

CAMERA SEPARATORIA

Volume 10, Number 2 / 2018, pp. 81-104

Adrian SZABRAŃSKI, Paweł WANTUSIAK, Paweł PISZCZ, Bronisław K. GŁÓD*

Zakład Chemii Analitycznej i Nieorganicznej, Instytut Chemii,
Wydział Nauk Ścisłych, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach,
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce

*Autor do korespondencji, e-mail: bkg@onet.eu

Zmiany właściwości antyoksydacyjnych miodów podczas ich fermentacji

Streszczenie: Celem pracy było zbadanie czy proces fermentacji (na różnych jego etapach) miodu wpływa na jego właściwości antyoksydacyjne. Ponadto zbadano wpływ różnych dodatków (moszczy owocowych i ziół) na nie. Aby móc przedyskutować mechanizm tych zmian pomiaru odniesiono do rodników różnej mocy (hydroksylowych i DPPH), a także do pomiarów amperometrycznych (w układzie przepływowym, HPLC). Wyniki te skorelowane zostały m.in. z całkowitą zawartością polifenoli. Aby przedyskutować korelacje otrzymane różnymi technikami zbadano dodatkowo stężenie etanolu i cukrów w badanych próbkach.

Słowa kluczowe: antyoksydanty, całkowity potencjał antyoksydacyjny, miody, HPLC

Changes in antioxidative properties of honeys during their fermentation

Abstract: The aim of the paper was to investigate whether the fermentation process (at its various stages) affects honey's antioxidant properties. The effect of various additives (herbs and fruit musts) on them has been also examined. The measurements were performed with reference to various radicals (DPPH and hydroxyl radicals) as well as to amperometric measurements in a flow system (HPLC). This allows a better understanding of the mechanism of the antioxidant interactions. The obtained results were correlated with the concentration of ethanol and sugars and total polyphenol content in the sample.

Keywords: antioxidants; total antioxidant potential, honeys, HPLC

1. Wstęp (Introduction)

Wolne rodniki i antyoksydanty są bardzo istotne z punktu widzenia zdrowia i długowieczności wszystkich organizmów żywych. W zależności od stężenia, miejsca występowania i okoliczności mają właściwości pro- lub anty- zdrowotne. Wolne rodniki reagują z wieloma biologicznie czynnymi związkami, takimi jak tłuszcze (uszkadzając błony mitochondrialne i komórkowe), kwasy nukleinowe (powodując raka i choroby neurodegeneracyjne), czy białka (dezaktywując enzymy). Przyczynia się to do apoptozy komórek, a w konsekwencji wielu stanów chorobowych i śmierci całych organizmów. Z drugiej strony wolne rodniki są etapami pośrednimi większości reakcji foto-, radio-, bio- czy elektrochemicznych. Ponadto przez komórki fagocytykujące wykorzystywane są do zwalczania infekcji. Antyoksydanty z jednej strony usuwają wolne rodniki, z drugiej same mogą się przekształcać w wolne rodniki lub przyczyniać się do ich wytwarzania np. w reakcji Fentona [1, 2].

Powszechnie uważa się, że niedobory endogennych antyoksydantów powinny być uzupełniane suplementami diety. Stąd istnieje potrzeba ich oznaczania. Okazało się, że często więcej informacji dostarcza sumaryczna wielkość – całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) będąca sumą mocy antyoksydacyjnej wszystkich antyoksydantów w próbce [1].

Miód pszczeli jest naturalnym produktem spożywczym, który poza właściwościami odżywczymi posiada również właściwości antybakteryjne i antyoksydacyjne. Zawiera antyoksydanty zarówno enzymatyczne jak i niskocząsteczkowe. Najważniejszym antyoksydantem enzymatycznym w miodzie są katalaza i peroksydaza glutationowa [1, 3], rozkładające nadtlenek wodoru powstały w wyniku reakcji oksydazy glukozy z wodą. Do przeciwutleniaczy nieenzymatycznych zawartych w miodzie zalicza się kwas askorbinowy, α -tokoferol, związki polifenolowe, w szczególności flawonoidy (kampferol, luteolina, kwercetyna, apigenina, trycetin, hespertyna, galangina, mircetyna, chryzyna), kwasy fenolowe (galusowy, cynamonowy, benzoesowy, kofeinowy) oraz wolne aminokwasy [1, 4-7].

Miód pitny powstaje w wyniku fermentacji etanolowej brzezki miodu pszczelego. Historia miodosytnictwa w Polsce sięga czasów przed-chrześcijańskich, natomiast sycenie na skalę przemysłową szacuje się na XIV wiek [8]. Miody pitne są napojami, które przygotowuje się w stosunkowo prosty sposób, sporządzenie brzezki miodowej można wykonywać w dwojaki sposób: poprzez sycenie lub przygotowywanie na zimno [9]. Aby miody pitne były gotowe do spożycia muszą przejść długotrwały proces dojrzewania oraz fermentację alkoholową, czyli proces beztlenowego rozkładu cukrów na alkohol etylowy i dwutlenek węgla przy jednoczesnym wydzielaniu ciepła. Przebieg fermentacji uzależniony jest przede wszystkim od ilości cukrów, temperatury oraz ilości matki drożdżowej.

2. Część eksperymentalna (*Experimental part*)

W badaniach CPA miódów użyto następujących odczynników chemicznych: DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl), metanol (99,9% HPLC grade), kwas 4-hydroksybenzoesowy (p-HBA) i 3,4-dihydroksybenzoesowy (3,4-DHBA) i siarczan(VI) żelaza(II) – Sigma - Aldrich, Steinheim, Niemcy; woda trójкратно destylowana (otrzymana w laboratorium z wykorzystaniem aparatu kwarcowego wody, Heraeus Quarzglas, Destamat, Niemcy), diwodorooortofosforan sodu, wodorooortofosforan potasu, brom, wolframian sodowy, molibdenian sodowy, węglan sodowy bezw., 85% kwas orto-fosforowy, siarczan litu i 3% nadtlenek wodoru (POCH, Gliwice, Polska) oraz kwas cytrynowy, wodorotlenek sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska).

Korzystano również z następującej aparatury: wysokosprawny chromatograf cieczowy (HPLC) firmy Knauer (Berlin, Niemcy) (składający się z: interfejsu Smartline Manager 5000 z wbudowanym degazerem, dwutłokowej pompy Smartline 1000 o przepływie fazy ruchomej w granicach 0,001 – 50 ml/min, kolumny analitycznej - COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Waters (4,6 x 150mm, 5 μ m), autosamplera Smartline 3800, detektora Smartline PDA 2800 z matrycą diodową DAD (zakres pracy lampy 190-1020 nm), termostatu kolumn Smartline 4000 z zakresem temperatur 5 ÷ 85°C, komputera z oprogramowaniem do rejestracji i obróbki danych ClarityChrom).

Pomiary spektrofotometryczne wykonano na spektrofotometrze firmy Thermo Spectronic, model: Helios Epsilon (USA). Korzystano także z wirówki laboratoryjnej Centrifuge MPW - 251 (MPW Med. Instruments, Polska), wagi analitycznej (RADWAG, WAA 100/C/1, Radom, Polska) o dokładności 10⁻⁴ g, wagi analitycznej (Sartorius, Werke GmbH, Göttingen, Niemcy) o dokładności 10⁻⁶ g, a także łaźni ultradźwiękowej (Sonorex RK 250H, Bandelin, Niemcy).

Przedmiot badań właściwości antyoksydacyjnych stanowiły próbki jedenastu miódów pitnych: czterech owocowych (miód lipowy z dodatkiem czarnej jagody, maliny, aronii lub borówki amerykańskiej), dwóch ziołomiodów (miód lipowy z dodatkiem melisy lub bzu czarnego) oraz pięciu miódów gatunkowych (lipowy, spadziowy, akacjowy, gryczany i wielokwiatowy). Miody pitne zostały sporządzone według przepisu przygotowywania trójniaka, tzn. na jedną część miodu przypadają dwie części wody. Wszystkie jedenaście miódów przygotowano w objętości 1 L (0,33 L miodu i 0,66 L wody), przy czym do produkcji miódów pitnych owocowych i ziołomiodu część wody zastąpiono moszczem owocowym i wywarem ziołowym o objętości 140 ml/L. Miody owocowe i ziołomiod zostały sporządzone na bazie miodu lipowego pochodzącego z jednej pasieki, miało to na celu zbadanie wpływu dodatku różnych gatunków moszczy na właściwości przeciwutleniające. Miody gatunkowe przygotowano z różnych rodzajów miódów nektarowych i spadziowego. Po przygotowaniu brzezki miodowej rozpoczęto powolne sycenie miódów, zagotowując roztwór i utrzymując proces wrzenia przez około 60 – 80 minut zbierając jednocześnie pojawiającą się na powierzchni pianę. Gdy etap sycenia dobiegł końca, brzezki przeniesiono do balonów fermentacyjnych, do każdego dodano matkę drożdżową, około 4 g kwasu cytrynowego i 0,5 g fosforanu diamonowego. Dzień sycenia uznano za początek wytwarzania miodu. Pobrano pierwszą próbkę. Całość zamknięto rurką destylacyjną, do której wiano łyżkę stołową wody i odstawiono w temperaturze pokojowej (ok. 20 - 23°C). Po sześciu dniach zaobserwowano, że proces fermentacji przebiega bardzo wolno, w związku z tym dodano niewielką ilość drożdży piekarskich uprzednio pobierając kolejne próbki. Po tej czynności zauważono wzmożoną i burzliwą fermentację. Próbkę pobierano na różnych etapach produkcji: w dniu „zerowym”, 6, 13, 20, 27, 34, 41, 57, 69, 85 i 120. W 41 dniu zebrano i pozostawiono do dalszych badań osady, z czego więcej osadów wytrąciło się w miódach owocowych.

2.1. **Oznaczanie CPA^{OH}** **(Determination of TAP^{OH})**

Oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w odniesieniu do rodnika hydroksylowego polega na wygenerowaniu rodnika w reakcji Fentona. Bezpośrednie oznaczenie rodnika OH[•] jest niemożliwe, ze względu na jego bardzo dużą reaktywność, krótki czas życia oraz brak charakterystycznego dla niego łatwomierzalnego parametru fizykochemicznego. W celu jego oznaczenia wykorzystuje się tzw. pułapki spinowe. W pracy zastosowano kwas *p*-hydroksybenzoesowy (pHBA), który reagując rodnikiem hydroksylowym wytwarza kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy. Pomiar wykonuje się dwukrotnie, bez i z dodatkiem miodu.

Rodniki generowane były w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 zawierającym 1 mM kwas *p*-hydroksybenzoesowy, 0,3 % nadtlenu wodoru i 2 mM siarczanu żelaza (II). Pomiar był wykonywany po 7 minutach od momentu dodania soli żelaza, zapoczątkowującej reakcję Fentona [10].

Kwas 3,4DHBA oznaczany był chromatograficznie w układzie faz odwróconych. Jako fazę ruchomą zastosowano bufor fosforanowy o pH 6,6. Próbkę o objętości 20 µl wprowadzano na kolumnę za pomocą dozownika pętlicowego, szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min, a temperatura kolumny 20°C. Chromatogramy rejestrowano na detektorze fotometrycznym przy długości fali 205 nm. Miarą CPA była różnica powierzchni pól pików kwasu 3,4DHBA przed i po dodaniu miodu [10].

2.2. **Oznaczenie CPA^{HPLC/ED}** **(Determination of TAP^{HPLC/ED})**

Składniki miodów można rozdzielać chromatograficznie. Monitorować je można amperometrycznie w anodowym zakresie potencjałów. Wówczas, na chromatogramie obserwujemy w zasadzie tylko reduktory (antyoksydanty). Miarą właściwości antyoksydacyjnych próbki było w tym przypadku sumaryczne pole powierzchni wszystkich pików otrzymanych na chromatogramie [11]. Pomiar przeprowadzono przy różnych potencjałach w zakresie $E = 0,2 \div 1,0$ V, w układzie trójelektrodowym (elektroda pracująca z węgla szklatego, elektroda odniesienia - Ag/AgCl, elektroda pomocnicza - Pt). w odwróconym układzie faz (RP – 18). We wszystkich przypadkach dochodziło do utleniania próbki (dodatnie piki chromatograficzne). Fazę ruchomą stanowił bufor fosforanowy o pH 6,6 i metanol w stosunku 97 : 3 (obj./obj.). Czas trwania analizy ustalono na 30 minut, co umożliwiło zaobserwowanie wszystkich potencjalnych pików.

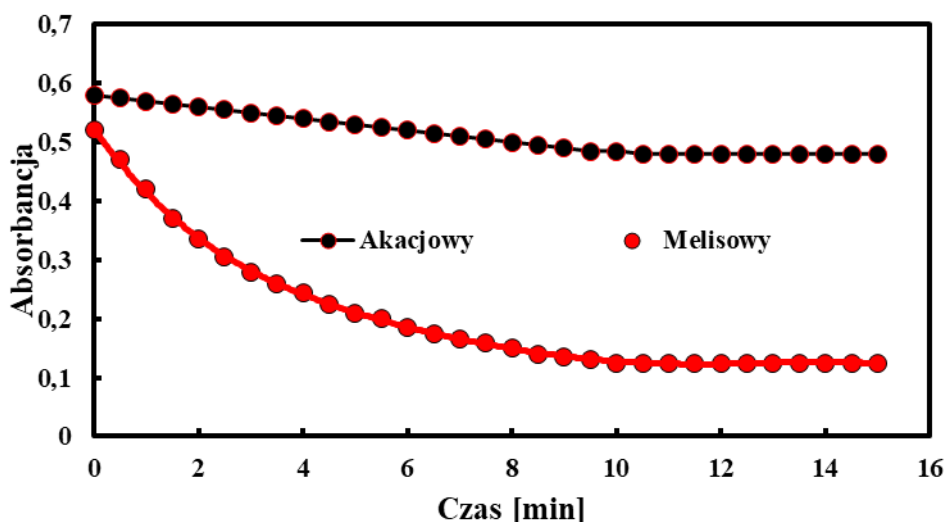
2.3. **Oznaczanie CPA metodą DPPH** **(Determination of TAP using DPPH assay)**

Właściwości antyoksydacyjne miodów pitnych w odniesieniu do rodnika DPPH[•] (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) oznaczano mierząc spadek absorpcji spowodowany jego redukcją przez zawarte w miodach antyoksydanty (polifenole, peptydy, produkty reakcji Maillarda) (Rys. 1). DPPH[•] jest syntetycznym rodnikiem azowym. Może on ulegać zarówno redukcji (przyłączenie elektronu i/lub wodoru) jak i utlenianiu. Rodnik DPPH w roztworze alkoholu przybiera barwę purpurową przy maksimum absorpcji $\lambda=517$ nm, a w czasie redukcji jego barwa przechodzi w jasno żółtą [12].

Pomiar aktywności przeciwutleniającej za pomocą DPPH[•] wykonano metodą spektrofotometryczną. Próbkę miodu pitnego o objętości 20 µl zmieszano z 980 µl metanolu i 1000 µl 0,1 mM metanolowego roztworu DPPH[•]. Absorbancję mierzono 20-krotnie przez 10 minut w odstępach półminutowych przy długości fali $\lambda = 517$ nm wobec metanolu jako odnośnika. Jako próbkę kontrolną zastosowano mieszaninę roztworu rodnika w metanolu. Wyniki pomiarowe podawane są najczęściej jako stopień zmiatania rodnika AA [%] i obliczane według równania:

$$AA\% = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

Gdzie A_A oznacza absorbancję badanej próbki, a A_B próby ślepej.



Rys. 1. Zmiana absorbancji w metodzie DPPH.

Fig. 1. Change of absorbance in DPPH assay.

Czas wykonywania pomiaru ustalono doświadczalnie na 10 minut. Wykonano dwie serie pomiarowe dla przypuszczalnie najsilniejszego i najsłabszego miodu pitnego, melisowego i akacjowego (Rys. 1). Zbadano szybkość zmiany barwy rodnika DPPH z dodatkiem tychże miodów mierząc czas zmiany barwy z purpurowej na żółtą. W przypadku miodu melisowego zmiana ta zachodziła dosyć szybko. Już w 7 minucie obserwowano jasno fioletowe zabarwienie roztworu rodnika co świadczy, że antyoksydanty zawarte w miodzie melisowym spełniają swoje zadanie. Po upływie 10 minut obserwowano zatrzymanie się reakcji i całkowity zanik barwy rodnika DPPH. Natomiast reakcja z dodatkiem miodu akacjowego przebiegała znacznie wolniej i nawet po 40 minutach od rozpoczęcia doświadczenia zabarwienie pochodzące od rodnika DPPH było wciąż intensywne. Pomiaru wykonywano po 10 minutach reakcji.

2.4. Oznaczanie całkowitego stężenia polifenoli (Determination of total polyphenols concentration)

Całkowitą zawartość polifenoli oznaczano metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu (FC) [13]. Polifenole redukują FCR zmieniając jego barwę na niebieską (maksimum absorpcji przy 765 nm). Barwa ta pochodzi od produktów redukcji głównych składników FCR, kwasów fosfowolframowego i fosfomolibdenowego. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do całkowitej zawartości polifenoli w badanej próbce.

Do kolbki o pojemności 10 ml odmierzone 1 ml próbki o stężeniu 10 mg/ml, następnie dodano 1 ml roztworu Folina-Ciocalteu. Całość pozostawiono na 3 minuty. Następnie dodano 4 ml 20% roztworu węgla sodu (Na_2CO_3) i uzupełniono wodą destylowaną do kreski. Zawartość kolbki dokładnie wymieszano i pozostawiono w ciemnym miejscu na 30 minut w celu ustabilizowania się reakcji. Po 30 minutach zmierzono wartość absorbancji przy 765 nm, względem prób ślepych w których miód zastąpiono wodą destylowaną.

2.5. Oznaczenie stężenia alkoholu etylowego (Determination of total ethanol concentration)

Alkohol etylowy oznaczano metodą piknometrycznego pomiaru gęstości destylatu według PN-90 A-79120/04 [14]. Istota metody polega na oddestylowaniu alkoholu etylowego z miodu pitnego, oznaczeniu gęstości otrzymanego destylatu i na podstawie tablic odczytaniu stężenia etanolu.

Czysty i suchy piknometr dokładnie najpierw wypłukano wodą destylowaną, a następnie alkoholem rektyfikowanym i pozostawiono do wyschnięcia. Piknometr wraz z korkiem zważono trzykrotnie, uśredniono masy nie różniące się od siebie o więcej niż $\pm 0,0002$ g. Następnie piknometr napełniono wodą destylowaną i wstawiono do termostatu o temperaturze 20°C na 30 min. Po upływie 30 minut zważono piknometr wraz z jego zawartością, i uśredniono wyniki trzech pomiarów. Za pomocą pipety do piknometru wprowadzono 50 ml miodu pitnego, zawartość piknometru przeniesiono ilościowo do kolby destylacyjnej, popłukując go 2-3 krotnie wodą destylowaną (łącznie 30 - 40 ml). Następnie roztwór miodu zalkalizowano 1 M roztworem wodorotlenku sodu wobec papierka wskaźnikowego. Destylację prowadzono w temperaturze wrzenia roztworu do momentu uzyskania około 45 ml destylatu (jako odbieralnik zastosowano piknometr). Piknometr zamknięto korkiem, zważono trzykrotnie, uśredniono wyniki nie różniące się o $\pm 0,0002$ g. Gęstość destylatu

obliczono ze wzoru przedstawionego poniżej. Moc miodu odczytano na podstawie tabel dołączonych do normy [14].

$$d_{20}^{20} = \frac{P_1 - P_0}{P_2 - P_0}$$

gdzie P_0 - masa pustego piknometru, P_1 - masa piknometru z destylatem w temperaturze 20°C, P_2 - masa piknometru z wodą destylowaną w temperaturze 20°C.

2.6. Oznaczenie zawartości cukrów metodą refraktometryczną (Determination of the sugar content by refractometric method)

Oznaczenie zawartości cukrów wykonano metodą refraktometryczną według PN-A-74252:1998 [15]. Refraktometr skalibrowano wobec wody destylowanej użytej jako wzorzec. Za wynik końcowy przyjęto średnią arytmetyczną z co najmniej dwóch pomiarów nie różniących się od siebie nie więcej niż 0,2 % (m/m). Oznaczenie wykonano dla próbek z początkowego i końcowego etapu produkcji.

2.7. Wpływ reakcji ubocznych na całkowity potencjał antyoksydacyjny (The influence of side reactions on the total antioxidant potential)

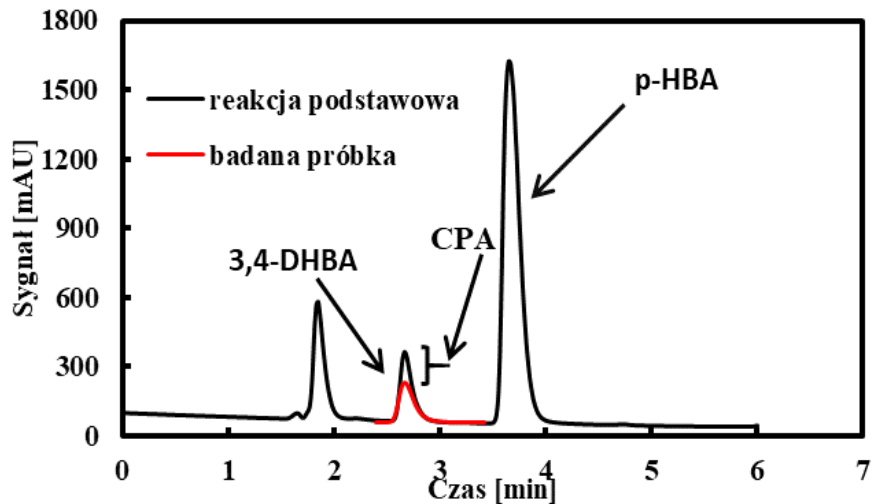
CPA jest równy sumie iloczynów ze stężeń wszystkich antyoksydantów, zarówno tych słabych (etanol, glukoza) jak i mocnych (polifenole). W trakcie pracy okazało się jednak, że CPA, w odniesieniu do rodników hydroksylowych, miodów pitnych nie jest wielkością addytywną. Jednym z możliwych wyjaśnień tego efektu jest przyjęcie założenia, że niektóre związki (w szczególności dotyczy to występujących w dużym stężeniu cukrów i etanolu) mogą wytwarzać silne rodniki zakłócające pomiar. Dlatego też zbadano możliwość powstawania 3,4DHBA z p-HBA (chromatograficznie) pod wpływem produktów utleniania glukozy i etanolu. Utleniaczem w tym przypadku były jony Fe(III).

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

3.1. CPA^{OH} miodów pitnych (TAP^{OH} of meads)

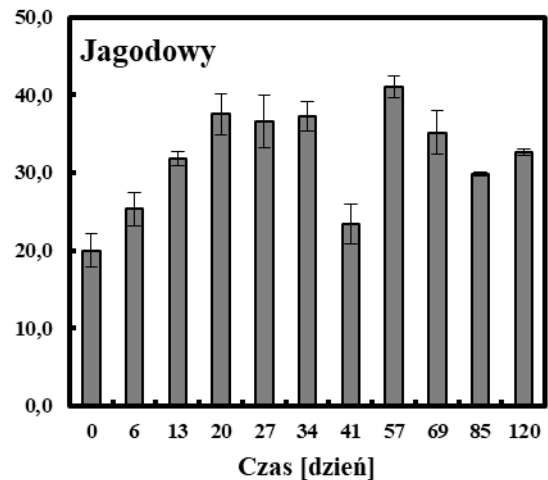
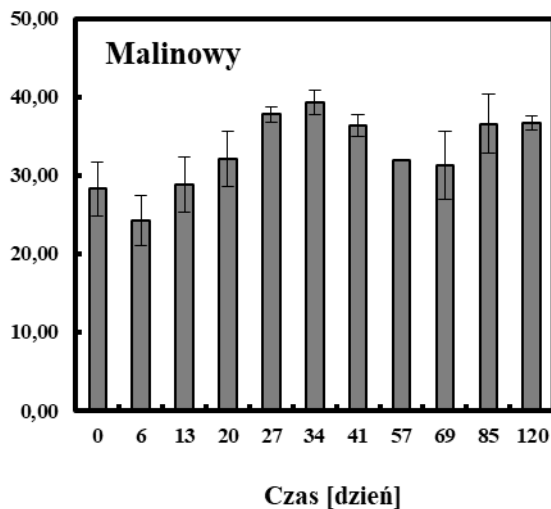
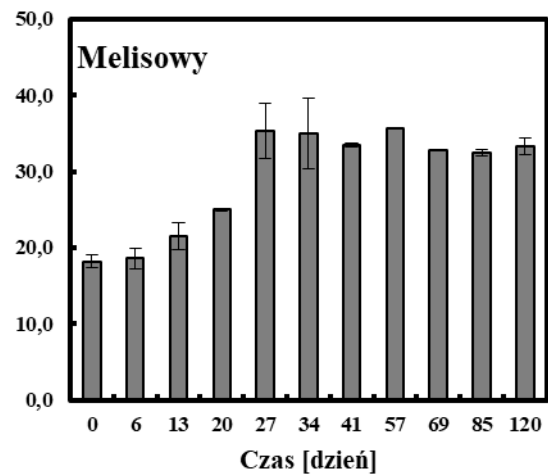
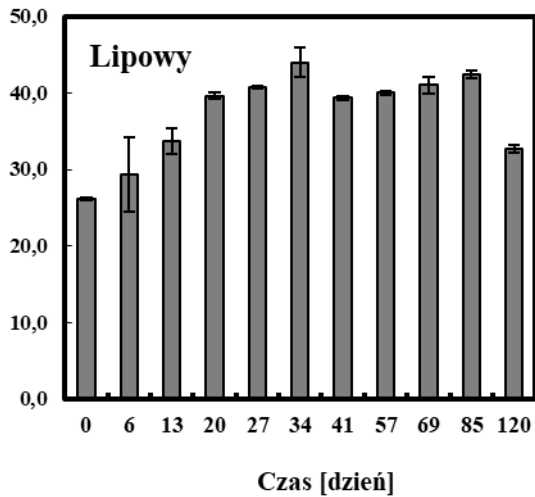
Mechanizm pomiaru CPA^{OH} przedstawiony został na Rys. 2. Polega on na wykonaniu chromatogramów produktów reakcji Fentona bez i z dodatkiem próbki. W wyniku reakcji kwasu p-HBA z rodnikami hydroksylowymi wygenerowanymi w reakcji Fentona powstaje kwas 3,4DHBA. Po dodaniu próbki do mieszaniny reakcyjnej próbki, pole powierzchni pików kwasu 3,4DHBA ulega zmniejszeniu. Różnica pól powierzchni kwasu 3,4DHBA powstałego w reakcji podstawowej i reakcji z próbką jest miarą całkowitego potencjału antyoksydacyjnego, CPA [10].

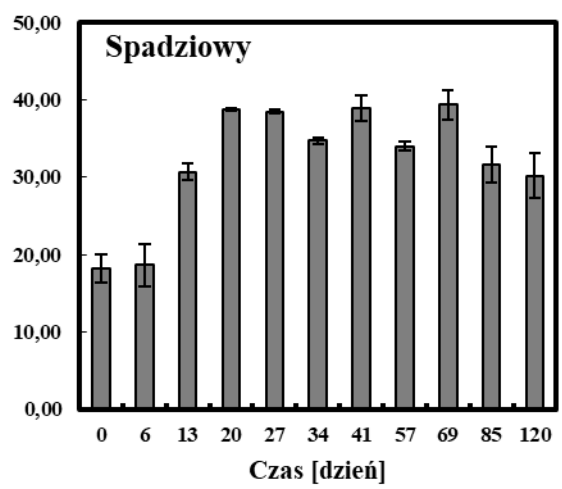
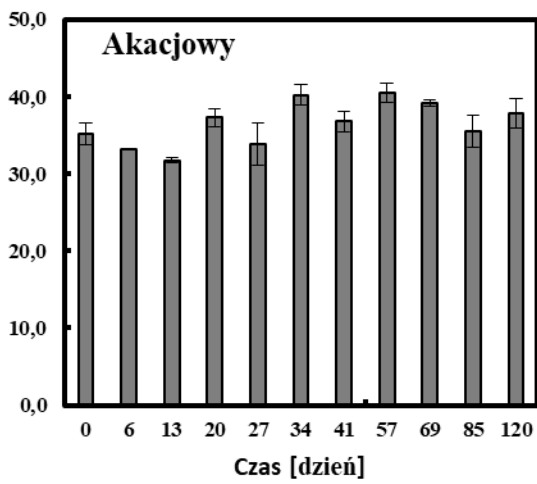
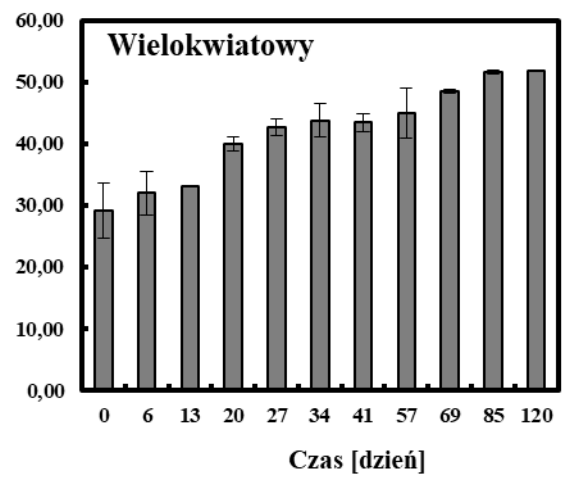
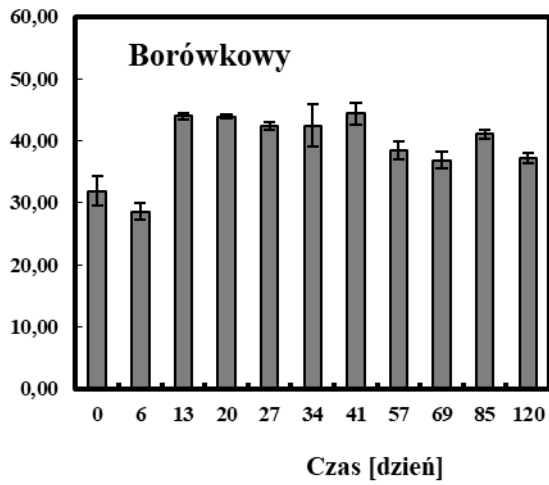
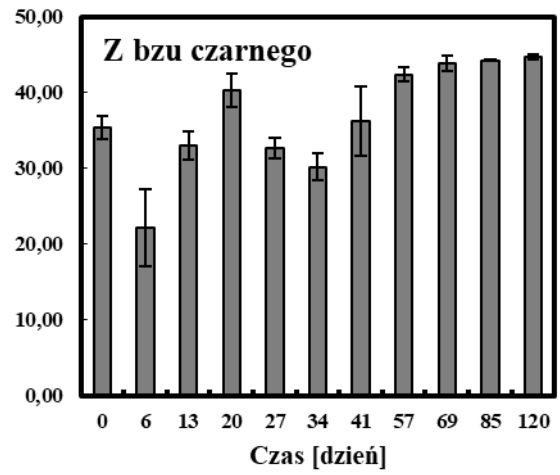
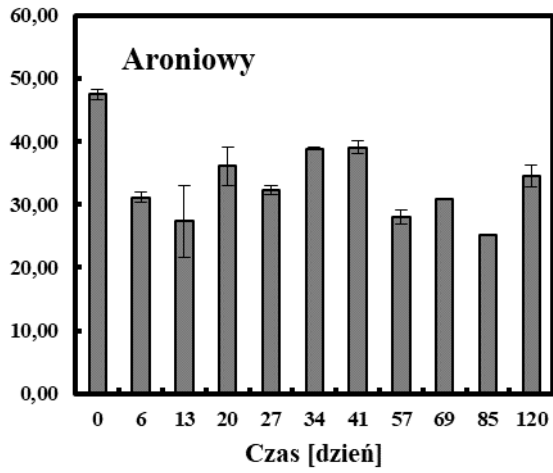
Wartości CPA^{OH} badanych miodów pitnych zostały przedstawione na wykresach na Rys. 3. Okazało się, że wartości CPA dla poszczególnych gatunków miodów pitnych na różnych etapach produkcji ulegały zmianom. Z wykresów na Rys. 3 możemy wnioskować, że w próbkach pięciu miodów (gryczanego, akacyjowego, lipowego z dodatkiem soku z borówki amerykańskiej, czarnego bzu, maliny) w dniu sporządzenia i pobrania próbek wartość CPA jest wyższa niż w dniu szóstym, czy też jak w przypadku miodu akacyjowego, aroniowego, z bzu czarnego wartość ta jest wyższa nawet w dniu trzynastym. Spowodowane to może być procesem sycenia miodów, a także dodatkiem świeżych soków owocowych, które znacznie różnią się od siebie składem i w których zawartość witaminy C, cukrów i związków polifenolowych jest stosunkowo wysoka. Kolejnym możliwym czynnikiem tak wysokich wartości CPA etapu początkowego produkcji mogą być reakcje chemiczne zachodzące podczas procesu sycenia, chodzi głównie o reakcje rozpadu białek i cukrów pod wpływem podwyższonej temperatury.

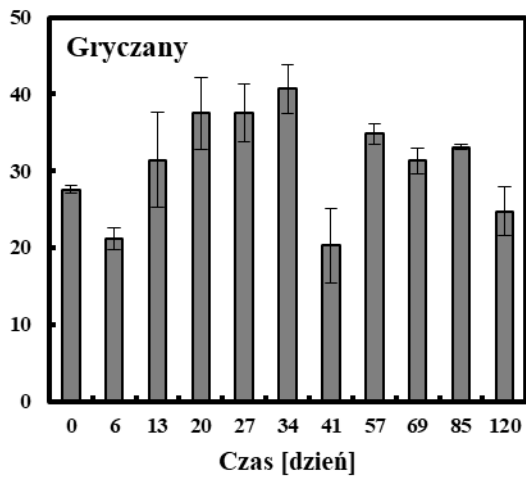


Rys. 2. Chromatogram, wyjaśniający mechanizm pomiaru CPA, 1 mM kwasu p-HBA i 3,4-DHBA (przed i po dodaniu próbki) otrzymanego w wyniku reakcji kwasu p-HBA z rodnikami hydroksylowymi. Warunki chromatograficzne: kolumna COSMOSIL 5 μ m, 4,6 x 150 mm, 5C18-MS-II (Waters), temp. 20°C. Faza ruchoma: bufor fosforanowy o pH 6,6; szybkość przepływu 1 ml/min, detektor UV 205 nm.

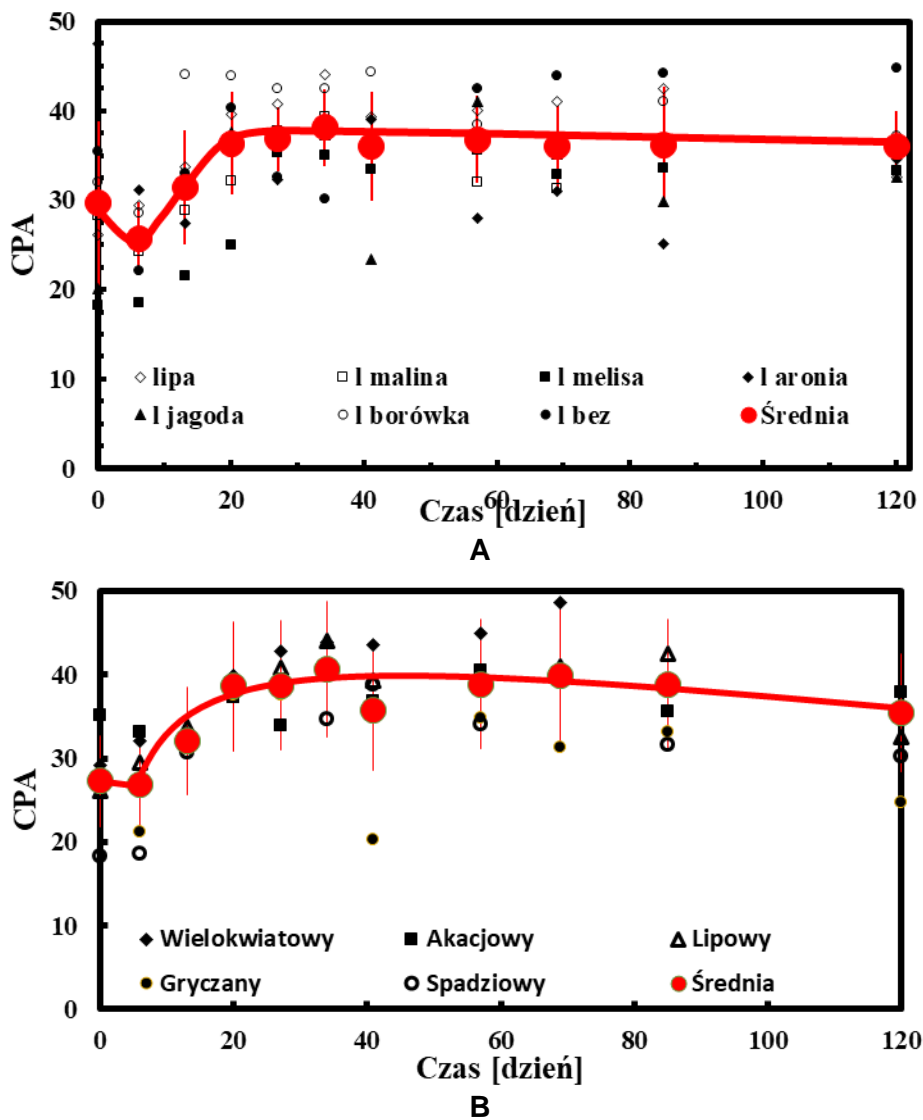
Fig. 2. HPLC chromatogram of p-HBA and 3,4-DHBA acids. Experimental conditions: column – COSMOSIL 5 μ m, 4,6 x 150 mm, 5C18-MS-II (Waters); temperature – 20°C; mobile phase – phosphate buffer pH 6.6; flow rate – 1 ml/min, UV detection – 205 nm.





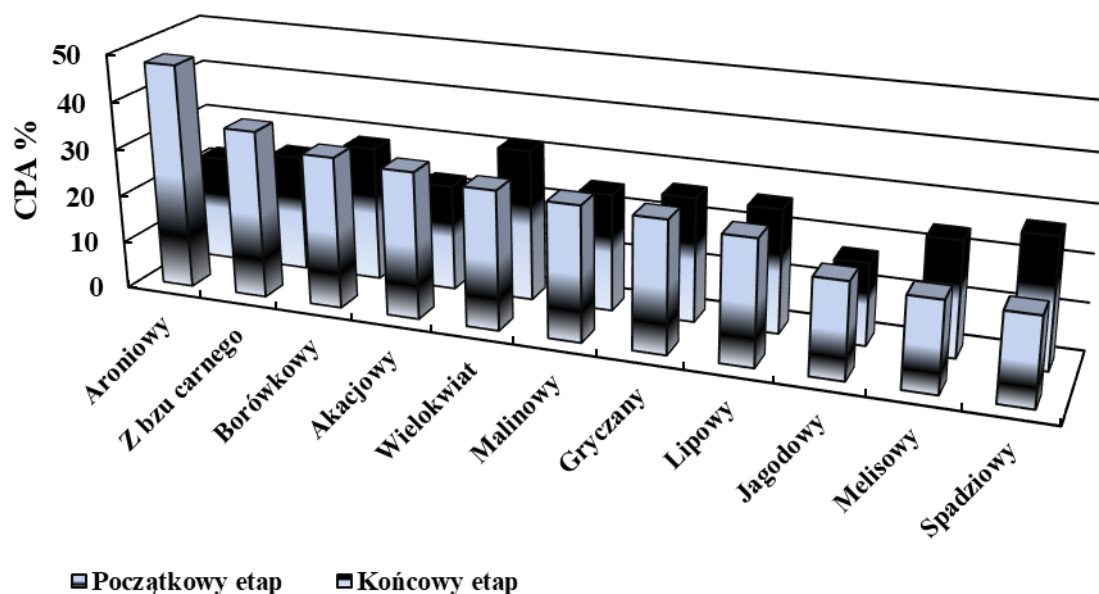


Rys. 3. CPA^{OH} miodów pitnych. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 2.
Fig. 3. TAP^{OH} of meads. Chromatographic conditions the same as on Fig. 2.



Rys. 4. CPA^{OH} miodów owocowych, A, i gatunkowych, B. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 2.
Fig. 4. TAP^{OH} of honeys: fruit, A and quality, B. Chromatographic conditions the same as on Fig. 2.

W roztworze miodu zachodzą reakcje enzymatyczne. Ich szybkość wzrasta z temperaturą do osiągnięcia maksimum. Po jego przekroczeniu aktywność enzymów zaczyna słabnąć w wyniku denaturacji białek. Od „zerowego” do piątego dnia fermentacji obserwowano bardzo powolną fermentację lub w niektórych przypadkach jej brak. W szóstym dniu dodano drożdże piekarskie. Po tym procesie pobrano próbki. W szóstym dniu wartość CPA miódów (głównie owocowych) uległa spadkowi, co może być przyczyną dodania drożdży. W kolejnych dniach po dodaniu drożdży wartość CPA sukcesywnie wzrastała, w niektórych przypadkach np. miodzie akacjowym, aroniowym wartość CPA rosła i malała skokowo. Za wielkości potencjału antyoksydacyjnego w dalszych etapach fermentacji (tj. po 6 dniu) odpowiedzialne są przede wszystkim warunki w jakich miody dojrzewały. W czterdziestym pierwszym dniu zaobserwowano znaczny spadek CPA miodu gryczanego i jagodowego. Spowodowane jest to prawdopodobnie dekantacją i zebraniem osadów wytrącających się podczas procesu dojrzewania. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na przebieg krzywych i wartość CPA w dalszych etapach produkcji ma wzrost stężenia wytwarzanego alkoholu, a tym samym spadek stężenia cukrów podczas fermentacji.



Rys. 5. CPA^{OH} poszczególnych miódów na początkowym i końcowym etapie wytwarzania.
Fig. 5. TAP^{OH} of honeys at the initial and final stages of production.

Z Rys. 3 wynika, że poszczególne miody zachowują się różnie podczas fermentacji. Jednakże uśrednione wyniki (Rys. 4) sugerują pewną ogólną tendencję. W początkowym etapie następuje spadek CPA^{OH} który następnie rośnie (są to zmiany statystycznie znamienne) i stabilizuje się na stałym poziomie. Efekt ten jest bardziej widoczny w przypadku miódów owocowych. Natomiast średnia wartość CPA^{OH} miódów gatunkowych przedstawia się nieco inaczej. W początkowym etapie wartości CPA utrzymują się na stałym poziomie po czym ulegają wzrostowi i w końcowej fazie następuje łagodny spadek ich wartości (Rys. 4B).

Na Rys. 5 przedstawiono wartości CPA badanych miódów na początkowym i końcowym etapie produkcji. Widać, że w niektórych przypadkach wartości CPA rosły, w niektórych nie zmieniały się lub były w granicy błęd pomiarowego, a jeszcze w innych przypadkach wartości CPA rosły. Za spadek całkowitego potencjału antyoksydacyjnego miódów pitnych na początkowym etapie w stosunku do końcowego odpowiedzialne są przede wszystkim antocyjany, a dokładnie ich częściowa degradacja oraz wytrącanie się w postaci osadów które na dalszym etapie produkcji zostały zebrane i w których zidentyfikowano znaczne ilości tychże związków. Przyczyną spadków są również liczne reakcje chemiczne zachodzące w miodach podczas procesu fermentacji, możemy wśród nich wymienić reakcje rozpadu enzymów czy też flawonoidów na glikozydy. Warto również zauważyć, że spadek CPA ma miejsce głównie w miodach owocowych (aroniowy, z bzu czarnego, jagodowy) w których stężenia antocyjanów i innych flawonoidów są znacznie wyższe niż w miodach gatunkowych.

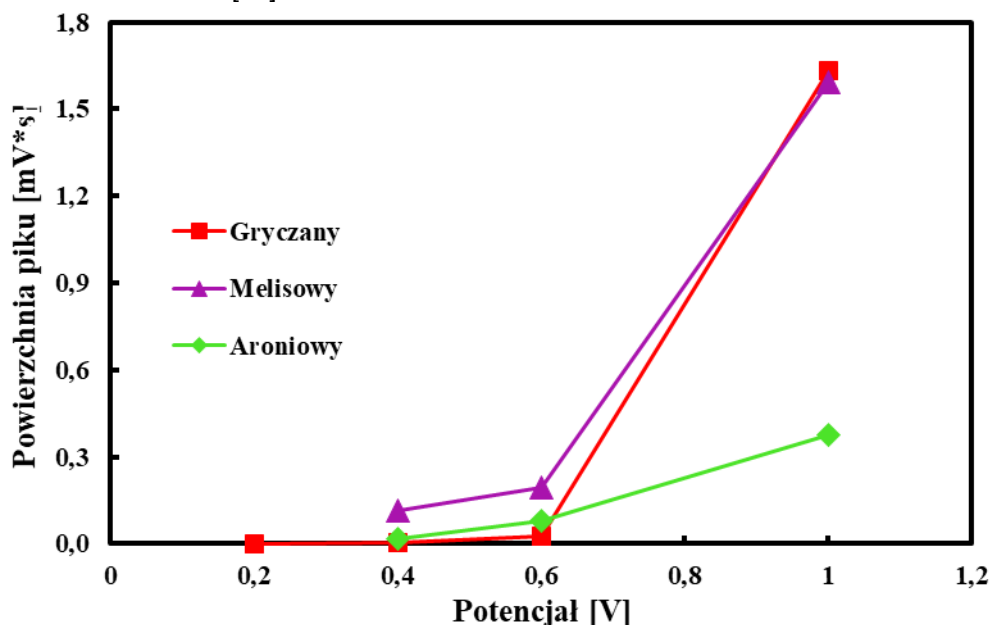
CPA pozostawało niezmiennione lub ulegało lekkim wahaniom w miodach gatunkowych (lipowy, gryczany), które praktycznie nie zawierają polifenoli odpowiedzialnych za wzrost lub spadek wartości CPA, lub po prostu zawierają antyoksydanty słabej mocy. Tylko w nielicznych przypadkach wartości CPA na końcowym etapie wzrosły w odniesieniu do początkowego etapu. Taką sytuację zaobserwowano dla miódów spadziowego, melisowego i wielokwiatowego. Za owy wzrost odpowiedzialny jest przede wszystkim wytworzony alkohol, lub znacznie wolniejszy przebieg procesu fermentacji co przyczyniło się do

wolniejszego rozpadu flawonoidów, a tym samym obserwowano wzrost CPA. Miód spadziowy i wielokwiatowy zawierają znaczne ilości witamin, głównie witaminy C, kwasów organicznych, enzymów oraz cukrów prostych, co w pewnym stopniu wpłynęło na wzrost CPA. Miód melisowy zawiera przede wszystkim dość wysokie stężenie związków polifenolowych (apigenina, luteolina) oraz fenolokwasów i to one są przyczyną wzrostu.

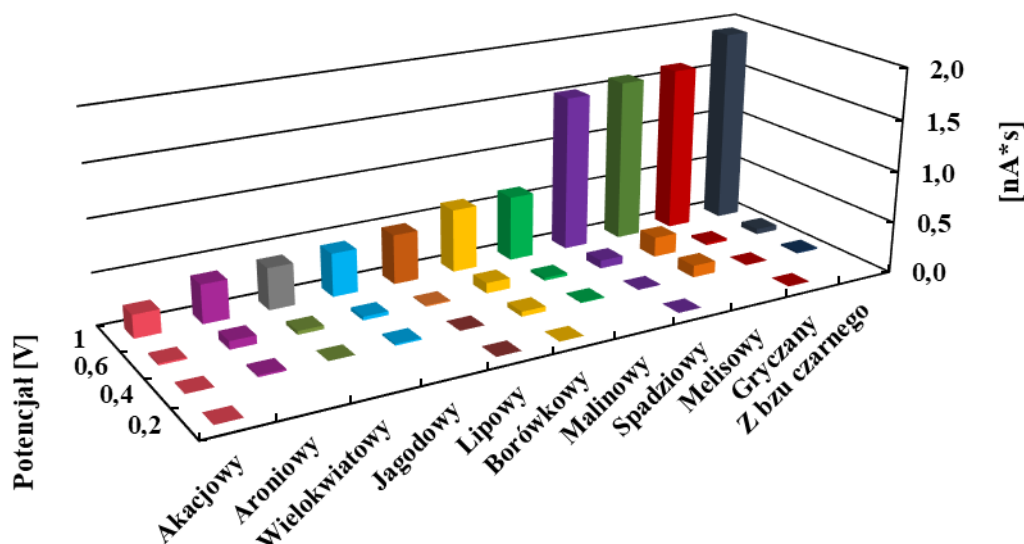
3.2. CPA^{HPLC/ED} miodów (TAP^{HPLC/ED} of honeys)

CPA można również oznaczać chromatograficznie z detekcją elektrochemiczną. Połączenie tych dwóch technik pozwala nam na rozdzielanie badanych związków i jednocześnie ich utlenienie. Badane próbki mogą być więc podzielone zarówno ze względu na zachowanie chromatograficzne jak i elektrochemiczne. Miara mocy antyrodnikowej było sumaryczne pole powierzchni, zarejestrowane w zakresie potencjału utleniającego, wszystkich pików chromatograficznych. Podczas wykonywania badań korzystano z elektrody z węgla szklanego. CPA oznaczano dla czystych miodów pitnych z etapu końcowego przy zakresie potencjałów elektrody pracującej od 0,2 V do 1 V.

Związki dające wyraźny sygnał na detektorze przy niskich potencjałach są silnymi antyoksydantami. Najsilniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi charakteryzują się miody melisowy i borówkowy, najsłabszymi zaś lipowy i wielokwiatowy. Miody owocowe wykazują większe CPA niż miody gatunkowe. Spowodowane jest to zapewne obecnością znacznej ilości związków polifenolowych, głównie flawonoidów i antocyjanów. Miody gatunkowe mają znacznie większe sumaryczne pola powierzchni przy potencjale 1 V niż przy niższych potencjałach. Prawdopodobnie jest to spowodowane wysokim stężeniem słabych antyoksydantów nie dających sygnałów przy niskich potencjałach. Miody o ciemnej barwie (gryczany, spadziowy) mają znacznie wyższe wartości CPA od miodów jasnych (akacjowy, lipowy, wielokwiatowy) co zostało udowodnione naukowo [11].



Rys. 6. Hydrodynamiczne voltamogramy wybranych miodów pitnych.
Fig. 6. Hydrodynamic voltammograms of selected meads.

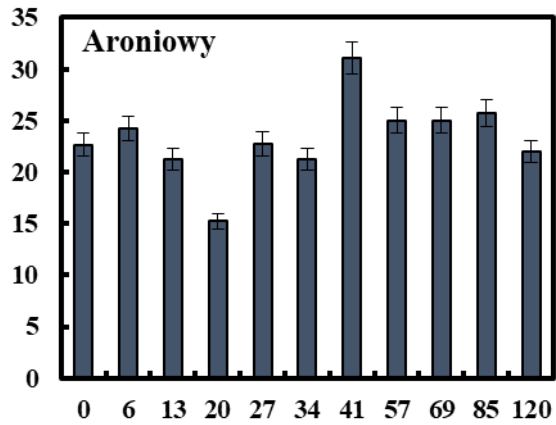
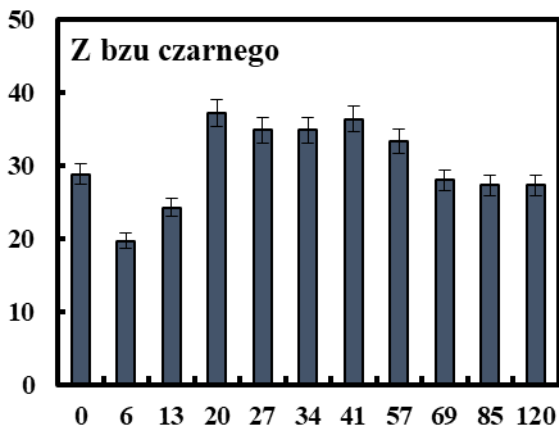
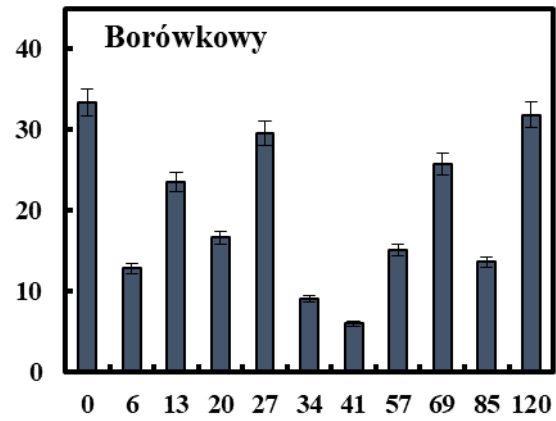
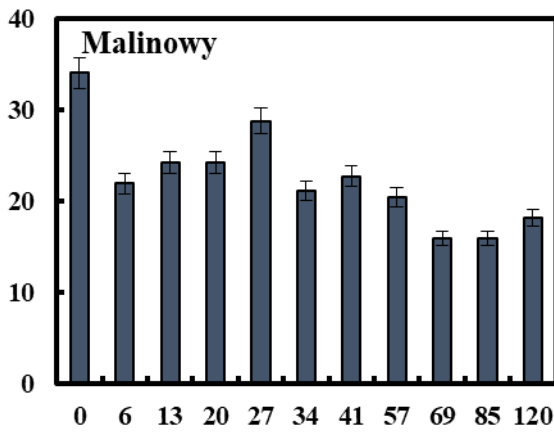
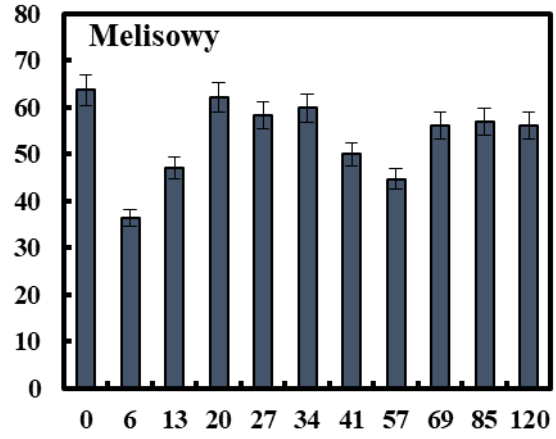
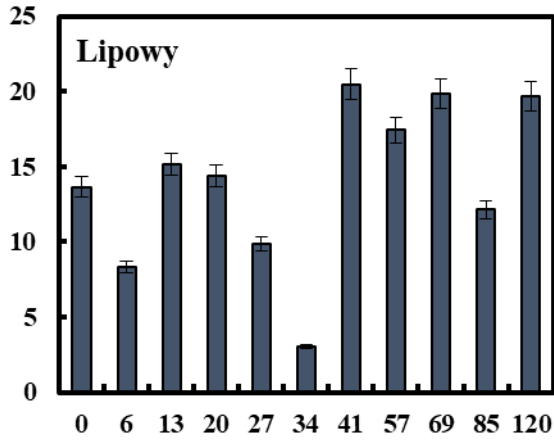


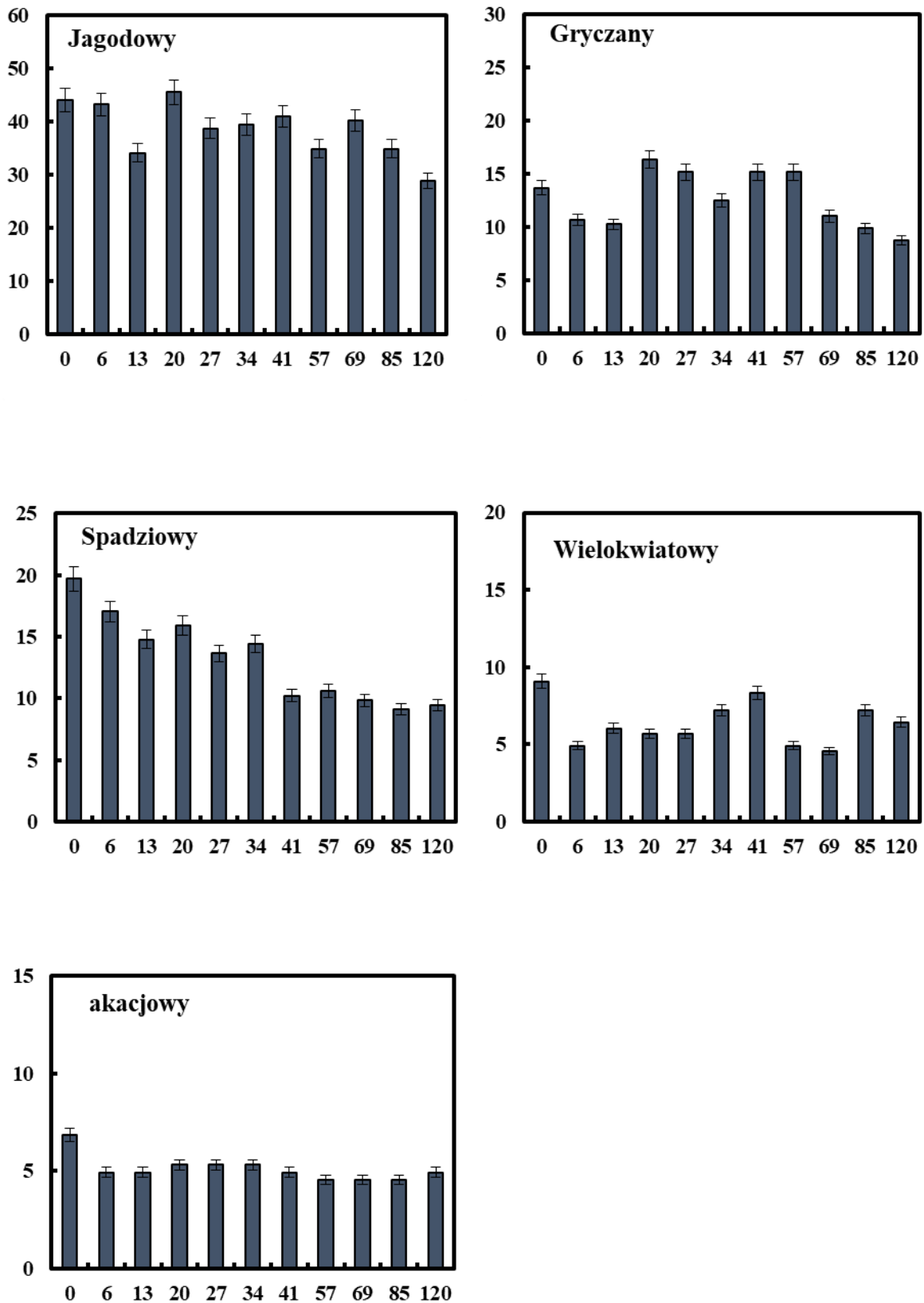
Rys. 7. CPA^{HPLC/ED} miodów.
Fig. 7. TAP^{HPLC/ED} of honeys.

Hydrodynamiczne woltamogramy (Rys. 6) przedstawiają zależność prądu od potencjału w warunkach przepływowych. Prąd jest wprost proporcjonalny do stężenia antyoksydantu, ilości przenoszonych elektronów i do kwadratu ze współczynnika dyfuzji. Im przy niższym potencjale przebiega reakcja utleniania tym z silniejszym antyoksydantem mamy do czynienia. Z Rys. 7 wynika, że wysokość pików wzrasta wraz z potencjałem. Wielkość pików jest proporcjonalna do stężenia antyoksydantu natomiast potencjał przy którym zostaje on utleniony proporcjonalny jest oraz do mocy przeciwutleniającej. Miód melisowy ma silne właściwości antyoksydacyjne, gdyż posiada znaczną ilość silnych antyoksydantów uwidaczniających się już przy $E = 0,4$ V, są to prawdopodobnie flawonoidy (apigenina, luteolina) oraz inne polifenole w tym pochodne kwasu hydrocynamonowego. Natomiast przy potencjale 0,6 V zaczyna uwidaczniać się wpływ słabych antyoksydantów o dość znacznym stężeniu. Analogiczna sytuacja zachodzi również przy $E = 1$ V czego dowodem jest gwałtowny skok krzywej. Zupełnie w inny sposób przedstawia się przebieg krzywej miodu gryczanego. Miód ten nie zawiera w sobie mocnych przeciwutleniaczy lub ich ilość jest znikoma. W przedziale $0,2 \div 0,6$ V różnica pomiędzy sumarycznymi wartościami pół powierzchni są niewielkie, dopiero przy $E = 1$ V obserwujemy gwałtowny skok i pojawienie się większej ilości pików. Jest to dowód, że w miodzie zawarte są słabej lub średniej mocy przeciwutleniacze w dość dużym stężeniu. Możemy wśród nich wyróżnić pochodne kwasów fenolowych (kawowego, chlorogenowego, protokatechowego) kwas jabłkowy i cytrynowy oraz związki polifenolowe. Miód aroniowy zawiera niskie stężenie mocnych antyoksydantów uwidaczniających się przy potencjale 0,4 V (głównie polifenole) oraz dość duże stężenie słabych antyoksydantów dających sygnał przy wyższych potencjałach. Widzimy, że krzywa dla miodu aroniowego ma tendencję wzrostową z czego możemy wnioskować, że przy wyższych potencjałach uaktywniłyby się jeszcze większa liczba przeciwutleniaczy o małej mocy.

3.3. CPA^{DPPH} miodów pitnych (TAP^{DPPH} of meads)

Oznaczanie właściwości przeciwutleniających miodów pitnych odniesionych do rodnika DPPH wykonano metodą spektrofotometryczną. Do metanolowego roztworu rodnikowego dodawano po 20 μ l miodów owocowych, natomiast miody gatunkowe dodawano w objętości po 40 μ l, gdyż przy niższym stężeniu próbek nie zauważano jakichkolwiek zmian barwy, lub reakcja zachodziła zbyt długo (ok. 40 – 60 min.). Pomiar spektrofotometryczny pozwala na tego typu badanie ze względu na swą prostotę i niski koszt analizy. W wyniku działania związków antyrodnikowych zawartych w miodach, rodnik wychwytuje elektron lub proton w wyniku czego jego barwa zmienia się z purpurowej na żółtą. Szybkość zmiany barwy jest wprost proporcjonalna do stężenia antyoksydantów w próbce oraz mocy przeciwutleniacza. Poniżej przedstawiono wykresy jedenastu miodów przebadanych metodą z wykorzystaniem rodnika DPPH. Wykresy sporządzono w optymalnym czasie analizy wynoszącym 5 minut.





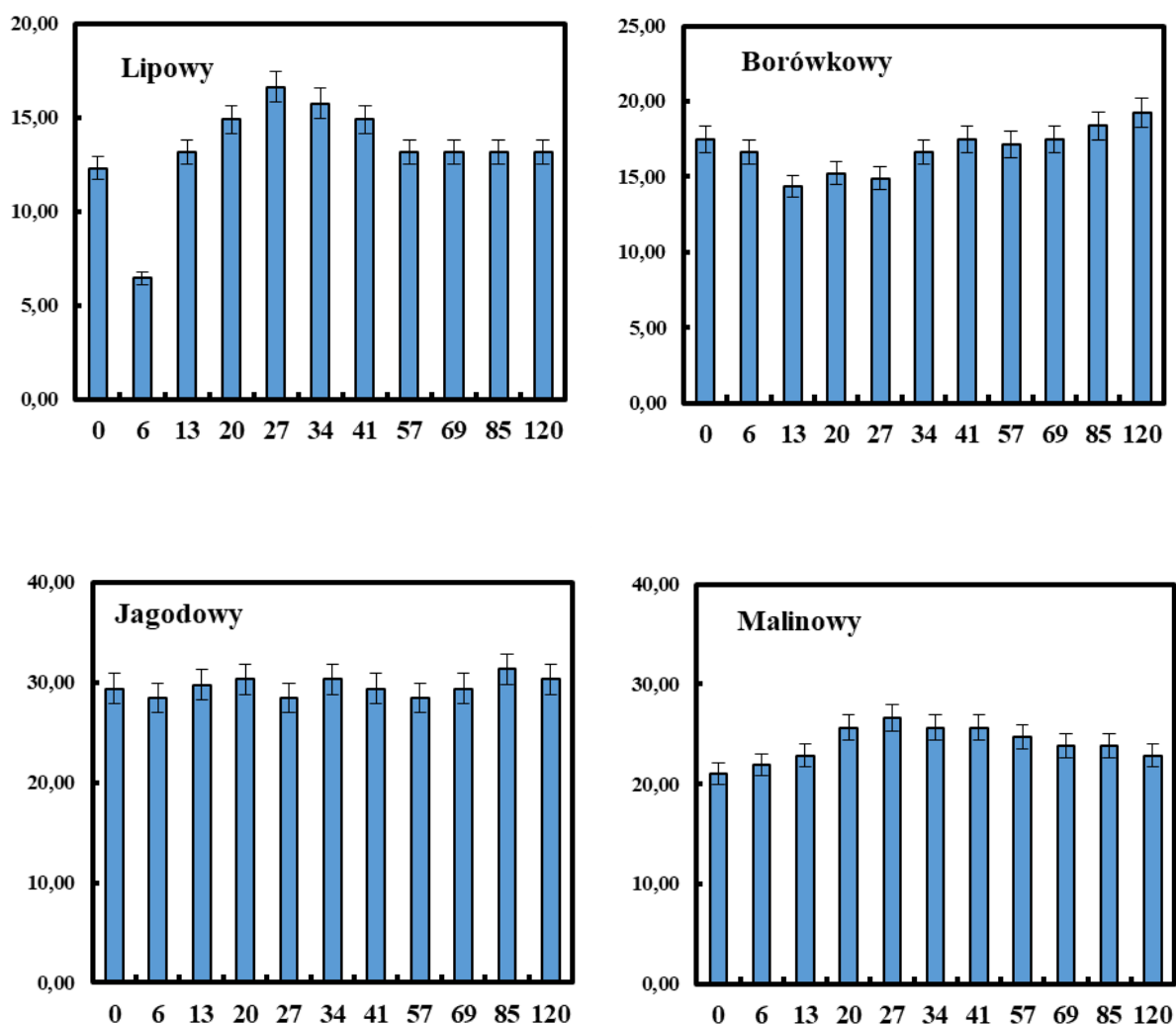
Rys. 8. Wartości CPA^{DPPH} miodów pitnych
 Fig. 8. TAP^{DPPH} of meads.

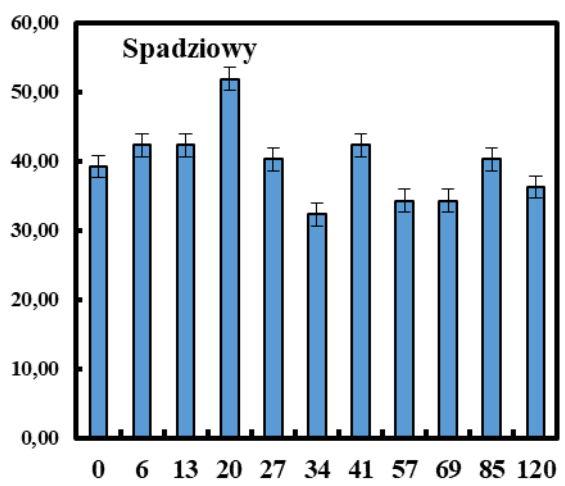
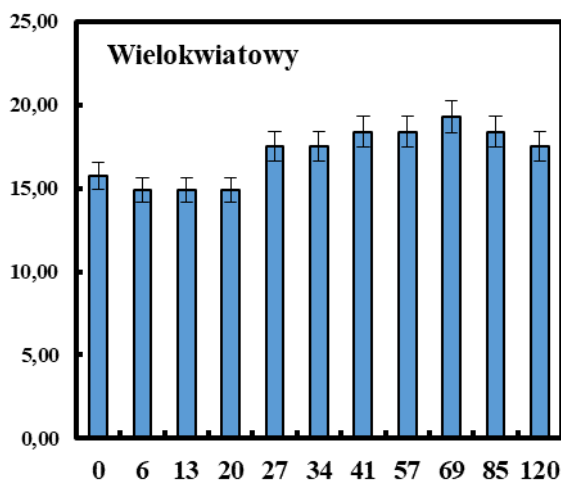
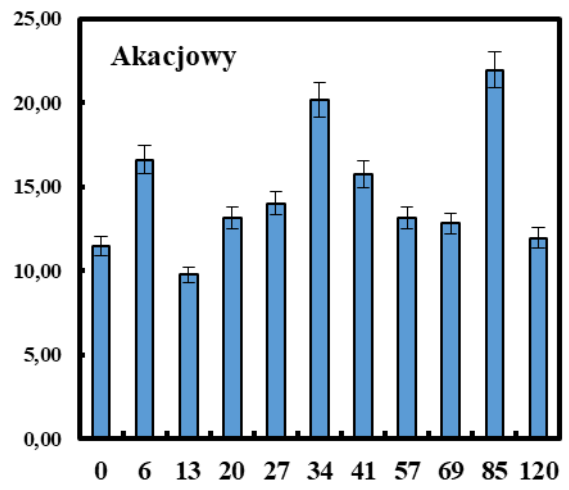
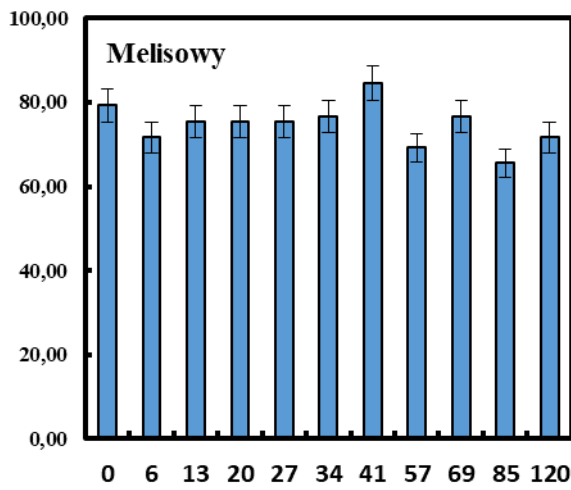
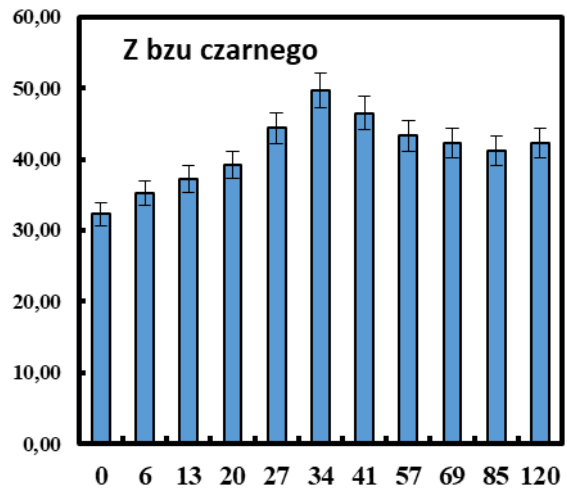
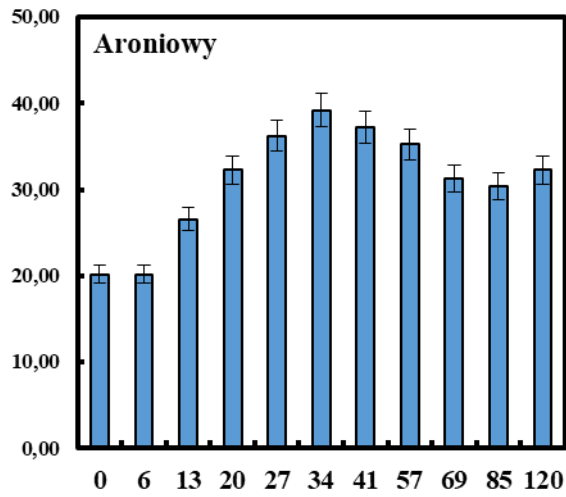
Rodnik DPPH reaguje przeważnie z mocnymi przeciwutleniaczami, co pozwala określić ich stężenie oraz stwierdzić czy dodatek moszczy owocowych i wywaru ziółowego wpływa korzystnie bądź nie na właściwości miodów. Najwyższym potencjałem antyrodnikowym w odniesieniu do DPPH• charakteryzuje się miód melisowy. Zmiata on średnio 53% rodników w porównaniu do miodu akacjowego, który zmiata zaledwie 5.1%. Silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzują się również miód jagodowy i z bzu czarnego. Porównując oba rodzaje miodów możemy zauważyć, że znacznie większą aktywność neutralizowania DPPH• mają miody owocowe (MO). Wartość antyoksydacyjna miodów szlachetnych jest niska ze względu na bardzo małą zawartość polifenoli. Przebieg wykresów CPA (Rys. 8) jest zróżnicowany dla każdego z miodów. Wynika to z niestabilnych warunków przebiegu fermentacji i reakcje między składnikami miodu.

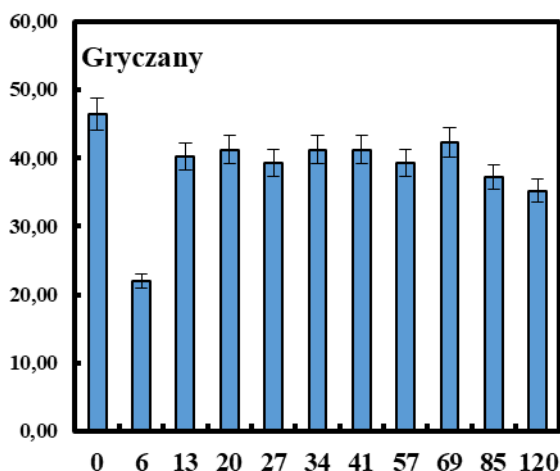
3.4. Całkowita zawartość polifenoli (Total polyphenols concentration)

Metoda Folina-Ciocalteu pozwala na określenie całkowitej zawartości polifenoli (CZP). Pomiar wykonywany jest metodą spektrofotometryczną. W miarę utleniania się polifenoli w reakcji z odczynnikiem FC roztwór zmienia barwę, przechodząc z żółtej w ciemnoniebieską, a nawet czarną. Całkowitą zawartość polifenoli przedstawiono jako ekwiwalent kwasu galusowego w przeliczeniu na 1 g produktu.

Na Rys. 9 przedstawiono całkowitą zawartość polifenoli w miodach pitnych zmieniającą się w czasie fermentacji i dojrzewania miodów. Oś odciętych obrazuje czas przebiegu fermentacji, oś rzędnych zawartość polifenoli w mg GA/g miodu.

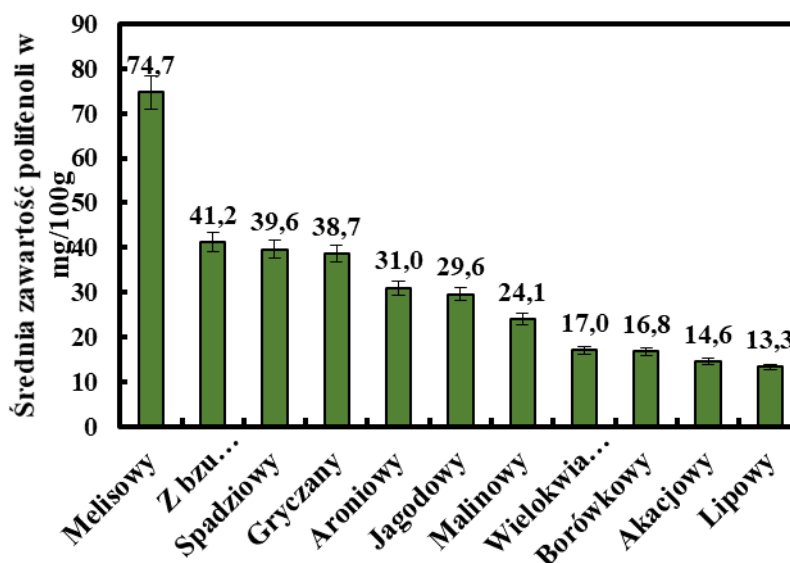






Rys. 9. Całkowita zawartość polifenoli w miodach pitnych na etapach fermentacji.
Fig. 9. Total polyphenols concentration in meads during the fermentation stages.

Zawartość polifenoli na różnych etapach zmieniała się (Rys. 9). Najwięcej związków polifenolowych zawiera miód melisowy (średnio 74,7 mg/100 g), następnie z bzu czarnego (śr. 41,2 mg/100 g) i spadziowy (śr. 39,6 mg/100g). W pozostałych miodach wartości te wahają się od 31 mg/100g dla miodu aroniowego do 13,3 mg/100g dla miodu lipowego (Rys. 10).



Rys. 10. Całkowita zawartość polifenoli w miodach pitnych.
Fig. 10. Total polyphenols concentration in meads.

W miodach owocowych, które zostały sporządzone na bazie miodu lipowego możemy zauważyć charakterystyczny przebieg wykresów całkowitej zawartości polifenoli (PF). Wartości te w początkowych stadiach procesu fermentacji ulegały sukcesywnym (mniejszym lub większym) wzrostom. Dla miodu aroniowego i z bzu czarnego (Rys. 9), stężenia PF wzrastały do 34 dnia produkcji poczym zaczęły stopniowo maleć. W miodzie malinowym wzrost był rejestrowany do 27 dnia. W pozostałych miodach owocowych, melisowym i jagodowym zawartość polifenoli zawierała się przez cały okres fermentacji na niemalże stałym poziomie z niewielkimi wahaniami. Natomiast w miodzie borówkowym stężenie PF malało do 13 dnia po czym do 120 ulegało ciągłemu wzrostowi.

W miodach gatunkowych całkowita zawartość polifenoli ulegała niewielkim zmianom. Jedynie w miodzie lipowym i akacjowym zmiany te są większe. Na taki przebieg zmian zawartości PF w miodach pitnych oznaczanych z wykorzystaniem odczynnika FC mogą mieć wpływ niekoniecznie same związki polifenolowe co związki reagujące z odczynnikiem FC i posiadające grupę fenolową. Do tych związków możemy zaliczyć aminokwasy, białka czy też enzymy. Obecność tych substancji mogło w znaczący sposób wpłynąć na zafałszowanie wyników, gdyż liczne badania wykazały, że zawartość polifenoli wraz z biegiem fermentacji ulega spadkowi, a tylko w niewielkim procencie wzrostowi. Istotną kwestią jest również

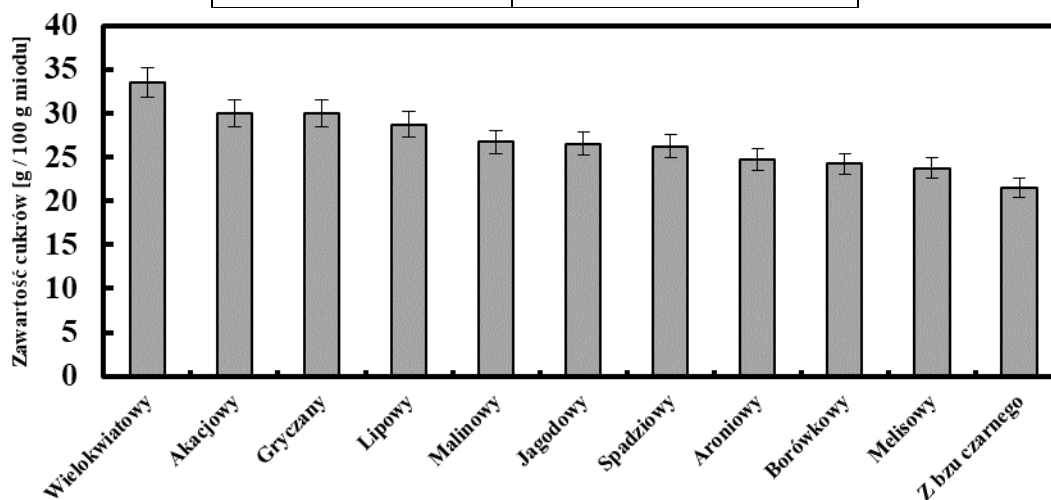
chronienie polifenoli przez cukry. Prawdopodobnie zawartość cukrów prostych w miodach była na tyle wysoka, aby nie dopuścić do strat PF co tłumaczyłoby początkowy wzrost na następnie spadek CZP. Przydatnym byłoby oznaczenie również polifenoli w miodach owocowych w celu porównania stężeń początkowych w sokach i miodach.

3.5. Wpływ fermentacji na zmiany stężeń cukrów (Effect of fermentation on changes in sugar concentrations)

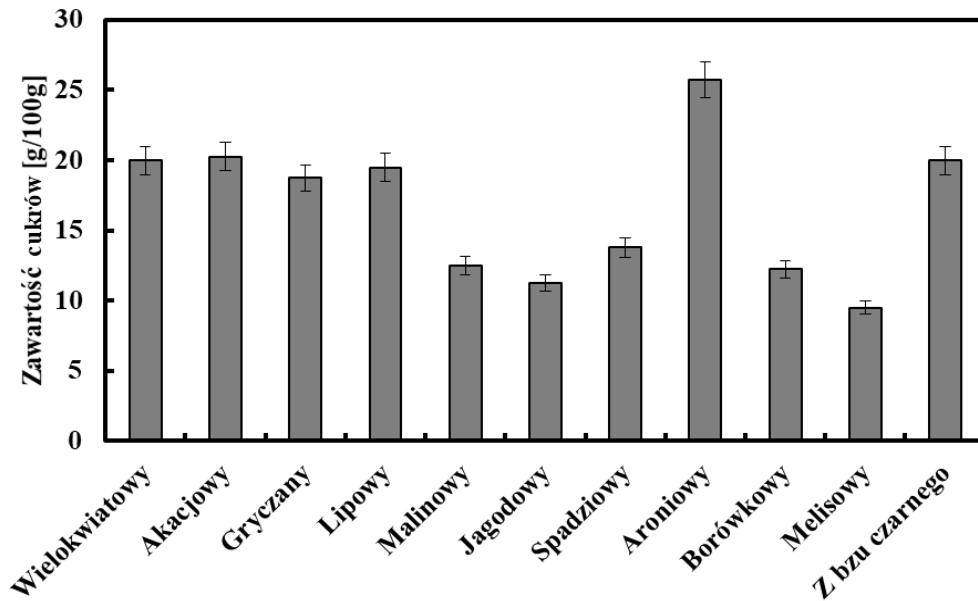
CPA^{OH} odnosi się do wszystkich antyoksydantów, również słabych. Przy badaniu właściwości antyoksydacyjnych miodów pitnych oprócz polifenoli, będących silnymi antyoksydantami, należy więc uwzględnić słabe antyoksydanty, występujące w bardzo dużym stężeniu. Zaliczyć można do nich przede wszystkim cukry i wytwarzany z nich alkohol. W celu potwierdzenia zmiany stężenia cukrów (glukozy i fruktozy) na rzecz wytwarzanego alkoholu zbadano stężenie cukrów metodą refraktometryczną według PN - A - 74252:1998 [15] w próbkach dnia „zerowego” (zakładając, że nie ma w nich alkoholu), oraz w próbkach z etapu końcowego w celu zbadania ilości cukru przetworzonego w alkohol. Na Rys. 11 przedstawiono zawartość cukrów w miodach pitnych na etapie początkowym produkcji. Zawierają się one w granicach od 33,5% w miodzie wielokwiatowym do 21,5% w miodzie lipowym z dodatkiem soku z czarnego. Różnice zawartości cukrów pomiędzy etapem początkowym i końcowym przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Różnica zawartości cukrów pomiędzy etapem początkowym a końcowym.
Table 1. The difference in the sugar content between the initial and final stages.

Gatunek miodu	Różnica pomiędzy EP i EK
1) Wielokwiatowy	13,5%
2) Akacjowy	9,75%
3) Gryczany	11,25%
4) Lipowy	9,25%
5) L + Malina	14,25%
6) L + Jagoda	15,25%
7) Spadziowy	12,45%
8) L + Aronia	-1%
9) L + Borówka	12%
10) L + Melisa	14,25%
11) L + Bez czarny	1,5%



Rys. 11. Zawartość cukrów w miodach na etapie początkowym.
Fig. 11. The content of sugars in honeys at the initial stage.

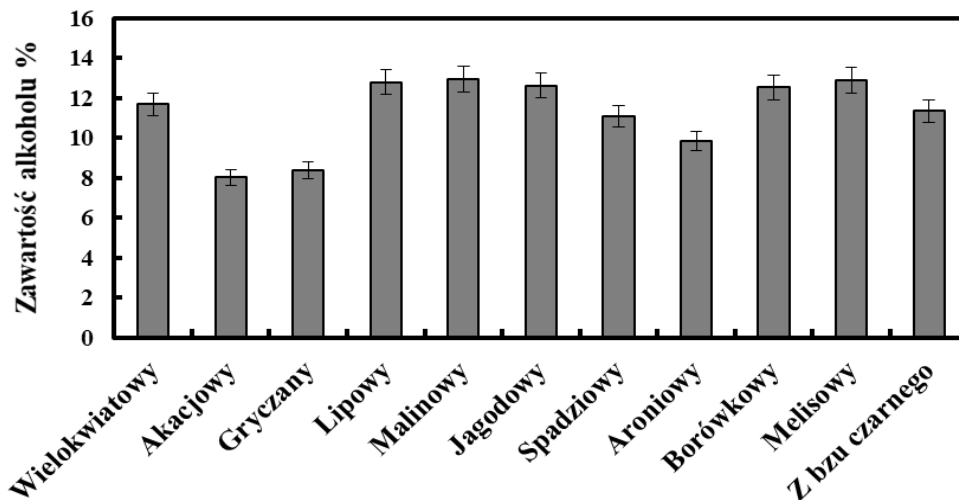


Rys. 12. Zawartość cukrów w miodach na etapie końcowym.
Fig. 12. The content of sugars in honeys at the final stage.

Porównując zawartość cukrów z EP przedstawionego na Rys. 11 z zawartością cukrów na EK możemy zauważyć, że różnice pomiędzy etapami wahają się w granicach od 15,25 dla miodu jagodowego do -1 (Tabela 1) dla miodu aroniowego. Miody, wielokwiatowy (20 %), akacjowy (20,25 %), gryczany (18,75 %) i lipowy (19,5 %) są miodami gatunkowymi a różnice zawartości cukrów na EK pomiędzy nimi (Rys. 12) są niewielkie ($\pm 1,5$ %), wyjątek stanowi miód spadziowy w którym na fazie końcowej stężenie cukru wynosi 13,8 %. Dodatek soków owocowych do miodów pitnych szlachetnych zwiększa różnice zawartości cukrów pomiędzy fazą startową a końcową. Wyjątkiem jest miód aroniowy i z bzu czarnego w których różnice są znikome. Miód lipowy, na bazie którego sporządzono miody owocowe w dniu pobrania pierwszej próbki zawierał 28,75 % cukru, natomiast w dniu zakończenia tylko 19,5 %. Miody owocowe np. jagodowy miały odpowiednio 26,5 % i 11,25 %. Zatem widzimy w jaki sposób sok owocowy wpływa na proces fermentacji i zawartość cukru na poszczególnych etapach. Miód aroniowy miał wyższe stężenie cukrów na etapie końcowym niż początkowym. Przyczyną zwiększonej ilości cukrów w ww. miodzie może być rozpad zawarty w aronii antocyjanów na glikozydy.

3.6. Stężenie alkoholu (Alcohol concentration)

Oznaczenie alkoholu etylowego wykonano metodą destylacji prostej według PN - 90 A - 79120/04 [14]. Wyniki oznaczenia przedstawiono na Rys. 13.

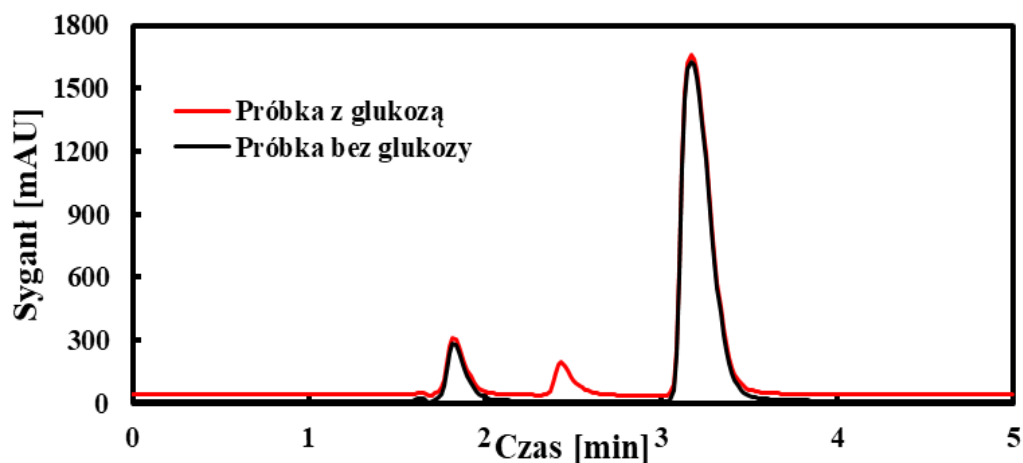


Rys. 13. Stężenie alkoholu w miodach pitnych wyznaczone na etapie końcowym produkcji.
Fig. 13. The concentration of alcohol in honeys determined at the final stage of production.

Stężenie alkoholu dla poszczególnych miodów zmieniało się w zakresie od 8 do 13 % (Rys. 13). Największe stężenie otrzymano dla miodu malinowego, najmniejsze dla akacjowego. Zauważyć można różnicę pomiędzy miodami owocowymi, ziołomiodem, a miodami gatunkowymi. Wyniki dowodzą, że stężenie cukrów PE miodów szlachetnych jest wyższe aniżeli miodów owocowych, natomiast, więcej alkoholu powstało w miodach z dodatkiem soków. Więcej alkoholu powinno się wytworzyć w miodach słodszych. Wpływ na taki przebieg reakcji ma prawdopodobnie dodatek świeżych soków. Zawarte w sokach cukry, głównie fruktoza, miały znaczący udział w produkcji alkoholu. Miód malinowy posiada blisko 13 % alkoholu. Tak wysokie stężenie może być spowodowane dużą początkową zawartością węglowodanów. W 100 g świeżych owoców jest ich 9 g, w związku z tym do brzezki miodowej wraz z dodatkiem soku malinowego dodano pewną (nieznaną) ilość cukrów prostych. Ponadto maliny zawierają w sobie duże ilości glikozydów antocyjanowych rozpuszczających się w wodzie i alkoholu. Przepuszczalnie, podczas procesu fermentacji w trakcie wytwarzania się alkoholu, cukry proste pochodzące z soku zaczęły się stopniowo rozpadać na aglikony i glikozydy, czyli dostarczały dodatkowych ilości cukrów, a tym samym sprawiły, że w miodach owocowych powstawało więcej alkoholu niż w miodach gatunkowych. W ten sam sposób można wytłumaczyć wzrost stężenia cukru miodu aroniowego w etapie końcowym w stosunku do etapu początkowego. Owoce aronii są bogatym źródłem związków polifenolowych, szczególnie flawonoidów, które powodują wzrost stężenia cukrów.

3.7. Wpływ reakcji ubocznych na wartość CPA^{OH} (The influence of side reactions on the TAP^{OH} value)

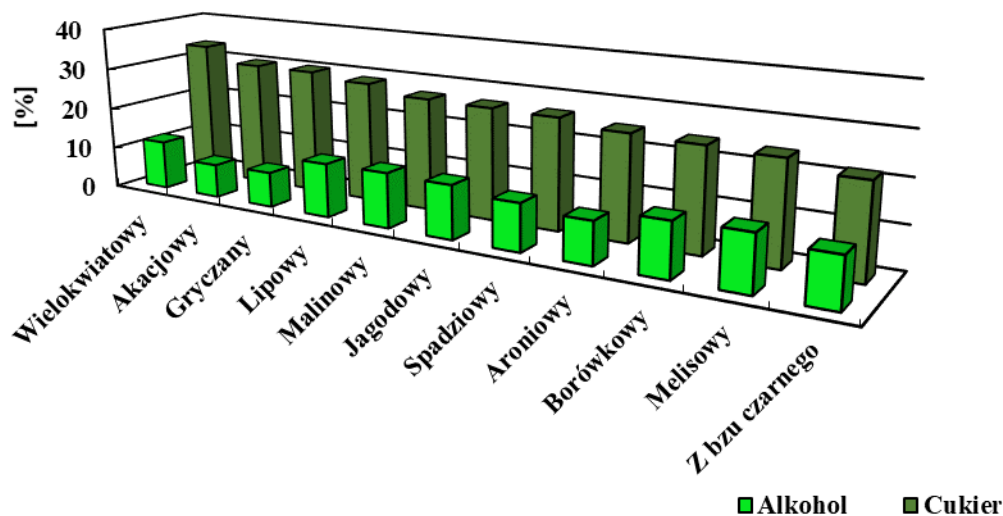
Reakcje uboczne zachodzące pomiędzy rodnikiem hydroksylowym a substancjami naturalnymi znajdującymi się w miodach pitnych w znaczący sposób wpływają na wyznaczone wartości CPA. Największy udział w reakcjach „ubocznych” mają glukoza, alkohol etylowy oraz kwas askorbinowy. Średnie stężenie glukozy na końcowym etapie produkcji waha się w granicach od 9,5 do 25 %. Stężenie alkoholu wynosi średnio 11 %. Oba te związki odgrywają ważną rolę przy oznaczaniu CPA w odniesieniu do rodnika hydroksylowego. Badania sugerują, że generowany rodnik reaguje nie tylko z antyoksydantami zawartymi w miodzie lecz ulega także reakcjom z cukrami czy etanolem (Rys. 14). Obecna w miodach glukoza może ulegać autooksydacji w wyniku reakcji z żelazem (III). Zbadano również wpływ dodatku kwasu askorbinowego na mieszaninę reakcyjną. Po sukcesywnym dodawaniu, począwszy od 20, 60 kończąc na 100 μ l roztworu kwasu o nieznanym stężeniu, obserwowano wzrost piku kwasu 3,4DHBA powyżej wartości reakcji podstawowej (Rys. 14). Zawarta w miodach owocowych witamina C wpływa na wartości CPA, nie znając jej dokładnego stężenia w miodach pitnych, nie potrafimy powiedzieć jaki jest jej faktyczny udział w oznaczaniu mocy antyoksydacyjnej.



Rys. 14. Przykładowy chromatogram badania wpływu glukozy na wartość CPA.

Fig. 14. An exemplary chromatogram of the study of the effect of glucose on the TAP value.

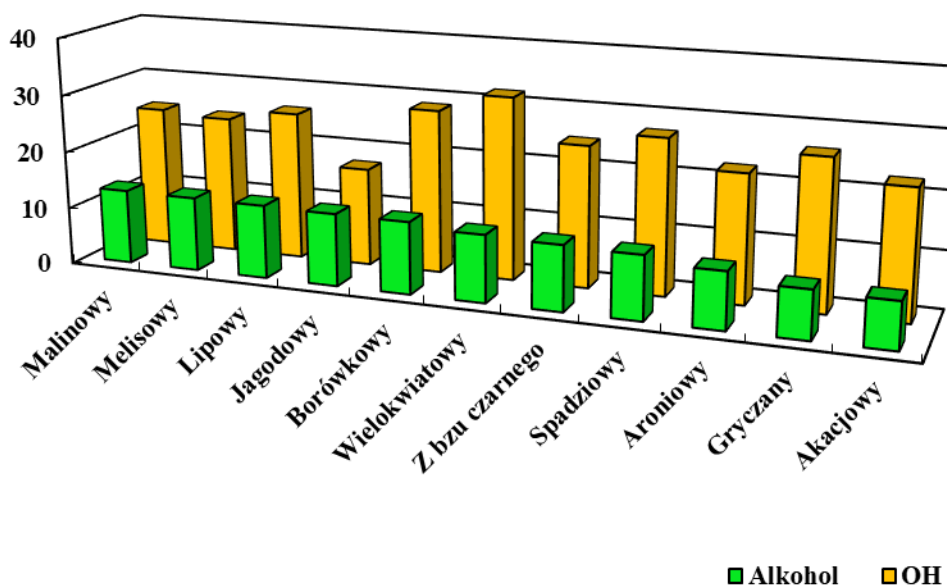
3.8. Korelacje (Correlations)



Rys. 15. Zależność zawartości cukrów przed procesem fermentacji do zawartości alkoholu wytworzonego podczas procesu fermentacji.

Fig. 15. The dependence of the sugar content before the fermentation process on the alcohol content produced during the fermentation process.

Na Rys. 15 przedstawiono zależność zawartości cukrów przed procesem fermentacji do zawartości alkoholu wytworzonego podczas tego procesu. Wynika z niego, że zawartość alkoholu w poszczególnych miódach jest w głównym stopniu uzależniona od stężenia cukrów. Nie możemy jednak twierdzić, że stężenie wytworzonego alkoholu w danym miodzie jest proporcjonalne do ubytku cukru podczas procesu fermentacji. Miody owocowe charakteryzują się wyższymi stężeniami alkoholu niż miody gatunkowe. Stężenia cukrów miódów gatunkowych na początkowym etapie wytwarzania są znacznie wyższe niż miódów owocowych.

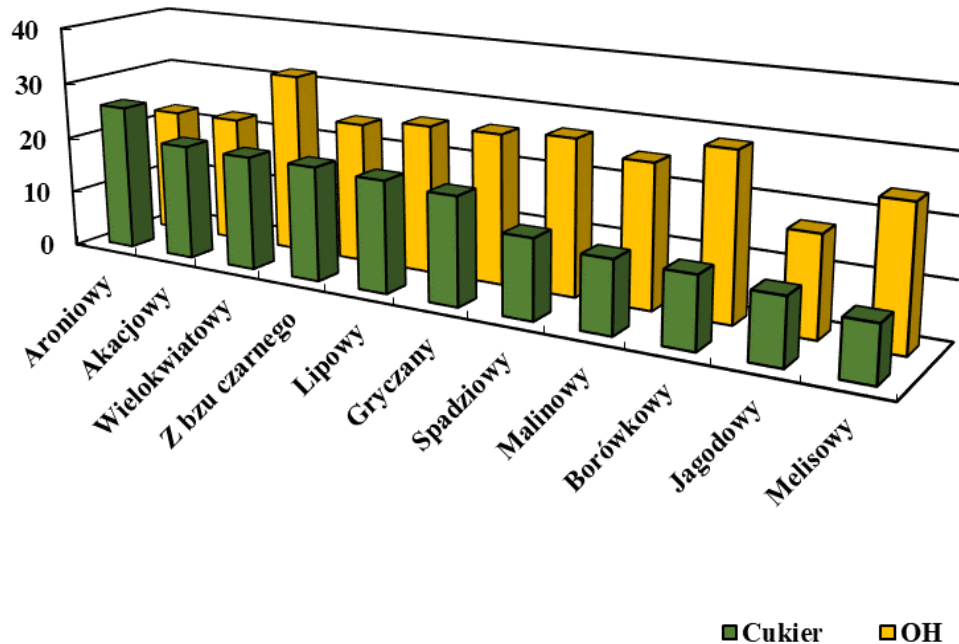


Rys. 16. Zależność pomiędzy stężeniem alkoholu a wartością CPA^{OH} .

Fig. 16. The dependence between alcohol concentration and TAP^{OH} value.

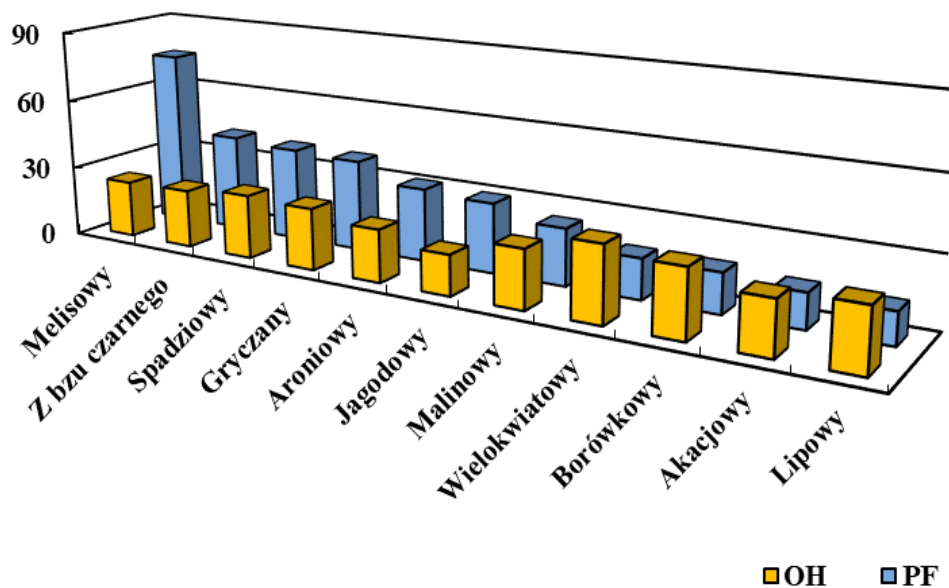
Na Rys. 16 przedstawiono zależność pomiędzy stężeniem alkoholu w miódach pitnych, a CPA miódów w odniesieniu do rodnika hydroksylowego. Widzimy, że nie ma jednoznacznej korelacji pomiędzy wynikami. Ze względu na to, że rodnik hydroksylowy jest bardzo reaktywny i reaguje ze wszystkimi związkami napotkanymi na swojej drodze, również z etanolem, wartości CPA ulegają zafałszowaniu. W

wyniku reakcji ubocznych w które wchodzi rodnik OH nie potrafimy oznaczyć w jakim stopniu rodniki zmiatane są faktycznie przez antyoksydanty zawarte w miodzie a w jakim poprzez reakcje uboczne. Zatem (Rys. 16) w miodach zawierających najwięcej alkoholu CPA jest porównywalne lub znacznie niższe (miód jagodowy) niż w miodach mających najmniejszą zawartość procentową alkoholu.



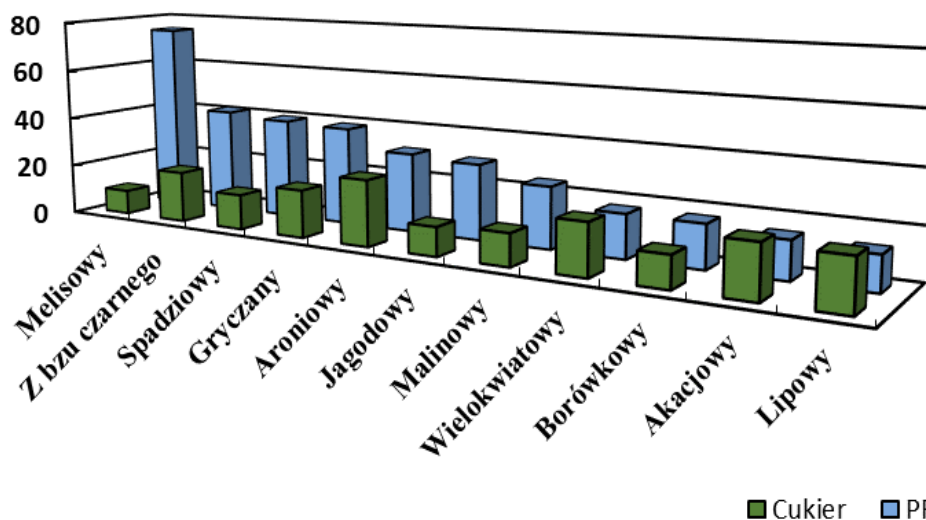
Rys. 17. Zależność pomiędzy zawartością cukru na końcowym etapie produkcji a wartością CPA^{OH}.
Fig. 17. The dependence between the sugar content at the final stage of production and the TAP^{OH} value.

Przedstawione na Rys. 17 korelacje świadczą o tym, że zawarte w miodach cukry (proste i złożone) mają znaczący wpływ na wartość CPA. Zauważmy, że im mniejsze stężenie cukru w miodzie tym wartość CPA jest wyższa, nie jest tak jednak we wszystkich przypadkach. Odstępstwem od tej tezy jest miód wielokwiatowy, malinowy, jagodowy i melisowy. W miodzie melisowym na końcowym etapie stężenie cukrów jest najniższe (9,5 g/100 g) spośród wszystkich badanych miodów, lecz wartość CPA jest stosunkowo wysoka. Przyczyną tego są niewątpliwie obecne w melisie silne antyoksydanty (polifenole) które zmiotły część wytwarzanych rodników nim te weszły w reakcje z cukrem lub innymi składnikami miodu. Zastanawiający jest miód wielokwiatowy, posiada największe CPA i jednocześnie zawiera w sobie znaczną ilość cukrów (20 g/100 g), spowodowane jest to prawdopodobnie tym, że miód ten wytwarzany jest z pyłków różnych gatunków kwiatów, a co za tym idzie jego skład jest zróżnicowany.

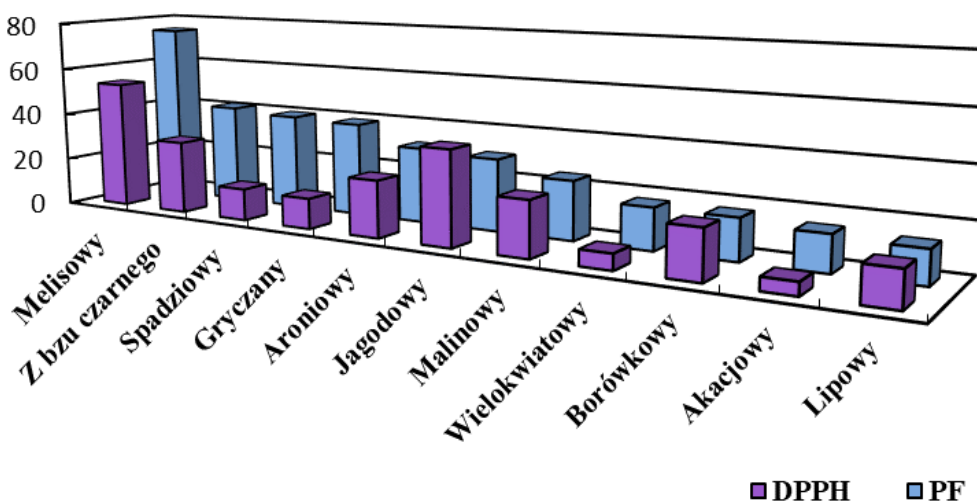


Rys. 18. Korelacja pomiędzy średnią zawartością polifenoli a wartością CPA^{OH}.
Fig. 18. Correlation between the average polyphenol content and the TAP^{OH} value.

Korelacja pomiędzy średnią zawartością polifenoli, a wartością CPA w odniesieniu do rodnika hydroksylowego przedstawia się dość ciekawie. Mianowicie wraz ze spadkiem ilości fenoli w poszczególnych miodach wartość CPA wzrasta, lub jak ma to miejsce w miodzie lipowym czy akacjowym CZP jest stosunkowo bardzo niska natomiast wielkość potencjału antyoksydacyjnego jest wyższa aniżeli w miodach w których CZP jest wysoka (melisowy, z bzu czarnego). Zauważmy, że im niższa zawartość polifenoli tym wartość CPA jest wyższa. Nie ma zależności pomiędzy całkowitą zawartością polifenoli, a zawartością cukru na końcowym etapie produkcji przedstawionym na Rys. 19.

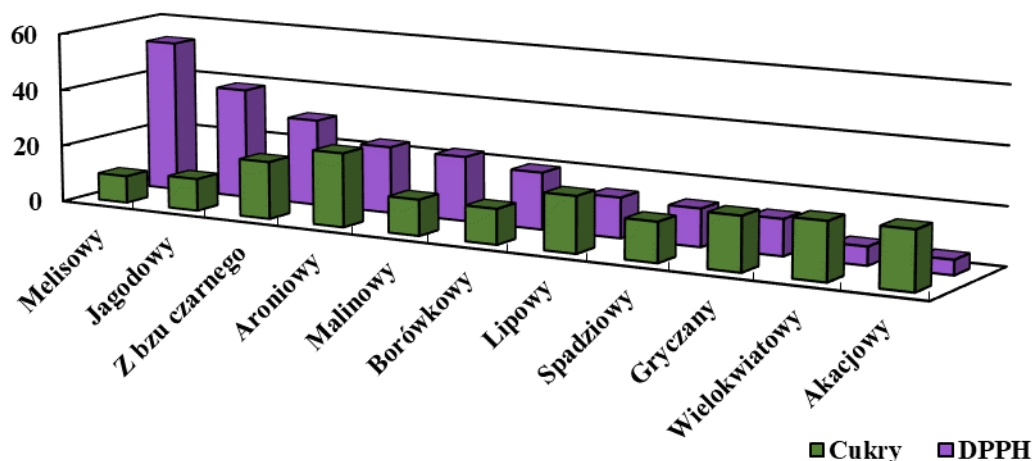


Rys. 19. Zależność pomiędzy średnią zawartością polifenoli, a zawartością cukru na końcowym etapie produkcji.
Fig. 19. Correlation between the average polyphenol content and the sugar content at the final stage of production.

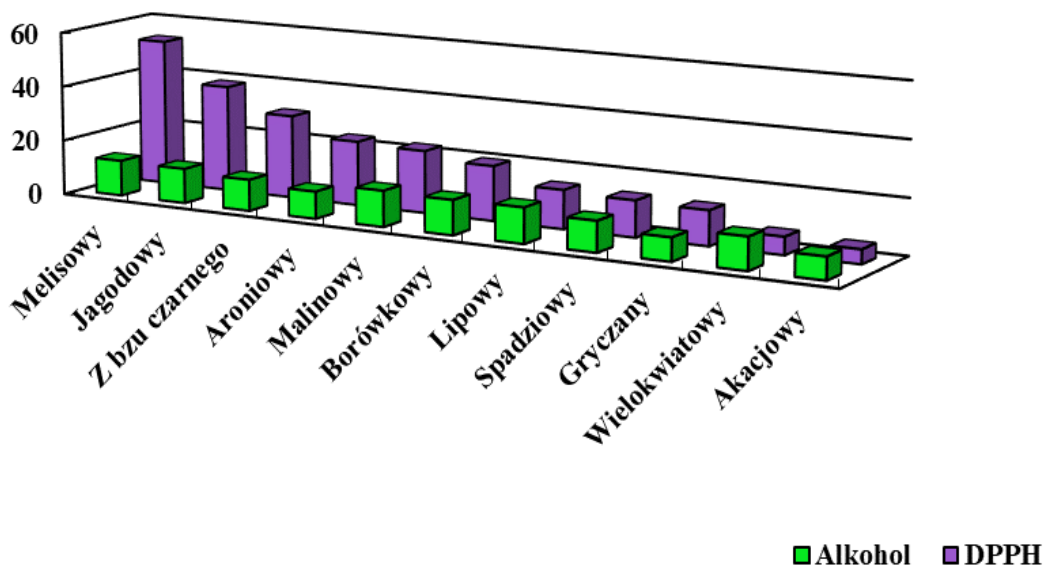


Rys. 20. Zależność pomiędzy średnią zawartością polifenoli, a CPA^{DPPH} .
Fig. 20. Correlation between the average content of polyphenols and TAP^{DPPH} .

Rys. 20 przedstawia zależność całkowitej zawartości polifenoli a właściwościami przeciwutleniającymi miodów w odniesieniu do rodnika DPPH. Wynika z niego, że moc antyoksydacyjna miodów wyznaczana w obecności rodnika DPPH nie jest zależna od zawartych w miodach polifenoli.



Rys. 21. Zależność pomiędzy CPA^{DPPH} , a zawartością cukrów na końcowym etapie produkcji.
 Fig. 21. Correlation between TAP^{DPPH} and sugar content at the final stage of production.



Rys. 22. Zależność pomiędzy zawartością alkoholu po zakończeniu procesu fermentacji, a właściwościami antyoksydacyjnymi miodów pitnych w odniesieniu do rodnika DPPH.
 Fig. 22. Correlation between the alcohol content after the end of the fermentation process and the antioxidant properties of meads in reference to the DPPH radical.

Rys. 21 i 22 przedstawiają zależności pomiędzy właściwościami antyrodnikowymi miodów w odniesieniu do rodnika DPPH a zawartością cukrów i alkoholu na końcowym etapie wytwarzania. Wynika z nich, że zarówno cukier jak i alkohol nie wpływają na oznaczenie CPA^{DPPH} .

4. Wnioski (Conclusions)

Z przedstawionych badań wynika, że podczas fermentacji miodów CPA zmieniało się osiągając stałą wartość po ok. 40 dniach. Zmiany różnych CPA, i wielkości pokrewnych, były słabo ze sobą skorelowane, co spowodowane jest zmianą wielu składników (różnie wpływających na mierzone parametry) w trakcie fermentacji. Stężenie cukrów malało, a stężenie alkoholu wzrastało, nieoczekiwanie okazało się, że dużym zmianom stężeń cukrów towarzyszyły małe alkoholi. Dodatki (np. moszcze owocowe), o dużej zawartości polifenoli, do brzezki zwiększają CPA. CPA^{OH} nie jest wielkością addytywną w odniesieniu do antyoksydantów występujących w miodach, glukoza i etanol (o dużym stężeniu) są odpowiedzialne za wytwarzanie nadmiarowych rodników. Glukoza wytwarza rodniki hydroksylowe w reakcji z $Fe(II)$.

5. Literatura (References)

1. G. Bartosz, *Druza twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, PWN, Warszawa 2006.
2. M. Karbarz, Źródła powstawania i oddziaływanie środowiskowe wolnych rodników, *Zeszyty* 40, 59-68, 2010.
3. B.R. D'Arcy, Antioxidants in Australian Floral Honeys – Identification of health-enhancing nutrient components, *Rural Industries Research and Development Corporation*, 5, 2-33, 2005.
4. M.J. Sereia, L.C. Marchini, E.M. Alves, P. Faquinello, Microorganism in organic and non organic honey samples of africanized honeybees, *J. Apic. Sci.*, 54, 49-54, 2010.
5. J. Tomaszewska-Gras, J. Kijowski, Zastosowanie różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC do oceny właściwości termodynamicznych miodu pszczelego i substancji stosowanych do jego fałszowania, *Nauka. Przyroda. Technologie.*, 4, 2-9, 2010.
6. J.I. Wilson, B.O. George, G.E. Umukoro, Effects of honey on the histology of liver in adult Wistar rats, *Biol. Med.*, 3, 1-5, 2011.
7. D. Gumul, J. Korus, B. Achremowicz, Wpływ procesów przetwórczych na aktywność przeciwutleniającą surowców pochodzenia roślinnego, *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość.*, 4, 41-48, 2005.
8. M. Wojtacki, Pszczelarz miodosytnikiem, *Pszczelarstwo*, 12, 16-17, 1974.
9. W. Perkowicz, *Domowy wyrób win i miodów*, Polskie Wydawnictwa Gospodarcze, wydanie IV, 3-45, 1956.
10. P. Wantusiak, B. Głód, Application of UV detection in HPLC in the total antioxidant potential assay, *Central European Journal of Chemistry*, 10(6), 1786-1790, 2012.
11. P.M. Wantusiak, P. Piszcz, B.K. Głód, A fast and simple method for the measurement of total antioxidant potential and a fingerprint of antioxidants, *Journal of Chromatographic Science*, 50, 909-913, 2012.
12. J. Małyszko, M. Karbarz, Spektrofotometryczne i elektrochemiczne metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej, *Wiadomości Chemiczne*, 63, 1-2, 2009.
13. K. Slonkart, V. Singleton, Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28, 49-55, 1977.
14. Polska norma PN-90-A-79120/08 *Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczenie kwasowości lotnej.*
15. Polska norma PN-A-74252:1998 *Wyroby i półprodukty ciastkarskie. Metody badań. Oznaczenie zawartości cukrów metodą refraktometryczną.*