych badań (Marks i Washburn 1977; Washburn i Nix 1974a; Becker i in. 1977) jej wartość waha się w zakresie 0,04 do 0,39. Wartości te są jednak wystarczające by przeprowadzić z powodzeniem selekcję w kierunku obniżenia lub podwyższenia poziomu cholesterolu w żółtku jaja (Ansah i in. 1983; Becker i in. 1977). Wreszcie, odziedziczalność cholesterolu jest wyższa w liniach męskich niż w żeńskich, co prowadzi do hipotezy, że cecha ta jest zależna od genów zlokalizowanych na chromosomie Z i można na tej podstawie prowadzić selekcję w kierunku obniżenia lub podwyższenia zawartości cholesterolu przez linie męskie (Ledur i in. 2000, Chen i in. 2019). Odziedziczalność zawartości cholesterolu w liniach męskich oszacowano na 0,530 (Chen i in. 2019).

W badaniach nad zawartością cholesterolu w jajach prowadzonych na kaczkach wykazano, że geny *HMGCS1*, *FDFT1*, *HMGCR* oraz *HMGCS1* pełnią funkcje w szlaku biosyntezy tego związku. Wszystkie one wykazują silną ekspresję w wątrobach kaczek składających jaja o dużym udziale żółtka (Du i in. 2019), co sugeruje, że większość cholesterolu syntetyzowanego jest *de novo* w wątrobie. Ponadto w przeprowadzonych badaniach wykazano, że szlaki biosyntezy kwasów tłuszczowych zachodzące w wątrobie nie są znacząco związane z zawartością żółtka w jaju.

2.2 Środowiskowe uwarunkowania zawartości cholesterolu w żółtkach jaj

Jaja kurze, posiadają w swoim składzie około 200 mg cholesterolu, jednak przy zastosowaniu odpowiedniej suplementacji można ten poziom znacznie obniżyć (Kurtoglu i in. 2004). Rekomendacje żywieniowe z 1972 roku zalecały spożywanie nie więcej niż trzech jaj tygodniowo, co skutkowało obniżeniem zainteresowania produktami jajczarskimi ze strony konsumenta, a także dodatkowym błędnym przeświadczeniem, jakoby ich nadmierne spożywanie związane było z występowaniem chorób sercowo-naczyniowych, na co również miały wpływ rozpowszechnione do wiadomości publicznej opinie lekarzy z tamtego okresu. Późniejsze badania naukowe dosadnie obaliły tę teorię udowadniając przy tym właściwości prozdrowotne jaj. Obecnie ograniczenia te nie są aktualne z uwagi na walory odżywcze jaj. Mają one wysoką wartość biologiczną białka oraz bogaty skład chemiczny zawierający wszystkie niezbędne składniki potrzebne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, z wyjątkiem witaminy C. Jednak sytuacja ta i związane z nią większe zainteresowanie cholesterolem zawartym w jaju ze strony konsumentów popchnęła świat naukowy do rozpoczęcia prac hodowlanych mających na celu dążenie do obniżenia cholesterolu w jajach kurzych.

Poziom cholesterolu w jajach można znacznie modyfikować, stosując odpowiednio dobraną dietę dla ptaków. Przeprowadzane modyfikacje obniżające poziom cholesterolu skutkowały jednak znacznym spadkiem zdolności wylęgowej jaj (Botsogolu i in. 1998). Wskazuje to na wysokie

znaczenie cholesterolu w kreowaniu prawidłowego wzrostu i rozwoju zarodków ptasich. Obniżanie poziomu cholesterolu w żywieniu zwierząt, należy przeprowadzać w sposób kontrolowany i przemyślany, tak aby nie przekroczyć minimalnych zakresów jego zawartości w osoczu krwi. Stopień, w jakim można obniżyć poziom cholesterolu w jajach, musi mieć granicę, ponieważ całkowite zahamowanie syntezy cholesterolu u kur niewątpliwie osłabiło by produkcję hormonów steroidowych i skutkowało by niepowodzeniem w produkcji jaj oraz piskląt (Elkin i in. 1999).

Wiele uwagi poświęcono manipulacjom farmakologicznym w celu obniżenia zawartości cholesterolu w jajach (Botelho i in. 2014). Do regulatorów zawartości tego lipidu w żółtku jaja można zaliczyć substancje syntetyczne, tu m.in. leki stosowane w produkcji drobiarskiej, które poza działaniem prozdrowotnym wpływają również na zawartość steroidu. Do tego rodzaju czynników zaliczamy statyny. Należą one do leków powszechnie stosowanych w leczeniu hiperlipidemii oraz chorób układu sercowo-naczyniowego u ludzi. Są one wytwarzane przez grzyby strzępkowe, najwcześniej wykorzystywany był gatunek *Penicillium citrinum*, a obecnie najczęściej jest to *Aspergillus terreus* i jego zmutowane rodzaje. Związki te hamują aktywność reduktazy 3-hydroksymetyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA), dzięki czemu zmniejszają syntezę cholesterolu (Pawlak i in. 2011, Bizukojć i in. 2005). Do statyn należą m.in.: lowastatyna, prawastatyna, atorwastatyna oraz symwastatyna. Lowastatyna jest jedną z najczęściej badanych statyn, zaliczana do grupy najsilniejszych leków hipercholesterolemicznych (Mori i in. 1999). W badaniach przeprowadzonych u kur niosek (Moiri i in. 1999) stwierdzono, że lowastatyna może zmniejszyć poziom cholesterolu w żółtku o 12,7% przy zastosowaniu odpowiednich jej dawek. Prawastatyna natomiast posiada charakter hydrofilowy, dzięki czemu jej poziom w tkankach i narządach jest bardzo niski. Kim i in. (2004) wykazali, że prawastatyna zmniejsza masę żółtka i zawartość cholesterolu w jaju. Jej podanie *per os* w odpowiednich ilościach powodowało 20% spadek cholesterolu, bez pogorszenia produkcji jaj. Atorwastatyna jest to skuteczny lek w leczeniu hipercholesterolemii oraz mieszanej dyslipidemii (jest to podwyższone stężenie triglicerydów oraz obniżone stężenie cholesterolu frakcji HDL, któremu towarzyszy podwyższone stężenie cholesterolu frakcji LDL) działający w sposób zależny od dawki. Atorwastatyna jest jedną z dwóch najsilniejszych statyn dostępnych na polskim rynku farmaceutycznym (Szymański 2014). U kur żywionych paszą z dodatkiem tej substancji możliwe było obniżenie zawartości cholesterolu w jajach o nawet 46%. Należy zaznaczyć, że negatywnie wpływa ona na nieśność znacząco obniżając jej poziom (Elkin i in. 1999, Kim i in. 2004). Z kolei symwastatyna wykazuje skuteczniejsze działanie niż lowastatyna i może obniżyć poziom cholesterolu o 19% (Elkin i in. 1999). Do wyselekcjonowania optymalnych leków i ich ewentualnego zastosowania w komercyjnej produkcji jaj o niskiej zawartości cholesterolu, konieczne są jednak kompleksowe badania skutków działania statyn na organizmy kur niosek, a co za tym idzie na zdrowie konsumentów.

W obniżaniu cholesterolu wykorzystuje się również inne środki. Wang i Pan (2003) przeprowadzili badanie, w którym sprawdzono jak zawartość czerwonej pleśni ryżu wpływa na cholesterol w jaju. Wykazali, że dodanie do paszy dla kur ryżu z czerwoną pleśnią może zmniejszyć stężenie cholesterolu w jajach o 5-14% w zależności od zawartości dodatku (Wan i Pan 2003). Inną substancją mogącą obniżyć zawartość cholesterolu w żółtku jest probukol. Probukol został wprowadzony na początku lat siedemdziesiątych XX wieku jako lek obniżający poziom cholesterolu. Wykazano, że jego stosowanie w diecie kur niosek pozwalało obniżyć poziom cholesterolu o około 5% (Kuzuya 1992, Naber i in. 1981). Należy jednak pamiętać, że leki mogą mieć niekorzystny wpływ na płodność ptaków, aktywność mięśni oraz w dalszej konsekwencji zdrowie konsumentów, dlatego lepszym rozwiązaniem są rośliny lecznicze (Khalifa i Noseer 2019).

Kolejny aspekt to naturalne dodatki żywieniowe. Główną z metod mającą wpływ na ograniczenie ilości cholesterolu w żółtku jaj jest zastosowanie w żywieniu niosek probiotyków (Kurtoglu i in. 2004). Duże znaczenie w tym zakresie mają też nasiona konopi wykorzystywane do suplementacji ptaków (Shahid i in. 2015). Korzystny wpływ przypisujemy zawartym w tych nasionach fitosterolom, które umożliwiają obniżenie poziomu cholesterolu (Włodarek 2007). Innym przykładem jest wykorzystanie olejków eterycznych (Gopi i in. 2014), czy żeń-szenia (Akbarian i in. 2011). Zastosowanie tych dodatków w diecie drobiu, pozytywnie wpływa na poprawę parametrów produkcyjnych i zdrowotnych ptaków. Z kolei Yalcin i in. (2008) wskazują na pozytywny wpływ

zastosowania czosnku, ponieważ skutkuje on zwiększeniem masy jaja, zmniejszeniem stężenia cholesterolu i triglicerydów w żółtku, a także cholesterolu w surowicy bez niekorzystnego działania na wydajność nieśną i jakość jaj.

Według innych badań (Zemkova i in. 2007, Simčić i in. 2009) system utrzymywania ptaków, jako kompleks czynników żywieniowych i środowiskowych, ma istotny wpływ na poziom cholesterolu. Stwierdzono, że wyższe stężenie cholesterolu znajduje się w jajach kur utrzymywanych w systemie wybiegowym, aniżeli w chowie klatkowym. Odwrotnie, Krawczyk i in. (2011), wskazują, że zawartość cholesterolu w jajach wyprodukowanych przez kury utrzymywane w systemie wolno wybiegowym jest niższa niż w przypadku jaj od kur utrzymywanych na ściółce. Czynnikiem wpływającym na niższy poziom lipidów, cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL we krwi i jajach może być dieta niosek uzupełniona w świeżość rośliny i zioła z wolnego wybiegu. Cholesterol jest biosyntetyzowany w wątrobie kur, a następnie wydzielany do osocza w postaci lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL). VLDL są transportowane do jajników, gdzie są wiązane i wchłaniane przez rosnące oocyty (Wang i Pan 2003), dlatego obniżenie cholesterolu w osoczu krwi może skutkować obniżeniem cholesterolu w żółtkach jaj.

3. Podsumowanie

Z uwagi na dietetyczne i prozdrowotne znaczenie jaj coraz częściej prowadzi się prace nad zawartymi w nich substancjami bioaktywnymi, m.in. cholesterolem, także w aspekcie jego wpływu na zdrowie konsumentów. Jaja kurze, dzięki obecnym w nich, niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego nienasyconym kwasom tłuszczowym, ale także cholesterolowi, wykazują cenne właściwości odżywcze i prozdrowotne. Mają także - istotne znaczenie w diecie człowieka. Z uwagi jednak na profilaktykę antycholesterolową wydaje się, że jest możliwe pozyskanie jaj o obniżonym poziomie cholesterolu w żółtku, czy to na drodze farmakologicznej, czy naturalnej suplementacji ptaków.

4. Literatura

- Adabi GSH, Ahabab A, Fani AR i in. (2011) Egg yolk fatty acid profile of avian species – influence on human nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97(1): 27–38.
- Akbarian A, Golian A, Sheikh Ahmadi A i in. (2011) Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) on egg yolk cholesterol, antioxidant status and performance of laying hens. *Journal of Applied Animal Research* 39(1):19-21.
- Antova GA, Gerzilov VT, Petkova ZY, iin. (2019) Comparative analysis of nutrient content and energy of eggs from different chicken genotypes. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 99(13): 5890-5898
- Ansah GA, Chan CW, Touchburn SP, i in. (1985) Selection for low yolk cholesterol in leghorn-type chickens. *Poultry Science* 64(1): 1-5.
- Basmacioglu H, Ergü M (2005) Research on the factors affecting cholesterol content and some other characteristics of eggs in laying hens. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 29(1): 157-164.
- Becker WA, Spencer JV, Verstrate JA i in. (1977) Genetic analysis of chicken egg yolk cholesterol. *Poultry Science* 56: 895-901.
- Bizukojć M, Ledakowicz S (2005) Biosynteza lowastatyny przez *Aspergillus terreus*. *Biotechnologia* 2(2): 55-67.
- Botelho GG, Falbo MK, Ost PR i in. (2015) Physiological performance of quails that underwent dietary and pharmacological manipulation of cholesterol. *Journal of Animal Hysiology and Animal Nutriton* 99(3): 424-429.
- Botsoglou NA, Yannakopoulos AL, Fletouris DJ i in. (1998) Yolk fatty acid composition and cholesterol content in response to level and form of dietary flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(11): 4652-4656.
- Calik J (2011) Ocena jakości jaj sześciu rodów kur nieśnych w zależności od ich wieku. *Żywność.Nauka. Technologia. Jakość.* 18(5): 85-93.

- Calik J (2016) Ocena zawartości wybranych składników chemicznych w jajach kurzych w zależności od cyklu ich produkcji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 23(3): 54-63.
- Chen X, Zhu W, Du Y i in. (2019) Genetic parameters for yolk cholesterol and transcriptional evidence indicate a role of lipoprotein lipase in the cholesterol metabolism of the Chinese Wenchang chicken. *Frontiers in Genetics* 10: 902. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00902>
- Cunningham DL, Krueger WF, Fanguy RC i in. (1974) Preliminary results of bidirectional selection for yolk cholesterol level in laying hens. *Poultry Science* 53(1): 384-391.
- Du X, Ren JD, Xu XQ i in. (2019) Comparative transcriptome analysis reveals genes related to the yolk ratio of duck eggs. *Animal Genetics* 50(5): 484-492.
- Elkin RG, Yan Z, Zhong Y i in. (1999). Select 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors vary in their ability to reduce egg yolk cholesterol levels in laying hens through alteration of hepatic cholesterol biosynthesis and plasma VLDL composition. *Journal of Nutrition* 129(5): 1010-1019.
- Gieroba B (2016). Miażdżycy- czynniki ryzyka i patogenez. Choroby cywilizacyjne i społeczne XXI w. – przegląd i badania: 35-46.
- Gopi M, Karthik K, Manjunathachar HV i in. (2014) Essential oils as a feed additive in poultry nutrition. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 2(1): 1-7.
- Harris PC, Wilcox FH (1963) Studies on egg yolk cholesterol 1. Genetic variation and some phenotypic correlations in a randombred population. *Poultry Science* (42): 178-182.
- Khalifa MI, Noseer EA (2019) Cholesterol quality of edible eggs produced by quail fed diets containing probiotic and/or ginger (*Zingiber officinale*). *Livestock Research for Rural Development* 3: Article #165.
- Kijowski J, Leśniewski G, Cegielska-Radziejewska R (2013) Jaja cennym źródłem składników bioaktywnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 20(5): 29-41.
- Kim JH, Hong ST, Lee HS i in. (2004) Oral administration of pravastatin reduces egg cholesterol but not plasma cholesterol in laying hens. *Poultry Science* 83(9): 1539-1543.
- Krawczyk J, Sokołowicz Z, Szymczyk B (2011) Effect of housing system on cholesterol, vitamin and fatty acid content of yolk and physical characteristics of eggs from Polish native hens. *Archiv für Geflügelkunde* 75(3): 151-157
- Kurtoglu V, Kurtoglu F, Seker E i in. (2004) Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Additives and Contaminants* 21(9): 817-823.
- Kuzuya M, Kuzuya F (1992) Probucol as an antioxidant and antiatherogenic drug. *Free Radical Biology & Medicine* 14: 67-77.
- Ledur MC, Fairfull RW, McMillan I i in. (2000) Genetic effects of aging on egg production traits in the first laying cycle of white Leghorn strains and strain crosses. *Poultry Science* 79: 296-304.
- Marks HL, Washburn KW (1977) Divergent selection for yolk cholesterol in laying hens. *British Poultry Science* 18:179-188.
- Mori AV, Mendonc CX, Santos CO (1999) Effect of dietary lipid-lowering drugs upon plasma lipids and egg yolk cholesterol levels of laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(11): 4731-4735.
- Naber EC, Elliot JF, Smith TL (1982) Effect of probucol on reproductive performance, egg yolk cholesterol content, and lipid metabolism in the laying hen. *Poultry Science* 61(6): 1118-1124.
- Okruszek A, Książkiewicz J, Haraf G i in. (2008) Wpływ pochodzenia kaczek z różnych stad zachowawczych na wybrane cechy jakościowe jaj. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu* 30: 43-50.
- Pawlak J, Ziętkowski Z, Bodzenta-Lukaszyk A (2011) Statyny i astma. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 65: 177-189.
- Shahid S, Chand N, Khan RU i in. (2015) Alternations in cholesterol and fatty acids composition in egg yolk of Rhode Island Red x Fyoumi hens fed with hemp seeds (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Chemistry* 2015, Article ID 362936, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/362936>.
- Sheridan AK, Humphris CSM, Nicholls PJ (1982) The cholesterol content of eggs produced by Australian egg-laying strains. *Poultry Science* 23: 569-575.

- Simčič M., Stibilj V., Holcman A. (2009) The cholesterol content of eggs produced by the Slovenian autochthonous Styrian hen. *Food Chemistry* 114: 1-4.
- Szymański FM (2014) Hipercholesterolemia jako najbardziej rozpowszechniony czynnik ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego w Polsce. O czym warto pamiętać w codziennej praktyce? *Choroby Serca i Naczyń* 11(4): 204-211.
- Turk DE, Barnett BD (1971) Cholesterol content of market eggs. *Poultry Science* 50: 1303-1306.
- Wang JJ, Pan TM (2003) Effect of red mold rice supplements on serum and egg yolk cholesterol levels of laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16): 4824-4829.
- Washburn KW, Nix DF (1974) Genetic basis of yolk cholesterol content. *Poultry Science* 53: 109-115.
- Włodarek D (2007) Mechanizm działania fitosteroli w obniżaniu poziomu cholesterolu LDL we krwi. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 58(1): 47-51.
- Yalcin S, Onbasilar EE, Reisli Z i in. (2006) Effect of garlic powder on the performance, egg traits and blood parameters of laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(9): 1336–1339.
- Zemková I, Simeonovová J, Lichovníková M i in. (2007) The effects of housing systems and age of hens on the weight and cholesterol concentration of the egg. *Czech Journal of Animal Science* 52 (4): 110-115.

2. Charakterystyka cholesterolu w jajach wybranych gatunków drobiu

The characteristic of cholesterol in eggs of selected poultry species

Natalia Kanadys⁽¹⁾, Jakub Chalimoniuk⁽¹⁾, Małgorzata Stopyra⁽¹⁾, Damian Spustek⁽¹⁾,
Dominika Krakowiak⁽¹⁾, Monika Śmiech⁽¹⁾, Kamil Drabik⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie *

⁽²⁾Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun Sekcji: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Natalia Kanadys: nataliakanadys@gmail.com

Słowa kluczowe: sterole, jaja konsumpcyjne, gatunki drobiu

Streszczenie

Przemysł jajczarski w głównej mierze opiera się na jajach pochodzących od kur. To one w szczególności poddawane są analizom pod względem jakości oraz zawartości substancji aktywnych, takich jak np. lizozym czy cholesterol. Cholesterol zawarty w jajach jest to głównie frakcja HDL, która potocznie nazywana jest „dobrym cholesterolem”. Z danych dostępnych w literaturze wynika, że zawartość cholesterolu w jajach mieści się w granicach 7,78-24 mg/g żółtka. Ostatnimi czasy jaja ptasie zostały szczególnie wzięte pod uwagę przez badaczy ze względu na fałszywy mit dotyczący tego, jakoby zawarty w nich cholesterol miał związek z występowaniem chorób serca. Przyczyną dużego zróżnicowania zawartości cholesterolu w jajach mogą być między innymi: gatunek drobiu, typ użytkowy, sposób żywienia, wiek, a także często metoda oznaczania zawartości cholesterolu. W pracy wykazano, że jaja zielononózek czy przepiórek wbrew powszechnej opinii nie posiadają mniej cholesterolu w porównaniu do jaj kur nieśnych. U drobiu wodnego zawartość cholesterolu jest najwyższa, zaś jaja od ptaków młodych i zawierają więcej tego związku niż jaja ptaków starszych. Z kolei jaja bezgrzebieniowców takich jak strusie zawierają najniższą ilość cholesterolu pomimo swoich dużych rozmiarów.

1. Wstęp

Cholesterol (chol) jest cząsteczką zbudowaną z 17-węglowej struktury cyklopentanoperhydrofenantrenu i dołączonego do niej 6-węglowego łańcucha bocznego, klasyfikowaną jako alkohol steroidowy ze względu na obecność pojedynczej grupy hydroksylowej. Źródłem cholesterolu, pomimo iż syntetyzowany jest we wszystkich komórkach jądrzastych organizmu, w głównej mierze jest w wątroba i jelita gdzie powstaje on *de novo* poprzez szereg reakcji enzymatycznych. Jednak większa jego część dostarczana jest wraz z pokarmem i wchłaniana w jelicie cienkim. (Użarowska i in., 2018)

Główną funkcją cholesterolu jest zależna od temperatury modulacja płynności błon komórkowych. Związek ten jest wyjściowym materiałem do syntezy kwasów żółciowych, hormonów steroidowych oraz witaminy D. Warunkuje on także właściwy przebieg rozwoju embrionalnego i wchodzi w skład błon komórkowych i tkanek nerwowych (Pieszka i in. 2017). Z tego względu tak ważny jest odpowiedni poziom cholesterolu w żółtku jaju, które w swojej najbardziej podstawowej funkcji stanowi pożywienie dla rozwijającego się zarodka, gwarantując młodemu organizmowi prawidłowy rozwój, a drastyczne obniżanie zawartości tego związku może powodować zmniejszenie zdolności wylęgowej jaj (Botsoglou i in. 1998).

Cholesterol występuje w jajach wszystkich gatunków. Zawartość steroidu zależna jest jednak od gatunku drobiu, od których pochodzą jaja. W związku z tym wpływa również na wykorzystanie ich w żywieniu ludzi. Celem pracy jest przybliżenie różnic w zawartości tego lipidu między jajami różnych gatunków oraz jego znaczenia w diecie człowieka.

*SKN działa pod patronatem Krajowej Rady Drobiarstwa, Izba Gospodarcza w Warszawie

2. Przegląd literatury

Podstawową funkcją jaj wszystkich gatunków drobiu jest reprodukcja. Jajo to żeńska komórka rozrodcza zaopatrzona we wszystkie niezbędne składniki potrzebne do prawidłowego rozwoju zarodka. Najważniejszym jego elementem jest żółtko bogate w składniki odżywcze, które stanowi źródło pożywienia dla zarodka. W jego skład wchodzi lipidy, białka, węglowodany, minerały oraz witaminy. Zbilansowany skład aminokwasowy oraz zawartość cennych składników odżywczych i bioaktywnych jaja sprawiają, że są one chętnie wybierane jako element zbilansowanej diety.

Aktualne prawodawstwo obowiązujące we wszystkich krajach UE, jest bardzo ogólne i jako konsumpcyjne kwalifikuje wyłącznie jaja kurze. Tymczasem na rynku dostępne są także jaja przepiórcze. Zyskują one na popularności z uwagi na fakt, że nie powodują alergii pokarmowych. W krajach takich jak Francja popularne są także jaja perlicze. W małych gospodarstwach, utrzymujących stada wielogatunkowe, wszystkie pozyskiwane jaja traktowane są jako konsumpcyjne. Przy produkcji na większą skalę, jaja od innych gatunków drobiu niż kura, są jajami niemal wyłącznie wylęgowymi.

Jednocześnie należy zauważyć, że teoretycznie wszystkie świeże jaja mogą być traktowane jako konsumpcyjne. Możliwe jest zatem wykorzystanie jaj, które z powodu nie spełniania kryteriów jakościowych w tym zakresie (np. mają nieprawidłowy kształt lub wielkość, obecność mikropęknięć) przeznaczane są do przemysłu przetwórczego. W Polsce roczne zapotrzebowanie na jaja jako surowiec do przemysłu spożywczego szacuje się na 1,3-1,5 mld sztuk. Są one wykorzystywane do produkcji wyrobów cukierniczych, majonezów, dresingów, lodów, makaronów, a także na proszek jajeczny (Kapusta 2014).

2.1 Cholesterol w jajach drobiu grzebiącego

Jaja kurze są źródłem cennych składników pokarmowych, charakteryzujących się dużym stopniem przyswajalności. W ich żółtkach znajdują się tłuszcze stanowiące około 60% suchej masy. Mają one wysoką wartość biologiczną ze względu na dobre proporcje nienasyconych kwasów tłuszczowych w stosunku do nasyconych. W swoim składzie jaja zawierają przeszło 210 mg cholesterolu jest to 12 mg/g żółtka (Siepka i in. 2015; Kijowski i in. 2013; Drabik i in. 2020). Zawartość cholesterolu w jajach kurzych jest warunkowana wieloma czynnikami. Należą do nich m.in. pochodzenie kur, ich wiekiem czy systemem utrzymania i żywienia. Zastosowanie metod hodowlanych i biologicznych lub zmiana żywienia kur pozwala zmniejszyć jego zawartość w jajach o około 25 - 30 % (Calik 2016; Calik i in. 2013). Warto wspomnieć, że jeszcze do niedawna uważano, że żółtko zielononóżki kuropatwianej zawiera mniej cholesterolu w porównaniu do innych ras kur. Jednak według najnowszych badań jest ono porównywalne z innymi rasami tych ptaków (Antruejo i in. 2011).

Jaja kurze bardzo często zastępowane są jajami przepiórczymi np. w diecie dzieci lub u osób z alergiami pokarmowymi. W jajach pochodzących od indyka, kaczki czy przepiórki zawartość cholesterolu na gram jaja jest wyższa niż w jajach kurzych. Jaja przepiórki zawierają mniej cholesterolu niż jaja kurze, lecz ich mały rozmiar powoduje, że stężenie zawartego w nich cholesterolu jest wyższe (Turk i Barnett 1971). Poziom cholesterolu w jajach przepiórnych wynosi około 844 mg, taka ilość cholesterolu może być nieodpowiednia dla konsumentów chorujących na hipercholesterolemię (Khalifa i Noseer 2019). Ogólna średnia zawartość cholesterolu w jajach przepiórnych wynosi 12,1 mg/g żółtka (Bragagnolo i in. 2003). Tak samo jak w przypadku jaj kurzych, w jajach przepiórnych możliwe jest obniżenie zawartości cholesterolu na przykład za pomocą leków hipocholesterolemicznych takich jak: statyny, inhibitory reduktazy HMG-CoA, fibraty (Khalifa i Noseer 2019). Jaja przepiórcze w porównaniu do jaj strusia, indyka, kaczki czy gęsi cechuje się niższą zawartością tłuszczu i cholesterolu, a także korzystniejszym stosunkiem kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych (Gondek i in. 2015; Sinanoglou i in. 2011).

Indyki zazwyczaj hodowane są ze względu na mięso, z tego powodu ich jaja przeznaczone są prawie w całości na wylęg tych ptaków. Nie mniej jednak możliwe jest ich spożywanie. Ich smak jest zbliżony do jaj kurzych, również ich przyrządzanie nie odbiega od nich pod względem czasowym. Charakteryzują się one jednak wysoką zawartością cholesterolu. Jak wynika z badań przeprowadzonych przez Adabi i in. (2013), na takich gatunkach drobiu jak kura, przepiórka, gęś,

indyk oraz struś, jaja indyka zawierały 13.35 mg cholesterolu na 1g żółtka. Była to druga wartość pod względem zawartości tego sterolu, zaraz po gęsiach, wśród badanych gatunków ptaków.

2.2 Cholesterol w jajach drobiu wodnego

Do drobiu wodnego zalicza się kaczki i gęsi. Są one przede wszystkim utrzymywane w celu pozyskania mięsa, jednak, jak każdy ptak, znoszą jaja. Na polskim, a nawet europejskim rynku nie są one tak bardzo popularne, jak na przykład na rynkach azjatyckich, gdzie ich spożycie jest bardzo duże, a jaja kaczek uchodzą tam za wykwinny przysmak. Podobnie jest z jajami gęsi, które w naszych rejonach świata nie zyskały szczególnego uznania wśród konsumentów (Rhodes i in. 1960). W związku z tym są rzadko dostępne w sklepach, a jedynie u hodowców, którzy nieczęsto je sprzedają ze względu na to, iż służą one głównie do wylęgu kolejnych pokoleń ptaków. Jaja drobiu wodnego są również narażone na zanieczyszczenie *Salmonellą* i z tego względu niechętnie kupowane. Zawierają w swoim składzie znaczące ilości makro i mikroelementów, witamin z grupy B oraz cholesterolu. Mimo wszystko są one pomijane w spożyciu przez konsumenta rynku polskiego, na co może wpływać również ich charakterystyczny smaki nieco oleista konsystencja.

Badania nad składem chemicznym jaj kaczek wykazały, że zawierają one istotnie mniej białka, przy znacznie wyższej koncentracji ogólnych lipidów (Friday i in., 2011).

Zawartość cholesterolu w jajach drobiu wodnego uzależniona jest od wielu różnych czynników. Należą do nich m.in. system utrzymania, żywienia, ich wieku oraz pochodzenia (Stępińska i in. 1996). Na podstawie prowadzonych badań wynika, że jaja pochodzące od młodego drobiu wodnego, charakteryzują się mniejszą masą, aniżeli jaja ptaków dorosłych. Ma to znaczący wpływ na zawartość cholesterolu, u młodego drobiu jest ona relatywnie duża. Jednak wraz ze czasem nieśności, a tym samym wzrostem wielkości jaj, powiększa się masa żółtka zawierająca cholesterol. Nie wpływa to jednak na jego ogólny udział w jaju, gdyż pozostaje on na tym samym poziomie (Jamroz i Hawalej, 1994). Badania Okruszek i in. (2006) prowadzone na kaczkach Orpington oraz krzyżowce tej rasy z Khaki Cambell, pokazały, że zawartość cholesterolu w jajach tych kaczek mierzona w 6 oraz 22 tygodniu nieśności oscylowała pomiędzy 17 mg/g, a niespełna 20 mg/g żółtka. Większe zawartości cholesterolu występowały w późniejszych tygodniach nieśności. Stąd wniosek, że zawartość sterolu w jajach kaczek skorelowana jest z wiekiem niośki.

Badania przeprowadzone na jajach pochodzących od stad zachowawczych kaczek (kaczka pomniejszona K2, pekin krajowy rodu P33 oraz Pekin angielski LsA), nie wykazały istotnych różnic pomiędzy kawkami LsA i P33 w odniesieniu do masy białka i żółtka, wysokości białka, barwa żółtka czy też zawartość cholesterolu w całym żółtku (Książkiewicz 1999). Żółtka pochodzących od nich jaj w porównaniu z żółtkami jaj kaczek pekin (LsA) charakteryzowały się mniejszą masą, istotnie niższa była także masa skorupy. Odnotowano zmniejszenie zawartości cholesterolu w żółtku (Książkiewicz i in. 2002).

Badania Aziz i in. (2012) wskazują na wyższą zawartość cholesterolu w jajach kaczek w porównaniu z kurzymi, jednak mniejszą niż u przepiórek japońskich. Bair i Marion (1977) w doświadczeniu prowadzonym na jajach trzech różnych pod względem genotypu kaczek (krzyżówki, piżmowej i krzyżówki Pekin $\times$ Rouen), uzyskali średni wyniki na poziomie 16,2 mg chol/g żółtka i 435 mg cholesterolu na jajo. Przeprowadzili oni również badania na jajach dwóch różnych pod względem genotypu gęsi (afrykańskiej i białej) i średni poziom cholesterolu w żółtku wynosił 16,3 mg/g. Jaja gęsi białej (17,5 mg/g żółtka) zawierały znacznie większą ilość cholesterolu niż jaja gęsi afrykańskiej (15,8 mg/g żółtka). Z badań tych wynika, że jaja gęsi zawierają większą ilość tego steroidu niż jaja kaczek.

Adabi i in. (2013) w badaniach prowadzonych na różnych gatunkach drobiu wykazali, że największą zawartością cholesterolu w żółtku charakteryzowały się jaj gęsi. Porównywane były one ze strusiami i indykami oraz przepiórkami i kurami. Co interesujące w pracy Friday i in. (2011) stwierdzono, że jaja kaczek charakteryzowały się niższym poziomem cholesterolu niż jaja pochodzące od perlic, czy nigeryjskich ras kur. Dane w tym zakresie pozostają zatem niejednoznaczne.

2.3 Cholesterol w jajach bezgrzebieniowców

Strusie, emu i nandu należą do rodziny bezgrzebieniowców. Należą one również do drobiu jednak często są przez konsumenta pomijane. Przeciętny konsument jaj nie kojarzy nawet hodowli tych ptaków z przemysłem jajczarskim. Wynika to z faktu, że w warunkach krajowych jaja tych ptaków praktycznie nie są dostępne jako typowo konsumpcyjne. Na rynek trafia tylko nadwyżka jaj wylęgowych i stanowią one np. oryginalny prezent w czasie Świąt Wielkanocnych. Nie mniej jednak badania nad treścią jaj bezgrzebieniowców są prowadzone, zwłaszcza w krajach, z których te ptaki pochodzą i gdzie są licznie utrzymywane.

Adabi i in. (2013) w swoich badaniach otrzymali zaskakująco niskie wartości cholesterolu w jaju strusia. W prowadzonym doświadczeniu badano zawartość steroidu u kur, przepiórek, gęsi, indyków oraz strusi. Jaja strusie zawierały najmniejszą ilość cholesterolu. Wynosiła ona 9,75 mg/g żółtka, gdzie najwyższą wartość przyjęły jaja gęsie – 15,81 mg/g żółtka. Kaźmierska i in. (2005) oraz Reiner i in. (1996) wskazują na zawartość steroidu w granicach zawierających się pomiędzy 13 a 19,8 mg/g żółtka w jaju strusim. Oczywistym jest fakt, że na zawartość cholesterolu w jaju wpływa szereg czynników do których należą m.in. żywienie czy wiek samic. Jaja strusie wykazują niewielkie, w porównaniu do kur, zmiany zawartości sterolu podczas okresu nieśności. Wynika to najprawdopodobniej z małej zmienności masy jaja, a co za tym idzie procentowego udziału żółtka, podczas sezonu (Meo i in. 2003).

Badania przeprowadzone na jajach nandu (*Rhea americana*) w celu określenie zawartości cholesterolu wykazały, że zawierają one 16,41mg tego steroidu w 1 g żółtka i jest to wartość zbliżona do zawartości cholesterolu w jajach perlic hodowlanych (16,0 mg/g) (Horobańczuk i in. 2003), ale wyższa w porównaniu do jaj strusi (Reiner i in. 1996).

Tab. 1. Zawartość cholesterolu w jajach różnych gatunków drobiu.

Gatunek	Rasa	Masa jaj (g)	Zawartość cholesterolu (mg/g żółtka)	Źródło
Kury	Leghorn	65	15	Gwara i in. (2004)
	Rhode Island	59	14,9	Gwara i in. (2004)
	Sussex	55	15,2	Gwara i in. (2004)
	Zielononóżka kuropatwiana	58	14 -15	Gwara i in. (2004)
Indyki		85	13,35	Adabi i in. (2013)
Kaczki		85	16,2	Bair i Marion (1977)
Przepiórki		10	12,1	Bragagnolo i Rodriguez-Amaya (2003)
Nandu		~600	16,4	Horbańczuk i in (2003)
Struś afrykański		1600	13	Horbańczuk i in. (1999)
Gęsi		184	16,3	Bair i Marion (1977)

3. Podsumowanie

Analizując dostępną literaturę można zauważyć, iż każdy gatunek drobiu charakteryzuje się odmiennymi wartościami cholesterolu zawartego w żółtku jaja (Tabela 1). Prym w tej klasyfikacji wiodą ptactwo wodne, a najwyższe stężenie cholesterolu występuje w jajach gęsi. Z kolei najniższe wartości stwierdzono, w zależności od prowadzonych badań, w jajach przepiórek i strusi.

Na zawartość tego steroidu w jaju ptaków wpływa szereg czynników, do których zaliczyć można wiek nioski, żywienie czy system chowu i dotyczy to wszystkich rodzajów ptactwa. Powyższa

praca może stanowić punkt odniesienia dla osób interesujących się zawartością cholesterolu w jajach różnych gatunków drobiu.

4. Literatura

- Adabi GSH, Ahbab A, Fani AR i in. (2011) Egg yolk fatty acid profile of avian species – influence on human nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97(1): 27–38.
- Antruejo A, Azcona JO, Garcia PT i in. (2011) Omega-3 enriched egg production: the effect of a -linolenic v -3 fatty acid sources on laying hen performance and yolk lipid content and fatty acid composition. *British Poultry Science* 52: 750–760.
- Aziz, Z, Cyriac, S, Beena V i in. (2012) Comparison of cholesterol content in chicken, duck and quail eggs. *Journal of Veterinary Animal Science* 43: 64-66.
- Bair CW, Marion WW (1977) Yolk cholesterol in eggs from various avian species. *Poultry Science* 57: 1260-1265.
- Botsoglou NA, Yannakopoulos AL, Fletouris DJ i in. (1998) Yolk fatty acid composition and cholesterol content in response to level and form of dietary flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4652-4656.
- Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB (2003) Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs. *Journal of Food Composition and Analysis* 16(2): 147–153.
- Calik J (2013) Zmiany cech jakościowych jaj, pochodzących od kur nieśnych żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33), w zależności od warunków ich przechowywania. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 20(2):73-79.
- Calik J (2016) Ocena zawartości wybranych składników chemicznych w jajach kurzych w zależności od cyklu ich produkcji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 3(106): 54 – 63.
- Drabik K., Batkowska J., Kosińska M. i in. (2020) Jaja kurze jako źródło biologicznie ważnych lipidów w diecie człowieka. [W:] Nyckowiak J., Leśny J. (red.) *Nauki przyrodnicze: fauna i hodowla zwierząt. Badania i Rozwój Młodych naukowców w Polsce*, Poznań: 12-17.
- Drozd L, Gondek M, Szkucik K i in. (2015) Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powierzchni jaj przepiórczych. *Medycyna Weterynaryjna* 71(05): 303-306.
- Friday ET., James O, Eniola, OJ i in. (2011) Variations in micronutrients content and lipid profile of some avian eggs. *Journal of Experimental Agriculture International* 1(4): 343-352.
- Gwara T, Florjanowicz J, Centkiewicz M i in. (2004) Ocena użyteczności reprodukcyjnej kur rasy Zielononóżka kuropatwiana ze stada zachowawczego, adoptowanych do warunków gospodarstwa ekologicznego w Parku Krajobrazowym Doliny Baryczy. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Zootechnika* 52: 91-98.
- Horbańczuk JO, Cooper RG, Jóźwik Ai in. (2003) Cholesterol content and fatty acid composition of egg yolk of grey nandu (*Rhea americana*). *Animal Science Papers and Reports* 21(4): 265-269.
- Horbańczuk JO, Sales J, Piotrowski J. i in. (1999) Lipid, cholesterol content and fatty acid composition of ostrich eggs as influenced by subspecies. *Archiv für Geflügelkunde* 63(5): 234-236.
- Jamroz D, Hawalej P (1994) Biologiczna rola cholesterolu i jego zawartość w jajach. *Zwierzęta Gospodarskie* 3: 19-21.
- Kapusta F (2014) Produkcja i zużycie jaj w Polsce- ocena samowystarczalności. *Polityki Europejskie, Finanse i Marketing*, 11(60): 65-77
- Każmierska M, Jarosz B, Korzeniowska M i in. (2005) Comparative analysis of fatty acid profiles and cholesterol content of egg yolk of different bird species. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* 14(55): 69-73.
- Khalifa MI, Noseer EA (2019) Cholesterol quality of edible eggs produced by quail fed diets containing probiotic and/or ginger (*Zingiber officinale*).. *Livestock Research for Rural Development* 3, Article 165.
- Kijowski J, Leśniewski G, Cegielska- Radziejewska R (2013) Jaja cennym źródłem składników bioaktywnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 20(5): 29-41.
- Kralik G, Kroic Z, Suchý P i in. (2008) Feeding fish oil and linseed oil to laying hens to increase the n-3 PUFA of egg yolk. *Acta Veterinaria Brno* 77: 561-568.

- Książkiewicz J, Kisiel T (2002 b) Charakterystyka wybranych cech morfologicznych i biochemicznych jaj oraz współzależności pomiędzy tymi cechami u różnych kaczek typu pekin. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. Zootechnica*. 227(44): 69 – 76.
- Książkiewicz J, Stępińska M, Kisiel T i in. (1999) Cechy fizyczne jaj i lipidy żółtek w stadach zachowawczych kaczek typu pekin i Cayuga. *Roczniki Naukowe Zootechniki* 26(3): 99-110.
- Meo CD, Stanco G, Cutrignelli M i in. (2003) Physical and chemical quality of ostrich eggs during the laying season. *British Poultry Science* 44(3): 386-290.
- Okruszek A, Książkiewicz J, Wołoszyn J i in. (2006) Effect of laying period and duck origin on egg characteristics. *Archiv für Tierzucht* 49: 400-410.
- Pieszka M, Pompa-Roborzyński M, Baran J (2017). Surowce i produkty drobiarskie a zdrowie konsumenta. *Wiadomości Zootechniczne* 55(4): 118–123.
- Reiner G, Dorau HP, Dzapo V (1995) Cholesterol content, nutrients and fatty acid profiles of ostrich (*Struthio camelus*) egg. *Archiv für Geflügelkunde* 59: 65-68.
- Rhodes MB, Adams JL, Bennett Ni in. (1960) Properties and food uses of ducks eggs. *Poultry Science* 39: 1473- 1478.
- Sieпка E., Bobak Ł, Gładowski W (2015) Charakterystyka aktywności biologicznej fosfolipidów żółtka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 22(2): 15-28.
- Sinanoglou VJ, Strati IF, Miniadis-Meimaroglou S (2011) Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study. *Food Chemistry* 124: 971-977.
- Stępińska M, Niemiec J, Riedel J i in. (1996) Zależność między zawartością cholesterolu w żółtku a wybranymi cechami jakości jaja w kilku stadach zachowawczych kur nieśnych. *Zeszyty Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* 1: 69-71.
- Turk DE, Barnett BD (1971) Cholesterol content of market eggs. *Poultry Science* 50(5): 1303-1206.
- Użarowska M., Surman M., Janik M. (2018). Dwie twarze cholesterolu: znaczenie fizjologiczne i udział w patogenezie wybranych schorzeń. *Kosmos*, 67(2), 375-390.

3. Jaja ekologiczne – hit czy kit?

Organic eggs – hit or flop?

Dawid Ziobro⁽¹⁾, Anna Kłos⁽¹⁾, Małgorzat Stopyra⁽¹⁾, Karolina Wengerska⁽¹⁾, Magdalena Kutrzuba⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Dawid Ziobro: dawid.ziobro@onet.pl

Słowa kluczowe: jakość, chów ekologiczny, zagrożenia, zalety

Streszczenie

Za najbardziej ekstensywne sposoby utrzymania ptaków uważa się system wybiegowy oraz jego certyfikowany odpowiednik, system ekologiczny. Zgodnie z prawodawstwem EU, producenci utrzymujący drób w systemie ekologicznym muszą spełniać bardziej restrykcyjne normy i wymagania w porównaniu do pozostałych systemów. Wymogi te dotyczą pochodzenia ptaków, sposobu ich utrzymania, a także składu i pochodzenia stosowanej paszy. Nie sprecyzowano natomiast jakimi cechami jakości powinien charakteryzować się ekologiczny surowiec jajczarski. Dostępne piśmiennictwo sugeruje, że na korzyść jaj ekologicznych może przemawiać niższy poziom cholesterolu w żółtkach i intensywniejsze ich zabarwienie. Niektórzy autorzy wskazują także na lepszą jakość skorup, czy korzystny profil kwasów tłuszczowych. Z drugiej strony produkcyjność ptaków utrzymywanych ekologicznie jest niższa niż w systemach intensywnych, zaś oprócz korzyści należy brać pod uwagę zagrożenia, jakie stwarza, głównie dla konsumentów, otwarty sposób chowu niosek. Wynikają one z relatywnie niewielkiej kontroli nad żerowaniem ptaków na wybiegu, z niedostatecznego poziomu higieny pozyskanych jaj, możliwej zwiększonej zawartości metali ciężkich czy dioksyn w jajach. Dyskusyjny może być także dobrostan ptaków, w aspekcie możliwego narażenia ich na działanie dodatkowych stresorów podczas bytowania na otwartej przestrzeni. Niezależnie od preferencji konsumentów czy uwarunkowań legislacyjnych, jaja pochodzące od „szczęśliwych kur” należy rozpatrywać jako wypadkową zalet i wad, zwłaszcza pod kątem ich jakości oraz bezpieczeństwa.

1. Wstęp

Coraz większa liczba konsumentów sięga po jaja z chowu ekologicznego. Może to wynikać z chęci prowadzenia zdrowszego trybu życia, przekonania o lepszej jakości jaj od kur utrzymywanych w systemie ekologicznym, bądź o korzyściach zdrowotnych wynikających ze spożywania tych jaj. Aż 24% respondentów mieszkających na terenie Wielkopolski deklaruowało zakup jaj z systemu ekologicznego (Cegielska-Radziejewska i in. 2016). Dla porównania, na terenie województwa lubelskiego po jaja z chowu ekologicznego sięgało zaledwie 9,7% ankietowanych (Wengerska i in. 2020). Zmienność w obrębie regionów może wynikać z szeregu czynników, wśród których należy wymienić dochód na osobę czy dostęp do surowca na rynku. Dodatkowo zainteresowanie konsumentów jajami ekologicznymi jest znacznie mniejsze w regionie Lubelszczyzny charakteryzującym się dużym rozdrobnieniem gospodarstw, co daje to możliwość pozyskiwania jaj od ptaków utrzymywanych w warunkach przydomowych. Krajowi konsumenci najchętniej wybierają jaja średnie lub duże, o beżowym lub jasnobrązowym zabarwieniu skorupy, i z żółtkiem zabarwionym na kolor odpowiadający 8 w skali Roche'a (słonecznie żółte) (Wengerska i in. 2020), może to wynikać z błędnego przekonania, że wyżej wymienione parametry wpływają na jakość jaja i jego właściwości prozdrowotne.

Na podjęcie decyzji przez konsumenta w momencie wyboru jaj składa się wiele czynników. Dotyczą one regulacji prawnych, przekonań własnych odnośnie systemów chowu kur niosek oraz przeświadczenia konsumenta w stosunku do jakości wybranego surowca. Celem pracy było

omówienie jakości oraz bezpieczeństwa jaj pochodzących od kur utrzymywanych w systemie ekologicznym w aspekcie występujących w obiegowej opinii stereotypów na ich temat.

2. Przegląd literatury

2.1 Prawodawstwo

Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji WE nr 589/2008 z dnia 23 czerwca 2008 jaja pochodzące od kur utrzymywanych w systemie ekologicznym powinny posiadać na swojej skorupie oznaczenie „0”. Daje to pewność konsumentom, że dany produkt został wyprodukowany zgodnie z wymogami rolnictwa ekologicznego określonymi w Rozporządzeniu Rady Wspólnoty Europejskiej Nr 1804/1999 z dnia 19 Lipca 1999 roku. Wymogi te w szczególności dotyczą obsady ptaków na m², dostępu do wybiegu, jakości i pochodzenia paszy oraz pochodzenia samych ptaków.

Zgodnie z powyższym rozporządzeniem liczba ptaków przypadających na 1 m² powierzchni kurnika netto (dostępnej dla zwierząt) nie powinna przekroczyć 6 sztuk, ponadto na jedną niosek powinno przypadać minimum 4 m² wybiegu. Pasza przeznaczona do żywienia zwierząt w systemie ekologicznym powinna być wytworzona we własnym gospodarstwie zgodnie z wytycznymi rolnictwa ekologicznego, a jeśli nie ma takiej możliwości powinna pochodzić z innych gospodarstw prowadzących produkcję ekologiczną. Zgodnie z Rozporządzeniem WE 1804/1999 kury przeznaczone do ekologicznej produkcji jaj powinny zostać wyłączone z jaj pochodzących od kur chowanych sposobami ekologicznymi oraz zostać odchowane zgodnie z normami rolnictwa ekologicznego, a w przypadku braku takiej możliwości dopuszczalny jest zakup młodych kurcząt do 18 tygodnia życia pochodzących z gospodarstw nieprowadzących produkcji ekologicznej. W tym przypadku warunkiem zbytu jaj, jako jaja ekologiczne, jest utrzymywanie drobiu zgodnie z wymogami rolnictwa ekologicznego przez okres przynajmniej 6 tygodni od daty zakupu.

2.2 Masa jaja

Potencjalny konsument przy zakupie jaj kieruje się ich wielkością. Jaja o większej masie są zdecydowanie chętniej wybierane aniżeli jaja małe. Większość konsumentów nie zdaje sobie jednak sprawy z tego, że masa jaja jest cechą uwarunkowaną genetycznie, ale też zależy od wieku nioski i wzrasta ona wraz z wiekiem ptaków (Calik 2011). Sokołowicz i in. (2018a) zaobserwowali, że jaja od niosek z systemu ekologicznego charakteryzowały się większą masą w porównaniu z jajami z systemu ściółkowego. Podobnie Clerici i in. (2006) stwierdzili, że nioski utrzymywane w systemie ekologicznym składają jaja o wyższej masie w porównaniu do jaj pochodzących od niosek utrzymywanych w systemie ściółkowym, klatkowym i wybiegowym. Na podstawie dostępnej literatury wydaje się więc, że ekologiczny system utrzymania ptaków może korzystnie wpływać na masę pozyskanych jaj.

2.3 Barwa skorupy

Konsumenci często przy zakupie jaj zwracają uwagę na barwę skorupy sądząc, że odpowiada za nią system chowu niosek oraz traktując jako wskaźnik jakości surowca. Preferencje konsumentów dotyczące koloru skorupy na całym świecie są różne. Włosi, Anglicy, Irlandczycy oraz Portugalczycy preferują głównie jaja o brązowym zabarwieniu skorupy, podczas gdy Holendrzy, Niemcy i Hiszpanie równie chętnie wybierają jaja o brązowym i białym kolorze (Arthur i O'Sullivan 2005). Jednak warto zwrócić uwagę, że barwa skorupy jest cechą uwarunkowaną genetycznie (Roberts, 2004), zaś system chowu ptaków czy żywienie wpływają na nią tylko nieznacznie. Wpływ barwy skorupy na jakość jaj, nie został dotychczas w pełni potwierdzony, gdyż w niektórych pracach wykazano brak zmienności (Odabaşi i in. 2006), podczas gdy doniesienia innych autorów wykazały istotne zależności w tym zakresie (Drabik i in. 2020).

2.4 Wytrzymałość, gęstość i masa skorupy

Jaja z chowu ekologicznego może cechować wyższa wytrzymałość, gęstość i masa skorup w porównaniu do jaj pochodzących od kur utrzymywanych w systemie konwencjonalnym. Lewko i Gornowicz (2010) odnotowały, że gęstość skorup jaj pochodzących od kur utrzymywanych w systemie konwencjonalnym oscyluje w granicach 11 do 23 mg/cm². Mugnai i in. (2009) stwierdzili,

że w ciągu roku badań skorupy jaj od kur utrzymywanych w systemach ekologicznych miały wyższą masę niż w jajach pochodzących od kur utrzymywanych w systemie klatkowym. Największą różnicę odnotowano w sezonie jesiennym, co mogło wynikać z najniższej nieśności ptaków i faktu przełożenia się ilości jaj na ich jakość. Także Küçükyılmaz i in. (2012) zaobserwowali, że jaja pochodzące od kur utrzymywanych w systemie ekologicznym miały znacznie cięższe skorupy w porównaniu do skorup jaj pochodzących od kur tej samej rasy utrzymywanych w systemie klatkowym. Obserwacje te potwierdzają również Gornowicz i in. (2013b), którzy dowiedli, że jakość skorup jaj pozyskanych metodami ekologicznymi kształtuje się na dobrym, pożądanym przez odbiorców poziomie. Wyższa masa, grubość, wytrzymałość skorupy jaj pochodzących od kur z chowu ekologicznego może być spowodowana tym, że ptaki przebywając na wybiegach mają możliwość pobierania drobnych kamieni oraz syntezy witaminy D3 (Bar i in. 1999), bezpośrednio zaangażowanej w proces metabolizmu wapnia.

2.5 Kolor żółtka i jego procentowy udział oraz plamy krwiste

Przy wyborze jaj konsument często zwraca uwagę na kolor żółtka, przy czym chętniej wybierane są te o ciemniejszym zabarwieniu (Strojny i in. 1998). Może to wynikać z przekonania, że za poziom wybarwienia kuli żółtkowej odpowiada system chowu ptaków. Faktycznie za intensywność zabarwienia żółtka odpowiadają karotenoidy zawarte w paszy, które mogą one również być pobierane przez kury na wybiegach ze znajdującej się tam roślinności. Zabarwienie żółtka można jednak modyfikować poprzez dodatek do mieszanek paszowych substancji barwiących takich jak: β -karoten, pochodne kwasu apokarotenowego, kantantynę lub naturalne nośniki substancji barwnych (Wężyk 2003). Stosowanie tych substancji jest zakazane w ekologicznej produkcji drobiarskiej. Gornowicz i in. (2013a) stwierdzili, że żółtka jaj pochodzących od niosek utrzymywanych ekologicznie cechowały się intensywnym i równomiernym wybarwieniem kuli żółtkowej, co odpowiadało preferencjom konsumenta, który przy wyborze surowca kieruje się zmysłem wzroku. Intensywniejsze zabarwienie żółtka w jajach z chowu wybiegowego oraz systemu ekologicznego w porównaniu z jajami z systemu ściółkowego wskazuje, że system utrzymania z dostępem do zielonego wybiegu wpływa korzystnie na barwę żółtka (Sokołowicz i in. 2018a).

Dla konsumentów istotną cechą jakościową jest proporcja żółtka w masie jaja. Stwierdzono, że jaja pochodzące od kur utrzymywanych w ekologicznym systemie chowu mają wyższą procentową zawartość żółtka (27,29%) w porównaniu do jaj pochodzących od kur utrzymywanych w systemie klatkowym (26,73%) (Kucukyilmaz i in. 2012). Wynika to z faktu, że jaja o niższej masie, charakteryzują się wyższym udziałem żółtka, co tłumaczy wpływ systemu utrzymania ptaków na kształtowaniu tej cechy jaj kurzych. Ponadto w jajach pochodzących od niosek z dostępem do wybiegów obserwuje się zwiększoną częstotliwość występowania plam krwistych. Przyczyną tego zjawiska może być fakt przebywania ptaków na wybiegach oraz narażenia na działanie dodatkowych stresorów, takich jak drapieżniki oraz hałas (Campo i in. 2012).

2.6 Poziom cholesterolu i profil kwasów tłuszczowych

Według przekonań konsumentów, jaja pochodzące z chowu ekologicznego cechują się znacznie niższym poziomem cholesterolu oraz korzystnym stosunkiem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-6 do n-3 w porównaniu do pozostałych systemów chowu. Z dotychczas przeprowadzonych badań nie wynika jednoznacznie, że ekologiczny system chowu wpływał na podwyższenie bądź obniżenie poziomu cholesterolu. W chowie ekologicznym zróżnicowanie poziomu cholesterolu oraz składu kwasów tłuszczowych w żółtku jaja mogą wynikać z naturalnego żerowania ptaków na wybiegu oraz zasobności pastwiska. Krawczyk (2009) stwierdziła, że kury z systemu ekologicznego znosiły jaja o najniższej zawartości cholesterolu (na g żółtka) w porównaniu do niosek utrzymywanych w chowie przydomowym oraz systemie intensywnym. Natomiast Minelli i in. (2007) stwierdzili, że jaja ekologiczne cechowały się wyższą zawartością cholesterolu niż jaja pochodzące od niosek utrzymywanych w systemie konwencjonalnym (odpowiednio 1,26% i 1,21%).

Udowodniono, że skład gatunkowy szaty roślinnej porastającej wybiegi znacząco wpływa na skład kwasów tłuszczowych w żółtku, szczególnie na wzrost zawartości kwasów omega 3 oraz zmniejszenie zawartości kwasów omega 6 (Mugnai i in. 2014). Sokołowicz i in. (2018b) porównując jaja pochodzące od kur utrzymywanych w systemie ściółkowym, wybiegowym i ekologicznym

wykazali, że zawartość kwasów omega 6 (PUFA n-6) był niższa w jajach od niosek z chowu ekologicznego i wybiegowego w porównaniu z chowem ściółkowym, zawartość kwasów omega 3 (PUFA n-3) była wyższa w jajach pochodzących od niosek z systemu ekologicznego i wybiegowego w porównaniu z jaj z chowu ściółkowego oraz stosunek kwasów omega 6 do kwasów omega 3 (PUFA 6/3) był korzystniejszy w jajach pochodzących od niosek z systemu ekologicznego i wybiegowego w porównaniu do jaj z systemu ściółkowego. Niezależnie od wieku niosek w chowie ekologicznym w jajach utrzymuje się korzystny niski stosunek kwasów n-6 do n-3 (Sokołowicz in. 2012).

2.7 Witaminy

Jaja pochodzące od kur utrzymywanych ekologicznie mogą się cechować wyższą zawartością witamin rozpuszczalnych w tłuszczach w porównaniu z pozostałymi systemami chowu. Dowiedziono, że jaja pochodzące od kur z tego systemu zawierały więcej β -tokoferolu w porównaniu z jajami od niosek z systemu klatkowego (Matt i in. 2009). Sokołowicz i in. (2012) zaobserwowali, że zielononóżki kuropatwiane w warunkach chowu ekologicznego składają jaja charakteryzujące się wysoką zawartością witamin A i E. Wyższe stężenie witamin w jajach pochodzących od kur z dostępem do wybiegów mogą wynikać z faktu spożywania przez drób znajdującej się tam roślinności, która posiada związki będące prekursorami niektórych witamin. Nie bez znaczenia dla poziomu koncentracji witamin w żółtku jaj jest również skład gatunkowy flory dostępnej dla ptaków. Króliczewski (2017) stwierdził, że dostępność do wysokiej jakości traw na wybiegu może być przyczyną dwukrotnie wyższego stężenia witaminy K2 w żółtkach jaj od niosek utrzymywanych w Holandii w porównaniu do żółtek jaj pochodzących z USA, gdzie ptaki miały dostęp do znacznie uboższych gatunkowo wybiegów zielonych.

2.8 Metale ciężkie i dioksyny

Jako potencjalne zagrożenie dla konsumenta wynikające ze spożywania jaj ekologicznych należy wskazać możliwe zwiększone stężenie metali ciężkich i dioksyn w surowcu pochodzącym z tego systemu. W systemie ekologicznym nioski przebywając na wybiegach mają możliwość pobierania elementów mineralnych wraz z zanieczyszczeniami znajdującymi się w ziemi (Sobczak 1999), co może prowadzić do wyższego stężenia metali ciężkich. Drabik i in. (2018) stwierdzili w jajach pochodzących z ekologicznego systemu chowu znacznie wyższe stężenie metali ciężkich, takich jak ołów i kadm, w porównaniu do jaj pochodzących z intensywnego systemu klatkowego. Natomiast Polonis i Dmoch (2007) odnotowali najwyższe średnie stężenie miedzi w białku jaj pochodzących od niosek z chowu przyzagrodowego. Podobnie jak w przypadku metali ciężkich, niższą zawartością dioksan cechują się jaja pochodzące z chowu klatkowego oraz ściółkowego w porównaniu do systemu wybiegowego. Zjawisko to może być powodowane żerowaniem niosek na zanieczyszczonych glebach (Schoeters i Hoogenboom 2006), które w systemach intensywnych jest minimalizowane poprzez kontrolę nad żywieniem ptaków.

2.9 Higiena i zanieczyszczenia mikrobiologiczne

Chów ekologiczny jest certyfikowanym odpowiednikiem chowu wybiegowego. Jaja pochodzące od kur utrzymywanych w tym systemie mogą się cechować niedostatecznym poziomem higieny utrzymanego surowca jajczarskiego. Głównie dlatego, że często nie są znoszone w przeznaczonych do tego celu gniazdach, ale na wybiegu, bądź na ściółce, co powoduje ich zabrudzenie odchodami ptaków lub glebą. Prowadzi to do zwiększenia ryzyka skażenia skorupy jaja szkodliwymi drobnoustrojami takimi jak *E. Coli*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* oraz *Yersenia* (Jones i in. 2004). Belkot i Gondek (2014) stwierdzili, że najniższym poziomem zanieczyszczenia bakteriynego cechowały się jaja z chowu klatkowego, a istotnie wyższym z chowu ekologicznego, ściółkowego i wolno wybiegowego. Nie wykazali jednak istotnych różnic pomiędzy chowem ekologicznym a wybiegowym. Natomiast Gondek i in. (2013) zaobserwowali, że jaja pochodzące od kur utrzymywanych w systemie wybiegowym i ekologicznym były zanieczyszczone w większym stopniu bakteriami z rodzaju *Listeria* w porównaniu do jaj pochodzących od kur utrzymywanych w zamkniętym systemie ściółkowym.

3. Podsumowanie

Na podstawie dostępnego piśmiennictwa nie da się jednoznacznie stwierdzić czy jaja ekologiczne cechują się wyższą jakością w porównaniu do pozostałych systemów. Na korzyść ekologicznego chowu drobiu może przemawiać niższy poziom cholesterolu, korzystny stosunek kwasów tłuszczowych, intensywniejsze zabarwienie żółtka, a także większy jego procentowy udział w jajach. Jednak nie należy zapominać o ograniczonej kontroli nad żywieniem ptaków i ich behawiorem, co może sprzyjać obniżeniu poziomu higieny pozyskiwanych jaj oraz pojawieniu się w surowcu substancji szkodliwych.

4. Literatura

- Arthur JA, O'Sullivan N (2005) Breeding chickens to meet egg quality needs. *International Hatchery Practice* 19: 7-9
- Bar A, Vax E, Striem S (1999) Relationships egg quality. *Poultry Science* 69:781-786
- Bełkot Z, Gondek M (2014) Zanieczyszczenie bakteryjne powierzchni jaj spożywczych w zależności od systemu utrzymania kur niosek. *Medycyna Weterynaryjna* 70(6): 378-382
- Calik J (2011) Ocena jakości jaj sześciu rodów kur nieśnych w zależności od ich wieku. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 18(5): 85-93
- Campo JL, Cabezas R, Torres O i in. (2012) Egg quality and welfare of white-, tinted-, and brown-shell egg layers in three different non-cage housing systems. *Archiv für Geflügelkunde* 77 (3): 179- 188
- Cegielska-Radziejewska R, Szablewski T, Bochnia K i in. (2016). Preferencje konsumentów jaj w Wielkopolsce i wybranym regionie Holandii. *Żywność dla świadomego konsumenta*: 64-72
- Clerici F, Casiraghi E, Hidalgo A i in. (2006) Evaluation of eggshell quality characteristics in relation to the housing system of laying hens. In XII European Poultry Conference: 10-14
- Drabik K, Batkowska J, Vasiukov K i in. (2020) The impact of eggshell colour on the quality of table and hatching eggs derived from Japanese quail. *Animals* 10(2): 264
- Drabik K, Chabroszewska P, Vasiukov K i in. (2018) Wpływ systemu chowu na zawartość metali ciężkich w jajach. [W:] *Nauki Przyrodnicze i Medyczne: Świat żywy a technologie w otoczeniu ludzi i zwierząt*: 93-98
- Gondek M, Szkucik K, Bełkot Z (2013) Wpływ różnych systemów utrzymania kur na zanieczyszczenie powierzchni jaj bakteriami chorobotwórczymi. *Medycyna Weterynaryjna* 69(6): 374-377
- Gornowicz E, Lewko L, Szablewski T (2013a) Ekologiczny chów kur jako czynnik kształtujący jakościowe cechy żółtka jaja. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 58(3): 161-164
- Gornowicz E, Węglarzy K, Szablewski T (2013b) Jakość skorupy jaj pozyskanych metodami ekologicznymi. *Wiadomości Zootechniczne* 4(51): 19-30
- Jones DR, Musgrove MT, Northcutt JK (2004) Variations in external and internal microbial populations in shell eggs during extended storage. *Journal of Food Protection* 67: 2657-2660
- Krawczyk J (2009) Quality of eggs from Polish native Greenleg Partridge chicken hens maintained in organic vs. backyard production systems. *Animal Science Papers and Reports*, 27(3): 227-235
- Króliczewski B (2017) Cenne składniki żółtka jaja. *Polskie Drobiarstwo* 5: 2-7
- Küçükyılmaz K, Bozkurt M, Herken EN i in. (2012) Effects of rearing systems on performance, egg characteristics and immune response in two layer hen genotype. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25(4): 559
- Lewko L, Gornowicz E (2010) Wyniki badań jakości jaj wybranych krajowych rodów hodowlanych kur nieśnych. *Wyniki oceny wartości użytkowej drobiu w 2009 roku*, Warszawa: 99–111
- Matt D, Veromann E, Luik A (2009) Effect of housing systems on biochemical composition of chicken eggs. *Agronomy Research* 7(2): 662-667
- Minelli G, Sirri F, Folegatti E, Meluzzi A, Franchini A (2007) Egg quality traits of laying hens reared in organic and conventional systems. *Italian Journal of Animal Science* 6(1): 728-730

- Mugnai C, Dal Bosco A, Castellini C (2009). Effect of rearing system and season on the performance and egg characteristics of Ancona laying hens. *Italian Journal of Animal Science* 8(2): 175-188
- Mugnai C, Sossidou EN, Dal Bosco A i in. (2014) The effects of husbandry system on the grass intake and egg nutritive characteristics of laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(3): 459-467
- Odabaşı AZ, Miles RD, Balaban MO i in. (2006) Vitamin C overcomes the detrimental effect of vanadium on brown eggshell pigmentation. *Journal of Applied Poultry Research* 15(3): 425-432
- Polonis A, Dmoch M (2007) Heavy metals and some elements in the eggs of factory farmed hens and backyard hens. *Annales of Animals Science* 7(2): 337-343
- Roberts JR (2004) Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *The Journal of Poultry Science* 41(3): 161-177
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 589/2008 z dnia 23 czerwca 2008 r., ustanawiające szczegółowe zasady wykonywania rozporządzenia Rady (WE) nr 1234/2007 w sprawie norm handlowych w odniesieniu do jaj. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* L, 163: 6-23
- Schoeters G, Hoogenboom R (2006) Contamination of free-range chicken eggs with dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls. *Molecular Nutrition & Food Research* 50(10): 908-914
- Sobczak J, Waligóra T (1999) Wpływ alternatywnej technologii chowu kur stad towarowych na ich wyniki produkcyjne. *Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego* 45: 205-214
- Sokołowicz Z, Krawczyk J, Dykiel M (2018a) The effect of the type of alternative housing system, genotype and age of laying hens on egg quality. *Annals of Animal Science* 18(2): 541-556
- Sokołowicz Z, Krawczyk J, Dykiel M (2018b) Effect of alternative housing system and hen genotype on egg quality characteristics. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 30(8): 695-703
- Sokołowicz Z, Krawczyk J, Herbut E (2012) Jakość jaj z chowu ekologicznego w pierwszym i drugim roku użytkowania niosek. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 4(83): 185-194
- Strojny J, Krawczyk J, Cywa-Benko K i in. (1998) Upodobania konsumentów jaj. *Polskie Drobiarstwo* 7(6): 3-5
- Wengerska K, Woronowa A, Wajcht A i in. (2020) Preferencje konsumentów jaj w regionie Lubelszczyzny (Preferences of eggs' consumers in Lublin region). [W:] Nyćkowiak J, Leśny J (red. nauk.): *Nauki przyrodnicze: fauna i hodowla zwierząt. Młodzi Naukowcy*, Poznań: 102-108
- Wężyk S (2003) Znaczenie kantaksantyny w żywieniu drobiu. *Polskie Drobiarstwo* 8: 18-20

4. Wybrane pasze gospodarskie w żywieniu drobiu a ich wpływ jakość pozyskiwanego surowca

Selected farm fodders in poultry nutrition and their impact on the quality of obtained raw materials

Dawid Ziobro⁽¹⁾, Kinga Rokicka⁽¹⁾, Małgorzat Stopyra⁽¹⁾, Dominika Krakowiak⁽¹⁾,
Damian Spustek⁽¹⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Dawid Ziobro: dawid.ziobro@onet.pl

Słowa kluczowe: produktywność, jaja, mięso, zabarwienie żółtka, cholesterol

Streszczenie

Wykorzystanie pasz gospodarskich w żywieniu drobiu może przełożyć się na wzrost opłacalności produkcji oraz poprawę jakości pozyskiwanych surowców. Ich stosowanie jako komponentu do mieszanek paszowych może korzystnie wpływać na barwę żółtka, poziom cholesterolu, zawartość witamin i luteiny oraz proporcje kwasów tłuszczowych, przyczyniając się tym samym do możliwości poprawy jakości i wartości odżywczej pozyskiwanego surowca. Obecnie pasze gospodarskie wykorzystywane są głównie w systemie ekologicznym, wybiegowym oraz amatorskim chowie przydomowym. Ze względu na pewne aspekty wynikające z ich stosowania zyskują coraz większe znaczenie w konstruowaniu dawek pokarmowych dla drobiu utrzymywanego w systemach intensywnych. Ponadto ich wykorzystanie można w różny sposób wpływać na zdrowotność ptaków, pozytywnie usprawniając funkcjonowanie przewodu pokarmowego lub negatywnie ze względu na obecność substancji antyżywniowych. W pracy omówiono możliwy wpływ zastosowania pasz gospodarskich takich jak zboża oraz śruty zbożowe, otręby, zielonki i rośliny okopowe na jakość pozyskiwanych surowców (jaj i mięsa).

1. Wstęp

Właściwie zbilansowane żywienie drobiu jest podstawowym warunkiem zdrowotności, właściwego dobrostanu i uzyskania produktywności oraz jakości produktu na dobrym poziomie. Drob grzebiący ma znacznie większe wymagania odnośnie jakości paszy niż większość innych zwierząt gospodarskich. Wiąże się to z szybką przemianą materii, tempem wzrostu, krótszym okresem dojrzewania płciowego oraz wyższą ciepłotą ciała. Wartość pokarmowa mieszanek paszowych powinna być dostosowana do gatunku, typu użytkowego i stanu fizjologicznego ptaków. Prawidłowe żywienie ptaków to niezwykle ważny czynnik przyczyniający się do utrzymania stada w dobrej kondycji fizycznej oraz uzyskania wysokiej produktywności.

W aspekcie produkcji nieśnej istotne jest nie tylko uzyskanie znacznej liczby jaj o dobrej jakości, lecz, przede wszystkim, ich możliwie najwyższa wartość biologiczna. Znajdujące się w paszy substancje nie tylko wpływają na smak i aromat treści jaj, ale również na ich konsystencję (Lewko i Gornowicz 2015) i zabarwienie żółtka (Kuchta i in. 1999). Od odpowiednio zbilansowanej diety zależą m.in. jakościowe parametry jaja, jego podstawowych frakcji oraz profil kwasów tłuszczowych w żółtku (Ahn i in. 1999).

Celem pracy było omówienie wpływu zastosowania pasz gospodarskich takich jak zboża i śruty zbożowe, otręby, zielonki, rośliny okopowe na jakość pozyskiwanego surowca.

* SKN działa pod patronatem Krajowej Rady Drobiarstwa, Izba Gospodarcza w Warszawie

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1 Zboża oraz śruty zbożowe

Najczęściej wykorzystywaną paszą gospodarską w żywieniu drobiu są ziarna zbóż takie jak pszenica, owies, jęczmień oraz sorgo. W mieszankach paszowych zarówno dla kur nieśnych, jak i brojlerów są one podstawowym źródłem energii.

Pszenica jest najczęściej stosowanym ziarnem zbóż w żywieniu drobiu. Wykorzystanie pszenicy w żywieniu brojlerów kurzych może być przyczyną szybszych przyrostów nawet o 20% oraz mniejszego zużycia paszy o 13% w porównaniu do brojlerów żywionych dietą opartą na sorgo (Black i in. 2005). Natomiast Laudadio i in. (2010) stwierdzili, że włączenie do diety śruty pszennej nie wpływa na spożycie paszy, masę ciała, przyrosty i współczynnik wykorzystania paszy u brojlerów. Należy jednak pamiętać, że pszenica zawiera pentozany które mogą być substancją antyodżywczą w diecie brojlerów (Choct i Anninson 1990).

Jednym z często stosowanych zbóż w żywieniu drobiu jest owies nagi, charakteryzujący się wysoką zawartością lizyny, której niedobory mogą powodować obniżoną nieśność oraz otluszczenie się ptaków. Wg Kosieradzkiej i Fabiańskiej (1999) ze względu na dużą zawartość rozpuszczalnych β -glukanów może tylko częściowo zastąpić kukurydzę i pszenicę w mieszankach dla drobiu (maks. do 40%) ze względu na negatywny wpływ substancji antyżywniowych owsa na przewod pokarmowy ptaków, tj. rozdęcie żołądka, związane z żelującymi i pęczniącymi właściwościami polisacharydów nieskrobiowych, oraz wzrost lepkości treści jelitowej, co powoduje pogorszenie strawności składników pokarmowych. Dopiero zastosowanie enzymu (β -glukanazy) umożliwia całkowite zastąpienie nim innych zbóż. Cave i in. (1989) wykazali, że owies nagi może stanowić alternatywę dla kukurydzy jako podstawowego ziarna w diecie kur niosek i może zastąpić część śruty sojowej tradycyjnie stosowanej w takich paszach. Uzupełnienie lizyną plus metioniną lub śrutą rzepakową nie wymaga stosowania śruty sojowej w paszy z owsa nagego. Udział owsa do odpowiednio 675 i 874 g w kilogramie paszy dla kur może poprawić ich wydajność nieśną i zwiększyć masę jaj przy jednoczesnym zmniejszeniu wykorzystania paszy. Dodatek owsa nagego w ilości 20% dawki paszowej może przyczynić się również do wzrostu produkcji nieśnej przepiórek (Szczurbińska i in. 1999).

Owies oplewiony ma szczególne znaczenie w żywieniu gęsi w porównaniu do pozostałych gatunków drobiu. Gęsi tuczone owsem nagi mogą charakteryzować się niższą masą ciała oraz mniejszymi przyrostami w porównaniu do gęsi żywionych owsem oplewionym. Ponadto żywienie owsem nagim może wpływać na niższą masę schłodzonej tuszy w porównaniu do tusz gęsi żywionych owsem oplewionym (Bielińska i in. 2018). Owies przeznaczony do żywienia gęsi powinien charakteryzować się około 14% zawartością białka (Kłopotek i Brzóska 2018). Jednak, w zależności od formy fizycznej owsa, efekty produkcyjne gęsi mogą być różne. Kłopotek (2018) porównując całe ziarno, gniecione i śrutowane stwierdził, że najlepsze efekty produkcyjne uzyskały ptaki żywione całym ziarnem owsa, nieco mniejsze owsem gniecionym, zaś istotnie gorsze śrutowanym. Ponadto zaobserwował wyższą masę ubojową gęsi spożywających owies cały i gnieciony, w porównaniu do owsa śrutowanego oraz wyższą masę mięśni piersiowych i mięśni kończyny, przy wzroście masy skóry i tkanki tłuszczowej.

Jęczmień nie jest często stosowany w żywieniu drobiu ze względu na wysoką zawartość włókna surowego, wielocukrów nie skrobiowych, alkaloidów, kwasu fitynowego, tanin, glukozyolanów i związków o działaniu antyproteolitycznym, które utrudniają wchłanianie aminokwasów oraz przepływ treści przez jelita. Ponadto trawienie metioniny pochodzącej z jęczmienia, mającej niezwykle istotne znaczenie w przyrostach masy ciała, wynosi zaledwie 75-79%, gdy w przypadku kukurydzy czy śruty sojowej ok. 90% (Szczurek 2006). Co więcej Bennett i Cassen (2003) wskazują, że udział jęczmienia zwiększony do 60% zmniejsza masę jaj oraz obniża nieśność przy jednoczesnym zwiększeniu spożycia paszy.

W krajach, w których występuje duży deficyt wody, w żywieniu drobiu powszechnie stosowane jest sorgo, jednak w Polsce jest to zboże o niewielkim znaczeniu (Różewicz 2020). Zastosowanie żywienia opartego sorgo w żywieniu kur niosek może się przyczynić do słabszego wykorzystania energii w porównaniu do żywienia opartego pszenicy. Słabe wykorzystanie energii

z diet opartych na sorgo można przypisać niskiej dostępności aminokwasów, ze względu na niską zawartość i strawność białek (Black i in. 2005). Według badań przeprowadzonych przez Jacob i in. (1996) nasiona sorgo negatywnie wpływają zarówno na masę ciała brojlerów, jak i na nieśność niosek. Dodatkowo Gualtieri i Rapaccini (1990) odnotowali także jaśniejszą barwę mięsa brojlerów skarmianych sorgiem oraz jaśniejszy kolor żółtka jaj w porównaniu do jaj niosek żywionych kukurydzą. Sorgo może być dobrym zamiennikiem kukurydzy w diecie piskląt bez negatywnego wpływu na ich masę ciała (Smith i in. 1989),

W żywieniu drobiu jako pasza gospodarska stosowane są również różnego rodzaju śruty, otrzymane w wyniku rozdrobnienia nasion roślin uprawnych. Najczęściej produkuje się śrutę zbożową, ale może być także produkowana z innych nasion, np. roślin motylkowych (strączkowych) lub oleistych.

Najbardziej powszechnie stosowaną śrutą zbożową w żywieniu drobiu jest śruta pszena. Patterson i in. (1988) porównując diety zawierające 89, 43 lub 20% śruty pszennej stwierdzili, że dieta zawierająca 89% śruty pszennej mogła się przyczynić do obniżenia produktywności niosek, wzrostu spożycia paszy oraz gorszego jej wykorzystania w porównaniu z dietą kontrolną opartą na kukurydzy, śrucie sojowej i mączce z lucerny. Odnotowano także poprawę jakości białka wyrażoną liczbą jednostek Haugh'a oraz spadek intensywności wybarwienia żółtka wraz ze wzrostem ilością śruty pszennej w diecie.

Równie często, co śrutę pszeną w żywieniu drobiu wykorzystuje się śrutę kukurydzianą. Milošević i in. (2011) porównując dietę opartą na ziarnie kukurydzy do diet opartej na grysie kukurydzianym w żywieniu brojlerów kurzych wykazali niższą zawartość tłuszczu około jelitowego u ptaków żywionych rozdrobnioną kukurydzą (grysem) w stosunku do całych ziaren.

2.2 Otręby

Otręby zbożowe to uboczny produkt powstający podczas mielenia zbóż. W mieszankach dla drobiu otręby można stosować w ograniczonej ilości, maksymalnie do 10% mieszanki pełnoporcjowej. Zbyt duży ich dodatek może powodować biegunki. Najczęściej stanowią one składnik paszy dla drobiu dorosłego, któremu należy ograniczyć paszę, przeciwdziałając m.in. zatuczaniu niosek, dlatego wykorzystywane są przede wszystkim w żywieniu stad rodzicielskich kur i indyków (Rutkowski i Lipiec 2012).

Otręby pszenne zawierają dużo włókna (9%), 14-15% białka oraz wysoką zawartość składników mineralnych i witamin z grupy B, ale także fitazę roślinną, naturalny enzym przyczyniający się do poprawy przyswajania fosforu z pasz zbożowych, w których występuje on najczęściej w formie niestrawnych fitynianów. Yao i in. (2007) badając wpływ fitazy mikrobiologicznej oraz roślinnej wykazali, że fitaza z otręb pszennych może poprawić wydajność produkcyjną kur niosek oraz wykorzystanie fosforu ogólnego i białka surowego. Wyniki te mogą sugerować, że w diecie kur niosek możliwe jest całkowite zastąpienie dodatku nieorganicznego fosforu przez otręby pszenne oraz mikrobiologiczną fitazę. Dodatkowo Wanzenböck i in. (2018) nie zaobserwowali negatywnego wpływu dodatku otręb pszennych na masę jaja, masę skorupy, białka i żółtka, a także grubość i wytrzymałość skorup. Jednak ich dodatek miał pozytywny wpływ na zwiększoną zawartość α -tokoferolu. Zastosowanie w żywieniu brojlerów otręb pszennych w ilości 30 % nie wpływa negatywnie na ich wydajność, lecz może wywierać korzystny wpływ na zdolności oksydacyjne osocza (Ali i in. 2008).

Ponadto w żywieniu drobiu można stosować dodatek łuski owsianej do paszy. Włączenie jej do diety opartej na pełnoziarnistej bądź mielonej pszenicy przyczynia się do zwiększenia rozmiarów żołądków brojlerów oraz poprawienia strawności skrobi (Hetland i in. 2003). Może także przyczynić się do większego zużycia paszy oraz wzrostu względnej masy jelit u tych ptaków (Hetland i in. 2001).

Otręby żytnie nie powinny być stosowane w żywieniu drobiu ze względu na zbyt dużą zawartość szkodliwych dla drobiu alkilorezorcynoli. Pawlik i in. (1976) sugerują, że ich obecność w paszy może przyczyniać się do powiększenia wątroby, a nawet jej uszkodzenia.

2.3 Zielonki

Zielonki wykorzystuje się głównie w żywieniu gęsi i kaczek, w żywieniu drobiu grzebiącego stosuje się je w niewielkich ilościach i przy niewielkich stadach. Najbardziej wartościowymi

zielonkami jest lucerna, koniczyna, pokrzywa. Ponadto korzystanie przez kury z zielonych wybiegów pozwala na uzupełnienie dziennej dawki paszowej naturalnymi barwnikami, gdyż ptaki żerują na zielonych częściach roślin, które są źródłem barwników-ksantofili (Sobczak i Marek 2012). W niektórych krajach jak np. w USA, dodawanie do paszy syntetycznych pigmentów jest zabronione. Alternatywą może być stosowanie kukurydzy, lucerny czy aksamitki. Wspomniane wcześniej rośliny przez zawarty w nich żółty ksantofil znacząco zmieniają barwę żółtka (Rowghani i in. 2006). Przy dostępie kur do zielonych wybiegów utrzymuje się korzystny, wąski stosunek kwasów tłuszczowych n6:n3 w żółtkach jaj, zaś rośliny pobierane na wybiegu są dobrym, dodatkowym źródłem witamin dla niosek. Rośliny te są zasobne w β -karoten, będący prowitaminą A (Sokołowicz i in. 2012).

Ponadto Lewko i Gornowicz (2015) wykazują, że jakość białka jaj kur nieśnych może być stymulowana poprzez dodatek do standardowych mieszanek paszowych preparatów roślinnych w postaci suszonej (zioła) lub świeżej (zielonka). Wzbogacenie standardowej mieszanki paszowej odpowiednio zbilansowaną kompozycją dobrej jakości suszonych ziół (szałwia, mięta, majeranek) w ilości 5% może oddziaływać na zawartość oraz aktywność lizozymu w jajach.

2.4 Okopowe

Rośliny okopowe wykorzystuje się głównie w żywieniu drobiu utrzymywanego w małych stadach, najczęściej w warunkach chowu przydomowego oraz w żywieniu drobiu wodnego. Jednak ich zastosowanie nie ma większego znaczenia w żywieniu kur (Kijowski 2001). Do roślin okopowych zalicza się między innymi marchew, ziemniaki, bataty (ziemniaki słodkie) oraz buraki ćwikłowe (czerwone). Hammershøj i in. (2010) stwierdzili, że wykorzystanie marchwi czerwonej, fioletowej i żółtej w żywieniu drobiu nieśnego wpływa korzystnie na wybarwienie żółtek oraz zawartość karotenoidów, przez co daje możliwość poprawy wartości odżywczej jaj. Natomiast Souza i in. (2019) stwierdzili, że dodatek mączki z buraków czerwonych przyczynił się do zwiększenia masy jaja oraz stężenia retinolu w żółtkach jaj w porównaniu z dietami z sorgo i śruty sojowej. Dodatek mączki z marchwi do paszy wpływa korzystnie na kolor żółtka jaja.

W żywieniu drobiu często wykorzystuje się również ziemniaki. W postaci parowanej stanowią one bogate źródło węglowodanów. Nie powinny być stosowane w żywieniu drobiu młodego ponieważ są paszą o małej wartości odżywczej, jednak są bardzo chętnie pobierane i mogą stanowić paszę objętościową np. w chowie indyków rzeźnych (Batkowska i Brodacki 2012). Interesujące może być również wykorzystanie słodkich ziemniaków. Literatura wskazuje, że są one bogatym źródłem witamin, mikroelementów oraz barwników takich jak β -karoten (Woolfe 1992). Takenoyama i in. (2007) stwierdzili, że dodatek słodkich ziemniaków do paszy wpływa na wzrost zawartości α -tokoferolu oraz luteiny w żółtku jaja.

3. Podsumowanie

Wykorzystanie pasz gospodarskich w żywieniu drobiu może wpływać na jakość pozyskiwanego surowca. W przypadku jaj do zalet wynikających ze stosowania pasz gospodarskich (marchew, zielonki) można zaliczyć intensywniejsze zabarwienie żółtka, obniżenie poziomu cholesterolu w żółtku jaja, oraz zwiększenie masy jaja i zawartości witamin w żółtku. Natomiast w żywieniu ptaków typu mięsnego pasze objętościowe zapobiegają nadmiernemu otluszczeniu oraz korzystnie zmieniają profil kwasów tłuszczowych, warunkując oprócz wartości odżywczej także trwałość pozyskiwanego surowca. Bezsporną jest także korzyść ekonomiczna. Pasze wytwarzane są w gospodarstwie, dlatego też nie wymagają dużych nakładów finansowych dając przy tym znaczną swobodę hodowcy w aspekcie komponowania czy wzbogacania diety ptaków.

4. Literatura

- Ahn DU, Sell JL, Jo C i in. (1999) Effect of dietary conjugated linoleic acid on the quality characteristics of chicken eggs during refrigerated storage. *Poultry Science* 78: 922–928.
- Ali MN, Abou Sekken MS, Mostafa KEKME (2008) Incorporation of wheat bran in broiler diets. *International Journal of Poultry Science* 7: 6-13.

- Batkowska J, Brodacki A (2012) The usefulness of different commercial strains of slaughter turkey females for extensive system of management and feeding. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A–Animal Science* 62(3): 135-141.
- Bennett CD, Classen HL (2003) Performance of Two Strains of Laying Hens Fed Ground and Whole Barley with and Without Access to Insoluble Grit. *Poultry Science* 82: 147-149.
- Bielińska H, Pietras M, Orczewska-Dudek S i in. (2018) Effect of naked oat on fattening and slaughter parameters and selected blood parameters of White Kołuda® geese. *Roczniki Naukowe Zootechniki* 45: 49-58.
- Black JL, Hughes RJ, Nielsen SG i in. (2005) The energy value of cereal grains, particularly wheat and sorghum, for poultry. *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium* 17: 21-29.
- Cave NA, Hamilton RMG., Burrows VD (1989) Evaluation of naked oats (*Avena nuda*) as a feedingstuff for laying hens. *Canadian Journal of Animal Science* 69(3): 789-799.
- Choct M, Annison G (1990) Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *British Poultry Science* 31: 811-821.
- Gualtieri M, Rapaccini S (1990) Sorghum grain in poultry feeding. *World's Poultry Science Journal* 46: 246-254.
- Hammershøj M, Kidmose U, Steinfeldt S (2010) Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as forage material for egg-laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(7): 1163-1171.
- Hetland H, Svihus B (2001) Effect of oat hulls on performance, gut capacity and feed passage time in broiler chickens. *British Poultry Science* 42(3): 354-361.
- Hetland H, Svihus B, Krogdahl Å (2003) Effects of oat hulls and wood shavings on digestion in broilers and layers fed diets based on whole or ground wheat. *British Poultry Science* 44: 275-282.
- Jacob JP, Mitaru BN, Mbugua PN i in. (1996) The feeding value of Kenyan sorghum, sunflower seed cake and sesame seed cake for broilers and layers. *Animal Feed Science and Technology* 61: 41-56.
- Kijowski J (2001) Bezpieczeństwo zdrowotne i jakość żywieniowa mięsa drobiowego i jaj. *Żywność Nauka Technologia Jakość*. 8: 82-92.
- Kłopotek E (2018) Wpływ postaci fizycznej ziarna owsa na efekty tuczu i jakość tuszek gęsi Białych Kołudzkich. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* 14: 23-36.
- Kłopotek E, Brzóska F (2018) Produkcja, skład chemiczny i wartość pokarmowa ziarna owsa w żywieniu gęsi rzeźnych. *Wiadomości Zootechniczne* 56: 178-187.
- Kosieradzka I, Fabijańska M (1999) Zastosowanie owsa nagiego w mieszankach dla kurcząt brojlerów. *Żywność (Supl.)* 1(18): 224-230.
- Kuchta M, Gornowicz E, Koreleski J (1999) Wpływ kantaksantyny na barwę żółtka jaj kurzych w zależności od zawartości pigmentów żółtych w paszy. *Roczniki Naukowe Zootechniki* 26(1): 229-241.
- Laudadio V, Modugno GD, Laporta L i in. (2010) Wheat-middlings in poultry diet and its effect on broiler performance. [W:] 2nd Workshop Feed-to-Food FP7 REGPOT-3. XIV International Symposium feed technology, Proceedings. Novi Sad, Serbia, 19-21 October, 2010, 41-44.
- Lewko L, Gornowicz E (2015) Żywienie ptaków – możliwości kształtowania się jakości białka jaja kurzego z uwzględnieniem właściwości lizozymu. *Wiadomości Zootechniczne* 53(4): 16-24.
- Milošević N, Stanačev V, Nikolova N i in. (2011) Corn meal in broiler chicken nutrition. *Macedonian Journal of Animal Science* 1: 107-111.
- Patterson PH, Sunde ML, Schieber EM i in. (1988) Wheat middlings as an alternate feedstuff for laying hens. *Poultry Science* 67: 1329-1337.
- Pawlik J, Kudrewicz-Hubicka Z, Wilusz T (1976) Wpływ ziarna żyta i zawartości w nim alkilorezorcynoli na wzrost i wydajność rzeźną oraz zachowanie się białek surowicy krwi kurcząt brojlerów. *Roczniki Naukowe Zootechniki* 5: 10 -125.
- Rowghani E, Maddahian A, Abousadi MA (2006) Effects of addition of marigold flower, safflower petals, red pepper on egg-yolk color and egg production in laying hens. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(7): 1333-1337.

- Różewicz M (2020) Potencjał uprawy sorga w Polsce oraz wartość paszowa i możliwość wykorzystania jego ziarna w żywieniu drobiu. *Wiadomości Zootechniczne* 1: 39–48.
- Rutkowski A, Lipiec A (2012) Produkty uboczne przemiału zbóż. [W:] Jankowski J (red.) *Hodowla i użytkowanie drobiu*. PWARiL, Warszawa: 116-120.
- Smith RL, Jensen LS, Hoveland CS i in. (1989) Use of pearl millet, sorghum, and triticale grain in broiler diets. *Journal of Production Agriculture* 2: 78-82.
- Sobczak J, Marek P (2012) Wpływ podawania kurom nieśnym zielonki z paciorecznika na intensywność barwy żółtka jaja. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* 8: 65-72.
- Sokołowicz Z, Krawczyk J, Herbut E (2012) Jakość jaj z chowu ekologicznego w pierwszym i drugim roku użytkowania niosek. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 83: 185-194.
- Souza LAZ, Lima HJDA, Martins RA i in. (2019) Egg yolk colour and retinol concentration of eggs from laying hens fed diets containing carrot and beetroot meal. *Czech Journal of Animal Science* 64(9): 395-403.
- Szczerbińska D, Piech M, Dańczak A i in. (1999) Wstępna ocena wartości owsa nieoplewionego i oplewionego w żywieniu stada reprodukcyjnego przepiórek. *Żywność* 18: 279-285.
- Szczurek W (2006) Strawne aminokwasy w żywieniu indyków rzeźnych. *Indyk Polski* 2: 6-13.
- Takenoyama SI, Kawahara S, Hayashi H i in. (2007) Effects of sweet potato (*Ipomoea batatas*) litters as supplemental feed on egg-laying of hens. *Bulletin of the Faculty of Agriculture University of Miyazaki* 53: 93-99.
- Wanzenböck E, Schreiner M, Zitz UI in. (2018) A combination of wheat bran and vegetable oils as feedstuff in laying hens' diet: impact on egg quality parameters. *Agricultural Sciences* 9: 676-691.
- Woolfe JA (1992) *Sweet potato, an untapped feed resource*. University Press, Cambridge, UK: 634-643.
- Yao JH, Han JC, Wu SY i in. (2007) Supplemental wheat bran and microbial phytase could replace inorganic phosphorus in laying hen diets. *Czech Journal of Animal Science* 52(11): 407-413.

5. Lizozym białka jaja – czynniki modyfikujące jego aktywność

Egg albumen lysozyme - activity modifying factors

Dominika Krakowiak⁽¹⁾, Damian Spustek⁽¹⁾, Małgorzata Stopyra⁽¹⁾, Kinga Rokicka⁽¹⁾,
Monika Śmiech⁽¹⁾, Kamil Drabik⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun Sekcji: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Dominika Krakowiak: dominika.krakowiak19980@gmail.com

Słowa kluczowe: muramidaza, enzym, przemysł drobiarski

Streszczenie

Lizozym (muramidaza) będący enzymem hydrolitycznym występuje w przyrodzie w trzech typach: c (kurzy), g (gęsi) oraz i (obecny u bezkręgowców). Znajduje on wiele zastosowań szczególnie w przemyśle spożywczym jako naturalny konserwant żywności. Na skalę przemysłową jest pozyskiwany w głównej mierze z białka jaja kurzego, gdzie występuje go najwięcej. Na aktywność enzymu wpływa szereg czynników począwszy od utrzymania kur niosek, a skończywszy na odczynie środowiska. Celem pracy było przybliżenie dotychczasowej wiedzy z zakresu czynników mających wpływ na muramidazę pochodzącą z białka jaj.

1. Wstęp

W 1922 r. szkocki bakteriolog Alexander Fleming w swoim doniesieniu "O niezwykle cennym elemencie bakteriologicznym znajdującym się w tkankach i wydzielinach" pierwszy raz napisał o enzymie hydrolitycznym - lizozymie.

Lizozym to enzym bakteriologiczny, należący do klasy hydrolaz, który występuje w przyrodzie w postaci monomeru. Można znaleźć go u zwierząt, roślin, bakterii oraz wirusów. Jest on pojedynczym łańcuchem peptydowym utworzonym ze 129 reszt aminokwasowych. Działa niszcząco na ścianę komórkową. Lizozym, inaczej muramidaza, ma również działanie przeciugrzybicze oraz przeciwwirusowe. Polega ono na zwiększeniu odporności naturalnej i przypomina działanie interferonu. Za najbogatsze źródło lizozymu uznaje się białko jaj kurzych, ponieważ zawiera aż 3,5% tego enzymu. Białko to, stało się podstawowym surowcem do przemysłowego pozyskiwania tego enzymu. Lizozym znalazł zastosowanie jako model do badań w mikrobiologii, medycynie, jak i enzymologii oraz biologii molekularnej. Enzym ma również zastosowanie w przemyśle spożywczym jako naturalny oraz bezpieczny konserwant żywności.

Ze względu na to, że lizozym jest elementem składowym jaja kurzego, podlega, tak jak cała treść jaja, działaniu czynników wpływających zarówno na ilość jak również aktywność enzymu. Do tych czynników zaliczamy: pochodzenie ptaków, system utrzymania, żywienie, wiek niosek, jak również czas i temperatura przechowywania jaj, odczyn środowiska (buforu) czy metodę izolacji enzymu.

Poniższa praca ma na celu przybliżenie wybranych czynników wpływających na jakość i ilość lizozymu pozyskiwanego z białek jaj kurzych.

2. Przegląd literatury

Lizozym znajduje się w białku jaja kurzego i tego względu, tak samo jak pozostałe substancje zawarte w jaju, podlega działaniu wielu czynników. Na aktywność lizozymu zawartego w białku jaja kurzego wpływają takie czynniki jak żywienie, pochodzenie, wiek ptaków, a także warunki środowiskowe. Wśród czynników wpływających na i jego składowe już po zniesieniu należy uwagę

* SKN działa pod patronatem Krajowej Rady Drobiarstwa, Izby Gospodarczej w Warszawie

zwrócić na warunki przechowywania, sposoby przetwarzania białka, jak również odczyn środowiska i metody wykorzystywane do oznaczania tego enzymu.

2.1 Genotyp ptaków

Zawartość lizozymu w białku jaja zależy w głównej mierze od genotypu ptaków, od których te jaja pochodzą. W badaniach Lewko i Gornowicz (2009) określano parametry jakościowe jaj, zarówno fizyczne jak i chemiczne, oraz analizowano zawartość i aktywność lizozymu białka jaja kurzego. Materiał do badań stanowiły jaja pochodzące od siedmiu krajowych rodów kur nieśnych: Rhode Island White (A-22 i A-88, M-55), Rhode Island Red (K-44 i K-66, V-44), oraz Sussex (S-55). Analiza aktywności i udziału procentowego lizozymu wykazała, że największa jego ilość znajduje się w jajach pochodzących od Rhode Island White (A-22). Z kolei najmniejszą aktywnością charakteryzowało się białko jaja pochodzące od kur rodu Rhode Island Red (V-44) podobnie, jeżeli chodzi o udział procentowy tego enzymu. Wyniki badań wskazują na istotną rolę genomu ptaków w odniesieniu do jakości białka jaja, a tym samym zawartości i aktywności enzymu lizozymu.

W badaniach na sześciu zachowawczych rasach kur (Krawczyk i in. 2020), których celem była ocena jakości pozyskanych jaj, materiał badawczy pochodził od kur ras: zielononóżka kuropatwiana (Z-11), żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33), Rhode Island Red (R-11), Rhode Island White (A-33), Sussex (S-66) i Leghorn (H-22). Uzyskano odmienne wyniki od zespołu Lewko i Gornowicz (2009) i wykazano największą zawartość oraz aktywność lizozymu w białku rzadkim jaj pochodzących od kur rasy Rhode Island Red. Najniższymi wartościami charakteryzowały się jaja rasy Leghorn. Z kolei w białku gęstym jaja aktywność lizozymu, jak również jego udział, był największy w jajach pochodzących od zielononózek kuropatwianych.

Prowadzono również badania (Lewko i Gornowicz 2012) nad jakością białka jaj trzech wybranych stad zachowawczych kaczek: P-9, mini kaczki (K-2) oraz LsA – ród syntetyczny. Wyniki analiz dotyczących zawartości procentowej lizozymu oraz jego aktywności wykazały, iż jaja pochodzące od kaczek K-9 zawierały w swoim składzie najwięcej enzymu. Najniższe ilości lizozymu wykazała analiza jaj pochodzących od kaczek ze stada rodu syntetycznego LsA. Badania wskazują na zależność między gatunkiem ptaka a aktywnością i udziałem procentowym muramidazy w białku jaja.

2.2 Wiek nioski

Kolejnym parametrem mającym wpływ na aktywność muramidazy jest wiek niosek od których pochodzą jaja. Udowodniono, że aktywność lizozymu jest z nim wysoko skorelowana. Można wynioskować, że skoro jakość białka w jajach ulega pogorszeniu wraz z wiekiem ptaków, także parametry charakteryzujące lizozym w tych jajach mogą ulec pogorszeniu. Wykazano, że wraz z wiekiem niosek znacząco zwiększa się masa jaja oraz masa białka, ale z drugiej strony odnotowano pogorszenie cech jakości białka tj. obniżenie wysokości białka gęstego oraz wartości jednostek Haugh'a, a także spadek aktywności enzymatycznej lizozymu (Silverside i Scott 2001).

Wyniki badań Banaszewskiej i in. (2019) również dowodzą zależności pomiędzy wiekiem nioski a aktywnością lizozymu zawartego w białku jaja kurzego, która rośnie wraz z wiekiem ptaków, przy czym zależność ta jest również związana z mniejszą ilością białka i większym udziałem żółtka w jaju. W innej pracy (Krawczyk i in. 2020), stwierdzono, że w jajach pochodzących od starszych niosek zawartość enzymu jest większa. Dodatkowo wykazano istotną statystycznie korelację między wiekiem nioski i jej genotypem, a aktywnością muramidazy.

2.3 System chowu i wiek nioski

Na aktywność lizozymu wpływa również pośrednio system utrzymania ptaków. Może on modyfikować jakość jaj także pod kątem substancji bioaktywnych. Batkowska i in. (2016) stwierdzili, że najkorzystniejsze cechy białka charakteryzują jaja od niosek z chowu klatkowego, a najmniej korzystne są z systemu wolno wybiegowego. Krawczyk i Gronowicz (2010) wskazują, że w systemie wybiegowym poprawie uległy takie cechy białka jaja, jak: jego wysokość, jednostki Haugh'a i zawartość lizozymu w stosunku do systemu ściółkowego. Udział tego enzymu w masie białka był o 28% większy w jajach z chowu wolno wybiegowego niż w jajach pochodzących z systemu ściółkowego.

W badaniach nad wpływem systemu utrzymania ptaków na aktywność muramidazy (Trziszka i in. 2007) oceniano jaja pochodzące od czterech grup niosek utrzymywanych w systemach: wolno wybiegowym, klatkowym oraz ściółkowym. Wykazano, że system utrzymania ptaków ma wpływ na aktywność enzymu, zaś najwyższą aktywnością lizozymu odznaczały się jaja pochodzące z chowu klatkowego.

2.4 Żywienie ptaków

Do elementów systemu chowu zalicza się też żywienie, zaś czynnikiem modyfikującym jakość pozyskiwanych jaj, a także zawartość i aktywność zawartego w nich lizozymu, mogą być dodatki paszowe. Dodanie do paszy odpowiednio zbilansowanej kompozycji dobrej jakości suszonych ziół (szałwia, mięta, majeranek) w ilości 5% może istotnie poprawić wybrane parametry jakościowe białka (masę, wysokość, JH), a także zwiększyć zawartość oraz aktywność lizozymu w jajach (Lewko i Gornowicz 2015). Ocena całościowa wykazała, że wyższymi parametrami lizozymu w obydwu analizowanych frakcjach białka jaj wyróżniały się te pochodzące od ptaków, żywionych mieszanką paszową z dodatkiem mieszanki suszonych ziół oraz świeżej zielonki. W przypadku białka jaj ptaków, żywionych mieszanką paszową z dodatkiem świeżej zielonki wartości te były wyższe, średnio o 0,02% i 4422U/ml – białko rzadkie oraz o 0,06% i 13624U/ml – białko gęste w porównaniu do grupy ptaków żywionej paszą standardową.

Krawczyk i in. (2012) dokonali szerokiej analizy jakości białka jaj kur: zielononóżka kuroopatwana i Rhode Island Red, żywionych mieszanką paszową, zawierającą suszony wywar kukurydziany (DDGS). W aspekcie zawartości i aktywności lizozymu wykazano, że frakcja białka gęstego jaj tych ptaków wyróżniała się wyższymi parametrami badanego enzymu w porównaniu do jaj niosek z grupy kontrolnej, żywionej bez dodatku. Co więcej wyższa była koncentracja lizozymu oraz jego aktywność enzymatyczna (średnio o 1069,7 U/ml).

Zespół Graszkievicz i in., (2007) prowadził badania dotyczące wpływu dodatków mineralno-huminowych oraz przeciwutleniaczy (wit. A i E) do paszy niosek na aktywność lizozymu w białku jaja. Badania prowadzone były z podziałem na 4 grupy jaj pochodzących od: ptaków żywionych standardową mieszanką paszową, ptaków żywionych paszą z dodatkiem witamin, ptaków skarmianych paszą z dodatkiem mineralno-huminowym oraz witamin. Otrzymane wyniki wskazują na pozytywny wpływ stosowania witamin, jako dodatku do żywności dla ptaków, na aktywność lizozymu. Zastosowanie w żywieniu paszy zawierającej zarówno preparat mineralno-huminowy jak i przeciwutleniacze nie skutkowało istotnymi zmianami aktywności muramidazy.

2.5 Inne czynniki modyfikujące zawartość i aktywność lizozymu w białku jaj na lizozym

Na aktywność lizozymu ma wpływ wiele dodatkowych czynników m. in jest to odczyn środowiska, temperatura, dodatek substancji chemicznych (nizyna i EDTA) itp. Najczęściej modelem badań nad strukturą oraz funkcją enzymatyczną lizozymu jest muramidaza typu c pochodząca z białka jaja kurzego (Gajda i Bugla-Płoskońska 2014). Wykazano, że lizozym, jako składnik białka jaj, w zależności od panujących warunków ich przechowywania np. przy podwyższonym ciśnieniu, może wykazywać tendencję do asocjacji, tracąc tym samym część swej aktywności hydrolitycznej (Jolles i Jolles 1984). Identyczne zjawisko utraty aktywności hydrolitycznej zaobserwowano modyfikując lizozym do formy dimeru. Pomimo zmiany formy z natywnej do dimerycznej nadal zachowywał antybakteryjną aktywność monomeru, a nawet ją przewyższał (Sophianopoulos 1969).

Wykazano, także że stabilność lizozymu w roztworze kwaśnym przy pH 4,5 utrzymywała się przez około 3 minuty, zaś przy pH 5,4 przez 30 minut, zatem stabilność enzymu może być uzależniona od odczynu roztworu (Matsuoka i in. 1966). W obu przypadkach temperatura wynosiła 100°C. Badacze Beychok i Warner (1959) zaobserwowali spadek aktywności enzymatycznej muramidazy przy założeniu pewnych kryteriów. Stwierdzili oni, że przy pH 5,5 w przedziale temperatur 85 – 95 °C stabilność enzymu była maksymalna. Natomiast gdy pH zwiększono powyżej 6,0 nastąpił spadek stabilności lizozymu. Inne badania (Gorini i Felix 1953) wykazały, że lizozym ogrzewany w buforze boranowym o pH 7,9 przy temperaturze 70 °C po upływie 30 minut wykazywał spadek aktywności aż o 25%. Inne badania wykazały, że lizozym rozpuszczony w buforze fosforanowym przy pH 6,2 oraz temperaturze 62,5 °C stał się 50-krotnie stabilniejszy w porównaniu

z tym, który roztwarzano w tej samej temperaturze, ale o pH buforu 9,0 (Cunninghama i Lineweavera 1967).

Nad wpływem temperatury na aktywność lizozymu badania prowadzili Qui i in (2012). W swoim doświadczeniu badali wpływ temperatury przechowywania jaj na jakość ich białka. Doświadczenie polegało na zastosowaniu trzech poziomów temperatury (4, 20, 37 °C), innej dla każdej grupy jaj, przechowywanych przez 15 dni. Stwierdzono, że wartość temperatury podczas przechowywania jaj miała wpływ na ilość lizozymu (im wyższa temperatura tym więcej enzymu występowało w białku), natomiast nie na jego aktywność.

Wynikało to prawdopodobnie z dużego ubytku wody z białka, na skutek jej parowania przez pory skorupowe jaja. Białko uległo zagęszczeniu, a tym samym lizozym koncentracji.

Leśnierowski i Borowiak (2012) przechowywali jaja kurze oraz samo wydzielone z nich białko przez 20 dni w temperaturze zbliżonej do temperatury inkubacji jaj wylęgowych, tj. 40 °C. Wykazano, że przechowywanie jaj, jak również samego białka wpływa na zmiany ilościowe i jakościowe lizozymu, ponadto w takiej temperaturze enzym ulega częściowej oligomeryzacji, a tym samym zmniejsza się jego aktywność w białku.

Również istotna pod względem aktywności muramidazy jest metoda stosowana do izolacji enzymu z białka jaja kurzego. Do stosowanych metod należą techniki elektroforetyczne, chromatograficzne, immunoenzymatyczne, spektrofotofluorometryczne i polaryzacji fluorescencji. Najpowszechniejszą metodą jest zastosowanie enzymatycznego testu immunosorpcyjnego ELISA, który charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością. Pozwala na wykrycie lizozymu na poziomie 0,264 µg/ml przy czym w badanych próbach białka jaja kurzego ilość muramidazy zawierała się w zakresie od 2,2 do 4,5 mg/ml. Na korzyść testu przemawia również fakt, że jest on szybki oraz prosty w przeprowadzeniu i z tego względu zalecany do stosowania zwłaszcza przy analizie wielu prób. Dodatkowo został on specjalnie zaprojektowany do określania stężeń lizozymu w białku jaja kurzego (Vidal i in. 2005). Do izolacji enzymu stosuje się również chromatografię kationowo-wymenną z wykorzystaniem RP-HPLC. Metoda ta pozwala na uzyskanie muramidazy o aktywności enzymu zbliżonej do poziomu uzyskiwanego przy zastosowaniu komercyjnych metod takich jak m.in. test ELISA, i w związku z tym może być z powodzeniem stosowana (Carrillo 2016). Badania nad zastosowaniem chromatografii jonowymiennej w izolowaniu lizozymu prowadzili również Jiang i in. (2001), których wyniki potwierdzały skuteczność zastosowania tej metody. Dodatkowym parametrem było zastosowanie w chromatografii nierozpuszczalnych w alkoholu, usieciovionych strąków grochu (AL-CLPPS) w celu odzyskiwania muramidazy z białka. Pozwoliło to na uzyskanie satysfakcjonujących wyników aktywności właściwej enzymu na poziomie 361380 U/mg białka. Lizozym z powodzeniem można izolować z wykorzystaniem metody różnicowej denaturacji cieplnej białek ze zmianą wartości pH oraz neutralizacji, dializą i oczyszczaniem metodą chromatografii żelowej (Dekina 2015). Metoda ta pozwala na uzyskanie enzymu o aktywności bakteriolitycznej na poziomie $22\,025 \pm 1\,500$ U/mg. Jest to wartość aktywności lizozymu zbliżona do lizozymu komercyjnego dostępnego na rynku.

3. Podsumowanie

Analiza dostępnej literatury pozwoliła na przybliżenie wybranych czynników oddziałujących na aktywność lizozymu białka jaja kurzego. Szereg czynników takich jak genotyp ptaków, sposób ich żywienia, czy chociażby przechowywanie jaj ma wpływ na ilość enzymu zawartego w jajach. Pozwala to na wysunięcie wniosków, że kontrolując i modyfikując pewne warunki, czy to chowu niosek, czy wreszcie przechowywania pozyskanego surowca jajczarskiego, można w pewnym stopniu wpłynąć na poziom aktywności muramidazy. W tym celu niezwykle istotna jest znajomość czynników, które mogą wpływać na aktywność lizozymu na każdym etapie jego pozyskiwania, tj. od nioski do ekstrakcji.

4. Literatura

Banaszewska D, Biesiada-Drzazga B, Ostrowski D i in. (2019) The impact of breeder age on egg quality and lysozyme activity. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 43(5): 583-589.

- Batkowska J, Brodacki A, Gryzińska M (2016) Effects of laying hen husbandry system and storage on egg quality, *European Poultry Science* 80, DOI: 10.1399/eps.2016.158.
- Beychok S, Warner RC (1959) Denaturation and electrophoretic behavior of lysozyme. *Journal of the American Chemical Society* 81(8): 1892-1897.
- Bochnak J, Drabik K, Pluta A i in. (2017) Lizozym – budowa, funkcje, zastosowanie. [W:] Chabuz W, Nowakowicz-Dębek B (red.) Jakość surowców pochodzenia zwierzęcego. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie: 32-38.
- Carrillo W, Tubón J, Vilcacundo R (2016) Isolation of hen egg white lysozyme by cation exchange chromatography, analysis of its digestibility and evaluation of the inhibition lipid peroxidation in the zebrafish model. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 9: 345-349.
- Cunningham FE, Lineweaver H (1967) Inactivation of lysozyme by native ovalbumin. *Poultry Science* 46(6): 1471-1477.
- Dekina SS, Romanovska II, Ovsepyan AM i in. (2015) Isolation and purification of lysozyme from the hen egg white. *Biotechnologia Acta* 8(6): 41-47.
- Gajda E, Bugla-Płoskońska E (2014), Lizozym – występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań. *Postępy Hig Med Dosw* 68: 1501-1515.
- Gorini L, Félix F (1953) Influence du manganèse sur la stabilité du lysozyme: I. Influence du manganèse sur la vitesse d'inactivation irréversible du lysozyme par la chaleur. *Biochimica et Biophysica Acta* 10: 128-135.
- Graszkiewicz A, Kazmierska M, Niedbalska J (2007). Wpływ dodatku preparatów mineralno-huminowych oraz przeciwutleniaczy do paszy niosek na aktywność lizozymu i cystatyny w białku: jaj. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 14(5): 360-366.
- Jiang CM, Wang MC, Chang WH i in. (2001) Isolation of lysozyme from hen egg albumen by alcoholinsoluble crosslinked pea pod solid ionexchange chromatography. *Journal of Food Science* 66(8): 1089-1093.
- Jollès P, Jollès J (1984) What's new in lysozyme research?: *Molecular and cellular biochemistry* 63(2): 165-189.
- Krawczyk J, Gornowicz, E (2010) Quality of eggs from hens kept in two different free-range systems in comparison with a barn system: *Archiv für Geflügelkunde* 74 (3): 151-157.
- Krawczyk J, Lewko L, Calik J (2020) Effect of laying hen genotype, age and some interior egg quality traits on lysozyme content. *Annals of Animal Science*, DOI: 10.2478/aoas-2020-0112.
- Krawczyk J, Sokołowicz Z, Świątkiewicz Si in. (2012) Performance and egg quality of hens from conservation flocks fed a diet containing maize distillers dried grains with solubles (DDGS). *Annals of Animal Science* 12: 247-260.
- Leśniewski G, Borowiak R (2012) Wpływ warunków środowiskowych na zmianę właściwości lizozymu w białku jaj kurzych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 19(3): 77-87.
- Lewko L, Gornowicz E (2009) Egg albumen quality as affected by bird origin. *Journal of central European Agriculture* 10(4): 455-463.
- Lewko L, Gornowicz E (2015) Żywienie ptaków – możliwości kształtowania się jakości białka jaja kurzego z uwzględnieniem właściwości lizozymu: *Wiadomości Zootechniczne* 4: 16-24.
- Lewko L, Gornowicz, E (2012) Porównanie jakości białka jaj kaczek K-2, P-9 i LsA pod względem zawartości i aktywności lizozymu. *Wiadomości Zootechniczne* 4: 17-24.
- Matsuoka Y, Hidaka Y, Yashima M (1966) Patent japoński Nr 41-150.
- Puk M (2016) Zmiany wybranych parametrów jakości jaj w czasie przechowywania w zależności od ich klasy wagowej. *Mat. konf. XIII Międzynarodowego Seminarium Studenckich Kół Naukowych nt. "Środowisko- Zwierzę- Produkt"*, 7 kwietnia 2016r., Lublin, 72-73.
- Qiu N, Ma M, Zhao L i in. (2012) Comparative proteomic analysis of egg white proteins under various storage temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(31): 7746-7753.
- Silversides FG, Scott AT, 2001. Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. *Poultry Science* 80(8): 1240-1245.
- Sophianopoulos AJ (1969) Association sites of lysozyme in solution I. The active site. *Journal of Biological Chemistry* 244(12): 3188-3193.

- Trziszka T, Dobrzanski Z, Skiba T i in. (2007) Effect of breeding and housing systems of layers on egg quality and the activity of cystain and lysozyme. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 57(4C): 583-586.
- Vidal ML, Gautron J, Nys Y (2005) Development of an ELISA for quantifying lysozyme in hen egg white. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(7): 2379-2385.

6. Forma mieszanki paszowej a efektywność chowu kurcząt brojlerów

The form of feed mixture and efficiency of broiler chicken rearing

Karolina Wengerska⁽¹⁾, Yaroslava Bandarenka⁽²⁾, Dawid Ziobro⁽¹⁾, Damian Spustek⁽¹⁾,
Kinga Rokicka⁽¹⁾, Mateusz Selwa⁽²⁾, Kamil Drabik⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

⁽²⁾Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Karolina Wengerska: karolina.wengerska@gmail.com

Słowa kluczowe: kurczęta rzeźne, wyniki produkcyjne, mieszanka paszowa, całe ziarno zbóż

Streszczenie

Koszt żywienia może stanowić do 75% całkowitych nakładów finansowych poniesionych w cyklu produkcyjnym kurcząt rzeźnych. Znaczenie ma tutaj nie tylko wartość pokarmowa mieszanek paszowych, czy dodatki paszowe, ale również forma paszy. Ptaki żywione są mieszankami syrkami, granulowanymi lub w kombinacji z całymi lub śrutowanymi ziarnami zbóż. Niewątpliwie zaletami pasz granulowanych jest ich jednorodność w zakresie dostarczania składników pokarmowych, lepsze wykorzystanie niż mieszanek syrkich, co może wynikać ze zmian właściwości składników pokarmowych w procesie granulacji (częściowe pękanie ziaren skrobi, zwiększenie rozpuszczalności w wodzie), mniejsze straty z powodu rozsypywania, a także fakt, że nie ulegają rozwarstwieniu podczas transportu.

Wydaje się, że mimo, iż pasza granulowana, gotowa do podania ptakom, pozwala na ograniczenie pracochłonności tuczu, a także zapewnia prawidłowe proporcje składników odżywczych i bezpieczeństwo mikrobiologiczne, to jej cena jest znacznie wyższa w porównaniu do paszy własnej i uzyskane, nieco lepsze, wyniki produkcyjne mogą nie wystarczyć na pokrycie tych różnic.

1. Wstęp

Wyniki produkcyjne drobiu mięsnego zależą od czynników genetycznych i środowiskowych. W stadach zarodowych kur mięsnych selekcję prowadzi się w kierunku poprawy takich cech jak: tempo wzrostu, wykorzystanie paszy i zdrowotność. Z czynników środowiskowych najistotniejsze jest żywienie, gdyż jego szacunkowe koszty mogą stanowić 65-70% wszystkich poniesionych kosztów produkcji (Michalczyk i in. 2013). Aby w pełni wykorzystać potencjał genetyczny brojlerów należy stosować mieszanki paszowe o zawartości energii, białka i pozostałych składników pokarmowych zgodnej z ich zapotrzebowaniem. Intensywny sposób żywienia musi zapewnić nie tylko zadowalające tempo wzrostu, ale także dobrą zdrowotność i przydatność technologiczną mięsa.

Celem pracy było przybliżenie wpływu formy mieszanki paszowej na efektywność chowu kurcząt brojlerów

2. Przegląd literatury

2.1 Charakterystyka mieszanek paszowych dla drobiu

Krótki przewód pokarmowy u drobiu powoduje, że codzienne spożycie paszy nie jest wysokie, a co za tym idzie pasza musi być odpowiednio zbilansowana we wszelkie składniki pokarmowe. Stosowanie źle dobranej paszy nawet przez krótki czas hamuje wzrost i rozwój ptaków, a także przyczynia się do pogorszenia ich stanu zdrowia. Ziarno zbóż stanowi główny składnik paszy dla drobiu, ale samo w sobie nie jest w stanie całkowicie zaspokoić zapotrzebowania na składniki pokarmowe potrzebne do prawidłowego wzrostu ptaków. Właściwe dopasowanie wszystkich

* SKN działa pod patronatem Krajowej Rady Drobiarstwa, Izba Gospodarcza w Warszawie

komponentów paszowych powinno być dostosowane do konkretnej grupy produkcyjnej ptaków, zarówno niedobór, jak i nadmiar któregośkolwiek z nich może prowadzić do utraty wartości całej dawki, a co za tym idzie obniżyć wyniki produkcyjno- ekonomiczne (Matuszek 2012).

Zapotrzebowanie ptaków na składniki pokarmowe zmienia się w trakcie ich życia: wzrasta zapotrzebowanie na energię metaboliczną, zaś spada na białko. Wykorzystując tę zależność na fermach hodowcy stosują trzy lub cztery typy pasz o nazwach handlowych: starter, grower i finisher.

Starter to pasza, która podawana jest od momentu wstawienia piskląt do około 10 dnia życia. W pierwszym okresie wzrostu brojlerów przevažają procesy syntezy białka, a potem równoczesne odkładanie białka i tłuszczu w ciele (Smulikowska i Rutkowski 2005). Jej zadaniem jest zapewnienie prawidłowego rozwoju narządów wewnętrznych, kości i mięśni, tak, aby zmaksymalizować wzrost podczas okresu początkowego. Ten rodzaj paszy jest pozbawiony udziału całego ziarna. W paszy typu starter odpowiednia struktura ma ogromne znaczenie. W sytuacji kiedy tak mały organizm, jakim jest pisklę, pobiera niewielką ilość pokarmu, rzeczą priorytetową jest aby znalazł tam niezbędne do prawidłowego wzrostu substancje. Przy starterze w formie sypkiej byłoby to bardzo trudne do osiągnięcia, dlatego najczęściej występuje on w formie kruszonki (Mohhamadi i in. 2014).

Podawanie paszy typu grower, tzw. wzrostowej, często dzielone jest na dwa lub trzy dodatkowe etapy (grower I, grower II). Paszę tę charakteryzuje nieco mniejszy poziom białka niż w poprzedniej mieszance i zwiększona zawartość energii. Struktura tej paszy sprzyja zmaksymalizowaniu jej pobrania. Na tym etapie żywienia ptaków można stopniowo rozpocząć dodawanie całego ziarna pszenicy (Bennett i in. 1995).

Finisher to ostatni rodzaj paszy, jaki podawany jest w cyklu produkcyjnym. Ponieważ ptaki typu mięsnego relatywnie rzadko szczepi się przeciwko pasożytniczej chorobie, jaką jest kokcydioza, pasze stosowane w żywieniu ptaków do tego etapu zawierają antybiotyki jonoforowe pełniące funkcję kokcydiostatyków (Vermeulen i in. 2001). Ze względu na fakt konieczności zachowania karencji, oraz to, że finisher stosowany jest w ostatni okresie chowu (7-10 dni przed ubojem) nie zawiera on żadnych dodatków medycznych, w tym także kokcydiostatyków. Ma on za zadanie stopniowe zmniejszanie poziomu białka i zwiększanie poziomu energii. W tym czasie następuje metaboliczne przetwarzanie białka na tłuszcz, co skutkuje słabszym wykorzystaniem paszy, dlatego bardzo istotne jest aby pasza w tym okresie zapewniła dostateczny poziom energii (Leeson i in. 1996).

2.2 Forma mieszanki

Oprócz proporcji podstawowych składników odżywczych w paszy dla szybko rosnących kurcząt nie bez znaczenia są także forma stosowanej mieszanki paszowej. Z historycznego punktu widzenia pierwsze mieszanki skarmiano wyłącznie w formie sypkiej (lata 50-te), obecnie zaś pasza typu starter ma przeważnie formę tzw. kruszonki (rozdrabniane granule), zaś grower i finisher to już tylko pasze granulowane (Havenstein i in. 2003). Zarówno granulaty, jak i pasza sypka powinna być odpowiednio zbilansowane ponieważ zbyt rozdrobniona pasza sypka prowadzi do spowolnienia perystaltyki jelit, a dostarczona treść pokarmowa jest słabo trawiona sokami trawiennymi.

Sporym problemem w podawaniu paszy sypkiej jest zapylenie w kurniku ponieważ utrudnia ono pobieranie paszy z karmideł, czego skutkiem jest dłuższe zajmowanie ich przez ptaki, przez co spada średnie tempo wzrostu stada. Źródłem pyłu jest między innymi sama pasza, a zapylenie zależy od struktury cząstek. Pasza sypka ma zdecydowanie bardziej pylistą strukturę, niż pasza granulowana (Just i in. 2009).

Bardzo ważną cechą mieszanek pełnoporcjowych jest ich jednorodność pod względem zawartości składników pokarmowych. Mieszanka powinna być drobno mielona i starannie wymieszana, aby ptaki nie mogły łatwo oddzielić składników, zaś każda pobrana porcja zapewniała dobrze zbilansowaną dietę. Niestety pasza mielona nie jest jednak tak smaczna i nie zachowuje tak dobrze wartości odżywczych jak pasza granulowana, a oprócz tego może się rozwarstwiać się, co zaburza jej jednorodność (Chehraghi i in. 2013).

Granulacja paszy to proces dość skomplikowany na który składa się szereg różnych operacji jak kondycjonowanie, wyłaczanie, chłodzenie, kruszenie, i sortowanie. Wszystkie te etapy służą temu aby osiągnąć granulaty mieszanki paszowej o odpowiedniej twardości oraz odporności na rozbijanie i kruszenie (Grochowicz 1996; Hejft 2002). Jednym z ważniejszych celów podczas

granulacji paszy jest osiągnięcie odpowiedniej wielkości surowca, za co odpowiada operacja rozdrabniania. Podczas wykonywania tego procesu wykorzystywane są różne urządzenia rozdrabniające. Bardzo ważna dla procesu kondycjonowania jest obecność skrobi. Skrobia w trakcie tego procesu ulega także latynizacji, dzięki czemu opory przetwarzania są znacznie mniejsze zaś po procesie chłodzenia skrobia staje się czynnikiem wiążącym granulaty. Dodatki tłuszczowe z jednej strony zmniejszają siły tarcia, a więc energochłonność granulacji, ale z drugiej strony ich zawartość powyżej 5% zmniejsza spoistość produktu finalnego. Gotowy granulaty paszowy jest poddawany działaniu dwóch sił: dynamicznej przy transporcie i sile statycznej podczas składowania (Zawiślak i Sobczak 2013). Wytworzony granulaty jest poddawany testom twardości granuli. Zakładając, że pasza granulowana będzie dostarczona do karmidła w odpowiedniej formie (nie ulegnie frakcjonowaniu) bardzo dużą zaletą będzie jej jednorodność, tzn. każdy ptak otrzyma takie same ilości składników pokarmowych, co zapobiega różnicowaniu się stada.

Podsumowując, wśród zalet paszy granulowanej wymienia się zwiększenie gęstości zasypowej paszy, poprawę płynności jej transportu, czy możliwości zmniejszenia kosztów mieszanki paszowej poprzez zastosowanie alternatywnych składników pasz (Agah i Norollahi 2008). Nacisk kładzie się na wspomnianą już jednorodność pasz (dostarczają składników pokarmowych w odpowiednich proporcjach), większe spożycie niż mieszanek sypkich (zalecane w chowie brojlerów), lepsze wykorzystywanie niż mieszanki sypkie, co może wynikać ze zmian właściwości składników pokarmowych w procesie granulacji (częściowe pękanie ziaren skrobi, zwiększenie rozpuszczalności w wodzie), ale też mniejsze straty z powodu rozsypywania paszy (granulki mogą być pobrane ponownie np. z wody) oraz fakt, że nie ulegają one rozwarstwieniu, łatwiej je przewozić i przechowywać (Calet 1965; Abdollahi i in. 2013).

Granulaty w porównaniu do paszy sypkiej jest znacznie łatwiej strawny dla ptaków. Pasza która zostanie w czasie produkcji zbyt mocno rozdrobniona może zostać poddana granulacji, co pozwoli ptakom na jej strawienie, lecz nie będzie odpowiednio stymulować pracy jelit. Bardzo ważne jest przy stosowaniu paszy granulowanej aby granulaty nie ulegał frakcjonowaniu, ponieważ w takiej formie nie zostanie dobrze wykorzystany w żołądku ani w jelitach, ale również jeśli ulegnie rozkruszeniu cząstki staną się różnorodne, co może skutkować selektywnym pobieraniem paszy i brojlery będą wybierać granulki o największych rozmiarach. Wielkość granulek paszy, a nawet jej rodzaj, znajduje swoje odzwierciedlenie w preferencjach samych ptaków i w ich zachowaniu. Wykazano, że brojlery w fazie wzrostowej (grower) chętniej jedzą pszenicę w formie całego ziarna niż zmieloną, czy śrutowaną, ale oprócz tego pobierają wysokobiałkową paszę granulowaną. Być może jest to spowodowane lepszym rozwojem żołądka zwiększonym tempem pobierania zboża w porównaniu do mieszanki, co może zaspokajać ich potrzebę dziobania. Wybór paszy przez ptaki może być też podyktowany ich zapotrzebowaniem na energię. Bardziej aktywne zwierzęta wybierają dietę bogatszą w węglowodany i uboższą w białko, co należałoby uwzględnić podczas kalkulacji kosztów żywienia (Nielsen 2004). W aspekcie behawioru ptaków nie można pominąć wpływu składu oraz struktury paszy na możliwość pojawienia się pterofagii lub kanibalizmu w stadzie. Zdecydowanie częściej do wystąpienia tych zachowań przyczynia się pasza granulowana niż sypka. Być może wynika to z faktu, że granule dość szybko wypełniają przewód pokarmowy, skracając czas pobierania paszy, ale sygnał uczucia pełności jest wysyłany do mózgu z pewnym opóźnieniem. Stąd potrzeba zaspokojenia przez ptaki instynktu dziobania i żerowania przenoszona jest na inne obiekty niż pasza. Częściej zjawisko to można obserwować u ptaków typu nieśnego, ale dotyczy ono również kurcząt brojlerów czy indyków rzeźnych (Kjaer i Bessei 2013).

Przyjmuje się, że w porównaniu do paszy sypkiej żywienie wysokoprodukcyjnych ptaków typu mięsnego paszą granulowaną poprawia ich tempo wzrostu, ale przy zwiększonym spożyciu paszy (Calet 1965). Ptaki szybko rosnące są też zdecydowanie bardziej wrażliwe na wielkość granulek niż kurczęta o wolniejszym tempie wzrostu. Zbyt duże rozdrobnienie paszy może skutkować ograniczeniem przyrostów masy ciała, zwłaszcza w ostatnim okresie odchovu (Quentin i in. 2004). Potwierdzają to wyniki Agah i Norollahi (2008), które wskazują, że, mimo że nie wykazano statystycznie istotnych różnic w całkowitym przyroście masy ciała i wykorzystaniu paszy na kilogram przyrostu ze względu na stosowanie paszy miałkiej lub granulowanej tonajbardziej korzystne byłoby stosowanie paszy sypkiej w pierwszych 10-ciu dniach chowu, zaś mieszanki granulowanej w okresie

wzrostowym (grower). Kombinacja taka jest najbardziej uzasadniona ekonomicznie i pozwala uzyskać największy przyrost masy ciała przy najlepszym wykorzystaniu paszy.

2.3 Dodatek całego ziarna

W programie żywienia drobiu można zastosować różne formy paszy (kruszonka czy mikrogranulat), które podawane są w pierwszych dniach życia, a rozmiar ich cząstek wynosi ok. 2 mm. Następnie po upływie około dwóch tygodni wprowadza się paszę w formie granulatu, którego rozmiar cząstek wraz z wiekiem kurcząt rośnie, rozmiary wahają się od około 2,8 mm do 3,5 mm. Gdy hodowca decyduje się na paszę produkowaną we własnym gospodarstwie bardzo często wyłączną formą paszy jest pasza sypka, zaś dodatkowo można zastosować dodatek całego ziarna (Mazanowski 2011).

Dodatek do paszy sypkiej całych ziaren bardzo korzystnie wpływa na pracę żołądka i jelit (Svihus i in. 2004). Dodatkowe stosowanie całego ziarna uaktywnia działanie układu trawiennego: ptaki lepiej wykorzystują paszę, korzystnie wpływa na żołądek mięśniowy zwiększając jego masę i zapobiega jego zwiotczeniu i nekrozom, co więcej całe ziarna wpływają na wolniejsze i dokładniejsze rozcieranie paszy i poprawiają perystaltykę i ukrwienie jelit. Lepsza praca żołądka, niższe pH zapobiega rozwojowi bakterii chorobotwórczych wpływa na odporność i przeżywalność ptaków oraz korzystnie wpływa na mikroklimat z uwagi na mniejszą wilgotność pomiotu (ogranicza dodatkowe dościelanie ściółki).

Stosując żywienie z dodatkiem ziarna pszenicy Osek i Milczarek (2016) nie stwierdziły wyraźnej różnicy w ilości spożywanej paszy, zaobserwowany tylko nieznaczny wzrost jej pobrania. Badania pokazały również, że ptaki żywione paszą z dodatkiem całej pszenicy miały gorszą wydajność rzeźna, a ich tuszki były słabiej umięśnione. Jednak w innych badaniach (Dozier i in. 2010) porównując wyniki kurcząt żywionych paszą o wysokiej (88% trwałości granul) i niskiej jakości granul (66% trwałości) oraz z dodatkiem ziaren stwierdzono, że wydajność rzeźna i zawartość tłuszczu w mięsie jest porównywalna, jedynie w przypadku granul słabej jakości wyniki były nieznacznie gorsze. Granulacja paszy poprawia znacząco jej wykorzystanie, zaś dodatek całej pszenicy znacząco nie spowalnia tempa wzrostu, o ile jego ilość jest kontrolowana. Bennett i in. (2002) najgorsze wyniki produkcyjne odnotowali w grupie kurcząt żywionych paszą sypką. Ci sami autorzy (Bennett i in. 1995) stwierdzili, że owszem, pasza granulowana zapewnia wyższą końcową masę ciała, ale należy pamiętać że jej cena jest znacznie wyższa niż paszy sypkiej lub z dodatkiem ziarna zbóż.

W doświadczeniu Husvéth i in. (2015) brojlery podzielono na trzy grupy i żywiono paszami bez zawartości całych ziaren ze średnią i wysoką ich zawartością. Wykazano, że masa żołądka mięśniowego jest zdecydowanie największa w przypadku paszy z dodatkiem dużej ilości zboża. Ogranicza to, co prawda efekty produkcyjne, ale nieznaczne spowolnienie tempa wzrostu przekłada się na mniejszą śmiertelność brojlerów z powodu wodobrzusza czy syndromu nagłej śmierci spowodowanej zbyt szybkim przyrostem masy ciała. Dodatek ziarna nie wpłynął wielkość płata tłuszczu okołojelitowego. Także w badaniach Amerah i Ravindran (2008) obecność całego ziarna w diecie kurcząt zmniejszyła ilość tłuszczu sadełkowego w ich tuszkach kurcząt. Potwierdza to, że dodatek całych ziaren zbóż korzystnie wpływa na rozwój układu pokarmowego. Oceniając wielkość poszczególnych narządów wewnętrznych Erenner i in. (2003) stwierdzili, że są one najlepiej rozwinięte u ptaków żywionych z dodatkiem całego ziarna. Wydaje się, że wynika to z dużej zawartości włókna, które stymuluje mięśnie gładkie do intensywniejszej pracy, stąd także większy udział żołądka mięśniowego w masie ciała ptaków (Engberg i in. 2002; Amerah i Ravindran 2008; Husvéth i in. 2015).

Yaghoubar i in. (2009) podają, że żywienie ptaków szybko rosnących całą pszenicą lub jej dodatkiem do mieszanki pełnoporcjowej (maksymalnie 200g/kg), jest uzasadnione z ekonomicznego punktu widzenia, zaś ptaki lepiej tę paszę wykorzystują. Jednak stwierdzili oni istotnie większą śmiertelność ptaków w grupie żywionej paszą granulowaną niż sypką. Pokrywa się to także z obserwacjami innych autorów (Husvéth i in. 2015), największą przeżywalnością charakteryzowały się ptaki żywione mieszanką w formie sypkiej.

W doświadczeniu Zang i in. (2009) pobrano próbki jelit i badano wysokość kosmków i głębokość krypty z brojlerów karmionych paszą drobno i grubo cząsteczkową, granulowaną i sypką. Badanie wykazało, że pasza granulowana lepiej wpływa na rozwój jelit niż pasza sypka. Z kolei w innej pracy (Amerah i Ravindran2008) najlepsze wartości pomiarów jelit odnotowano u ptaków żywionych z udziałem ziarna pszenicy.

3. Podsumowanie

Najważniejszym ogniwem w chowie i hodowli drobiu jest żywienie. Koszty, jakie hodowca ponosi na żywienie, mogą sięgać nawet 75%-80% całkowitych kosztów produkcji (Gadzirayi i in. 2006). Mieszalnie paszowe posiadają szeroką ofertę gotowych, zbilansowanych mieszanek dla drobiu w różnej formie i wydaje się, że są one w stanie w ten sposób pokryć zapotrzebowanie wszystkich możliwych kombinacji gatunków, faz wzrostu, czy kierunku użytkowania. Jednak, mimo że pasza granulowana, gotowa do podania ptakom, pozwala na ograniczenie pracochłonności tuczu, a także zapewnia prawidłowe proporcje składników odżywczych i bezpieczeństwo mikrobiologiczne ptaków, to jej cena jest znacznie wyższa w porównaniu do paszy własnej. Wysoka cena gotowych granulatów paszowych, mimo uzyskania nieco lepszych wyników produkcyjnych, może nie wystarczyć do pokrycia różnic wynikających z kosztów zakupu paszy. Przy produkcji paszy własnej warto rozważyć dodatek całego ziarna, ponieważ korzystnie wpływa to na zdrowotność kurcząt, jednak także należy zwracać uwagę na jakość surowców wykorzystywanych jej do wytworzenia.

4. Literatura

- Abdollahi MR, Ravindran V, Svihus B (2013) Pelleting of broiler diets: An overview with emphasis on pellet quality and nutritional value. *Animal Feed Science And Technology* 179(1-4): 1-23.
- Agah MJ, Norollahi H (2008) Effect of feed form and duration time in growing period on broilers performance. *International Journal of Poultry Science* 7(11): 1074-1077.
- Amerah AM, Ravindran V (2008) Influence of method of whole-wheat feeding on the performance, digestive tract development and carcass traits of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 147: 326–339.
- Bennett CD, Classen HL, Riddell C (1995) Live performance and health of broiler chickens fed diets diluted with whole or crumbled wheat. *Canadian Journal of Animal Science* 75(4): 611-614.
- Bennett CD, Classen HL, Riddell C (2002) Feeding broiler chickens wheat and barley diets containing whole, ground and pelleted grain. *Poultry Science* 81(7): 995-1003.
- Calet C (1965) The relative value of pellets versus mash and grain in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal* 21(01): 23–52.
- Chehraghi M, Zakeri A, Taghinejad-Roudbanel M (2013) Effects of different feed forms on performance in broiler chickens. *European Journal of Experimental Biology* 3(4): 66-70.
- Dozier III WA, Behnke KC, Gehring CK i in. (2010) Effects of feed form on growth performance and processing yields of broiler chickens during a 42-day production period. *Journal of Applied Poultry Research* 19(3): 219-226.
- Engberg RM, Hedemann MS, Jensen BB (2002) The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science* 44: 569-579.
- Erener G, Ocak N, Ozturk E i in. (2003) Effect of different choice feeding methods based on whole wheat on performance of male broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 106(1-4): 131–138.
- Gadzirayi CT, Mutandwa E, Chihiya J i in. (2006) A comparative economic analysis of mash and pelleted feed in broiler production under deep litter housing system. *International Journal of Poultry Science* 7: 629-631.
- Grochowicz J (1996) *Technologia produkcji mieszanek paszowych*. PWRiL Warszawa.
- Havenstein GB, Ferket PR, Qureshi MA (2003) Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets 1. *Poultry Science* 82: 1500-1508.

- Hejft R (2002) Ciśnieniowa aglomeracja materiałów roślinnych, ITE Radom.
- Husvéth F, P  l L, Galamb E,   cs KC i in. (2015) Effects of whole wheat incorporated into pelleted diets on the growth performance and intestinal function of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 210: 144–151.
- Just N, Duchaine C, Singh B (2009) An aerobiological perspective of dust in cage-housed and floor-housed poultry operations. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 4(1): 13.
- Kjaer JB, Bessei W (2013) The interrelationships of nutrition and feather pecking in the domestic fowl. *Archiv f  r Geflügelkunde* 77: 1-9.
- Leeson S, Caston L, Summers JD (1996) Broiler response to energy or energy and protein dilution in the finisher diet. *Poultry Science* 75(4): 522-528.
- Matuszek D (2012) Analiza przebiegu automatycznego procesu dozowania wybranych s  k  adnik  w paszy drobiowej w warunkach paszy przemys  lowej. *Inżynieria Rolnicza* 2(136): 221-229.
- Mazanowski A (2011) Nowoczesna produkcja kurcząt brojlerów. Pro Agricola Sp. z o.o.
- Michalczuk M,   ukasiewicz M, Wnuk A i in. (2013) Wpływ dostępu do wybiegów na wyniki produkcyjne oraz warto  c rze  zn   kurcz  t wolno rosn  cych Hubbard JA 957. *Roczniki Naukowe PTZ* 9(2): 23-31.
- Mohhamadi V, Abbaspour B, Sharifi SD i in. (2014) Gravimetric and frictional properties of broilers diets. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal* 16(2): 167-175.
- Nielsen BL (2004) Behavioural aspects of feeding constraints: do broilers follow their gut feelings? *Applied Animal Behaviour Science* 86(3-4): 251–260.
- Osek M, Milczarek A (2016) Wyniki odchovu i warto  c rze  zna kurcz  t brojlerów   zywionych mieszankami z r  wnym udzia  em ca  ego ziarna pszenicy. *Journal of Animal Science, Biology and Bioeconomy* 34(1): 15-22.
- Quentin M, Bouvarel I, Picard M (2004) Short-and long-term effects of feed form on fast-and slow-growing broilers. *Journal of Applied Poultry Research* 13(4): 540-548.
- Smulikowska S, Rutkowski A (2005) Zalecenia   ywieniowe i warto  c pokarmowa pasz. Normy   ywienia Drobiu, Instytut Fizjologii i   ywienia Zwierz  t im. Jana Kielanowskiego PAN.
- Svihus B, Juvik E, Hetland H i in. (2004) Causes for improvement in nutritive value of broiler chicken diets with whole wheat instead of ground wheat. *British Poultry Science* 45: 55-60.
- Vermeulen A, Schaap D, Schetters TP (2001) Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology* 100(1-2): 13–20.
- Yaghoubfar A, Samiei R, Dastar B i in. (2009) The effect of feed form (pellet and mash) and nutrients and metabolizable energy levels on performance of broiler chickens. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 16(1-A).
- Zang JJ, Piao XS, Huang DS i in. (2009) Effects of feed particle size and feed form on growth performance, nutrient metabolizability and intestinal morphology in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 22(1): 107-112.
- Zawi  lak K, Sobczak P (2013) Analiza procesu rozdrabniania zb  w paszowych. *Pasze Przemys  lowe* 22(4): 11-14.

7. Inseminacja u ptaków gospodarskich

Artificial insemination in selected poultry species

Łukasz Czerniawski⁽¹⁾, Kostiantyn Vasiukov⁽¹⁾, Marta Kosińska⁽¹⁾, Ewelina Misiec⁽¹⁾,
Jakub Łukaszczyk⁽¹⁾, Kamil Drabik⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie *

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UP, mgr inż. Kamil Drabik

Łukasz Czerniawski: czerniawski.luk@gmail.com

Słowa kluczowe: sztuczne unasienianie, pobieranie nasienia, dojrzałość płciowa, zapłodnienie

Streszczenie

Wzrost zapotrzebowania na produkty drobiarskie niesie za sobą intensyfikację produkcji, również poprzez poprawę reprodukcji drobiu. Jedną z jej metod jest opracowanie sposobów sztucznego unasieniania oraz ich wdrożenie do hodowli ptactwa domowego. Techniki pobierania i magazynowania nasienia oraz procedury inseminacji samic zostały opracowane jeszcze w latach 30-tych XX wieku, jednak zagadnienia te są aktualne do dzisiaj. Celem niniejszej pracy była analiza technik inseminacji stosowanych u różnych gatunków ptaków gospodarskich. Zastosowanie sztucznego unasieniania jest opłacalne nie tylko pod względem ekonomicznym, ponieważ ogranicza konieczność posiadania dużej liczby samców do rozrodu, ale też pozwala na uzyskanie krzyżówek między rasami, typami użytkowymi, czy nawet gatunkami, które wykazują znaczny dymorfizm płciowy i zróżnicowanie cech fenotypowych, uniemożliwiające naturalną reprodukcję.

1. Wstęp

Jednym ze sposobów wspomagania i kontroli rozmnażania ptaków jest sztuczna inseminacja. Obecnie jest ona stosowana na szeroką skalę m. in. w rozrodzie indyków oraz kur mięsnych, co jest związane z dymorfizmem płciowym w masie ciała, a w konsekwencji z niskimi wskaźnikami zapłodnienia jaj. Sztuczne unasienianie, czyli zdeponowanie pobranego wcześniej nasienia samców bezpośrednio w drogach rodnych samicy, ma liczne zalety. Przy posiadaniu niewystarczającej liczby samców potrzebnych do krycia naturalnego można pobrać nasienie od jednego z nich i zapłodnić nim wybraną liczbę samic (Lasoń i in. 2016) lub zrobić to samo w przypadku konieczności uzyskania jak największej liczby potomstwa od danego osobnika, np. cennego pod względem genetycznym. Oprócz tego sztuczna inseminacja pozwala na transport nasienia na duże odległości, a także zapobiega szerzeniu się chorób związanych z kryciem naturalnym.

Nasienie od samców można pobrać za pomocą dwóch metod. Pierwszą, najczęściej stosowaną, jest masaż grzbietu i okolic kloaki, gdyż w momencie pobudzenia samca, nacisk na boczne okolice kloaki powoduje wynicowanie organu kopulacyjnego i wyciek nasienia. Drugą metodą jest wykorzystanie naturalnych odruchów płciowych samca w czasie stymulacji przez samicę. Nasienie pobiera się do zbiorniczków odpowiednio przystosowanych do budowy anatomicznej organu kopulacyjnego samca. Zabieg inseminacji powinien być przeprowadzony jak najszybciej od momentu pobrania nasienia, gdyż w warunkach *in vitro* plemniki charakteryzują się szybką utratą zdolności do zapładniania komórki jajowej. Z kolei rozrzedzenie nasienia za pomocą rozpuszczalnika pozwala na dłuższe jego przechowywanie. Pobrane nasienie wprowadza się do części pochwowej jajowodu samicy za pomocą pipety lub pistoletu inseminacyjnego. Przy krzyżowaniu międzygatunkowym należy stosować głębszą inseminację, w której nasienie wprowadza się do części macicznej jajowodu

*SKN działa pod patronatem Krajowej Rady Drobiarstwa, Izba Gospodarcza w Warszawie

Celem pracy była analiza znaczenia stosowania technik inseminacji u różnych gatunków ptaków gospodarskich oraz omówienie niektórych technik pobierania nasienia samców i unasieniania samic.

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1 Inseminacja u kur

Techniki pozyskiwania nasienia od kogutów zostały opracowane jeszcze w pierwszej połowie XX wieku, a stosowane są powszechnie do dziś. W 1936 r. Quinn i Burrows opisali nieinwazyjną metodę, polegającą na masowaniu kreślonych partii ciała koguta w celu pobudzenia odruchu kopulacji. Polegała ona na unieruchomieniu samca i delikatnym masażu grzbietu ptaka w kierunku od skrzydeł do ogona, mocnymi, szybkimi pociągnięciami, na które samiec reaguje erekcją. W tym momencie delikatnie przeciska się kloakę, po czym do pojemnika zbiera się nasienie, wyciekające przez zewnętrzne brodawki nasieniowodu. Nasienie do dróg rodnych kur wprowadza się dwoma sposobami: inseminacji dootrzewnowej oraz inseminacji przez jajowód. Inseminacja dootrzewnowa polega na bezpośrednim wprowadzeniu nasienia w okolice jajnika, częściej stosowaną techniką jest jednak inseminacja przez jajowód, która polega na uciskaniu brzucha kury i wynicowaniu ujścia pochwy przez kloakę. Nasienie wprowadza się na głębokość 2-4 cm.

W przypadku kur inseminacja stosowana jest w chowie wielkotowarowym oraz w hodowlach zarodowych. Jej atutem jest zwiększenie liczby kur przypadających na jednego koguta, a także procentu zapłodnionych jaj, pozyskanych od jednej samicy. Poza tym, eliminacja krycia naturalnego pozwala ominąć czynnik behawioralny, wynikający z występującej w stadach hierarchii. Często obniżenie wskaźnika zapłodnienia okazuje się skutkiem obecności w stadzie kur, znajdujących się w hierarchii tak wysoko, że nie pozwalają się pokryć. Dodatkowo kogut może wykazywać pewne preferencje i nie kryć niektórych samic w stadzie, jest to tzw. "krycie selektywne" (Warren i Gish 1943). Ważną zaletą sztucznego unasieniania, jest także możliwość uniknięcia przez samice urazów, mających miejsce w przypadku krycia naturalnego. Wynika to przede wszystkim z dymorfizmu płciowego, szczególnie wyraźnego u kur mięsnych, gdzie kogut znacznie przewyższa kurę pod względem rozmiarów ciała. Urazy mogą wstąpić także u kur nieśnych, gdzie temperament kogutów może przejawiać się agresją. Inseminacja pozwala również ograniczyć lub wyeliminować choroby przenoszone drogą płciową, np. mykoplazmozy (Stipkovits i Kempf 1996).

Większość ras i linii kur osiąga dojrzałość płciową dość wcześnie, około 138-150 dni (Calik 2018). O tempie dojrzewania decyduje przede wszystkim długość dnia świetlnego. Ten czynnik wywiera również znaczący wpływ na nieśność u dorosłych samic oraz na produkcję plemników u kogutów, która rozpoczyna się u nich już ok. 12 tyg. życia. Jednak plemniki powstające na samym początku procesu dojrzewania są słabe i mało żywotne, samce powinny więc osiągnąć dojrzałość hodowlaną. Termin jej osiągnięcia waha się zależności od wieku, długości dnia świetlnego, ale także od rozmiaru ciała samca, co kolei wpływa na rozmiar jąder oraz jakość nasienia. Przeciętnie dojrzałość hodowlaną kogut osiąga bliżej 18 tygodnia życia (Kharayat i in. 2018).

Szczególnie ważne są prace przygotowawcze, które poprzedzają zabieg inseminacji. W przypadku kur domowych, zaleca się trzymać koguta z dala od samic, aby zmaksymalizować ilość dostępnego nasienia. Poza tym, ważnym również jest odstawienie paszy 12 godzin przed pobraniem nasienia. Ma to na celu wyczyszczenie przewodu pokarmowego ptaka by zapobiec ewentualnemu zanieczyszczeniu nasienia (Quinn i Burrows 1936). Przed inseminacją zaleca się również kontrolę jakości nasienia poprzez badanie mikroskopowe.

2.2 Inseminacja u przepiórek

Przepiórki japońskie charakteryzują się znaczną nieśnością, a poza tym mają wysokie tempo wzrostu i wcześnie osiągają dojrzałość płciową, dzięki czemu są wykorzystywane do badań w zakresie fizjologii, żywienia i reprodukcji drobiu (Olszańska 1979). Dodatkowo ptaki te wyróżniają się charakterystycznym nasieniem. Cechy te przyczyniają się do wzrostu zainteresowania przepiórkami w kontekście wprowadzania metod biotechnologicznych w ich hodowli (Ottinger 2001).

Przepiórka japońska osiąga dojrzałość płciową około 7 tygodnia życia, kiedy widoczny jest dymorfizm płciowy. Charakterystyczną jest większa masa ciała samic (160-220 g) w porównaniu do masy ciała samców (120-150 g), co jest cechą niespotykaną u innych gatunków drobiu grzebiącego (Rutkowski 2012). Produkcja plemników zaczyna się już w 26 dniu życia samca, a następnie w 30 dniu życia przedostają się one do nasieniowodów. Pierwsze próby godowe samce zaczynają około 35 dnia życia. Ponadto samce mają gruczoł nadodbytowy, który jest zbudowany z górnej części fałdu skórnej kloaki. W czasie wzrastającej aktywności płciowej zwiększa on swoje rozmiary, stając się zewnętrznym objawem zdolności płciowych. Przybiera wtedy sinoczerwoną barwę. Ciekawym jest, że dźwięki wydawane przez samce mogą przyspieszyć rozwój płciowy samic (Mills i in. 1997).

Jedną z możliwości inseminacji przepiórek także jest metoda Burrowsa i Quinna (1936). Aby uzyskać nasienie od samca przepiórki japońskiej należy trzymać go w prawej dłoni, tak aby ogon był skierowany w stronę palca wskazującego. Następnie kciukiem i palcem wskazującym lewej dłoni uciskać na kloakę i jednocześnie wykonywać masaż brzucha. W ten sposób zostanie wytłoczone nasienie, które pobiera się za pomocą mikropipety wyposażonej w gumową rurkę (Marks i Lepore 1965). Razem z nasieniem pojawia charakterystyczna pianina. Jest nią substancja glikomukoproteinowa (Fujihara i Koga 1991; Seiwert i Adkins-Regan 1998). Im większy gruczoł kloakalny tym większa objętość wydzielanej pianiny. Główną jej funkcją jest zapobieganie przyklejaniu do skorupy jaja zdeponowanego nasienia, które już wcześniej znalazło się w jajowodzie samicy. Dodatkowo powoduje ona rozrzedzenie skupisk plemników oraz zwiększa ich ruchliwość (Biswas i in. 2010). Plemniki dzięki pianinie mają większą zdolność zapładniającą. Natomiast w warunkach *in vitro*, w niskich temperaturach obecność pianiny w nasieniu zwiększa liczbę plemników zdeformowanych i obniża ruchliwość plemników (Fujihara 1989; Chełmońska i in. 2006).

Właściwą dawkę nasienia należy zdeponować w pochwie samicy, dbając by była ona przed tym zabiegiem możliwie jak najmniej zestresowana (Marks i Lepore 1965). Przed wykonaniem zabiegu inseminacji powinno się zbadać nasienie makro i mikroskopowo biorąc pod uwagę objętość ejakulatu, stopień jego zanieczyszczenia oraz koncentrację i budowę plemników. Miarodajnym sposobem sprawdzenia jakości nasienia jest też ocena procentu zapłodnionych jaj oraz wylęgowość piskląt (Birkhead i Fletcher 1994).

2.3 Inseminacja u indyków

Indyki (*Meleagris gallopavo*) należą do najcięższych ptaków grzebiących użytkowanych w kierunku mięsnym. U indyków także, występuje największy dymorfizm płciowy w masie ciała, spośród ptaków użytkowych, niejednokrotnie utrudnia on, a wręcz uniemożliwia krycie naturalne (Jankowski i Kozłowski 2012).

Współczesne indyki rzeźne (brojlery) powstają na skutek krzyżowania rodów matecznych i ojcowskich o różnej wartości użytkowej, tj. indyczek lżejszych zawsze z cięższymi indorami. Ze względu na różnice w masie ciała konieczna jest inseminacja.

Nasienie od indorów pobiera się metodą opracowaną przez Quinna i Burrowsa (1936), masując okolice kloaki, po obu jej stronach oraz nasady ogona odchylonego, w kierunku grzbietu ptaka. Na początku okresu rozplodowego, na kilkanaście dni przed pierwszą inseminacją indyczek, należy w odstępach kilkudniowych wykonać 2-3 próbne masaże i pobieranie nasienia. Do reprodukcji zostawia się najlepsze indory, brakując sztuki nie reagujące na masaż lub oddające nasienie złej jakości. Nasienie należy pobierać nie rzadziej niż co 7 dni, ponieważ przy mniejszej częstotliwości charakteryzuje się gorszą jakością. W praktyce optymalne jest pobieranie nasienia 2 razy w tygodniu. Dobre nasienie indora ma postać gęstego, jednolitego, nieprzezroczystego płynu o barwie mlecznobiałej. Barwa nasienia zależy od koncentracji plemników, jeśli jest ona mała, wówczas ejakulat jest szarawy, przezroczysty i wodnisty. Żółta i jasnobrazowa barwa najczęściej świadczą o dużej liczbie zdeformowanych plemników.

Pobrane nasienie należy w ciągu 30-40 min wprowadzić do jajowodu samicy. Opóźnienie inseminacji zmniejsza liczbę jaj zapłodnionych. Rozcieńczenie nasienia bezpośrednio po pobraniu przedłuża zdolność plemników do zapłodnienia do 8 godzin. Termin pierwszej inseminacji jest niezwykle ważnym czynnikiem, który wpływa na zapłodnienie jaj w pierwszych tygodniach użytkowania nieśnego. Dokonuje się ją zwykle między 12-16 dniem od stymulacji świetlnej, kiedy

w stadzie indyczek pojawiają się pierwsze jaja. W czasie pierwszej inseminacji nie udaje się zapłodnić wszystkich indyczek, gdyż nie wszystkie są jeszcze dojrzałe. Inseminuje się te, u których można wycisnąć jajowód. Każdy dzień opóźnienia pierwszej inseminacji zwiększa odsetek unasiennionych indyczek (Burrows i Marsden 1938). Po wycisnieniu jajowodu deponuje się nasienie do pochwy na głębokość 4-5 cm. Osoba wycisnująca jajowód następnie zwalnia ucisk brzucha, powodując cofnięcie jajowodu, który zasysa nasienie, chroniąc je przed wypłynięciem. Unasiennioną samicę po inseminacji należy spokojnie i delikatnie położyć na ściółce, by zapobiec ewentualnemu uszkodzeniu jaj, które znajdują się w części macicznej jajowodu (Jankowski i Kozłowski 2012).

2.4 Inseminacja u gęsi

Problematyczność rozrodu gęsi wynika m.in. z takich czynników jak sezonowość rozrodu, niewielka produkcja jaj, stosunkowo niska wylęgowość oraz słaba jakość nasienia. Niektóre z tych problemów można wyeliminować stosując inseminację, a także hodowlę ukierunkowaną na wzrost płodności (Łukaszewicz 2010).

Trudność w uzyskaniu pożądanego genetycznie potomstwa u gęsi może wynikać także z faktu występującej wśród tych ptaków monogamii, chociaż skłonność do kojarzenia się z tylko jedną partnerką u gęsi domowych nie jest tak wyraźna, jak u ich dzikich krewnych. Gęsior hodowlany kojarzy się z jedną do pięciu samic, rzadko więcej, jednak często nie pozwala to na osiągnięcie maksymalnej liczby potomstwa od atrakcyjnego, pod względem genotypowym i fenotypowym samca (Kinney i Burger 1960). Zastosowanie w rozrodzie ptaków sztucznego unasienniania niesie wiele korzyści. Pozwala ono na ominięcie specyfiki procesów rozrodczych gęsi i podwyższenie wskaźników reprodukcyjnych, a także daje możliwość wykorzystania nasienia wartościowych samców, a przez to ukierunkowanie pracy hodowlanej pod względem poprawy pożądanых cech.

Gęsiory osiągają dojrzałość płciową w wieku 7-8 miesięcy. Nasienie można pobierać w sezonie rozrodczym 2-3 razy w tygodniu. Dawkę inseminacyjną w objętości od 0,05 do 0,1 ml wprowadza się do jajowodu gęsi przy pomocy strzykawki tuberkulinowej oraz pipety inseminacyjnej. W dawce powinno znaleźć się ok 100 mln plemników. Nasienie można rozrzedzić, maksymalnie w stosunku 1:4, co umożliwia dokładniejsze podawanie małych dawek oraz wydłuża zdolność zapładniającą plemników *in vitro*. Zabieg inseminacji u gęsi wystarczy stosować raz na 5-6 dni, co pozwala na uzyskanie ok. 80-95% zapłodnionych jaj. Największą skuteczność ma sztuczne unasiennianie wykonywane porą popołudniową, ponieważ przesuwaniu się plemników nie przeszkadza jajo wędrujące w dół jajowodu (Chełmońska i Dymkowska 1993).

Zdolności zapładniające nasienia w przypadku gęsi, odmiennie niż u kur, nie obniżają się podczas procesu mrożenia. Jakość nasienia określa się poprzez ruchliwość, przeżywalność oraz budowę morfologiczną plemników, a także poziom andenozyno-5-trifosforanu (ATP) i białek. Istotna jest także rzeczywista zdolność zapładniająca plemników określana poprzez wyniki lęgu jaj oraz testy penetracji plemników przez błonę przedwitelinową komórki jajowej (Wertelecki i in. 2002). Nasienie może być przechowywane w ciekłym azocie do temperatury -196 °C. Materiał poddawany zamrażaniu musi być rozrzedzony i zmieszany ze środkiem ochronnym zabezpieczającym przed destrukcją plemników w czasie zamrażania i rozmrażania.

W wyniku inseminacji nasieniem mrożonym można u gęsi osiągnąć ponad 90% zapłodnionych jaj i więcej niż 75% wylęzonych piskląt. Używając takiego nasienia trzeba zwiększyć kilkukrotnie dawkę plemników (Chełmońska i Dymkowska 1993). Na podstawie wylęgowości piskląt wykazano jedynie niewielkie obniżenie efektywności zapładniającej plemników kriokonserwowanych. Badania wskazują jednak, że można zwiększyć częstość zapłodnienia nasieniem rozmrożonym poprzez zwiększenie dawki inseminacyjnej. Stwierdzono jednak, że przechowywanie nasienia w niskich temperaturach może wpłynąć negatywnie na zamieralność zarodków (Łukaszewicz 2001a; Łukaszewicz 2001b). Wykazano także obniżenie parametrów wzrostu piskląt w pierwszych trzech dniach życia u ptaków uzyskanych po inseminacji materiałem zamrożonym-rozmrożonym porównaniu do piskląt uzyskanych od gęsi inseminowanych nasieniem świeżym. Różnice w tempie wzrostu, opisywane za pomocą przyrostów masy ciała oraz zmian masy woreczka żółtkowego i jego składu chemicznego, wyrównywały się już w 5 dniu życia (Wertelecki

i in. 2002). W badaniach Łukaszewicz (2003) obserwowano pozytywny wpływ inseminacji gęsi rozmrożonym nasieniem na podatność plemników na mrożenie w kolejnych pokoleniach. W każdym z czterech badanych pokoleń odnotowano zwiększenie odporności plemników na stres temperaturowo-osmotyczny związany z kriokonserwacją, do którego doszło na skutek selekcji naturalnej pośród badanych osobników. Dodatkowo u badanych samców pojawiały się pozytywne reakcje na masaż podczas regularnego pobierania nasienia.

3. Podsumowanie

Pierwsze opisy zabiegu inseminacji drobiu pochodzą z lat 30-ch ubiegłego wieku. Już wtedy hodowla ptactwa domowego napotykała problemy ograniczające naturalną reprodukcję (choroby, dymorfizm płciowy a urazy i skaleczenia ptaków itd.), które próbowano wyeliminować przy pomocy sztucznego unasieniania. Opracowane wówczas techniki przeprowadzenia zabiegu u różnych gatunków drobiu są stosowane i dzisiaj. Sztuczna inseminacja jest cenną metodą wspomagania rozmnażania w chowie i hodowli ptaków, pozwala na jego kontrolę jakościową, zaś jej zastosowanie jest uzasadnione ekonomicznie.

4. Literatura

- Birkhead TR, Fletcher F (1994) Numbers of spermatozoa attached to and penetrating perivitelline layers of Japanese quail eggs. *The Auk* 111(4): 997-1000.
- Biswas A, Ranganatha OS, Mohan J (2010) The effect of different foam concentrations on sperm motility in Japanese quail. *Veterinary Medicine International* 2010: 1-4.
- Burrows WH, Marsden SJ (1938) Artificial breeding of turkeys. *Poultry Science* 17(5): 408-411.
- Calik J (2018) Kształtowanie się trendów cech użytkowych i wylęgowości kur Rhode Island White A-33 w ciągu pięciu pokoleń. *Wiadomości Zootechniczne* 56(4): 52-57.
- Chełmońska B (1967) Próby sztucznego unasieniania gęsi. *Medycyna Weterynaryjna* 7: 432-436.
- Chełmońska B, Dymkowska B (1993) Rozród ptaków. [W:] Świerczewska E (red.) *Hodowla i użytkowanie drobiu*, Warszawa, Wydawnictwo SGGW: 40-66.
- Chełmońska B, Łukaszewicz E, Kowalczyk A i in. (2006) The effect of proctodeal gland foam, diluent and dimethylacetamide addition on morphology and fertilising ability of Japanese quail (*Coturnix japonica*) spermatozoa. *The Journal of Poultry Science* 43(1): 54-59.
- Fujihara N (1989) Physiological characteristics of quail (*Coturnix coturnix japonica*) spermatozoa. [In:] *Proceedings of IV. International Congress of Andrology*, Florence, Italy.
- Fujihara N (1991) Physiological function of the dorsal proctodeal gland foam of the male quail. In *Proceedings of the World Quail Conference*, Tartu-Tallin, Estonia.
- Jankowski J (2012) *Hodowla i użytkowanie drobiu*. Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa: 459-467.
- Jankowski J, Kozłowski K (2012) *Hodowla i użytkowanie indyków* [W:] Jankowski J (red.) *Hodowla i użytkowanie drobiu*, PWRiL, Warszawa: 325-354.
- Kharayat NS, Chaudhary GR., Katiyar R i in. (2018) Significance of artificial insemination in poultry. *Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology* 5(1): 15-19.
- Kinney T, Burger RE (1960) A technique for the insemination of geese. *Poultry Science* 39(1): 230-232.
- Lasoń M, Kowalczyk A, Nowak B (2016) Zastosowanie sztucznej inseminacji w rozrodzie przepiórek japońskich (*Coturnix japonica*) typu mięsnego. *Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania*: 152-161.
- Łukaszewicz E (2001a) Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. *Theriogenology* 55(9): 1819-1829.
- Łukaszewicz E (2001b) DMF effects on frozen gander semen. *British Poultry Science* 42(3): 308-314.
- Łukaszewicz E (2003) Resistance to the freezing process of White Koluda gander spermatozoa in four subsequent generations. *Medycyna Weterynaryjna* 59(10): 909-913.

- Łukaszewicz E (2010) Artificial insemination in geese. *World's Poultry Science Journal* 66(4): 647-658.
- Marks HL, Lepore PD (1965) A procedure for artificial insemination of Japanese quail. *Poultry science* 44(4): 1001-1003.
- Mills D, Crawford L, Domjan M, i in. (1997) The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21(3): 261-281.
- Olszańska B (1979) Przepiórka japońska jako model badań laboratoryjnych. *Drobiarstwo* 11: 6-8.
- Ottinger MA (2001) Quail and other short-lived birds. *Experimental Gerontology* 36: 859- 868.
- Quinn JP, Burrows WH (1936) Artificial insemination in fowls. *Journal of Heredity* 27(1): 31-38.
- Seiwert CM, Adkins-Regan E (1998) The foam production system of the male Japanese quail: characterisation of structure and function. *Brain, Behavior and Evolution* 52(2): 61-80.
- Stipkovits L, Kempf I (1996) Mycoplasmoses in poultry. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties* 15: 1495-1526.
- Warren DC, Gish CL (1943) The value of artificial insemination in poultry breeding work. *Poultry Science* 22(2): 108-117.
- Wertelecki T, Łukaszewicz E, Jamroz D (2002) Rozwój piskląt gęsi pochodzących po inseminacji gęsi nasieniem świeżym lub zamrożonym-rozmrożonym. *Medycyna Weterynaryjna* 11(58): 890-894.

8. Choroby drobiu wpływające na jakość jaj

Poultry diseases affecting eggs quality

Łukasz Czerniawski⁽¹⁾, Marta Kosińska⁽¹⁾, Jakub Łukaszczyk⁽¹⁾, Kostiantyn Vasiukov⁽¹⁾,
Ewelina Misiec⁽¹⁾, Kamil Drabik⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie *

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Łukasz Czerniawski: czerniawski.luk@gmail.com

Słowa kluczowe: avian infectious bronchitis, *Dermanyssus gallinae*, syndrom spadku nieśności, *Eimeria* spp.

Streszczenie

Na przestrzeni lat w hodowli i chowie drobiu człowiek ma styczność z wieloma chorobami powodującymi straty ekonomiczne poprzez wzrost śmiertelności w stadach niosek i obniżenie ilości i jakości surowca jajczarskiego. W pracy przeanalizowane zostały choroby i zakażenia wywierające znaczący wpływ na nieśność ptaków oraz obniżenie jakości jaj, głównie poprzez nieprawidłową budowę skorupy. Omówiono wybrane infekcje o etiologii wirusowej, takie jak: zakaźne zapalenie oskrzeli ptaków (IB), syndrom spadku nieśności (EDS), rzekomy pomór drobiu (ND), zakaźne zapalenie krtani i tchawicy (ILT), oraz dwie choroby pasożytnicze tj. kokcydiozę drobiu i inwazję *Dermanyssus gallinae*. W celu zapobiegania tym chorobom należy dbać o regularną immunizację ptaków, przestrzegać zasad higieny i dbać o prawidłowe warunki chowu, a w razie potrzeby stosować właściwe leczenie.

1. Wstęp

Jaja konsumpcyjne, jak każdy inny produkt trafiający na półki sklepowe muszą spełniać określone w czynnym ustawodawstwie wymogi, w tym też wymagania dotyczące jakości dostarczanego surowca. Na jakość składa się wiele wskaźników, od czystości skorupy i prawidłowej budowy jaja, przez jego skład chemiczny (profil kwasów tłuszczowych, skład aminokwasowy) po bezpieczeństwo konsumenta końcowego. Na zmiany zachodzące w treści jaj konsumpcyjnych wpływają warunki utrzymywania stada, żywienie (w tym dodatki paszowe), ale też mogące występować stany chorobowe. Wiele chorób dotyczących stad drobiu stanowi poważny problem zarówno pod względem sanitarnym, ekonomicznym, ale także obniżającym dobrostan ptaków, co odbija się negatywnie na jakości jaj.

Celem pracy jest przybliżenie problematyki zależności jakości surowca jajczarskiego od stanu zdrowotnego stada towarowego kur nieśnych.

2. Przegląd piśmiennictwa

Drób narażony jest na wiele chorób m.in. mających podłoże wirusowe, bakteryjne, grzybicze i pasożytnicze. Niektóre z nich mają predylekcje gatunkowe, zaś inne są groźne dla wszystkich ptaków zaliczanych do drobiu. Niemniej jednak, występowanie jakichkolwiek patogenów jest niepożądane ze względu na skutki ich obecności, między innymi obniżenie poziomu dobrostanu, wzrost śmiertelności w stadzie, spadek produktywności oraz pogorszenie jakości surowców drobiarskich.

W pracy omówiono wybrane infekcje o etiologii wirusowej, które wpływają na jakość surowca jajczarskiego, takie jak: zakaźne zapalenie oskrzeli ptaków (IB), syndrom spadku nieśności (EDS), rzekomy pomór drobiu (ND), zakaźne zapalenie krtani i tchawicy (ILT), oraz dwie choroby pasożytnicze tj. kokcydiozę drobiu i inwazję *Dermanyssus gallinae*.

*SKN działa pod patronatem Krajowej Rady Drobiarstwa, Izba Gospodarcza w Warszawie

2.1 Zakaźne zapalenie oskrzeli ptaków (IB)

Do jednej z najistotniejszych przyczyn obniżenia efektywności produkcji drobiarskiej zaliczamy zakaźne zapalenie oskrzeli ptaków (*avian infectious bronchitis*, IB) (Pijarska i Malec 2006). Jest to choroba wirusowa wywołana przez koronawirusa IBV (*infectious bronchitis virus*), należącego do rodziny *Coronaviridae*. Jego genom buduje pojedyncze RNA (Roberts i in. 2011). Duża zmienność sekwencji jego aminokwasów jest odpowiedzialna za powstawanie nowych odmian antygenowych. Dodatkowo zmienna jest jego patogenność i tropizm tkankowy, co wiąże się z różną formą samej choroby. Choroba ta występuje głównie u kur i bażantów i niezależnie od wieku ptaków, które mogą zarazić się w dwóch okresach życia, tuż po wykluciu lub dopiero po osiągnięciu dojrzałości płciowej (Pijarska i Malec 2006). Choroba rozprzestrzenia się drogą inhalacyjną lub przez kontakt z chorym ptakiem, zakażonymi odchodami pochodzącymi od osobników chorych i nosicieli lub zakażoną ściółką czy sprzętem. Poza tym, wirus, może przedostawać się na skorupy jaj bezpośrednio od ptaków chorych, a następnie zarażać pisklęta (Domańska-Blicharz 2018).

Objawy choroby dotyczą głównie układu oddechowego. Zalicza się do nich duszności, kaszel, rzęzenie, katar, łzawienie oraz obrzęk zatok podoczodołowych. Obserwuje się także drżenie mięśni i rozjaśnienie ich barwy, co można łatwo zauważyć na mięśniach udowych żywych ptaków. Zapalenie oskrzeli ptaków diametralnie przyczynia się do spadku nieśności w stadzie, nawet do 50%. Mimo łagodnych objawów klinicznych może być on długotrwały. Zauważalne jest też pogorszenie wskaźników zapłodnienia (Sevoian i Levine 1957). Dodatkowo jaja, pochodzące od chorych niosek mają cienką skorupę lub nie posiadają jej w ogóle. Zdarzają się również skorupy chropowate i zdeformowane. Zmiany te nie wpływają bezpośrednio na pogorszenie jakości jaj, natomiast przyczyniają się do obniżenia wytrzymałości samych skorup, co może eliminować takie jaja z obrotu. Poza tym, jaja o słabych skorupach mogą być zgniecione i/lub zjedzone przez same ptaki jeszcze w gnieździe. Zdarzają się też zmiany konsystencji białka, które staje się wodniste i może zawierać ziarnistości (Bande i in. 2016).

Szczepienia obok przestrzegania zasad bioasekuracji są najważniejszym narzędziem kontroli zakażeń IBV. Ptaki powinny mieć stale wysoki poziom przeciwciał anti-IBV (Pijarska i Malec 2006). Skuteczność dobrania szczepionki zależy od prawidłowej identyfikacji typu wirusa, który wywołał chorobę. Wśród metod jego identyfikacji wyróżnia się metody antygenowe, molekularne, a także opierające się na odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu kontrolnym, ale zjadliwym szczepem. O przynależności do danego typu IBV decyduje sekwencja nukleotydowa/aminokwasowa genu/białka S1 wirusa. Najbardziej rozpowszechniony typ IBV to GI-1 znany pod nazwą Massachusetts (Mass). Globalne rozpowszechnienie szczepów typu Mass IBV zawdzięcza najprawdopodobniej częstemu stosowaniu go w różnych szczepionkach. Szybka ewolucja wirusów IBV i stosowanie masowych szczepień może powodować pojawienie się kolejnych wariantów genetycznych wirusa (Domańska-Blicharz 2018).

2.2 Syndrom spadku nieśności (*egg drop syndrome*, EDS)

Syndrom ten wywołany jest przez adenowirusy powszechnie występujące wśród ptaków. Wirusy te rzadko są chorobotwórcze i często doprowadzają do zakażeń bezobjawowych. Ich znaczenie chorobotwórcze rośnie w przypadku obniżenia odporności w stadzie. EDS jest wirusową chorobą kur niosek, która powoduje spadek nieśności oraz produkcję jaj o cienkich i zdeformowanych skorupach przez ptaki, które nie wykazują objawów chorobowych. Przeciwciała dla wirusa EDS są wykrywane również w surowicy domowych kaczek, gęsi oraz ptaków wodnych dziko żyjących. Na zakażenie adenowirusami wrażliwe są perliczki i przepiórki japońskie. W warunkach naturalnych nie wykazano zakażeń wśród indyków i bażantów, mimo, że te ptaki są wrażliwe na zakażenie w warunkach doświadczalnych (Koncicki i in. 2006). Do zakażenia dochodzi drogą kropelkową lub *per os* przez odchody ptaków zakażonych. Dodatkowo drób hodowlany może zarazić się od chorego ptactwa dzikiego.

Jednym z pierwszych objawów choroby jest spadek nieśności i pojawienie się jaj z nieprawidłowo wykształconą skorupą. Produkcja jaj w tym czasie zmniejsza się o 10 do 40%. Skorupa jaj traci właściwy pigment, dodatkowo staje się cienka, krucha, szorstka i ziarnista, zdarzają się jaja także bez skorup (Roberts i in. 2011). Jako jedno z ostatnich objawów wymienia się

zmętnienie i wodnistość białka (Mazurkiewicz i in. 1990). Aby ograniczać straty w stadzie ważna jest immunizacja kur szczepionkami inaktywowanymi, dzięki którym odporność utrzymuje się przez około rok. Takie szczepionki powinno się je stosować przed rozpoczęciem okresu nieśności (Koncicki i in. 2006).

2.3 Kokcydioza drobiu

Jest to choroba wywoływana przez pierwotniaki z rodzaju *Eimeria*. Większość gatunków kokcydii występujących u drobiu jest bardzo patogenna i powoduje specyficzne objawy kliniczne, dzięki czemu diagnostyka postaci klinicznej choroby jest znacznie ułatwiona. Występują pięć rodzajów kokcydiozy, które są powodowane przez pięć różnych gatunków z rodzaju *Eimeria*, mianowicie są to występujące u drobiu grzebiącego: *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. acervulina* oraz *E. maxima*. Każdy z tych gatunków zasiedla określony odcinek przewodu pokarmowego, np. *E. acervulina* zasiedla dwunastnicę, a *E. brunetti* – jelita ślepe. Dzięki tej wiedzy diagnostyka kokcydiozy może opierać się również na badaniu ewentualnie występujących zmian w poszczególnych częściach przewodu pokarmowego (Gawel i in. 2015).

Ptaki zakażone drobnoustrojami *Eimeria* są osłabione, sennie i osowiałe, mają nastroszone pióra, a także przyjmują charakterystyczną postawę tzw. postawę "sępa". Ich odchody początkowo mają kolor żółtawy, który z czasem przechodzi w czekoladowo-mahoniowy ze względu na obecność krwi. Niekiedy można też zaobserwować u ptactwa wzmożone pragnienie. Podczas sekcji stwierdza się głównie rozdęcie i zapalenie krwotoczne błony śluzowej jelit, a w ich świetle także obecność dużej ilości skrępow. Przy gatunku *E. tenella* charakterystyczną zmianą jest również bledź mięśni szkieletowych (Doner i in. 2019).

Infekcje pierwotniakami *Eimeri* w stadach nieśnych powodują przede wszystkim spadek produkcji. Jaja pochodzące od intensywnie zakażonych niosek silnie patogennymi gatunkami (przede wszystkim *E. acervulina*) charakteryzują się bardziej bladym kolorem żółtka niż te, u których wystąpiła słabsza inwazja mniej patogennymi gatunkami (Ruff i Britton 1976). Niestety, problemem pozostaje kwestia leczenia kokcydiozy. Specjalistyczne antybiotyki jonoforowe charakteryzują się zdolnością do osadzania się w tkance mięśniowej (kurczęta brojlery) oraz w jajach (kurzynioski). Ze względu na to, tak ważnym jest przestrzeganie okresu karencji w przypadku profilaktyki i leczenia. Zlekceważenie karencji może doprowadzić do pojawienia się pozostałości leków w jajach, co może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów i powinno skutkować wyeliminowaniem takiego surowca z rynku.

Obecnie jedną z głównych metod zapobiegania wystąpieniu kokcydiozy w stadach kur-niosek, są stosowane na szeroką skalę szczepionki (Sharman i in. 2010), wdrażane również z uwagi na fakt, iż gatunki *Eimeria* stają się coraz bardziej odporne na stosowane antybiotyki jonoforowe (Doner i in. 2019). Odnotowano, iż stosowanie szczepionek może doprowadzać do występowania krótkich przerw w nieśności stada po upływie około tygodnia od szczepienia. Aczkolwiek, nioski dość szybko powracają do produkcji, przy czym nie zauważono spadku jakości treści jajo. Niekorzystne zmiany odnotowuje się w przypadku grubości skorup, która może ulec nieznacznej degradacji (Berg i in. 1951). Wg Świątkiewicza i in. (2009), w celu profilaktyki występowania inwazji *Eimeria* można stosować probiotyki, ekstrakty ziół, olejków eterycznych, enzymów paszowych, oraz innych związków chemicznych czy organicznych (np. betainy, mannano-oligosacharydu, putrescyny).

Rozpowszechnieniu się kokcydii sprzyja bezpośrednio kontakt pomiędzy osobnikiem zdrowym, a ściółką czy pomiotem, paszą czy wodą zanieczyszczonymi odchodami ptaków chorych. *Eimerie* stanowią szczególne zagrożenie ze względu na łatwość w namnażaniu i rozprzestrzenianiu się w obrębie jednego kurnika, zwłaszcza w stadach utrzymywanych w systemach podłogowych.

2.4 Rzekomy pomór drobiu (Newcastle disease, ND)

Rzekomy pomór drobiu (*Pseudopestis avium*), nazywany także chorobą Newcastle jest jedną z najgroźniejszych chorób drobiu. Znajduje się on na liście OIE (World Organisation for Animal Health – Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt) i podlega obowiązkowi zwalczania. Chorobę wywołuje wirus RNA należący do rodzaju *Rubulavirus* rodziny *Paramyxoviridae*. Otoczony jest przez 2 glikoproteiny, które ułatwiają mu przyłączanie i wnikanie do komórek gospodarza (Roberts

i in. 2011). Wirus ma predylekcje do układu oddechowego i przewodu pokarmowego lub ośrodkowego układu nerwowego ptaków. Wyróżnia się trzy szczepy wirusa rzekomego pomoru drobiu o różnej zjadliwości i patogenności. Wysoce zjadliwe (welogeniczne) szczepy wirusa powodują ostrą chorobę układu nerwowego i oddechowego z tendencją do szybkiego szerzenia się i wysoką, dochodzącą do 90% śmiertelnością. Szczepy mezogeniczne (średnia patogenność) są przyczyną zapalenia dróg oddechowych, powodują spadek nieśności i upadki kształtujące się na poziomie 10% stada, podczas gdy szczepy lentogeniczne (niska patogenność) powodują zachorowania o łagodnym przebiegu (Gliński i Kostro 2018).

Rzekomy pomór drobiu dotyczy wszystkich gatunków ptaków gospodarskich, ale patogenność jest różna w zależności od gospodarza. Wirus w zanieczyszczonym materiale może przetrwać kilka tygodni (Alexander i Senne 2008). U dorosłych kur wpływ na produkcję jaj mogą mieć szczepy o średniej zjadliwości. Przy zakażeniu dochodzi do częściowego lub całkowitego spadku produkcji jaj. Skorupa jaja staje się bardzo cienka, dochodzi do tzw. lania jajami, powoduje to ogromne straty ekonomiczne (Roberts i in. 2011). Poza tym, obecne są też inne zmiany skorup jaj, np. występowanie zgrubień i zmian kształtu całego jaja, czy jego końców, zdarzają się dość często skorupy z chropowatością (Berg i in. 1947). W zakresie jakości treści jaj ND może powodować spadek wysokości białka gęstego, stanowiącego swego rodzaju warstwę ochronną dla żółtka. Poza tym, takie zmiany białka mogą też być związane z obniżeniem pH oraz niską pienistością białka (Jacob i in. 2000).

2.5 Zakaźne zapalenie krtani i tchawicy (*Infectiouslaryngotracheitis*, ILT)

Zakaźne zapalenie krtani i tchawicy jest wysoce zakaźną, ostro przebiegającą chorobą układu oddechowego kur występującą na całym świecie. Choroba ta może przejawiać się szerokim spektrum nasilenia objawów klinicznych, od postaci subklinicznej do postaci ostrej, a nawet nadostrej. Wywołuje ją wirus ILTV należący do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirinae* aktualnie oznaczony jako *Gallidherpes virus 1*. Wirusy z tej rodziny wywołują często zakażenia latentne, w których wirus występuje w formie utajenia. Materiał genetyczny wirusa to dwuniciowe DNA. Do zakażenia ptaków dochodzi drogą oddechową, a zakażenie szerzy się najszybciej poprzez kontakt bezpośredni pomiędzy osobnikami chorymi, siewcami wirusa, a ptakami zdrowymi, wrażliwymi na zakażenie. Możliwe jest również zakażenie drogą pośrednią (Śmiałek i in. 2012). ILT jest chorobą, która może powodować duże straty produkcyjne spowodowane śmiertelnością, zachorowalnością i zmniejszoną produkcją jaj. Choroba może dotyczyć kur w każdym wieku, jednak najczęściej obserwuje się ją u dorosłych ptaków. Objawy kliniczne choroby dotyczą przede wszystkim układu oddechowego. Można zaobserwować zaburzenia w oddychaniu, duszności, śluzowate zapalenie tchawicy, zapalenie zatok i spojówek oraz odkształcanie śluzu zmieszanego z krwią (Roberts i in. 2011).

Choroba na szeroką skalę przyczynia się do spadku pobrania paszy przez nioski, co w wyniku końcowym powoduje drastyczne spadki nieśności w stadzie. Poza tym, jak i w przypadku chorób drobiu omawianych wcześniej, zakaźne zapalenie krtani i tchawicy wpływa przede wszystkim na jakość i wytrzymałość skorup jaj. Jaja pozyskane od niosek chorych mogą charakteryzować się nieprawidłowym kształtem, chropowatością skorupy lub obniżeniem jej grubości i wytrzymałości (Raggi i in. 1961).

2.6 Inwazja *Dermanyssus gallinae*

Z wyjątkiem chorób wywoływanych przez niewidoczne gołym okiem drobnoustroje należy również pamiętać o pasożytach zewnętrznych występujących u drobiu. Najczęściej spotykanym jest ptaszyniec kurzy (*Dermanyssus gallinae*) zwany inaczej czerwonym roztoczem (ang. poultry red mite, PRM), który bytuje na zewnętrznej powierzchni żywiciela głównie nocą, więc jest klasyfikowany jako okresowy ektopasożyt (Wiśniewska i in. 2018). Jego inwazja w kurnikach zdarza się bardzo często. Jest on niewykrywalny na ptakach padłych, a na żywym ptactwie szybko się przemieszcza po powierzchni nabłonka, a najczęściej gromadzi się w okolicach kloaki, na brzuchu i pod skrzydłami. Łatwym sposobem na weryfikację wystąpienia inwazji jest pobranie zeszkrobiny ze ścian, w których można zobaczyć poruszające się, opite krwią samice ptaszyńca (Sokół i Romaniuk 2007).

Ze względu na sposób odżywiania pasożyt poruszając się i nakluwając skórę powoduje świąd i podrażnienia, a także zmiany behawioru u ptaków dotkniętych inwazją. Kury wykazują nadmierną ruchliwość, wokalizację, są niespokojne i rozdrażnione. Poza tym w stadzie obserwuje się nasilenie zachowań higienicznych (self-grooming), co sprzyja wydziobywaniu piór. Może również dochodzić do wystąpienia przypadków kanibalizmu, a także wzrostu śmiertelności (od 6 do 8%). Dochodzi do obniżenia ogólnej kondycji i odporności organizmu, ale również w wyniku pobierania przez ptaszyńca krwi może wystąpić u ptaków anemia (Koziatek 2015). Długotrwałe oddziaływanie pasożyta powoduje wystąpienie u kur stresu chronicznego, w związku z czym dochodzi do znacznego spadku nieśności (od 15 do 20%). Na skorupkach jaj znoszonych przez nioski zaatakowane ptaszyńcem obserwuje się brązowe plamki, które powstają w wyniku rozgniatacia opitych krwią pasożytów.

Podobnie do inwazji *Eimeria spp.*, inwazja czerwonego kleszcza wpływa pośrednio na jakość surowca jajczarskiego i bezpieczeństwo konsumenta, gdyż preparaty służące do jej zwalczania mogą negatywnie oddziaływać na organizm ptaków, albo obniżać jakość pozyskiwanych jaj. Jednym z takich popularnych preparatów chemicznych jest fipronil. W roku 2017 w mediach często omawiany był problem przekroczenia jego dopuszczalnego poziomu w jajach konsumpcyjnych w Holandii, Belgii, Francji, Niemczech, a później również w Polsce. Także w Polsce Główny Inspektorat Weterynarii (2017) wykrył przekroczenie normy w 6 badanych próbkach z ferm położonych w województwach mazowieckim oraz wielkopolskim. Fipronil, jest substancją toksyczną, łatwo przenikającą do treści jaj, wywiera wpływ na układ nerwowy organizmów żywych, może wywoływać nadpobudliwość, pojawienie się drgawek, zawroty głowy itp. (Stafford i in. 2018).

Zwalczanie inwazji ptaszyńca jest trudne z powodu zasiedlania przez niego szczelin i miejsc dla stosowanych w formie oprysku akarycydów. Z uwagi, że pasożyt żywi się głównie nocą przy temperaturze ok. 22 °C istnieje możliwość ograniczenia czasu żerowania ptaszyńca na ptakach poprzez stosowanie modyfikacji programu świetlnego stosowanego w budynku inwentarskim, tak, by skrócić odcinki czasu, kiedy pasożyt mógłby wyjść z kryjówki w celu żerowania (Sokół i Romaniuk 2007).

3. Podsumowanie

Przeanalizowane choroby i zakażenia wywierają znaczący wpływ na nieśność kur, gdyż przyczyniają się do spadku pobrania paszy przez ptaki zakażone. Z kolei, spadek jakości surowca jajczarskiego przejawia się głównie poprzez nieprawidłową budowę skorupy. Do objawów pogorszenia jej jakości zaliczymy niewłaściwą pigmentację, kruchość, szorstkość oraz różnego rodzaju deformacje. Zdarza się, że jaja są całkowicie bez skorupy. Dodatkowo znane są przypadki zmiany jakości treści jaj, mowa tu o wzroście wodnistości białka oraz spadku wysokości białka gęstego. Innym istotnym problemem jest stosowanie w trakcie leczenia środków, których pozostałości mogą przedostawać się do treści jaj konsumpcyjnych (np. fipronil, lub antybiotyki jonoforowe).

Podsumowując należy zaznaczyć, że w celu zapobiegania wymienionym chorobom należy dbać o regularną immunizację ptaków, przestrzegać zasad higieny i dbać o prawidłowe warunki chowu, a w razie potrzeby stosować właściwe leczenie.

4. Literatura

- Bande F, Arshad SS, Omar AR i in. (2016) Pathogenesis and diagnostic approaches of avian infectious bronchitis. *Advances in Virology* 2016: 1–11.
- Berg LR, Bearse GE, Hamilton CM (1947) The effect of newcastle disease on egg production and egg quality. *Poultry Science* 26(6): 614–622.
- Berg LR, Hamilton CM, Bearse GE (1951) The effect of coccidiosis (caused by *Eimeria Maxima*) on egg quality. *Poultry Science* 30(2): 298–301.
- Domańska-Blicharz K (2018) Zakaźne zapalenie oskrzeli kur-ogólnoświatowy problem w przemyśle drobiarskim. *Życie Weterynaryjne* 93(06): 384-387.
- Doner S, Szeleszczuk P, Żbikowski A (2019) Kokcydioza kur. *Życie Weterynaryjne* 94 (07): 494-502.

- Gaweł A., Bobusia K., Bobrek K. (2015) Identyfikacja gatunków *Eimeriaspp.* występujących u kur i kurcząt brojlerów na terenie Polski. *Medycyna Weterynaryjna* 71 (6): 382-385.
- Gliński Z, Kostro K (2018) Ptaki łowne naturalnym rezerwuarem zoonoz. *Życie Weterynaryjne* 93(5): 295-303.
- Główny Inspektorat Weterynarii (2017) Komunikat Głównego Lekarza Weterynarii nr 2 w sprawie obecności niedozwolonej substancji - fipronil w jajach i mięsie drobiowym pochodzącym z państw członkowskich Unii Europejskiej.
<https://www.wetgiw.gov.pl/main/komunikaty/Komunikat-Glownego-Lekarza-Weterynarii-nr-2-w-sprawie-obecnosci-niedozwolonej-substancji-fipronil-w-jajach-i-miesie-drobiowym-pochodzacych-z-panstw-czlonkowskich-Unii-Europejskiej/idn:595>, data dostępu: 20.11.2020.
- Jacob JP, Miles RD, Mather FB (2000) Egg quality. Gainesville, Institute off Food and Agricultural Science (IFAS). Bulletin PS24: 1-12.
- Koncicki A, Krasnodębska-Depta A, Mazur-Gonkowska B (2006) Nowe dane nt. roli adenowirusów w patologii drobiu. *Medycyna Weterynaryjna* 62(07): 739-743.
- Koziatek S (2015) Wpływ ptaszyńca kurzego (*Dermanyssus gallinae*) na dobrostan oraz produktywność kur niosek w chowie przemysłowym. [W:] Kuczera M, Piech K (red.) *Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców* 2,t. 1: 86-88.
- Mazurkiewicz M, Giebel O, Trziszka T i in. (1990) Syndrom spadku nieśności u kur (EDS'76) - przebieg choroby oraz zmiany w jajach. *Medycyna Weterynaryjna* 46(09): 321-324.
- Pijarska I, Malec H (2006) Wybrane wirusowe czynniki etiologiczne wywołujące patologiczne stany układu rozrodczego u drobiu. *Przegląd Hodowlany* 74(05): 21-23
- Raggi LG, Brownell JR, Stewart GF (1961) Effects of infectious laryngotracheitis virus on egg production and quality. *Poultry Science* 40(1): 134-140.
- Roberts JR, Souillard R, Bertin J (2011) Avian diseases which affect egg production and quality. [In:] *Improving the safety and quality of eggs and egg products*. Woodhead Publishing: 376-393.
- Ruff MD, Britton WM (1976) Reduced yolk color in layers with coccidiosis. *Poultry Science* 55: 1712-1716.
- Sevoian M, Levine PP (1957) Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production, and egg quality of laying chickens. *Avian Diseases* 1(2): 136-164
- Sharman PA, Smith NC, Wallach MG i in. (2010) Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis. *Parasite Immunology* 32(8): 590-598
- Śmiałek M, Tykałowski B, Stentzel T i in. (2012) Zakaźne zapalenie krtani i tchawicy-patogeneza oraz perspektywy immunoprofilaktyki swoistej. *Medycyna Weterynaryjna* 68(11): 654-661
- Stafford EG, Tell LA, Lin Z i in. (2018) Consequences of fipronil exposure in egg-laying hens. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 253(1): 57-60
- Świątkiewicz S, Arczewska A, Koreleski J (2009) Wpływ wybranych dodatków paszowych na przebieg kokcydiozy u drobiu. *Medycyna Weterynaryjna* 65(11): 758-761
- Wiśniewska M, Ceregrzyn J, Misiec E i in. (2018) Ptaszyniec kurzy (*Dermanyssusgallinae*) – zagrożenie w produkcji drobiarskiej [W:] Bednarczyk J (red) *Nauki Przyrodnicze i Medyczne: Świat żywy a technologie w otoczeniu ludzi i zwierząt*, Lublin, 32-35
- Sokół R, Romaniuk K (2007) Przebieg i dynamika inwazji *Dermanyssus gallinae* w fermie kur niosek. *Medycyna Weterynaryjna* 63(4): 484-485

9. Behavior pokarmowy młodych alpак (*Vicugna pacos*)

Feeding behaviour of young alpacas (*Vicugna pacos*)

Joanna Kapustka

Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa, Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Monika Budżyńska prof. uczelni

Kapustka Joanna: joanna.kapustka@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: Zachowanie się, pobieranie pokarmu, żywienie, alpaka

Streszczenie

Mleko jest podstawowym i najważniejszym pokarmem młodych ssaków. Skład mleka poszczególnych gatunków różni się pod względem procentowej zawartości suchej masy, białka, tłuszczu i laktozy. Mleko alpак jest gęste i lepkie, nie ma zastosowania w przetwórstwie. Południowoamerykańskie wielbłądowate mają układ pokarmowy zbliżony budową i funkcją do układu pokarmowego przeżuwaczy. Celem niniejszej pracy było określenie behawioru pokarmowego młodych alpак z uwzględnieniem częstotliwości i czasu pobierania pokarmu. Obserwacjami objęto dwie alpaki rasy huacaya w wieku 3 i 4 miesięcy, przebywające z matkami, ale zaczynające pobierać również pokarm stały. Łączny czas trwania zachowań pokarmowych podczas 4 godzin jednodniowej obserwacji wyniósł u młodszego i starszego osobnika odpowiednio 94 min i 125 min. Czas pobierania pokarmu stałego (pasienie się i pobieranie siana) był dłuższy u starszego osobnika i wyniósł 108,5 min., natomiast u młodszego osobnika – 89 min. Młode podchodziły do matki, by napić się mleka średnio raz na 2 godziny i pobierały ten pokarm przez średnio 140 s. Obserwacje behawioru pokarmowego młodych alpак w sposób istotny mogą przyczynić się do polepszenia metod opieki nad cria, które zostały odrzucone przez matkę, bądź produkuje ona za mało pokarmu i człowiek musi dodatkowo je dokarmiać.

1. Wstęp

Alpaki (*Vicugna pacos*) należą do rodziny wielbłądowatych (*Camelidae*), rodzaj *Vicugna*. Udomowienie alpак szacuje się na 5500 - 6000 lat temu na terenie peruwiańskiej puny na wysokości ponad 4000 m n.p.m., do dziś żyją na tych terenach ich dzicy przodkowie - wikunie (*Vicugna vicugna*). Alpaki są blisko spokrewnione z lamami (*Lama glama*) oraz przodkami lam - guanako (*Lama guanicoe*) (Wheeler 1995; Czub i in. 2010). Wszystkie cztery gatunki określane są mianem południowoamerykańskich wielbłądowatych, w skrócie SAC (South American Camelidae) (AAA 2008; Gauly 2017). Hodowla alpак w Polsce ma swoje początki w 2004 roku i z powodzeniem się rozwija. Wyróżnia się dwie rasy alpак: huacaya oraz suri, różniące się rodzajem włókna, ale znaczną część światowej populacji stanowi rasa huacaya (Czub i in. 2010). Ze względu na zwiększającą się populację alpак w Polsce niezbędne jest poszerzanie wiedzy na temat tego gatunku, nie tylko pod kątem jego biologii, ale i behawioru. Do tej pory niewiele jest prac podejmujących tematykę zachowania się tych zwierząt.

Ciąża u alpак trwa około 345 dni, zazwyczaj rodzi się jedno młode, bliźnięta są niezwykle rzadkie (Morales Villavicencio 2010). Podstawowym pokarmem młodych ssaków zaraz po urodzeniu jest siara produkowana przez gruczoł mlekowy samicy w pierwszych dniach po porodzie. Jest to niezbędny pokarm dostarczający składników pokarmowych oraz związków immunologicznie aktywnych zapewniających odporność młodemu organizmowi (Rak i Bronkowska 2014). Przez resztę laktacji młode żywi się mlekiem matki. Skład mleka poszczególnych gatunków ssaków różni się pod względem procentowej zawartości suchej masy, białka, tłuszczu i laktozy, co w dużej mierze zależy od specyfiki i środowiska życia danego gatunku (Hozyasz i Słowik 2013). W skład mleka alpак wchodzi: 15,6% SM, 4,53% białka, 3,68% tłuszczu, 6,00% laktozy (Chad i in. 2014), swoim składem jest podobne do mleka innych wielbłądowatych (El Agamy i in. 2009). Jest ono gęste i lepkie. W przeciwieństwie do wielbłądów, w których przypadku użytkowanie mleczne jest prowadzone,

choć ma marginalne znaczenie w światowej produkcji mleka (Faye 2004), mleko alpak nie znajduje do tej pory zastosowania przez ludzi, więc również nie prowadzi się selekcji tych zwierząt w celu zwiększenia ich wydajności mlecznej.

SACs nie są typowymi zwierzętami przeżuwającymi, budowa ich układu pokarmowego różni się od tego, który występuje u przeżuwaczy, jakie znamy (bydło, kozy, owce), ale ma pewne cechy wspólne. Z tego powodu nazywane są pseudoprzeżuwaczami (ang. pseudo-ruminants). Alpaki posiadają odruch odłykania i przeżuwają pokarm (AAA 2008). Dla młodych alpak (cria) pobieranie mleka matki jest najważniejsze w pierwszych 60 dniach życia, kiedy najczęściej przybierają na wadze (Chad i in. 2014). Młode ssaki piją mleko kilka - a nawet kilkanaście razy na dobę, w zależności od gatunku. Cielęta ssą mleko matki około 8 do 16 razy na dobę, średni czas pobierania mleka w ciągu dnia to około 70 min. (Neja i in. 2017). Młode małych przeżuwaczy pobierają mleko nawet 2-4 razy na godzinę (Bungo i in. 1998), ale czas pobierania pokarmu jest znacznie krótszy i wynosi jednorazowo kilkanaście sekund (Bungo i in. 1998). Można zatem zauważyć, że młode dużych przeżuwaczy (jak bydło) pobierają pokarm rzadko, ale długo, co może się przełożyć na jednorazowe większe pobranie mleka, natomiast małych przeżuwaczy (jak kozy, owce) często, ale krótko, więc jednorazowa ilość pobieranego pokarmu jest znacznie mniejsza. Neja i in. (2017) podkreślają, że młode zwierzęta pijące mleko muszą mieć również stały dostęp do wody. Częstotliwość i czas pobierania mleka przez młode maleje wraz z wiekiem (Bungo i in. 1998; Cimen 2007; Neja i in. 2017). Jagnięta i kozłeta najczęściej i najdłużej pobierają pokarm w pierwszym tygodniu życia, w tym czasie matka nie ogranicza im dostępu do sutka (Bungo i in. 1998; Cimen 2007). Do tej pory nie prowadzono podobnych obserwacji u cria.

Z wiekiem młode przeżuwacze oprócz mleka zaczynają pobierać pokarm stały (zielonka pastwiskowa, siano). Częściowo przyczynia się do tego spadek mleczności samicy oraz fakt, że odgania ona coraz częściej młode od sutka. Bungo i in. (1998) zaobserwowali, że największy wzrost częstotliwości przypadków odpędzania młodych od sutka występuje w drugim tygodniu życia jagniąt, a w kolejnych tygodniach maleje, co może być związane z faktem, że jagnięta stopniowo przyzwyczajały się do pobierania pokarmu stałego. Ramos i Tennesen (1992) podkreślają, że przebywanie młodych zwierząt na pastwisku wraz z matką znacznie ułatwia im przestawienie się całkowicie na pasze stałe po odsadzeniu. Wpływ ma na to również nauka pasienia się poprzez naśladowanie matki i innych członków stada. Alpaki, podobnie jak kozy czy owce w okresie wiosenno-letnim utrzymuje się w systemie pastwiskowym (AAA 2008; Czub i in. 2010; Gauly 2017), co pozytywnie wpływa na ich dobrostan (Gauly 2017). Młode odchowuje się przy matkach i odsadza, gdy są w wieku około 6 miesięcy (Morales Villavicencio 2010).

Celem niniejszej pracy było określenie behawioru pokarmowego młodych alpak z uwzględnieniem częstotliwości i czasu pobierania pokarmu.

2. Materiał i metody

Obserwacjami objęto dwie alpaki rasy huacaya w wieku 3 miesięcy (młodszy) i 4 miesięcy (starszy), przebywające z matkami, ale zaczynające pobierać również pokarm stały. Matki z cria w czasie obserwacji przebywały wraz z resztą ich stada. Młode miały stały dostęp do wody. Ze względu na różnice w umaszczeniu i niewielką ilość młodych nie było potrzeby separacji ich od stada w celu prowadzenia obserwacji ich zachowania.

Obserwacje ciągle prowadzono jednego dnia popołudniu oraz wieczorem przez dwie godziny (odpowiednio 12:00 - 14:00 i 17:00 - 19:00) przez znane zwierzętom osoby. Częstotliwość pobierania mleka była notowana przez obserwatora, a czas trwania każdego z obserwowanych zachowań pokarmowych mierzono stoperem (s). Odnotowywano takie zachowania jak: pobieranie mleka, pobieranie paszy objętościowej (siana), pasienie się, pobieranie wody i przeżuwanie. Pobieranie mleka było rozumiane jako podejście do matki i ssanie mleka z sutków wymienia, pobieranie paszy objętościowej (siana) polegało na pobraniu siana, częściowym rozdrobnieniu w jamie gębowej i połknięciu, picie wody oznaczało podejście do poidła, zassanie wody do pyska i jej połknięcie, za przeżuwanie uznawano odłykanie i przeżucie porcji pokarmu w pozycji leżącej bądź stojącej. Za jednorazowe wystąpienie danego zachowania uznawano czynność, którą zwierzę

wykonywało przez minimum 5 sekund, by kolejną czynność uznano za odrębną, czas pomiędzy wystąpieniem tych samych czynności musiał wynieść minimum 10 sekund.

Na podstawie uzyskanych wyników określono częstotliwość ssania mleka od matki, obliczono również średnią długość pobierania mleka podczas jednorazowego podejścia do sutka (s) oraz łączny czas pobierania mleka (min). Zwrócono również uwagę na długość pobierania pokarmu stałego (siano), pasienia się, pobierania wody oraz przeżuwania. Określono średni czas trwania (min) każdej z wymienionych czynności.

3. Wyniki

Czas przeznaczony na wykonywanie poszczególnych czynności związanych z behawiorem pokarmowym u obu młodych alpak był podobny. Nie zaobserwowano większych różnic pomiędzy osobnikami. Czas trwania poszczególnych zachowań pokarmowych u obu obserwowanych osobników przedstawiono w tabeli 1 (Tab. 1).

Tab. 1. Czas trwania (s) zachowań pokarmowych u obserwowanych osobników.

		Czas trwania zachowań (s)									
		Pobieranie mleka		Pobieranie paszy objętościowej (siano)		Pasienie się		Pobieranie wody		Przeżuwanie	
Osobnik	Wiek	Popołudniu	Wieczorem	Popołudniu	Wieczorem	Popołudniu	Wieczorem	Popołudniu	Wieczorem	Popołudniu	Wieczorem
Młodszy	3 mies.	160	160	1230	1530	2580	0	0	0	0	0
Starszy	4 mies.	60	180	2085	1920	2508	0	0	0	300	450

Całkowity czas pobierania mleka przez młodszego i starszego osobnika w czasie obserwacji wyniósł odpowiednio 320 i 240 s. Jednorazowy czas pobierania mleka od matki wyniósł średnio 140 s. Każde z młodych pobierało pokarm od matki średnio raz na 2 godziny. Zaobserwowano również, że obie matki nie zawsze pozwalały młodym na podejście do sutka i wypicie mleka, zdarzyło się to łącznie 3 razy w ciągu obserwacji.

W czasie obserwacji młode alpaki najwięcej czasu przeznaczały na pasienie się i pobieranie paszy objętościowej. Ze względu na deszczową pogodę, stado miało możliwość przebywania na pastwisku tylko w pierwszej godzinie obserwacji popołudniu (od 12:00 do 13:00), resztę czasu spędziły w pomieszczeniu inwentarskim, gdzie miały stały dostęp do siana. W ciągu godziny obserwacji na pastwisku młode pasły się przez średnio 42 min. $\pm$ 1 min.

Czas trwania pobierania siana wyniósł u młodszego i starszego osobnika odpowiednio 46 min i 67 min. Średni czas pobierania siana popołudniu i wieczorem był bardzo podobny i wyniósł odpowiednio 27 i 29 min, mimo, że popołudniu zwierzęta miały dostęp do siana przez 1 godzinę, a wieczorem przez 2 godziny. W czasie wieczornej obserwacji zauważono, że alpaki około godziny 18:00 (gdy robiło się już ciemno) przestawały pobierać pokarm i większość czasu spędzały leżąc i ewentualnie przeżuając. Mogło być to przyczyną tak krótkiego czasu pobierania pokarmu wieczorem.

W czasie trwania obserwacji nie zarejestrowano pobierania wody przez młode. Mogło się to wiązać z faktem, że pogoda była deszczowa i pobierana przez zwierzęta trawa była soczysta.

Alpaki, po okresie pobierania pokarmu stałego rozpoczynają przeżuwanie. Odbywa się to w pozycji stojącej lub leżącej. W czasie trwania obserwacji tylko starszy osobnik przeżuwał, raz

podczas obserwacji popołudniu i raz w czasie obserwacji wieczornej. Całkowity czas przeżuwania wyniósł 12,5 min, 5 min. popołudniu i 7,5 min wieczorem, średnio około 6 min.

Łączny czas trwania zachowań pokarmowych podczas 4 godzin obserwacji wyniósł u młodszego i starszego osobnika odpowiednio 94 min i 125 min. Czas pobierania pokarmu stałego (pasienie się i pobieranie siana) był dłuższy u starszego osobnika i wyniósł 108,5 min., natomiast u młodszego osobnika – 89 min. Osobnik młodszy więcej czasu spędził na pobieraniu mleka od matki – 320 s.

4. Dyskusja i wnioski

Cria podczas picia mleka od matki w charakterystyczny sposób wyginają szyję (Rys.1). U pseudoprzeżuwaczy, również stwierdza się obecność rynienki przełykowej (charakterystycznej dla przeżuwaczy), dzięki której mleko omija pierwszą komorę żołądka (pełniącą funkcje analogiczną do żwacza przeżuwaczy) i trafia do „węzła” pomiędzy drugą i trzecią komorą (Vallenas i in. 1971). Istotne jest, by podczas karmienia młodych butelką przyjmowały one postawę jak podczas naturalnego picia mleka od matki, co umożliwiłoby odpowiednie ułożenie rynienki przełykowej. Częstotliwość jak i czas pobierania mleka przez młode alpaki nieco różni się w stosunku do małych przeżuwaczy (koźłeta, jagnięta), jak i dużych (cielęta). Średni czas pobierania mleka przez młode jagnięta w wieku od siódmego do trzydziestego piątego dnia życia wynosi od 42 do 32 sekund (Cimen 2007), pierwsze pobranie siary zaraz po urodzeniu trwa 20-50 sekund (Kołaczkiewicz i Dobrzański 2019). Koźłeta w pierwszych dniach po urodzeniu spędzają na ssaniu jednorazowo około 45 sekund (Kołaczkiewicz i Dobrzański 2019). Natomiast w przypadku cria, które w czasie prowadzenia obserwacji miały około 90 – 120 dni (były w wieku trzech i czterech miesięcy) średni czas ssania sutka wynosił 140 sekund. Z drugiej strony młode większych przeżuwaczy, jak bydło pobierają pokarm jednorazowo przez nawet 10 minut (Neja i in. 2017), zaraz po urodzeniu jest to średnio 8-12 minut (Kołaczkiewicz i Dobrzański 2019). Ciekawie wygląda behavior ssania u dromaderów. U tego gatunku występują znaczne różnice w zależności od systemu utrzymania. Zwierzęta utrzymywane w systemie półintensywnym (bez stałego dostępu do pastwiska) pobierają pokarm znacznie dłużej, średnio 10 minut w wieku do 20 dnia życia, zatem podobnie jak w przypadku bydła. Natomiast w systemie tradycyjnym (zwierzęta przebywające na pastwisku) czas ten wynosi jedynie 4 minuty. Z wiekiem czas pobierania mleka przez młode wielbłądy spada, co jest typowe dla wszystkich młodych ssących mleko. W wieku około 3 miesięcy czas ssania mleka wynosił już jedynie 6 minut w systemie półintensywnym i 2 minuty w systemie tradycyjnym (Fattah i Roushdy 2016). Niemal identyczny średni czas pobierania mleka od matki miały obserwowane cria (140 sekund, czyli 2 minuty 20 sekund), które w czasie obserwacji były w podobnym wieku i systemie utrzymania, co obserwowane młode wielbłądy. Obserwacje behavioru cria pokazały, że młode podchodzą do sutka średnio raz na dwie godziny. Wiąże się to z faktem, że obserwowane młode były już w wieku, kiedy część ich diety stanowi pasza stała. Znacznie częściej do sutka podchodzą młode zaraz po urodzeniu i w pierwszych tygodniach życia. Obserwacje Cimen (2007) pokazują że jagnięta w pierwszym tygodniu życia mogą ssać mleko nawet co pół godziny, z czasem częstotliwość ta się zmniejsza do jednego podejścia na godzinę w wieku jednego miesiąca. Kołaczkiewicz i Dobrzański (2019) podają, że w pierwszej dobie życia jagniąt podchodzą one do sutka nawet 14 razy na godzinę, w kolejnych dniach około 3 razy na godzinę, by w wieku około 6 tygodni częstotliwość ta zmniejszyła się do zaledwie 6 razy na dobę, czyli raz na 4 godziny. Obserwowane cria pobierały pokarm średnio 12 razy na dobę. U koźłat nie obserwuje się tak znacznych różnic w częstotliwości pobierania mleka w zależności od wieku, jak u jagniąt. W pierwszych dniach po urodzeniu jest to 3-4 razy w ciągu godziny, a po skończeniu około pięciu tygodni – 1-3 razy na godzinę (Kołaczkiewicz i Dobrzański 2019). Cielęta zaraz po urodzeniu ssą mleko raz na 2-3 godziny (Szewczyk 2019), z wiekiem częstotliwość ta spada do jednego podejścia na 3-4 godziny (Neja i in 2017; Szewczyk 2019). Nawet po odsadzeniu, jeśli mają swobodny dostęp do preparatu mlekozastępczego częstotliwość pobierania pokarmu jest podobna (około raz na 4 godziny). Jeżeli cielęta nie mają swobodnego dostępu do mleka zastępczego, to są karmione dwa razy na dobę (Neja 2013). Można zauważyć, że znacznie odbiega to od naturalnego behavioru ssania cieląt i może przyczyniać się do obniżenia ich dobrostanu. W przypadku alpak, hodowcy, jeśli jest taka potrzeba, karmią cria raz na 2 godziny, a prowadzone obserwacje potwierdzają, że jest to zgodne z naturalnym

behawiorem tego gatunku. Obserwacje behawioru ssania u innych gatunków przeżuwaczy sugerują jednak, że należałoby zmierzyć czas i częstotliwość ssania u młodych alpак w pierwszych dniach po urodzeniu. U innych gatunków częstotliwość pobierania mleka od matki jest znacznie wyższa w pierwszych dniach życia niż w kolejnych tygodniach. Podczas obserwacji można było dostrzec, że młode alpaki podchodzą do wymienia ssąc z każdego sutka po kolei dodatkowo podbijając głową wymię by uzyskać więcej mleka. Podobne zachowanie obserwuje się u koźląt (Kończ i Dobrzański 2019). Hodowcy jako niezawodny sposób potwierdzenia, że ciał napilo się mleka obserwują czy młode ma białe „wąsiki” na górnej wardze po odejściu od sutka. Jest to bardzo istotne, ponieważ zdarzają się przypadki, że matka produkuje niewiele mleka bądź nie ma go wcale, a młode podchodzą instynktownie do wymienia poszukując pokarmu. Może to dawać złudne poczucie, że młode jest najedzone, a w rzeczywistości wymaga dokarmiania ze strony właściciela.



Rys. 1. Cria pijące mleko z wymienia.

Można stwierdzić, że przeżuwacze w pierwszych tygodniach swojego życia są zwierzętami monogastrycznymi. Za sprawą obecności rynienki przełykowej mleko trafia bezpośrednio do trawieńca (Appleby i in. 2001), bądź trzeciej komory (u wielbłądowatych) (Vallenas i in. 1971). Jednakże już po kilku dniach zaczynają się interesować pokarmem stałym (sianem, zielonką), mimo, że podstawą ich żywienia wciąż jest mleko. Kończ i Dobrzański (2019) oraz Neja i in. (2017) podają, że ciałęta zaczynają skubać trawę na pastwisku już w 1-3 tygodniu życia, a w pełni przeżuwaczem stają się w 6-8 tygodniu. Koźlęta zaczynają pobierać pasze stałe w 5 tygodniu życia (Kończ i Dobrzański 2019). Możliwość wcześniejszego pobierania pokarmu stałego pobudza rozwój żwacza, co jest zjawiskiem pożądanym (Appleby i in. 2001). Ramos i Tennesen (1992) wspominają wręcz o „treningu żywieniowym” u jagniąt. Polega on na wczesnym zapoznawaniu młodych z określonym rodzajem pokarmu (zielonką pastwiskową), dzięki temu chętniej spożywają je w przyszłości, po odsadzeniu (szybsza akceptacja pastwiska). Ważną rolę odgrywa także matka, od której młode uczy się pobierać zróżnicowany pokarm poprzez naśladownictwo. Samica również wraz ze wzrostem potomka zaczyna odmawiać mu dostępu do sutka, tym samym zmusza młode do pobierania coraz większej ilości pokarmu stałego (Bungo i in. 1998). Nie jest dokładnie określone kiedy pokarm stały zaczynają pobierać ciał, ale Morales Villavicencio (2010) podaje, że w wieku 4-5 miesięcy w żywieniu stada należy uwzględnić również młode, które w tym wieku powinny już przede wszystkim pobierać pasze stałe. Podczas niniejszych badań zaobserwowano, że matki kilka razy nie pozwoliły na pobranie mleka swoim młodym, mimo że podchodziły one do sutka, zatem pośrednio

również przyczyniały się do zwiększenia ilości pobierania pokarmu stałego przez cria. Fattah i Roushdy (2016) podają że młode wielbłądy zaczynają pobierać pokarm stały i przeżuwać w wieku około 3 miesięcy. Niniejsze obserwacje behawioru pokarmowego młodych alpак potwierdziły występowanie przeżuwania u czteromiesięcznej alpaki, nie zaobserwowano tego zachowania u młodszego (trzymiesięcznego osobnika), ale oba osobniki podobną ilość czasu przeznaczają na pobieranie pokarmu stałego, co może sugerować że trzymiesięczny osobnik również potrafił przeżuwać, tylko nie zostało to zaobserwowane. Po około miesiącu od wprowadzenia pasz stałych w żywieniu młodych alpак przeprowadza się odsadzenie młodych od matek. Wcześniejsze przyzwyczajenie młodych do pasz stałych wpływa na zmniejszenie stresu związanego z separacją od matki (Morales Villavicencio 2010).

Mleko jest podstawowym i najważniejszym pokarmem młodych ssaków. Alpaki karmią swoje cria średnio raz na dwie godziny, choć obserwując inne gatunki (owce, kozy) można przypuszczać, że ta częstotliwość jest wyższa zaraz po urodzeniu. Alpaki są utrzymywane w systemach półekstensywnych, gdzie młode są odchowywane przy matkach, co wpływa na wysoki dobrostan rosnących młodych. Dodatkowo alpак nie użytkuje się w kierunku mlecznym, więc cały produkowany przez matkę pokarm jest przeznaczony dla potomstwa. Młode przeżuwacze, mimo pobierania mleka od matki przez pierwsze nawet 6 miesięcy życia (Morales Villavicencio 2010; Szewczyk 2019) już w pierwszych tygodniach po narodzinach zaczynają pobierać pokarm stały, co przyczynia się do szybszego rozwoju żwacza i łatwiejszego przestawienia na żywienie paszami stałymi po odsadzeniu. Prowadzone obserwacje behawioru pokarmowego cria pokazują, że w wieku 3-4 miesięcy w ich diecie przeważa pokarm stały (pasza objętościowa sucha i soczysta). Pobierały ją przez średnio 99 minut w ciągu trwania 4 godzin obserwacji (około 25 minut w godzinie). Podczas jednorazowego podejścia do sutka młode pobierają mleko przez około 140 sekund. Obserwacje behawioru pokarmowego młodych alpак w sposób istotny mogą przyczynić się do polepszenia metod opieki nad cria które zostały odrzucone przez matkę bądź produkuje ona za mało pokarmu i człowiek musi dodatkowo je dokarmiać.

5. Piśmiennictwo

- Appleby MC, Weary DM, Chua B (2001) Performance and feeding behaviour of calves on ad libitum milk from artificial teats. *Applied Animal Behaviour Science* 74: 191-201.
- Australian Alpaca Association (AAA) (2008) Alpaca Nutrition. Alpaca Fact Sheet, AAA Inc. Education and Training Sub-committee.
- Bungo T, Shimojo M, Nakano Y et al. (1998) Relationship between nursing and suckling behaviour in Tokara native goats. *Applied Animal Behaviour Science* 59: 357-362.
- Chad EK, DePeters EJ, Puschner B et al. (2014) Preliminary investigation of the composition of alpaca (*Vicugna pacos*) milk in California. *Small Ruminant Research* 117: 165-168.
- Cimen M (2007) The Milk Biochemical Parameters and Sucking Behaviour of Lambs until 35 d of Age. *Asian Journal of Chemistry* 19 (4): 3152-3156.
- Czub G, Morales Villavicencio M, Niżnikowski R (2010) Charakterystyka i kierunki użytkowania wielbłądowatych (cz. 1). *Przegląd Hodowlany* 7: 25-28.
- El-Agamy EI, Nawar M, Shamsia SM, et al. (2009) Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children? *Small Ruminant Research* 82: 1-6.
- Fattah AFA, Roushdy ESM (2016) Productive performance and behaviour of calf camel (*Camelus dromedarius*) under semi-intensive and traditional rearing system. *Benha Veterinary Medical Journal* 31: 85-91.
- Faye B (2004) Dairy productivity of camels. *FAO-ICAR Seminar of Camels*. Sousse, Tunisia.
- Gauly M (2017) Animal welfare problems in south american camelids kept in Europe. 7th European Symposium on South American Camelids, 12-14.06.2017, Assisi, Italy, p. 25.
- Hozyasz KK, Słowik M (2013) Mleka inne niż ogólnodostępne krowie – argumenty za i przeciw. *Przegląd Gastroenterologiczny* 8 (2): 98-107.
- Kołacz R, Dobrzański Z (2019) Higiena i dobrostan zwierząt. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław.
- Morales Villavicencio M (2010) Chów alpак. Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa.

- Neja W (2013) Behaviour of calves in the first weeks of life. *Journal of Central European Agriculture* 14 (1): 33-41.
- Neja W, Jankowska M, Bogucki M i in. (2017) Behawior cieląt. *Folia Pomeranae Univeritatis Technologiae Stetinensis* 336 (43): 103-110.
- Rak KA, Bronkowska M (2014) Immunologiczne znaczenie siary. *Hygeia Public Health* 49 (2): 249-254.
- Ramos A, Tennessen T (1992) Effect of previous grazing experience on the grazing behaviour of lambs. *Applied Animal Behaviour Science* 33: 43-52.
- Szewczyk A (2019) Odchów cieląt przy matkach – czy jest to możliwe w stadach krów mlecznych. *Roczniki Naukowe Zootechniki* 46 (2): 75-81.
- Vallenas A, Cummings JF, Munnel JF (1971) A gross study of the compartmentalized stomach of two new-world camelids, the llama and guanaco. *Journal of Morphology* 134: 399-423.
- Wheeler JC (1995) Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society* 54: 271-295.

10. Zaburzenia behawioralne u psów. Rozpoznanie i terapia.

Behavioral disturbances in companion animals. Recognition and therapy.

Aleksandra Garbiec

Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa, Wydział Nauk o zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. lek. wet Mirosław Karpiński (profesor uczelni)

Mirosław Karpiński: miroslaw.karpinski@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: behawior, lęk separacyjny, agresja, nadaktywność

Streszczenie

Celem pracy jest przedstawienie najczęstszych zaburzeń zachowania występujących w świecie zwierząt towarzyszących, ze zwróceniem szczególnej uwagi na lęk separacyjny. Zaburzenia behawioralne to odchylenia w fizjologicznym zachowaniu zwierząt, powszechnie określa się je mianem zaburzeń zachowania. Prawidłowe zachowanie pozwala jednostce przetrwać, nabywać nowe umiejętności i tworzyć więzi społeczne, a więc zapewnia odpowiedni poziom dobrostanu, natomiast zachowania patologiczne to wszystkie zachowania, które nie pozwalają na utrzymanie homeostazy fizycznej i psychicznej. Aby wyeliminować problem, konieczne jest jego prawidłowe zdiagnozowanie, poznanie i wyeliminowanie jego przyczyny oraz zastosowanie odpowiednio dobranej terapii behawioralnej, feromonami czy farmakologicznej.

1. Wstęp

Na wstępie należy zaznaczyć, że nie wszystkie zachowania psów, które wydają się nieprawidłowe według właściciela, są zaburzeniami behawioralnymi. Zwierzęta posiadają podobnie jak ludzie, różne temperamenty, osobowości a przede wszystkim zachowania instynktowne. Błędnie stawiane diagnozy o zaburzeniach behawioralnych wynikają z niewiedzy i błędnej interpretacji zachowań. Co więcej niektóre niewłaściwe zachowania wynikają ze złego współżycia na linii pies-człowiek. Tryb życia współczesnego człowieka w dużej mierze uniemożliwia zwierzęciu zaspokojenie swoich potrzeb takich jak np. polowanie, tropienie, kopanie itp. Brak zaspokojenia potrzeb instynktownych może rodzić problemy z zachowaniem tj. agresja, frustracja, nadpobudliwość czy różnego rodzaju fobie (Horoszewicz i in. 2017). Do rozwoju zaburzeń zachowania u psów mają wpływ wrodzone skłonności, ale także bodźce pochodzące ze środowiska, w którym zwierzę dorastało. Okres rozpoczęcia socjalizacji przypada na piąty tydzień życia i trwa nawet do ukończenia przez psa pierwszego roku życia. Należy także nadmienić, że niektóre zaburzenia zachowania mogą mieć podłoże somatyczne tzn. wynikać ze złego sposobu odżywiania czy złego stanu zdrowia, którego przyczyną są choroby towarzyszące przebiegające np. z dyskomfortem, bólem czy świądem. Do najczęściej występujących i diagnozowanych problemów behawioralnych zaliczamy lęk separacyjny, agresję oraz nadaktywność.

2. Opis zagadnienia

2.1 Lęk separacyjny

Lęk separacyjny to zaburzenie zachowania objawiające się niepokojem psa w momencie kiedy zostaje sam bez opiekuna któremu ufa. Naukowcy dowiedli, że lęk separacyjny znacznie częściej występuje u zwierząt adoptowanych niż u zwierząt pochodzących z hodowli (Witkowska i Chudalewska 2014). Do głównych przyczyn mogących mieć wpływ na wystąpienie lęku separacyjnego zalicza się brak odpowiedniej socjalizacji w wieku szczenięcym, złe traktowanie, trauma czy ciągle zmiany w codziennym życiu psa tj. kilkukrotna zmiana opiekuna, zmiana miejsca zamieszkania (Osija i Fiszdon 2015). Zaburzenie behawioralne może pojawić się na skutek zbyt silnego przywiązania zwierzęcia do jego właściciela, najczęściej wynika to ze zbyt dużej czułości jaką człowiek przelewa na swojego pupila tzn. wspólne spożywanie posiłków, pozwalanie na spanie

spa w łóżku itp. (Rys. 1) Niestety psy nadmiernie przywiązane do opiekuna czują niepokój już w sytuacji gdy w domu pojawiają się obce osoby, kiedy opiekun znajduje się w innym pomieszczeniu, a kiedy wychodzi z domu pies odczuwa bardzo duży lęk i strach, że kochany człowiek nie wróci (Ogata 2016).

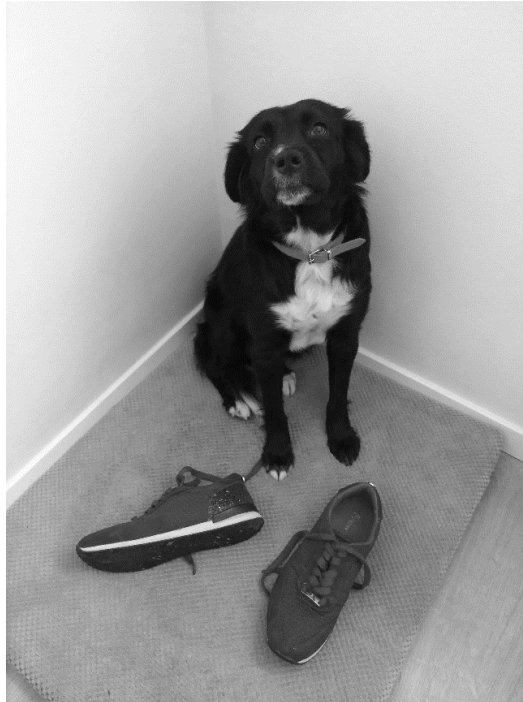


Rys. 1. Pies leżący na nogach opiekuna (oznaka nadmiernego przywiązania).

Może być wiele oznak świadczących o występowaniu u danego psa lęku separacyjnego, jednak do najczęściej rozpoznawanych zaliczamy m.in. zachowania depresyjne, również częste jest skomlenie, wokalizacja, otaczanie się przedmiotami opiekuna czy niszczenie przedmiotów mających zapach właściciela (Simpson 2000) (Rys. 2), (Rys. 3). Zapach właściciela działa uspokajająco na zwierzę poprzez uwalnianie endorfin dzięki czemu czuje się bezpieczniej (Appleby i Pluijmakers 2003). Aby rozpoznać lęk separacyjny konieczne jest zidentyfikowanie podłoża problemu np. zbyt duże przywiązanie do człowieka, problem z socjalizacją w nowym miejscu, stres, ból czy trauma. Aby ostatecznie potwierdzić występowanie lęku separacyjnego najlepsze będzie nagranie zachowania zwierzęcia kiedy zostaje samo w pomieszczeniu/domu/podwórku itp.

W sytuacji kiedy chcemy wyeliminować problem z występowaniem lęku separacyjnego należy pamiętać o endorfinach, czyli hormonach szczęścia uwalniających się w dużej ilości podczas powitań z utęsknionym opiekunem, dlatego też aby nie pogłębiać lęku separacyjnego nie powinniśmy witać się z pupilem bardzo wylewnie, ponieważ będzie on coraz bardziej wyczekiwał ponownych powitań. Co więcej powinniśmy doprowadzić do modyfikacji zachowań poprzez wprowadzenie sztywnego planu dnia, dzięki czemu osiągniemy rytualizację i wewnętrzny spokój psa (King i in. 2000). Zwierzę z lękiem separacyjnym powinno być systematycznie uczone posłuszeństwa oraz nagradzane za prawidłowe zachowania tj. wykonywanie komend czy spanie w wyznaczonym miejscu. Aby ułatwić psu kwestie pozostawania w domu samotnie należy stopniowo przyzwyczajać zwierzę do takiej sytuacji, zaczynając od kilkunastu minut wydłużając do kilku godzin. Opiekun do którego zwierzę jest nadmiernie przywiązane powinien stopniowo skracać czas spędzany razem i ograniczać poświęcaną mu uwagę (Sherman 2008). Kiedy zwierzę reaguje nerwowo w momencie kiedy przygotowujemy się do wyjścia z domu np. zakładamy buty, kurtkę, brzdękamy kluczami

należy te czynności wykonywać także podczas dnia bez zamiaru wyjścia z domu (odwrażliwianie) (Rys. 4) Terapię należy zawsze wykonywać z dużym spokojem, cierpliwością oraz systematycznością.



Rys. 2. Pies na swoim posłaniu z przedmiotami należącymi do opiekuna.



Rys. 3. Pies śpiący na ubraniach noszących zapach opiekuna.



Rys. 4. Zaniepokojony pies stojący przy torbie właściciela (znak, że właściciel wychodzi do pracy).

2.2 Agresja

Występowanie zachowań agresywnych u psów może mieć kilka przyczyn, dlatego też aby wyeliminować ten problem należy prawidłowo rozpoznać podłoże i rodzaj agresji. Niekontrolowana i nieleczone agresja u psa będzie wzbierać na siłę w miarę upływu czasu (Kudła 2006).

Rodzaje agresji:

- Na tle hormonalnym
- Dominująca/terytorialna
- W samoobronie
- Po traumatyczna/lękowa
- Instynktowna

Agresja na tle hormonalnym spowodowana jest zbyt wysokim poziomem męskich hormonów płciowych, które powodują wzrost pewności siebie psa, dominacji a także nadpobudliwość mogąca przerodzić się w zachowania agresywne. Najskuteczniejszą metodą eliminacji tego typu agresji jest kastracja chemiczna lub chirurgiczna samca.

Agresja dominująca, nazywana także terytorialną związana jest z drabiną hierarchiczną, co za tym idzie pozycja w stadzie. Jest to agresja stanowiąca największy odsetek wśród innych form agresji (Line i Voith 1986). Nie zawsze musi być to stado psów, pies może dominować także nad ludźmi z którymi mieszka. Pies będzie przejawiał ten typ agresji w momencie kiedy poczuje że jego status społeczny jest zagrożony np. pojawienie się nieznanych osób lub zwierząt na jego terytorium (Jasińska 2000). Agresja taka objawia się warczeniem, klapaniem zębami, a w skrajnych przypadkach bezpośrednim atakiem na osobę/zwierzę które naruszyło jego przestrzeń, lub gdy została ograniczona jego swoboda np. chęć zamknięcia w klatce, przytrzymanie za obroź itp. W celu leczenia tego typ agresji wskazane jest zastosowanie terapii w postaci treningu posłuszeństwa. Co więcej zapewnienie psu bezpieczeństwa pomaga w eliminowaniu agresji dominującej (Cichoń 2008).

Agresja w samoobronie jest to rodzaj agresji wynikająca najczęściej ze strachu zwierzęcia przed daną sytuacją, reakcją itp. Należy nadmienić, że pies może wyrazić ten rodzaj agresji w obronie

swojego opiekuna. Do bezpośredniego ataku dochodzi w sytuacji braku odczytania sygnałów ostrzegawczych tj. oblizywanie lusterka nosa, tulenie uszu, podkulenie ogona, wycofanie czy warczenie. Agresja w samoobronie jest bezwarunkowa, ponieważ ma na celu obronę przed niesprzyjającymi bodźcami. W przypadku stałej obawy przed konkretnymi czynnikami należy zastosować terapię odczulającą, mającą na celu przyczajenie do potencjalnie zagrażającego czynnika, który został utrwalony przez psa i na którego reaguje agresją.

Agresja lękowa związana jest najczęściej z przeżyciami traumatycznymi, które zapisały się na trwałe w pamięci czworonoga. Pies z agresją lękową przejawia charakterystyczne objawy tj. niepokój, dyszenie, obniżona pozycja ciała, wycofanie, podkulony ogon czy najeżona sierść w sytuacji zetknięcia z bodźcem który wywołuje negatywne emocje np. w gabinecie weterynaryjnym, czy na inne psy jeżeli wcześniej doszło do pogryzienia. W tym przypadku należy stosować metodę nagradzania w przypadku zignorowania potencjalnego zagrożenia, a także terapię odczulającą.

Agresja instynktowna/łowcza wynika z temperamentu zwierzęcia i cech genetycznych. Są rasy psów u których bardzo mocno zakorzenione są zachowania tropiące, polujące itp. Ten rodzaj agresji skierowany jest najczęściej w stronę potencjalnych ofiar tzn. mniejszych psów, kotów czy małych dzieci. Metoda do niwelowania tego typu problemu jest odpowiednie zaspokojenie potrzeb zwierzęcia tj. aportowania, przeciąganie liny, tropienie (Orłowska 2006).

W przypadku występowania jakiegokolwiek z wyżej wymienionych agresji nie należy stosować wobec zwierzęcia kar fizycznych, ponieważ doprowadzi to do negatywnego wzmocnienia i utrwalenia nieprawidłowych zachowań (Bamberger i Houpt 2006).

2.3 Nadaktywność

Nadaktywność nazywana inaczej nadpobudliwością, jest to zaburzenie behawioralne występujące głównie u młodszych psów. Do wystąpienia dochodzi na skutek braku kontroli nad niewłaściwymi zachowaniami u szczeniąt w wieku socjalizacji tj. do 12 tygodnia życia (socjalizacja szczenięcia). Zbyt szybka adopcja, niewystarczający kontakt z matką czy innymi szczeniętami mogą być potencjalnymi przyczynami występowania zespołu nadpobudliwości (Dehasse 2005). U starszych psów nadaktywność może wynikać z braku rytualizacji dnia. Ciągłe zachodzące zmiany w otoczeniu psa powodują rozchwianie emocjonalne. W przypadku źle zbilansowanej diety, zawierającej zbyt duże ilości kukurydzy, lub w przypadku zbyt energetycznego pokarmu możemy doprowadzić do wystąpienia tego zespołu u psów starszych (DeNapoli i in. 2000). Głównymi objawami są podgryzanie, szczekanie, drapanie, skakanie na właściciela i inne osoby oraz inne zwierzęta, jednym słowem pies znajduje się w ciągłym ruchu. W przypadku braku odpowiedniej terapii może przekształcić się w zachowania agresywne lub stan głębokiego lęku/depresji.

Terapia behawioralna w tym przypadku polega na wprowadzeniu konkretnych zasad w życie zwierzęcia poprzez krótkie i jasne polecenia, mające na celu skupienie uwagi psa i wzrost koncentracji.

3. Leczenie

3.1 Feromonoterapia

Stosowanie feromonów jako terapii podstawowej lub wspomagającej jest uznane za bezpieczny i nieinwazyjny sposób leczenia lub łagodzenia zaburzeń behawioralnych. W przypadku psów stosowane są feromony syntetyzowane na wzór naturalnych psich feromonów wydzielanych przez gruczoły łojowe bruzdy międzysutkowej karmiącej suki. Są to feromony należące do grupy o działaniu uspokajającym (dog appeasing pheromone – DAP) (Young-Mee i in. 2010).

3.2 Ziołolecznictwo

Terapia ziołami jest także stosowana w przypadku trudności z leczeniem zaburzeń behawioralnych metodami konwencjonalnymi. Do najczęściej stosowanych ziół mogących pomóc w leczeniu zachowań depresyjnych są waleriana i dziurawiec. W przypadku zachowań lękowych stosowany jest miłorząb japoński (ginkgo biloba) (Pittler i Ernst 2000).

3.3 Farmakoterapia

W przypadku zaburzeń behawioralnych popularne jest stosowanie tryptofanu, alprazolamu, diazepamu, hydroksyzyny, serotoniny oraz kломipraminy. Jednak wszystkie farmaceutyki powinny być przepisane przez lekarza weterynarii i stosowane zgodnie z jego zaleceniami.

4. Podsumowanie

W świecie stale rosnącej empatii człowieka dla zwierząt, diagnozowanie i rozwiązywanie istniejących problemów behawioralnych staje się coraz popularniejsze i niezbędne do prawidłowego funkcjonowania na linii człowiek – zwierzę. Medycyna behawioralna jest bardzo dynamicznie rozwijająca się gałęzią medycyny weterynaryjnej.

5. Literatura

- Appleby D, Pluijmakers J (2003) Separation anxiety in dogs. The function of homeostasis in its development and treatment. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 33(2): 321.
- Bamberger M, Houpt KA (2006) Signalment factors, comorbidity, and trends in behavior diagnoses in dogs: 1,644 cases (1991-2001). *J Am Vet Med Assoc* 229(10): 1591-1601.
- Cichoń R (2008) Agresywne zachowania psów. Wybrane elementy diagnostyki i terapii. *Weterynaria w Praktyce* 5(2): 88-89.
- Dehasse J (2005) Dog and cat ontogeny disorders: hyperactivity, deprivation, dyssocialisation and depression. W: *Veterinary Behavioural Medicine I ESAVS Course*: 34-39.
- DeNapoli J.S, Dodman N.H, Shuster L i in. (2000) Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217(4): 504-508.
- Horoszewicz E, Kalinowska M, Niedziolka R (2017) Rozwój psychofizyczny psów oraz charakterystyka wybranych zaburzeń behawioralnych. *Wiadomości Zootechniczne* 55(4): 148-153.
- Jasińska R (2000) Przyczyny agresji u psów. *Magazyn Weterynaryjny* 9(3 suplement – psy): 55-58.
- King J. N, Simpson B. S, Overall K. L i in. (2000) Treatment of separation anxiety in dogs with clomipramine: results from a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicenter clinical trial. *Applied Animal Behaviour Science* 67(4): 255-275.
- Kudła J (2006) Agresja u psów. Cz. I. Klasyfikacja i czynniki wpływające na agresywne zachowanie u psów. *Magazyn Weterynaryjny* 15(12): 44-46.
- Line S, Voith V.L (1986) Dominance aggression of dogs towards people: behavior profile and response to treatment. *Applied Animal Behaviour Science* 16(1): 77-83.
- Ogata N (2016) Separation anxiety in dogs: What progress has been made in our understanding of the most common behavioral problems in dogs?. *Journal of Veterinary Behavior* 16: 28-35.
- Orłowska A (2006) Systemy hamowania agresji u psów. *Weterynaria po Dyplomie* 7(4): 31-36.
- Osija A, Fiszdon K (2015) Lęk separacyjny u psów-przyczyny, objawy i metody leczenia. *Życie Weterynaryjne* 90(12): 796.
- Pittler M.H, Ernst E (2000) Ginkgo biloba extract for the treatment of intermittent claudication: a meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Med* 108: 276–281.
- Sherman B.L (2008) Separation anxiety in dogs. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet* 30: 27–42.
- Witkowska O, Chudalewska K (2014) Lęk separacyjny u psów. *Życie Weterynaryjne*, 89(08): 682-684.
- Young-Mee K, Jong-Kyung L, A.M, Sung-Hee H i in. (2010) Efficacy of dog-appeasing pheromone (DAP) for ameliorating separation-related behavioral signs in hospitalized dogs. *Can. Vet.J* 51: 380–384.

11. Lateralizacja motoryczna i sensoryczna – asymetria półkul mózgu u zwierząt towarzyszących

Motor and sensory lateralization - asymmetry of the brain hemispheres in companion animals

Aleksandra Garbiec

Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa, Wydział Nauk o zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. lek. wet Mirosław Karpiński

Mirosław Karpiński: miroslaw.karpinski@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: pies, kot, behawior, stres, lateralizacja

Streszczenie

Celem pracy jest omówienie zjawiska lateralizacji motorycznej i sensorycznej u zwierząt towarzyszących ze zwróceniem szczególnej uwagi na psa. W pracy opisano najpopularniejsze metody badania stronności zwanej potocznie w przypadku psów „łapnością”. W celu dokładnego zobrazowania na czym polega lateralizacja tekst został wzbogacony o zdjęcia czworonogów wraz z interpretacją. Uzupełnieniem pracy jest wyjaśnienie jak testowanie preferencji łap może stanowić przydatne narzędzie do odpowiedniego doboru psa pod względem temperamentu.

1. Wstęp

Lateralizacja nazywana inaczej asymetrią półkul mózgu, odpowiada za przewagę prawej lub lewej półkuli mózgu, co determinuje dominację prawej lub lewej strony ciała zwierzęcia. W populacji ludzkiej potocznie określamy osoby z preferencją prawostronną – praworęczne, z lewostronną – leworęczne, natomiast w przypadku psów mówimy o prawo lub lewołapności. Osobniki z brakiem widocznej przewagi jednej z półkul nazywamy ambiwalentnymi, czyli obułapnymi. Wyróżniamy i badamy dwa typy lateralizacji: motoryczną oraz sensoryczną (Dukowicz i in. 2015). Lateralizacja kształtuje się wraz z wzrostem organizmu, nabywaniem umiejętności koordynacji ruchów oraz wzrostem poziomu percepcji (Corballis 2009). Asymetria mózgu jest podmiotem badań wielu naukowców, jest obserwowana i opisywana nie tylko u ssaków, a także u ptaków, gadów a nawet płazów.

2. Opis zagadnienia

2.1 Lateralizacja motoryczna

Lateralizacja motoryczna nazywana jest inaczej ruchową, polega na określeniu za pomocą odpowiednich testów, która łapa u zwierzęcia jest łapą dominującą. U psów prawołapnych dominującą jest lewa półkula i odwrotnie. Do najpopularniejszych testów zaliczamy test z taśmą przyklepną umieszczaną na grzbiecie nosa psa (Quaranta i in. 2004) oraz test z zabawką typu kong, czyli „Kong ball test” (Plueckhahn i in. 2016). Testy są nieinwazyjne, bezpieczne i akceptowane przez większość testowanych psów, co więcej są one łatwe do powtórzenia i obserwacji.

Test z taśmą przyklepną polega na umieszczeniu taśmy samoprzylepnej na grzbiecie nosa psa, dokładnie po środku tak, aby pies nie był w stanie zobaczyć taśmy (Rys.1). Następnie prowadzi się obserwację, którą łapą pies będzie usiłował ściągnąć taśmę (Rys.2). Aby badanie było wiarygodne należy wykonać co najmniej 50 powtórzeń w ciągu jednej godziny (Siniscalchi i in. 2008).

Kong ball test jest metodą umożliwiającą zbadanie lateralizacji motorycznej, ale przy użyciu zmysłu węchu, ponieważ zabawkę wypełnia się jedzeniem, aby zachęcić psa do chwytania zabawki. Podczas próby zjedzenie smakołyka umieszczonego we wnętrzu gumowego przedmiotu pies musi użyć prawej lub lewej łapy do jego stabilizacji (Batt i in. 2007) (Rys. 3). Aby badanie było uznane za prawidłowo wykonane pies powinien wykonać 50 dotknięć w przeciągu jednej godziny (Plueckhahn i in. 2016).



Rys. 1. Taśma umieszczona na grzbiecie nosa psa.



Rys. 2. Pies usiłujący zdjąć taśmę z nosa przy użyciu lewej łapy.



Rys. 3. Pies podczas testu z zabawką Kong (autor M. Rusecka).

Stronność motoryczną, można badać również u kotów, choć jest to o wiele trudniejsze zadanie ze względu na temperament kotów. Najpopularniejszymi metodami oceny asymetrii motorycznej jest test polegający na sięganiu po zabawkę zawieszoną nad głową zwierzęcia oraz test polegający za podążaniem za zabawką która jest ciągnięta po ziemi (Wells i Millsopp 2009) (Rys.4).

Naukowcy w swoich badaniach doszli do wniosków, że preferowanie użycie prawej łapy (lewej półkuli) wiąże się z większą eksploracją w nowych sytuacjach (Cameron i Rogers, 1999). Odmienne wyższą emocjonalność i reaktywność na nowe bodźce zaobserwowano u zwierząt preferujących używanie lewej łapy (prawej półkuli) (Larose i in. 2006). Podczas swoich badań Branson i Rogers (2006) odkryli, że psy ze słabszą preferencją łap podczas testu Kong były bardziej podatne na stres w odpowiedzi na głośne dźwięki oraz wykazywały bardziej pobudliwe zachowanie w stosunku do psów z jednostronną preferencją łapy. Co więcej wielu naukowców potwierdziło w swoich badaniach też, że prawa półkula jest odpowiedzialna za wyrażanie strachu i agresywności. Badania te dowodzą, że badanie asymetrii mózgu może dawać nie tylko informacje o preferencji łapy, ale także być przydatnym narzędziem do określania skłonności zwierzęcia do pewnych cech.

2.2 Lateralizacja sensoryczna

Lateralizacja sensoryczna u zwierząt towarzyszących dotyczy zmysłów węchu i słuchu. Badanie asymetrii sensorycznej dokonuje się poprzez mobilizację właśnie tych zmysłów poprzez dźwięki lub zapachy oraz obserwację zwierzęcia. Jeśli chodzi o bodźce słuchowe, badano reakcje odwracania

głowy w kierunku akustycznego bodźca umieszczonego z tyłu głowy zwierzęcia (Siniscalchii i in. 2008). Najłatwiej dokonać interpretacji w sytuacji kiedy reakcja na dźwięki jest rejestrowana przez wideo rejestrator. Ważne jest aby wykorzystać różnorodne bodźce słuchowe tzn. przyjemne, niepokojące oraz znane i nowe dla badanego zwierzęcia. Najczęściej wykorzystywane są odgłosy burzy, fajerwerków oraz odgłosy innych zwierząt i ludzi.



Rys. 4. Test z zabawką ciągnięta po podłożu (autor M. Rusecka).

W przypadku odwracania głowy sytuacja jest analogiczna jak przy używaniu łapy czyli przy zwrocie głowy w prawo zaangażowana jest lewa półkula i odwrotnie. Kierunek odwracania głowy, jest reakcją bezwarunkową uważaną za wskaźnik zaangażowania uwagi wobec prezentowanego bodźca półkuli przeciwnej, do wykonywanego przez psa ruchu głowy (Leliveld i in. 2008). Bardzo ważne jest aby zarejestrować w którą stronę pies odwraca głowę przy danym rodzaju dźwięku, ponieważ jest to pomocne w interpretacji potencjalnego charakteru, usposobienia psa czy reakcji na stres. Naukowcy dowiedli, że psy odwracają głowę w prawo (dominacji lewej półkuli) w przypadku alarmowych dźwięków tj. wokalizację innych psów, odgłos pukania do drzwi. Co ciekawe zauważono, że specjalizacja lewej półkuli jest odpowiedzialna za wokalizację czy wydawanie dźwięków. Część osobników w przypadku tego typu odgłosów nie wykazywała ruchu głowy w żadnym kierunku, najprawdopodobniej ze względu na dezorientację (Siniscalchi i in. 2012). W przypadku odgłosów burzy czy fajerwerków psy odwracają się w stronę lewą (dominacja prawej półkuli), co może świadczyć że prawa półkula będzie odpowiedzialna za ekspresję takich emocji jak

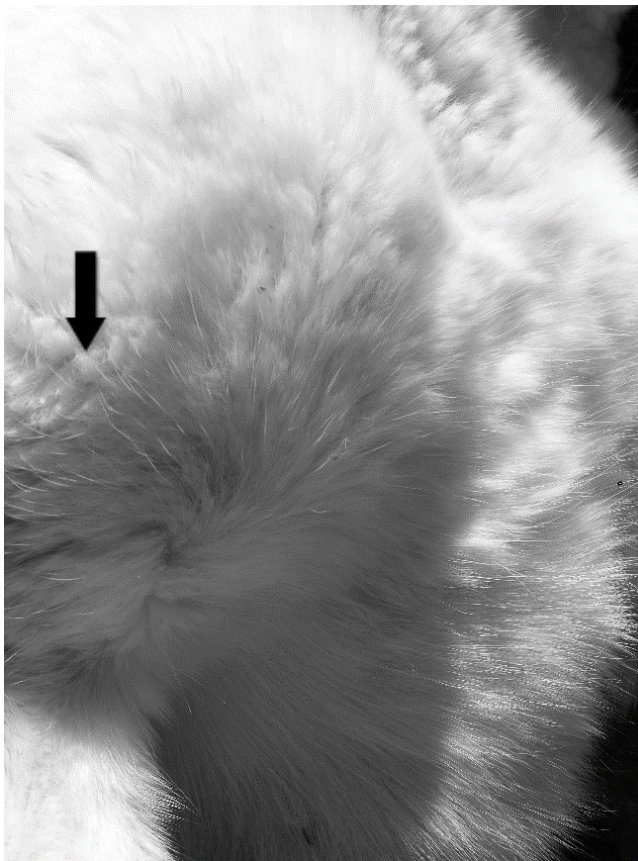
agresja czy strach. Do podobnych wniosków doszli naukowcy w 2010, którzy stwierdził, że zwierzęta charakteryzujące się preferencją lewostronną wykazują wyższy poziom stresu niż zwierzęta z preferencją prawostronną (Rogers 2010). Dosyć innowacyjnym wynikiem badań jest fakt, że w przypadku słów wypowiedzianych przez człowieka, psy odwracały się równie często przez prawe jak i lewe ucho, co może wskazywać, że odbiór i rozumienie ludzkiej mowy wymaga aktywności obu półkul mózgowych psa (Zięba i Poloński 2012).

W przypadku testowania narządu węchu, należy zaznaczyć iż nabłonek węchowy prawego nozdrza będzie pobudzał prawa półkulę mózgu i odwrotnie (ipsilateralnie) (Royet i Plailly 2004). Jako bodźców węchowych używa się charakterystycznych zapachów mających wzbudzić określone reakcję np. radość, ekscytację, zaciekawienie czy strach itd. Używanie przez większość testu prawego nozdrza może świadczyć o wzroście napięcia i większego nacechowania emocjami w odpowiedzi na pobudzenie prawej półkuli mózgu. W przypadku wachania przyjemnych bodźców takich jak np.. jedzenie czy ubrania właściciela zwierzęta używały w większości lewego nozdrza, czyli dochodziło do aktywacji lewej półkuli mózgu (Siniscalchi i in. 2011). Zarówno naukowcy badający lateralizację motoryczną i sensoryczną doszli do podobnych wniosków (Schneider i in. 2013).

Lateralizacja w świecie zwierząt jest coraz szerzej badana i opisywana, prowadzone są również obserwacje związane z ułożeniem sierści u zwierząt. Okazuje się, że sierść psów potrafi układać się zgodnie z asymetrią mózgu tzn. u psa prawołapnego sierść będzie układała się w „wir” w prawa stronę i odwrotnie (Rys. 5, 6).



Rys. 5. Ułożenie sierści w wir prawostronny (autor M. Karpiński).



Rys. 6. Ułożenie sierści w wir lewostronny (autor M. Karpiński).

3. Podsumowanie i wnioski

Lateralizacja motoryczna i sensoryczna w świecie zwierząt jest zjawiskiem bardzo ciekawym i niosącym za sobą wiele korzyści. Tak samo jak u ludzi asymetria niesie za sobą pewne predyspozycje osobnicze dlatego też, jeżeli Twój pupil chętnie i szybko uczy się komend najprawdopodobniej wykaże asymetrię lewostronną, czyli będzie prawolapny. Natomiast jeżeli Twój ulubieniec jest bardzo kreatywny jego dominującą półkulą będzie półkula prawa czyli będzie lewolapny.

4. Literatura

- Batt L, Batt M, McGreevy P (2007) Two tests for motor laterality in dogs. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 2(2): 47–51.
- Branson N.J, Roger, L.J (2006) Relationship between paw preference strength and noise phobia in *Canis familiaris*. *Journal of Comparative Psychology* 120(3): 176.
- Cameron R, Rogers L.J (1999) Hand preference of the common marmoset (*Callithrix jacchus*): problem solving and responses in a novel setting. *Journal of Comparative Psychology* 113(2): 149.
- Corballis M.C (2009) The evolution and genetics of cerebral asymmetry. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci* 364(1519): 867-879.
- Dukowicz A, Sikorska J, Szymańska J i in. (2015) Asymetria funkcjonalna mózgu w badaniach z udziałem naczelnych. *Psychologia-Etologia-Genetyka* 32: 7-27.
- Larose C, Richard-Yris M.A, Hausberger M i in. (2006) Laterality of horses associated with emotionality in novel situations. *Laterality* 11(4), 355-367.

- Leliveld L.M, Scheumann M, Zimmermann E (2008) Manual lateralization in early primates: A comparison of two mouse lemur species. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists* 137(2): 156-163.
- Plueckhahn T.C, Schneider L.A, Delfabbro P. H (2016) Assessing lateralization in domestic dogs: Performance by *Canis familiaris* on the Kong test. *Journal of Veterinary Behavior* 15: 25-30.
- Quaranta A, Siniscalchi M, Frate A, Vallortigara G (2004) Paw preference in dogs: relations between lateralised behaviour and immunity. *Behavioural Brain Research* 153(2): 521-525.
- Rogers L.J (2010) Relevance of brain and behavioural lateralization to animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 127(1-2): 1-11.
- Royet J.P, Plailly J (2004) Lateralization of olfactory processes. *Chemical senses* 29(8): 731-745.
- Schneider L.A, Delfabbro P.H, Burns N.R (2013) Temperament and lateralization in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Veterinary Behavior* 8(3): 124-134.
- Siniscalchi M, Quaranta A, Rogers L.J (2008) Hemispheric specialization in dogs for processing different acoustic stimuli. *PLoS One* 3(10): e3349.
- Siniscalchi M, Sasso R, Pepe A.M i in. (2011) Sniffing with the right nostril: lateralization of response to odour stimuli by dogs. *Animal behaviour* 82(2): 399-404.
- Wells D.L, Millsopp S (2009) Lateralized behaviour in the domestic cat, *Felis silvestris catus*. *Animal Behaviour* 78(2): 537-541.
- Zięba K, Poloński L (2012) Przejawy asymetrii funkcjonalnej w świecie zwierząt: lateralizacja słuchowa, wzrokowa oraz węchowa. *Psychologia-Etologia-Genetyka* 25, 57-71.

12. Zastosowanie krzemu w namnażaniu winogron (*Vitis vinifera* L.) w kulturach *in vitro*

The use of silicon in the micropropagation of grapes (*Vitis vinifera* L.) *in vitro*

Weronika Bil⁽¹⁾, Monika Figiel-Kroczyńska⁽²⁾, Arleta Kruczek⁽²⁾, Marcelina Krupa- Małkiewicz⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin; Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽²⁾Katedra Ogrodnictwa, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Weronika Bil: weronika.bil@wp.pl

Słowa kluczowe: krzem, winogron, mikrorozmnażanie, *Vitis vinifera*

Key words: silicon, grape, micromultiplication, *Vitis vinifera*

Streszczenie

Krzem jest drugim co do ilości pierwiastkiem skorupy ziemskiej. Doniesiono, że krzem poprawia wiele parametrów wzrostu, w tym embriogenezę i organogenezę, a także morfologię, fizjologię i anatomię liści. Krzem zmniejsza podatność roślin na zasolenie i niską temperaturę, łagodzi toksyczność metali, zmniejsza częstość występowania nadmiernej wilgotności i zapobiega oksydacyjnemu brązowieniu fenolowemu roślin. Coraz więcej badań potwierdza korzystne działanie krzemu na rośliny sadownicze i warzywnicze. Stąd też, celem badań było określenie wpływu krzemu na cechy morfologiczne winogron namnażanych *in vitro*.

Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe winogronu (*Vitis vinifera* L.) otrzymane z ustabilizowanej, sterylnej kultury *in vitro*. W doświadczeniu zastosowano 5 kombinacje pożywek według składu makro- i mikroelementów WPM-Woody Plant Meddia (Lloyd, McCown, 1981). Zastosowano pięć stężeń roztworu krzemu (0, 50, 100, 200, 500 mg/dm³) „Actisil” zawierającego 0,6 % kwasu ortokrzemowego stabilizowanego choliną oraz 2 % Ca. Kontrolę w doświadczeniu stanowiła pożywka WPM bez dodatku krzemu.

Po przeanalizowaniu otrzymanych wyników badań, stwierdzono, że zastosowanie krzemu w wyższych stężeniach (200 i 500 mg/dm³) miało negatywny wpływ na długość pędów i korzeni. Winogrona z dodatkiem krzemu charakteryzowały się mniej wykształconym systemem korzeniowym. Rośliny z pożywki MS z dodatkiem 500 mg/dm³ krzemu miały najkrótsze pędy i korzenie oraz wyraźne objawy chlorozy.

Abstract

Silicon is the second most abundant element in the earth's crust. Silicon has been reported to improve many growth parameters, including embryogenesis and organogenesis, as well as leaf morphology, physiology and anatomy. Silicon reduces the susceptibility of plants to salinity and low temperatures, reduces metal toxicity, reduces the incidence of excessive humidity and prevents phenolic oxidative browning in plants. More and more studies confirm the beneficial effects of silicon on fruit and vegetable plants. Hence, the aim of the research was to determine the influence of silicon on the morphological characteristics of grapes grown *in vitro*.

The research material was grape shoot explants (*Vitis vinifera* L.) obtained from a stabilized, sterile *in vitro* culture. In the experiment, 5 combinations of media were used according to the composition of macro- and microelements of WPM (Lloyd, McCown, 1981). Five concentrations of silicon (0, 50, 100, 200, 500 mg / dm³) added as "Actisil" containing 0,6% choline-stabilized orthosilicic acid and 2% Ca were used. After analyzing the obtained test results, it was found that the use of silicon in higher concentrations (200 and 500 mg/dm³) had a negative effect on the length of the shoot and roots. Grapes with the addition of silicon had a less developed root system. Plants from the MS medium with the addition of 500 mg / dm³ of silicon had the shortest shoots and roots as well as clear symptoms of chlorosis.

1. Wstęp

Winorośl (*Vitis L.*) jest rośliną owocową o dużym znaczeniu gospodarczym. Należy do jednych z najstarszych roślin uprawnych. Jej owoce są wykorzystywane przez człowieka od ponad sześciu tysięcy lat. Obecnie obszary uprawy winorośli zajmują 10 milionów hektarów na całym świecie, co czyni je jedną z najczęściej uprawianych roślin owocowych na świecie. Winorośl właściwa (*Vitis vinifera L.*), nazywana jest także winoroślą winną, latoroślą winną. Rośliny występujące w stanie dzikim i będące przodkami roślin uprawnych rosły niegdyś niemal w całym basenie Morza Śródziemnego, w rejonie Kaukazu i dalej na wschód po Turkmenistan. Winorośl uprawna, wyróżniana jako osobny podgatunek, rozprzestrzeniona została szeroko w postaci wielu odmian uprawnych na całym świecie. Z jagód wytwarza się przede wszystkim wina, poza tym wykorzystuje się je do bezpośredniego spożycia (także suszone jako rodzyunki), do wyrobu soków, galaretek, dżemów, kwasu winowego i octu winnego. Z nasion tłoczony jest olej. W zależności od gatunku i odmiany owoce posiadają różne kształty, kolory, rozmiary i smaki. Winorośl jest, także cenioną rośliną ogrodową – atrakcyjnym krzewem ozdobnym, służącym tzw. hortiterapii czyli relaksacji w otoczeniu roślin ogrodowych. Amatorska uprawa winorośli ma szereg zalet. W pierwszej kolejności stymuluje nas do zdobycia informacji o tej roślinie. Dostarcza wrażeń estetycznych i smakowych. Pielęgnacja krzewów jest formą aktywnego wypoczynku i pomaga utrzymać dobrą formę psychofizyczną (Kapłań i in. 2015). W związku ze wzrastającą popularnością tego gatunku poszukuje się alternatywnych metod uprawy, pozwalających zwiększyć efektywność i uzyskać większą ilość materiału roślinnego, w stosunkowo krótkim czasie. Taką korzystną alternatywą dla konwencjonalnej uprawy są dynamicznie rozwijające się roślinne kultury *in vitro* (Gawroński i in. 2013).

W ostatnich kilkunastu latach, krzem jest coraz częściej stosowany w nawożeniu roślin uprawnych, co potwierdzają liczne badania dotyczące roślin rolniczych i ogrodniczych. Liczne doniesienia naukowe wskazują, jak ważna jest rola krzemu w odporności roślin na stres wywołany abiotycznymi i biotycznymi czynnikami środowiska (Hou i in. 2006; Sacała 2009). Krzem to powszechnie występujący pierwiastek w skorupie ziemskiej. Procentowa zawartość Si w glebach wynosi od 25% do nawet 45%. Każdy kilogram gleby zwykle zawiera bardzo duże ilości dwutlenku krzemu w zakresie 50 - 400 g. Jest to główny składnik wszystkich frakcji granulometrycznych gleb, a przede wszystkim frakcji piasku i pyłu. Najwięcej krzemu jest w glebach piaszczystych, najmniej w ilastych (Nishimura i in. 1989). Azot (N) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie składników, a w ziemskiej atmosferze jest go ponad 78%, jest on najbardziej deficytowym składnikiem żywieniowym, w znikomym stopniu dostępnym dla roślin. Podobna sytuacja dotyczy krzemu (Si). Krzem jest wszechobecny w roślinach jednoliściennych i dwuliściennych, w ilościach równoważnych lub większych w stosunku do fosforu i magnezu. Mimo to, krzem nie jest uznawany za niezbędny składnik pokarmowy dla wzrostu roślin. Jest pierwiastkiem o dobroczynnych właściwościach, którego pominięcie w dawce nawozowej nie wpływa negatywnie na rośliny uprawne, a obecność pozytywnie na ich kondycję.

Setki badań przeprowadzonych na kilku gatunkach roślin i w różnych warunkach wzrostu wykazały korzystne korzyści płynące z nawożenia Si, zwłaszcza w łagodzeniu stresów biotycznych i abiotycznych. Stres abiotyczny jest jednym z najpoważniejszych ograniczeń w uprawach roślin na całym świecie. Ze względu na zmianę klimatu i nieprzewidywalną pogodę, stresy abiotyczne stały się bardziej powszechne. Rośliny wytwarzają reaktywne formy tlenu (RFT) jako pierwszą odpowiedź na większość stresów abiotycznych, takich jak zasolenie, susza, stres termiczny i stres związany z metalami ciężkimi. Reaktywne formy tlenu (RFT), które są stosunkowo bardziej reaktywne w porównaniu z O_2 i mogą prowadzić do niespecyficznego utleniania białek i lipidów błonowych lub mogą powodować uszkodzenie DNA. Ta odpowiedź powoduje poważne uszkodzenia struktury komórkowej i organelli oraz zmienia normalne funkcjonowanie komórki. Badania prowadzone przez Hasanuzzamana i in. (2012) pokazały, że rośliny poddane działaniu metalem ciężkim, miały zmniejszoną zawartość RFT po podaniu Si w porównaniu z próbą kontrolną (Hasanuzzaman i in. 2012). Badanie Kabira (2016), także potwierdziło, że Si odgrywa kluczową rolę w przeciwdziałaniu toksyczności Cd i przywracaniu normalnego wzrostu i rozwoju roślin lucerny (Kabira i in. 2016).

W roślinach krzem występuje przede wszystkim w komórkach epidermy, mezofilu, sklerenchymie i w ścianach komórkowych, a zawartość w organach nadziemnych roślin waha się w zależności od gatunku, wieku i warunków wzrostu. W podziałach botanicznych rośliny dzieli się na dwie grupy, a mianowicie hiperakumulatory oraz rośliny wrażliwe. Chociaż jest to rzadkie, nadmierne poziomy krzemu mogą prawdopodobnie konkurować z wchłanianiem innych składników odżywczych. U gerbery i słonecznika stwierdzono, że wysoki poziom krzemu deformuje kwiaty. Rośliny uważane za „nieakumulujące” krzem są bardziej wrażliwe na jego nadmiar, niż te, które są „akumulatorami”. Główną dostępną i łatwo przyswajalną przez rośliny formą Si jest kwas monokrzemowy (H_4SiO_4). Kwas ortokrzemowy przemieszcza się przez błony cytoplazmatyczne korzeni roślin za pomocą dwóch mechanizmów: transportu biernego na drodze dyfuzji u roślin dwuliściennych i transportu aktywnego za pomocą specyficznych transporterów u traw np. ryżu. Wielkość pobrania i rozmieszczenie tego pierwiastka w roślinie zależy od intensywności transpiracji.

Niektóre rośliny dwuliścienne, takie jak rośliny strączkowe, mają tendencję do wykluczania Si z tkanek - wchłanianie odrzucające. Rośliny te nie są w stanie gromadzić Si i nie korzystają z krzemu. W warunkach stresu wodnego krzem może zwiększyć odporność roślin na stres i polepszyć wzrost roślin. Te korzystne efekty mogą wynikać z lepszej i bardziej wydajnej osmoregulacji, poprawy stanu wody roślin, zmniejszenia utraty wody w wyniku transpiracji, utrzymania odpowiedniej podaży niezbędnych składników odżywczych, ograniczenia pobierania toksycznych jonów oraz sprawnego funkcjonowania mechanizmów antyoksydacyjnych. Na podstawie aktualnej wiedzy i przedstawionych danych, można wyciągnąć wniosek, że rola Si w roślinach nie ogranicza się do tworzenia fizycznej lub mechanicznej bariery (jako wytrącona bezpostaciowa krzemionka) w ścianach komórkowych, prześwitach i pustkach międzykomórkowych. Krzem może również modulować metabolizm roślin i zmieniać aktywność fizjologiczną, szczególnie u roślin poddanych stresowi. Jednak w niektórych roślinach zwiększona podaż krzemu nie poprawia wzrostu roślin (Sacała i in. 2009). Krzem może być uważany za narzędzie pomagające chronić rośliny przed szkodnikami i chorobami. Zauważono, że w wyniku cyklicznego uszkodzania roślin odnotowano zwiększone pobieranie krzemu.

Na początku lat dziewięćdziesiątych pierwsze dowody kwestionujące rolę Si jako bariery mechanicznej odnotowano w modelach roślin dwuliściennych. Samuels i in. wykorzystując patosystem mączniaka ogórka i mączniaka prawdziwego, wykazali, że w krótkim okresie czasu po zaprzestaniu karmienia Si wszystkie efekty profilaktyczne zanikły. Zatem przerwanie zasilania Si doprowadziło do utraty odporności (Samuels i in. 1991). W literaturze można znaleźć również dwie hipotezy na temat wpływu krzemu na zwiększenie odporności roślin na atak patogenów grzybowych. Pierwsza wiąże się z podwyższoną akumulacją pierwiastka pod skórą, co pełni rolę swoistej bariery fizycznej uniemożliwiającej rozwój strzępki (Datnoff i in. 2005).

Druga hipoteza jest związana z biologiczną aktywnością wywołującą ekspresję genów odpowiedzialnych za naturalne mechanizmy odpornościowe. Zwiększona produktywność enzymów, takich jak polifenoloksydazy, peroksydazy i inne, przyczynia się do produkcji związków antygrzybiczych, jak fenole, flawonoidy i fitoaleksyny (Fortunato 2014). Patrząc w przyszłość, pojawiają się możliwości, które pozwalają zrozumieć funkcję Si, pierwiastka, który ma różnorodny wpływ na rośliny.

Kolor liści oznacza stan odżywienia oraz zdrowia rośliny. Określany jest poprzez zawartość chlorofilu, karotenoidów oraz innych pigmentów (Hu i in. 2010). Najbardziej preferowaną metodą do pomiaru koloru liści jest System CIE $L^*a^*b^*$. Zmiana barwy liści może być spowodowana degradacją zielonego barwnika, czyli chlorofilu, a także zmianą stosunku zawartości *chlorofilu a* do *chlorofilu b*, co skutkuje przesunięciem barwy z zielonej w kierunku zielono-żółtym (Polak 2008).

Dokładne mechanizmy korzystnej roli Si mogą być zależne od gatunku. Dlatego naszym celem było zbadanie, czy krzem wpływa korzystnie na rośliny winogron namnażanych *in vitro*.

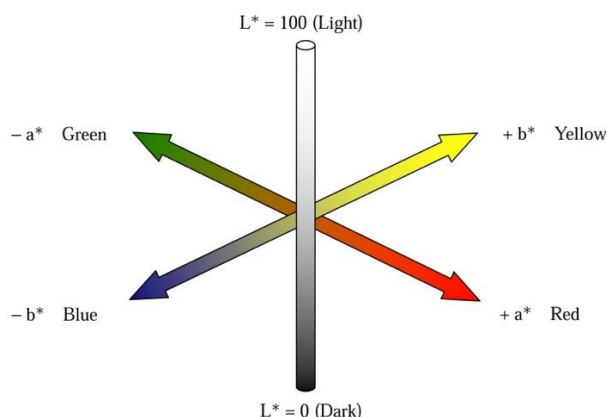
2. Materiały i metody

Doświadczenie przeprowadzone zostało w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe winogronu (*Vitis vinifera* L.) otrzymane z ustabilizowanej, sterylnej

kultury *in vitro*. W doświadczeniu zastosowano 5 kombinacji pożywek według składu makro- i mikroelementów WPM (Lloyd i McCown, 1981). Zastosowano pięć stężeń krzemu (0, 50, 100, 200, 500 mg/dm³) dodanego w postaci roztworu pod nazwą handlową „Actisil” (Yara Polska) zawierającego 0,6 % kwasu ortokrzemowego stabilizowanego choliną oraz 2 % Ca. Kontrolę w doświadczeniu stanowiła pożywka WPM bez dodatku krzemu. Eksplantaty winogronu o długości ok. 2 cm wykładano po cztery sztuki do słoików o pojemności 200 ml, uzupełnianych po 30 ml odpowiedniej dla danej grupy pożywki, a następnie próby inkubowano w fitotronie przez okres ok. 6 tygodni. Przygotowane pożywki poddano wcześniej procesowi autoklawowania przez 19 min w 121° C i ciśnieniu 0.1MPa. Eksplantaty winogron o długości 2cm wykładano po 4 sztuki do słoików. Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach. Szczepienie eksplantatów przeprowadzano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza, w celu zapewnienia sterylnych warunków pracy. Tak przygotowane kultury inkubowano w fitotronie o temperaturze 21°C, 16 godzinnym oświetleniu (40 μmol m⁻²s⁻¹).

Po 40 dniach od momentu wyłożenia eksplantatów, wykonano pomiary cech morfologicznych takich, jak wysokość roślin, masa korzeni, masa pędów oraz wierzchnia barwa liści.

Pomiary barwy oraz ich współrzędne oznaczono w międzynarodowym konwencjonalnym systemie kolorymetrycznym CIE L*a*b*, gdzie: L* określa barwę białą (100) i czarną (0), a* określa barwę zieloną (-100) i czerwoną (+100), b* określa barwę niebieską (-100) i żółtą (+100) (Rysunek 1). Stosowano typ obserwatora 10° oraz iluminant D65, a średnica otworu pomiarowego wynosiła 3 mm.



Rys 1. Model barw CIE Lab.

Otrzymane wyniki badań opracowano statystycznie. Wykorzystano analizę wariancji dwuczynnikowej oraz test Tukey’a dla średnich. Różnice pomiędzy badanymi cechami szacowano na poziomie istotności $\alpha=0,01$ dla różnic wysoce istotnych i $\alpha=0,05$ dla różnic istotnych.

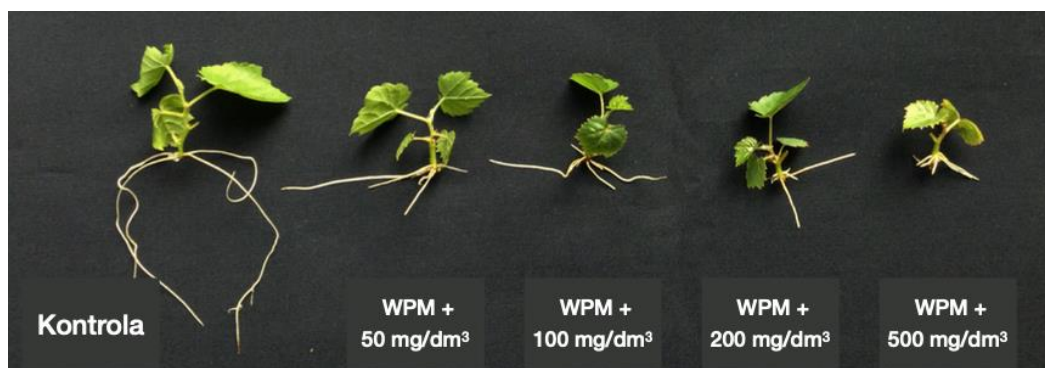
3. Wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników badań zaobserwowano, że dodatek krzemu, niezależnie od jego stężenia w porównaniu z próbą kontrolną, miał wpływ na takie cechy morfologiczne jak: wysokość rośliny, długość i liczbę korzeni (Rys.2) oraz na parametry L*a*b* barwy liści winogronu w warunkach *in vitro* (Tab.1).

Winogron na pożywce bez dodatku krzemu charakteryzowały się najdłuższymi pędami i korzeniami odpowiednio 2,18 cm, 4,05 cm (Tab. 2).

Wyniki pomiarów wykazały zmiany parametrów barwy. W systemie CIE L*a*b* zmniejszenie wartości L* oznacza zmniejszenie ilości światła odbitego od badanego materiału, wynikiem czego jest jego pociemnienie (Rys.1). Dodatek krzemu do pożywki spowodował spadek wartości parametru L* dla prób z dodatkiem 100 i 200 mg/dm³. Wartości parametrów a* i b*, gdzie -a* barwa zielona, +a* barwa czerwona, -b* barwa niebieska, +b barwa żółta, wskazują, że liście były

w zakresie barw od zielonej do żółtej. Analizując wyniki, stwierdzono nieznaczne zmiany wybarwienia liści roślin z poszczególnych pożywek.



Rys. 2. Eksplantaty pędowe winogron po 6 tygodniach wzrostu namnażane w kulturach *in vitro*.

Tab. 1. Parametry $L^*a^*b^*$ mierzone na wierzchu liści winogronu.

Rodzaj pożywki	L^*	a^*	b^*
KONTROLA	43,12a*	-8,08a	22,42a
WPM+50	45,48a	-8,39a	23,86a
WPM+100	37,40a	-8,26a	17,69a
WPM+200	39,81a	-8,92a	17,51a
WPM+500	46,03a	-8,06a	24,08a

*grupy jednorodne

Tab. 2. Cechy morfologiczne winogronu w zależności od zastosowanej pożywki.

Rodzaj pożywki	wysokość roślin	liczba pędów	długość korzeni	liczba korzeni	liczba liści	masa
KONTROLA	2,18a*	1	4,05b	1,89a	2,42a	0,21a
WPM+50	1,60a	1	1,38a	1,69a	2,25a	0,10a
WPM+100	1,69a	1	1,19a	1,00a	1,69a	0,09a
WPM+200	1,59a	1	1,06a	1,56a	1,88a	0,06a
WPM+500	1,38a	1	0,22a	0,81a	1,38a	0,05a

*grupy jednorodne

4. Dyskusja

W badaniach przeprowadzonych przez Adatia zastosowano pożywki zawierające 10 mg/dm³ SiO₂ (niski Si), który był poziomem obecnym w wodzie oraz 100 mg/dm³ SiO₂ (wysokie Si), wykazały, że wysoki poziom krzemu wpływał dodatnio na liście ogórka. Obserwowane zmiany dotyczyły głównie zwiększonej sztywności dojrzałych liści, które miały bardziej szorstką teksturę i były trzymane bardziej poziomo; były ciemnozielone, a starzenie się opóźniało. Dodatkowo, wysoki poziom krzemu niwelował występowanie ognisk chorób grzybiczych. Dodatek Si może być korzystny w przypadku ogórków uprawianych na obszarach, gdzie lokalne zasoby wody w ten pierwiastek są niskie, zwłaszcza gdy są uprawiane w roztworze recyrkulacyjnym lub w średnio ubogim w Si (Adatia 1986). Zastosowana w naszym badaniu dawka nie dała podobnych rezultatów. Krzem wpłynął negatywnie na liczbę liści i dodatkowo na ich barwę.

Przeprowadzone doświadczenie przez Chen (1969) na skrzypie polnym (*Equisetum arvense* L.), pokazały, że optymalna dawka dla roślin akumulujących krzem wynosi 4080 mg/dm³, uzupełniane co 2 tygodnie. Przyczyną negatywnego wpływu na wzrost roślin mogła być zbyt wysoka

dawka krzemu, o czym w swojej pracy wspominał Sacała (2009). Krzem może modulować metabolizm roślin i zmieniać aktywność fizjologiczną, szczególnie u roślin poddanych stresowi. Jednak w niektórych roślinach zwiększona podaż krzemu nie poprawia wzrostu roślin (Sacała i in. 2009). Doniesiono, że zastosowanie Si poprawia wzrost i rozwój różnych roślin. Zhou (1995) obserwował ciała krzemionkowe w tkankach liści hybrydowych sadzonek *Phalaenopsis* hodowanych na pożywce Vacin i Went uzupełnionej CaSiO_3 . Dodatek CaSiO_3 również zwiększył długość liścia (Zhou 1995). Soares i in. (2013) podali, że dodanie $5,0 \text{ mg/dm}^3 \text{ K}_2\text{SiO}_3$ i $20,0 \text{ mg/dm}^3 \text{ Na}_2\text{SiO}_3$ do zmodyfikowanej pożywki Knudson C zwiększyło liczbę korzeni oraz długość części nadziemnej i korzenia sadzonek *C. loddigesii* (Soares i in. 2013).

Optymalne stężenie Si różni się w obrębie tego samego gatunku rośliny i / lub genotypu.

Przeprowadzone badania wykazały korzystne działanie Si w kulturach tkanek roślinnych. Potrzebne są jednak dalsze badania na wielu różnych gatunkach roślin, aby potwierdzić rolę Si w hodowli tkankowej roślin. Hodowla *in vitro* to przydatny system do badania fizjologicznych i biochemicznych funkcji Si w roślinach na poziomie molekularnym. Ponadto systemy hodowli zawieszinowych komórek *in vitro* dają możliwość badania roli Si na poziomie pojedynczej komórki.

5. Wnioski

- a) Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, iż stężenie zastosowanego roztworu krzemu miało negatywny wpływ na wzrost i liczbę pędów, liczbę i długość korzeni oraz świeżą i suchą masę roślin winogron.
- b) Dodatek krzemu nie poprawił wzrostu roślin oraz korzeni w porównaniu do próby kontrolnej.
- c) Dodatek 500 mg/dm^3 roztworu krzemu do pożywki WPM spowodował wystąpienie chlorozy u roślin winogron

6. Literatura

- Adatia MH, Besford RT (1986) The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. *Annals of Botany*, 58(3), 343-351.
- Chen CH, Lewin J (1969) Silicon as a nutrient element for *Equisetum arvense*. *Canadian Journal of Botany*, 47(1), 125-131.
- Datnoff LE, Rodrigues FA (2005) The role of silicon in suppressing rice diseases. *American Phytopathological Society*.
- Fortunato AA, da Silva W L (2014) Phenylpropanoid pathway is potentiated by silicon in the roots of banana plants during the infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*, 104(6), 597-603.
- Gawroński J, Żebrowska J, Kaczmarek E, i in. (2013) Analiza wzrostu i rozwoju siewek jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) w kulturze *in vitro*. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin*, 23(4): 1–10.
- Hasanuzzaman M, Hossain MA, Fujita M (2012) Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium-induced oxidative stress by upregulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Biological Trace Element Research*, 149(2), 248-261.
- Hu H, Liu H Q, Zhang H, Zhu J H, Yao X G, Zhang X B, Zheng K F (2010) Assessment of chlorophyll content based on image color analysis, comparison with SPAD-502. In 2010 2nd international conference on information engineering and computer science (pp. 1-3). IEEE.
- Kabir AH, Hossain MM, et al. (2016) Role of silicon counteracting cadmium toxicity in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in plant science*, 7, 1117.
- Kaplan M, Suszyna J (2015) Uprawa winorośli w Polsce DORADZTWO I EDUKACJA, 37.
- McCown, B.H. and Lloyd, G. (1981) Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience*, 16, 453-453.
- Nishimura K, Miyaki Y, Takahashi E (1989) On silicon, aluminium, and zinc accumulators discriminated from 147 species of Angiospermae. *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* 13323–43.

- Polak R (2008) Wpływ parametrów sublimacyjnego suszenia na zmianę współrzędnych barwy suszu z liści selera. *Acta Scientiarum Polonorum Technica Agraria* , 7(2-1): 9–18.
- Sacała E (2009) Role of silicon in plant resistance to water stress. *Journal of Elementology* 14(3): 619–630. DOI: 10.5601/jelem.2009.14.3.20.
- Samuels A L, Glass A D M, et al. (1991) Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. *Plant, Cell & Environment*, 14(5), 485-492.
- Soares J D R, Villa, F, Rodrigues F A, Pasqual M (2013) Concentrations of silicon and GA3 in in vitro propagation of orchids under natural light. *Scientia Agraria Paranaensis*, 12(4), 286-292.

13. Zastosowanie mleczka kokosowego i wody kokosowej w namnażaniu winogron (*Vitis vinifera* L.) w kulturach *in vitro*

Application coconut milk and coconut water in the multiplication of grapes (*Vitis vinifera* L.) in *in vitro* cultures

Weronika Bil⁽¹⁾, Monika Figiel-Kroczyńska⁽²⁾, Arleta Kruczek⁽²⁾, Marcelina Krupa- Małkiewicz⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin; Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽²⁾Katedra Ogrodnictwa, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Weronika Bil: weronika.bil@wp.pl

Słowa kluczowe: mleczko kokosowe, woda kokosowa, winogron, mikrorozmnażanie, *Vitis vinifera*

Key words: coconut milk, coconut water, grape, micromultiplication, *Vitis vinifera*

Streszczenie

Cytokiny stanowią jedną z głównych grup hormonów roślinnych. Stymulują one procesy anaboliczne, wzrost i podział komórek. Do naturalnie występujących cytokinin należy między innymi zeatyna. Zeatyna i jej pochodne występują w wielu ekstraktach roślinnych i są aktywnym składnikiem między innymi mleka kokosowego, który powoduje wzrost roślin. Celem pracy było wykorzystanie mleczka kokosowego i wody kokosowej, jako tańszej alternatywy dla drogiego hormonu wzrost, jakim jest zeatyna w namnażaniu winogron *in vitro*.

Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe winogronu (*Vitis vinifera* L.) otrzymane z ustabilizowanej, sterylnej kultury *in vitro*. W doświadczeniu zastosowano 5 kombinacje pożywek według składu makro- i mikroelementów WPM (Lloyd i McCown, 1981): WPM z dodatkiem 10 i 15% wody kokosowej, WPM z dodatkiem 10 i 15% mleczka kokosowego oraz WPM z zeatyną w stężeniu 0,1 mg/dm³. Kontrolę w doświadczeniu stanowiła pożywka WPM z zeatyną.

Dodatek 10% i 15% mleczka kokosowego do pożywki WPM wpływa pozytywnie na cechy morfologiczne winogron takie jak: wysokość roślin, świeża masa roślin, liczba liści.

Abstract

Cytokinins are one of the main groups of plant hormones. They stimulate anabolic processes, cell growth and division. Naturally occurring cytokinins include, inter alia, zeatin. Zeatin and its derivatives are found in many plant extracts and are an active ingredient of, among others, coconut milk, which causes plant growth. Hence, the aim of the study was to use coconut milk and coconut water as a cheaper alternative to the expensive growth hormone zeatin in the *in vitro* multiplication of grapes.

The research material was grape shoot explants (*Vitis vinifera* L.) obtained from a stabilized, sterile *in vitro* culture. In the experiment, 5 combinations of media were used according to the macro- and microelement composition of WPM (Lloyd and McCown, 1981); WPM with the addition of 10 and 15% coconut water, WPM with the addition of 10 and 15% coconut milk and WPM with zeatin at a concentration of 0.1 mg / dm³. The control in the experiment was WPM medium with zeatin.

It was found that the addition of 10% and 15% coconut milk to the WPM medium has a positive effect on the morphological features of the grapes, such as: plant height, fresh plant weight, number of leaves.

1. Wstęp

Winogrona były wykorzystywane od wieków. Popularność tych owoców sprawia, że są uprawiane na całym świecie. Większość udomowionych winogrona pochodzą z odmian z *Vitis vinifera*. Istnieje około 60 gatunków *Vitis*, które występują głównie w strefach umiarkowanych na półkuli północnej. Na przestrzeni ostatnich lat wzrasta zainteresowanie uprawą winorośli w polskich warunkach. Poszukuje się odmian, które posiadają odpowiednie walory użytkowe oraz zdrowotne.

Winogrona są spożywane w stanie świeżym, przetwarzane na wino, ocet lub sok lub suszone na rodzynki. Około 71% światowej produkcji winogron przeznacza się na wino, 27% na świeże owoce, a 2% na suszone owoce. Odmiany *Vitis vinifera* stanowią podstawę większości win produkowanych na całym świecie. W zależności od gatunku i odmiany owoce posiadają różne kształty, kolory, rozmiary i smaki.

Winogrona są cennym źródłem wielu fitoskładników, w tym intensywnie badanego składnika - resweratrolu. Skład fitochemiczny winogron różni się znacznie między różnymi odmianami.

Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że winogrona mają silne działanie przeciwtłeniające i przeciwproliferacyjne, hamujące proliferację komórek rakowych i hamują agregację płytek krwi, jednocześnie obniżając poziom cholesterolu. Winogrona zawierają fitochemikalia, takie jak kwasy fenolowe, stylbeny, antocyjany i proantocyjanidyny, z których wszystkie są silnymi przeciwtłeniaczami (Imran 2017; Pezzuto 2008).

Wykorzystanie hodowli *in vitro* do mikrorozmnażania roślin, jest jednym z najważniejszych praktycznych zastosowań roślinnych kultur *in vitro* (Szopa i Kostyń 2006).

Czynnikiem morfogenetycznym podczas wzrostu i rozwoju eksplantatów w prowadzonych kulturach jest m.in. odpowiedni dobór składu pożywki i regulatorów wzrostu (Ramage i Williams 2002). Procesy wzrostu i rozwoju roślin regulowane są przez niskocząsteczkowe endo- i egzogenne substancje zwane fitohormonami lub hormonami roślinnymi. Występują one powszechnie w roślinach, są aktywne biologicznie w bardzo małych ilościach. Regulatory wzrostu wpływającymi na efekt prowadzonej kultury (Bishop i in. 2015). Kierunek morfogenezy w kulturach *in vitro* uzależniony jest w dużym stopniu od rodzaju zastosowanych hormonów.

Cytokininy są regulatorami wzrostu niezbędnymi do zainicjowania merystemów pędowych w kulturach *in vitro*. Cytokininy zostały odkryte przez Skooga i współpracowników w 1955 r. (Miller i in. 1995). Cytokina i auksyna to dwa główne hormony wzrostu roślin, które kontrolują praktycznie wszystkie aspekty wzrostu i rozwoju roślin wyższych. Cytokininy są pochodnymi adeniny. Występują w młodych organach roślin, w których trwają intensywne podziały komórkowe, a ich biosynteza przebiega w korzeniach.

Cytokininy należą do jednej z najważniejszych i najbardziej znanych klas hormonów roślinnych. Cytokininy odgrywają ważną rolę w różnych aspektach wzrostu i rozwoju roślin, w tym w podziale komórek, różnicowaniu komórek, dominacji wierzchołkowej, rozwoju pędów, różnicowaniu plastydów indukcji ekspresji genów fotosyntezy i hamowaniu starzenia się liści czy też tworzeniu pędów z kalusa w hodowli. Cytokininy są szeroko stosowane w bioinżynierii i produkcji rolnej do hodowli kultur komórek roślinnych w bioreaktorach, czy też do przeprowadzania mikrorozmnażania roślin uprawnych (Romanov 2012).

W ogrodnictwie i rolnictwie stosuje się też syntetyczne cytokininy np. do przedłużania trwałości ciętych kwiatów.

Pierwszą wyizolowaną i zidentyfikowaną cytokininą naturalną była zeatyna. Zeatynę odkryto po raz pierwszy w 1964r. w niedojrzałych ziarnach kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays* L.), od której wzięła się jej nazwa (Peter 2012).

Zeatyna i jej pochodne występują w wielu ekstraktach roślinnych i są aktywnym składnikiem między innymi mleka kokosowego, który powoduje wzrost roślin. Zeatyna promuje wzrost bocznych pąków, a spryskany merystemami stymuluje podział komórek, aby uzyskać bardziej krzaczaste rośliny (David Mok 1994).

Mleko kokosowe to nieprzezroczysty, mleczno-biały płyn ekstrahowany z startego mięszu dojrzałych orzechów kokosowych, nieprzezroczystość i bogaty smak mleka kokosowego zawdzięczają wysokiej treści olejowej, z których większość stanowią tłuszcze nasycone. Mleko kokosowe jest tradycyjnie wytwarzane przez tarcie białego wewnętrznego mięszu dojrzałych orzechów kokosowych i mieszanie rozdrobnionego miazgi kokosowej z niewielką ilością gorącej wody w celu zawieszenia tłuszczu obecnego w startej miazdze. Proces tarcia można przeprowadzić ręcznie lub maszynowo (NIIR 2006; Janick 2008).

Woda kokosowa, płynne bielmo otrzymywane z niedojrzałych orzechów kokosowych, w swojej naturalnej postaci jest napojem orzeźwiającym i odżywcym. W dzisiejszych czasach woda

kokosowa jest coraz szerzej spożywana na całym świecie ze względu na jej korzystne właściwości zdrowotne. Ponadto, woda kokosowa ma również szerokie zastosowanie w hodowli tkanek roślinnych (Ang 2005). Choć skład odżywczy wody kokosowej został dobrze udokumentowany (Santoso 1996) dokładny skład czynników sprzyjających wzrostowi, które sprawiają, że woda kokosowa jest wydajną pożywką dla hodowli tkanek roślinnych, pozostaje w dużej mierze nieznany z powodu ograniczonej wiedzy na temat dokładnych typów i stężeń endogennych cytokinin, w tym nukleotydów cytokininowych.

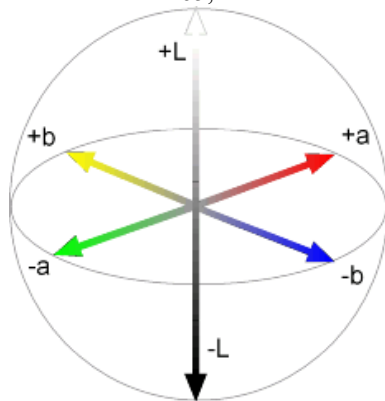
Celem badania było określenie, czy woda kokosowa lub mleczko kokosowe może stanowić alternatywę dla drogiego naturalnego hormonu wzrostu- zeatyny w namnażaniu winogron w kulturach *in vitro*.

2. Materiały i metody

Doświadczenie przeprowadzone zostało w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe winogronu (*Vitis vinifera* L.) otrzymane z ustabilizowanej, sterylnej kultury *in vitro*. W doświadczeniu zastosowano 5 kombinacje pożywek według składu makro- i mikroelementów WPM (Lloyd i McCown, 1981). Zastosowano pięć kombinacji pożywki: z dodatkiem 10 i 15% wody kokosowej, z dodatkiem 10 i 15% mleczka kokosowego oraz z zeatyną. Kontrolę w doświadczeniu stanowiła pożywka WPM z zeatyną w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$. Eksplantaty winogronu o długości ok. 2cm wykładano po cztery sztuki do słoików o pojemności 200 ml, uzupełnianych po 30 ml odpowiedniej dla danej grupy pożywki, a następnie próby inkubowano w fitotronie przez okres ok. 6 tygodni. Przygotowane pożywki poddano wcześniej procesowi autoklawowania przez 19 min w 121°C i ciśnieniu $0,1 \text{ MPa}$. Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach. Szczepienie eksplantatów przeprowadzano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza, w celu zapewnienia sterylnych warunków pracy. Tak przygotowane kultury inkubowano w fitotronie o temperaturze 21°C , 16 godzinnym oświetleniu ($40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Po 42 dniach od momentu wyłożenia eksplantatów, wykonano pomiary cech morfologicznych takich, jak wysokość roślin, masa korzeni, masa pędów oraz wierzchnia barwa liści.

Pomiary barwy oraz ich współrzędne oznaczono w międzynarodowym konwencjonalnym systemie kolorymetrycznym CIE $L^*a^*b^*$, gdzie: L^* określa barwę białą (100) i czarną (0), a^* określa barwę zieloną (-100) i czerwoną (+100), b^* określa barwę niebieską (-100) i żółtą (+100) (Rys. 1). Stosowano typ obserwatora 10° oraz iluminant D65, a średnica otworu pomiarowego wynosiła 3 mm.

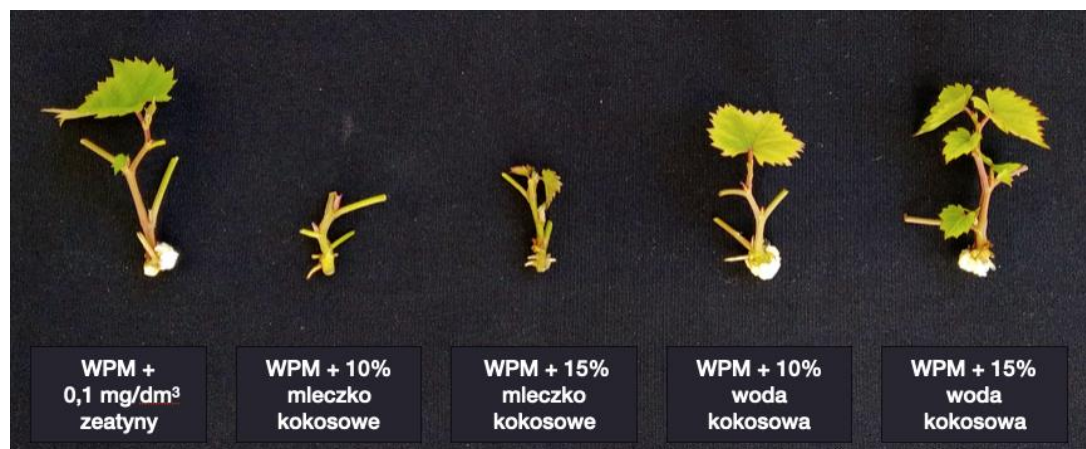


Rys. 1. Model barw CIE Lab.

Otrzymane wyniki badań opracowano statystycznie. Wykorzystano analizę wariancji dwuczynnikowej oraz test Tukey'a dla średnich. Różnice pomiędzy badanymi cechami szacowano na poziomie istotności $\alpha=0,01$ dla różnic wysoce istotnych i $\alpha=0,05$ dla różnic istotnych.

3. Wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników badań zaobserwowano, że dodatek mleczka kokosowego w stężeniu 10 i 15%, miał pozytywny wpływ na takie cechy morfologiczne jak: wysokość rośliny, długość i liczbę korzeni oraz masę rośliny (Tab. 1) oraz na parametry $L^*a^*b^*$ barwy liści winogronu w warunkach *in vitro* (Tab. 2).



Rys. 2. Eksplantaty pędowe winogron po 6 tygodniach wzrostu namnażane w kulturach *in vitro*.

Przeprowadzona analiza wariancji wyników wykazała, że rośliny winogron na pożywkach WPM z dodatkiem 15% mleczka kokosowego charakteryzowały się najdłuższymi pędami odpowiednio 3,19 cm, największą liczbą liści oraz najwyższą masą (0,16 g) w porównaniu do kontroli (Tab. 1) Natomiast długość pędów winogron na pożywce z dodatkiem 10% wody kokosowej była najkrótsza i wynosiła 1,38 cm. Takie same różnice statystyczne obserwowano w przypadku liczby korzeni na roślinie. Liczba korzeni winogron na pożywce z dodatkiem wody kokosowej i mleczka kokosowego nie różniła się statystycznie istotnie i była na poziomie kontroli. Winogron na pożywce z dodatkiem 15% mleczka kokosowego.

Tab. 1. Cechy morfologiczne winogronu w zależności od zastosowanej pożywki.

Rodzaj pożywki	wysokość rośliny (cm)	liczba pędów	długość korzeni (cm)	liczba korzeni	świeża masa (g)	liczba liści
WPM + 0,1mg/dm ³ zeatyny	2,13a	1,00a	0,81a	1,00a	0,12a	1,88a
WPM + woda kokosowa 10%	1,38a	1,00a	0,00a	0,00a	0,05b	1,63a
WPM + woda kokosowa 15%	1,69a	1,00a	0,00a	0,00a	0,04b	1,00a
WPM + mleczko kokosowe 10%	2,63b	1,00a	1,19a	0,75a	0,15a	1,63a
WPM + mleczko kokosowe 15%	3,19b	1,00a	0,69a	0,75a	0,16a	3,29b

*grupy jednorodne

Tab. 2. Parametry $L^*a^*b^*$ mierzone na wierzchu liści winogronu

Rodzaj pożywki	L^*	a^*	b^*
WPM + 0,1 mg/dm ³ zeatyny	43,91	-8,02	22,27
WPM + woda kokosowa 10%	53,55	2,18	33,94
WPM + woda kokosowa 15%	51,78	4,47	28,41
WPM + mleczko kokosowe 10%	48,62	-3,60	28,23
WPM + mleczko kokosowe 15%	48,01	-5,46	28,37

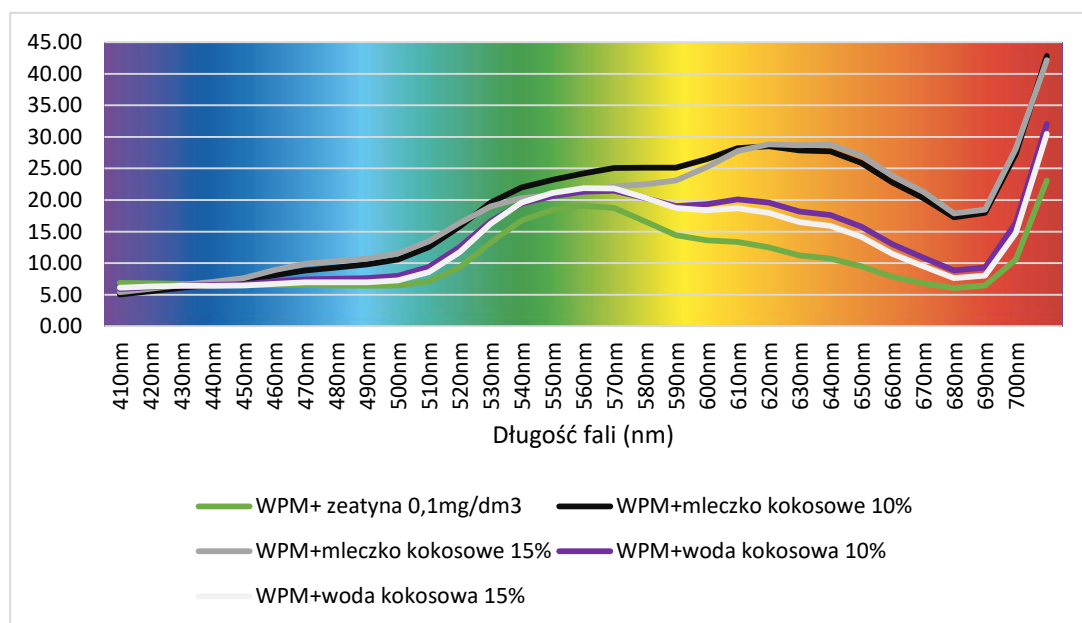
*grupy jednorodne

Wyniki pomiarów wykazały zmiany parametrów barwy. W systemie CIE $L^*a^*b^*$ zmniejszenie wartości L^* oznacza zmniejszenie ilości światła odbitego od badanego materiału, wynikiem czego jest jego pociemnienie (Rys.3).

Dodatek wody kokosowej do pożywki spowodował wzrost wartości parametru L^* . Wartości parametrów a^* i b^* , gdzie $-a^*$ barwa zielona, $+a^*$ barwa czerwona, $-b^*$ barwa niebieska, $+b^*$ barwa żółta, wskazują, że liście były w zakresie barw od zielonej i czerwonej do żółtej.

Analizując wyniki, stwierdzono zmianę barwy dla roślin na pożywkach WPM z dodatkiem 10 i 15% wody kokosowej. Rośliny te charakteryzowały się bardziej żółtym zabarwieniem liści i łodyg.

W przypadku barwy czerwonej zaobserwowano nieznaczne zmiany wybarwienia liści roślin z poszczególnych pożywek.



Rys. 3. Rozkład barwy w różnych kombinacjach pożywki.

4. Dyskusja

W literaturze wiele jest doniesień na temat pozytywnego wpływu mleczka kokosowego i wody kokosowej na cechy morfologiczne roślin. Najczęściej obserwowane działanie cytokinin na kultury roślinne *in vitro* to inicjacja merystemów pędowych, stymulacja kaulogenezy, zahamowanie

tworzenia korzeni, redukcja długości pędów i opóźnianie procesu starzenia. Fitohormony te są substancjami, które powodują odmłodzenie eksplantatów co ma ogromne znaczenie w przypadku rozmnażania starych, wartościowych drzew leśnych lub starych klonów roślin sadowniczych. Pierwszą reakcją na dodatek cytokininy do pożywki jest zwiększenie świeżej masy eksplantatów (Orlikowska 1997). Największy wzrost świeżej masy zaobserwowano w przypadku pożywki WPM z dodatkiem 15% mleczka kokosowego.

Wyniki otrzymane w doświadczeniu prowadzonym przez Ghazzawy (2019) na palmie daktylowej pokazują, że przy użyciu 30% mleka kokosowego uzyskano większą liczbę pędów w porównaniu do kontroli, a najdłuższe pędy odnotowano przy użyciu 10% mleczka kokosowego. W fazie ukorzeniania palmy daktylowej wykazano, że zastosowanie 30% mleka kokosowego zwiększyło liczbę korzeni, grubość pędów i procent ukorzeniania (Ghazzawy 2019).

Metody mikrorozmnażania kiwi (*Actinidia deliciosa* var. *Deliciosa*) została ulepszona przez dodatek 10% mleka kokosowego dodanego przed autoklawowaniem. Dodatek 10% mleka kokosowego znacząco podniósł wszystkie sześć parametrów pędów w ciągu 74 dni inkubacji. Liczba wytworzonych pojedynczych węzłów, długość pędów, długość ogonków i powierzchnia liści były w przybliżeniu podwojone (Boase 1993).

Do prawidłowego wzrostu roślin potrzebne są niezbędne składniki odżywcze, a bardzo często również dodatek regulatorów wzrostu i rozwoju. W przypadku mikrorozmnażania goździka (*Dianthus caryophyllus* L.) produkcja na dużą skalę nie była możliwa przy zastosowaniu dostępnych tradycyjnych pożywek (pożywki MS). Khatun (rok) po raz pierwszy wykazał wpływ wody kokosowej wraz z hormonem cytokininowym na efektywny wzrost goździka *in vitro*. Wykazano, że najwyższy procent indukcji pędów otrzymano po dodaniu do pożywki wody kokosowej w stężeniu 10% + BAP 1,0 mg/dm⁻³ (Khatun 2018).

Woda kokosowa jest znana jako substancja naturalna o wysokim poziomie zeatyny w swoim składzie, a w ostatnich latach stwierdzono zwiększone znaczenie jej zastosowaniu w mikrorozmnażaniu gatunków ważnych gospodarczo, takich jak kawa (Ismail i in. 2003) lub storczyki (Santos-Hernandez i in. 2005).

Przeprowadzone badania wykazują różnicę między dawkami wody kokosowej i mleczka kokosowego, a poprawą cech morfologicznych u roślin.

5. Wnioski

Stwierdzono, że dodatek 10% i 15% mleczka kokosowego do pożywki WPM wpływa pozytywnie na cechy morfologiczne winogron takie jak: wysokość roślin, świeża masa roślin, liczba liści.

W zależności od dawki wody kokosowej i mleczka kokosowego zaobserwowano różnice w poprawie cech morfologicznych u roślin.

Mleczko kokosowe może być stosowane jako niedroga alternatywa dla naturalnego hormonu wzrostu- zeatyny.

6. Bibliografia

- Ang SL, Yong JWA (2005) Protocol for in vitro germination and sustainable growth of two tropical mistletoes. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 80, 221–228
- Bishop G, Sakakibara MS, Yamaguchi S (2015) Biosynthesis of hormones. W: Buchanan BB, Gruissem W, Russell LJ *Biochemistry and molecular biology of plants*. Wiley Blackwell, UK: 769-833.
- Boase M R, Wright S I in. (1993) Coconut milk enhancement of axillary shoot growth in vitro of kiwifruit. *New Zealand journal of crop and horticultural science*, 21(2), 171-176.
- David W S Mok, Machteld C Mok (1994) *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press. P. 8. ISBN 0-8493-6252-0.
- Ghazzawy H S, El-Sharabasy S F (2019) Effect of natural additives as coconut milk on the shooting and rooting media of in vitro barhi date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Materials Research Proceedings*, 11, 186-192.

- Hall R M, Drew R A, Higgins C M I in. (2000) Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. *Australian Journal of Botany*, 48(5), 673-680.
- Imran M, Rauf A, Imran A , Nadeem M, Ahmad Z, Atif M I in. (2017) Health benefits of grapes polyphenols. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences* 10, 40-51.
- Ismail SARWAT et al. (2003) In vitro multiplication of *Coffea arabica*. *Pakistan Journal of Botany* 35.5: 829-834.
- Janick J, Paull RE (2008) *Cocos* in *The Encyclopedia of Fruit and Nuts*. pp. 109–113. Archived from the original on 18 May 2015. Retrieved 11 May 2015.
- Khatun M, Roy P K, et al. (2018) Additive effect of coconut water with various hormones on in vitro regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) *Journal of Animal and Plant Sciences*, 28(2), 589-596.
- Miller C O, Skoog F, Von Saltza M H et al. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1392-1392.
- NIIR Board of Consultants and Engineers (2006) *The Complete Book on Coconut & Coconut Products (Cultivation and Processing)*. Asia Pacific Business Press Inc. p. 274.
- Orlikowska T (1997) *Regulatory roślinne w kulturach in vitro*. W: Jankiewicz L.S. (red.). *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Zastosowanie w ogrodnictwie, rolnictwie, leśnictwie i w kulturach tkanek*. Tom II. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa: 219-233
- Peter V Minorsky (2012) *Reakcje roślin na sygnały wewnętrzne i zewnętrzne*. W: Neil Campbell, Jane Reece: *Biologia*. Poznań: Dom Wydawniczy „Rebis”, 2012, s. 829.
- Pezzuto J M (2008) Grapes and human health: a perspective. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(16), 6777-6784.
- Ramage C M, Williams R R (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 38: 116-124.
- Romanov G A (2012) *McGraw Hill Encyclopedia of Science & Technol.* 2012. V, 5, 205-207.
- Santos-Hernández L, Martínez-García M, Campos J E, et al. (2005) In vitro propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *HortScience*, 40(2), 439-442.
- Santoso U, Kubo K, Ota T, Tadokoro T, et al. (1996) Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food chemistry*, 57(2), 299-304.
- Szopa J, Kostyń K (2006) *Kultury komórkowe i rośliny transgeniczne w biotechnologii*. *Biotechnologia* 4: 7

14. Charakterystyka i możliwości aplikacyjne wierzbówki kiprzycy (*Epilobium angustifolium* L.)

Characteristics and possibility of application of willow herb (*Epilobium angustifolium* L.)

Karolina Ferysiuk, Karolina M. Wójciak

Katedra Technologii Surowców Pochodzenia Zwierzęcego, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Karolina Wójciak, prof. uczelni badawczo-dydaktyczny

Karolina Ferysiuk: karolinaferysiuk@10g.pl

Słowa kluczowe: oenoteina B, polifenole, ekstrakty ziołowe, wyroby mięsne

Streszczenie

Wierzbówka kiprzyca (*Epilobium angustifolium*) jest wytrzymałą rośliną zielną należącą do rodzaju *Epilobium*. W medycynie jest stosowana przy dolegliwościach związanych z układem moczowym, wykazuje również właściwości antykancerogenne w stosunku do komórek nowotworowych gruczołu prostaty. Ponadto, ekstrakty pozyskane z zioła wierzbówki cechują się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym oraz inhibitującym wzrost bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Pomimo tego, wykorzystanie wierzbówki kiprzycy jako potencjalnego, wielofunkcyjnego dodatku do wyrobów mięsnych nie stało się popularnym kierunkiem badań.

1. Wstęp

1.1 Procesy oksydacyjne

Mięso i wyroby mięsne są szczególnie podatne na procesy oksydacyjne ze względu na wysoką zawartość białka, kwasów tłuszczowych oraz barwników hemowych (Fałowo i in. 2014). Proces ten prowadzi do spadku jakości produktów na skutek pojawienia się negatywnych zmian w wartości odżywczej oraz wyróżnikach sensorycznych (Ribeiro i in. 2019).

Peroksydacja lipidów składa się z trzech etapów: inicjacji (powstały tlen singletowy usuwa atom wodoru z węglanu metylenowego łańcucha nienasyconych kwasów tłuszczowych, prowadząc do powstania wolnych rodników), propagacji (wolne rodniki wchodzą w dalsze reakcje z tlenem i kwasami tłuszczowymi, prowadząc do utworzenia wodoronadtlenków i rodników nadtlenkowych) oraz terminacji (powstają trwałe produkty końcowe łańcuchowej reakcji propagacji tj. aldehydy, ketony, alkohole itd.) (Ribeiro i in. 2019).

Reaktywne formy tlenu/wolne rodniki tlenowe (z ang. *reactive oxygen species* – ROS), mogą powodować stres oksydacyjny, który z kolei może prowadzić do różnego rodzaju chorób przewlekłych (chorób wieńcowych serca, nowotworów, osteoporozy i in.) (Nimse i Pal 2015). Stan stresu oksydacyjnego jest bardzo często powiązany z brakiem równowagi pomiędzy generowaniem wolnych rodników a ich neutralizacją (Fałowo i in. 2014; Sindhi i in. 2013). Wolne rodniki natomiast to związki cechujące się wysoką niestabilnością, która powiązana jest z brakiem sparowanego elektronu na ostatniej powłoce (Sindhi i in. 2013). Jednym z bardzo reaktywnych wolnych rodników jest rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) który może doprowadzić do negatywnych modyfikacji molekuł proteinowych, lipidowych oraz uszkodzenia DNA (Nimse i Pal 2015). Wolne rodniki zatem nie tylko wykazują negatywny wpływ na żywność per se ale również na organizm człowieka.

Oksydacja białek prowadzi do negatywnych, nieodwracalnych zmian w łańcuchu aminokwasowym co w efekcie prowadzi do zmniejszenia dostępności oraz aktywności metabolicznej tych związków. Reakcji utleniania ulegają również barwniki. Powstanie metmioglobiny powoduje odbarwienie mięsa oraz jego wyrobów. Warto również wspomnieć o tym, że sama mioglobina może wykazywać działanie prooksydacyjne (Zhang i in. 2013).

Oksydacja tłuszczów prowadzi do degradacji niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz negatywnych zmian w jakości sensorycznej produktu tj. powstanie zjełczałego

zapachu oraz smaku. Ponadto, podczas reakcji utleniania lipidów dochodzi do powstania szeregu negatywnych dla zdrowia człowieka związków m. in. wodoronadtlenków lipidów, które mogą wykazywać działania cytotoksyczne w stosunku do komórek (Domínguez i in. 2019). Jednym z wtórnych produktów utleniania lipidów jest dialdehyd malonowy – związek wykazujący właściwości toksyczne względem komórek (Ribeiro i in. 2019). Również oksydacja cholesterolu prowadzi do zwiększenia jego aktywności mutagennej i ryzyka zachorowania na chorobę wieńcową (Domínguez i in. 2019). Co więcej, produkty utleniania lipidów oraz białek wchodzą w interakcje – szczególnie wtórne produkty oksydacji lipidów wykazują niszczące działanie w stosunku do aminokwasów (Zhang i in. 2013).

1.2 Trwałość mikrobiologiczna mięsa i jego wyrobów

Uważa się, że zarówno mięso jak i jego wyroby stanowią doskonałą pożywkę dla wzrostu mikroorganizmów saprofitycznych i patogennych. Do najczęściej występujących w mięsie i produktach mięsnych rodzajów bakterii zaliczyć można: *Escherichia*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Lactobacillus*, pleśni: *Sporotrichum*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Cladosporium*, drożdży: *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. (Dave i Ghaly 2011).

Aktywność metaboliczna drobnoustrojów powoduje znaczne obniżenie jakości sensorycznej żywności – wytwarzane przez bakterie metylosiarczek, siarkowodor czy kadaweryna i putrescyna przyczyniają się do powstanie nieprzyjemnego smaku oraz zapachu (siarkowy, gnilny) (Dave i Ghaly 2011). Ponadto, spożycie wyrobów mięsnych zanieczyszczonych mikroorganizmami patogennymi może powodować poważne problemy zdrowotne, w niektórych przypadkach zakończone śmiercią (Jayasena i Jo 2013).

1.3 Działania na przyszłość

W celu przeciwdziałania w/w procesom wykorzystuje się substancje zwane przeciwutleniaczami (Ribeiro i in 2019). Obecność antyoksydantów w niskich stężeniach jest w stanie hamować utlenianie lipidów, protein i węglowodanów (Sindhi i in 2013). Substancje o działaniu antyoksydacyjnym mogą być dodawane do pasz dla zwierząt lub w czasie produkcji wyrobu mięsnego. Co ciekawe, dodatek antyoksydantów do wyrobu w zbyt wysokich ilościach może prowadzić do odwrotnego skutku – antyoksydant zacznie działać jako prooksydant (Falowo i in 2014).

W przypadku mikroorganizmów, metody prewencyjne polegają na przechowywaniu surowego mięsa/wyrobów mięsnych w niskich temperaturach (chłodzenie, mrożenie) bądź na wykorzystywaniu odpowiednich metod pakowania produktów, dodatku substancji osmoaktywnych, dodatku azotanów lub zastosowaniu odpowiedniej obróbki termicznej (Dave i Ghaly 2011; Jayasena i Jo 2013; Negi 2012).

Zastosowanie przeciwutleniaczy syntetycznych (BHT, BHA czy azotanów) niesie ze sobą kontrowersję w postaci negatywnego oddziaływania (uszkodzenia DNA, nowotwory) na zdrowie konsumenta. Stąd wzrastające zainteresowanie substancjami pochodzenia roślinnego, które wykazują zarówno działanie antyoksydacyjne jak i bakteriobójcze (Ribeiro i in. 2019; Falowo i in. 2014; Negi 2012).

2. Opis zagadnienia

Jak zostało przedstawione powyżej, oksydacja wyrobów mięsnych jest negatywnym zjawiskiem prowadzącym do pogorszenia cech odżywczych oraz sensorycznych wyrobów mięsnych; z kolei dodatek antyoksydantów pochodzenia chemicznego, które mają przeciwdziałać temu procesowi jest tematem wysoce dyskusyjnym.

Z tego powodu zainteresowanie wielu ośrodków naukowych, zostało skierowane w stronę źródła metabolitów wtórnych (polifenoli), które nie tylko wykazują działanie antyoksydacyjne ale również bakteriostatyczne, barwotwórcze czy prozdrowotne.

Jedną z roślin prezentującą silne właściwości antyoksydacyjne oraz antybakteryjne i prozdrowotne jest, należąca do rodzaju *Epilobium*, wierzbówka kiprzyca (*E. angustifolium*).

Charakterystyka wierzbówki oraz opis właściwości antyoksydacyjnych, bakteriostatycznych, prozdrowotnych wraz z możliwością aplikacji rośliny w produkcji wyrobów mięsnych zostały przedstawione w dalszych rozdziałach.

3. Przegląd literatury

3.1 Epilobium angustifolium

Wierzbówka kiprzyca (*E. angustifolium* L.) zakwalifikowana jest do liczącej 22 rodzajów i ponad 650 gatunków rodziny *Onagraceae*. Spośród 200 gatunków należących do rodzaju *Epilobium* na terenie Polski występuje 14 (m. in. wierzbownica błotna, wierzbownica górska, wierzbownica okółkowa czy też wierzbownica wzgórzowa czy wierzbówka kiprzyca) (Kujawski i in. 2010). Sama nazwa rodzaju odnosi się do usytuowania kwiatów tych roślin (z gr. *epi* – na, *lobos* – pod). Ze względu na to, iż liście ziół z rodzaju *Epilobium* przypominają liście wierzy (z ang. *willow*) taka nomenklatura została przyjęta w nazewnictwie anglojęzycznym (Kujawski i in. 2010).

W Polsce zioło jest znane pod nazwą wierzbówka kiprzyca, w Stanach Zjednoczonych jako „fireweed”, w Wielkiej Brytanii jako „rosebay willowherb” a także jako zioło de St. Anotine (Francja), Weidenroesen, Antoniuskraut i Feuerkraut (Niemcy) (Granica i in. 2014).

Wierzbówka jest kwitnącą, od czerwca do września, wieloletnią rośliną zielną; kwiaty o barwie różowej rozwija w duże groniaste kwiatostany; może dorastać do 3 m wysokości (Kadam i in. 2018). Roślina występuje powszechnie w strefie umiarkowanej Ameryki Północnej i Eurazji, zajmuje siedliska wylesione bądź nawet spalone ale rośnie również na skalistych zboczach, górskich łąkach, skrajach lasów – wykazuje dużą tolerancję względem warunków środowiskowych (Adamczak i in. 2019).

Wierzbówka kiprzyca znalazła swe miejsce również w medycynie ludowej do leczenia chorób wątroby, żołądka oraz nerek, zapalenia gruczołu krokowego i, ogólnie, dróg moczowych. Stosowano ją również zewnętrznie jako środek antyseptyczny. W XIX wieku *E. angustifolium* znalazło zastosowanie jako herbata – napar zwany był herbatą Ivan bądź herbatą Koporye (Adamczak i in. 2019). Części naziemne rośliny oraz korzeń są wykorzystywane jako surowiec zielarski (Kujawski i in. 2010).

Zioło zawiera ponad 250 różnych klas metabolitów: flawonoidów (kwercetynę, kaempferol, myricetynę), z czego dominującym komponentem jest kwercetyno-3-O-glukuronian, kwasy fenolowe (m. in. kwas elagowy, galusowy, kawowy) oraz znaczne ilości elagitanin (stanowią one nawet do 15% suchej masy rośliny). Oenoteina B stanowi dominujący związek spośród elagitanin i jest odpowiedzialna za szereg bioaktywnych właściwości wierzbówki (Adamczak i in. 2019; Kadam i in. 2018). Ponadto, Tóth i in. (2009) wskazuje, że wierzbówka kiprzyca zawiera glukuronid kwercetyny i kemferolu, nieobecne u innych gatunków. Odnotowano również, iż w zależności od fazy rozwoju rośliny zawartość związków polifenolowych ulega zmianie – największe ilości polifenoli zostały zaobserwowane w fazie masowego kwitnienia rośliny (Adamczak i in. 2019). Bardziej szczegółowy opis składu polifenolowego zioła przedstawiono w Tab. 1.

3.2 Właściwości antyoksydacyjne

Doskonałym źródłem substancji o działaniu przeciwutleniającym są drugorzędowe metabolity roślinne – związki polifenolowe (flawonoidy, kwasy fenolowe, garbniki diterpenowe i in.) (Falowo i in. 2014). Substancje przeciwutleniające (antyoksydanty) posiadają zdolność wygaszania bądź hamowania negatywnych reakcji powodowanych przez wolne rodniki (Nimse i Pal 2015). Działanie antyoksydacyjne opiera się na mechanizmach: zakończenia powstawania wolnych rodników na etapie propagacji poprzez oddanie elektronu przez substancję o działaniu przeciwutleniającym, usunięciu inicjatorów wolnych rodników bądź poprzez reakcję chelatowania metali (Fe, Cu) (Falowo i in. 2014).

Onar i in. (2012) przeprowadzili doświadczenie sprawdzające aktywność wodnych ekstraktów z liści wierzbówki jako inhibitora elastazy, lipooksygenazy oraz tyrozynazy. Elastaza powoduje rozkład elastyny – białko odpowiedzialną za odbudowę oraz uelastycznianie skóry; zawartość tego enzymu wzrasta wraz z wiekiem, co powoduje zwiotczenie tkanki. Degradując białko elastaza przyczynia się również do rozedmy płuc oraz reumatoidalnego zapalenia stawów.

Tyrozyna natomiast powoduje brązowienie warzyw oraz owoców a lipooksygenaza jest enzymem powiązanym z negatywnym wzrostem komórek nowotworowych oraz przedłużaniem ich przeżywalności. Naukowcy odnotowali wzrastającą procentową zdolność inhibitującą ekstraktów odnoszącą się do wszystkich trzech enzymów; zdolność inhibitująca wzrastała wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów (Onar i in. 2012). Autorzy odnotowali inhibitujące działanie ekstraktów w stosunku do hialuronidazy, co jest powiązane z obecnością oenoteiny B (Kiss i in. 2011).

Przeprowadzono również doświadczenia sprawdzające właściwości antyoksydacyjne (redukcja żelaza, ABTS*, DPPH) – ekstrakty wykazały zdolność redukcji jonu Fe^{3+} – reakcja ta wskazuje na zdolności ekstraktów do wygaszania (np. wolnych rodników) poprzez transfer elektronu (Onar i in. 2012; Shikov i in. 2006).

Natomiast Ruszová i in. (2013) sprawdzili całkowity reaktywny potencjał antyoksydacyjny 1,3-butanodiolowego ekstraktu z wierzbówki koprzyicy wobec rodnika nadtlennowego wytwarzanego w wyniku termicznego rozkładu dichlorowodoru 2,2'-azobis(2-amidynopropanu) – metoda ABAP. W porównaniu do Trolox'u (ok. 8000 $\mu\text{mol/ml}$) oraz galusanu sodu (ok. 5000 $\mu\text{mol/ml}$), ekstrakt wykazał znacznie niższy potencjał antyoksydacyjny (ok. 2000 $\mu\text{mol/ml}$). Autorzy odnotowali, iż silniejszą wartość antyoksydacyjną uzyskali wykorzystując rodnik ABTS.

Ekstrakty wykazały silne zdolności inhibicji rodnika hydroksylowego (dla stężenia 100 mg/ml – 15,60%) oraz anionu ponadtlenkowego (39,32%). W pierwszym przypadku próbą odniesienia był kwas askorbinowy (cechował się słabszym działaniem w porównaniu do ekstraktów) w drugim – Trolox (dopiero w koncentracji 100 mg/ml cechował się znacznie silniejszymi właściwościami niż ekstrakty – 74,36%). Wodne ekstrakty wykazały również zdolność do inhibicji wolnych rodników (met. ABTS*, DPPH) która była skorelowana z obecnością związków fenolowych (Onar i in. 2012). Ponadto, ekstrakty wykazują również zdolność chelatowania jonów żelaza (Shikov i in. 2006).

Tab. 1. Skład fitochemiczny wierzbówki koprzyicy (wg Adamczak i in. 2019).

KLASA POLIFENOLU	KOMPONENTY
Flawonoidy	kemferol, eter 8-O-metylowy kemferol, kemferol-3-O-arabinozyd, kemferol-3-O-ramnozyd, kemferol-3-O-glukozyd, kemferol-7-O-piomasarologlukozyd, mirycetyna, mirycetyna-3-O-arabinozyd, mirycetyna-3-O-glukuronid, mirycetyna-3-O-heksozyd, mirycetyna-3-O-galaktozyd, mirycetyna-7-O-glukozyd, kwercetyna, kwercetyna-3-O-glukozyd, kwercetyna-3-opheksoid, kwercetyna-7-O-ramnozyd, kwercetyna-3-O-arabinozyd, kwercetyna-3-O-galaktozyd, kwercetyna kufoiloheksoid, kwercetyna-3-O-rutynozyd (rutyna)
Taniny ulegające hydrolizie	oenoteina A i B, utleniona pochodna oenoteiny A, 1,6-di-O-galoiloglukoza, 1,2,6-tri-O-galoiloglukoza, 1,4,6-tri-O-galoiloglukoza,
Steroidy	kampesterol, stigmasterol, cholesterol, β -sitosterol, β -sitosterol glukozyd, β -sitosterol (6"-O-acetylo)-glukozyd,
Kwasy fenolowe i ich pochodne	kwas benzoowy, kwas 4-glukozyloksy-3-hydroksybenzoowy, p-hydroksybenzaldehyd, kwas 3-hydroksy-4-metoksybenzoowy, kwas 3,4-dihydroksybenzoowy (kwas protokatechowy), ester metylowy kwasu protokatechowego, metyl p-hydroksybenzen octan
Inne	kwas L-askorbinowy, ester metylowy kwasu hematynowego, seryna, treonina, kwas abscysynowy, 2-hydroksybenzotiazol, alkohol cerylowy, choalina, kopatyna B, piroglutaminian n-butyłu

3.3 Właściwości antybakteryjne

Działanie antybakteryjne antyoksydantów pochodzenia roślinnego związane jest głównie z uszkodzeniem błony komórki bakteryjnej, co prowadzi w efekcie do obniżenia turgoru komórki. Co

ciekawe, poszczególne rodzaje związków polifenolowych wykazują różne działanie: fenole i flawonoidy wykazują działanie chelatujące metale, fenole i terpenoidy powodując uszkodzenie błony komórkowej. Roślinne antyoksydanty mogą również zaburzać pracę enzymów metabolicznych. Jednakże dokładny mechanizm działania polifenoli na komórki bakteryjne nie jest do końca poznany (Negi 2012).

Jak zostało wspomniane wcześniej, skład chemiczny rośliny ulega zmianie w zależności od fazy kwitnienia. Również poszczególne części roślin mogą zawierać różną koncentrację składników bioaktywnych.

Kosaec i in. (2013) przetestowali inhibitujące działanie etanolowych ekstraktów pozyskanych z liści oraz kwiatów wierzbówki kiprzycy w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Doświadczenie wykazało silne właściwości inhibitujące obydwu ekstraktów zarówno przy stężeniu 73 mg/ml jak i przy zastosowaniu minimalnego stężenia inhibitującego. Jedynie drożdże (m. in. *Candida albicans*, *C. dubliniensis*) okazały się być odporne na zastosowane ekstrakty (stężenie 73 mg/ml). Autorzy przetestowali również działanie różnych stężeń (3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml) ekstraktu wierzbówki w stosunku do żywotności drożdży *C. albicans*. Odnotowano iż zastosowanie niższych stężeń pozwoliło uzyskać podobne efekty redukcji żywotności komórek, niezależnie od zastosowanego źródła ekstraktu (tj. kwiat lub liść). Różnice zostały zauważone przy stężeniu najwyższym – ekstrakt z liści powodował istotnie wyższą redukcję komórek bakterii w porównaniu do ekstraktu z kwiatu.

Porównano również inhibitujące działanie ekstraktów pozyskanych z pięciu gatunków należących do rodzaju *Epilobium*: *E. angustifolium* L., *E. rosmarinifolium*, *E. palustre* L., *E. tetragonum* L. oraz *E. hirsutum* L. na wzrost wybranych bakterii patogennych. Autorzy zauważyli, że wszystkie etanolowe ekstrakty wykazały działanie bakteriostatyczne zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*) jak i Gram-ujemnych (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. flexneri*). Działanie inhibitujące wzrost drożdży wykazały przede wszystkim ekstrakty pozyskane z *E. angustifolium* i *E. hirsutum*. (Battinelli i in. 2001).

Güven i in. (2020) oceniali właściwości bakteriostatyczne ekstraktów wodnych, etanolowych, metanolowych i heksanowych 10 roślin zielnych (m. in. wierzbówki kiprzycy, szakłaku pospolitego czy strączyńca wąskolistnego). W badaniu wykorzystano cztery szczepy bakteryjne: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* oraz *K. pneumoniae*; wprowadzona ilość rozcieńczonego ekstraktu wynosiła 20 µl. Doświadczenie wykazało, iż, w przypadku wierzbówki, najefektywniejszym ekstraktem okazał się ekstrakt metanolowy, następnie heksanowy i etanolowy. *E. angustifolium* wykazała silne właściwości inhibitujące w stosunku do *S. aureus*, *K. pneumoniae* oraz *P. aeruginosa*.

Ferrante i in. (2020) przetestowali wpływ wodnych ekstraktów pozyskanych z pięciu ziół tradycyjnie wykorzystywanych w schorzeniach związanych z układem moczowym. Właściwości inhibitujące ekstraktów zostały zbadane w stosunku do drożdży (m. in. *C. tropicalis*, *C. albicans*), bakterii chorobotwórczych (m. in. *E. coli*, *B. cereus*, *S. typhi*), dermatofitów (m. in. *A. crocatum*, *T. rubrum*). Badanie pozwoliło odnotować, iż *E. angustifolium*, ze względu na swój bogaty skład polifenolowy (szczególnie wysokie zawartości kwasu galusowego i katechin), wykazuje silne właściwości inhibitujące w stosunku do większości drobnoustrojów (szczególnie wysoką skuteczność wykazało wobec dermatofitów i drożdży). Jednakże minimalne stężenie inhibitujące potrzebne do inaktywacji *E. coli* czy *S. typhi* było znacznie wyższe w porównaniu do pozostałych roślin.

3.4 Właściwości prozdrowotne

Tradycyjne wykorzystanie roślin z rodzaju *Epilobium* jest powiązane z leczeniem dolegliwości związanych z układem moczowym. Pierwsze doświadczenia powiązane z testowaniem zdolności inhibitujących ekstraktów z roślin z rodzaju *Epilobium* powstały w latach 90-tych. Testy *in vitro* wykazały większą skuteczność wodnych ekstraktów z *E. parviflorum* w inhibtowaniu enzymów biorących udział w rozwoju łagodnego przerostu prostaty (z ang. *benign prostate hyperplasia* – BPH). Prawdopodobnie wtedy doszło do identyfikacji enoteiny B jako składnika biologicznie czynnego. Późniejsze doświadczenia wskazywały na antyproliferacyjne zdolności ekstraktów z *E. angustifolium* (ale również innych ziół z rodziny *Epilobium*) w stosunku do komórek nowotworowych

(Granica i in., 2014). Uważa się, że aktywacja szlaku mitochondrialnego jest czynnikiem wpływającym na apoptozę komórek nowotworowych gruczołu prostaty (Ostrowska i in. 2017).

Elagotanniny są estrami kwasu heksahydroksydifenowego i monosacharydów; związki te są zaliczane do nutraceutyków – prezentują bowiem różną aktywność biologiczną tj. przeciwzapalną, antibakteryjną, antyoksydacyjną, przeciwmiażdżycową oraz antykancerogenną. Uważa się, że elagotanniny mogą przyczynić się do spowolnienia procesów kancerogenezy. Żywnością szczególnie bogatą w te substancje są przede wszystkim owoce granatu (Lipińska i in. 2014).

Elagotanniny nie ulegają degradacji w obecności enzymów żołądkowych oraz niskiego pH (1,8 – 2,0) a ich metabolizm poprzez ludzką mikrobiotę prowadzi do powstania urolityn, które są włączane do krążenia wątrobowo-jelitowego (Lipińska i in. 2014). Urolityny (pochodne dibenzopiran-6-onu) są wytwarzane przez mikroflorę jelitową z kwasu elagowego; wykazują działanie antyoksydacyjne oraz zdolność do łagodzenia stanów zapalnych fibroblastów okrężnicy. Uważa się również, iż urolityna posiada właściwości antykancerogenne – szczególnie w stosunku do komórek nowotworowych jelita grubego (badania *in vitro*) (Espín i in. 2013).

Stolarczyk i in. (2013) zwraca uwagę, iż podczas inkubacji ekstraktu (*E. hirsutum*) przy pomocy ludzkiej mikrobioty występującej w jelitach, odnotowano obecność urolityny A, B i C (oenoteina B została zmetabolizowana do urolityn).

Ponadto, w swoim doświadczeniu, Stolarczyk i in. (2013) przetestowali właściwości antykancerogenne ekstraktów etylenowych oraz wodnych roślin z rodzaju *Epilobium*. Wodne ekstrakty wykazały silniejsze zdolności zapobieganiu proliferacji nowotworowych komórek prostaty w porównaniu do ekstraktów etylowych. Autorzy porównali ekstrakty pochodzące z trzech ziół z rodzaju *Epilobium*: *E. angustifolium*, *E. hirsutum* i *E. parviflorum*. Ekstrakty z dwóch ostatnich ziół wykazały najsilniejsze oddziaływanie. Naukowcy sprawdzili również działanie poszczególnych, charakterystycznych komponentów ekstrahowanych z wierzbówki – oenoteina B wykazała najwyższą zdolność przeciwko proliferacji komórek ($IC_{50} = 7,8 \mu M$; dla porównania ekstrakty: 44,6, 37,3, 32,2 μM); kwercetyno-3-O-glukuronid okazała się nieaktywna.

Natomiast zastosowany etanolowy ekstrakt wskazał właściwości genotoksyczne w stosunku do ludzkich linii komórek raka wątrobowo-komórkowego HepG2; efekt był szczególnie widoczny przy zastosowaniu najwyższych stężeń ekstraktu tj. 50 oraz 75 $\mu g/ml$ (Ostrowska i in. 2017).

Przeprowadzono również doświadczenie związane z określeniem mechanizmu działania wodnego wyciągu z wierzbówki kypczy na ekspresję mRNA receptorów estrogenowych α i β w brzusznej płacie gruczołu krokowego szczurów (*in vivo*) (Kujawski i in. 2010). Negatywne zmiany związane z ekspresją receptorów mogą powodować pojawienie się chorób nowotworowych. Autorzy wskazują, że rośliny zawierające związki polifenolowe z grupy lignanów, flawonów, izoflawonów, mogą stać się alternatywą dla leków z grupy SERM (z ang. *selective estrogen receptor modulators*) stosowanych w terapii estrogenowej. Autorzy odnotowali różny wpływ wyciągów na ekspresji mRNA, odnotowano zwiększenie ekspresji głównie receptora ER α . Jednakże Kujawski i in. (2010) zwraca uwagę, iż może to dowodzić podwójnego wpływu wyciągu z wierzbówki kypczy: z jednej strony widoczne są efekty terapeutyczne z drugiej zaś, istnieje zagrożenie negatywnego wpływu podczas leczenia zaburzeń estrogenozależnych.

Sprawdzono również ewentualną toksyczność ekstraktów z *E. angustifolium*. Wodne ekstrakty nie wykazały toksycznego działania na ludzkie komórki fibroblastów (nawet przy stężeniu 50 $\mu g/ml$) (Kiss i in. 2011). Battinelli i in. (2001) sprawdzili natomiast działanie cytotoksyczne ekstraktów etanolowych wobec solowców (*A. salina*) przy zastosowaniu pięciu różnych stężeń. Nie odnotowano działania toksycznego ekstraktu przy jego maksymalnej koncentracji tj. 325 $\mu g/ml$ (w odniesieniu do ekstraktu suchego).

3.5 Zastosowanie wierzbówki kypczy w technologii żywności

Pomimo tego, iż zawarte w wierzbówce kypczy związki polifenolowe – a w szczególności oenoteina B – wykazują działanie prozdrowotne oraz antyoksydacyjne, zioło to nie znalazło szerokiego zastosowania w przetwórstwie mięsnym. Na chwilę obecną istnieją dwa opracowania dot. wykorzystania ekstraktów z *E. angustifolium* w wyrobach mięsnych.

Pierwszy eksperyment przeprowadzony przez Rey i in. (2005) dotyczył sprawdzenia zdolności antyoksydacyjnych w pasztecikach wieprzowych fortifikowanych dodatkiem ekstraktów pochodzących z wierzbowki kiprzycy, maliny moroszki (*Rubus chamaemorus*) oraz buraka (*Beta vulgaris* „Vulgaris”). Liofilizowane ekstrakty dodano w ilościach 100 oraz 500 mg/kg; w takiej samej ilości dodano roztwory zawierające kwercetynę, rutynę oraz kwas kawowy; próbę kontrolną stanowił wyrób bez żadnych dodatków. Zawartość drugorzędowych produktów oksydacji została zbadana po 3 dniach przechowywania natomiast zawartość heksanal – po 6 dniach. Doświadczenie wykazało, że dodatek ekstraktów w wyższej ilości przyczynił się znacząco do obniżenia wartości badanych parametrów (dotyczyło to ekstraktów z wierzbowki i buraka); ekstrakt z maliny moroszki okazał się skuteczny w obydwu dawkach. Niemniej jednak autorzy zauważyli, iż próba zawierająca ekstrakt z *E. angustifolium* w ilości 500 mg/kg pozwalała inhibować procesy oksydacyjne na zbliżonym poziomie jak wyrób z dodatkiem *R. chamaemorus* czy kwercetyny.

Natomiast drugie doświadczenie, stworzone przez Cando i in. (2014) dotyczyło zbadania wpływu różnych ilości ekstraktów z wierzbowki kiprzycy (50, 200, 800 ppm wyr. jako ekwiwalent kwasu galusowego) na stabilizację barwy oraz oksydację lipidów i białka pasztecików wieprzowych podczas 11 dni chłodniczego przechowywania. Próby odniesienia stanowiły wyroby bez żadnych dodatków oraz z dodatkiem 100 ppm kwasu galusowego. Doświadczenie wskazało, iż najniższa koncentracja ziołowego ekstraktu pozwoliła na utrzymanie wartości parametru TBARS na bardzo niskim poziomie – porównywalnym z próbą zawierającą kwas galusowy. W przypadku oceny zawartości grup karbonylowych, dodatek wierzbowki kiprzycy wykazał działanie prooksydacyjne; było ono szczególnie widoczne w próbach z dodatkiem 800 ppm ekstraktu. Podobne spostrzeżenia zostały sformułowane po analizie barwy metodą odbiciową. Na początku przechowywania produkt fortifikowany najwyższą ilością ekstraktu cechował się najwyższą intensywnością barwy czerwonej; wraz z upływem czasu, obserwowano odbarwienie. Zmniejszenie udziału parametru a* nastąpiło we wszystkich próbach z dodatkiem wierzbowki, jednakże szczególnie widoczne było w wyrobie z dodatkiem 800 ppm ekstraktu.

4. Podsumowanie

Ektrakty z wierzbowki kiprzycy cechują się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Dzięki zdolności do neutralizacji wolnych rodników oraz chelatowania metali z powodzeniem mogłyby znaleźć swoje miejsce jako przeciwutleniacz, podobnie jak ekstrakt z rozmarynu, dodawany do wyrobów mięsnych. Ponadto występujący w ziele składnik – oenoteina B – wykazuje szereg właściwości prozdrowotnych (przede wszystkim antykancerogennych). Istotne jest również, że ekstrakty nie wykazują cech toksycznych. Niestety, pomimo bardzo dobrych właściwości, *E. angustifolium* nie znalazło jak dotąd szerszego zastosowania w produkcji żywności.

5. Literatura

- Adamczak A, Dreger M, Seidler-Łożykowska K, Wielgus K (2019) Fireweed (*Epilobium angustifolium* L.): botany, phytochemistry and traditional uses. A review. *Herba Polonica Journal* 65(3): 51-63.
- Battinelli L, Tita B, Evandri MG, Mazzanti G (2001) Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. *Il Farmaco* 56: 345–348.
- Cando D, Morcuende D, Utrera M, Estévez M (2014) Phenolic-rich extracts from Willowherb (*Epilobium hirsutum* L.) inhibit lipid oxidation but accelerate protein carbonylation and discoloration of beef patties. *European Food Research and Technology*, 238: 741–751.
- Dave D, Ghaly AE (2011) Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6 (4): 486-510
- Domínguez R, Pateiro M, Gagaoua M, Barba FJ, Zhang W, Lorenzo JM (2019). A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants* 8, 429, 1-31.

- Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F (2013) Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 1-15.
- Falowo AB, Fayemi PO, Muchenje V (2014) Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. Food Research International 64: 171–181.
- Ferrante C, Chiavaroli A, Angelini P, Venanzoni R, Flores RA, Brunetti L, Petrucci M, Politi M, Menghini L, Leone S, Recinella L, Zengin G, Ak G, Di Mascio M, Bacchin F, Orlando G (2020) Phenolic content and antimicrobial and anti-inflammatory effects of *Solidago virgaurea*, *Phyllanthus niruri*, *Epilobium angustifolium*, *Peumus boldus*, and *Ononis spinosa* extracts. Antibiotics 9, 783: 1-21.
- Granica S, Piwowski JP, Czerwińska ME, Kiss AK (2014) Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. Journal of Ethnopharmacology 156: 316–346.
- Güven K, Matpan Bekler F, Yalaz S, Gül Güven R, Demirtaş Aksu M, İpekçi M, Tuşar FR, Polat N (2020) Evaluation of antibacterial effects of some traditional plants against pathogen microorganisms. Banat's Journal of Biotechnology XI(21): 38-49.
- Jayasena DD, Jo Ch Jo (2013) Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. Trends in Food Science & Technology, 34, 2, 96-108.
- Lipińska L, Klewicka E, Sójka M (2014) Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria 13(3), 289-299
- Kiss AK, Bazyłko A, Filipek A, Granica S, Jaszewska E, Kiarszys U, Kosmider A, Piwowski J (2011) Oenothlein B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. Phytomedicine 18: 557–560.
- Kosalec I, Kopjar N, Kremer D (2013) Antimicrobial activity of willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) leaves and flowers. Current Drug Targets 9: 986-991.
- Kujawski R, Bogacz A, Derebecka-Hołyś N, Cichocka J, Kujawski J, Mikołajczak PL, Bobkiewicz-Kozłowska T, Grześkowiak E, Krajewska-Patan A, Czerny B, Mrozikiewicz PM (2010) Rośliny lecznicze z rodzaju *Epilobium* – działanie biologiczne i farmakologiczne. Herba Polonica Journal 56 (1): 67-82.
- Kujawski R, Mrozikiewicz P, Bogacz A, Cichocka J, Mikołajczak P, Czerny B, Bobkiewicz-Kozłowska T, Grześkowiak E (2010) Wpływ standaryzowanego wyciągu z *Epilobium angustifolium* na ekspresję mRNA receptorów estrogenowych α i β w modelu in vivo. Ginekologia Polska, 8, 600-605.
- Granica S, Piwowski JP, Czerwińska ME, Kiss AK (2014) Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. Journal of Ethnopharmacology 156: 316–346.
- Nimse SB, Pal D (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances 5: 27986-28006.
- Onar HC, Yusufoglu A, Turker G, Yanardag R (2012) Elastase, tyrosinase and lipoxygenase inhibition and antioxidant activity of an aqueous extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. Journal of Medicinal Plants Research 6(5): 716-726.
- Ostrowska H, Oleshchuk O, Vannini S, Cataldi S, Albi E, Codini M, Moulas M, Marchyshyn S, Beccari T, Ceccarini MR (2017) *Epilobium angustifolium* L.: A medicinal plant with therapeutic properties. The EuroBiotech Journal 1 (2), 126-131
- Ribeiro JS, Santos MJMC, Silvach LKR, Pereira LCL, Santos IA, da Silva Lannes SC, Kadam P, Patil M, Yadav K (2018) A Review on Phytopharmacopial Potential of *Epilobium angustifolium*. Pharmacognosy Journal 10(6): 1076-1078.
- Reya AI, Hopia A, Kivikari R, Kahkonen M (2005) Use of natural food/plant extracts: cloudberry (*Rubus Chamaemorus*), beetroot (*Beta Vulgaris* “Vulgaris”) or willow herb (*Epilobium angustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. LWT 38: 363–370.
- Ruszová E, Cheel J, Pávek S, Moravcová M, Hermannová M, Matějková M, Spilková J, Velebný V, Kubala L (2013) *Epilobium angustifolium* extract demonstrates multiple effects on dermal

- fibroblasts in vitro and skin photo-protection in vivo. *General Physiology and Biophysics*, 32, 347–359
- Shikov AN, Poltanov EA, Dorman HJD, Makarov VG, Tikhonov VP, Hiltunen R (2006) Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of commercial water-soluble willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3617–3624
- Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N (2013). Potential applications of antioxidants e A review. *Journal of Pharmacy Research* 7: 828 – 835.
- Singh NP (2012) Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology* 156: 7–17.
- da Silva MV (2019) Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat Science* 148: 181–188.
- Stolarczyk M, Piwowarski JP, Granica S, Stefańska J, Naruszewicz M, Kiss AK (2013) Extracts from *Epilobium* sp. Herbs, their components and gut microbiota metabolites of epilobium ellagitannins, urolithins, inhibit hormone-dependent prostate cancer cells-(LNCaP) proliferation and psa secretion. *Phytotherapy Research* 27: 1842–1848
- Tóth BH, Blazics B, Kéry Á (2012) Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species *Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis* 49: 26–3.
- Zhang W, Xiao S, Ahn DU (2013) Protein Oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53:1191–1201.

15. Zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z tymianku (*Thymus vulgaris* L.) otrzymanych za pomocą różnych rozpuszczalników

Content of phenolic compounds and antioxidant activity of thyme extracts (*Thymus vulgaris* L.) obtained with various solvents

Jakuć Piotr⁽¹⁾, Purkiewicz Aleksandra⁽¹⁾, Zakrzewski Arkadiusz⁽²⁾, Wiśniewski Patryk⁽²⁾

⁽¹⁾Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

⁽²⁾Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM

Jakuć Piotr: piotrekjakuć@gmail.com

Słowa kluczowe: zioła, antyoksydanty, polifenole, DPPH

Streszczenie

Piśmiennictwo pokazuje, że zioła wykazują silne właściwości antyoksydacyjne i mogą stanowić źródło naturalnych przeciwutleniaczy w technologii produkcji żywności. W pracy dokonano analizy zawartości związków fenolowych ogółem oraz aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z tymianku właściwego (*Thymus vulgaris*). Do otrzymania ekstraktów użyto różnych rozpuszczalników, w tym: etanol, woda dejonizowana zimna i gorąca oraz aceton. Zawartość związków fenolowych ogółem oznaczono stosując reakcję barwną z odczynnikiem Folina-Ciocalteu, natomiast do oznaczenia aktywności przeciwutleniającej wykorzystano test z rodnikiem DPPH. W badaniach wykazano, że najwyższa zawartość związków fenolowych kształtowała się w acetonowych ekstraktach z tymianku, natomiast najwyższą aktywnością wygaszania rodnika DPPH charakteryzowały się ekstrakty otrzymane z tymianku przy użyciu gorącej wody. Najniższą zawartość związków fenolowych odnotowano w przypadku zastosowania do ekstrakcji wody gorącej, natomiast najniższa zdolność wygaszania rodnika DPPH cechowała ekstrakty etanolowe. Wykazano ujemną zależność korelacyjną pomiędzy zawartością związków fenolowych oznaczonych z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu oraz aktywnością antyoksydacyjną wyznaczoną w teście z rodnikiem DPPH w ekstraktach tymianku.

1. Wstęp

Tymianek (*Thymus vulgaris* L.) należy do rodziny *Labiatae* (Zaborowska i in. 2012) i jest jedną z popularniejszych roślin zielarskich, którą uprawia się w licznych regionach świata. Stosowana jest powszechnie w przemyśle spożywczym jako roślina przyprawowa, ze względu na swój intensywny smak i zapach. Oprócz właściwości sensorycznych, roślina ta może wykazywać działania antyoksydacyjne i antymikrobiologiczne (El-Sayed i Youssef 2019). Właściwości przeciwutleniające tymianku są wykorzystywane przede wszystkim w hamowaniu jęlczenia olejów i tłuszczów, stanowiącego jedną z głównych przyczyn pogorszenia jakości żywności (Mohamed i in. 2013). Ponadto tymianek jest również ceniony za jego właściwości lecznicze, które są determinowane zawartością wielu związków aktywnych biologicznie (Seidler-Łyżyskowska i in. 2006). Najpopularniejszymi związkami chemicznymi występującymi w tymianku są olejki eteryczne, związki fenolowe, w tym flawonoidy, garbniki i fenolokwasy, witaminy, składniki mineralne, związki triterpenowe, związki siarki oraz alkaloidy (Mews i in. 2008). Związki fenolowe zawarte w tymianku mają udowodnione działanie zmiatania wolnych rodników tlenowych, hydroksylowych i anionorodników nadadtlenkowych (Zaborowska i in. 2012). Za wyróżnik jakości tymianku uważa się olejek eteryczny, którego zawartość i skład chemiczny są zależne m.in. od czynników biologicznych i agrotechnicznych, a także sposobu przerobu i przechowywania (Mews i in. 2008). Potwierdzono, że olejek eteryczny tymianku stanowi bogate źródło tymonu i karkawrolu – związków

o silnych właściwościach antyoksydacyjnych (Farak i in. 1989). Jego silne właściwości bakteriobójcze przejawiają się hamującym wpływem na bakterie gram dodatnie: *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* oraz gram ujemne: *Escherichia coli* i *Enterobacter aerogenes*. Dodatkowo wykazano hamujące działanie olejku eterycznego z tymianku na rozwój drożdży i grzybów (Zaborowska i in. 2012).

Pomimo potwierdzanych coraz częściej silnych właściwości przeciwutleniających ziół, w przemyśle spożywczym nadal najpowszechniej stosowanymi przeciwutleniaczami są te syntetyczne, w tym butylohydroksyanizol (BHA), butylohydroksytoluen (BHT) i tert-butylohydrochinon (TBHQ). Wynika to przede wszystkim z wysokiej skuteczności przy wprowadzeniu niewielkiego dodatku i niskiej ceny w porównaniu do przeciwutleniaczy naturalnych (Kiewlicz i in. 2015). Jednakże, ze względu na podkreślane w literaturze naukowej zagrożenia dla zdrowia i potencjalne właściwości rakotwórcze syntetycznych przeciwutleniaczy, coraz więcej producentów odchodzi od ich stosowania (Mohamed i in. 2013). Badanie naturalnych źródeł antyoksydantów, bezpieczniejszych i skuteczniejszych od tych syntetycznych, stanowią nowatorski punkt widzenia dzisiejszego rynku żywności i może być to punktem wyjścia do całkowitej eliminacji syntetycznych przeciwutleniaczy z żywności. Literatura wskazuje, że również tymianek może być dobrą alternatywą dla przeciwutleniaczy syntetycznych. Zioła mają szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, przede wszystkim ze względu na właściwości sensoryczne oraz działanie antyoksydacyjne. Swoje zastosowanie znajdują w produktach mleczarskich, dzięki ich przeciwdrobnoustrojowym właściwościom w stosunku do mykotoksyn i *Salmonella sp.* (oregano), *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus* (rozmaryn) oraz *Vibrio parahaemolyticus* (tymianek). Dzięki temu są skuteczne w przedłużaniu trwałości jogurtów, masła czy serów. Dodatek 2% suszu z rozmarynu skutecznie hamuje proces lipolizy w maśle, natomiast dodatek olejku eterycznego z tymianku zapobiega psuciu się masła przechowywanego w temperaturze pokojowej (El-Sayed i Youssef 2019). Suszone zioła oraz ekstrakty ziołowe są dodawane również do mięsa i produktów mięsnych w celu ograniczenia obróbki termicznej oraz wydłużenia trwałości produktu i poprawy cech sensorycznych. Olejek bazyliowy jest skuteczny w hamowaniu namnażania bakterii w produktach mięsnych, a mikrokapsułki z olejkiem bazyliowym zastosowane jako dodatek do kielbas pozwalają na dłuższe zachowanie smaku. W przemyśle owocowo-warzywnym komponenty olejków eterycznych ziół – karwakrol, tymol i mentol skutecznie ograniczają rozkład przede wszystkim winogron czy wiśni (Hussain i in. 2013). Do tej pory niewielu autorów dokonało oceny właściwości przeciwutleniających ekstraktów tymianku otrzymywanych przy użyciu różnych rozpuszczalników.

Celem przeprowadzonych badań była analiza zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej w ekstraktach z tymianku otrzymanych poprzez ekstrakcję etanolem, acetonem i wodą (zimną i gorącą).

2. Materiał i metody

2.1 Odczynniki

Podczas przygotowywania i analizy ekstraktów użyto odczynników chemicznych o stopniu czystości cz.d.a. Aceton, alkohol etylowy 99,8%, odczynnik Folina-Ciocalteu, węglan sodu, alkohol metylowy, katechinę pozyskano z firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska). 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH) oraz kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy (Troloks) pozyskano z firmy Sigma Aldrich (Poznań, Polska).

2.2 Przygotowanie ekstraktów

Materiał do badań stanowiły rośliny tymianku właściwego (*Thymus vulgaris*), które zakupiono w postaci świeżej w sklepie stacjonarnym na terenie Olsztyna w województwie warmińsko-mazurskim (Polska). Rośliny tymianku (pędy wraz z liśćmi) zostały oczyszczone oraz pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Susz z tymianku rozdrobniono przy pomocy młynka laboratoryjnego, a następnie poddano ekstrakcji 4 rozpuszczalnikami, jakimi były: alkohol etylowy 99,8%, aceton, zimna woda dejonizowana, gorąca woda dejonizowana.

Ekstrakty z alkoholem etylowym, acetonem i zimną wodą dejonizowaną otrzymano w następujący sposób: odważono 1 g ($\pm 0,001$ g) uprzednio przygotowanego suszu z tymianku, następnie przeniesiono do probówek wirowniczych o pojemności 15 ml oraz ekstrahowano 10 ml rozpuszczalnika. Po ekstrakcji mieszaninę odwirowano w wirówce laboratoryjnej (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy) przez 10 min. przy zastosowaniu 4000 obrotów min^{-1} . Powstały ekstrakt zlano do kolby. Czynności te powtórzono pięciokrotnie. Otrzymane ekstrakty połączono i odparowano do sucha w wyparce próżniowej (Büchi, Flawil, Szwajcaria). Suchy ekstrakt rozpuszczono w 10 ml rozpuszczalnika. W przypadku każdego rozpuszczalnika przygotowano równoległe trzy powtórzenia.

Ekstrakt z gorącą wodą dejonizowaną otrzymano w następujący sposób: odważono 1 g ($\pm 0,001$ g) uprzednio przygotowanego suszu z tymianku, następnie przeniesiono do kolby okrągłej płaskodennej o pojemności 250 ml oraz dodano 150 ml gorącej wody dejonizowanej. Ekstrakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny. Otrzymane ekstrakty odparowano do sucha w wyparce próżniowej firmy Büchi. Suchy ekstrakt rozpuszczono w 10 ml wody dejonizowanej. W przypadku zastosowania tej metody ekstrakcji przygotowano równoległe również trzy powtórzenia.

2.3 Oznaczanie zawartości związków fenolowych ogółem

Do oznaczenia zawartości związków fenolowych ogółem wykorzystano zmodyfikowaną metodę Ribereau-Gayon (1972). W celu wykonania oznaczenia odmierzone 0,1 ml badanego ekstraktu do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Dodano 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu (rozcieńczonego wodą destylowaną w stosunku 1:2) i wymieszano. Następnie dodano 3 ml 14% roztworu węgla sodu i wymieszano. Całość uzupełniono wodą destylowaną do pojemności 10 ml i ponownie wymieszano. Przygotowane roztwory odstawiono na 60 minut w zaciemnione miejsce. Po tym czasie dokonano pomiaru absorbancji roztworów przy długości fali 720 nm przy pomocy spektrofotometru FLUOstar OMEGA BGM LAB Tech (Ortenberg, Niemcy) wobec próby odczynnikowej. Próba odczynnikowa zamiast badanego ekstraktu zawierała odpowiedni rozpuszczalnik. Zawartość związków fenolowych ogółem obliczono na podstawie krzywej wzorcowej przygotowanej dla różnych stężeń katechiny i wyrażono w mg katechiny 100 ml^{-1} ekstraktu.

2.4 Oznaczenie zdolności wychwytywania rodników DPPH

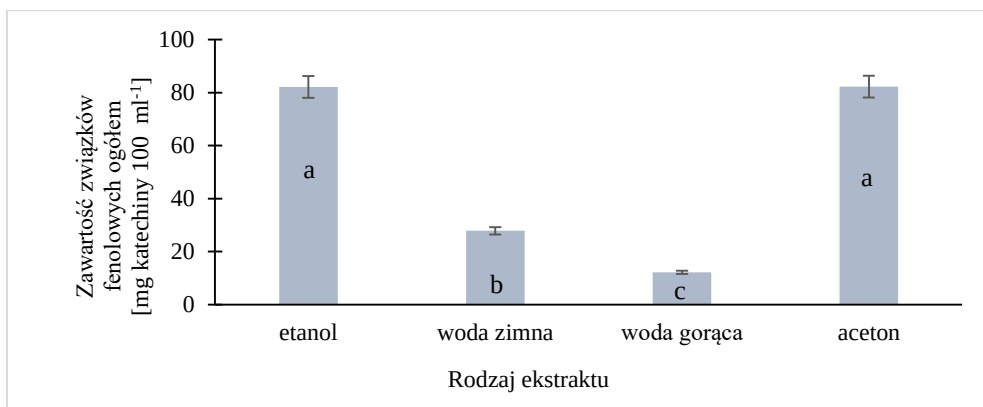
Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH przeprowadzono zgodnie z procedurą opracowaną przez Yang i in. (2014). Roztwór rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego) przygotowano przez rozpuszczenie 27,8 mg DPPH w 200 ml w metanolu. W celu przeprowadzenia pomiaru spektrofotometrycznego zmieszano 100 μl badanego ekstraktu i 900 μl roztworu DPPH. Powstałą mieszaninę pozostawiono na 16 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 515 nm przy pomocy spektrofotometru FLUOstar OMEGA BGM LAB Tech (Ortenberg, Niemcy) wobec próby odczynnikowej. Próba odczynnikowa zamiast badanego ekstraktu zawierała odpowiedni rozpuszczalnik. Aktywność przeciwutleniającą badanych ekstraktów obliczono na podstawie krzywej wzorcowej przygotowanej dla różnych stężeń Troloksu (TE) i wyrażono w $\mu\text{mol TE } 100 \text{ ml}^{-1}$ ekstraktu.

2.5 Analiza statystyczna

Wyniki badań przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wyniki poddano analizie wariancji (ANOVA) przy pomocy testu Duncana. Do wykazania zależności pomiędzy zawartością związków fenolowych ogółem a zdolnością wygaszania wolnego rodnika DPPH wykorzystano test korelacji liniowej Pearsona. Za poziom istotny przyjęto $p \leq 0,05$. Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 13.1 (Statsoft Inc., Kraków, Polska).

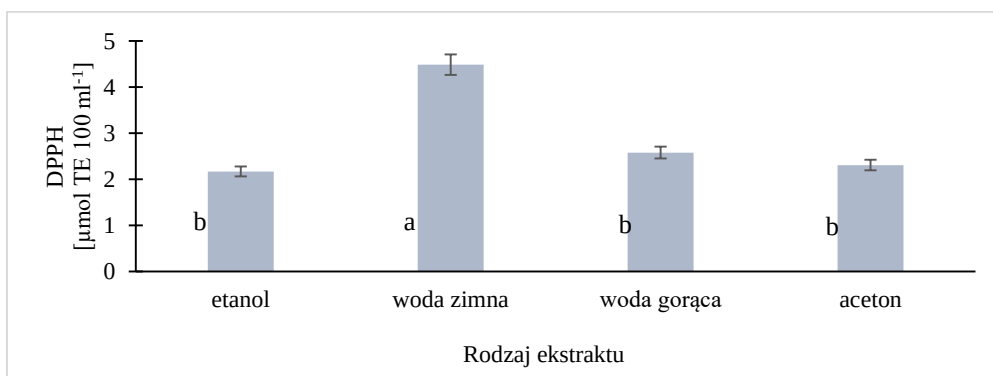
3. Wyniki badań

Zawartość związków fenolowych ogółem oraz aktywność przeciwutleniającą badaną testem DPPH przedstawiono na rysunkach (Rys. 1-2).



Rys. 1. Zawartość związków fenolowych ogółem w ekstraktach z tymianku pozyskanych różnymi rozpuszczalnikami. Objasnienia: a,b,c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie ($p \leq 0,05$).

Najwyższą zawartość związków fenolowych odnotowano w ekstraktach acetonowych tymianku ($82,29 \pm 3,99$ mg katechiny/100 ml⁻¹ ekstraktu). Niewiele niższe ilości ($82,19 \pm 7,90$ mg katechiny/100 ml⁻¹ ekstraktu) związków fenolowych wykazano w ekstraktach etanolowych, których zawartość nie różniła się istotnie od ich zawartości w ekstraktach acetonowych ($p > 0,05$). Statystycznie niższą ($p \leq 0,05$) zawartość związków fenolowych odnotowano w ekstraktach otrzymaną przy użyciu zimnej wody ($27,85 \pm 0,59$ mg katechiny 100 ml⁻¹ ekstraktu). Wartość ta była prawie trzykrotnie niższa niż w przypadku ekstraktów acetonowych i etanolowych. Najniższą zawartość związków fenolowych wykazano w ekstraktach otrzymanych z użyciem gorącej wody ($12,17 \pm 0,89$ mg katechiny 100 ml⁻¹ ekstraktu). Ta zawartość różniła się istotnie od zawartości związków fenolowych w ekstraktach etanolowych, z użyciem wody zimnej i acetonowych ($p \leq 0,05$).



Rys. 2. Aktywność przeciwutleniająca wyrażona jako zdolność wygaszania rodnika DPPH w ekstraktach z tymianku pozyskanych różnymi rozpuszczalnikami. Objasnienia: a,b,c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie ($p \leq 0,05$).

Aktywność wygaszania wolnego rodnika DPPH kształtowała się na najwyższym poziomie w ekstraktach z tymianku otrzymanych z użyciem zimnej wody ($4,49 \pm 0,44$ μmol TE 100 ml⁻¹ ekstraktu). Aktywność ta była zbliżona w ekstraktach etanolowych ($2,17 \pm 0,11$ μmol TE 100 ml⁻¹ ekstraktu), ekstraktach z użyciem wody gorącej ($2,58 \pm 0,34$ μmol TE 100 ml⁻¹ ekstraktu) oraz acetonu ($2,31 \pm 0,06$ μmol TE 100 ml⁻¹ ekstraktu) i nie różniła się istotnie. Aktywność przeciwutleniająca wodnych ekstraktów tymianku otrzymanych metodą „na zimno” była istotnie wyższa od aktywności przeciwutleniającej pozostałych ekstraktów ($p \leq 0,05$).

Zależność pomiędzy zawartością związków fenolowych ogółem a zdolnością wygaszania wolnego rodnika DPPH była odwrotnie proporcjonalna. Wykazano słabą ujemną korelację pomiędzy badanymi parametrami ($r = -0,51$).

4. Dyskusja wyników

Wiele źródeł literaturowych podaje, że ekstrakty z tymianku właściwego są doskonałym źródłem związków o charakterze przeciwutleniającym, w tym związków fenolowych (Kozłowska 2012; Mohamed 2013, Abdul 2017). Wyniki przeprowadzonych badań wskazały, iż najwięcej tych związków zostało wyekstrahowane przy użyciu etanolu i acetonu, istotnie więcej niż za pomocą wody, niezależnie od jej temperatury. Do podobnych wniosków doszli Abdul Qadir i in. (2017), którzy badając ekstrakty acetonowe, etanolowe oraz wodne z tymianku, wykazali w ekstraktach etanolowych najwyższe zawartości związków fenolowych. W badaniach własnych zawartość tych związków w ekstraktach etanolowych i acetonowych były porównywalne. Natomiast w cytowanych badaniach stwierdzono istotnie niższą zawartość związków fenolowych w ekstraktach acetonowych z tymianku w porównaniu do ekstraktów etanolowych.

Inni autorzy, badając zawartość związków fenolowych w ekstraktach z tymianku, uzyskali znacznie wyższe wartości niż te uzyskane w badaniach własnych. Abdelfadel i in. (2015) badając ekstrakty wodne tymianku wykazali, że ekstrakty wodne przygotowane metodą na gorąco i na zimno posiadały znacznie wyższe zawartości tych związków, odpowiednio 340,6 i 302,0 mg 100 ml⁻¹, w porównaniu do wartości uzyskanych w badaniach własnych (odpowiednio 4,49 i 2,58 mg 100 ml⁻¹). Duża rozbieżność wyników wynikała z tego, iż wspomniani autorzy do przygotowania ekstraktów tymianku użyli 20 g ziół, z kolei w badaniach własnych ilość ta była czterokrotnie niższa. Ponadto czynniki, które mogły wpływać na uzyskanie odmiennych wyników to m.in. różnice surowcowe i inne warunki podczas przygotowywania ekstraktów.

W badaniach własnych, najwyższą aktywność przeciwutleniającą w teście z rodnikiem DPPH wykazały ekstrakty wodne z tymianku, przygotowane metodą na zimno, natomiast najniższą – ekstrakty etanolowe. Podobne wyniki uzyskali w swoich badaniach Abdul Qadir i in. (2017), wykazując, że wodne ekstrakty z tymianku charakteryzowała najwyższa zdolność wygaszania rodnika DPPH, natomiast etanolowe – najniższa. Wyniki badań własnych dotyczące aktywności wygaszania rodnika DPPH w badanych ekstraktach różniły się od wielkości literaturowych. W badaniach własnych % inhibicji, oznaczający zdolność antyoksydacyjną ekstraktów dla ekstraktów etanolowych, wodnych przygotowanych metodą „na zimno” i „na gorąco” oraz acetonowych wynosił kolejno 11,1, 24,6, 14,0 i 12,3%. W badaniach Grigore i in. (2009) zdolność antyoksydacyjna ekstraktów z tymianku wynosiła około 90%. Wartości te kilkukrotnie przewyższały wartości % inhibicji w wynikach badań własnych. Abdul Qadir (2017) wykazał w ekstraktach etanolowych i acetonowych tymianku % inhibicji na poziomie około 60 i 50%. Wartości te są kilkukrotnie niższe w odniesieniu do wartości uzyskanych w badaniach własnych. Na takie wyniki wpływ mogły mieć różnorodne czynniki, w tym odmienne warunki prowadzenia reakcji oraz różne naważki tymianku użyte do przygotowania ekstraktów.

W badaniach własnych wykazano istotny wpływ metody ekstrakcji na aktywność przeciwutleniającą. Wyższe zawartości związków fenolowych posiadały ekstrakty uzyskane przy pomocy etanolu i acetonu (rozpuszczalników organicznych) niż ekstrakty wodne (rozpuszczalniki nieorganiczne). W przypadku wartości aktywności przeciwutleniającej zaobserwowano odwrotną tendencję – w ekstraktach etanolowych i acetonowych aktywność przeciwutleniająca była niższa niż w ekstraktach wodnych. Wpływ na aktywność przeciwutleniającą miała także temperatura prowadzenia ekstrakcji. Wyniki badań własnych wykazały, że ponad dwukrotnie wyższą zawartością związków fenolowych oraz prawie dwukrotnie wyższą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzowały się ekstrakty wodne przygotowane metodą „na zimno” niż metodą „na gorąco”. Manzocco i in. (1998) podają, że wraz ze wzrostem temperatury ekstrakcji maleje aktywność wygaszania rodników DPPH. Z kolei Maeda i in. (1992) stwierdzili, że zastosowanie wyższej temperatury ekstrakcji prowadzi do uzyskania wyższych wartości aktywności przeciwutleniającej. Cytowani autorzy tłumaczą to wyższą destrukcją ścian komórkowych, co pozwala na uwolnienie większej ilości związków o charakterze przeciwutleniającym.

W badaniach własnych wykazano ujemną korelację pomiędzy zawartością związków fenolowych ogółem oraz aktywnością wygaszania wolnego rodnika DPPH. Kozłowska i Ścibisz (2012) wykazały jednak silną dodatnią korelację pomiędzy wspomnianymi parametrami ($r = 0,95$). Podobnie Abdelfadel i in. (2015) stwierdzili, iż wzajemna relacja zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej w ekstraktach z tymianku jest względem siebie istotnie zależna. Powodem odmiennych wyników może być sezonowość – właściwości antyoksydacyjne tymianku są zmienne w zależności od pory roku (Tural i Turhan 2017). Ponadto, warto podkreślić, że odczynnik Folina-Ciocalteu reaguje nie tylko ze związkami fenolowymi, ale także z innymi związkami redukującymi zawartymi w ekstraktach roślinnych. Największy wpływ na zmniejszenie dokładności testu mają kwas askorbinowy, kwas dehydroaskorbinowy (DHA) i cukry redukujące (glukoza i fruktoza). Obecność kwasu askorbinowego jest szczególnym problemem przy oznaczaniu zawartości związków fenolowych w ekstraktach roślinnych (Sanchez-Rangel i in. 2013). Tymianek stanowi bardzo dobre źródło witaminy C (Panahi 2017), przez co podczas reakcji barwnej, zawarte w nim kwas askorbinowy i dehydroaskorbinowy szybko reagują z odczynnikiem Folina-Ciocalteu, dając często zawyżone wyniki zawartości związków fenolowych (Sanchez-Rangel i in. 2013). Ujemna korelacja pomiędzy testem DPPH a zawartością związków fenolowych mogła być również determinowana rodzajem rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji. Testem DPPH można wykryć jedynie układy hydrofobowe, ze względu na zastosowanie rodnika rozpuszczalnego w rozpuszczalnikach organicznych (Gu i in. 2019). Z tego względu, testem DPPH nie wykryje się antyoksydantów rozpuszczalnych w wodzie, przez co wynik całkowitej aktywności antyoksydacyjnej może być zaniżony.

5. Wnioski

Metoda pozyskiwania ekstraktów z tymianku wywierała istotny wpływ na zawartość związków fenolowych ogółem oraz aktywność przeciwutleniającą.

Wyższe zawartości związków fenolowych charakteryzowały ekstrakty otrzymane przy użyciu rozpuszczalników organicznych (etanol, aceton), natomiast wyraźnie wyższa aktywność przeciwutleniającą wykazywał ekstrakt otrzymany przy użyciu gorącej wody.

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów otrzymanych za pomocą różnych rozpuszczalników nie zależała od zawartości w nich związków fenolowych.

6. Literatura

- Abdelfadel MM, Khalaf HH, Sharoba AM, Assous MTM (2015) Effect of extraction methods on antioxidant and antimicrobial activities of some spices and herbs extracts. *International Journal of Advanced Research* 3(12): 165-179.
- Abdul Qadir M, Shahzadi SK, Bashir A, Munir A, Shahzad S (2017) Evaluation of phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial activities of some common herbs. *International Journal of Analytical Chemistry*:3475738. <https://doi.org/10.1155/2017/3475738>.
- El-Sayed SM, Youssed AM (2019) Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon* 6(6): 1-7.
- Farag RS, Badei AZMA, El-Baroty GSA (1989) Influence of thyme and clove essential oils on cottonseed oil oxidation. *The Journal of the American Oil Chemists's Society* 66: 800-804.
- Grigore A, Paraschiv I, Colceru-Mihail S, Bubueanu C, Draghici E, Ichim M (2010) Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Romanian Biotechnological Letters* 15(4): 5436-5443.
- Gu C, Howell K, Dushea FR, Suleria HAR (2019) LC-ESI-QTOF/MS characterisation of phenolic acids and flavonoids in polyphenol-rich fruits and vegetables and their potential antioxidant activities. *Antioxidants* 8: 405.
- Hussain A, Panjagari NR, Singh RRB, Patil GR (2013) Potential herbs and herbal nutraceuticals: food applications and their interactions with food components. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(1): 94-122.

- Kiewlicz J, Szymusiak H, Zieliński R (2015) Otrzymywanie, stabilność termiczna i właściwości przeciwutleniające długołańcuchowych estrów kwasu ferulowego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 4(101): 188-200.
- Kozłowska M, Ścibisz I (2012) Badanie zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z roślin przyprawowych podczas ich przechowywania. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna 45(3): 358-363.
- Maeda H, Katsuki T, Akaike T, Yasutake R (1992) High correlation between lipid peroxide radical and tumor-promoter effect: Suppression of tumor promotion in the epstein-barr virus/b-lymphocyte system and scavenging of alkyl peroxide radicals by various vegetable extracts. Cancer Science 83(9): 923-928.
- Manzocco L, Anese M, Nicoli M (1998) Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. LWT-Food Science and Technology 31(7): 694-698.
- Mewes S, Krüger H, Pank F (2008) Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (*Thymus vulgaris* L.). Genetic Resources and Crop Evolution 8(55): 1303-1311.
- Mohamed GGR, Mohamed AS, Khaled AS, Khalel IK (2013) Evaluation and antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products 43: 827-831.
- Panahi B, Dehdivan NS (2017) Evaluation of ascorbic acid and thyme treatments on physicochemical changes in quince fruit. Biological Forum-An International Journal 9(2): 122-125.
- Ribereau-Gayon P (1972) Conspectus of the phenolic constituents. In Plant Phenolics, Heywood, V.H., Ed.; Hafner Publishing Co: New York, NY, USA, 1-23.
- Sanchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velazquez DA (2013) The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. Analytical Methods 3: 5990-5999.
- Seidler-Łożyskowska K, Kozik E, Golcz A, Mieloszyk E (2006) Zawartość makroelementów i oleju eterycznego w surowcach wybranych gatunków roślin zielarskich z upraw ekologicznych. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering 51(2): 161-163.
- Tural S, Turhan S (2017) Antimicrobial and antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and laurel (*Lauris nobilis* L.) essential oils and their mixtures. The Journal of Food 42(5): 588-596.
- Yang L, Zhang H, Cheng L, Gu Z, Hua D, Qi X, Qian H, Wang L (2014) Effect of extrusion on the hydrophilic antioxidant capacity of four whole grains. Journal of Food and Nutrition Research 2(2): 80-87.
- Zaborowska Z, Przygoński K, Bilśka A (2012) Antioxidative effect of thyme (*Thymus vulgaris*) in sunflower oil. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 11(3): 283-291.

16. Charakterystyka kapusty głowiastej czerwonej (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*)

Characteristics of red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*)

Kapusta-Duch Joanna

Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Kapusta-Duch Joanna: joanna.kapusta-duch@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: warzywa kapustne; jakość zdrowotna; kapusta głowiasta

Streszczenie

Obecnie dużą uwagę przykładą się do wpływu diety na zdrowie człowieka. Liczne badania epidemiologiczne pokazują, że dieta bogata w produkty roślinne zmniejsza ryzyko zapadnięcia na przewlekłe choroby niezakaźne, do których należą m.in. miażdżyca oraz nowotwory. Warzywa kapustne, w tym kapusta głowiasta czerwona, są spożywane w dużych ilościach, zarówno w Polsce jak i w innych krajach europejskich. Każdy gatunek odznacza się indywidualnym wyglądem, odmiennymi walorami odżywczymi i smakowymi. Cechuje je przystępna cena, dostępność na rynku lokalnym oraz popularność wśród konsumentów. Dzięki dość częstej konsumpcji można uznać je za istotne źródło składników odżywczych w diecie człowieka.

1. Wstęp

1.1 Warzywa kapustne - systematyka, pochodzenie i ogólna charakterystyka

Warzywa kapustne należą do roślin okrytozalążkowych (*Angiospermae*), klasy dwuliściennych (*Dicotyledones*), rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*), nazywanych dawniej rodziną roślin krzyżowych (*Cruciferae*). W obrębie tej rodziny gatunkiem najbardziej istotnym gospodarczo jest kapusta warzywna - *Brassica oleracea* L. Odmianami botanicznymi tego gatunku jest większość warzyw kapustnych, które uprawia się w Polsce.

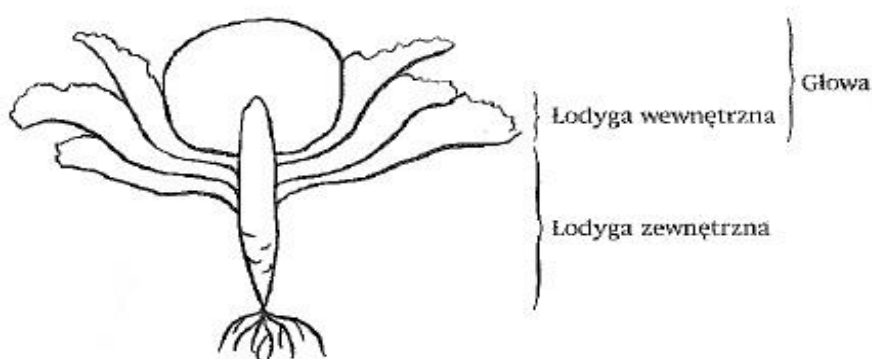
Do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) należą następujące odmiany:

- kapusta głowiasta biała (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*);
- kapusta głowiasta czerwona (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*);
- kapusta włoska (*Brassica oleracea* var. *sabauda*);
- kapusta brukselska (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*);
- kalafior (*Brassica oleracea* var. *botrytis*);
- brokuł (*Brassica oleracea* var. *italica*);
- kalarepa (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*);
- jarmuż (*Brassica oleracea* var. *acephala*);
- kapusta pekińska (*Brassica pekinensis*);
- kapusta chińska (*Brassica campestris* var. *chinensis*);
- rzodkiewka (*Raphanus sativus* var. *sativus*);
- rzodkiew (*Raphanus sativus* var. *niger*);
- rzepa (*Brassica rapa* var. *rapifera*);
- chrzan (*Cochlearia armoracia*);
- rzeżucha ogrodowa (*Lepidium sativum*) (Krochmal-Marczak i in. 2017; Kunicki i in. 2006; Grabowska i in. 2013).

Odmiany należące do gatunku *Brassica oleracea* L. (kapusta warzywna), czyli kapusta głowiasta biała, czerwona i włoska, kapusta brukselska, kalafior, brokuł, kalarepa i jarmuż pochodzą od występującej na wybrzeżach zachodniej Europy kapusty dzikiej (*Brassica oleracea* var. *silvestris* L.), udomowionej około 3000 lat temu najprawdopodobniej przez Celtów. Wzmianki o znanych już trzech odmianach kapusty pochodzą z około 300 roku p.n.e (Dobrakowska-Kopecka 1992). Najstarszą odmianą kapusty warzywnej, która uprawiana była już w starożytności, jest tzw. kapusta

liściasta, popularnie nazywana jarmużem. Kapusta głowiasta biała znana była już w okresie średniowiecza, a skrzyżowanie jej z jarmużem dało początek nowej odmianie - kapuście brukselskiej, która pojawiła się w Belgii w XIII wieku. Pierwsze opisy kalarepy, kapusty głowiastej czerwonej i kapusty włoskiej datuje się na wiek XVI. Najmłodszą odmianą kapusty warzywnej jest kalafior, który podobnie jak brokuł wywodzi się z Cypru (Grabowska i in. 2013).

Odmiany botaniczne kapusty warzywnej *Brassica oleracea* L., za wyjątkiem kapusty pekińskiej, brokułu i kalafiora, to rośliny dwuletnie. Po rocznym okresie jarowizacji (podczas którego wykształcona zostaje część jadalna rośliny, czyli główka) dochodzi dopiero do rozwoju generatywnego - wytwarzają się wówczas pędy kwiatostanowe oraz nasiona (Dobrakowska-Kopecka 1992; Knaflowski i in. 1999). Rośliny z rodziny kapustowatych mają kwiaty złożone z czterech równej wielkości płatków ułożonych w charakterystyczny kształt krzyża, stąd nazwa - warzywa krzyżowe (*Cruciferae*). Z kolei "*Brassica*" to po łacińsku kapusta (Higdon i in. 2007).



Rys. 1. Budowa morfologiczna kapusty głowiastej (Grabowska i in. 2013).

Warzywa kapustne to rośliny obcypylne, owadopylne. Ich owoc to łuszczyzna, zawierająca kuliste, oliwkowo-brunatne nasiona. Poszczególne odmiany botaniczne kapusty warzywnej różnią się pomiędzy sobą zarówno cechami morfologicznymi, jak i użytkowymi. Ich cechą wspólną są natomiast wymagania klimatyczne i glebowe (gleby najlepiej żyzne, bogate w próchnicę o odczynie obojętnym, wysoka wilgotność powietrza, małe wymagania cieplne - temperatura optymalna to 15 - 20 °C). W Polsce warzywa kapustne uprawiane są głównie z rozsady, która jest produkowana zarówno pod osłonami jak i na rozsadniku. Innym sposobem uprawy jest ręczny, bądź mechaniczny wysiew nasion bezpośrednio na pole (Dobrakowska-Kopecka 1992; Knaflowski i in. 1999; Kołota i in. 2007; Świetlikowska (red.) 2008).

2. Opis zagadnienia

Żywność pochodzenia roślinnego jest bogatym źródłem substancji biologicznie aktywnych, zarówno odżywczych, jak i określanych mianem nieodżywczych. Liczną grupę wśród tych związków stanowią substancje o działaniu przeciwutleniającym, zwalczającym aktywność wolnych rodników. Wśród popularnych gatunków warzyw największą zdolnością wiązania rodników nadtlenkowych wyróżnia się czosnek, jarmuż, szpinak, kapusta brukselska, brokuły i buraki, natomiast w odniesieniu do rodników wodorotlenowych – jarmuż i brukselka (Mizgier i in. 2016).

Kapusta czerwona, obok kapusty białej i brukselskiej zajmuje w Polsce jedno z wiodących miejsc wśród produkowanych warzyw. Ich znaczenie gospodarcze wynika z dużej wartości odżywczej i możliwości wszechstronnego wykorzystywania przez cały rok. W warzywach kapustnych właściwości przeciwutleniające przypisywane są polifenolom (m.in. flawonoidom),

witaminie C, E, a także karotenoidom. Jako silne przeciwutleniacze związki te zabezpieczają organizm przed chorobami nowotworowymi, chorobą wieńcową serca, mogą też zapobiegać procesowi przedwczesnego starzenia.

O jakości zdrowotnej żywności, obok zawartych w niej składników odżywczych i nieodżywczych o właściwościach prozdrowotnych, decyduje obecność zanieczyszczeń chemicznych. Jednymi z najbardziej niebezpiecznych są metale ciężkie, m.in. kadm i ołów. Wspólną ich cechą jest zdolność do kumulacji w organizmie człowieka, długi okres półtrwania i związana z tym chemiczna toksyczność (Bahadoran i in. 2016; Soengas i in. 2011). Głównymi czynnikami decydującymi o jakości zdrowotnej żywności pochodzenia roślinnego są systemy uprawy i warunki klimatyczne, jakie towarzyszą wzrostowi roślin.

3. Przegląd literatury

3.1 Cechy użytkowe

Kapusta głowiasta czerwona należy do roślin dwuletnich. W pierwszym roku rozwoju następuje wzrost pąka szczytowego. Początkowo jest on otwarty, lecz wraz ze wzrostem kolejnych liści wewnętrznych, które stopniowo zachodzą jeden na drugi, dochodzi do zamknięcia pąka szczytowego. Uformowana zostaje wówczas główka, stanowiąca część jadalną kapusty głowiastej czerwonej. Ważne cechy użytkowe główki to jej kształt, wielkość oraz twardość. Głównym czynnikiem determinującym kształt główek jest odmiana. Kapusty głowiaste czerwone tworzą najczęściej główki kuliste bądź kulisto-owalne. Wielkość główek określana jest zazwyczaj ich masą i w znacznym stopniu wiąże się z okresem wegetacji. Odmiany wczesne charakteryzują się mniejszą masą główek (0,8 - 1,0 kg), podczas gdy masa główek odmian późniejszych może wynosić ponad 2 kg. Bezpośrednio z wielkością związana jest twardość główek. Zależy ona od ilości oraz sposobu ułożenia liści wewnętrznych (luźne bądź zwarte) i rzutuje na trwałość przechowalniczą kapust. Na ogół późniejsze odmiany kapust głowiastych charakteryzują się bardziej zwiezłymi główkami. W przypadku kapusty głowiastej czerwonej wysoką twardością odznaczają się również odmiany wczesne. Stopień zwiezłości główek uzależniony jest również od rodzaju nawozu. Nadmierne nawożenie azotem przy jednoczesnym niedoborze potasu oraz fosforu prowadzi do zmniejszenia twardości główek (Dobrakowska-Kopecka 1992; Knaflowski i in. 1999; Świetlikowska (red.) 2008; Grabowska i in. 2013).

Cechą charakterystyczną kapusty głowiastej czerwonej jest barwa jej liści zewnętrznych: od fioletowo-zielonej, poprzez ciemnofioletową do ciemnoczerwonej. Takie zabarwienie wynika z obecności rubrobrassyliny, należącej do grupy antocyjanów (Grabowska i in. 2013). Na intensywność tego zabarwienia wpływają warunki hodowli: obfite nawożenie potasowe, niska temperatura i niedobór wody wzmacniają barwę kapusty czerwonej (Knaflowski i in. 1999). Im ta barwa jest silniejsza, tym wyższa jest sucha masa kapusty, co z kolei przekłada się na wzrost trwałości przechowalniczej. Na liściach kapusty czerwonej pojawia się również nalot woskowy o odcieniu srebrzystym, szarym lub niebieskim (Dobrakowska-Kopecka 1992). Duża wilgotność powietrza, a mała wilgotność gleby, intensywne nawożenie NH_4SO_4 oraz przeznaczenie do przechowywania (odmiany późniejsze) sprzyjają pojawianiu się większej warstwy nalotu woskowego (Świetlikowska (red.) 2008). Zabarwienie liści wewnętrznych, tworzących główkę, jest zwykle jaśniejsze na skutek braku dostępu światła. W przypadku kapusty czerwonej barwa ta nie jest mniej intensywna, ale w porównaniu z barwą liści zewnętrznych nie posiada odcieni niebieskich i szarych. Błyszki liściowe kapusty głowiastej czerwonej mają gładką lub prawie gładką powierzchnię (Dobrakowska-Kopecka 1992). Liczba liści zarówno w rozecie, jak i tych okalających głowę jest cechą odmianową i jest większa u odmian późniejszych (Grabowska i in. 2013).

Ważną cechą użytkową kapusty jest jej długość okresu wegetacji. Podział odmian kapusty głowiastej ze względu na długość okresu wegetacji został przedstawiony w Tab. 1.

Zarówno odmiany wczesne, jak i późne nadają się bezpośrednio do konsumpcji. Natomiast do kwaszenia mogą być przeznaczone wyłącznie późne odmiany kapusty (Świetlikowska (red.) 2008). W przypadku kapusty głowiastej czerwonej okres wegetacji odmian wczesnych wynosi

średnio 60 - 90 dni, średnio wczesnych 90 - 115 dni, średnio późnych 120 - 140 dni a późnych 150 - 200 dni (Kołota i in. 2007).

Tab. 1. Podział odmian kapusty głowiastej ze względu na długość okresu wegetacji (opracowanie na podstawie: Knaflowski i in. 1999; Świetlikowska (red.) 2008)

Odmiana	Długość okresu wegetacji	Sposób uprawy	Sadzenie/ wysiew	Zbiór
Wczesna	60 - 90 dni	Z rozsady	I połowa kwietnia	Od początku czerwca do połowy lipca
Średnio-wczesna	100 - 120 dni	Z rozsady	Maj	Lipiec, sierpień, niekiedy wrzesień
Średnio-późna	120 - 140 dni	Wysiew nasion na pole	Przełom marca - kwietnia	Październik, niekiedy listopad
Późna	Powyżej 140 dni	Wysiew nasion na pole	Od kwietnia do połowy marca	Październik, niekiedy listopad

3.2 Uprawa i przechowywanie kapusty głowiastej czerwonej

Kapusta głowiasta czerwona uprawiana jest jedynie z rozsady. Według Kunickiego i in. (2006) „rozsadą nazywamy młode rośliny mające kilka liści, które zostały uzyskane z wysiewu nasion na niewielkich powierzchniach (...) i są przeznaczone do dalszej uprawy w innym miejscu”. Rozsady doniczkowe najczęściej sadi się ręcznie, natomiast na dużych powierzchniach używa się do tego sadzarek. Gleba musi być wilgotna, najlepiej więc sadzić rozsadę w deszczowe dni (przed bądź po deszczu). Kapustę głowiastą czerwoną sadi się w rozstawie 50 x 50 cm. Odmiany późne powinny być sadzone już początkiem maja. Podczas produkcji rozsady należy wykonywać pewne zabiegi pielęgnacyjne. Należą do nich: nawadnianie (jednorazowe dawki polewowe, w zależności od rodzaju gleby, to 15 - 25 mm), nawożenie pogłównie, odchwaszczanie (kapustne należą do warzyw najmniej wrażliwych na zachwaszczenie), ochrona przed chorobami i szkodnikami. Kapusta czerwona źle znosi suszę oraz niedobór wody, zwłaszcza w tzw. okresach krytycznych, tj. podczas zawiązywania oraz przyrostu główek. Najlepsze gleby do uprawy kapusty głowiastej czerwonej to: mady, bielice, czarne ziemie, czarnoziemy, a więc gleby bardzo żyzne i bogate w próchnicę. Optymalna temperatura w czasie produkcji rozsady to 18 - 22°C po wysiewie, a po wschodach 16 - 18 °C - w dzień słoneczny lub 14 - 16 °C - w dzień pochmurny (Kunicki i in. 2006; Kołota i in. 2007).

Kapusta głowiasta ma bardzo wysokie wymagania pokarmowe. Jej silnie rozwinięty system korzeniowy umożliwia roślinie pobór składników z głębszych warstw gleby (Anyszka (red.) 2013). Tabela 2 przedstawia optymalny poziom w glebie wybranych składników pokarmowych dla późnej odmiany kapusty. W przypadku kapusty głowiastej czerwonej bardzo ważne jest zwiększone nawożenie gleby potasem, co korzystnie wpływa na barwę liści (Kołota i in. 2007). Z kolei odmiany przeznaczone do przechowywania nie powinny być nadmiernie nawożone azotem (dawki powyżej zalecanych), gdyż przyczynia się to do pogorszenia trwałości główek (Gajewski 2005).

Plenność późnej odmiany kapusty głowiastej czerwonej wynosi przeciętnie 30 - 50 t/ha (Dobrakowska-Kopecka 1992). Zbierana jest ona ręcznie bądź mechanicznie na przełomie października i listopada. Kapustę przeznaczoną do przechowywania nie powinno się zbierać zbyt późno, ponieważ przemarznięte głowy są trudniejsze w przechowywaniu. Miejscem składowania takiej kapusty mogą być doły, kopce, jak również chłodnie i przechowalnie. Obecnie najbardziej pożądanym miejscem przechowywania kapusty, pomimo wysokich kosztów, są chłodnie, w których

panują kontrolowane warunki temperaturowe i wilgotnościowe (temp. 0 - 1 °C przy wilgotności względnej 90 - 95 %). Pozwala to w znacznym stopniu ograniczyć straty składników odżywczych i zachować świeży wygląd główek. Kapusty głowiaste mogą być przechowywane również w kontrolowanej atmosferze KA (5 % CO₂; 2,5 % O₂) przez około 8 miesięcy, wymaga to jednak stosowania specjalnych urządzeń, które ustalają skład atmosfery w zależności od gatunku warzywa. Pomimo tego, częstość zastosowania KA wzrasta, gdyż niesie ze sobą wiele korzyści. Pozwala nie tylko zmniejszyć ubytki masy, ale także korzystnie wpływa na smak kapusty (wyraźnie pikantny i cierpki) oraz stopień zachowania zielonej barwy liści. Duże znaczenie ma odpowiedni skład ilościowy atmosfery, gdyż pewne odstępstwa mogą pogarszać jakość przechowywanej kapusty (np. przyczyniać się do ubytku witaminy C przy zbyt wysokiej koncentracji CO₂) (Adamicki i Czerko 2002; Kunicki i in. 2006; Kołota i in. 2007).

Tab. 2. Optymalny poziom w glebie wybranych składników pokarmowych dla kapusty głowiastej odmiany późnej (opracowanie na podstawie: Anyszka (red.) 2013).

Zawartość składników pokarmowych w mg/dm ³				
Azot	Fosfor	Potas	Magnez	Wapń
120 - 135	60 - 70	180 - 210	65 - 75	1000 - 1500

3.3 Odmiany kapusty głowiastej czerwonej

Do najważniejszych i najpopularniejszych odmian kapusty głowiastej czerwonej możemy zaliczyć takie odmiany, jak (Dobrakowska-Kopecka 1992, Świetlikowska (red.) 2008):

- a) *Koda* - jest to wczesna odmiana kapusty czerwonej, przeznaczona głównie do spożycia bezpośredniego w okresie letnim. Tworzy główki o kształcie kulistym, lekko spłaszczonym, dobrej twardości, o ciemnoczerwonym zabarwieniu liści. Średnia masa główki wynosi 0,8 - 1,0 kg.
- b) *Haco* - jest odmianą plenną, wczesną i średnio wczesną, która podobnie jak *Koda* przeznaczona jest do bezpośredniego spożycia w okresie letnim. Wykształca główki kuliste i lekko spłaszczone o bardzo dobrej zwięzłości i fioletowym zabarwieniu liści. Masa główki to około 0,7 - 1,7 kg.
- c) *Holenderska* - średnio późna odmiana uprawiana z przeznaczeniem na wczesnojesienne spożycie bezpośrednie. Tworzy główki kuliste o bardzo dobrej twardości i średniej masie 1,2 - 1,6 kg. Zabarwienie główek czerwono-fioletowe.
- d) *Kalibos* - jest to średnio późna odmiana, przeznaczona przede wszystkim do spożycia bezpośredniego, niekiedy również do kwaszenia. Wykształca główki o średniej masie 1,5 - 2,0 kg, kształcie stożkowatym i dobrej zwięzłości. Odmianę *Kalibos* uważa się za najsmaczniejszą odmianę kapusty głowiastej czerwonej.
- e) *Kissendrup* - jest odmianą średnio późną uprawianą z przeznaczeniem do bezpośredniego spożycia oraz kwaszenia, niekiedy do krótkotrwałego przechowywania w kopcach. Tworzy główki kuliste, ciemnofioletowe o dobrej zwięzłości i masie około 1 - 2 kg.
- f) *Langedijker* - jest to odmiana późna, przeznaczona do długotrwałego przechowywania. Jest również bardzo dobrą odmianą do jesiennego spożycia bezpośredniego. Wykształca główki kulisto-owalne, lekko wydłużone o bardzo dobrej zwięzłości i masie około 2 kg. Zabarwienie liści czerwono-fioletowe.
- g) *Roxy F₁* - odmiana późna, uważana za najlepszą do długotrwałego przechowywania. Uprawiana również z przeznaczeniem na kwaszenie i spożycie bezpośrednie. Tworzy główki o kulistym kształcie, bardzo dobrej twardości i masie 1,0 - 3,5 kg.

3.4 Skład i wartość odżywcza kapusty głowiastej czerwonej

Kapusta głowiasta czerwona jest warzywem niskokalorycznym - zawiera tylko 31 kcal w 100 g części jadalnych (Kunachowicz i in. 2020). Podobnie jak inne warzywa kapustne, jest bardzo dobrym źródłem błonnika pokarmowego wśród pozostałych warzyw. Zaliczamy ją ponadto do warzyw obfitujących w witaminę C (Gawęcki (red.) 2017). Spośród składników mineralnych, na

uwagę zasługuje dość wysoka zawartość potasu. Poniżej przedstawiono zawartość składników odżywczych w 100 g świeżej masy.

Tab. 3. Zawartość wybranych składników odżywczych w 100 g części jadalnych kapusty czerwonej według Kunachowicz i in. (2020).

Składnik odżywczy	Zawartość
Białko	1,9 g
Tłuszcz	0,2 g
Węglowodany ogółem	6,7 g
Błonnik pokarmowy	2,5 g
Witamina C	54 mg
Potas	269 mg

Kapusta głowiasta czerwona zawiera szereg substancji bioaktywnych, decydujących o jej właściwościach prozdrowotnych. Zaliczamy do nich: karotenoidy, witaminy i enzymy antyoksydacyjne, polifenole i charakterystyczne dla kapusty czerwonej antocyjany, a także glukozynolany oraz będące ich metabolitami tiocyjaniany. Nie wszystkie z nich możemy określić mianem składników odżywczych - niektóre należą do tzw. NSN czyli naturalnych substancji nieodżywczych (Leja i in. 2010; Kapusta-Duch i in. 2012). Obecnie dane epidemiologiczne sugerują korzystny, ochronny wpływ związków antyoksydacyjnych zawartych w warzywach (również w warzywach krzyżowych) na organizm człowieka, mogący zapobiegać rozwojowi chorób degeneracyjnych, w tym nowotworów i chorób układu krążenia (Singh i in. 2006). Zanim jednak zaczęto doceniać kapustę jako wartościowe warzywo, powszechnie wykorzystywano jej właściwości w leczeniu bólu głowy, biegunki czy dny moczaniowej. Kapusta wykazuje również działanie przeciwrzodowe - jej sok pobudza komórki śluzówki żołądka do wytwarzania śluzu (Singh i in. 2006; Rowicka i Czajka 2011).

4. Podsumowanie

Obecnie uważa się, że prawidłowy sposób odżywiania oraz zdrowy styl życia mogą zapobiegać rozwojowi 30 - 40% nowotworów. Badania donoszą, iż dieta uboga w związki, takie jak kwas askorbinowy, tokoferole, polifenole, izotiocyjaniany, czy selen, stwarza większe ryzyko rozwoju nowotworu, niż substancje o udowodnionym działaniu kancerogennym (np. mykotoksyny), które mogą być obecne w żywności. Regularne spożywanie warzyw kapustnych, w tym kapusty głowiastej czerwonej, może stanowić ważny element profilaktyki występowania przewlekłych chorób niezakaźnych, będących główną przyczyną zgonów ludzi na świecie według ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

5. Literatura

- Adamicki F, Czerko Z (2002) Przechowalnictwo warzyw i ziemniaka. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań.
- Anyszka Z. (red.). (2013) Metodyka integrowanej ochrony kapusty głowiastej. Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice.
- Bahadoran Z, Mirmiran P, Jeddi S, Azizi F, Ghasemi A, Hadaegh F (2016). Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products, meats and processed meats. *Journal of Food Composition and Analysis* 51: 93-105.
- Dobrakowska-Kopecka Z. (1992). Odmianoznawstwo warzywne. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. H. Kołłątaja w Krakowie, Kraków.
- Gawęcki J (red.) (2017) Żywność człowieka. Podstawy nauki o żywieniu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Grabowska A, Jędraszczyk E, Sękara A (2013) Odmianoznawstwo roślin warzywnych. Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego, Kraków.

- Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH (2007) Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis. *Pharmacological Research* 55(3): 224-236.
- Kapusta-Duch J, Kopeć A, Piątkowska E, i in. (2012) The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 63(4): 389 - 395.
- Knaflowski M, Krzesiński W, Małachowski A. (1999) *Biologia i odmianoznawstwo roślin warzywnych*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań.
- Kołota E, Orłowski M, Biesiada A. (2007) *Warzywnictwo*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, Wrocław.
- Krochmal-Marczak B, Sawicka B, Stryjecka M, i in. (2017) Wartość odżywcza i prozdrowotna wybranych warzyw z rodzaju kapusta (*Brassica L.*). *Herbalism* 1(3): 80–91.
- Kunachowicz H, Nadolna I, Iwanow K, i in. (2020) *Tabele składu i wartości odżywczej żywności*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Kunicki E, Sękara A, Kalisz A. (2006) *Skrypt do ćwiczeń z warzywnictwa ogólnego dla studentów Akademii Rolniczej*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Kraków.
- Leja M, Kamińska I, Kołton A (2010) Phenolic compounds as the major antioxidants in red cabbage. *Folia Horticulturae* 22(1): 19-24.
- Mizgier P, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, i in. (2016) Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. *Journal of Functional Foods* 21: 133-146.
- Rowicka G, Czajka M (2011) Znaczenie diety w profilaktyce i leczeniu choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. *Medycyna Rodzinna* 1: 15-18.
- Singh J, Upadhyay AK, Bahadur A, et al. (2006) Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea L. var. capitata*). *Scientia Horticulturae* 108: 233-237.
- Soengas P, Sotelo T, Velasco P, i in. (2011) Antioxidant Properties of Brassica Vegetables. *Functional Plant Science and Biotechnology* 5(2): 43-55.
- Świetlikowska K (red.) (2008) *Surowce spożywcze pochodzenia roślinnego*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.

17. Pozyskiwanie, właściwości fizykochemiczne i funkcjonalne inuliny oraz jej wykorzystanie w przemyśle spożywczym, kosmonautycznym i pasowym

Acquisition, physicochemical and functional properties of inulin and its use in the food, aerospace and fodder industries

Małecki Jan⁽¹⁾, Szafrńska Jagoda O.⁽¹⁾, Małecki Tomasz⁽²⁾

⁽¹⁾ Zakład Technologii Mleka i Hydrokoloidów Katedry Technologii Surowców Pochodzenia Zwierzęcego, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Zakład Automatyki i Osprzętu Lotniczego, Wydział Mechaniczny Energetyki i Lotnictwa, Politechnika Warszawska

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Sołowiej Bartosz, prof. uczelni

Małecki Jan: jan.malecki1993@gmail.com

Słowa kluczowe: węglowodany, oligosacharydy, zdrowie, błonnik, żywność

Streszczenie

Inulina to polisacharyd typu fruktanu, składający się z (2→1) połączonych reszt -d-fruktozylu ($n = 2-60$), zwykle z końcową grupą (1↔2) -d-glukozy. Zastosowania inuliny i jej zhydrolizowanej postaci oligofruktozy ($n = 2-10$) są bardzo zróżnicowane. Jest szeroko stosowana w przemyśle spożywczym jako modyfikator tekstury, ekwiwalent tłuszczu lub jako niskokaloryczna substancja słodząca. Ponadto ma również zastosowanie w innych branżach, takich jak przemysł farmaceutyczny oraz medyczny. W większości tego typu zastosowań jest stosowany jako środek diagnostyczny do badania czynności nerek i jako stabilizator białek. Dla przemysłu spożywczego szczególną rolę odgrywa stopień polimeryzacji oraz pochodzenie botaniczne tego składnika, ponieważ cechy te wywierają istotny wpływ na właściwości fizykochemiczne pozyskanej inuliny.

1. Wstęp

Inulina to określenie stosowane dla mieszanin polimerów fruktozy (fruktanów) o długości 10–12 cząsteczek. Są to mieszaniny zarówno oligomerów, jak i polimerów, które najlepiej charakteryzuje stopień polimeryzacji (DP). Udowodniono, że inulina wywiera pozytywny wpływ m.in. na obniżanie indeksu glikemicznego czy poziomu lipidów, wzrost biodostępności minerałów i immunologiczne efekty modulacyjne wraz z możliwością poprawy tekstury, cech reologicznych i właściwości odżywczych żywności. Przemysł spożywczy stoi obecnie przed wyzwaniem związanym z zaspokajaniem popytu na żywność, która zapewniając dodatkowe korzyści zdrowotne, jednocześnie spełnia wymagania żywieniowe. Niektóre z powodów wzrostu popytu obejmują wpływ nowoczesnego stylu życia, rosnące koszty opieki zdrowotnej związane z dłuższym życiem czy oczekiwanie i naturalne zainteresowanie osób starszych podniesieniem jakości ich życia. Wszystkie te aspekty pozwalają na zaliczenie inuliny do żywności funkcjonalnej co zachęca producentów z różnych gałęzi przemysłu do coraz szerszego jej wykorzystania.

2. Inulina – właściwości fizykochemiczne i funkcjonalne

Inulina jest naturalnym polisacharydem, po raz pierwszy otrzymanym prawdopodobnie w 1804 roku z korzenia omanu wielkiego (*Inula helenium*). Ten związek chemiczny należy do fruktooligosacharydów (fruktanów). Tworzy łańcuch, złożony z cząsteczek β -D-fruktozy połączonych wiązaniem β -2,1-glikozydowym, z jedną terminalnie położoną cząsteczką α -D-glukozy przyłączoną wiązaniem β -1,2-glikozydowym. W stanie naturalnym długość łańcucha fruktozowego waha się od 2 do 50 jednostek. Obecnie dla celów użytkowych inulinę otrzymuje się w dwóch formach, zależnie od stopnia polimeryzacji: „DP” (krótkołańcuchowa 2–10 jednostek) i „HP” tzw. wysokowydajna, o długości łańcucha minimum 23 jednostki (Glibowski i in. 2011). Inulina ma postać białego proszku, rozpuszczalnego w ciepłej wodzie (z roztworu wytrąca się przy 0°C), charakteryzuje się neutralnym smakiem i zapachem. Po hydrolizie lub w formie krótkołańcuchowej (do 10 jednostek

fruktozy), nabiera słodkiego smaku (Panchev i in. 2011). Wodne roztwory inuliny skręcają płaszczyznę światła spolaryzowanego w lewo i charakteryzują się właściwościami silnie redukującymi (De Gennaro i in. 2000). Inulina jest słabo rozpuszczalna w wodzie i jej rozpuszczalność obniża się w przypadku frakcji o wyższej masie cząsteczkowej, natomiast w istotny sposób wzrasta w wyższych temperaturach dla wszystkich rodzajów inulin. Charakterystyka ta umożliwia kontrolowaną produkcję kilku izomorfów, co pozwala na modyfikację właściwości produktu, takich jak reologia (Kubik i in. 2006). Ten specyficzny rodzaj błonnika posiada zdolność do żelowania. Zasadniczo żele inulinowe opierają się na oddziaływaniach zachodzących między rozpuszczonymi łańcuchami inuliny. Jednak żele tego typu mogą również zawierać nierozpuszczone mikrokryształy. Mikrokryształy mogą łączyć się ze sobą, tworząc sieć, która jest zdolna do interakcji zarówno z rozpuszczalnikiem, jak i innymi cząstkami inuliny, zwiększając w ten sposób wytrzymałość powstającego żelu (Kowalski i in. 2009). Temperatura i masa cząsteczkowa wpływają na tworzenie się mikrokryształów, a tym samym na tworzenie się żelu. Inuliny o dużej masie cząsteczkowej lepiej żelują niż ich odpowiedniki o niższej masie cząsteczkowej. Żele wytwarzane termicznie są mocniejsze i gładziej niż żele indukowane ścinaniem. Masa cząsteczkowa wpływa również na zdolność wchłaniania wody. Inuliny o wyższej masie cząsteczkowej mogą być stosowane w celu polepszania zdolności do przetwarzania i stabilności podczas procesu przechowywania w żywności lub innych produktach (Laguna i in. 2014).

3. Źródła inuliny

Inulina może być otrzymywana z surowców pochodzenia roślinnego na drodze ekstrakcji wodnej wspomaganą ultradźwiękami i/lub mikrofalami. Wraz z modyfikacjami enzymatycznymi może być też syntetyzowana przez drobnoustroje. Związek ten jest gromadzony głównie w podziemnych częściach spichrzowych (korzenie, bulwy, kłącza) roślin z rodziny *Asteraceae*, zaś w mniejszych ilościach w liściach tychże roślin. Gromadzi się także w roślinach z rodzin: *Campanulaceae*, *Iridaceae*, *Alliaceae*, *Agavaceae*. Najczęściej jednak inulina izolowana jest z korzeni cykorii (*Cichorium intybus*). Proces pozyskiwania składa się z trzech głównych etapów: (1) ekstrakcji składników rozpuszczalnych w wodzie, w tym inuliny, z korzenia cykorii (2) oczyszczania w celu usunięcia zanieczyszczeń i opcjonalnie inuliny o niskim DP oraz (3) na koniec suszenie rozpyłowe. Czasami wyekstrahowany produkt jest częściowo hydrolizowany w celu zmniejszenia DP produktu końcowego (Ferreira i in. 2002). Inulina ekstrahowana z korzenia cykorii zawiera do 10% cukrów (mono-, di- i krótkołańcuchowych oligosacharydów). Zazwyczaj ekstrakcję przeprowadza się przez gotowanie oczyszczonych i pociętych lub zmielonych korzeni w wodzie. Warunki procesu, takie jak pH wody, stosunek wody do korzeni, czas obróbki termicznej itp. mogą być modyfikowane w celu otrzymania produktu o pożądanych właściwościach (Panchev i in. 2011). Otrzymaną mieszaninę po ekstrakcji poddaje się kondensacji przez odparowanie. Oczyszczanie inuliny odbywa się głównie przy wykorzystaniu różnicy rozpuszczalności frakcji DP obecnych w ekstraktach. Ogrzewanie i chłodzenie w połączeniu z filtracją, dekantacją i (ultra) wirowaniem zostały opracowane w celu wytworzenia frakcji inuliny o różnej masie cząsteczkowej. Pozostałości inuliny, które nie zostały wytrącone w tych procesach, można przekształcić w substancję stałą przez suszenie rozpyłowe. Optymalny dobór parametrów procesu suszenia rozpyłowego dobierany jest poprzez zmianę temperatury powietrza na wlocie, temperatury roztworu i prędkości obrotowej pompy zasilającej w oparciu o mikrostrukturę wytwarzanej inuliny oraz reologiczne zachowanie stężonych roztworów inuliny.

Tab.1. Zawartość inuliny w wybranych surowcach roślinnych (Abed i in. 2016).

Surowiec	Zawartość inuliny (g/100 g)
Cebula (<i>Allium cepa</i>)	1,1-7,5
Bulwy topinamburu (<i>Helianthus tuberosus</i>)	16,0-20,0
Korzeń cykorii (<i>Cichorium intybus</i>)	35,7-47,6
Szparagi (<i>Asparagus officinalis</i>)	2,0-3,0
Czosnek (<i>Allium sativum</i>)	9,0-16,0
Pszenica (<i>Triticum sp.</i>)	1,0-3,8
Jęczmień (<i>Hordeum vulgare</i>)	0,5-1,0

4. Metabolizm inuliny

4.1 Synteza inuliny

Inulina występuje w stanie naturalnym jako długoterminowy materiał zapasowy roślin lub jako krótkoterminowy w miejscach ich aktywnego wzrostu. Może spełniać także funkcję ochronną jako osmo- lub karioprotektany, czyli substancje mające za zadanie chronić przed przesuszeniem lub przechłodzeniem roślin (Kubik i in. 2006). Może być magazynowana w wakuoli komórkowej, nie wymagając od rośliny posiadania, wyspecjalizowanych organelli (jak np. skrobia). Często jednak, rośliny posiadające zdolność wytwarzania inuliny tworzą wyspecjalizowane organelle w organach, które mogą następnie służyć jako materiał do rozmnażania wegetatywnego roślin magazynujących inulinę (np. bulwy dalii czy topinamburu). Biosynteza inuliny w roślinach jest indukowana wraz z rozpoczęciem wzrostu promieniowego korzeni. Substancją budulcową, z której powstaje inulina jest sacharoza, do której dołączane są cząsteczki fruktozy. Niezbędne, a zarazem wystarczające do zsyntetyzowania łańcucha inuliny są dwa enzymy: sacharozo-sacharozo 1-fruktozylotransferaza, odpowiedzialna za przyłączanie pierwszych cząsteczek fruktozy, i fruktano-fruktano 1-fruktozylotransferaza warunkująca wytworzenie długiego łańcucha inuliny. Inulina może być również syntetyzowana metodami biotechnologicznymi poza organizmem roślin przy użyciu enzymów bakteryjnych (Ferreira i in. 2002).

4.2 Rozkład inuliny

Rozkład inuliny może następować na skutek kwaśnej hydrolizy przy $\text{pH} < 4,5$ lub rozpadu enzymatycznego (Glibowski i in. 2011). Rozpad końcowych wiązań β -2,1-glikozydowych łańcucha fruktanowego następuje pod wpływem enzymu β -fruktofuranazydy, zaś rozpad takich samych wiązań wewnątrz łańcucha katalizowany jest przez fruktanohydrolazę 2,1- β -D-fruktanu. Oderwanie końcowej cząsteczki glukozy następuje natomiast pod wpływem inwertazy (β -D-fruktofuranazydy). Enzymy rozkładające inulinę identyfikowane są głównie wśród drobnoustrojów, najczęściej z rodzaju *Lactobacillus* lub *Bifidobacterium*. Nie są wytwarzane w przewodzie pokarmowym człowieka jako enzymy własne, jednak mogą być wytwarzane przez bakterie zasiedlające jelita, w szczególności jelito grube. Zdolność trawienia fruktanów wykazują drobnoustroje przewodu pokarmowego zwierząt roślinożernych oraz człowieka, bytujące także w jamie ustnej. Obecność enzymów rozkładających inulinę stwierdzono także w roślinach magazynujących ten cukier jako materiał zapasowy (np. w słoneczniku bulwiastym, cykorii) oraz w glebie, w bezpośrednim sąsiedztwie tych gatunków, a wytworzone przez mikroorganizmy glebowe.

5. Zastosowanie inuliny

Inulina oraz inne oligosacharydy są stosowane w przemyśle spożywczym głównie jako składniki posiadające zdolność do regulacji zawartości wody, konsystencji, uzyskania odpowiedniego punktu zamarzania czy kształtowania cech reologicznych produktów. Wykazują właściwości emulgujące oraz zdolność do tworzenia żelu. Inulina stosowana przy produkcji żywności ma postać białego proszku, dobrze rozpuszczalnego w ciepłej wodzie (w zimnej natomiast ulega wytrącaniu). Charakteryzuje się neutralnym zapachem i smakiem. Do głównych właściwości technologicznych inuliny zalicza się zdolność żelowania i pochłaniania wody, tworzenia emulsji i zagęszczania. Poprawia smarowność, smak i zapach oraz stabilizuje produkty w formie piany lub emulsji (González-Herrera i in. 2015). Inuliny krótkołańcuchowe mogą być stosowane jako ekwiwalenty sacharozy (np. w lodach i jogurtach owocowych), nie wpływając na znaczny wzrost poziomu glukozy we krwi. Może być także składnikiem preparatów odchudzających. Stosowana w przemyśle piekarsko-cukierniczym zastępuje dodatek tłuszczu, przyczyniając się do poprawy trwałości i jakości pieczywa oraz ciast (Karimi i in. 2015). Jako zamiennik tłuszczu wpływa na znaczne obniżenie wartości energetycznej, zachowując przy tym walory sensoryczne, takie jak śmietankowa konsystencja i gładkość produktu. Fruktooligosacharydy mają właściwości technologiczne porównywane do tych, które cechuje syrop glukozowy. Nie krystalizują, nie dają odczucia ziarnistości w jamie ustnej, nie wytrącają się. Charakteryzuje je jeszcze lepsza rozpuszczalność niż rozpuszczalność inuliny. Posiadają zdolność pochłaniania wody, zmniejszając jej aktywność (a_w).

Wpływają także na zmianę temperatury wrzenia i zamarzania produktu. W wyrobach piekarskich stosowane są jako zamiennik sacharozy.

5.1 Znaczenie dietetyczne

Z uwagi na obecność wiązań β -2,1-glikozydowych, które występują w łańcuchu fruktozowym inuliny, związek ten nie jest trawiony w przewodzie pokarmowym przez enzymy własne ludzi i zwierząt monogastycznych, dzięki temu stanowi doskonałą pożywkę dla bifidobakterii warunkujących utrzymanie prawidłowej flory jelitowej, przez co staje się prebiotykiem, w efekcie pozytywnie wpływając na funkcjonowanie przewodu pokarmowego (Apolinario i in. 2014). Z uwagi na działanie hipoglikemiczne inulina polecana jest w diecie cukrzyków, ponadto obniża stężenie cholesterolu we krwi, ma więc działanie przeciwmiażdżycowe. Inulina uznawana jest także za rozpuszczalną frakcję błonnika pokarmowego.

5.2 Działanie prebiotyczne

Prebiotyczna funkcja inuliny (sprzyjanie rozwojowi korzystnych dla organizmu człowieka bakterii) może być wykorzystywana w dietetyce, weterynarii i kosmetyce (Franck 2002). Wiązania β -glikozydowe inuliny powodują, że jest ona odporna na hydrolizę przez enzymy trawienne występujące w jelicie cienkim. W wyniku tego inulina przechodzi w niezmienionej postaci do jelita grubego, gdzie staje się natomiast substratem dla pożądanej mikroflory bakteryjnej – bifidobakterii (Górecka i in. 2009). Prawie cała inulina ulega fermentacji prowadzonej przez mikroflorę okrężnicy (*Bifidobacterium* sp. i *Lactobacillus* sp.). Produktami fermentacji są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (octowy, propionowy, masłowy), które hamują rozwój szkodliwych bakterii, np. *Salmonella* i *E. coli*.

5.3 Zastosowanie w przemyśle spożywczym i technologii żywności

W produkcji żywności wykorzystywane są właściwości fizykochemiczne inuliny, takie jak: zdolność do tworzenia żelu i pęcznienia, stabilizacja struktury, m.in. do tworzenia: pian, emulsji, kremów, zwiększania lepkości oraz poprawy cech sensorycznych żywności (Nastaj i in. 2008). Stosowana jest również, jako modyfikator cech reologicznych oraz substytut tłuszczów i cukrów, w produkcji lodów, nabiału, deserów, wędlin, pieczywa, żywności funkcjonalnej oraz produktów o obniżonej kaloryczności. W produktach mleczarskich, a nawet w tych o zmniejszonej wartości energetycznej, inulina może być używana jako substancja zastępująca tłuszcze, umożliwiając zachowanie prawidłowej tekstury, stabilności, smakowitości. Jest również możliwość jej wykorzystywania w produkcji niskotłuszczowych serków twarogowych czy śmietany (Polak 2001). Dzięki temu, że inulina łatwo hydrolizuje do fruktozy i glukozy, może być również dalej przekształcana w alkohol etylowy (produkcja wyrobów spirytusowych) lub w alkohol metylowy, bądź kwas cytrynowy do celów przemysłowych (Nieto-Nieto i in. 2015).

5.4 Możliwości zastosowania w kosmonautyce

Biorąc pod uwagę wymagania stawiane przed żywnością przeznaczoną do lotów w kosmos, inulina i fruktooligosacharydy mogą znaleźć zastosowanie jako dodatek do produktów spożywanych przez kosmonautów. Żywność tego typu musi spełniać szereg wymagań, m.in. bezpieczeństwo stosowania (zminimalizowanie prawdopodobieństwa zatrucia pokarmowych), stabilność podczas czasu trwania misji (niska aktywność wody, czystość mikrobiologiczna), smakowitość (zapewnienie pozytywnych doznań smakowych, utrzymanie/wzrost morale załogi), wartość odżywcza (zapewnienie prawidłowej i zbilansowanej diety), minimalizacja zasobów, różnorodność itp. (Douglas i in. 2020). Produkty muszą być łatwe do przygotowania, najczęściej wiąże się to z dodaniem wody do suchych składników w postaci proszku i delikatnym podgrzaniem mieszaniny. Równie często są to produkty pakowane próżniowo lub pakowane w aluminiowe tubki (Angelo 1999). Wszystkie wymienione wcześniej właściwości inuliny oraz wymagania stawiane przed żywnością dla kosmonautów sprawiają, że składnik ten może być doskonałą substancją wzbogacającą produkty przeznaczone do wypraw kosmicznych (Douglas i in. 2020).

5.5 Zastosowanie w produkcji pasz

Wykorzystanie dodatku inuliny w żywieniu zwierząt rzeźnych oraz drobiu ma dwojakie, korzystne znaczenie: wpływa na zdrowotność zwierząt hodowlanych oraz jakość żywnościowych surowców zwierzęcych (np. jaja z obniżoną zawartością cholesterolu od kur żywionych inuliną). Ten rodzaj błonnika wykazuje także znaczący, pozytywny wpływ na mikroflorę jelitową, histomorfologię jelit, układ odpornościowy oraz metabolizm związków mineralnych i lipidów. Jednak zmienne tj. stężenie inuliny w paszy, płęć, cechy indywidualne, odpowiednie warunki higieniczne czy stres środowiskowy mogą wpływać na zdolność drobiu do przyswajania inuliny (Buclaw 2016). Na rynku widać coraz większe zainteresowanie stosowaniem inuliny ze słonecznika bulwiastego, w żywieniu zwierząt monogastrycznych, gdyż stwierdzono istotne zwiększenie przyrostów masy ciała w pierwszym i drugim okresie tuczu wraz ze wzrostem dawki inuliny. Wykazano też działanie antypasożytnicze inuliny u osobników, których dieta uwzględniała ten rodzaj błonnika (Tientam i in. 2015). Zastosowanie prebiotyków, typu inuliny, jako dodatku do pasz dla zwierząt hodowlanych to stosunkowo mało poznany temat, który w dalszym ciągu wymaga lepszego poznania oraz szeregu badań, lecz aktualne doniesienia sprawiają, że ten typ błonnika może w przyszłości stać się powszechnie stosowanym składnikiem wzbogacającym produkty paszowe (Buclaw 2016).

6. Podsumowanie i wnioski

Aktualny rynek krajowy i zagraniczny produktów żywnościowych musi sprostać wciąż rosnącym potrzebom konsumentów i ich wysokim wymaganiom odnośnie jakości żywności, w szczególności jej bezpieczeństwa zdrowotnego. Zauważalny jest ciągły wzrost zainteresowania konsumentów żywnością, która cechuje się ukierunkowanym i korzystnym wpływem na organizm. Prowadzi to do większego zapotrzebowania na produkty, zawierające m.in. błonnik, probiotyki i prebiotyki, które wykazują korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Prebiotyki coraz częściej wykorzystywane są w przemyśle mleczarskim, tłuszczowym, piekarsko-cukierniczym i mięsny. Asortyment produktów wykorzystujących oligofruktozę i inulinę na rynku spożywczym jest dość szybko poszerzany dzięki wynikom badań wykazującym ich korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Duży potencjał, a także wymierne korzyści płynące ze spożywania produktów wzbogacanych w te składniki skłaniają instytucje i ośrodki badawcze do prowadzenia dalszych badań nad możliwością wykorzystania tych składników w innych gałęziach przemysłu, wzbogacania kolejnych produktów i wprowadzania ich na rynek.

7. Literatura

- Abed SM, Ali AH, Noman A i in. (2016) Inulin as Prebiotics and its Applications in Food Industry and Human Health. A Review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research* 5(1): 88-97.
- Angelo AC (1999) Space foods and nutrition. National Aeronautics and Space Administration Office of Human Resources and Education Division Washington D.C. 2: 1-62.
- Apolinario AC, de Lima Damasceno BP, de Macedo Beltrao NE i in. (2014) Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymer* 101: 368–378.
- Buclaw M (2016) The use of inulin in poultry feeding: a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100: 1015-1022.
- De Gennaro S, Birch GG, Parke SA i in. (2000) Studies on the physicochemical properties of inulin and inulin oligomers. *Food Chemistry* 68 (2): 179–183.
- Douglas GL, Zwart SR, Smith SM (2020) Space food for thought: Challenges and considerations for food and nutrition on exploration missions. *The Journal of Nutrition Issues and Opinions* 17: 2242-2244.
- Ferreira L, Carvalho R, Gil MH, Dordick JS (2002) Enzymatic synthesis of inulin containing hydrogels. *Biomacromolecules* 3 (2): 333–341.

- Franck A (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition* 87(2): 287–291.
- Glibowski P, Bukowska A (2011) The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stability. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* 10 (2): 189–196.
- González-Herrera SM, Herrera RR, López MG i in. (2015) Inulin in food products: Prebiotic and functional ingredient. *British Food Journal* 117: 371–387.
- Górecka D, Konieczny P, Gramza-Michałowska A (2009) Inulina – znaczenie żywieniowe i technologiczne. *Przemysł Spożywczy* 10: 22–27.
- Karimi R, Azizi MH, Ghasemlou M i in. (2015) Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers* 119: 85–100.
- Kowalski R, Prycz J (2009) Innowacyjne dodatki technologiczne w przemyśle mięsnym. *Przemysł Spożywczy* 63 (3): 28-32.
- Kubik C, Piasecka K, Anyszka A i in. (2006) Polifruktany i fruktooligosacharydy (FOS) - występowanie, otrzymywanie i zastosowanie. *Biotechnologia* 73 (2): 103-116.
- Laguna L, Primo-Martin C, Varela P i in. (2014) HPMC and inulin as fat replacers in biscuits: Sensory and instrumental evaluation. *LWT - Food Science and Technology* 56 (2): 494-501.
- Nastaj M, Gustaw W (2008) Wpływ wybranych prebiotyków na właściwości reologiczne jogurtu stałego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 60 (5): 217-225.
- Nieto-Nieto TV, Wang YX, Ozimek L i in. (2015) Inulin at low concentrations significantly improves the gelling properties of oat protein—a molecular mechanism study. *Food Hydrocolloids* 50: 116-127.
- Panchev I, Delchev N, Kovacheva D i in. (2011) Physicochemical characteristics of inulins obtained from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *European Food Research and Technology* 233: 889–896.
- Polak E (2001) Zastosowanie pro- i prebiotyków w lodach. *Przemysł Spożywczy* 55 (3): 22-23.
- Tiengtam N, Khempaka S, Paengkoum P i in. (2015) Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Science and Technology* 207: 120–129.

18. Regulacja rozwoju brodawek korzeniowych za pośrednictwem wybranych fitohormonów

Regulation of root nodule development by chosen phytohormones

Olejnik Przemysław

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Opiekun naukowy: dr hab. Katarzyna Nuc

Olejnik Przemysław: przemyslaw.olejnik.92@gmail.com

Słowa kluczowe: hormony roślinne, brodawki zdeterminowane, brodawki niezdeterminowane, biologiczne wiązanie azotu,

Streszczenie

Proces tworzenia brodawek korzeniowych oraz odpowiednie zbilansowanie ich liczby są niezwykle istotne zarówno dla wzrostu i rozwoju roślin bobowatych jak i dla ich przetrwania w często niesprzyjających warunkach środowiskowych. Z tego względu bardzo ważna jest regulacja intensywności formowania brodawek korzeniowych. Rośliny dysponują wieloma mechanizmami, których celem jest ograniczenie brodawkowania w warunkach niekorzystnych oraz jego intensyfikacja w przypadku braku stresów środowiskowych. Jednym z takich mechanizmów jest regulacja procesu tworzenia brodawek korzeniowych oparta na funkcjonowaniu fitohormonów.

Celem pracy jest omówienie roli wybranych hormonów roślinnych w regulacji procesu rozwoju brodawek korzeniowych.

1. Wstęp

Azot (N) jest jednym z pierwiastków warunkujących istnienie życia na Ziemi, ponieważ stanowi istotny składnik takich kluczowych biomolekuł jak kwasy nukleinowe, białka, chlorofil czy witaminy. Głównym źródłem tego pierwiastka dla konsumentów są rośliny, które przyswajają azot dostępny w podłożu w formie amonowej i azotanowej. Jednakże ograniczona ilość łatwo przyswajalnych form N w glebie jest jednym z głównych czynników ograniczających produktywność ekosystemów.

Niektóre gatunki roślin przystosowały się na drodze ewolucji do wzrostu w warunkach ograniczonej dostępności tego pierwiastka w glebie nabywając cechy umożliwiające im wykorzystanie azotu atmosferycznego, przyczyniając się tym samym do zwiększenia globalnego obiegu azotu w przyrodzie. Najlepiej poznaną grupą roślin o wspomnianych cechach są rośliny bobowate, które mogą wykorzystywać azot atmosferyczny dzięki symbiozie z bakteriami, zdolnymi do wiązania i redukcji N_2 do form łatwo przyswajalnych, zwanymi rizobiami. W wyniku wzajemnej interakcji pomiędzy roślinami a wspomnianymi mikroorganizmami na powierzchni korzeni tworzą się specyficzne struktury (brodawki korzeniowe), które następnie są zasiedlane przez rizobia.

2. Opis zagadnienia

Nawiązanie efektywnej symbiozy jest możliwe gdy w reosferze rośliny bobowatej-makrosymbionta, obecne są rizobia określonego gatunku- mikrosymbiont. Pierwszym etapem tworzenia układu symbiotycznego jest przyleganie bakterii do powierzchni korzeni włosowatych, które odbywa się za pośrednictwem takich cząsteczek i struktur jak: rikadhezyna, fimbrie, lektyny i polisacharydy (Skorupska i in. 2006). Następnie dochodzi do wymiany sygnałów molekularnych pomiędzy przyszłymi symbiontami, spośród których najważniejszymi są flawonoidy, wydzielane przez roślinę w odpowiedzi na niedobór azotu, oraz czynniki Nod produkowane przez rizobia. Flawonoidy indukują ekspresję genów nodulacji u określonego gatunku bakterii czego skutkiem jest indukcja biosyntezy i sekrecji czynników Nod. Po udanej wymianie sygnałów molekularnych dochodzi do inicjacji procesu infekcji i formowania brodawki korzeniowej. Pierwszym symptomem

rozpoczęcia tworzenia symbiozy jest zawijanie końcówki korzenia włosowatego. W ten sposób powstaje przestrzeń, wewnątrz której zostaje uwięziona pewna ilość rizobiów. Bakterie namnażając się w jej wnętrzu i syntetyzując czynniki Nod powodują hydrolizę ściany komórkowej i wpuklenie błony inicjując powstanie nici infekcyjnej, czyli swoistego korytarza którym bakterie wędrują w głąb korzenia do primodium, czyli miejsca formowania przyszłej brodawki korzeniowej (Gage 2004).

Proces tworzenia układu symbiotycznego podlega ścisłej kontroli ze strony makrosymbionta. W jego regulację zaangażowane są liczne mechanizmy molekularne mające na celu przeciwdziałanie zbyt intensywnemu brodawkowaniu, które mogłoby okazać się dużym obciążeniem dla rośliny zwłaszcza w warunkach stresowych. Jednym z komponentów tego mechanizmu są fitohormony, które mogą zarówno hamować jak i promować tworzenie brodawek korzeniowych.

3. Przegląd literatury

Kwas indolinoctowy (IAA), należący do auksyn, był pierwszym zidentyfikowanym hormonem roślinnym. Fitohormon ten jest syntetyzowany z tryptofanu lub indolu w załączkach liści, młodych liściach i formujących się nasionach. Następnie jest on transportowany do innych tkanek roślinnych za pośrednictwem kambium, pasm prekambialnych i komórek epidermy.

Auksyny pełnią w organizmach roślin różnorodne funkcje. Odpowiadają między innymi za indukcję podziałów komórkowych i wzrostu komórek. Ponadto stymulują różnicowanie komórek do floemu i ksylemu. Regulują również formowanie i wzrost korzeni bocznych w warunkach naturalnych oraz indukują różnicowanie korzeni podczas regeneracji roślin w warunkach *in vitro*. Biorą również udział w regulowaniu tropizmu czyli zmiany kierunku wzrostu pędów i korzeni w odpowiedzi na działanie siły grawitacji czy obecność światła. Ponadto są odpowiedzialne za tak zwaną dominację wierzchołkową czyli promowanie wzrostu pędu głównego przy jednoczesnym hamowaniu wzrostu pędów bocznych.

Pierwsze doniesienia na temat udziału auksyn w procesie tworzenia brodawek korzeniowych u roślin bobowatych pochodzą z roku 1936 kiedy to stwierdzono obecność tych fitohormonów we wspomnianych strukturach obecnych na korzeniach grochu siewnego (*Pisum sativum*). Ponadto wykazano wzrost stężenia kwasu indolinoctowego wraz z rozwojem brodawki korzeniowej (Thimann 1936). Później Rightmyer i Long stwierdzili, że zastosowanie inhibitorów polarnego transportu auksyn takich jak kwas naftalenoftalowy (NPA) i kwas 2,3,5-trijodobenzoesowy (TIBA) indukuje powstawanie brodawek na korzeniach *Medicago sativa* i *Medicago truncatula* na skutek wzrostu stężenia auksyn w korzeniach (Rightmyer i Long 2011). Ponadto w badaniach prowadzonych na transgenicznej koniczynie białej (*Trifolium repens*), do której wprowadzono gen kodujący białko GUS ulegający ekspresji pod wpływem aktywowanego przez auksyny promotora GH₃, zaobserwowano, że rizobia powodują lokalne i krótkotrwałe zahamowanie transportu auksyn prowadzący do akumulacji wspomnianych fitohormonów w miejscu tworzenia brodawki korzeniowej (Mathesius i in. 1998). Podobne rezultaty uzyskano w przypadku transgenicznej rośliny *M. truncatula* zawierającej gen kodujący białko GUS ulegający ekspresji pod wpływem aktywowanego przez auksyny promotora DR₅ (Huo i in. 2006). van Noorden i wsp. wykazali, że mutant *M. truncatula* charakteryzujący się zwiększoną liczbą brodawek korzeniowych w porównaniu do roślin typu dzikiego wydajniej transportował auksyny dzięki czemu ich stężenie w regionach formowania brodawek korzeniowych było zdecydowanie wyższe w porównaniu do analogicznych miejsc na korzeniach roślin typu dzikiego (Noorden i in. 2006).

Powyższe przykłady wskazują, że auksyny działają jako pozytywny regulator procesu formowania brodawek korzeniowych u roślin bobowatych.

Kolejną grupą hormonów występujących w roślinach są, będące pochodnymi adeniny, cytokininy charakteryzujące się zdolnością do indukowania podziałów komórkowych. Jednym z fitohormonów należących do tej grupy jest zeatyna, której synteza przebiega we wierzchołkach korzeni oraz rozwijających się nasionach.

Poza indukowaniem podziałów komórkowych cytokininy pełnią wiele istotnych funkcji regulatorowych. Jedną z nich jest pozytywny wpływ na wzrost liści wynikający głównie z powiększania się komórek. Jest to najprawdopodobniej mechanizm, dzięki któremu całkowita powierzchnia liści rekompensuje wzrost korzeni, ponieważ wraz z rozwojem systemu korzeniowego

rośnie stężenie cytokin w tkankach ale także zapotrzebowanie rośliny na energię i materiały budulcowe pozyskiwane w wyniku fotosyntezy. Ponadto cytokininy opóźniają starzenie się liści i wspomagają otwieranie aparatów szparkowych, zwiększając tym samym ilość pobieranego dwutlenku węgla niezbędnego roślinom do dalszego rozwoju. Wspomniane fitohormony odpowiedzialne są również za wzrost pędów bocznych i krzewienie roślin szczególnie w przypadku utraty wierzchołka pędu głównego, na szczycie którego syntetyzowane są auksyny. Cytokininy stosowane są również w hodowlach *in vitro*, gdzie biorą udział w indukowaniu morfogenezy pędów.

Cytokininy pełnią istotną funkcję w rozwoju brodawek korzeniowych. Wykazano, że zastosowanie egzogennych cytokin w eksperymentach prowadzonych na roślinie modelowej *Lotus japonicus* (komonica japońska) prowadzi do indukcji formowania primodiów i struktur podobnych do brodawek korzeniowych niezależnie od obecności rizobiów. Ponadto dodatek cytokin do pożywki hodowlanej powoduje formowanie primodiów na korzeniach mutantów *L. japonicus* pozbawionych zdolności do nodulacji (Heckmann i in. 2011). Poza tym obecność egzogennej zeatyny wywołuje ekspresję genów kodujących tzw. wczesne noduliny, takich jak *ENOD11*, *NIN*, *NSP1* i *NSP2* u *M. truncatula* i *L. japonicus* (Plet i in. 2011; Heckmann i in. 2011). Ponadto u roślin z gatunku *M. truncatula* posiadających mutację w genie *cre1*, kodującym receptor cytokin, zaobserwowano upośledzenie procesu formowania brodawek korzeniowych oraz wzrost liczby porzuconych przez rizobia nici infekcyjnych na granicy epidermy i kory pierwotnej (Gonzalez-Rizzo i in. 2006; Plet i in. 2011). Dane te wskazują, iż zarówno wydłużanie nici infekcyjnych jak i tworzenie brodawek korzeniowych zależą od sygnałów przekazywanych przez cytokininy. Ponadto niezdefiniowane brodawki korzeniowe powstające u roślin posiadających mutację w genie *cre1* charakteryzowały się zwielokrotnieniem strefy merystematycznej, co sugeruje że w brodawkach tego typu cytokininy mogą również regulować przejście komórek z tej strefy do stref różnicowania i elongacji (Plet i in. 2011).

Kolejną grupą związków organicznych należących do hormonów roślinnych są gibereliny. Cechą charakterystyczną tych fitohormonów jest obecność w ich strukturze szkieletu węglowego entgiberelinanu. W organizmach roślin największe znaczenie ma kwas giberelinowy (GA_1), który jest syntetyzowany z aldehydu 3-fosfoglicerynowego w młodych tkankach pędów i nasionach.

Gibereliny biorą udział w wielu procesach w trakcie wzrostu i rozwoju roślin. Jednym z nich jest wzrost elongacyjny części nadziemnych wynikający z indukcji podziałów komórkowych i wydłużania komórek w pędach. Kwas giberelinowy ponadto może powodować przedwczesne formowanie nasion u roślin dnia długiego. Zjawisko to jest bardzo niekorzystne w uprawach ogrodniczych, ponieważ warzywa należące do roślin dnia długiego nie wykształcają wówczas w pełni organów jadalnych angażując substancje pokarmowe we wzrost pędu kwiatowego i formowanie nasion. Gibereliny uczestniczą również w procesie kiełkowania nasion poprzez stymulację produkcji α -amylazy hydrolizującej skrobię obecną w bielmie do glukozy.

Gibereliny uczestniczą również w regulacji procesu formowania brodawek korzeniowych. Jednym z dowodów jest wynik badań przeprowadzonych na mutantach grochu siewnego (*P. sativum*), w których wyciszono geny odpowiedzialne za syntezę kwasu giberelinowego. U roślin tych stwierdzono znaczną redukcję liczby wytworzonych brodawek korzeniowych, które ponadto charakteryzowały się bladym zabarwieniem i zdecydowanie mniejszymi rozmiarami w porównaniu do brodawek korzeniowych wytwarzanych przez rośliny typu dzikiego (Ferguson i in. 2005). W kolejnym eksperymencie przeprowadzonym przez Fergusona i wsp. wspomniane wcześniej mutanty traktowano roztworem gibereliny GA_3 będącej analogiem kwasu giberelinowego wytwarzanym przez grzyby z gatunku *Fusarium moniliforme*. Zabieg ten pozwolił na przywrócenie wyglądu brodawek obecnych na korzeniach mutantów do stanu w jakim występują one u roślin typu dzikiego. Jednakże stwierdzono również, że zbyt wysokie stężenie giberelin w pożywce (10^{-3} M) hamuje proces nodulacji (Ferguson i in. 2011). Wyniki te wskazują, że proces formowania brodawek korzeniowych wymaga obecności giberelin w optymalnym stężeniu. Inne badania wykazały, że zastosowanie GA_3 w uprawach *L. japonicus* i *M. truncatula* hamuje indukowane przez czynniki Nod skręcanie końcówek korzeni włosowatych będące pierwszym etapem tworzenia nici infekcyjnych oraz formowania brodawek korzeniowych. Natomiast późniejsze zastosowanie inhibitora biosyntezy giberelin- paklobutrazolu (PAC) przywracało intensywność początkowych etapów tworzenia układu

symbiotycznego, co wskazuje na to, że gibereliny działają jako negatywny regulator formowania nici infekcyjnych (Maekawa i in. 2009).

Przytoczone wyniki wskazują na różnorodne działanie giberelin w trakcie nawiązywania symbiozy pomiędzy roślinami bobowatymi a rizobiami. Gibereliny hamują formowanie nici infekcyjnych ale promują uzyskiwanie właściwej morfologii brodawek korzeniowych. Prawdopodobnie wynika to z faktu uczestnictwa tej grupy fitohormonów w procesach podziałów komórkowych, które leżą u podstaw formowania brodawek.

Kolejnym fitohormonem o dużym znaczeniu dla regulacji procesów fizjologicznych zachodzących w tkankach roślin jest kwas abscysynowy (ABA), który jest syntetyzowany z aldehydu 3-fosfoglicerynowego w korzeniach i młodych liściach w odpowiedzi na niedobór wody w podłożu. Po zaindukowaniu biosyntezy wspomniany fitohormon rozprowadzany jest do innych organów rośliny za pośrednictwem ksylemu i floemu.

Jak wspomniano, kwas abscysynowy jest syntetyzowany przez roślinę w odpowiedzi na stres suszy. W związku z tym, jego rolą jest przeciwdziałanie negatywnym skutkom niedoboru wody między innymi poprzez ograniczenie parowania z powierzchni nadziemnych organów rośliny poprzez zamykanie aparatów szparkowych. Ponadto kwas abscysynowy hamuje wzrost pędów i liści przyspieszając jednocześnie wzrost korzeni, umożliwiając tym samym roślinie popieranie wody z głębiej położonych warstw podłoża. ABA indukuje również syntezę materiałów zapasowych w nasionach, umożliwiając w ten sposób roślinom przetrwanie okresowych niedoborów wody w postaci form spoczynkowych. Ponadto kwas abscysynowy obecny w nasionach przeciwdziała w warunkach suszy syntezie α -amylaz indukowanej przez gibereliny, uniemożliwiając kiełkowanie w czasie niedoboru wody.

Kwas abscysynowy, jako fitohormon odpowiedzialny za ochronę rośliny przed stresem suszy bierze również udział w regulacji procesu brodawkowania, zapobiegając nadmiernemu obciążeniu organizmu w niesprzyjających warunkach. Dowodem na hamowanie procesu formowania brodawek korzeniowych przez kwas abscysynowy jest wynik badań, w których zastosowanie egzogenne ABA silnie zahamowało proces brodawkowania zarówno w przypadku roślin wytwarzających brodawki zdeterminowane (np. *L. japonicus*) jak i niezdeteminowane (np. *M. truncatula*) (Suzuki i in. 2004; Ding i in. 2008). Zastosowanie egzogenne kwasu abscysynowego w przypadku komonicy japońskiej spowodowało znaczny spadek liczby nici infekcyjnych oraz hamowało proces transportu wapnia do korzeni włosowatych, wpływając tym samym negatywnie na początkowe etapy infekcji. Późniejsze zastosowanie abaminy, specyficznego inhibitora biosyntezy ABA, spowodowało wzrost liczby nowopowstałych brodawek korzeniowych (Suzuki i in. 2004). Podobne obserwacje poczynili Ding i wsp. w badaniach z wykorzystaniem *M. truncatula*. W wyniku eksperymentu polegającego na traktowaniu wymienionej rośliny modelowej egzogenным kwasem abscysynowym zaobserwowali oni spadek wydajności transportu wapnia do korzeni włosowatych. Efekt ten został jednak odwrócony po wypłukaniu ABA za pomocą 1 nM mieszaniny czynników Nod. Ponadto zaobserwowano, że kwas abscysynowy hamuje ekspresję wczesnych nodulin takich jak *ENOD11* i *RIP*, która jest indukowana przez wydzielane przez rizobia czynniki Nod (Ding i in. 2008).

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że kwas abscysynowy działa jako negatywny regulator początkowych etapów nawiązywania symbiozy pomiędzy roślinami bobowatymi i rizobiami.

Kwas salicylowy (SA) przez wiele lat był uważany za substancję występującą wyłącznie w tkankach roślin z rodzaju *Salix*. Aktualnie jednak znany jest jako powszechnie występujący związek biorący udział w odpowiedzi na atak patogenów.

Kwas salicylowy wpływa również na proces formowania brodawek korzeniowych. Wykazano, że zastosowanie egzogenne SA hamuje rozwój brodawek korzeniowych u lucerny siewnej (*Medicago sativa*) jednakże nie zaobserwowano podobnego efektu u *L. japonicus* (van Spronsen i in. 2003; Nakagawa i Kawaguchi 2006). Potwierdzeniem udziału kwasu salicylowego w procesie formowania brodawek korzeniowych są również wyniki eksperymentu przeprowadzonego na transgenicznym roślinach *L. japonicus* i *M. truncatula* charakteryzujących się nadekspresją genu *NahG* pochodzącego z bakterii *Pseudomonas putida*. Gen ten koduje enzym

katalizujący reakcję rozkładu kwasu salicylowego do katecholu znacznie obniżając stężenie endogennego SA. W przypadku *L. japonicus* zaobserwowano zmniejszenie liczby formujących się nici infekcyjnych i brodawek korzeniowych. Natomiast w przypadku *M. truncatula* nie zaobserwowano żadnych różnic w liczbie brodawek korzeniowych oraz nici infekcyjnych w porównaniu do roślin typu dzikiego (Stacey i in. 2006).

Powyższe wyniki dowodzą różnic we wpływie kwasu salicylowego na formowanie brodawek korzeniowych w zależności od ich typu. W przypadku *L. japonicus* wytwarzającego zdeterminowane brodawki korzeniowe zauważalny jest pozytywny wpływ SA na proces ich formowania. Natomiast w przypadku *M. sativa* i *M. truncatula* wytwarzających niezdedeterminowane brodawki korzeniowe, zauważalny jest hamujący wpływ kwasu salicylowego na ich tworzenie.

Kolejnym hormonem występującym w organizmach roślin jest, należący do metyloestrów, kwas jasmonowy (JA). Fitohormon ten zawdzięcza swoją nazwę roślinie z gatunku *Jasminum officinale*, u której związek ten jest jedną z głównych substancji zapachowych. Kwas jasmonowy odgrywa bardzo istotną rolę w obronie roślin przed atakiem szkodników, indukując syntezę inhibitorów proteinaz obecnych w przewodzie pokarmowym owadów. Ponadto JA hamuje kiełkowanie nasion i wzrost roślin jednocześnie przyspieszając procesy starzenia się komórek, opadanie liści, formowanie bulw i kłączy, gnicie owoców oraz syntezę pigmentów.

Kwas jasmonowy bierze również udział w regulacji procesu brodawkowania. W przypadku roślin typu dzikiego *L. japonicus* jak i jej mutantów o zwiększonej wydajności tworzenia brodawek korzeniowych, traktowanie pędów kwasem jasmonowym silnie hamuje proces brodawkowania. Ponadto JA inhibuje wczesne etapy nodulacji takie jak formowanie nici infekcyjnych czy ekspresja genów wczesny nodulin takich jak *NIN*, *RIP*, *ENOD11* (Nakagawa i Kawaguchi 2006). W przeciwieństwie do przytoczonych powyżej wyników Suzuki i wsp. wykazali indukcję formowania brodawek korzeniowych przez roślinę modelową *L. japonicus* po traktowaniu 0,1 nM kwasem jasmonowym (Suzuki i in. 2011). Zahamowanie procesu tworzenia brodawek korzeniowych zaobserwowano również po traktowaniu liści soi roztworem zawierającym inhibitory biosyntezy kwasu jasmonowego (Kinkema i Gresshoff 2008).

Powyższe wyniki wskazują, że kwas jasmonowy może funkcjonować zarówno jako pozytywny jak i negatywny regulator procesu tworzenia brodawek korzeniowych w zależności od gatunku rośliny jak i stężenia fitohormonu.

4. Podsumowanie

Proces formowania brodawek korzeniowych oraz nawiązanie efektywnej symbiozy pomiędzy roślinami bobowatymi a bakteriami brodawkowymi należy do jednych z najważniejszych procesów warunkujących istnienie życia na Ziemi, ponieważ leży u podstaw cyklu obiegu azotu w przyrodzie. Inicjacja tworzenia wspomnianego układu symbiotycznego zależy przede wszystkim od skuteczności wymiany sygnałów molekularnych pomiędzy dwoma przyszłymi partnerami. Jednakże nie bez znaczenia są również mechanizmy regulatorowe funkcjonujące wewnątrz organizmów roślin, których główną rolą jest zapobieganiu nadmiernemu obciążeniu makrosymbionta przez zbyt dużą liczbę brodawek korzeniowych. Jednym z głównych elementów regulacji są fitohormony, które mogą funkcjonować zarówno jako pozytywne jak i negatywne regulatory brodawkowania.

Zarówno auksyny jak i cytokiny promują tworzenie brodawek korzeniowych. Ponadto w brodawkach niezdedeterminowanych cytokiny mogą regulować proces przejścia komórek ze strefy merystematycznej do strefy różnicowania i elongacji. Gibereliny natomiast działają jako negatywny regulator formowania nici infekcyjnych ale jednocześnie promują prawidłową morfologię brodawek korzeniowych. Z kolei kwas abscysynowy biorący udział między innymi w odpowiedzi rośliny na stres suszy działa jako negatywny regulator początkowych etapów tworzenia układu symbiotycznego roślin bobowatych z rizobiami. Natomiast działanie kwasu salicylowego uzależnione jest od typu brodawek korzeniowych. SA jest pozytywnym regulatorem rozwoju brodawek zdeterminowanych i negatywnym brodawek niezdedeterminowanych. Z kolei kwas jasmonowy może funkcjonować zarówno jako regulator pozytywny jak i negatywny w zależności od jego stężenia oraz gatunku rośliny.

5. Literatura

- Ding Y, Kalo P, Yendrek C i in. (2008) Absciscic Acid Coordinates Nod Factor and Cytokinin Signaling during the Regulation of Nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 20:2681–2695.
- Ferguson BJ, Foo E, Ross JJ i in. (2011) Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in *Pisum sativum*. *New Phytol* 189:829–842.
- Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB (2005) Nodulation Phenotypes of Gibberellin and Brassinosteroid Mutants of Pea. *Plant Physiology* 138:2396–2405.
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:280–300.
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell* 18:2680–2693.
- Heckmann AB, Sandal N, Bek AS i in. (2011) Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1385–1395.
- Huo X, Schnabel E, Hughes K i in. (2006) RNAi Phenotypes and the Localization of a Protein::GUS Fusion Imply a Role for *Medicago truncatula* PIN Genes in Nodulation. *J Plant Growth Regul* 25:156–165.
- Kinkema M, Gresshoff PM (2008) Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1337–1348.
- Maekawa T, Maekawa-Yoshikawa M, Takeda N i in. (2009) Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant J* 58:183–194.
- Mathesius U, Schlaman HRM, Spaik HP i in. (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant Journal* 14:23–34.
- Nakagawa T, Kawaguchi M (2006) Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 47:176–180.
- Noorden GE van, Ross JJ, Reid JB i in. (2006) Defective Long-Distance Auxin Transport Regulation in the *Medicago truncatula* super numeric nodules Mutant. *Plant Physiology* 140:1494–1506.
- Plet J, Wasson A, Ariel F i in. (2011) MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 65:622–633.
- Rightmyer AP, Long SR (2011) Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncatula* in response to auxin transport inhibitors. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1372–1384.
- Skorupska A, Janczarek M, Marczak M i in. (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions: *Microb. Cell Fact.* 5:7
- Stacey G, McAlvin CB, Kim SY, i in. (2006) Effects of Endogenous Salicylic Acid on Nodulation in the Model Legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 141:1473–1481.
- Suzuki A, Akune M, Kogiso M i in. (2004) Control of nodule number by the phytohormone abscisic Acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol* 45:914–922.
- Suzuki A, Suriyagoda L, Shigeyama T i in. (2011) *Lotus japonicus* nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16837–16842.
- Thimann KV (1936) On the Physiology of the Formation of Nodules on Legume Roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22:511–514
- van Spronsen PC, Tak T, Rood AMM i in. (2003) Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Mol Plant Microbe Interact* 16:83–91.

19. Rola izomeraz peptydyloprolilowych w epigenetycznej regulacji ekspresji genów

Role of peptidyl-prolyl isomerases in epigenetic regulation of gene expression

Olejnik Przemysław

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Opiekun naukowy: dr hab. Katarzyna Nuc

Olejnik Przemysław: przemyslaw.olejnik.92@gmail.com

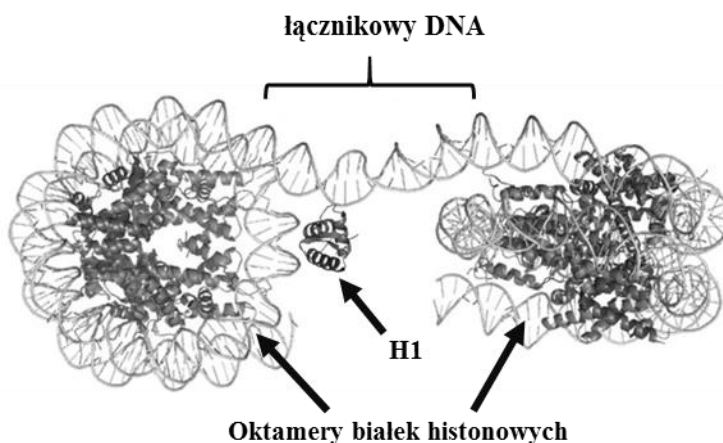
Słowa kluczowe: parwuliny, białka wiążące FK506, cyklofiliny, izomeryzacja *cis/trans*

Streszczenie

Potranslacyjne modyfikacje białek stanowią dynamiczną i odwracalną metodę kontrolowania ich funkcji i przekazywania sygnałów wewnątrz komórki. W ostatniej dekadzie coraz częściej pojawiają się doniesienia dotyczące udziału izomeraz peptydyloprolilowych (PPI) w sygnalizacji i potranslacyjnych modyfikacjach białek. Dotychczas zidentyfikowano trzy rodziny wspomnianych izomeraz: parwuliny, cyklofiliny i białka wiążące FK506 (FKBP), których cechą wspólną jest zdolność katalizowania izomeryzacji wiązania peptydowego pomiędzy proliną a dowolnym poprzedzającym ją w sekwencji białka aminokwasem, co może regulować zarówno strukturę, jak i funkcję białek. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie roli izomeraz peptydyloprolilowych w metylacji i acetylacji białek histonowych mających wpływ na regulację ekspresji genów związanej ze stopniem kondensacji chromatyny w jądrze komórkowym.

1. Wstęp

W organizmach eukariotycznych kwas deoksyrybonukleinowy, będący nośnikiem informacji genetycznej, znajduje się w jądrze komórkowym. Jednakże, ze względu na niewielki rozmiar tego organellum w porównaniu do długości obecnych w jego wnętrzu cząsteczek DNA, konieczny jest bardzo wysoki stopień kondensacji kwasu deoksyrybonukleinowego. Dlatego też informacja genetyczna występuje w jądrze komórkowym w postaci kompleksu nukleoproteinowego zwanego chromatyną. Wyróżniamy dwa rodzaje chromatyny różniące się między sobą stopniem upakowania a co za tym idzie aktywnością transkrypcyjną. Jednym z nich jest silnie skondensowana heterochromatyna, która ze względu na duży stopień upakowania informacji genetycznej nie jest aktywna transkrypcyjnie. Z kolei euchromatyna dzięki luźniejszej strukturze DNA jest aktywna transkrypcyjnie, ponieważ jej mniej skondensowana struktura umożliwia dostęp czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA do elementów regulatorowych genów.



Rys. 1. Schemat upakowania kwasu deoksyrybonukleinowego w chromatynie (Panday i Grove 2016).

Podstawową jednostką w strukturze chromatyny jest nukleosom, którego rdzeń zbudowany jest z oktameru białek, składającego się z par histonów H2A, H2B, H3 i H4. Każdy z rdzeni histonowych otoczony jest fragmentem DNA o długości około 146 par zasad. Ponadto pomiędzy oktamerami występuje fragment tak zwanego łącznikowego DNA o długości od 20 do 80 par zasad. W nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatynie fragment ten może łączyć się z piątym rodzajem białka histonowego zwanego histonem H1, co znacznie zwiększa stopień upakowania materiału genetycznego (Panday i Grove 2016). (Rys. 1)

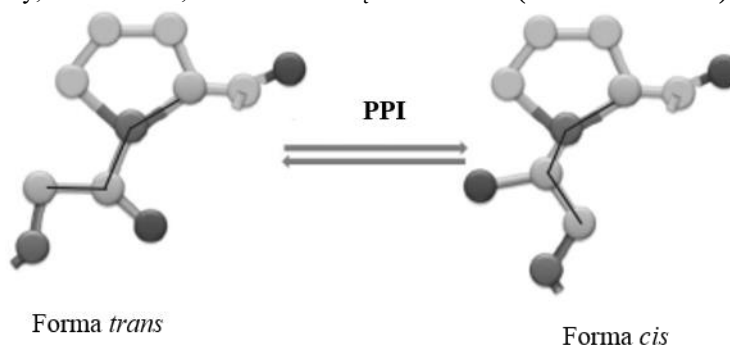
Pomimo dużego stopnia upakowania kwasu deoksyrybonukleinowego w jądrze komórkowym określone fragmenty muszą być dostępne dla czynników transkrypcyjnych i kompleksów białek odpowiedzialnych między innymi za replikację i naprawę DNA. W związku z tym u organizmów eukariotycznych występują mechanizmy umożliwiające rozluźnianie lub zwiększenie kondensacji chromatyny. Należą do nich między innymi modyfikacje DNA i białek histonowych.

2. Opis zagadnienia

Zdecydowana większość wiązań peptydowych w białkach występuje w konfiguracji *trans*. Wynika to z faktu, że taka struktura połączeń pomiędzy aminokwasami jest korzystniejsza energetycznie ze względu na brak ewentualnej zwady przestrzennej wynikającej ze struktury bocznych łańcuchów reszt aminokwasowych. Jeden z nielicznych wyjątków stanowi wiązanie pomiędzy proliną a dowolnym aminokwasem poprzedzającym ją w pierwszorzędowej strukturze białek (Xaa-Pro, gdzie Xaa to dowolny aminokwas), które może występować w konfiguracji *cis* i *trans*. Jednakże proces przejścia z konformacji *cis* do *trans* i na odwrót jest bardzo czasochłonny i stanowi etap limitujący tempo fałdowania białek warunkujący im pełnienie określonych funkcji w komórce (Wedemeyer i in 2003). Izomerazy peptydyloprolilowe to grupa białek, które katalizują ten proces umożliwiając białkom uzyskanie struktury natywnej. (Rys. 2)

Niektóre spośród izomerazy peptydyloprolilowych zaliczane są do rodziny białek określanej jako immunofiliny, czyli białek biorących udział w procesie odpowiedzi immunologicznej komórki. Do immunofiliny należą: białka oddziałujące z FK506 (FKBP ang. FK506 binding protein) i cyklofiliny. Trzeci rodzaj izomerazy peptydyloprolilowych stanowią parwuliny, które nie wykazują właściwości immunosupresyjnych (Wang i Heitman 2005).

Parwuliny (łac.: parvulus, bardzo mały) to izomerazy peptydyloprolilowe, które występują zarówno u prokariotów, jak i eukariotów. W przeciwieństwie do innych rodzin PPI, parwuliny nie oddziałują z lekami o działaniu immunosupresyjnym. Białka te są klasyfikowane na podstawie homologii do małego prokariotycznego PPI, pierwotnie opisanego w *E. coli*. Genom ludzki koduje dwa białka parwuliny, Pin1 i Pin14, a także izoformę Pin14 Pin17 (Mueller i in. 2006).



Rys. 2. Schemat reakcji izomeryzacji wiązania peptydowego X-Pro katalizowanej przez izomerazy peptydyloprolilowe (Kumari i in. 2012).

Cyklofiliny zawdzięczają swoją nazwę powinowactwu do cyklosporyny A (CsA) będącej środkiem o działaniu immunosupresyjnym. Podobnie jak parwuliny, cyklofiliny są konserwatywną grupą białek występującą zarówno u prokariotów jak i eukariotów. Jednakże różnorodność tych

białek w organizmach jest znacznie większa w porównaniu z parwulinami. W komórkach człowieka występuje szesnaście cyklofilin, podczas gdy u muszki owocówki tylko dziewięć, a u drożdży osiem. Cyklofiliny różnią się rozmiarem i strukturą: CypA zawiera pojedynczą domenę cyklofilinową i jest białkiem o masie 18 kDa, podczas gdy nukleoporyna (RanB2 / Nup358) jest cyklofiliną wielodomenową o wielkości ponad 350 kDa (Dilworth i in. 2011).

Białka oddziałujące z FK506 zostały zidentyfikowane jako wewnątrz komórkowy receptor dla immunosupresanta FK506. Podobnie jak cyklofiliny i parwuliny białka te występują zarówno u prokariotów jak i eukariotów a ich liczba w komórkach rośnie wraz ze złożonością organizmu.

W ostatnich latach wykazano również udział wspomnianych białek w procesie acetytacji i metylacji odpowiedzialnych za zmianę stopnia kondensacji chromatyny.

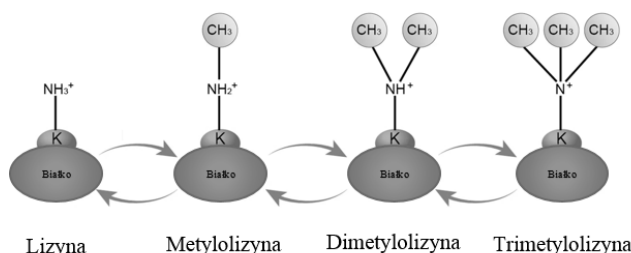
3. Przegląd literatury

Bardzo istotnym elementem epigenetycznej regulacji ekspresji genów są potranslacyjne modyfikacje białek histonowych. Jednym z nich jest acetylacja histonów, której podlegają reszty lizyny obecne w ich sekwencji. Reakcja acetytacji katalizowana jest przez acetylotransferazy histonowe (HATs- *histone acetyltransferases*), które przyłączają grupę acetylową do zlokalizowanej w resztach lizyny grupy ε-aminowej. W wyniku pojawienia się tej modyfikacji dochodzi do rozluźnienia struktury chromatyny co umożliwia dostęp czynników transkrypcyjnych, a co za tym idzie ekspresję genów. Odwrotną reakcją polegającą na odłączeniu grupy acetylowej od reszty lizyny jest deacetylacja katalizowana przez enzymy należące do deacetylaz histonów (HDACs- *histone deacetylases*). Odłączenie grup acetylowych od reszt lizyny obecnych w sekwencji histonów prowadzi do kondensacji chromatyny i inaktywacji transkrypcji genów (Schleithoff i in. 2012).

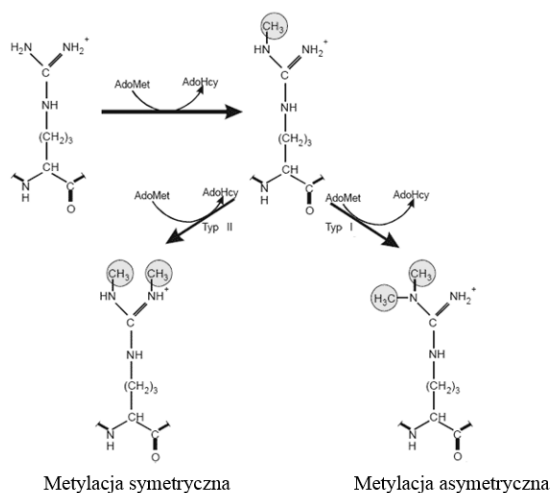
Niektóre izomeryzy peptydyloprolilowe mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów wpływając na proces acetytacji i deacetylacji białek histonowych. Dowodem tego jest udział białek CprI oraz EssI we wspomnianych procesach u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Białko CprI będące analogiem cyklofiliny A człowieka jest składnikiem dwóch kompleksów deacetylaz histonów Sin3-Rpd3 i Set3 (Arévalo-Rodríguez i in. 2000; Pijnappel i in. 2001). Zarówno CprI, jak i należące do parwulin, białko EssI oddziałują z deacetylazą histonów Sin3-Rpd3. Ponadto te dwie izomeryzy działają w sposób antagonistyczny względem siebie. Białko CprI promuje składanie wspomnianego kompleksu deacetylazy a co za tym idzie kondensację chromatyny. Z kolei białko EssI hamuje aktywność HDAC Sin3-Rpd3 promując transkrypcję genów (Arévalo-Rodríguez i in. 2000). Poza tym białko CprI stanowi, wraz z deacetylazami: Hos2 i HstI, element kompleksu deacetylazy histonów Set3. Arévalo-Rodríguez i Heitman wykazali że CprI jest wymagany do indukcji genów *IME1* i *IME2*, których ekspresja warunkuje wydajną sporulację u tego gatunku drożdży. W eksperymencie z wykorzystaniem mutantów drożdży posiadających mutację w obrębie miejsca aktywnego izomeryzy CprI stwierdzono znaczny spadek liczby wytwarzanych przez grzyby spor co wskazuje na udział tej izomeryzy peptydyloprolilowej w indukcji genów sporulacji (Arévalo-Rodríguez i Heitman 2005). Niedawno odkryto rolę kompleksu Set3 w utrzymywaniu acetytacji na końcu 5' regionów transkrybowanych (Kim i Buratowski 2009). Zdolność tego kompleksu do deacetylowania chromatyny wymaga produktu genu *cpr1*. Powyższe dane sugerują, że CprI uczestniczy w regulacji co najmniej dwóch różnych kompleksów HDAC w drożdżach.

Kolejną potranslacyjną modyfikacją białek histonowych jest ich metylacja oraz demetylacja. W obrębie histonów modyfikacja ta dotyczy reszt lizyny (K), które mogą podlegać mono- di- lub trój metylacji oraz argininy ulegające mono- lub dimetylacji. (Rys. 3, Rys 4.) Pomimo tego, że metylacja nie wpływa bezpośrednio na strukturę chromatyny może powodować powstanie miejsc wiązania białek mających wpływ na jej kondensację i dekondensację (Schleithoff i in. 2012).

Za reakcja metylacji białek histonowych odpowiedzialne są metylotransferazy (HMTs- *histone methyltransferases*) katalizujące przyłączanie grupy metylowej. Natomiast za przeciwną reakcję odpowiedzialne są demetylazy histonów. Wspomniane modyfikacje białek histonowych w połączeniu z ich acetytacją tworzą charakterystyczny wzór poszczególnych białek histonowych, który determinuje oddziaływanie DNA z czynnikami transkrypcyjnymi regulując tym samym ekspresję genów (Adcock i in. 2006).



Rys. 3. Schemat metylacji i demetylacji reszt lizyny w białkach histonowych (Han i in. 2019).

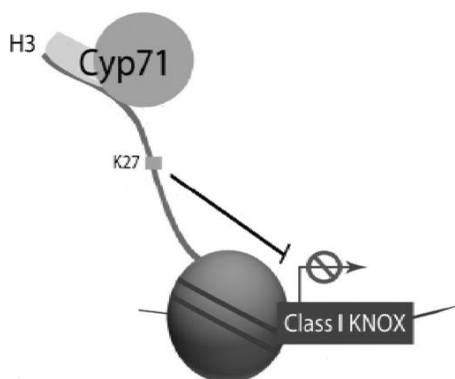


Rys. 4. Schemat metylacji reszt argininy w białkach histonowych (Wang i in. 2019).

Najlepiej poznanymi metylacjami białek histonowych są te dotyczące histonów H3 i H4. Modyfikacje te pojawiając się w różnych regionach genów mogą zarówno prowadzić do rozluźnienia struktury chromatyny i ekspresji genów jak i kondensacji nukleoproteiny np. potrójna metylacja lizyny w pozycjach 9, 27 i 36 histonu H3 oraz 20 histonu H4 prowadzą do kondensacji chromatyny. Z kolei te same modyfikacje w pozycjach 4 i 79 w histonie H3 promują formowanie euchromatyny.(Adcock i in. 2006; Grønbaek i in. 2007; Schleithoff i in. 2012; Choi i Lee 2013).

Również izomerazy peptydyloprolilowe mogą być zaangażowane w procesy metylacji białek histonowych a co za tym idzie mieć wpływ na ekspresję genów. Cyklofilina 71 (Cyp71) *Arabidopsis thaliana* jest wysoce konserwatywnym białkiem zawierającym na końcu aminowym czterokrotnie powtórzony motyw WD40 i domenę cyklofilinową na końcu karboksylowym. Wykazano, że rośliny posiadające mutację w obrębie genu kodującego tę cyklofilinę charakteryzują się zmianami fenotypowymi spowodowanym przez nieprawidłową ekspresją genów *KNOX*, których produkty należą do czynników transkrypcyjnych biorących między innymi udział w odbieraniu sygnałów przenoszonych przez hormony roślinne (Jasinski i in. 2005; Li i in. 2007). Dowodem bezpośredniej roli Cyp71 w ekspresji genów *KNOX* jest obecność tego białka wśród czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ekspresję dwóch spośród nich (*STM* i *KNAT1*). Ponadto wykazano, że cyklofilina 71 *A.thaliana* oddziałuje bezpośrednio z histonem H3 za pomocą motywów WD40 oraz fragmentu łączącego je z domeną cyklofilinową, co wskazuje, iż odpowiadają one za nakierowywanie izomeraz peptydyloprolilowych na histony. Poza tym stwierdzono, że u roślin z wyciszonym genem kodującym Cyp71 nastąpiło zmniejszenie częstotliwości metylacji lizyny w pozycji 27 histonu H3 (H4K27) w pobliżu genów *STM* i *KNAT1*(Li i in. 2007). Na podstawie

powyższych rezultatów można stwierdzić, że cyklofilina 71 *A. thaliana* promuje metylację H3K27 pomagając w wyciszaniu wspomnianych genów. (Rys 5.).

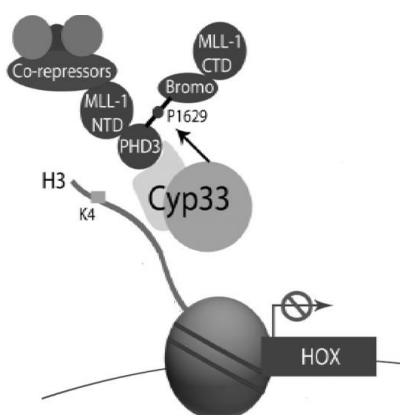


Rys. 5. Cyklofilina 71 *A. thaliana* oddziałuje za pośrednictwem powtórzeń WD40 z ogonem histonu H3 wzmacniając metylację lizyny w pozycji 27 (Dilworth i in. 2011).

Kolejnym dowodem na udział izomeraz peptydyloprolinowych w potranslacyjnej modyfikacji histonów jest cyklofilina 33 (Cyp33) człowieka zawierająca na końcu aminowym domenę rozpoznającą RNA i domenę cyklofilinową na końcu karboksylowym. Wykazano, że izomeraza ta oddziałuje z metylotransferazą MLL-1. Dowodów na fizyczne powiązanie tych dwóch białek dostarczyły wyniki badań z wykorzystaniem koimmunoprecypitacji, które dowiodły że białka te oddziałują ze sobą bezpośrednio za pomocą palca PHD3 metylotransferazy i domeny RRM cyklofiliny 33. Dodatkowym dowodem jest fakt, iż MLL-1 i Cyp33 wykazują zbliżone wzorce lokalizacji jądrowej, co dodatkowo sugeruje udział tych dwóch enzymów w podobnych procesach jądrowych i kompleksach białkowych. Ponadto wykazano, że nadekspresja Cyp33 skutkuje obniżeniem poziomu ekspresji genów *HOXC8* i *HOXC9* w warunkach *in vitro*. Zmian ekspresji nie obserwowano jednak, gdy domeny RRM i cyklofilinowa ulegały nadekspresji oddzielnie, co wskazuje na konieczność obecności całej Cyp33 w celu zmiany wzorców regulacji transkrypcji (Fair i in. 2001). Jeden z modeli wyjaśniających mechanizm działania kompleksu MLL-1/Cyp33 zakłada, że izomeryzacja wiązania peptydowego pomiędzy proliną w pozycji 1629 a poprzedzającym ją aminokwasem znajdującymi się w łączniku pomiędzy domenami PHD3 i Bromo w metylotransferazie MLL-1 powoduje zmianę jego funkcjonowania z aktywatora w represor. Izomeryzacja wiązania peptydowego katalizowana przez domenę cyklofilinową Cyp33 prowadzi do reorganizacji pobliskich domen co powoduje udostępnienie miejsca wiązania domeny RRM cyklofiliny 33 z domeną PHD3 białka MLL-1. (Rys. 6) Ponadto wzajemne oddziaływanie tych domen zapobiega interakcji domeny PHD z metyloargininą w pozycji 4 histonu H3 (H3K4) (Wang i in. 2010).

4. Podsumowanie

Izomerazy peptydyloprolinowe do których należą parvuliny, cyklofiliny i białka wiążące czynniki FK506 posiadają zdolność do katalizowania reakcji izomeryzacji wiązania peptydowego pomiędzy proliną a poprzedzającym ją w sekwencji białkowej aminokwasem przyspieszając tym samym konwersję tego wiązania peptydowego pomiędzy konformacją *cis* i *trans*. Ponadto białka te biorą aktywny udział w kontroli ekspresji genów wynikającej ze zmiany stopnia upakowania chromatyny w jądrze komórkowym eukariotów. W powyższej pracy przedstawiono jedynie kilka przykładów udziału izomeraz peptydyloprolinowych w acetytacji i metylacji jednakże z roku na rok przybywa dowodów potwierdzających rolę tych białek w regulacji ekspresji genów.



Rys. 6. Mechanizm działania kompleksu MLL-1/Cyp33 (Dilworth i in. 2011).

5. Literatura

- Adcock IM, Ford P, Ito K i in. (2006) Epigenetics and airways disease. *Respir Res* 7:21.
- Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME, Wu Xi in. (2000) Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3–Rpd3 histone deacetylase. *EMBO J* 19:3739–3749.
- Arévalo-Rodríguez M, Heitman J (2005) Cyclophilin A Is Localized to the Nucleus and Controls Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 4:17–29.
- Choi JD, Lee JS (2013) Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform* 11:164–173.
- Dilworth D, Gudavicius G, Leung A i in. (2011) The roles of peptidyl-proline isomerases in gene regulation11This review is part of Special Issue entitled Asilomar Chromatin and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*.
- Fair K, Anderson M, Bulanova Ei in. (2001) Protein Interactions of the MLL PHD Fingers Modulate MLL Target Gene Regulation in Human Cells. *Mol Cell Biol* 21:3589–3597.
- GRØNBÆK K, Hother C, Jones PA (2007) Epigenetic changes in cancer. *Apmis* 115:1039–1059
- Han D, Huang M, Wang T i in. (2019) Lysine methylation of transcription factors in cancer. *Cell Death Dis* 10:1–11.
- Jasinski S, Piazza P, Craft J i in. (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* 15:1560–1565.
- Kim T, Buratowski S (2009) Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions. *Cell* 137:259–272.
- Kumari S, Roy S, Singh P i in. (2012) Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant signaling & behavior* 8: 22734.
- Li H, He Z, Lu Gi in. (2007) A WD40 Domain Cyclophilin Interacts with Histone H3 and Functions in Gene Repression and Organogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19:2403–2416.
- Mueller JW, Kessler D, Neumann Di in. (2006) Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation. *BMC Mol Biol* 7:9.
- Panday A, Grove A (2016) Yeast HMO1: Linker histone reinvented. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81:00037–16
- Pijnappel WW, Schaft D, Roguev A i in. (2001) The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev* 15:2991–3004.
- Schleithoff C, Voelter-Mahlknecht S, Dahmke IN, i in. (2012) On the epigenetics of vascular regulation and disease. *Clin Epigenetics* 4:7.
- Wang P, Heitman J (2005) The cyclophilins. *Genome Biology* 6:226.

- Wang TS, Cheng JK, Lei QY, i in. (2019) A Switch for Transcriptional Activation and Repression: Histone Arginine Methylation. In: Jurga S, Barciszewski J (eds) The DNA, RNA, and Histone Methylomes. Springer International Publishing, Cham, pp 521–541
- Wang Z, Song J, Milne TA i in. (2010) Pro isomerization in MLL1 PHD3-bromo cassette connects H3K4me readout to Cyp33 and HDAC-mediated repression. Cell 141:1183–1194.
- Wedemeyer W, Welker E, Scheraga H (2003) Proline Cis–Trans Isomerization and Protein Folding †. Biochemistry 41:14637–44.

20. Biofortyfikacja agronomiczna sposobem wzbogacania roślin w cynk, selen i żelazo

Szerement Justyna⁽¹⁾, Szatanik-Kloc Alicja⁽³⁾, Jarosz Renata⁽¹⁾, Juda Michał⁽¹⁾,
Marcinińska-Mazur Lidia⁽¹⁾, Trusilewicz Lidia-Natalia⁽¹⁾, Mierzwa-Herszteł Monika^(1,2)

⁽¹⁾Akademia Górniczo-Hutnicza im. S. Staszica w Krakowie; Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska; Katedra Mineralogii, Petrografii i Geochemii, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

⁽²⁾Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej, al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

⁽³⁾Instytut Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk, Zakład Fizykochemii Materiałów Porowatych, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Szerement Justyna: jszerement@gmail.com

Słowa kluczowe: biofortyfikacja, nawożenie roślin, mikroelementy

Streszczenie

Około 30% ludności na świecie cierpi z powodu tzw. „ukrytego głodu” – niedożywienia, spowodowanego m.in. niedoborem kluczowych mikroelementów, takich jak cynk, selen i żelazo. Pierwiastki te pełnią wiele istotnych funkcji w organizmie człowieka, a ich niedobór może prowadzić do wielu poważnych zaburzeń. Uboga dieta, zwłaszcza pochodzenia roślinnego, uznawana jest za główną przyczynę niedożywienia mikroelementami. Szybkim, bezpiecznym i skutecznym sposobem wprowadzenia mikroelementów do diety człowieka jest biofortyfikacja agronomiczna, dzięki której przy pomocy nawozów w sposób bezpośredni można zwiększyć zawartość mikroelementów w częściach jadalnych nawożonych roślin. Celem pracy jest omówienie głównych czynników wpływających na efektywność biofortyfikacji agronomicznej wybranymi mikroelementami oraz przedstawienie wyników badań dotyczących nawożenia roślin uprawnych cynkiem, selenem i żelazem, opublikowanych po 2015 roku.

1. Wstęp

Według danych Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa około 2 biliona ludzi na świecie (jedna na trzy osoby) cierpi z powodu niedoboru mikroelementów. Problem ten często nazywany jest terminem „ukrytego głodu” i najczęściej dotyczy dzieci w fazie rozwoju i wzrostu, kobiety w ciąży i w trakcie laktacji, sportowców oraz osoby narażone na duży wysiłek fizyczny. Zjawisko niedożywienia mikroelementami jest bardzo niepokojącym zjawiskiem, ponieważ mikroelementy odgrywają znaczącą rolę w prawidłowym funkcjonowaniu całego organizmu człowieka. Cynk (Zn) reguluje pracę ponad 200 enzymów i odgrywa ważną rolę w procesach odpornościowych. Selen (Se) chroni komórki przed negatywnym wpływem reaktywnych form tlenu. Niedobór Se może prowadzić do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu tarczycy oraz powodować procesy uszkodzenia komórek i przyspieszenia starzenia się komórek, zwiększając prawdopodobieństwo zachorowania na nowotwory, cukrzycę, miażdżycę oraz choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Parkinsona czy Alzheimera. Żelazo (Fe) jest składnikiem hemoglobiny, która transportuje tlen. Z jego niedoborem wiąże się ryzyko pojawienia anemii, zwanej również niedokrwistością, z powodu której cierpi około jedna czwarta światowej populacji. W Tab. 1. przedstawiono dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na każdy z wyżej wymienionych mikroelementów.

2. Opis zagadnienia

W celu złagodzenia problemu niedożywienia wprowadzane są preparaty wzbogacające dietę człowieka przede wszystkim w brakujące mikroelementy. Powstaje również wiele programów, w tym Harvest Plus, badających wpływ nawożenia upraw (głównie pszenicy, kukurydzy, ryżu i soi) mikroelementami na zwiększenie zawartości m.in. tych mikroelementów w jadalnych częściach

roślin. Testuje się również wzbogacanie żywności w mikroelementy lub suplementację diety. To podejście wymaga jednak stałych i stosunkowo dużych nakładów finansowych, co w konsekwencji ze względów społeczno-ekonomicznych nie jest dostępne dla wszystkich ludzi. Niestety pomimo wielu starań mających na celu wyeliminowanie zjawiska „ukrytego głodu” jest ono ciągle problemem na całym świecie i dotyczy nie tylko kraje ubogie, ale również te wysoko rozwinięte. Dzieje się tak, ponieważ w ciągu ostatnich 50 lat rolnictwo w krajach rozwijających się w głównym stopniu skupione było na zwiększeniu produkcji i dostępności tzw. roślin podstawowych o dużej kaloryczności. W mniejszym stopniu uwaga była przyłożona do produkcji warzyw wysokiej jakości, które stanowią naturalne, bogate źródło mikroelementów. Ponadto wzrasta ubogość gleb w wybrane mikroelementy lub występują one w nich w formach mniej lub ostatecznie nieprzyswajalnych przez rośliny. Kolejną przyczyną niskiej zawartości mikroelementów w roślinach jest stosowanie do upraw roślin, które mają niską zdolność do ich akumulacji w częściach jadalnych.

Sposobem na zwiększenie zawartości mikroelementów w częściach jadalnych roślin jest biofortyfikacja. Istnieją trzy główne sposoby biofortyfikowania roślin w mikroelementy: biofortyfikacja agronomiczna, w której mikroelementy są dostarczane do roślin przy pomocy organicznych i nieorganicznych nawozów, biofortyfikacja poprzez hodowlę roślin konwencjonalnymi metodami oraz biofortyfikacja wspomagana metodami inżynierii genetycznej (modyfikacje genetyczne). Pomimo faktu, że biofortyfikacja z użyciem narzędzi biotechnologicznych jest uważana za najskuteczniejszą metodę biofortyfikacji roślin, wiele osób wciąż uważa spożywanie roślin modyfikowanych genetycznie za dość kontrowersyjne. Stąd też biofortyfikacja agronomiczna może być uznawana za bezpieczniejszą metodę zwiększania mikroelementów w częściach jadalnych roślin.

Celem pracy jest omówienie najważniejszych czynników wpływających na efektywność biofortyfikacji agronomicznej oraz przykładów biofortyfikacji agronomicznej mikroelementów Zn, Se i Fe dla wybranych roślin uprawnych.

Tab. 1. Zalecane dzienne porcje mikroelementów dla dorosłych (National Institutes of Health Office of Dietary Supplements).

Mikroelement	Dzienne zapotrzebowanie	
	Mężczyźni	Kobiety
Se	55 mg	55 mg
Zn	11 mg	8 mg
Fe	8 mg	18 mg

3. Przegląd literatury

Na efektywność biofortyfikacji agronomicznej ma wpływ wiele czynników, takich jak: właściwości fizyczne, chemiczne i mikrobiologiczne gleby, wybranie odpowiedniej formy aplikowanego mikroelementu, jak również dawki i techniki nawożenia. Ponadto należy pamiętać, aby zastosowana ilość danego mikroelementu nie wpływała negatywnie na wzrost i rozwój roślin. Ważne jest zapewnienie dostatecznej ilości danego mikroelementu, przy jednoczesnym zapewnieniu bezpieczeństwa jego stosowania i minimalizacji skażenia nim środowiska.

3.1 Wpływ właściwości gleby

O tym czy dany mikroelement zostanie pobrany przez roślinę, odpowiada jego biodostępność w glebie. To z kolei związane jest z właściwościami gleby, takimi jak: pH, zawartość materii organicznej, wilgotność, pojemność kationowymienna czy aktywność mikroorganizmów. Ogólna zawartość Zn i Fe w glebach jest stosunkowo wysoka, niemniej jednak wapnowanie gleb w dużym stopniu wpływa na obniżenie ich przyswajalności przez rośliny. W przypadku Se łatwo dostępne dla roślin seleniany (SeO_4^{2-}) w środowisku kwaśnym i obojętnym przechodzą w trudno przyswajalne przez rośliny seleniny (SeO_3^{2-}) lub związki kompleksowe. Ponadto w glebie z powodu podobieństwa chemicznego pierwiastków może występować konkurencja w ich pobieraniu przez rośliny, tak jak w przypadku selenu i siarki.

3.2 Wpływ metody uprawy i rodzaju nawozu

Biofortyfikacja roślin mikroelementami może być przeprowadzana na uprawach glebowych, bezglebowych i hydroponicznych, stosując nawożenie glebowe i dolistne. Wiele badań dotyczy upraw glebowych, przeprowadzanych głównie na mikropoletkach i w doniczkach, niemniej jednak w ostatnich latach coraz więcej doświadczeń przeprowadzanych jest z wykorzystaniem upraw hydroponicznych (poprzez stosowanie roztworów mineralnych zamiast gleby rolniczej), które umożliwiają kontrolę wielu parametrów uprawy, tj.: pH, oświetlenie, wilgotność i skład pożywki. Nawożenie glebowe jest od lat najczęściej stosowaną praktyką. Jednak wiele badań potwierdza tezę, że większą efektywność nawożenia otrzymuje się w przypadku stosowania nawozów dolistnych lub połączenia nawożenia glebowego z dolistnym dokarmianiem. Oprócz zwiększenia zawartości mikroelementów, dzięki bezpośredniej aplikacji nawozu na roślinę, część nawozów może osadzać się w glebie, stając się kolejnym dostępnym źródłem tych mikroelementów w glebie. Należy jednak pamiętać, że wchłanianie składników pokarmowych przez liście jest ograniczone i ściśle związane z warunkami pogodowymi oraz fazą rozwojową rośliny.

Postępy w dziedzinie nanotechnologii pozwoliły na produkcję nawozów o zmniejszonej wielkości cząstek (rzędu lub poniżej 10^{-9} m), dzięki którym mikroelementy są lepiej przyswajalne przez rośliny. Nawozy te aplikowane są w formie dolistnej oraz na etapie zaprawiania nasion. Zastosowanie nanotechnologii w biofortyfikacji mikroelementami może pomóc w promowaniu zrównoważonego rolnictwa poprzez dostarczanie nawozów o spowolnionym lub kontrolowanym uwalnianiu składników. Jedną z głównych zalet tej technologii jest ograniczenie stosowania konwencjonalnych nawozów, które przy długotrwałym stosowaniu mogą powodować podwyższenie zawartości toksycznych składników w glebie. Zmniejszenie wielkości cząstek nawozu dostarcza składniki pokarmowe we właściwe miejsce i w programowalnym interwale czasowym, co efektywnie i skutecznie ułatwia ich przyswajanie przez rośliny. Kolejnym sposobem wzbogacania roślin w Zn, Se i Fe jest zastosowanie nawożenia połączonego z aplikacją bakterii stymulujących wzrost (np. wybranych bakterii z rodzaju *Bacillus*) oraz arbuskularnych grzybów mikoryzowych.

3.3 Wpływ formy pierwiastka i związku chemicznego

Kolejnym bardzo ważnym parametrem wpływającym na efektywność biofortyfikacji agronomicznej mikroelementami jest forma chemiczna pierwiastka. Wiele badań wykazuje, że w przypadku Se większą zawartość tego mikroelementu otrzymuje się przy zastosowaniu selenianu (Se(VI)). Zarówno Zn i Fe występują w nawozach nieorganicznych jako kationy dwuwartościowe. Badania przeprowadzone przez Montoya i in. (2020) potwierdzają przykładowo, że cynk (Zn) w postaci nawozów organicznych jest lepiej przyswajalny przez rośliny, niż jego nieorganiczna forma. W przypadku Fe o wiele większą efektywność nawożenia otrzymuje się natomiast przy zastosowaniu kompleksów Fe-EDDHA i cytrynianu żelaza.

3.4 Wpływ Zn, Fe, Se na jakość odżywczą roślin uprawnych

Rośliny w różnym stopniu pobierają i akumulują mikroelementy. W tej części wyróżniono pozytywny wpływ biofortyfikacji agronomicznej mikroelementami na zwiększenie ich zawartości w roślinach oraz syntezę związków, które wykazują korzystny wpływ na rośliny i zdrowie ludzi. W Tab. 2. przedstawiono wpływ formy pierwiastka, typu, dawki i techniki nawożenia na akumulację Zn, Se i Fe w częściach jadalnych biofortyfikowanych roślin. Akumulację pierwiastków w danej części rośliny podano dla najkorzystniejszej opcji nawożenia.

Zboża

Biofortyfikacja zbóż koncentruje się na lepszym wchłanianiu mikroelementów i ich translokacji do ziaren, a ostatecznie na zwiększaniu ich sekwestracji do bielma (tj. tkanki odżywczej u zarodka rośliny). Wzrost zawartości mikroelementów zaobserwowano po nawożeniu Fe w pszenicy (Muhammad i in. 2016), nawożeniu Zn w pszenicy (Jalal i in. 2020), kukurydzy (Liu i in. 2016) i ryżu (Coffin and Slaton 2020), oraz przy jednoczesnym nawożeniu Zn i Fe w pszenicy (Jalal i in. 2020). Badania wykazały pozytywny wpływ stosowania Se na plon ziarna ryżu (Amato i in. 2018) oraz pszenicy (Manojlović i in. 2019) oraz zwiększenie właściwości antyoksydacyjnych w samym

ziarnie pszenicy (Yin i in. 2020). Zastosowanie nanochelatów Fe zwiększyło zawartość białka w ziarnie (Fakharzadeh i in. 2020).

Tab. 2. Wpływ formy pierwiastka, typu, dawki i techniki nawożenia na akumulację cynku, selenu i żelaza w częściach jadalnych biofortyfikowanych roślin (dane podane w mg dm^{-3} , sucha masa (s.m.), świeża masa (ś.m.)).

Roślina	Forma mikroelementu	Dawka mikroelementu	Typ nawożenia/ rodzaj uprawy	Akumulacja mikroelementu w częściach jadalnych (mg kg^{-1})	Ref.
Pszenica ozima	Se(IV)	5; 10 g ha^{-1} 10 g ha^{-1}	Dolistne Glebowe/ Badania polowe	Ziarno: 0,41 s.m. w przypadku nawożenia dolistnego (10 g ha^{-1})	(Manojlović i in. 2019)
Ryż	MeSeCys + Se(-II), Se(IV), Se(VI),	400 μg 790 μg Se na doniczkę	Dolistne Glebowe/ Badania laboratoryjne: hydroponiczne i glebowe	Ziarno: ok. 0,13 s.m. w przypadku nawożenia dolistnego Se(VI)	(Yin i in.2020)
Groszek uprawny	Se(IV) Se(VI)	10; 20 $\mu\text{M dm}^{-3}$	Hydroponiczne/ Badania laboratoryjne, hydroponiczne	Siewka: 2638,5 (s.m.) w przypadku 20 $\mu\text{M dm}^{-3}$ Se (VI)	(Łukasiewicz i in. 2019)
Kiełki rukoli (R), czerwonej kapusty (CzK) i czerwonej gorczycy (CzG)	Zn(II) Fe(II)	0 - 20 mg dm^{-3} 0 - 40 mg dm^{-3}	Hydroponiczne/ Badania laboratoryjne, hydroponiczne	Zn R: 7,0 CzK: 7,5 CzG: 9,0 Fe: R: 110,7 CzK: 448,5 CzG: 323,3 dla najwyższych dawek nawożenia (ś.m.)	(Di Gioia i in. 2019)
Kiełki grochu	Zn(II)	0 - 60 mg dm^{-3}	Namaczanie lub opryskiwanie nasion/ Badania laboratoryjne	Namaczane: 170 Opryskiwane: 220 dla 60 mg dm^{-3} (ś.m.)	(Lingyun i in. 2016)
Fasola Mung (trzy różne genotypy)	Zn(II)	0,01M 10 kg ha^{-1} 0,5%	Osmotyczne zaprawianie nasion Glebowe Dolistne Mix/ Badania laboratoryjne, glebowe	Ziarno: 45,7 – 65,0 (s.m.) dla połączonego nawożenia glebowego, dolistnego i osmotycznego zaprawiania nasion	(Haider i in. 2018)
Pszenica	Zn(II) Fe(II)	0 - 2%	Dolistne/ Badania poletkowe	Ziarno Fe: 50 dla połączonego nawożenia 0,1% Zn i 2% Fe	(Jalal i in. 2020)
Wspiega wężowata	Fe(II) i Fe-EDDHA	0 - 100 $\mu\text{M dm}^{-3}$	Hydroponiczne/ Badania laboratoryjne, hydroponiczne	Ziarno: 95 dla Fe(II) w dawce 100 $\mu\text{M dm}^{-3}$	(Márquez-Quiroz i in. 2015)

Warzywa

Warzywa są ważną częścią codziennej diety człowieka. Rośliny strączkowe są doskonałym źródłem białka, złożonych węglowodanów, witamin i minerałów. Badania potwierdzają zwiększoną zawartość mikroelementów po nawożeniu Zn (Poblaciones and Rengel 2016) i Se (Łukasiewicz i in. 2019) w ziarnach grochu, Zn w fasoli (Haider i in. 2020) oraz Fe również w fasoli (Márquez-Quiroz i in. 2015). Zaobserwowano również zwiększenie zawartości aminokwasów i fenoli u dwóch gatunków rukoli (Acqua i in.. 2019), rzodkiewki (Schiavon i in. 2016) oraz brokułów (Mahn 2017). Dolistne stosowanie Se w postaci seleninu zwiększyło plon i zawartość karotenoidów w korzeniach marchwi (Oliveira i in. 2018). Biofortyfikacja Zn + *Piriformospora indica* wpłynęła pozytywnie na liczbę liści i całkowitą zawartość chlorofilu w sałacie (Padash i in. 2016).

Kielki warzyw i zbóż

Jednym z obiecujących sposobów wzbogacenia diety człowieka w niezbędne mikroelementy jest biofortyfikacja kielków. Ten rodzaj biofortyfikacji daje możliwość produkcji roślin biofortyfikowanych o dużej zawartości składników odżywczych w bardzo krótkim czasie przy użyciu prostych systemów bezglebowych, nawet w warunkach domowych. Biofortyfikacja Zn, oprócz zwiększenia jego zawartości w częściach jadalnych roślin, wpływa również na większą akumulację pierwiastków śladowych, takich jak Fe i Cu w kielkach rukoli, czerwonej kapuście i czerwonej gorczycy (Di Gioia i in. 2019) oraz zwiększyła zawartość chlorofilów i aminokwasów (zwłaszcza kwasu asparaginowego, fenyloalaniny, alanina), całkowitą zawartość fenolu oraz aktywność peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej w kielkach grochu (Lingyun i in. 2016). W korzeniach rzodkiewki biofortyfikowanych selenianem (VI) zaobserwowano podwyższony poziom niektórych aminokwasów fenolowych (metionina, Se-metyloselenocysteina, histydyna) (Schiavon i in.. 2016). Se-metyloselenocysteina dodatkowo jest istotna ze względu na wykazywane właściwości przeciwrakotwórcze.

Rośliny lecznicze

Rośliny lecznicze są ważne w diecie człowieka ze względu na ich właściwości przeciwutleniające i aktywność przeciwbakteryjną. Zioła zawierają bardzo ważne związki chemiczne, których nie można znaleźć w innych roślinach. Odżywianie roślin mikroelementami jest jednym z czynników wpływających na metabolizm roślin i poziom wtórnych metabolitów, jednak mechanizm wpływu mikroelementów na wtórny metabolizm roślin leczniczych pozostaje nadal słabo poznany. W dostępnej literaturze większość badań dotyczy biofortyfikacji bazylii, gdzie nawożenie selenem zwiększyło zawartość związków fenolowych i olejków eterycznych, a także działanie antyoksydacyjne ekstraktów w jej bazylii (Mezeyova and Hegedusova 2018; Skrypnik i in. 2019).

4. Podsumowanie

Biofortyfikacja agronomiczna pozwala na zwiększenie zawartości Zn, Se i Fe w roślinach uprawnych i może stanowić bezpieczną metodę dostarczenia niezbędnych mikroelementów do diety człowieka. W ostatnich latach coraz większą uwagę skupia się na biofortyfikacji warzyw, kielków oraz roślin leczniczych, w których oprócz zwiększonej zawartości mikroelementów zaobserwowano również ich pozytywny wpływ m.in. na metabolizm roślin i poziom wtórnych metabolitów. Biofortyfikacja roślin uprawnych mikroelementami wciąż jest wyzwaniem, ponieważ na jej efektywność wpływa wiele czynników takich jak: forma chemiczna pierwiastka, dawka, technika nawożenia czy właściwości gleby/podłoża uprawnego. Ważne jest, aby dobrać odpowiednie nawożenie indywidualnie dla każdej grupy roślin, uwzględniając różnice genotypowe. Rozwój nanotechnologii pozwolił na otrzymywanie nowych nawozów o różnej wielkości miarowej cząstek (rzędu lub poniżej 10^{-9} m). Nanonawozy są obiecującą alternatywą dla nawozów konwencjonalnych, która w znacznym stopniu może ograniczyć negatywny wpływ nawożenia mineralnego na środowisko i obniżyć koszt ich aplikacji. Również optymistyczną ścieżką rozwoju technologii produkcji jest projektowanie nawozów wspomaganych przez wyselekcjonowane mikroorganizmy.

Praca powstała w ramach projektu „Popioły lotne jako prekursorzy materiałów funkcjonalizowanych do zastosowania w inżynierii środowiska, budownictwie i rolnictwie”

POIR.04.04.00-00-14E6/18-00, który jest realizowany w ramach programu TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

5. Literatura

- Acqua SD, Ertani A, Pilon-smits EAH, et al (2019) Selenium Biofortification Differentially Affects Sulfur Two Rocket Species (*Eruca Sativa* Mill . and *Diplotaxis Tenuifolia*) Grown in Hydroponics. *Plants* 8:1–19. <https://doi.org/10.3390/plants8030068>
- Amato RD, Fontanella MC, Falcinelli B, et al (2018) Selenium biofortification in rice (*Oryza sativa* L.) sprouting : effects on Se yield and nutritional traits with a focus on phenolic acid profile. *J Agric Food Chem* 66:4082–4090. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00127>
- Coffin MD, Slaton NA (2020) Effect of low-use-rate zinc fertilization on rice growth and grain yield. 1–10. <https://doi.org/10.1002/agg2.20016>
- Di Gioia F, Petropoulos SA, Ozores-Hampton M, et al (2019) Zinc and iron agronomic biofortification of Brassicaceae microgreens. *Agronomy* 9:1–20. <https://doi.org/10.3390/agronomy9110677>
- Fakharzadeh S, Ha M, Baghaei MA, Etesami M (2020) Using Nanochelating Technology for Biofortification and Yield Increase in Rice. *Sci Rep* 10:4351. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60189-x>
- Haider MU, Hussain M, Farooq M, Nawaz A (2020) Zinc Nutrition for Improving the Productivity and Grain Biofortification of Mungbean. *J Soil Sci Plant Nutr* 20:1321–1335. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00215-z>
- Haider MU, Hussain M, Farooq M, Nawaz A (2018) Soil application of zinc improves the growth , yield and grain zinc biofortification of mungbean Soil application of zinc improves the growth , yield and grain zinc biofortification of mungbean. <https://doi.org/10.25252/SE/18/71610>
- Jalal A, Shah S, Carvalho M, et al (2020) Agro-Biofortification of Zinc and Iron in Wheat Grains. *Gesunde Pflanz* 72:227–236. <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00505-7>
- Lingyun Y, Jian W, Chenggang W, et al (2016) Effect of Zinc Enrichment on Growth and Nutritional Quality in Pea Sprouts. *J Food Nutr Res* 4:100–107. <https://doi.org/10.12691/jfnr-4-2-6>
- Liu H, Gan W, Rengel Z, Zhao P (2016) Effects of zinc fertilizer rate and application method on photosynthetic characteristics and grain yield of summer maize. 16:550–562. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162016005000045>
- Łukasiewicz S, Politycka B, Smoleń S (2019) Accumulation of selected macronutrients and tolerance towards selenium of garden pea treated with selenite and selenate. *J Elem* 24:245–256. <https://doi.org/10.5601/jelem.2018.23.1.1650>
- Mahn A (2017) Modelling of the effect of selenium fertilization on the content of bioactive compounds in broccoli heads. *Food Chem* 233:492–499. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.144>
- Manojlović MS, Lončarić Z, Cabilovski RR, et al (2019) Biofortification of wheat cultivars with selenium. *Acta Agric Scand Sect B — Soil Plant Sci* 69:1–10. <https://doi.org/10.1080/09064710.2019.1645204>
- Márquez-Quiroz C, De-la-Cruz-Lázaro E, Osorio-Osorio R, Sánchez-Chávez E (2015) Biofortification of cowpea beans with iron: Iron's influence on mineral content and yield. *J Soil Sci Plant Nutr* 15:839–847. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000058>
- Mezeyova I, Hegedusova A (2016) Phytomass and content of essential oils in *Ocimum basilicum* after foliar treatment with selenium. *Agric Food* 4:19–27
- Mezeyova I, Hegedusova A (2018) Qualitative parameters of less grown basil depending on nutrition in the form of selenium. *Int J Agric For Life Sci For Life Sci* 2:164–170
- Montoya M, Vallejo A, Recio J, et al (2020) Zinc – nitrogen interaction effect on wheat biofortification and nutrient use efficiency. *J Plant Nutr Soil Sci* 4:1–11. <https://doi.org/10.1002/jpln.201900339>

- Muhammad P, Ramzani A, Khalid M, et al (2016) Iron biofortification of wheat grains through integrated use of organic and chemical fertilizers in pH affected calcareous soil *Plant Physiology and Biochemistry* Iron biofortification of wheat grains through integrated use of organic and chemical fertilizers in pH affected calcareous soil. *Plant Physiol Biochem* 104:284–293. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.053>
- National Institutes of Health Office of Dietary Supplements). https://ods.od.nih.gov/HealthInformation/Dietary_Reference_Intakes.aspx
- Padash A, Shahabivand S, Behtash F, Aghaee A (2016) A practicable method for zinc enrichment in lettuce leaves by the endophyte fungus *Piriformospora indica* under increasing zinc supply. *Sci Hort* (Amsterdam) 213:367–372. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.040>
- Poblaciones MJ, Rengel Z (2016) Soil and foliar zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): grain accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Food Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.189>
- Schiavon M, Berto C, Malagoli M, et al (2016) Selenium Biofortification in Radish Enhances Nutritional Quality via Accumulation of Methyl-Selenocysteine and Promotion of Transcripts and Metabolites Related to Glucosinolates , Phenolics , and Amino Acids. *Front Plant Sci* 7:1371. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01371>
- Skrypnik L, Novikova A, Tokupova E (2019) Improvement of phenolic compounds, essential oil content and antioxidant properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) depending on type and concentration of selenium application. *Plants* 8:1–13. <https://doi.org/10.3390/plants8110458>
- Yin H, Qi Z, Li M, et al (2020) Selenium forms and methods of application differentially modulate plant growth, photosynthesis, stress tolerance, selenium content and speciation in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicol Environ Saf* 169:911–917. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.080>

21. Zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki *Listeria monocytogenes* izolowane z warzyw mrożonych

The ability to form biofilm of *Listeria monocytogenes* isolated from frozen vegetables

Zakrzewski Arkadiusz⁽¹⁾, Wiśniewski Patryk⁽¹⁾, Purkiewicz Aleksandra⁽²⁾, Jakuć Piotr⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

⁽²⁾ Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Opiekun naukowy: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

Zakrzewski Arkadiusz: arkadiusz.zakrzewski@uwm.edu.pl

Słowa kluczowe: psychrotrofy, *quorum sensing*, właściwości adhezyjne, Multipleks PCR, płytki mikrotitracyjne

Streszczenie

Listeria monocytogenes jest jednym z najczęściej izolowanych mikroorganizmów patogennych przenoszonym przez żywność. Pałeczki te posiadają wysoko rozwinięte mechanizmy adaptacyjne do niekorzystnych warunków środowiskowych. Ze względu na psychrotrofową naturę rozwijają się w temperaturach chłodniczego przechowywania żywności. Szczepy *L. monocytogenes* bardzo szybko nabywają odporność na preparaty dezynfekujące, co skutkować może tworzeniem biofilmu, a także problemami w skutecznej ich eliminacji ze środowiska produkcyjnego. Wiele szczepów należących do tego gatunku izolowanych jest z mrożonych produktów przetwórstwa owocowo-warzywnego. Celem pracy była ocena zdolności szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z mrożonek warzywnych do wytwarzania biofilmu, a także określenie genetycznych determinantów odpowiedzialnych za właściwości adhezyjne oraz *quorum sensing* (*luxS*, *actA2*, *rrn*). Materiał do badań stanowiło 43 szczepy należące do gatunku *L. monocytogenes* izolowane z warzyw mrożonych. Zdolność i intensywność tworzenia biofilmu analizowano metodą barwienia z użyciem fioleto krystalicznego z odczytem spektrofotometrycznym przy długości fali 584 nm. Geny *luxS* i *rrn* stwierdzono u 97,7% szczepów, natomiast gen *actA2* – u 93,0% izolatów. Stwierdzono, iż obecność genów odpowiedzialnych za właściwości adhezyjne oraz *quorum sensing* nie jest jednoznaczna z fenotypową zdolnością tworzenia biofilmu.

1. Wstęp

Bakterie należące do rodzaju *Listeria* posiadają wiele cech ułatwiających adaptację do różnych, niekorzystnych warunków środowiskowych. Tolerują szerokie spektrum pH, wysokie zasolenie, a także wykazują odporność na środki chemiczne i detergenty (Szewczuk 2015). Rodzaj ten obejmuje łącznie 17 gatunków drobnoustrojów, z czego za chorobotwórczy dla ludzi uznaje się jeden – *Listeria monocytogenes* (Doyle 2001).

L. monocytogenes jest jednym z najczęściej przenoszonych przez zanieczyszczoną żywność mikroorganizmów chorobotwórczych. Szczepy należące do tego gatunku odpowiedzialne są za wywołanie listeriozy – zoonozy cechującej się ciężkim przebiegiem i wysoką umieralnością, szczególnie u osób znajdujących się w tzw. grupie podwyższonego ryzyka (Henriques i in. 2017). W 2018 r. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) zgłosił łącznie 2 549 potwierdzonych przypadków listeriozy – wskaźnik zapadalności wynosił 0,47/100 000 ludzi. W raporcie wykazano 229 zgonów (spośród wszystkich zgłoszonych przypadków hospitalizowanych) spowodowanych spożyciem żywności zanieczyszczonej tym patogenem. Do grupy żywności najczęściej kontaminowanej patogenem zalicza się mrożonki warzywne. Trzy państwa (Dania, Finlandia oraz Wielka Brytania) zgłosiły 46 przypadków hospitalizacji spowodowanych spożyciem mrożonek warzywnych, spośród których 5 było śmiertelnych. Produkty uwzględnione w kategorii: „warzywa, soki oraz im podobne” stanowiły najczęstszy rodzaj żywności odpowiedzialny za listeriozę, jako FBO (ang. *Food-borne outbreaks*) – choroby wywołanej

spożyciem skażonej żywności ("The European Union One Health 2018 Zoonoses Report" 2019). Dane wskazują na fakt, iż warzywa (bez względu na rodzaj, stopień przetworzenia, czy też metodę utrwalania) stanowią jedno z głównych źródeł rozprzestrzeniania się *L. monocytogenes*.

W celu zniwelowania wpływu niekorzystnych zmian zachodzących w środowisku pałeczki *L. monocytogenes* dysponują szeregiem mechanizmów obronnych wobec stresowych czynników środowiskowych, a także umożliwiających nabywanie oporności. Wśród nich wyróżnia się m.in. zdolność komórek do wymiany informacji (komunikowania się między sobą), co niewątpliwie przyczynia się do wzrostu patogenezы tych drobnoustrojów (Kannan i in. 2020). Jednym z najważniejszych systemów komunikowania się drobnoustrojów, przekształcającym zachowania osobnicze (indywidualne) w grupowe jest system *quorum sensing* (QS). W mechanizmie tym udział biorą dwa enzymy (Pfs i LuxS), które odpowiedzialne są za katalizowanie transferu S-adenozylu homocysteiny (SAH) do toksycznego produktu ubocznego AMC (Activated Methyl Cycle), homocysteiny i 4,5-dihydroksy-2,3-pentanedionu (DPD). Związki te ulegają przemianom do różnych cyklicznych związków określanych mianem AI-2. Stwierdzono, iż AI-2 wykorzystywana jest w komunikacji międzygatunkowych populacji bakterii (Kannan i in. 2020).

Wśród gatunku *L. monocytogenes* wyróżnia się dwa typy systemu QS – system LuxS z autoinduktorem-2 (AI-2) oraz system regulacji genu (*agr*), w którym pośredniczą oligopeptydy. Oba systemy mogą przyczyniać się do tworzenia biofilmu przez *L. monocytogenes*, który zapewnia idealne środowisko wzrostu i rozwoju, ale także jest jednym z głównych problemów przemysłu spożywczego (Wei i in. 2020)

Celem pracy była ocena zdolności szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z mrozonek warzywnych do wytwarzania biofilmu, a także określenie genetycznych determinantów odpowiedzialnych za właściwości adhezyjne oraz *quorum sensing* (*luxS*, *actA2*, *rrn*).

2. Materiał i Metody

2.1 Szczepy wykorzystane w badaniu

Badaniom poddano 43 szczepy wyizolowane z warzyw mrożonych, potencjalnie przynależnych do gatunku *L. monocytogenes*, pochodzących z kolekcji Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

2.2 Identyfikacja i określanie przynależności gatunkowej

24-godzinne kolonie drobnoustrojów wyrosłe na podłożu Brain-Heart Infusion agar (Merck, Niemcy) identyfikowano z zastosowaniem techniki desorpcji/ jonizacji laserowej wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight). Analizę wykonano przy użyciu aparatu Vitek MS MALDI-TOF (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francja), przy napięciu 200 kV, zakresie masy 2–20 kDa, częstotliwości lasera 50 Hz i czasie opóźnienia ekstrakcji 200 ns. Jako matrycę zastosowano MALDI VitekMS-CHCA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francja). Uzyskane spektra analizowano z wykorzystaniem bazy danych SARAMIS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francja).

2.3 Określanie obecności genów odpowiedzialnych za *quorum sensing* oraz właściwości adhezyjne

Po etapie identyfikacji i określania przynależności do gatunku *L. monocytogenes* przystąpiono do etapu określenia determinantów genetycznych *quorum sensing* (*luxS*, *actA2*, *rrn*). W tym celu przeprowadzono izolację DNA szczepów *L. monocytogenes* z zastosowaniem zestawu do izolacji genomowego DNA – Genomic Mini (A&A Biotechnology). Izolacja DNA przebiegała dwuetapowo – wstępne przygotowanie próbki oraz właściwy protokół izolacji. Uzyskane DNA przechowywano w temp. -20°C do czasu dalszych analiz. Kolejny etap stanowiło przeprowadzanie właściwej reakcji Multiplex PCR umożliwiającej amplifikację konkretnych fragmentów DNA. Przygotowane próbki umieszczono w termocyklerze (Mastercycler nexus GX2/GX2e, Eppendorf, Niemcy) i rozpoczęto reakcję Multiplex PCR, zgodnie z poniższym programem (Tab. 1). Skład użytych primerów i oczekiwaną wielkość produktów reakcji PCR zaprezentowano w tabeli (Tab. 2).

Wizualizację produktów otrzymanych podczas przeprowadzonej reakcji PCR wykonano z użyciem elektroforezy w żelu agarozowym. Żel uzyskano poprzez zmieszanie w odpowiednich proporcjach agarozy i buforu elektroforetycznego 1 x TBE tak aby uzyskać stężenie na poziomie 1,5%. Produkty rozdziłu poddano wizualizacji z zastosowaniem systemu do dokumentacji i analizy żeli barwionych fluorescencyjnie G-BOX F3 (Syngene).

Tab. 1. Warunki termiczne reakcji Multiplex PCR przeprowadzanej w termocyklerze.

Liczba cykli	Etap	Temperatura	Czas
1	Wstępna denaturacja DNA	94°C	4 min.
30	Denaturacja w cyklu	94°C	30 sek.
	Przyłączanie primerów	49°C	30 sek.
	Wydłużanie primerów	72°C	90 sek.
1	Wydłużanie końcowe	72°C	10 minut

Tab. 2. Wykaz primerów i oczekiwana wielkość produktów reakcji PCR (pz) badanych genów.

Gen	Primery	Sekwencja (5' → 3')	PCR (pz)	Źródło
<i>luxS</i>	luxS-f	ATGGCAGAAAAAATGAATGTAGAAA	486	(Ali 2011)
	luxS-r	TTATTCACCAAACACATTTTCCA		
<i>actA2</i>	actA2-f	GACGAAAATCCCGAAGTGAA	268/385	(Jaradat, i in. 2002)
	actA2-r	CTAGCGAAGGTGCTGTTTCC		
<i>rrn</i>	rrn-f	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	938	(Meloni i in. 2012)
	rrn-r	CTC CAT AAA GGT GAC CCT		

2.4 Zdolność tworzenia biofilmu

Zdolność do wytwarzania biofilmu badano przy użyciu 96-dołkowych, płaskodennych, jałowych płytek polistyrenowych (Bionovo). Wykorzystywano metodykę zaproponowaną przez Stepanović i in. (2007) w modyfikacji własnej. Do każdej studzienki wprowadzano 200 µl świeżego, sterylnego bulionu TSB. Następnie do studzienek wprowadzono hodowlę szczepów (20 µl) o gęstości 1×10^9 kom/ml, w trzech powtórzeniach. Kontrole negatywne stanowiły studzienki bez dodatku hodowli. Płytki inkubowano z pokrywą, w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji delikatnie odpipetowywano hodowlę z każdej studzienki, a następnie trzykrotnie przemywano buforem PBS w objętości 250 µl. Następnie biofilm utrwalano przez 15 min. wprowadzając do każdej studzienki 200 µl etanolu (96%). Po tym czasie alkohol zlewano, a płytki suszono w temperaturze pokojowej ok 20 min. Biofilmy zostały poddane barwieniu roztworem fioletu krystalicznego w ilości 200 µl przez 5 min. Po delikatnym przemywaniu pod laminarnym strumieniem bieżącej wody do momentu wypłukania niezwiązanego barwnika ze studzienek, płytki suszono w temperaturze pokojowej. komórki zawieszano w 160 µl 33% (v/v) lodowatego kwasu octowego. Absorbancję przy długości fali 570 nm mierzono czytnikiem mikropłytek Infinite M1000 PRO (Tecan). Gęstość optyczną (ODs) dla każdego badanego szczepu określano na podstawie średniej arytmetycznej z 3 powtórzeń wykonując pomiary w 20 miejscach każdej studzienki. Uzyskaną wartość porównywano z wartością OD odcięcia (ODc), którą definiowano, jako trzy odchylenia standardowe powyżej średniej OD kontroli negatywnej.

Do określenia zdolności szczepu do tworzenia biofilmu posłużyła skala zaproponowana przez Stepanović i in. 2007 (Tab. 3).

Tab. 3. Skala zdolności szczepu do tworzenia biofilmu (opracowanie własne na podstawie Stepanović i in. 2007).

Zdolność tworzenia biofilmu	Wartość
brak	($OD \leq OD_c$),
słabe wytwarzanie	($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$),
umiarkowane wytwarzanie	($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$)
silne wytwarzanie	($4 \times OD_c < OD$).

3. Wyniki i dyskusja

Zdolność *L. monocytogenes* do długotrwałego przetrwania na urządzeniach i w środowisku produkcyjnym przemysłu spożywczego (szczególnie w niekorzystnych warunkach) może być związana ze zdolnością tworzenia biofilmu (Ricci i in. 2018). W powyższym badaniu wykazano, że zaledwie jeden szczep (2,3%) zdolny był do tworzenia biofilmu (biofilm silny), natomiast pozostałe izolaty nie wykazywały tej cechy. Uzyskane wyniki w znacznym stopniu odbiegają od tych uzyskanych przez Skowron i in. (2019). W badaniu tym autorzy wykazali, iż 42,4% szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z warzyw mrożonych charakteryzowała się zdolnością wytwarzaniem bardzo silnego biofilmu, natomiast 21,2% szczepów była zdolna do wytwarzania silnego biofilmu. Średni biofilm wytwarzany był przez 28,3%, a 8,1% szczepów wytwarzała biofilm słaby (Skowron i in. 2019). Badacze udowodnili również, że mimo wysokiego podobieństwa genotypowego szczepów wyniki różniły się istotnie statystycznie w zależności od lat w jakich szczepy były izolowane (Skowron i in. 2019).

W genomie każdego z 43 izolatów wykryto co najmniej jeden z badanych genów *quorum sensing*. Gen *luxS* (~ 486 pz) i *rrn* (~ 938 pz) posiadało 42 izolaty. Tylko jeden szczep *L. monocytogenes* nie zawierał w swoim genomie wspomnianych genów. W badaniach własnych u 39 izolatów (90,7%) wykazano obecność wszystkich analizowanych genów. Nie zaobserwowano istotnych relacji między zdolnością tworzenia biofilmu, a obecnością w genomie badanych szczepów genów *luxS*, *actA2* i *rrn*. Szczegóły obecności genów *quorum sensing* u badanych izolatów *L. monocytogenes* zestawiono w tabeli (Tab. 4).

Gen *luxS*, odpowiadający za kodowanie enzymu katalizującego produkcję cząsteczek autoinduktora 2 (AI-2), wykryto u 42 szczepów (97,7%). Gen ten uważany jest przez badaczy za istotny w tworzeniu biofilmu przez wiele bakterii (w tym przez pałeczki *L. monocytogenes*) (Belval i in. 2006). Gen *actA2* wykryto u 40 szczepów (93,0%), natomiast gen *rrn* u 42 szczepów (97,7%). Wszystkie badane geny wykryte zostały u szczepu posiadającego silne zdolności w tworzeniu biofilmu.

Wśród produktów reakcji Multiplex PCR zaobserwowano polimorfizm, jednakże tylko w przypadku genu *actA2*. Obecność tego genu u szczepów wpływa na możliwość łatwego rozprzestrzeniania się w środowisku bytowania. W przeprowadzonym badaniu polimorfizm genu *actA2* wykazano u 22 szczepów (51,2%) uzyskując fragment 268 pz zamiast oczekiwanych 385 pz. Delecja nukleotydów w tym genie może wiązać się ze zwiększoną wirulencją szczepów, jednakże nie zawsze tak jest. W doniesieniach naukowych wykazano również brak korelacji między polimorfizmem, a zdolnością do inwazji komórek *in vitro* (Conter i in. 2010; Meloni i in. 2012). Wyniki badań własnych potwierdzają brak związku ze zwiększoną wirulencją szczepów zawierających polimorficzny gen *actA2* – szczepy te nie wykazują zdolności tworzenia biofilmu.

Jednym z głównych czynników wpływających na występowanie i rozwój biofilmów pałeczek *L. monocytogenes* jest dostępność składników pokarmowych na powierzchni warzyw. W zależności od gatunku warzyw dostęp składników jest różny i wywierać może wpływ na dynamikę populacji drobnoustrojów. Likotrafiti i in. badali dynamikę rozwoju pałeczek *L. monocytogenes* przy zastosowaniu dwóch warzyw – ogórka i sałaty. W badaniach tych wzrost *L. monocytogenes* obserwowano wyłącznie na naskórku ogórka. Autorzy spekulowali, iż było to spowodowane różnicami w dostępności składników odżywczych na powierzchni warzyw (Likotrafiti i in. 2013). Różnice w strukturze powierzchni i dostępności wilgoci powierzchniowej i / lub składników odżywczych mogą również wyjaśniać niezdolność *L. monocytogenes* do wzrostu na nienaruszonych truskawkach w porównaniu z innymi owocami o powierzchni charakteryzujących się dużą wilgotnością (Flessa i in. 2005). Niektórzy badacze sugerują, że ograniczona dostępność składników odżywczych na powierzchni nienaruszonych, zewnętrznych powierzchni owoców i warzyw (kantalupy, seler i kielki) wpłynąć mogła na ograniczony wzrost *L. monocytogenes* (Marik i in. 2020).

Mechanizmy adaptacji w odniesieniu do stresu temperaturowego są podstawową umiejętnością *L. monocytogenes* i umożliwiają jej przetrwanie w żywności mrożonej (Santos i in. 2019). W badaniach udowodniono, że ograniczony dostęp do składników odżywczych i stres związany z zimnem zwiększają produkcję biofilmu (Miladi i in. 2013). Te odkrycia wysuwają

następującą hipotezę – stres zwiększa zjadliwość poprzez zwiększenie zdolności adhezji (Miladi i in. 2013). Powyższe stwierdzenie może tłumaczyć tak mały odsetek szczepów zdolnych do tworzenia biofilmu (uzyskanych w badaniach własnych), ze względu na fakt, iż w metodzie za Stepanović i in. (2007) (zastosowanej w badaniach) uwzględniono bogate podłoże, a także optymalną temperaturę hodowli.

Tab. 4. Wyniki reakcji Multiplex PCR dla genów *quorum sensing* związanych z biofilmem u *L. monocytogenes*.

Szczep	BIOFILM	<i>luxS</i> (486 pz)	<i>actA2</i> (268/385 pz)	<i>rrn</i> (938 pz)
66	-	+	+	+
67	-	+	↑+	+
68	-	+	+	+
69	-	+	+	+
70	-	+	+	+
71	-	+	↑+	+
72	-	+	↑+	+
73	-	+	+	+
74	-	+	+	+
75	-	+	+	+
76	-	+	↑+	+
77	-	+	+	+
78	-	+	+	+
79	-	+	+	+
80	-	+	+	+
81	SILNE	+	+	+
82	-	+	↑+	+
83	-	+	↑+	+
84	-	+	↑+	+
85	-	+	↑+	+
86	-	+	+	+
87	-	+	↑+	+
88	-	+	↑+	+
89	-	+	+	+
90	-	+	↑+	+
91	-	+	↑+	+
92	-	+	+	+
93	-	+	↑+	+
94	-	+	+	+
95	-	+	↑+	+
96	-	+	↑+	+
97	-	+	+	+
98	-	+	+	+
99	-	+	+	+
141	-	+	↑+	+
142	-	+	↑+	+
143	-	+	-	+
144	-	+	-	+
145	-	+	-	+
146	-	-	+	-
147	-	+	↑+	+
148	-	+	↑+	+
149	-	+	+	+

+ obecny; - nieobecny; ↑+ polimorfizm

Mrożone warzywa dostępne w ofercie handlowej na terenie Polski mogą być zanieczyszczone pałeczkami *L. monocytogenes*. Wykazują one różny stopień zdolności tworzenia biofilmu, dlatego też niezbędny staje się monitoring w stosunku do rozpowszechnienia tej zdolności wśród szczepów izolowanych z mrożonych warzyw, a także uwzględnienie w badaniach większego spektrum determinantów genetycznych warunkujących wytwarzanie biofilmu.

4. Wnioski

- a) Mrożonki warzywne zakupione w sklepach detalicznych stanowią rezerwuár pałeczek *L. monocytogenes*.
- b) Drobnoustroje należące do gatunku *L. monocytogenes* posiadają potencjalne zdolność tworzenia nawet silnych biofilmów.
- c) Obecność genów związanych z *quorum sensing* oraz odpowiedzialnych za właściwości adhezyjne u szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z mrożonek warzywnych nie jest jednoznaczna ze zdolnością tworzenia biofilmu.
- d) Ze względu na różny stopień zdolności tworzenia biofilmu przez pałeczki *Listeria monocytogenes* izolowane z mrożonek warzywnych należy monitorować rozpowszechnianie się mikroorganizmów w tych produktach.

5. Literatura

- Ali S (2011) The role of quorum sensing in survival, biofilm formation and gene expression of *Listeria monocytogenes*. University of Guelph.
- Belval SC, Gal L, Margiewes S i in. (2006) Assessment of the roles of LuxS, S-ribosylhomocysteine and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Society* 72: 2644–2650. doi: 10.1128/AEM.72.4.2644-2650.2006.
- Conter M, Vergara A, Di Ciccio P (2009) Polymorphism of actA gene is not related to in vitro virulence of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 137:100-105. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.019.
- Doyle M (2001) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press.
- Flessa S, Lusk DM, Harris LJ (2005) Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. Accessed December 13, 2020. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.010.
- Henriques AR, Cristino JM, Fraqueza MJ (2017) Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from industrial and retail ready-to-eat meat-based foods and their relationship with clinical strains from human listeriosis in Portugal. *Journal of Food Protection* 80: 551–560. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-16-310.
- Jaradat ZW, Schutze GE, Bhunia AK (2002) Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 1-10. doi:10.1016/s0168-1605(02)00050-8.
- Kannan S, Balakrishnan J, Govindasamy A (2020) *Listeria monocytogenes* – Amended understanding of its pathogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion. *Microbial Pathogenesis* 149: 104575. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104575.
- Likotrafiti E, Smirniotis P, Nastou A, Rhoades J (2013) Effect of relative humidity and storage temperature on the behavior of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables. *Journal of Food Safety* 33(4): 545–51. <https://doi.org/10.1111/jfs.12087>.
- Marik CM, Zuchel J, Schaffner DW i in. (2020) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* on intact fruit and vegetable surfaces during postharvest handling: a systematic literature review. *Journal of Food Protection*. International Association for Food Protection. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-283>.
- Meloni D, Mazza R, Piras F i in. (2012) The biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolated from meat, poultry, fish and processing plant environments is related to serotype and pathogenic profile of the strains. *Veterinary Science Development*, 2(1): 12. doi:10.4081/vsd.2012.4012.
- Miladi H, Ammar E, Slama RB i in. (2013) Influence of freezing stress on morphological alteration and biofilm formation by *Listeria monocytogenes*: relationship with cell surface hydrophobicity and membrane fluidity. *Archives of Microbiology* 195(10–11): 705–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0921-7>.

- Ricci A, Allende A, Bolton D, i in. (2018) *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal* 16(1).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>.
- Santos T, Viala D, Chambon C, i in. (2019) *Listeria monocytogenes* biofilm adaptation to different temperatures seen through shotgun proteomics. *Frontiers in Nutrition* 6: 89.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00089>.
- Skowron K, Grudlewska K, Lewandowski D, i in. (2019) Antibiotic susceptibility and ability to form biofilm of *Listeria monocytogenes* strains isolated from frozen vegetables.” *Acta Alimentaria* 48(1): 65–75. <https://doi.org/10.1556/066.2019.48.1.8>.
- Szewczuk K, Misiewicz A (2015) Wzrost *Listeria monocytogenes* a warunki środowiskowe. *Przemysł Spożywczy* 1(11): 14-17. doi: 10.15199/65.2015.11.4.
- “The European Union One Health 2018 Zoonoses Report.” (2019) *EFSA Journal* 17(12).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>.
- Wei LN, Shi CZ, Luo CX i in. (2020) Phloretin inhibits biofilm formation by affecting quorum sensing under different temperature. *LWT – Food Science and Technology*, 109668. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109668.