

ROMUALDA DANKÓW<sup>1</sup>, JOANNA TEICHERT<sup>1</sup>, JAN PIKUL<sup>1</sup>, NATALIA OSTEN-SACKEN<sup>2</sup>,  
DOROTA CAIS-SOKOLIŃSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Technologii Mleczarstwa

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

<sup>2</sup>Narodowe Muzeum Historii Naturalnej w Luksemburgu

## CHOLESTEROL I PRODUKTY JEGO UTLENIANIA W LIOFILIZATACH MLEKA KLACZY I KUMYSU\*

CHOLESTEROL AND ITS OXIDATION PRODUCTS  
IN MARE MILK LYOPHILISATES AND KUMISS

**Streszczenie.** Celem pracy było wytworzenie liofilizatów mleka klaczy i kumysu oraz ocena zawartości cholesterolu, oksysteroli, aldehydu malonowego, a także barwy podczas przechowywania w warunkach temperatury pokojowej i chłodniczej przez okres 6 miesięcy. Materiał badawczy stanowiło płynne mleko klaczy i kumys oraz przygotowane z tych surowców liofilizaty przechowywane przez 6 miesięcy w warunkach temperatury 4–6°C i 18–20°C. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono istotny wpływ procesu liofilizacji na wszystkie analizowane wskaźniki. Również stwierdzono istotny wpływ czasu i temperatury przechowywania na wszystkie analizowane wyróżniki. Zmiany zawartości cholesterolu i oksysteroli oraz aldehydu malonowego były większe w przypadku liofilizatów kumysu niż mleka klaczy. Sam proces liofilizacji płynnego mleka klaczy i kumysu powodował zwiększenie zawartości oksysteroli. Procesy utleniania w analizowanych liofilizatach zachodziły szybciej w temperaturze pokojowej niż chłodniczej.

**Słowa kluczowe:** liofilizacja, mleko klaczy, kumys, oksysterole, cholesterol, TBA, indeks bieli

### Wstęp

Mleko klaczy staje się coraz bardziej popularne w krajach Europy Zachodniej jako substytut mleka krowiego i znajduje zastosowanie w żywieniu ludzi dorosłych, a także niemowląt i dzieci chorujących na alergię (Businco i in., 2000; Chapman i in., 2000;

---

\*Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w latach 2009–2013 jako projekt badawczy nr N N312 3106 37.

Curadi i in., 2001; Di Cagno i in., 2004; Salimei i Fantuz, 2012). W Polsce jest kilka farm, w których pozyskuje się mleko klaczy. Mleko to jest po doju schładzane, rozlewane do opakowań jednostkowych (szklanych, plastikowych, z folii polietylenowej) i w tej postaci sprzedawane. Nadmiar mleka jest zamrażany lub proszkowany. Mleko klaczy ma skład bardziej zbliżony do mleka kobiecego niż krowiego. Jego cechą jest mała zawartość tłuszczu (1,21%) i białka (2,14%), mniejsza niż w mleku krowim (3,61% i 3,3%). Białka serwatkowe w mleku klaczy stanowią około 40% ogólnej zawartości białek, a kazeina – około 50%. Pozostałe 8–10% to azot niebiałkowy (Danków i in., 2009). Mleko klaczy zawiera dwukrotnie mniej frakcji kazeinowej (1,07%) niż mleko krowie (2,60%), a trzykrotnie więcej niż mleko ludzkie (0,37%). Ze względu na skład kwasów tłuszczowych mleko klaczy można uznać za cenne źródło nienasyconych kwasów tłuszczowych (Kacprzak i in., 2012; Rutkowska i in., 2011).

Głównym sterolem wchodzącym w skład tłuszczu zwierzęcego i oleju rybiego jest cholesterol 5-cholesten-3- $\beta$ -ol. Podstawową jego funkcją w błonach komórkowych jest kontrola utrzymania bariery między komórką a środowiskiem. Cholesterol stanowi także substancję wyjściową dla syntezy kwasów żółciowych i hormonów sterydowych (Wąsowicz, 1997). Cholesterol łatwo ulega autooksydacji w kontakcie z powietrzem, a temperatura, światło, promieniowanie jonizujące znacznie przyspieszają ten proces (Bartnikowska, 1995).

Produkty utleniania cholesterolu (PUC), nazywane oksysterolami, obejmują dużą liczbę związków utworzonych z cholesterolu w procesie utleniania enzymatycznego i nieenzymatycznego. W żywności oksysterole powstają w procesach utleniania nieenzymatycznego, szczególnie w autooksydacji (Wąsowicz, 1997).

Do żywności i produktów spożywczych bogatych w cholesterol można zaliczyć jaja kurze i prosięk jajeczny, mleko w proszku, ser i produkty mleczne, mięso zwierząt ciepłokrwistych, podroby, ryby. Żywność zawierająca cholesterol jest podatna na utlenianie, szczególnie ta, która jest odwodniona, poddana napromieniowaniu czy działaniu wysokiej temperatury, obróbce termicznej w obecności tlenu (Obara i Kołczak, 2004). W każdym z powyższych warunków żywność jest wystawiona na działanie reaktywnych form tlenu, takich jak tlen singletowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy i ozon. Nie tylko przetwarzanie, lecz także przechowywanie bezpróżniowe przez dłuższy czas znacznie powiększają generowanie oksysteroli (Addis, 1986). Produkty mleczarskie (mleko w proszku, śmietana) bezpośrednio po przygotowaniu nie zawierają wykrywalnych ilości PUC, jeżeli do ich otrzymywania metodą suszenia rozpyłowego i walcowego stosowano niskie i średnie temperatury. Nourooz-Zadeh i Appelqvist (1988) podają, że produkty otrzymane z stosowaniem wysokich temperatur w procesie suszenia zawierały wykrywalne ilości 7- $\alpha$ -hydroksycholesterolu (7- $\alpha$ -OH-C), 7- $\beta$ -hydroksycholesterolu (7- $\beta$ -OH-C),  $\alpha$ - i  $\beta$ -epoksycholesterolu ( $\alpha$ - i  $\beta$ -OH-C) oraz 7-ketocholesterolu (7-keto-C). Przechowywane przez 12 miesięcy pełne mleko w proszku miało od 0,3 do 9,2 ppm PUC w zależności od technologii otrzymywania. Proszek mleczny przechowywany w 14 magazynach przez okres od 13 do 37 miesięcy zawierał od 19,6 do 77,9 ppm PUC.

Ponieważ mleko klaczy oraz wytworzony z niego kumys są produktami sezonowymi, podejmuje się próby ich proszkowania metodą liofilizacji w celu zapewnienia podaży przez cały rok. Suszenie sublimacyjne jest metodą utrwalania pozwalającą w jak największym stopniu zachować wartość odżywczą mleka. Dłuższe przechowywanie

lioofilizatów jest możliwe dzięki zmniejszeniu aktywności wody – pod warunkiem właściwego zapakowania uniemożliwiającego dostęp wilgoci z atmosfery. Produkty suszone sublimacyjnie mogą być odtwarzane do ich pierwotnego stanu poprzez dodanie wody. W związku z powyższym celem pracy było wytworzenie liofilizatów mleka kłaczy i kumysu oraz określenie zawartości cholesterolu, oksysteroli, aldehydu malonowego, a także ocena barwy podczas przechowywania w warunkach temperatury pokojowej i chłodniczej przez okres 6 miesięcy.

## Material i metody

Materiał do badań stanowiło 14 próbek liofilizatów wytworzonych z mleka pozyskanego od kłaczy zimnokrwistych z farmy w województwie wielkopolskim. Mleko i kumys przed liofilizacją były zamrażane do temperatury  $-33^{\circ}\text{C}$  w specjalnych pojemnikach szklanych uprzednio zważonych. W procesie suszenia sublimacyjnego zastosowano liofilizator firmy LABCONCO, model 7755031, wyposażony w wymrażacz o pojemności 18 l i w pompę próżniową. Próby liofilizowano przy ciśnieniu minimalnym sublimacji lodu 0,08 mbar w czasie 8 h. Otrzymane liofilizaty w ilości po 5 g zapakowano w atmosferze azotu w saszetki z papieru białego kredowanego powlekanego bezbarwnym polietylenem typu NCPE 7518. W czasie 6 miesięcy przechowywania w warunkach temperatury chłodniczej i pokojowej trzykrotnie wykonano badania, oceniając wpływ czasu i temperatury na zawartość cholesterolu, oksysteroli, aldehydu malonowego, a także na barwę.

Ekstrakcji tłuszczu z badanych próbek, w których oznaczano zawartość cholesterolu i oksysteroli, dokonano metodą Rose-Gottlieba (Krełowska-Kułas, 1993), jednak w przypadku oznaczania zawartości cholesterolu dodano jako standard wewnętrzny 100  $\mu\text{l}$  roztworu 5- $\alpha$ -cholestanu o stężeniu 0,504 mg w 100  $\mu\text{l}$ . Następnie próbki zmydlano 1 N KOH w metanolu. Ostatnim etapem przed analizą na chromatografii gazowym była silylacja polegająca na dodaniu 100  $\mu\text{l}$  bezwodnej pirydyny i 100  $\mu\text{l}$  BSTFA + 1% TMCS do próbek zawierających wyodrębniony cholesterol (Przygoński i in., 2000). Przy oznaczaniu zawartości oksysteroli dodano jako standard wewnętrzny 100  $\mu\text{l}$  roztworu 19-OH-C o stężeniu 10  $\mu\text{g}$  w 100  $\mu\text{l}$ . Uzyskaną frakcję poddano transestryfikacji i frakcjonowaniu na kolumnie SEP-PAK  $\text{NH}_2$ , a następnie procesowi silylacji poprzez dodanie 100  $\mu\text{l}$  bezwodnej pirydyny i 100  $\mu\text{l}$  BSTFA + 1% TMCS (Przygoński i in., 2000).

Zawartość cholesterolu oraz oksysteroli w badanych próbach oznaczono na chromatografii gazowej firmy Hewlett-Packard (model 5890) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym. Chromatograf był wyposażony w kwarcową kolumnę kapilarną HP-5 o długości 30 m, o średnicy wewnętrznej 0,25 mm, z fazą stacjonarną pokrywającą kolumnę filmem o grubości 0,25  $\mu\text{m}$ .

Zawartość aldehydu malonowego oznaczono w następujący sposób: próbkę liofilizatu mleka lub kumysu regenerowano wodą destylowaną i alkoholowym roztworem BHT o stężeniu 0,01%. Do zregenerowanej próby dodawano 4 N kwasu solnego w celu zmniejszenia wartości pH do 1,5. Kolby podłączano do aparatu destylacyjnego i prowadzono destylację przez 12–15 min, aż do zebrania 50  $\text{cm}^3$  destylatu. Destylat w ilości 5  $\text{cm}^3$  przenoszono do próbek oraz dodawano 5  $\text{cm}^3$  odczynnika TBA. Probówki

mocno zakręcano, mieszano zawartość i ogrzewano przez 1 h we wrzącej łaźni wodnej, a następnie, po zakończeniu ogrzewania, schładzano w wodzie wodociągowej mniej więcej 10 min. Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali 532 nm w obecności próby kontrolnej. W celu przeliczenia uzyskanych wartości absorbancji na zawartość aldehydu w miligramach na kilogram badanej próbki (liczba TBA) obliczono wartość stałej  $k$ . Liczba TBA =  $k \cdot A$  (mg aldehydu malonowego na 1 kg próbki), gdzie  $k$  jest to współczynnik przeliczeniowy, a  $A$  – wartość absorbancji.

Pomiar barwy polegał na pomiarze koloru i jego odcienia przez podanie współrzędnych  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  za pomocą spektrofotometru X-Rite SP 60 (Cais-Sokolińska i Majcher, 2009). Współrzędne  $a^*$  i  $b^*$  (dodatnie i ujemne) określają udział barw podstawowych (czerwona, niebieska, zielona i żółta), natomiast  $L^*$  określa jasność barwy w zakresie od 0 do 100 (Oszmiański, 2002).

Uzyskane wyniki oznaczeń i pomiarów poddano analizie statystycznej. Obliczono statystyki opisowe, tj. wartości średnie, odchylenia standardowe i współczynniki zmienności, dla czasu przed liofilizacją i po niej, jak również dla okresu przechowywania w temperaturze pokojowej i chłodniczej. W celu oszacowania istotności wpływu badanych czynników na mierzone i oznaczane cechy zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji z wykorzystaniem programu Statistica 9.0. W analizie wyników przyjęto poziom istotności  $p \leq 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

W wyniku procesu **liofilizacji mleka kłaczy** stwierdzono istotny ( $p \leq 0,05$ ) wzrost zawartości cholesterolu: od poziomu 2,5 mg w 100 g do 24,1 mg w 100 g.

Proces liofilizacji spowodował zwiększenie zawartości takich produktów utlenienia cholesterolu (PUC), jak: 7- $\alpha$ -OH-C, 7- $\beta$ -OH-C i 7-keto-C, należących do grupy 7-oksysteroli,  $\alpha$ -epoksy-C,  $\beta$ -epoksy-C, należących do grupy epoksydów, triol-C jako produkt hydratacji epoksydów i 25-OH-C jako ostatni PUC. Wymienione frakcje oksysteroli były charakterystyczne dla liofilizowanego mleka kłaczy także w trakcie jego dalszego przechowywania. Wykazano, że w wyniku zastosowania suszenia sublimacyjnego nastąpił istotny wzrost łącznej zawartości oksysteroli w liofilizacie mleka kłaczy porównaniu z produktem wyjściowym (tab. 1). Porównując strukturę oksysteroli przed liofilizacją i po niej, zaobserwowano powstanie najbardziej szkodliwego triolu-C – w nieznacznej ilości 0,3  $\mu\text{g/g}$ , co stanowiło tylko 1% PUC. Ponadto powstał 25-OH-C – w ilości 0,8  $\mu\text{g/g}$ , co stanowiło 3% PUC. Stwierdzono istotny wzrost grupy 7-oksysteroli, których udział w PUC był o 7% większy od ich średniej zawartości przed liofilizacją. Również w przypadku grupy epoksydów nastąpił istotny wzrost ich zawartości, jednak w strukturze jakościowej ich udział zmniejszył się o 11% w porównaniu z surowca przed liofilizacją. Podobne tendencje stwierdzili w swoich badaniach Nourooz-Zadeh i Appelqvist (1988) oraz Sieber (2005).

W wyniku procesu liofilizacji mleka kłaczy stwierdzono również istotny ( $p \leq 0,05$ ) wzrost zawartości aldehydu malonowego: od 0,93 mg/kg do 4,0 mg/kg. Podobne wyniki otrzymał Kny (1998).

Wpływ procesu liofilizacji na barwę mleka kłaczy przedstawiono w tabeli 2. Stwierdzono istotny ( $p \leq 0,05$ ) wpływ procesu liofilizacji na wartości: wskaźnika oddalenia od

Tabela 1. Zawartość oksysteroli w mleku klaczy przed liofilizacją i po niej ( $\mu\text{g/g}$ )  
 Table 1. Content of oxysterols in mare milk before and after lyophilisation ( $\mu\text{g/g}$ )

Mleko Milk	7- $\alpha$ -OH-C	7- $\beta$ -OH-C	$\alpha$ -Epoksy- -C	$\beta$ -Epoksy- -C	Triol-C	25-OH-C	7-Keto-C	Suma Sum
Przed liofilizacją Before lyophilisation	0,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	0,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,3	1,32 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,3	6,2 <sup>a</sup>
Po liofilizacji After lyophilisation	3,4 <sup>b</sup> $\pm$ 0,7	5,3 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	2,4 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	4,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,5	0,3 <sup>b</sup> $\pm$ 0,05	0,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	8,5 <sup>b</sup> $\pm$ 1,8	25,5 <sup>b</sup>

Różne litery w kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$ .  
 Different letters in columns mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$ .

Tabela 2. Składowe barwy mleka klaczy przed liofilizacją i po niej  
 Table 2. Components of the colour of mare milk before and after lyophilisation

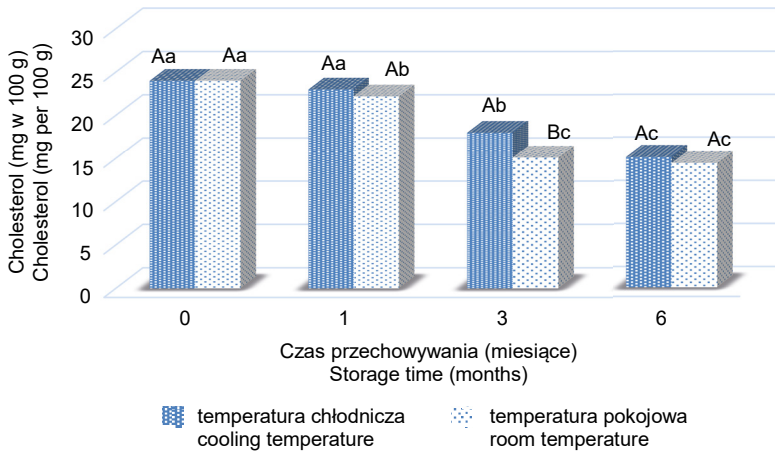
Mleko Milk	L*	a*	b*	$\Delta L^*$	$\Delta a^*$	$\Delta b^*$	$\Delta E$	WI (%)	C*
Przed liofilizacją Before lyophilisation	85,9 <sup>a</sup>	-2,1 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	85,7 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>
Po liofilizacji After lyophilisation	84,4 <sup>a</sup>	-2,0 <sup>a</sup>	5,1 <sup>b</sup>	-1,5 <sup>b</sup>	0,1 <sup>a</sup>	4,4 <sup>b</sup>	4,7 <sup>b</sup>	83,4 <sup>a</sup>	5,5 <sup>b</sup>

Różne litery w kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$ .  
 Different letters in columns mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$ .

bieli (WI), wskaźnika natężenia barwy (C\*), na składową b\* oraz na różnicę barwy ( $\Delta E$ ). Zmniejszeniu się wartości wskaźnika oddalenia od bieli towarzyszył wzrost udziału barwy żółtej (b\*) oraz wzrost natężenia i różnicy między barwami.

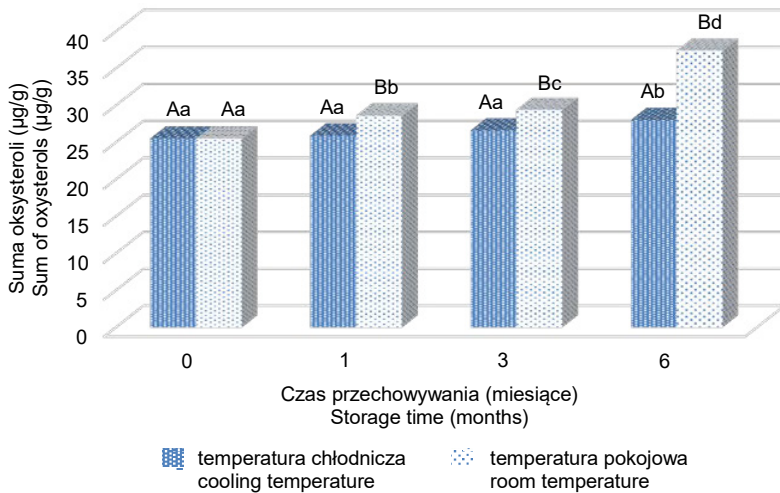
Zmiany zawartości cholesterolu w liofilizowanym mleku klaczy przechowywanym w różnych warunkach temperaturowych przez okres 6 miesięcy przedstawiono na rysunku 1. Zawartość cholesterolu w liofilizacie mleka przechowywanego w temperaturze pokojowej wynosiła od 24,0 mg w 100 g po liofilizacji poprzez 22,2 mg w 100 g, 15,1 mg w 100 g i 14,4 mg w 100 g odpowiednio w 1., 3. i 6. miesiącu przechowywania. W liofilizacie przechowywanym w temperaturze chłodniczej poziom cholesterolu wynosił od 23,0 mg w 100 g tuż po liofilizacji przez 21,2 mg w 100 g, 18,0 mg w 100 g i 15,1 mg w 100 g odpowiednio w 1., 3. i 6. miesiącu przechowywania. Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w ilości cholesterolu między próbkami liofilizowanego mleka klaczy przechowywanymi w warunkach temperatury chłodniczej i pokojowej w 3. miesiącu badań. Nie stwierdzono takiej różnicy w 6. miesiącu przechowywania. Zbliżone wyniki uzyskali Kny (1998) i Sieber (2005). Wykazano istotne ( $p = 0,05$ ) zmniejszenie ilości cholesterolu w liofilizatach przechowywanych przez 3 i 6 miesięcy.

Wpływ temperatury przechowywania na zawartość sumy oksysteroli w liofilizowanym mleku klaczy przedstawiono na rysunku 2. Analiza statystyczna wykazała istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w zawartości sumy PUC między liofilizatami mleka klaczy przechodo-



Rys. 1. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na zawartość cholesterolu w liofilizatach mleka kłaczki. Różne duże i małe litery oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$

Fig. 1. Influence of storage time and temperature on the cholesterol content of mare milk lyophilisates. Different capital and small letters mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$



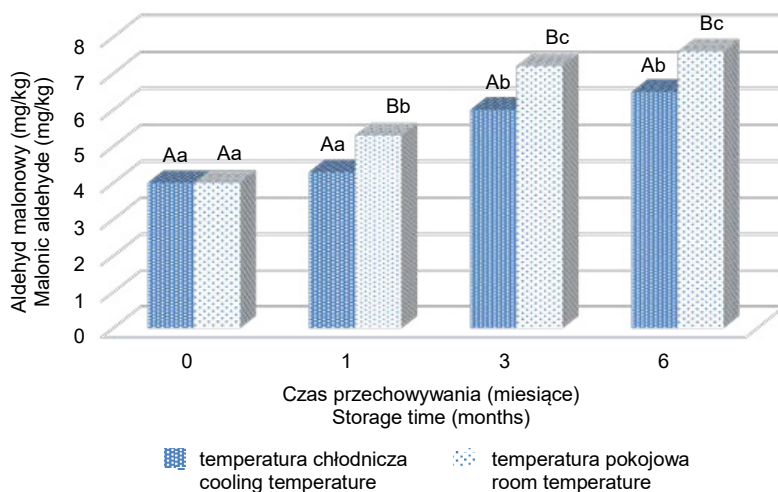
Rys. 2. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na zawartość sumy oksysteroli w liofilizatach mleka kłaczki. Różne duże i małe litery oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$

Fig. 2. Influence of storage time and temperature on the sum of oxysterols content of mare milk lyophilisates. Different capital and small letters mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$

wywany w warunkach temperatury chłodniczej i pokojowej w 1., 3. i 6. miesiącu badań. Różnice te w poszczególnych miesiącach wynosiły: 2,8, 2,9 i 9,4  $\mu\text{g/g}$ . Poziomą sumę oksysteroli był wyższy w liofilizatach przechowywanych w temperaturze pokojowej.

Procentowy udział oksysteroli w całkowitej ilości utlenionego cholesterolu był istotnie ( $p \leq 0,05$ ) większy w liofilizatach przechowywanych w temperaturze pokojowej (12%), niż w chłodniczej (3%) (rys. 2, 6).

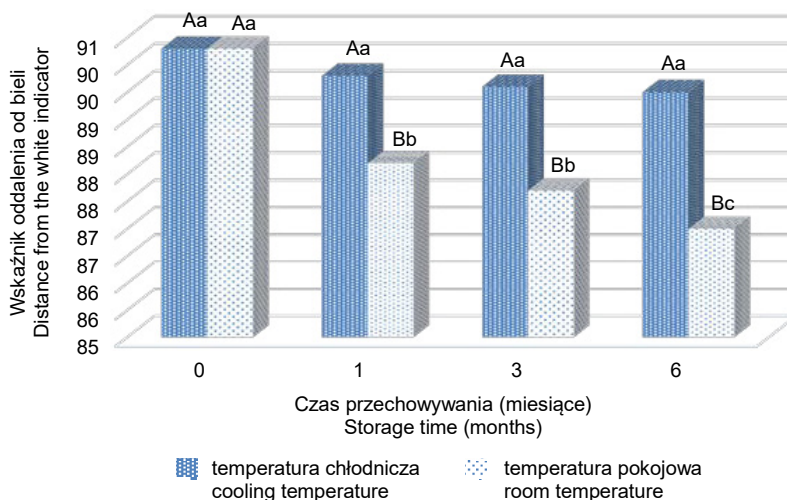
Wpływ temperatury przechowywania liofilizatu na zawartość aldehydu malonowego, wyrażoną za pomocą liczby TBA, przedstawiono na rysunku 3. Poziom aldehydu malonowego w liofilizacie mleka przechowywanego w temperaturze pokojowej wynosił od 4,0 mg/kg bezpośrednio po liofilizacji poprzez 5,3 mg/kg, 7,2 mg/kg do 7,6 mg/kg odpowiednio w 1., 3. i 6. miesiącu przechowywania. W liofilizacie mleka przechowywanego w temperaturze chłodniczej zawartość aldehydu malonowego wynosiła 4,3 mg/kg, 6,0 mg/kg i 6,5 mg/kg odpowiednio w 1., 3. i 6. miesiącu przechowywania. Analiza statystyczna wykazała istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w ilości oznaczonego aldehydu w liofilizatach składowanych w temperaturze pokojowej i chłodniczej w 1., 3. i 6. miesiącu badań. W poszczególnych miesiącach różnice te wynosiły: 1,1, 1,2 i 1,1 mg/kg. Stwierdzono również istotny ( $p \leq 0,05$ ) wpływ czasu przechowywania na wzrost zawartości TBA.



Rys. 3. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na zawartość aldehydu malonowego w liofilizatach mleka klaczy. Różne duże i małe litery oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$

Fig. 3. Influence of storage time and temperature on the malonic aldehyde content of mare milk lyophilisates. Different capital and small letters mean statistically significant differences at the level of  $p = 0,05$

Zmiany barwy w zależności od warunków temperaturowych podczas 6-miesięcznego przechowywania liofilizowanego mleka klaczy przedstawiono z wykorzystaniem wskaźnika oddalenia od bieli (WI) na rysunku 4. Stwierdzono istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice



Rys. 4. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na wartość wskaźnika oddalenia od bieli (WI) w liofilizatach mleka klaczy. Różne duże i małe litery oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$

Fig. 4. Influence of storage time and temperature on the value of distance from the white indicator (WI) of mare milk lyophilisates. Different capital and small letters mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$

w wartościach wskaźnika WI liofilizatów przechowywanych w temperaturze pokojowej i chłodniczej w 1., 3. i 6. miesiącu wykonywanych pomiarów. W poszczególnych miesiącach różnice te wynosiły: 1,6, 2,0 i 2,5%. Wartości WI były większe dla proszku przechowywanego w warunkach temperatury chłodniczej.

Stwierdzono również istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w wartościach wskaźnika natężenia barwy. W poszczególnych okresach badań różnice te wynosiły: 1,6, 2,3 i 3,5. Wartości  $C^*$  i udziału barwy żółtej ( $b^*$ ) były większe dla proszku przechowywanego w temperaturze pokojowej. Istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice zaobserwowano także w przypadku wskaźnika  $\Delta E$ . Zmiany barwy w kierunku żółtej liofilizowanego mleka klaczy przechowywanego w temperaturze pokojowej były znacząco większe niż mleka przechowywanego w temperaturze chłodniczej. Poza tym liofilizowane mleko klaczy przechowywane w warunkach temperatury chłodniczej było bardziej białe niż w temperaturze pokojowej, niezależnie od czasu. Świadczą o tym różnice w wartościach wskaźnika oddalenia od bieli.

W wyniku procesu **lioofilizacji kumysu** stwierdzono istotny ( $p \leq 0,05$ ) wzrost zawartości cholesterolu: od 3,8 mg w 100 g w płynnym kumysie do 37,1 mg w 100 g w liofilizacie. Zbliżone wyniki uzyskał w swoich badaniach Addis (1986).

W wyniku procesu liofilizacji kumysu powstały nowe produkty utlenienia cholesterolu (PUC), takie jak: 7- $\alpha$ -OH-C, należący do grupy 7-oksysteroli, i 25-OH-C jako ostatni PUC. Stwierdzono istotną różnicę w zawartości 7- $\alpha$ -OH-C i 7-keto-C, należących do grupy 7-oksysteroli, przed liofilizacją kumysu i po niej (tab. 3). Nie zaobserwowano statystycznych różnic w zawartości epoksydów ( $\alpha$ - i  $\beta$ -epoksy-C). Wykazano



Tabela 3. Zawartość oksysteroli w kumysie przed liofilizacją i po niej (µg/g)  
Table 3. Content of oxysterols in kumiss before and after lyophilisation (µg/g)

Kumys Kumiss	7- $\alpha$ -OH-C	7- $\beta$ -OH-C	$\alpha$ -Epoksy-C	$\beta$ -Epoksy-C	Triol-C	25-OH-C	7-Keto-C	Suma Sum
Przed liofilizacją Before lyophilisation	0,0 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup> ±1,0	3,1 <sup>a</sup> ±1,2	7,6 <sup>a</sup> ±1,4	0,0	0,0 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup> ±0,6	14,7 <sup>a</sup>
Po liofilizacji After lyophilisation	3,3 <sup>b</sup> ±0,7	2,9 <sup>a</sup> ±0,4	3,5 <sup>a</sup> ±0,6	7,9 <sup>a</sup> ±0,9	0,0	0,4 <sup>b</sup> ±0,1	6,8 <sup>b</sup> ±0,8	24,8 <sup>b</sup>

Różne litery w kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$ .  
Different letters in columns mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$ .

istotną zmianę zawartości sumy oksysteroli: od 14,7 do 24,8 µg/g w wyniku zastosowania suszenia sublimacyjnego. Porównując strukturę oksysteroli przed liofilizacją i po niej, stwierdzono powstanie szkodliwego 25-OH-C – w ilości 0,4 µg/g, co stanowiło tylko 2% PUC. Zawartość 7- $\alpha$ -OH-C i 7-keto-C kształtowała się w przypadku pierwszej frakcji na poziomie od 0 do 3,3 µg/g, a w przypadku drugiej – od 1,4 do 6,8 µg/g. Procentowy udział 7- $\alpha$ -OH-C w PUC zwiększył się z 0 do 13%, a w przypadku 7-keto-C – z 10 do 27%, w związku z tym nastąpiło zmniejszenie udziału epoksydów w PUC o 26% w porównaniu z surowcem przed liofilizacją. Podobne tendencje zaobserwowali w swoich badaniach Nourooz-Zadeh i Appelqvist (1988).

W wyniku procesu liofilizacji kumysu stwierdzono istotny ( $p \leq 0,05$ ) wzrost zawartości aldehydu malonowego: od 4,4 mg/kg do 14,8 mg/kg. Podobny wzrost uzyskał Kny (1998).

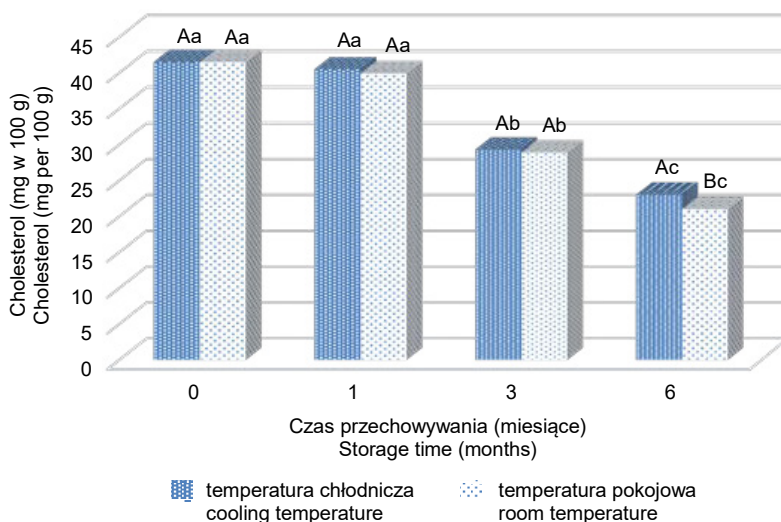
Wpływ procesu liofilizacji na barwę kumysu przedstawiono w tabeli 4. Spektrofotometryczny pomiar barwy wykazał istotny wpływ procesu liofilizacji kumysu na wartości: wskaźnika oddalenia od bieli (WI), wskaźnika natężenia barwy ( $C^*$ ), na składową  $b^*$  oraz na różnicę barwy ( $\Delta E$ ). Zmniejszeniu się wartości wskaźnika oddalenia od bieli z 83,4% do 80,6% towarzyszył wzrost udziału barwy żółtej ( $b^*$ ) z 2,9 do 8,7, a różnica barwy ( $\Delta E$ ) wynosiła 5,9.

Tabela 4. Składowe barwy kumysu przed liofilizacją i po niej  
Table 4. Components of the colour of kumiss before and after lyophilisation

Kumys Kumiss	L*	a*	b*	$\Delta L^*$	$\Delta a^*$	$\Delta b^*$	$\Delta E$	WI [%]	$C^*$
Przed liofilizacją Before lyophilisation	83,7 <sup>a</sup>	-1,4 <sup>a</sup>	2,9 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0	0,0	0,0 <sup>a</sup>	83,4 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>
Po liofilizacji After lyophilisation	82,7 <sup>a</sup>	-1,4 <sup>a</sup>	8,7 <sup>b</sup>	-1,0 <sup>b</sup>	0,0	5,8 <sup>b</sup>	5,9 <sup>b</sup>	80,6 <sup>b</sup>	8,8 <sup>b</sup>

Różne litery w kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$ .  
Different letters in columns mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$ .

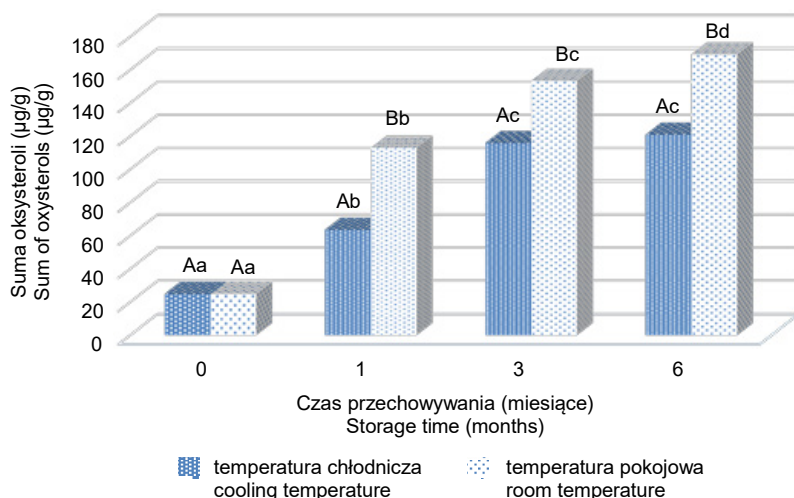
Kształtowanie się zawartości cholesterolu w liofilizowanym kumysie podczas przechowywania w różnych warunkach temperaturowych przedstawiono na rysunku 5. Zawartość cholesterolu w liofilizacie kumysu przechowywanego w temperaturze pokojowej wynosiła od 37,1 mg w 100 g po liofilizacji poprzez 35,6 mg w 100 g, 28,6 mg w 100 g i 19,6 mg w 100 g odpowiednio w 1., 3. i 6. miesiącu przechowywania. W liofilizacie przechowywanym w temperaturze chłodniczej cholesterol kształtował się na poziomie 36,4 mg w 100 g, 29,8 mg w 100 g i 22,5 mg w 100 g odpowiednio w 1., 3. i 6. miesiącu przechowywania. Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w ilości cholesterolu między próbkami przechowywanymi w warunkach temperatury chłodniczej i pokojowej w 6. miesiącu badań (2,9 mg w 100 g liofilizatu). Zawartość cholesterolu była większa w liofilizacie przechowywanym w warunkach temperatury chłodniczej i wynosiła 22,5 mg w 100 g. W temperaturze pokojowej stwierdzono obecność 19,6 mg cholesterolu w 100 g proszku. Podobne wyniki uzyskał Kny (1998) w badaniach liofilizatów mleka klaczy przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych.



Rys. 5. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na zawartość cholesterolu w liofilizatach kumysu. Różne duże i małe litery oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$

Fig. 5. Influence of storage time and temperature on the cholesterol content of kumiss lyophilisates. Different capital and small letters mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$

Wpływ temperatury na zawartość sumy oksysteroli podczas 6-miesięcznego przechowywania liofilizowanego kumysu przedstawiono na rysunku 6. Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w zawartości sumy PUC między proszkami kumysu przechowywanymi w warunkach temperatury chłodniczej i pokojowej w 1., 3. i 6. miesiącu badań. Różnice te w poszczególnych miesiącach wynosiły:



Rys. 6. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na zawartość sumy oksysteroli w liofilizatach kumysu. Różne duże i małe litery oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$

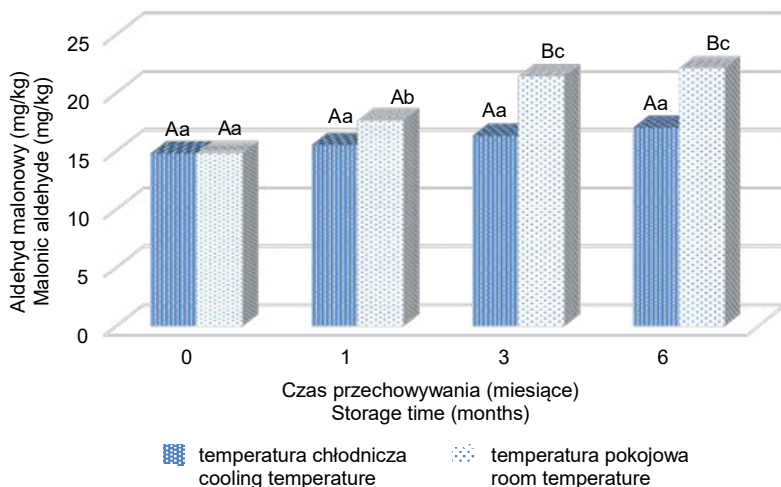
Fig. 6. Influence of storage time and temperature on the sum of oxysterols content of kumiss lyophilisates. Different capital and small letters mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$

49,4, 37,4 i 48,4  $\mu\text{g/g}$ . Poziom sumy oksysteroli był wyższy w liofilizatach przechowywanych w temperaturze pokojowej. Zbliżone wyniki uzyskał Sieber (2005).

Procentowy udział oksysteroli w całkowitej ilości utlenionego cholesterolu był istotnie większy w liofilizatach składowanych w temperaturze pokojowej (81,8%) niż chłodniczej (69,3%).

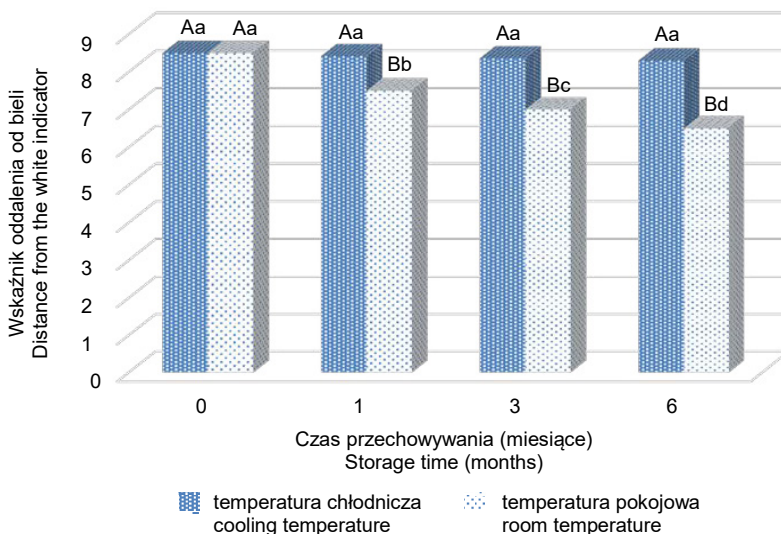
Wpływ różnych warunków temperaturowych na zawartość aldehydu malonowego, wyrażoną za pomocą liczby TBA, przedstawiono na rysunku 7. Poziom aldehydu malonowego w liofilizacie kumysu przechowywanego w temperaturze pokojowej wynosił od 14,8 mg/kg bezpośrednio po liofilizacji poprzez 17,6 mg/kg, 21,4 mg/kg do 22,1 mg/kg odpowiednio w 1., 3. i 6. miesiącu przechowywania. W liofilizacie przechowywanym w temperaturze chłodniczej zawartość aldehydu malonowego kształtowała się na poziomie 15,5 mg/kg, 16,3 mg/kg i 17,0 mg/kg odpowiednio w 1., 3. i 6. miesiącu przechowywania. Analiza statystyczna wykazała istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w ilości oznaczonego aldehydu w próbkach składowanych w temperaturze pokojowej i chłodniczej w 3. i 6. miesiącu badań. W obydwu okresach różnice te wynosiły 5,1 mg/kg. Stwierdzono również istotny ( $p \leq 0,05$ ) wpływ czasu przechowywania na zawartość TBA. Podobną tendencję zmian TBA zaobserwował Kny (1998).

Zależność barwy od warunków temperaturowych podczas 6-miesięcznego przechowywania liofilizowanego kumysu przedstawiono z wykorzystaniem wskaźnika oddalenia od bieli (WI) na rysunku 8. Zauważono istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w wartościach wskaźnika WI liofilizatów przechowywanych w temperaturze pokojowej i chłodniczej w 1., 3. i 6. miesiącu wykonywanych pomiarów. W poszczególnych miesiącach różnice



Rys. 7. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na zawartość aldehydu malonowego w liofilizatach kumysu. Różne duże i małe litery oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$

Fig. 7. Influence of storage time and temperature on the malonic aldehyde content of kumiss lyophilisates. Different capital and small letters mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$



Rys. 8. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na wartość wskaźnika oddalenia od bieli (WI) w liofilizatach kumysu. Różne duże i małe litery oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie  $p = 0,05$

Fig. 8. Influence of storage time and temperature on the value of distance from the white indicator (WI) of kumiss lyophilisates. Different capital and small letters mean statistically significant differences at the level of  $p = 0.05$

te wynosiły: 9,3, 14,8 i 16,6%. Wartości WI były większe dla proszku przechowywanego w warunkach temperatury chłodniczej.

Stwierdzono istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice w wartościach wskaźnika natężenia barwy w zależności od warunków temperaturowych w 1., 3. i 6. miesiącu wykonywanych pomiarów. W poszczególnych okresach badań różnice te wynosiły: 9,7, 14,5 i 15,8. Wartości  $C^*$  i udziału barwy żółtej ( $b^*$ ) były większe dla proszku przechowywanego w temperaturze pokojowej. Zauważono istotne różnice w wartościach wskaźnika  $\Delta E$  w zależności od warunków temperaturowych w 1., 3. i 6. miesiącu wykonywanych pomiarów. W poszczególnych okresach różnice te wynosiły: 9,3, 15,0 i 17,6. Zmiany barwy w kierunku żółtej liofilizowanego kumysu przechowywanego w temperaturze pokojowej były istotnie większe aniżeli kumysu przechowywanego w temperaturze chłodniczej. Poza tym kumys liofilizowany przechowywany w warunkach temperatury chłodniczej był bardziej biały niż w temperaturze pokojowej, niezależnie od czasu. Świadczą o tym różnice w wartościach wskaźnika oddalenia od bieli. Podobne wyniki uzyskał Kny (1998).

## Podsumowanie

Stwierdzono istotny wpływ procesu liofilizacji na wzrost zawartości oksysteroli i aldehydu malonowego w mleku klaczy oraz zmianę jego barwy. Zawartość cholesterolu w badanych liofilizatach zmniejszała się podczas 6-miesięcznego przechowywania w istotny sposób. Potwierdzono, że czas przechowywania, warunki temperaturowe oraz rodzaj surowca mają wpływ na zawartość cholesterolu w analizowanym mleku klaczy i kumysie. Spośród oznaczanych produktów utlenienia cholesterolu stwierdzono znaczne zwiększenie 7-keto-C i  $\alpha$ -epoksy-C w liofilizowanym mleku klaczy, a 7-keto-C, 7- $\alpha$ -OH-C i 7- $\beta$ -OH-C w liofilizowanym kumysie. Największe ilości oksysteroli tworzyły się w proszkach mleka klaczy i kumysu przechowywanych w temperaturze pokojowej. Wraz z upływem czasu przechowywania w warunkach temperatury pokojowej wzrastała ilość triolu-C w kumysie liofilizowanym. Udział procentowy oksysteroli w ogólnej ilości utlenionego cholesterolu zwiększał się we wszystkich badanych liofilizatach. Stwierdzono istotny związek pomiędzy zawartością cholesterolu a produktami jego utleniania w liofilizowanym mleku przechowywanym w warunkach temperatury chłodniczej. W pozostałych przypadkach takiej zależności nie zaobserwowano. Podczas 6-miesięcznego przechowywania badanych liofilizatów zawartość aldehydu malonowego wzrastała w zależności od warunków temperaturowych oraz rodzaju surowca. Wartości wskaźnika oddalenia od bieli malały przez cały okres przechowywania. Największą zmianę zaobserwowano w przypadku liofilizowanego kumysu przechowywanego w temperaturze pokojowej. Czas przechowywania i warunki temperaturowe wpływały w istotny sposób na zmianę barwy badanych liofilizatów. W przypadku liofilizatów mleka klaczy i kumysu przechowywanych w warunkach temperatury chłodniczej nie zaobserwowano istotnych zmian wskaźnika WI. Wykazano związek pomiędzy składową barwy  $C^*$  i  $b^*$  a wskaźnikiem oddalenia od bieli liofilizatów mleka klaczy i kumysu przechowywanych w temperaturze pokojowej.

## Literatura

- Addis, P. B. (1986). Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 10–11, 1021–1030.
- Bartnikowska, E. (1995). Aktywność biologiczna oksysteroli. *Żyw. Człow. Metab.*, 22, 1, 78–88.
- Businco, L., Giampietro, P. G., Lucenti, P., Lucaroni, F., Pini, C., Di Felice, G., Iacovacci, P., Curadi, C., Orlandi, M. (2000). Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105, 5, 1031–1034.
- Cais-Sokolińska, D., Majcher, M. (2009). Zależność pomiędzy parametrami barwy skali CIE L\*, a\*, b\* a podstawowym składem chemicznym permeatu i koncentratu mleka poddanego mikro- i ultrafiltracji. *Apar. Bad. Dydakt.*, 14, 1, 92–96.
- Chapman, M. D., Smith, A. M., Vailes, L. D., Arruda, L. K., Dhanaraj, V., Pomés, A. (2000). Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106, 3, 409–418.
- Curadi, M. C., Orlandi, M., Lucenti, P., Giampietro, P. G. (2001). Use of mare milk in pediatric allergology. W: N. Miraglia, W. Martin-Rosset (red.), *Recent progress in animal production science. Vol. 2* (s. 647–649). Piacenza: Franco Angeli.
- Danków, R., Cais-Sokolińska, D., Pikul, J. (2009). Kształtowanie się zawartości związków azotowych w mleku kłaczy i kumysie oraz ich liofilizatach. *Nauka Przyr. Technol.*, 3, 4, #115.
- Di Cagno, R., Tamborrino, A., Gallo, G., Leone, C., De Angelis, M., Faccia, M., Amirante, P., Gobetti, M., (2004). Uses of mares' milk in manufacture of fermented milks. *Int. Dairy J.*, 14, 9, 767–775.
- Kacprzak, S., Pietrzak-Fiećko, R., Felkner-Poźniakowska, B., Gałowska, M., Wójcik, D. (2012). Określenie procentowego udziału kwasów tłuszczowych w tłuszczu mleka kłaczy. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 45, 3, 562–566.
- Kny, G. (1998). *Untersuchungen zur Qualität von frischer und gefriergetrockneter Stutenmilch*. Leipzig: Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.
- Krełowska-Kulaś, M. (1993). *Badanie jakości produktów spożywczych*. Warszawa: PWE.
- Nourooz-Zadeh, J., Appelqvist, L.-A. (1988). Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: milk powder products. *J. Food Sci.*, 53, 1, 74–79.
- Obara, A., Kołczak, T. (2004). Biologiczna rola produktów utleniania cholesterolu w organizmie człowieka i zwierząt. *Med. Wet.*, 60, 6, 573–578.
- Oszmiański, J. (2002). *Technologia i analiza produktów z owoców i warzyw. Wybrane zagadnienia*. Wrocław: Wyd. Akademii Rolniczej we Wrocławiu.
- Przygoński, K., Jeleń, H., Wąsowicz, E. (2000). Determination of cholesterol oxidation products in milk powder and infant formulas by gas chromatography and mass spectrometry. *Nahrung*, 44, 2, 122–125.
- Rutkowska, J., Adamska, A., Białek, M. (2011). Porównanie składu kwasów tłuszczowych zawartych w tłuszczu mleka kłaczy i krów. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 74, 1, 28–38.
- Salimei, E., Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *Int. Dairy J.*, 24, 2, 130–142.
- Sander, B. D., Addis, P. B., Park, S. W., Smith, D. E. (1989). Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *J. Food Prot.*, 52, 109–114.
- Sieber, R. (2005). Oxidised cholesterol in milk and dairy products. *Int. Dairy J.*, 15, 3, 191–206.
- Wąsowicz, E. (1997). Produkty utleniania cholesterolu wykrywane w żywności i ich biologiczne znaczenie. *Bibl. PTTŻ Ser. Pop.-Nauk. PTTŻ*, 17.

## CHOLESTEROL AND ITS OXIDATION PRODUCTS IN MARE MILK LYOPHILISATES AND KUMISS

**Summary.** The aim of the thesis was to evaluate the influence of freeze-drying and storage temperature of lyophilisates of mare milk and kumiss on the content of cholesterol, oxysterols and malonic aldehyde and change of colour during 6-month storage. The research material was liquid mare milk and kumiss and lyophilisates made of them and stored for 6 months at temperatures of 4–6°C and 18–20°C. On the basis of the received results it was statistically reported that all the analysed compounds were significantly influenced by the type of material, freeze-drying process, storage time and storage temperatures. Changes in the content of cholesterol, oxysterols and malonic aldehyde were bigger in the lyophilisates of kumiss than in the lyophilisates of mare milk. The freeze-drying process of liquid mare milk and kumiss resulted in an increase in the content of oxysterols. Oxidation processes in the analysed lyophilisates took place faster at room temperature than in cooling temperature.

**Key words:** freeze-drying, mare milk, kumiss, oxysterols, cholesterol, TBA, white index

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

*Romualda Danków, Katedra Technologii Mleczarstwa, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31/33, 60-624 Poznań, Poland, e-mail: dankow@up.poznan.pl*

*Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:*

*21.01.2016*

*Do cytowania – For citation:*

*Danków, R., Teichert, J., Pikul, J., Osten-Sacken, N., Cais-Sokolińska, D. (2016). Cholesterol i produkty jego utleniania w liofilizatach mleka kłaczy i kumysu. *Nauka Przyr. Technol.*, 10, 1, #11. DOI: 10.17306/J.NPT.2016.1.11*