

projektu innowacyjnego, w której wykorzystuje się metodologię zarządzania projektem. Faza ta rozpoczyna się od planowania ogólnego, następnie planowania szczegółowego, organizacji projektu, wyznaczenia określonych celów i etapów, realizacji i monitorowania poszczególnych zaplanowanych działań. Końcowym rezultatem jest innowacja gotowa do debiutu rynkowego. Opracowanie i wdrożenie strategii wprowadzenia produktu na rynek jest uwarunkowane między innymi rodzajem innowacji, pozycją rynkową przedsiębiorstwa, zasobami przedsiębiorstwa i poziomem konkurencji rynkowej (Sojkin, 2003; Tidd i Bessant, 2011).

Ostatnim etapem zarządzania innowacjami jest proces dyfuzji (dyskontowania innowacji). Jest to długotrwały proces rozprzestrzeniania się informacji o danej innowacji na rynku w systemach społecznych. Dyskontowanie wiąże się z celem innowacyjności, jakim jest dążenie do sukcesu rynkowego, między innymi dzięki akceptacji przez liczną grupę konsumentów, pozwalającej na zadowalające efekty finansowe dla przedsiębiorstwa, czy też obniżenie kosztów i zwiększenie udziałów w rynku. Dyfuzja innowacji jest procesem wieloetapowym i przebiega na wielu płaszczyznach (Rogers, 1983; Tidd i Bessant, 2011).

Interesujący, kompleksowy model procesu kształtowania systemu zarządzania innowacjami w przedsiębiorstwie zaprezentowali Cyfert i Mielcarek (2010), według których istnieją cztery główne podprocesy (rysunek 1):



**Rysunek 1. Model procesu zarządzania innowacjami**

Źródło: (Cyfert i Mielcarek, 2010).

- analiza determinant systemu zarządzania innowacjami,
- projektowanie/doskonalenie systemu zarządzania innowacjami,
- wdrażanie systemu zarządzania innowacjami,
- kontrola funkcjonowania systemu zarządzania innowacjami.

Zaproponowany układ szczegółowych działań (w ramach zdefiniowanych podprocesów) charakteryzuje się systemowym, kompleksowym rozwiązaniem, cyklicznością i logiką powiązań, a także możliwością uzyskania i utrzymania efektu synergii w zarządzaniu innowacjami.

Zaproponowany model i jego prawidłowe wdrożenie może pozwolić na uzyskanie następujących korzyści dla przedsiębiorstwa:

- kompleksowe, holistyczne zarządzanie innowacjami w przedsiębiorstwie,
- zintegrowanie systemu zarządzania innowacjami ze strategią przedsiębiorstwa i systemem zarządzania projektami i procesami,
- poprawa komunikacji działań innowacyjnych w przedsiębiorstwie, w tym zwiększenie aktywności innowacyjnej przedsiębiorców (Cyfert i Mielcarek, 2010).

Proces zarządzania innowacjami produktowymi wpływającymi na projektowanie i rozwój produktów na rynku ze strony przedsiębiorstwa jest uzależniony od:

- stanu posiadanej wiedzy,
- stopnia innowacyjności (między innymi aktywności innowacyjnej pracowników),
- kultury organizacyjnej,
- zasobów przedsiębiorstwa,
- ograniczeń czasowych,
- dostępności surowców,
- przyjętego poziomu ryzyka (Cyfert i Mielcarek, 2010; Kokot-Stępień, 2017; Rutkowski, 2016; Sojkin, 2012; Tidd i Bessant, 2011).

Wyniki badań na polskich rynkach żywnościowych: mleczarskim, tłuszczowym, cukierniczo-piekarniczym, mięsno-wędliniarskim wykazały, że podmioty w kategorii liderzy rynkowi (duże przedsiębiorstwa) w swoim portfelu innowacji produktowych posiadają nowe produkty na rynku na poziomie 10–20%. Pozostała struktura innowacji to głównie modyfikacje produktowe (50–60%) lub nowe produkty dla przedsiębiorstwa (40%). W przypadku przedsiębiorstw małych i średnich w portfelu innowacji występują głównie modyfikacje (na poziomie około 80%), a pozostałe produkty to nowe produkty dla przedsiębiorstw. Wśród tych przedsiębiorstw nie odnotowano kategorii: nowe produkty na rynku. W badanych przedsiębiorstwach proces projektowania i rozwoju produktów wyglądał

podobnie. Poszczególne etapy: poszukiwanie pomysłów, ich selekcja, prace koncepcyjne, opracowanie i testowanie prototypu, analiza ekonomiczna, opracowanie procesu komercjalizacji, ocena skuteczności nowego produktu były zbliżone. Niemniej w zależności od wielkości przedsiębiorstwa, pozycji rynkowej przedsiębiorstwa, rynku żywnościowego oraz skali działania zaobserwowano różnice w zakresie i szczegółowości poszczególnych działań (Sojkin, 2012).

Informacje płynące z rynku żywności i dostępne dane literaturowe (Pacholek, 2019; Rogut i Piasecki, 2009; Sojkin, 2012) wskazują, że głównym kierunkiem innowacyjności produktowej na rynku żywnościowym jest projektowanie innowacyjnych produktów o dodatkowych, zadeklarowanych cechach prozdrowotnych. Wśród produktów o największym potencjale wymieniono między innymi żywność ukierunkowaną na zmniejszenie ryzyka chorób (zwłaszcza tzw. chorób cywilizacyjnych), wykorzystanie do produkcji żywności surowców roślinnych bogatych w składniki bioaktywne korzystne dla zdrowia, wykorzystanie niekonwencjonalnych surowców i produktów ubocznych, rozwijanie produktów o cechach prozdrowotnych otrzymanych na drodze wzbogacenia w bioaktywne składniki (na przykład błonnik pokarmowy, probiotyki, prebiotyki, synbiotyki, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, substancje fitochemiczne: fitostrole, związki fenolowe, fitoestrogeny), czy też wprowadzenie nowych metod wytwarzania, pozwalających na znaczące ograniczenie strat labilnych związków biologicznie odżywczych lub o fizjologicznym udokumentowanym oddziaływaniu na organizm człowieka. Kierunek ten jest też swoistą odpowiedzią na aktualne trendy konsumenckie. Wyniki przeprowadzonych badań konsumenckich wskazują na najistotniejsze elementy akceptacji konsumenckiej, wpływające na modelowanie procesu komercjalizacji innowacji produktowych. Są to: precyzyjna ocena zachowań uczestników potencjalnego rynku docelowego, zgodność postrzegania innowacji przez konsumentów z pożądaną charakterystyką innowacyjnego produktu oraz widoczność/dostrzegalność produktu na półce sklepowej (Sojkin, 2012).

Rozwojowi innowacji produktów o cechach prozdrowotnych sprzyja rosnąca chęć poprawy jakości życia konsumenta, jak również pojawienie się składników żywności, które są ponownie dodane do żywności (na przykład zboża rzekome, ekstrakty roślinne, produkty uboczne przemysłu spożywczego) oraz rozwój możliwości analitycznych pozwalających na precyzyjne określenie pozytywnego oddziaływania na organizm człowieka. Rynek żywności o dodatkowych cechach prozdrowotnych (określany jako rynek żywności funkcjonalnej) jest jednym z najszybciej rozwijających się rynków żywnościowych na świecie. W 2017 roku wartość globalnego rynku żywności funkcjonalnej była szacowana na 129 mld dolarów. Według prognoz sprzedaż dla tej kategorii produktów spożywczych na świecie może w 2024 roku osiągnąć wartość 253 mld dolarów, co oznaczałoby niemal dwukrotny wzrost w porównaniu z wartością z 2017 roku (Puls Biznesu, 2018).

### 1.3. Osłonki jako innowacyjny produkt na rynku żywności

Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 450/2009 z dnia 29 maja 2009 r. w sprawie aktywnych i inteligentnych materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością osłonki (materiały powlekające lub powlekające żywność) należą do nowoczesnych, aktywnych i inteligentnych materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością. Mogą składać się z jednej lub więcej warstw lub elementów materiałów różnego typu, takich jak tworzywa sztuczne, papier, karton lub materiały powlekające i lakiery. Osłonki mogą występować jako:

- integralna część produktu żywnościowego,
- opakowanie produktu żywnościowego (na przykład niejadalne powłoki wędlin, serów).

Ponadto w rozumieniu Ustawy z dnia 13 czerwca 2013 r. o gospodarce opakowaniami i odpadami opakowaniowymi (Dz.U. 2013, poz. 888) oraz Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 22 października 2013 r. w sprawie przykładowego wykazu wyrobów, które uznaje się albo nie uznaje się za opakowanie (Dz.U. 2013, poz. 1274), osłonki nie są opakowaniem, ponieważ stanowią integralną część produktu i nie są stosowane samodzielnie. Stanowią one jednak niezwykle ważny element zapewnienia jakości i trwałości produktów żywnościowych. Osłonki zabezpieczają produkt przed wnikaniem do jego wnętrza niepożądanych obcych zapachów oraz ograniczają rozwój patogennej mikroflory. Pozwalają także wyeksponować atrakcyjny wygląd produktu i zachęcić konsumentów do zakupu. Jeśli osłonki stanowią integralną część produktu żywnościowego, mogą być przeznaczone do spożycia lub ich spożycia można się spodziewać, wówczas są objęte kategorią „żywność” i muszą spełniać wszelkie rygorystyczne wymagania dotyczące żywności. Zgodnie z definicją podaną w Rozporządzeniu (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiającym ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołującym Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiającym procedury w zakresie bezpieczeństwa żywność to:

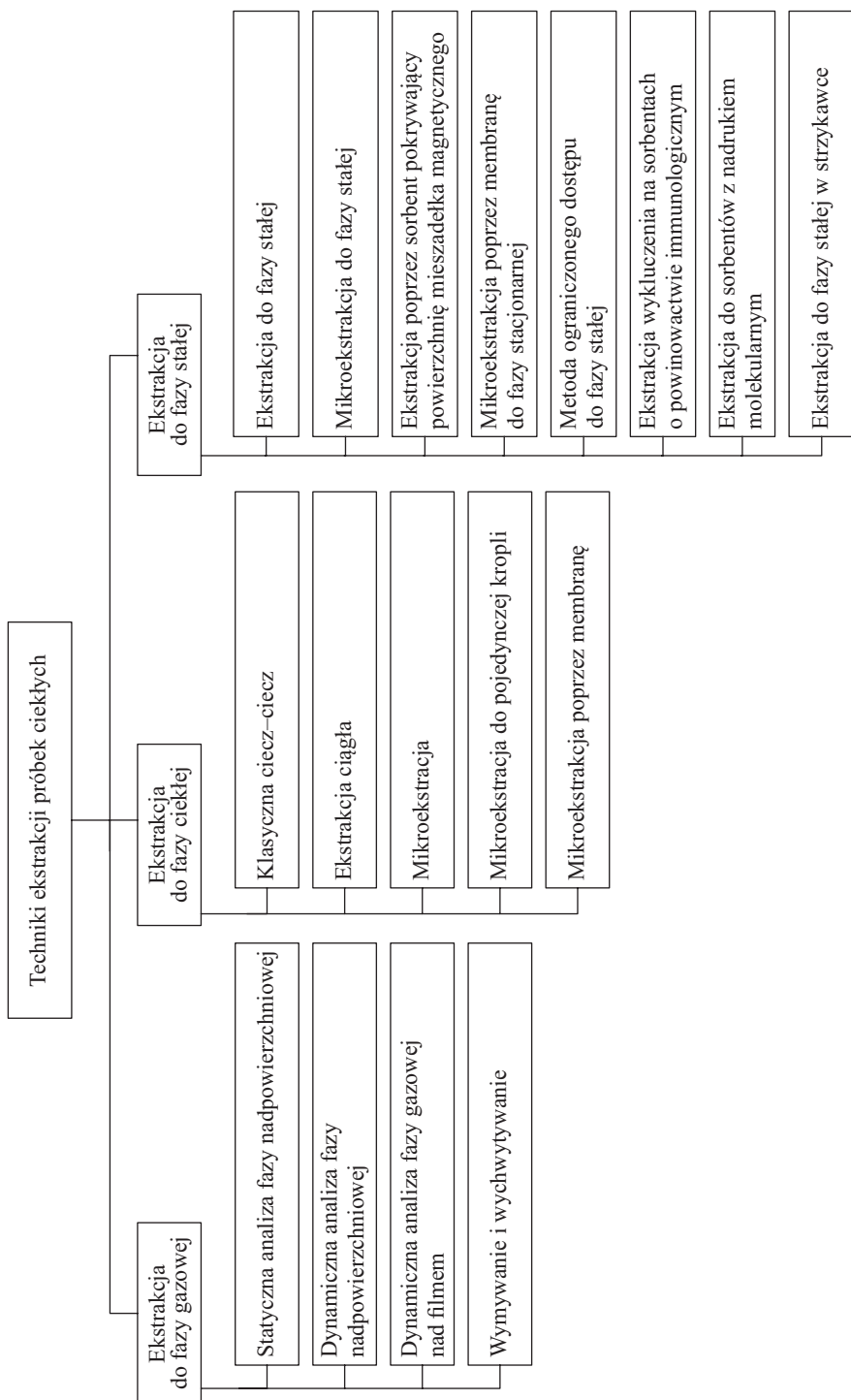
jakiegokolwiek substancje lub produkty, przetworzone, częściowo przetworzone lub nieprzetworzone, przeznaczone do spożycia przez ludzi lub których spożycia przez ludzi można się spodziewać (obejmując napoje, gumę do żucia i wszelkie substancje, łącznie z wodą), świadomie dodane do żywności podczas jej wytwarzania, przygotowania lub obróbki.

Zgodnie z uregulowaniami prawa żywnościowego każda żywność, w tym osłonka jadalna, wprowadzana na rynek musi być bezpieczna. Podstawowymi uregulowaniami prawnymi dotyczącymi bezpieczeństwa żywności w Unii Europejskiej są rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady:

- Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności,
- Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych,
- Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego,
- Rozporządzenie (WE) nr 854/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące organizacji urzędowych kontroli w odniesieniu do produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi,
- Rozporządzenie (WE) nr 1924/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych dotyczących żywności,
- Rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 stycznia 1997 r. dotyczące nowej żywności i nowych składników żywności,
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności,
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności.

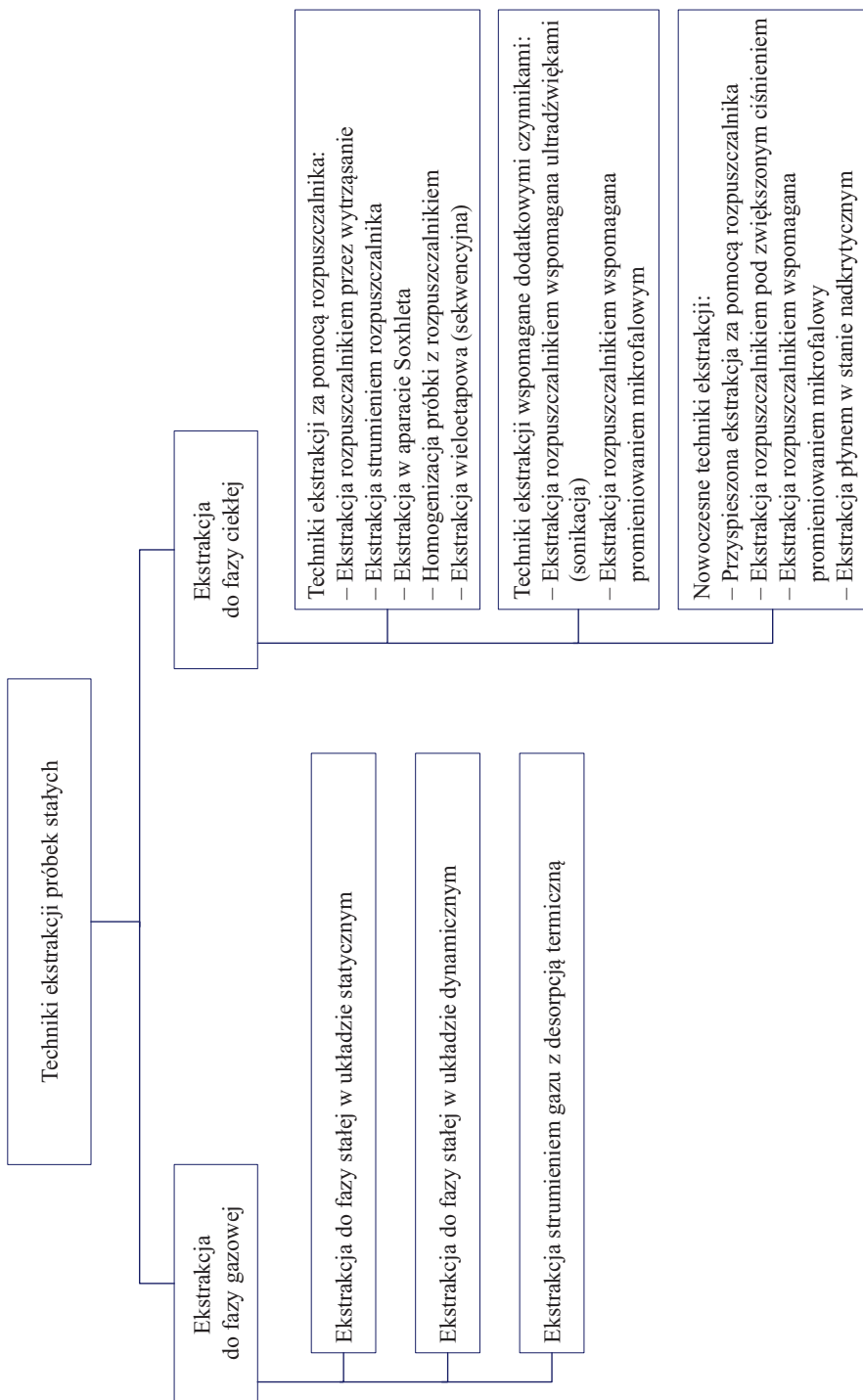
W Polsce podstawowym aktem prawnym jest Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz.U. 2006, Nr 171 poz. 1225), której zapisy definiują bezpieczeństwo żywności jako:

ogół warunków, które muszą być spełnione, w szczególności dotyczących stosowanych substancji dodatkowych i aromatów, poziomu substancji zanieczyszczających, pozostałości pestycydów, warunków napromieniowania żywności, cech organoleptycznych i działań, które muszą być podejmowane na wszystkich etapach produkcji i obrotu żywnością w celu zapewnienia zdrowia i życia człowieka.



**Rysunek 13. Podział technik ekstrakcji próbek ciekłych**

Źródło: Na podstawie (Stepnowski i in., 2010).



**Rysunek 14. Podział technik ekstrakcji próbek stałych**

Źródło: Na podstawie (Stepnowski i in., 2010).

rozpuszczalność różnych grup związków. Opierając się na ogólnie istniejącej zasadzie rozpuszczalności „podobne rozpuszcza się w podobnym”, uważa się, że związki chemiczne posiadające kwaśny atom wodoru lub dużo grup hydroksylowych będą się łatwiej rozpuszczały w rozpuszczalnikach protonowych niż aprotowych. Podobnie substancja, która posiada duży moment dipolowy, będzie lepiej rozpuszczalna w ekstrahentach polarnych niż apolarnych posiadających zerowy albo bardzo mały moment dipolowy (Kobus-Cisowska i in., 2015). W wyniku ekstrakcji rozpuszczalnikowej w ekstrakcie znajdują się zwykle takie substancje, jak cukry, kwasy organiczne, barwniki, garbniki i inne polifenole. Proporcje tych składników mogą się różnić w zależności od użytego rozpuszczalnika (Yu i in., 2005). Najczęściej stosuje się takie rozpuszczalniki ekstrahujące, jak etanol, metanol, aceton, heksan, octan etylu, woda, chloroform, eter naftowy lub toluen. Często wykorzystuje się również ich wodne mieszaniny bądź ekstrahuje się kolejno różnymi ekstrahentami, uwzględniając ich polarność, w celu uzyskania większej efektywności ekstrakcji.

Duży wpływ na jakość uzyskanego ekstraktu ma temperatura. Dobiera się ją na podstawie składu badanego materiału roślinnego, lotności ekstrahowanych analitów i ich powinowactwa do składników matrycy próbki. Dostępne dane literaturowe wskazują, że ogrzewanie próbki może zwiększyć skuteczność ekstrakcji, ponieważ wzrost temperatury zmniejsza lepkość rozpuszczalnika i zwiększa ruch molekularno-kinetyczny oraz współczynnik dyfuzji (Palma i in., 2013; Quenea i in., 2012). W doniesieniach literaturowych można odnaleźć także informacje o tym, że zbyt wysoka temperatura prowadzi do ekstrakcji niepożądanych zanieczyszczeń i rozkładu składników termolabilnych (Zhang i in., 2018). W ramach badań potwierdzono korzystny wpływ niskiej temperatury (poniżej 30°C) na jakość ekstrahowanych analitów (Esclapez i in., 2011; Zhang i in., 2009).

Efektywność ekstrakcji wzrasta wraz ze zwiększaniem jej krotności, a zadowalający poziom osiąga się, jeżeli ekstrakcja zostanie przeprowadzona trzykrotnie tym samym rozpuszczalnikiem i uzyskane przesącza zostaną połączone. Zawartość metabolitów będzie większa w ekstraktach po pierwszej ekstrakcji niż po drugiej i trzeciej. Wysoka efektywność pierwszej ekstrakcji wynika prawdopodobnie z niskiej proporcji materiału ekstrahowanego do rozpuszczalnika, co uniemożliwia powstanie roztworu przesyconego, a metabolity swobodnie mogą przechodzić do ekstraktu w czasie procesu ekstrakcji (Kobus-Cisowska i in., 2015).

Na efektywność procesu ekstrakcji analitów wpływ ma również wielkość cząstek próbki stałej. Zmniejszenie wielkości cząstek badanego materiału zwiększa kontakt powierzchniowy między próbką a zastosowanym rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym. Z kolei zbyt mały rozmiar cząstek może powodować nadmierną absorpcję substancji rozpuszczonej w stanie stałym i trudności w późniejszej



filtracji (Zhang i in., 2018). Według Azwanidy (2015) zastosowanie wielkości cząstek poniżej 0,5 mm jest najlepsze do osiągnięcia wydajnej ekstrakcji.

Do poprawienia wyników procesu ekstrakcji stosuje się ponadto różne dodatkowe oddziaływania fizyczne, w tym fale akustyczne o częstotliwości w zakresie 20–2000 kHz, zwane ultradźwiękami. Powszechnie wiadomo, że ultradźwięki mają znaczący wpływ na szybkość różnych procesów (Altaf i in., 2018). Proces ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (tzw. sonikacji) przeprowadza się na dwa sposoby: za pomocą łaźni ultradźwiękowej lub za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego. Różnica między tymi metodami polega na jednostkowej wprowadzanej mocy oraz na sposobie rozchodzenia się fali akustycznej. W łaźni ultradźwiękowej fala rozchodzi się w wodzie i dopiero z niej przechodzi do rozdrobionej próbki, pokonując przy tym barierę, którą stanowi ścianka naczynia. Zaletą ekstrakcji za pomocą łaźni ultradźwiękowej jest możliwość poddawania ekstrakcji wielu próbek jednocześnie. W dezintegratorze ultradźwiękowym fala jest natomiast emitowana bezpośrednio do próbki, przez co jego użycie jest bardziej efektywne.

Sonikację proponuje się jako metodę ekstrakcji przyjazną dla środowiska, odpowiednią do ekstrakcji na skalę laboratoryjną. Jednak można ją również przenieść na skalę pilotażową i przemysłową. Jak podają Chemat i in. (2017), przykładowo ekstrakcja 50 g nasion w 300 cm<sup>3</sup> heksanu wymaga odpowiednio 6 kWh, by przeprowadzić macerację w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika (mieszanie mechaniczne i ogrzewanie), 8 kWh w przypadku Soxhleta (ogrzewanie) i 0,25 kWh w ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (zasilania ultradźwięków). Jeśli chodzi o wpływ na środowisko, obliczona ilość emisji ditlenku węgla do atmosfery jest wyższa w przypadku Soxhleta (6400 g CO<sub>2</sub>/100 g ekstrahowanej substancji stałej) i maceracji (3600 g CO<sub>2</sub>/100 g ekstrahowanej substancji stałej) niż w przypadku ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (200 g CO<sub>2</sub>/100 g ekstrahowanej substancji stałej) (Chemat i in., 2017).

Zainteresowanie naukowców procesem ekstrakcji i czynnikami, które wpływają na jego efektywność, jest wyrazem wysokiej świadomości w zakresie istotności wpływu tego etapu procedury na jakość otrzymywanych analitów. Znanych jest też wiele czynników mogących wpływać zarówno pozytywnie, jak i negatywnie na efektywność procesu ekstrakcji. Jednak odpowiednio dobrane parametry wyodrębniania substancji roślinnych powinny zagwarantować maksymalny odzysk cennych metabolitów w możliwie krótkim czasie, z lepszą jakością ekstrakcji i zachowanym bezpieczeństwem, przy niższych nakładach finansowych. Mimo że opracowano wiele nowych metod ekstrakcji, w których przeanalizowano wpływ różnych czynników na efektywność ekstrakcji, do tej pory żadna pojedyncza metoda nie jest uważana za standardową dla ekstrakcji związków bioaktywnych z roślin.

## 3.2. Metody projektowania procesu ekstrakcyjnego

W toku badań naukowych poświęconych związkom bioaktywnym uzyskiwanym z różnych roślin wielu naukowców wciąż koncentruje się na optymalizacji procesów ekstrakcji, ponieważ związki fenolowe cechują się labilnością i nierównomiernym rozmieszczeniem w roślinie, a ich ekstrakcja z materiału roślinnego wymaga odpowiedniego przygotowania (Cheng i Hong, 2018; Ilghami i in., 2015; Tomšik i in., 2016). Poszukiwanie optymalnych warunków ekstrakcji metodą jednowymiarową, w której modyfikowany jest tylko jeden czynnik, a wszystkie pozostałe są stałymi wartościami, jest bardzo czasochłonne i kosztowne. Ponadto istotną wadą takiego podejścia jest niemożność wykrycia potencjalnych interakcji w różnych warunkach. W tej sytuacji alternatywą dla standardowego podejścia jednowymiarowego jest zastosowanie metodologii wykorzystującej proces projektowania eksperymentu, która jest szczególnie przydatna, gdy na badane zjawisko mają wpływ co najmniej dwa czynniki (Granato i de Araujo Calado, 2014).

Termin „eksperyment” definiuje się jako systematyczną procedurę przeprowadzaną w kontrolowanych warunkach w celu odkrycia nieznanego efektu, przetestowania lub ustalenia hipotezy lub zilustrowania znanego efektu (Bochenryn i Kusz, 2014). Podczas analizy procesu często stosuje się eksperymenty, aby ocenić, które dane wejściowe procesu mają znaczący wpływ na wynik procesu i jaki powinien być docelowy poziom tych nakładów, aby osiągnąć pożądany rezultat (produkt wyjściowy).

Wdrożenie procedur planowania doświadczeń przed rozpoczęciem procesu produkcyjnego prowadzi także do istotnego polepszenia rezultatów procesu i ma wpływ na jego aspekt technologiczny oraz ekonomiczny. Projektowanie eksperymentalne (*design of experiments* – DOE) stosuje się, aby obniżyć jego koszty poprzez przyspieszenie procesu projektowania, zmniejszenie późniejszych zmian projektowych oraz zmniejszenie złożoności materiałowej i roboczej. Zaplanowane eksperymenty są również narzędziem do osiągnięcia oszczędności kosztów produkcji przez zminimalizowanie zmienności procesu i zmniejszenie liczby przeróbek, odpadów i potrzeby kontroli.

Metody planowania eksperymentu zostały stworzone w latach dwudziestych XX wieku przez Ronalda Fishera. Skuteczność tych metod sprawiła, że w późniejszych latach znalazły zastosowanie w biologii, medycynie, psychologii, jak również w statystycznej kontroli jakości. Planowanie eksperymentów jako jedno z narzędzi statystycznej kontroli jakości pozwala na określenie czynników najsilniej oddziałujących na zmienną charakteryzującą badany proces, a także umożliwia wskazanie wartości czynników, dla których zmienna wynikowa osiąga pożądaną wartość lub najmniejszą zmienność. W celu prawidłowego

stępujących w ekstraktach z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej połączonej z spektrometrem mas z analizatorem typu pułapka jonowa (HPLC-ESI-IT-MS), a także z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii cieczerwowej połączonej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas z analizatorem typu Orbitrap (UPLC-Q-Orbitrap-MS).

#### Analiza HPLC-ESI-IT-MS

Analizy mające na celu wstępną identyfikację związków występujących w wyizolowanych frakcjach ekstraktów z wytlóków aronii przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej połączonej z spektrometrem mas z analizatorem typu pułapka jonowa, w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Analizę przeprowadzono w jonizacji ujemnej i dodatniej z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczerwego (Agilent 1100, Agilent, Santa Clara, USA) wyposażonego w spektrometr masowy (Esquire 3000, Bruker Daltonics, Brema, Niemcy) z analizatorem pułapki jonowej pozwalającym uzyskać widma MS/MSn. Próbki, po uprzednim przefiltrowaniu przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 µm (Millex LCR), wprowadzono poprzez iniektor manualny w ilości 20 µl i rozdzielano na kolumnie XBridge Waters 2,1 · 150 mm, wypełnionej złożem o odwróconej fazie (żel krzemionkowy C18), o uziarnieniu 3,5 µm. Próby rozdzielano z wykorzystaniem dwóch faz ciekłych, które stanowiły: woda dejonizowana z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego (rozpuszczalnik A) i acetonitryl (rozpuszczalnik B), przy przepływie 0,2 cm<sup>3</sup>/min. Frakcje rozdzielano według gradientu: inicjująco 10% B, 5 min – 25% B, 50 min – 37% B, 55 min – 95% B, 63 min – 95% B, 64 min – 10% B.

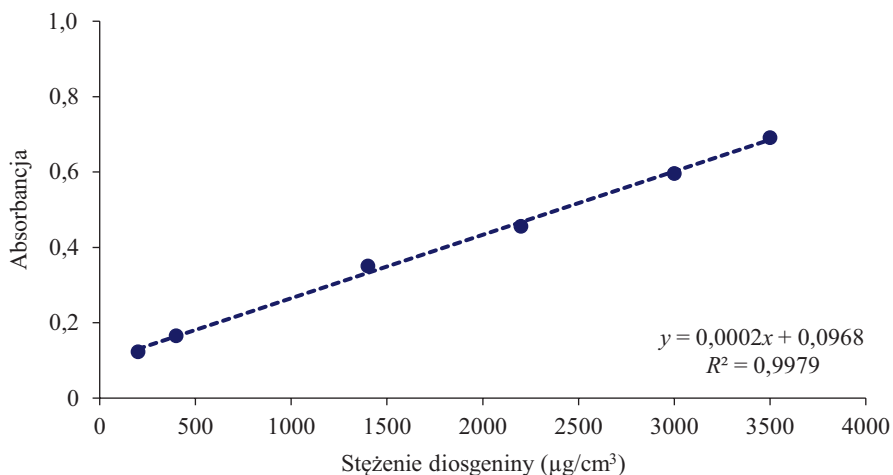
#### Analiza UPLC-Q-Orbitrap-MS

W celu oznaczenia składu elementarnej substancji naturalnych zawartych w wyizolowanych frakcjach ekstraktów z wytlóków aronii zastosowano metodę ultrasprawnej chromatografii cieczerwowej połączonej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas z analizatorem typu Orbitrap. Analizę przeprowadzono w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Badanie wykonano za pomocą aparatu Acquity (Waters, Milford, USA) połączonego ze spektrometrem mas QExactive (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) ze źródłem jonów HESI. Próbki rozdzielano na kolumnie Acquity BEH C18 (Waters) 150 · 2,1 mm, o uziarnieniu 1,7 µm. Związki były wymywane z wykorzystaniem dwóch faz, z których jedną stanowiła woda dejonizowana z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego (rozpuszczalnik A), a drugą acetonitryl (rozpuszczalnik B). Rozdział UPLC przeprowadzono według gradientu: inicjująco 5% B, 1 min – 5% B, 3 min – 10% B, 12 min – 40% B, 15 min – 95% B,

15,5 min – 95% B, 16 min – 5% B, 20 min – 5%. Rozdział prowadzono w 40°C przy przepływie 0,35 cm<sup>3</sup>/min. Do wstępnej analizy struktur chemicznych substancji naturalnych występujących w wyizolowanych frakcjach ekstraktów z wyłóków aronii posłużyły widma masowe fragmentacyjne oraz widma wysokorozdzielcze.

Oznaczenie ogólnej zawartości saponin (TSC)

Ogólną zawartość saponin w ekstraktach określono metodą opisaną przez Navarro del Hierro i in. (2018). Pobrano 125 µl próbki, następnie dodano 125 µl 0,8-procentowej waniliny rozpuszczonej w 96-procentowym alkoholu etylowym i 1,25 cm<sup>3</sup> 72-procentowego kwasu siarkowego (VI). Próbki wirowano i ogrzewano w 60°C przez 10 minut. Tak przygotowane próbki schładzano w lodzie przez 5 minut, następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 520 nm względem próbki kontrolnej zawierającej alkohol etylowy. Ogólną zawartość saponin w ekstraktach wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej (rysunek 23), którą przygotowano w tych samych warunkach, jakie podano wcześniej dla próbek. Wyniki wyrażono w g diosgeniny/100 g s.m. frakcji ekstraktu.



Rysunek 23. Krzywa wzorcowe do oznaczania ogólnej zawartości saponin

Źródło: Opracowanie własne.

### 4.3.3. Opracowanie i techniczne testowanie koncepcji eksperymentalnych osłonek jadalnych

Opracowanie i techniczne testowanie koncepcji eksperymentalnych osłonek jadalnych obejmowało następujące czynności:

- opracowanie koncepcji eksperymentalnych osłonek jadalnych,
- techniczne testowanie koncepcji eksperymentalnych osłonek jadalnych,
- oszacowanie bezpośrednich kosztów wytworzenia eksperymentalnych osłonek jadalnych.

### **Opracowanie koncepcji eksperymentalnych osłonek jadalnych**

Eksperymentalne osłonki jadalne zaprojektowano metodą opisaną przez Genksowsky'ego i in. (2015), wykorzystując chitozan jako podstawowy składnik strukturotwórczy. W tym celu 6 g chitozanu o średniej masie cząsteczkowej (300–1000 cps) rozpuszczono w 300 cm<sup>3</sup> 1-procentowego wodnego kwasu mlekowego (v/v). Otrzymano 2-procentowy roztwór chitozanu (w/v), który mieszano na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 26 godzin. Następnie dodano 2,5 cm<sup>3</sup> gliceryny na 1 g chitozanu i mieszano przez 1 godzinę. Po tym czasie dodano odpowiednio 0,5%, 1%, 1,5% frakcji 2 wyizolowanej na złożu poliamidowym do otrzymanych roztworów chitozanu. Frakcja 2 ekstraktu z wyłoków aronii (odmiany Nero) wyizolowana na złożu poliamidowym charakteryzowała się najwyższymi właściwościami przeciwutleniającymi. Równolegle przygotowano próbkę kontrolną bez dodatku ekstraktu. Następnie próbki mieszano przez 1 godzinę, po czym wszystkie mieszaniny wirowano przez 20 minut na 5000 obrotów. Próbki w ilości 20 g pobrano i wylano do jałowych szalek Petriego o średnicy 9 cm. Próbki suszono w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Wysuszone osłonki chitozanowe przechowywano w ekssykatorze w temperaturze pokojowej przy wilgotności względnej 50% do czasu przeprowadzenia analiz.

### **Techniczne testowanie koncepcji eksperymentalnych osłonek jadalnych**

W celu oceny właściwości użytkowych uzyskanych eksperymentalnych osłonek chitozanowych z dodatkiem i bez dodatku frakcji 2 ekstraktu z wyłoków aronii wykonano następujące badania:

- instrumentalny pomiar barwy ( $L^*a^*b^*$ ,  $L^*C^*h^\circ$ ),
- transmitancję optyczną (T),
- rozpuszczalność w wodzie (WS),
- szybkość przenikania pary wodnej (WVTR) i przepuszczalność pary wodnej (WVP),
- przepuszczalność tlenu (OTR),
- analizę struktury za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR),
- skaningową mikroskopię elektronową (SEM),
- analizę właściwości przeciwutleniających (DPPH, ABTS).

Instrumentalny pomiar barwy ( $L^*a^*b^*$ ,  $L^*C^*h^\circ$ )

Parametry barwy oznaczono w systemie CIE  $L^*a^*b^*$  znormalizowanym przez Międzynarodową Komisję Oświetleniową (CIE International Commission on Illumination, 2019) oraz w systemie  $L^*C^*h^\circ$ . Pomiar parametrów barwy przeprowadzono w zakresie światła widzialnego (VIS) od 250 nm do 850 nm, stosując typ obserwatora  $10^\circ$  oraz iluminant D65. W celu dokonania oznaczeń parametrów barwy z badanych chitozanowych osłonek wycięto obszar o wymiarach 20 mm · 20 mm i umieszczono w odpowiedniej przystawce do pomiaru barwy w spektrofotometrze Jasco V-770 w trzech powtórzeniach dla każdego rodzaju osłonki. W systemie CIE  $L^*a^*b^*$  zdefiniowano trzy składowe:  $L^*$ , która przyjmuje wartości od 100 (barwa idealnie biała) do 0 (barwa idealnie czarna) i oznacza jasność, oraz  $a^*$  i  $b^*$ , które wyrażają chromatyczność barwy. Wartość  $a^*$  określa odcienie czerwieni ( $+a^*$ ) i zieleni ( $-a^*$ ), wartość  $b^*$  zaś przedstawia odcienie żółci ( $+b^*$ ) i niebieskiego ( $-b^*$ ). System  $L^*C^*h^\circ$  opiera się również na trzech składowych, gdzie  $L^*$  opisuje jasność,  $C^*$  określa stopień nasycenia barwy, natomiast parametr  $h^\circ$  wyraża kąt tonu barwy ( $0-360^\circ$ ) (Gliszczyńska-Świgło, 2016).

Transmitancja optyczna (T)

Właściwości optyczne chitozanowych osłonek oceniono pod względem przepuszczalności światła w zakresie długości fali od 250 do 850 nm. Pomiarów optycznych przeprowadzono za pomocą spektrofotometru Jasco z podwójną wiązką V-770 w temperaturze pokojowej. Wyniki wyrażono jako procent transmitancji (% T) próbek.

Rozpuszczalność w wodzie (WS)

Przed pomiarem z chitozanowych osłonek wycięto kwadraty o wymiarach 20 mm · 20 mm i zważono. Próbki następnie suszono w  $75^\circ\text{C}$  przez 24 godziny w celu ustalenia początkowej suchej masy ( $W_1$ ). Wsuszone próbki zanurzono w  $30\text{ cm}^3$  wody destylowanej na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Na koniec próbki suszono ponownie w  $75^\circ\text{C}$  przez 24 godziny i zważono ( $W_2$ ) (Tan i in., 2020). Rozpuszczalność chitozanowych osłonek (%) określono zgodnie z następującym wzorem:

$$WS = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \cdot 100\%$$

gdzie:

$WS$  – rozpuszczalność w wodzie (%),

$W_1$  – początkowa sucha masa osłonki (g),

$W_2$  – masa osłonki, która nie rozpuściła się w 30 cm<sup>3</sup> wody w ciągu 24 godzin w 75°C (g).

Szybkość przenikania pary wodnej (WVTR) i przepuszczalność pary wodnej (WVP)

Szybkość przenikania pary wodnej i przepuszczalność pary wodnej chitozanych osłonek zostały określone zgodnie z normą PN-ISO 2528:2000 (Polski Komitet Normalizacyjny, 2000) i według metodyki opisananej przez Priyadarshi i in. (2018). Naczynia pomiarowe wypełniono 180 g suszającego żelu krzemionkowego i zamknięto metalową pokrywką z gumowymi uszczelkami, pomiędzy którymi umieszczono analizowane osłonki. Naczynia następnie zważono z dokładnością do 0,001 g i umieszczono w eksykatorze o wilgotności względnej 70%. Eksykator umieszczono w inkubatorze w temperaturze 25°C. Wzrost masy naczyń określono w czasie 8 godzin w odstępach godzinnych. Wartości szybkości przenikania pary wodnej (WVTR) i przepuszczalności pary wodnej (WVP) dla każdej osłonki obliczono zgodnie z następującymi wzorami:

$$WVTR = \frac{w}{A \cdot t}$$

gdzie:

- $WVTR$  – szybkość przenikania pary wodnej (g / (m<sup>2</sup> · d)),
- $w$  – przyrost masy (g),
- $t$  – czas (doba),
- $A$  – powierzchnia przenoszenia pary wodnej (m<sup>2</sup>);

$$WVP = \frac{WVTR \cdot d}{p \cdot (R_1 - R_2)}$$

gdzie:

- $WVP$  – przepuszczalność pary wodnej (g/(Pa · s · m)),
- $WVTR$  – szybkość przenikania pary wodnej (g/(m<sup>2</sup> · d)),
- $d$  – grubość folii (m),
- $t$  – czas (s),
- $p$  – prężność pary nasyconej wody (31,7 mbar w 25°C),
- $R_1$  – wilgotność względna w eksykatorze na zewnątrz naczynia (%),
- $R_2$  – wilgotność względna wewnątrz naczynia (%).

Przepuszczalność tlenu (OTR)

Przepuszczalność tlenu określono na podstawie metody ASTM F3136-15 (ASTM International, 2015) za pomocą systemu OxyPerm składającego się z analizatora Oxysense 325 i dedykowanej komory przepuszczalnej z wbudowanym



howanych z herbaty do chitozanowych osłonek powoduje zwiększenie rozpuszczalności w wodzie analizowanych osłonek. Wyższa rozpuszczalność w wodzie może poprawić biodegradowalność osłonki, redukując czas jej rozkładu w warunkach naturalnych, co pozwoli na ograniczanie masy zużytych opakowań, z drugiej zaś strony redukuje jej możliwości aplikacyjne do żywności o wysokiej zawartości wody (Singh i Sharma, 2008).

### **Szybkość przenikania pary wodnej (WVTR) i przepuszczalność pary wodnej (WVP)**

Jedną z ważnych właściwości funkcjonalnych opakowań żywności jest zmniejszenie transferu wilgoci między żywnością a otaczającą atmosferą. Ograniczenie przepuszczalności pary wodnej przez opakowanie jest bardzo ważne szczególnie w przypadku produktów o niskiej wilgotności (na przykład kruche ciastka, zbożowe koncentraty śniadaniowe). W innych zastosowaniach zmniejszenie wilgotności produktu jest zjawiskiem pożądanym dla zapobieżenia kondensacji pary wodnej wewnątrz opakowania (zmniejszenie przezroczystości) i ryzyka rozwoju pleśni. Otrzymane wartości szybkości przenikania pary wodnej (*water vaport transmission rate* – WVTR) oraz przepuszczalności pary wodnej (*water vapor permeability* – WVP) dla próbki kontrolnej i próbek z dodatkiem frakcji 2 ekstraktu z wyłoków aronii przedstawiono w tabeli 18. Wyniki badania wykazały, że właściwości barierowe dla pary wodnej badanych chitozanowych osłonek poprawiły się dzięki włączeniu ekstraktu z wyłoków aronii. Zwiększenie dodatku frakcji 2 ekstraktu skutkowało zmniejszeniem szybkości przenikania pary wodnej (WVTR) oraz przepuszczalności pary wodnej (WVP) przez badane próbki. Badania innych autorów pozwalają wyciągnąć podobne wnioski (Priyadarshi i in., 2018; Qin i in., 2015).

### **Przepuszczalność tlenu (OTR)**

Przepuszczalność tlenu (*oxygen transmission rate* – OTR) w materiałach do pakowania żywności ma ogromne znaczenie dla trwałości żywności, ponieważ tlen jest kluczowym czynnikiem utleniającym (Sothornvit i Pitak, 2007). Wartości szybkości przenikania tlenu przez próbkę kontrolną i próbki z dodatkiem frakcji 2 ekstraktu z wyłoków aronii dodanym w różnych stężeniach przedstawiono w tabeli 18. Stwierdzono, że dodatek ekstraktu z wyłoków aronii w różnych proporcjach istotnie ( $p < 0,05$ ) zmniejszył przepuszczalność tlenu chitozanowych osłonek. Im większą ilość frakcji 2 ekstraktu dodano do chitozanowych osłonek, tym mniejsza była szybkość przenikania tlenu. Sugeruje to, że polifenole zawarte we frakcji 2 ekstraktu z wyłoków aronii mogą znacznie poprawiać właściwości bariery tlenowej chitozanowej osłonki. Polifenole z ekstraktu z wyłoków aronii mogą uczestniczyć w oddziaływaniach międzycząsteczkowych z łańcuchami chitozanu i odgrywać rolę sieciującą w polimerycznych in-

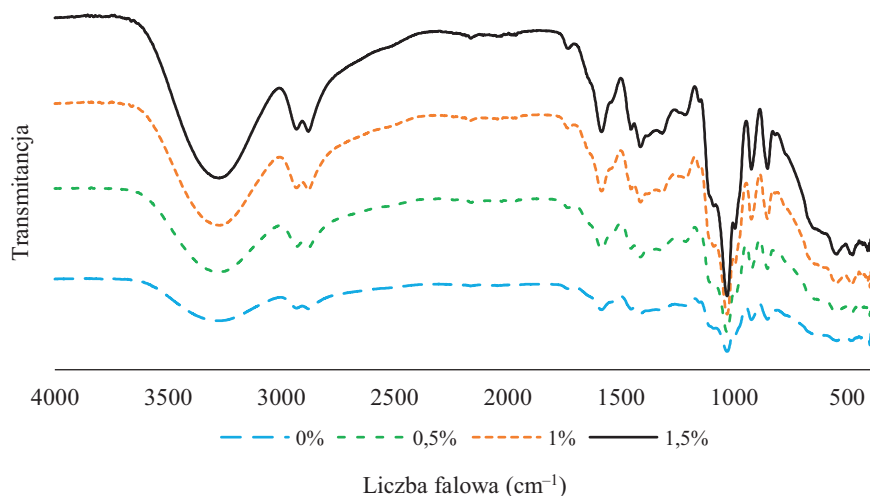


terakcjach łańcuch-łańcuch (Siripatrawan i Vitchayakitti, 2016). Cząsteczki te mogą również wypełniać pustą przestrzeń w chitozanowej osłonce, co skutkuje bardziej zwartą strukturą (Siripatrawan i Vitchayakitti, 2016).

### Analiza struktury (FTIR)

Spektroskopia FTIR została użyta jako narzędzie do badania możliwych interakcji między cząsteczkami chitozanu i polifenolami obecnymi we frakcji 2 ekstraktu z wyłoków aronii poprzez pomiar transmitancji w zakresie liczb falowych 500–4000  $\text{cm}^{-1}$ . Rysunek 34 przedstawia profil FTIR uzyskany dla próbki kontrolnej (chitozanowa osłonka bez dodatku) i dla chitozanowych osłonek zawierających różne stężenia frakcji 2 ekstraktu.

Najbardziej istotne cechy widma chitozanowej osłonki to pasmo rozciągające OH i NH przy 3000–3700  $\text{cm}^{-1}$ , pasmo przy 2887  $\text{cm}^{-1}$  związane ze rozciąganiem wiązań CH, pasmo przy 1590  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadające drganiom zginającym NH z drugorzędowej grupy amidowej oraz pasmo absorpcyjne przy 1750  $\text{cm}^{-1}$  sugerujące obecność grup karbonylowych (drgania rozciągające C = O, acetylowany monomer) (Lawrie i in., 2007). Inne pasma absorpcyjne obecne między 1550  $\text{cm}^{-1}$  a 900  $\text{cm}^{-1}$  w widmach próbki kontrolnej i w próbkach z różną ilością frakcji 2 ekstraktu z wyłoków aronii są uważane za odpowiadające drganiom zginającym NH oraz rozciągającym C-N i C-O (Bajic i in., 2019). Zaobserwowano pewne różnice w widmach FTIR chitozanowych osłonek bez dodatku i z dodatkiem ekstraktu w różnych stężeniach. Najbardziej znaczące zmiany są zauważalne w chitozanowej osłonce zawierającej



**Rysunek 34. Widma FTIR dla próbki kontrolnej i osłonek chitozanowych z różnym dodatkiem frakcji 2 ekstraktu z wyłoków aronii**

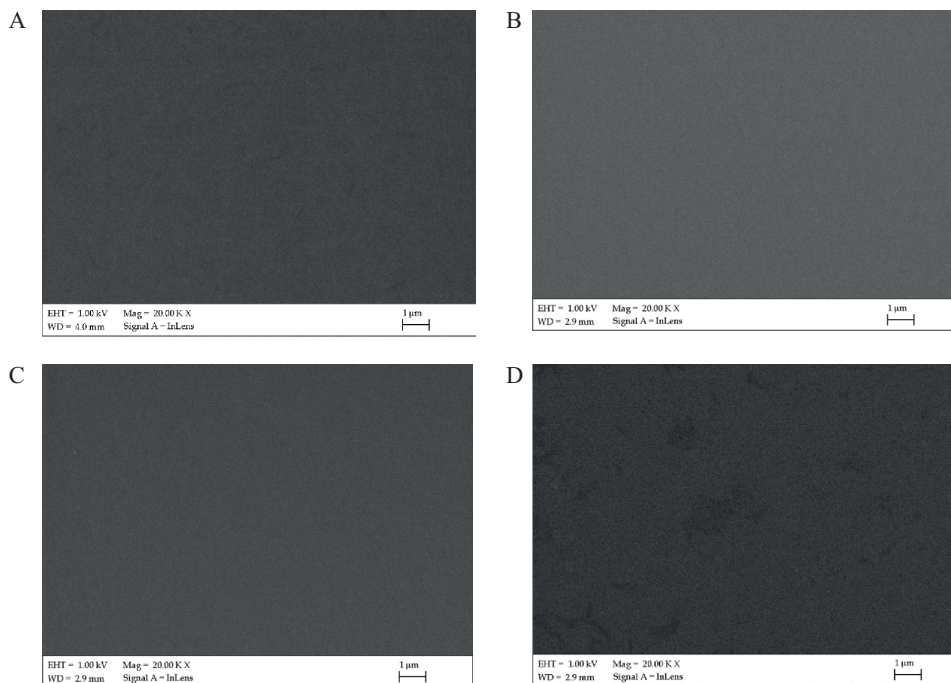
Źródło: Opracowanie własne.

najwyższe stężenie dodatku frakcji 2 ekstraktu z wycieków aronii (1,5%) (rysunek 34). Stwierdzono wzrost intensywności pasma absorpcji odpowiadającego drganiom rozciągającym O-H ( $3000\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ ) i pasma odpowiadającego rozciąganiu C = O ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ) i zginaniu N-H ( $1590\text{ cm}^{-1}$ ) w stosunku do widm próbki kontrolnej.

Omówione wyniki sugerują, że między grupami NH i OH cząsteczek chitozanu a grupami OH cząsteczek obecnych w ekstraktach z aronii występują wodorowe wiązania międzycząsteczkowe, co zaobserwowano również dla innych ekstraktów roślinnych w literaturze (Bajić i in., 2019; Bi i in., 2019).

### Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

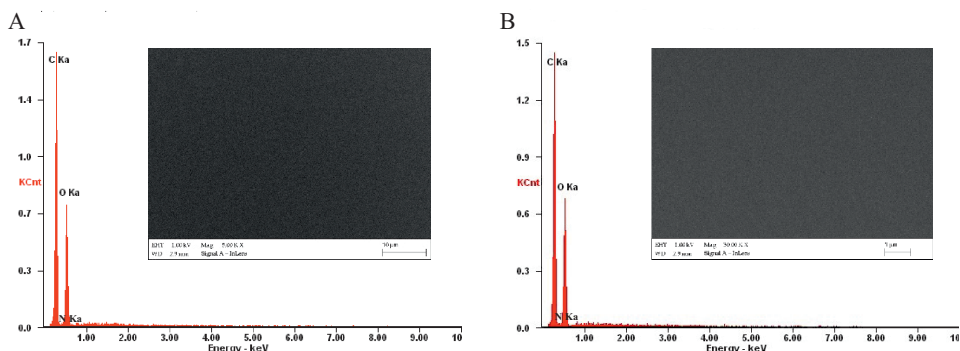
Wybrane wyniki badań SEM przedstawiono na rysunku 35. Powierzchnie chitozanowych osłonek są ciągłe i jednolite. Nie zarejestrowano żadnych zanieczyszczeń, osadów ani rozwarstwień. Dodatek 0,5%–1,5% frakcji 2 ekstraktu z wycieków aronii nie wpływa w widoczny sposób na morfologię powierzchni



**Rysunek 35. Obrazy SEM chitozanowych osłonek: (A) bez dodatku, (B) z 0,5-procentowym dodatkiem frakcji 2 ekstraktu z wycieków aronii, (C) z 1-procentowym dodatkiem frakcji 2 ekstraktu z wycieków aronii, (D) z 1,5-procentowym dodatkiem frakcji 2 ekstraktu z wycieków aronii**

Źródło: Opracowanie własne.

próbek. W widmie EDS dla chitozanowych osłonek zarejestrowano piki odpowiadające takim pierwiastkom, jak węgiel, tlen i azot. Potwierdza to czystość próbek. Na rysunku 36 przedstawiono przykład widm EDS dla chitozanowych osłonek bez dodatku i z 1,5-procentowym dodatkiem frakcji 2 ekstraktu z wytlóków aronii.



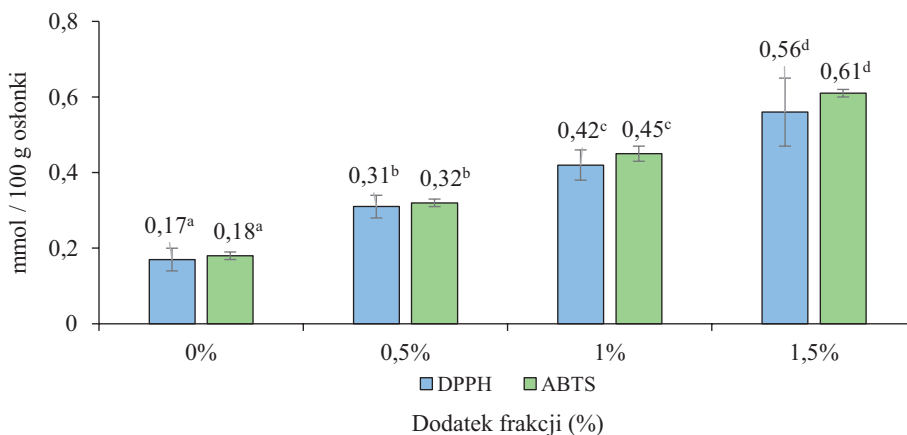
**Rysunek 36. Widma EDS chitozanowych osłonek: (A) bez dodatku, (B) z 1,5-procentowym dodatkiem frakcji 2 ekstraktu z wytlóków aronii**

Źródło: Opracowanie własne.

### **Analiza właściwości przeciwutleniających (DPPH, ABTS)**

Do pomiaru aktywności przeciwutleniającej chitozanowych osłonek zastosowano dwie metody – test z rodnikiem DPPH i test zdolności do dezaktywacji kationorodników ABTS. Testy te opierają się na pomiarze absorbancji roztworów rodnika, którego zanik barwy w obecności badanej próbki świadczy o neutralizacji rodników, czyli przeciwutleniającym działaniu badanej próby. Ocenę zdolności przeciwutleniającej chitozanowych osłonek przedstawiono na rysunku 37. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że badane osłonki wykazały działanie przeciwutleniające, ale ich aktywność była zróżnicowana.

Właściwości przeciwutleniające osłonki bez dodatku są powiązane z obecnością wolnej grupy aminowej (Yen i in., 2008). Analizując aktywność przeciwutleniającą pozostałych próbek, zauważono, że ze wzrostem ilości ekstraktu w próbce rosła aktywność badanej osłonki. Aktywność przeciwutleniająca osłonek mierzona testem DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup> była zbliżona. W teście z rodnikiem DPPH aktywność określono na poziomie 0,31, 0,42 i 0,56 mmol/100 g osłonki, z kolei dla testu z kationorodnikiem ABTS – 0,32, 0,45 i 0,61 mmol/100 g osłonki odpowiednio dla stężeń 0,5%, 1% i 1,5%. Badane próbki różniły się od siebie aktywnością przeciwutleniającą, a różnice te zawsze były statystycznie istotne.



**Rysunek 37. Porównanie zdolności antyoksydacyjnych chitozanowych osłonek w zależności od dodatku frakcji 2 ekstraktu z wytlóków aronii mierzonych testami DPPH i ABTS**

Źródło: Opracowanie własne.

Dostępne dane literaturowe dotyczące aktywności przeciwutleniającej chitozanowych osłonek są bardzo rozbieżne i trudne do porównania, co jest uwarunkowane różnicami wynikającymi z rodzaju zastosowanego materiału, metod analitycznych oraz sposobu prezentacji wyników. Dotychczasowe badania potwierdzają, że chitozanowe osłonki wykazują aktywność przeciwutleniającą, a ich wzbogacanie ekstraktami roślinnymi zwiększa właściwości przeciwutleniające.

W badaniach z wykorzystaniem rodnika DPPH przeprowadzonych przez Genskowsky'ego i in. (2015) stwierdzono, że dodatek zliofilizowanych owoców maqui w ilości 0,5% i 1% do chitozanowych osłonek wpływa na zwiększenie potencjału przeciwutleniającego badanych osłonek, który w zależności od stężenia dodatku wynosił odpowiednio 2,06 i 2,80 mg TE/g.

Wskazanie optymalnej ilości dodatku frakcji 2 ekstraktu z wytlóków aronii do technicznych koncepcji eksperymentalnych chitozanowych osłonek jadalnych jest złożonym procesem, w którym trzeba wziąć pod uwagę wiele czynników, takich jak rodzaj produktu, który ma zostać powleczony osłonką, formę aplikacji osłonki, zachodzące zmiany w jakości organoleptycznej, właściwości przeciwdrobnoustrojowe czy przewidywany okres przedłużenia trwałości produktu. Przeprowadzone badania stanowią punkt wyjścia do kolejnych badań dotyczących opracowania i oceny prototypów osłonek jadalnych do wybranych grup produktów żywnościowych.