

ŁUKASZ BYCZYŃSKI, ROBERT DULIŃSKI

## WPLYW DODATKU ALG DO PIECZYWA ŻYTNIEGO NA ZAWARTOŚĆ I BIODOSTĘPNOŚĆ *IN VITRO* WYBRANYCH MIKRO- I MAKROELEMENTÓW

### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Na potrzeby przemysłu paliwowego opracowano wydajne sposoby upraw mikroglonów w fotobioreaktorach lub w otwartych zbiornikach recyrkulacyjnych. Zmniejszenie światowego zapotrzebowania na paliwa powoduje, że wytwarzanie biopaliw trzeciej generacji staje się mniej opłacalne. Producenci alg poszukują dla nich alternatywnych zastosowań i wiążą duże nadzieje z przemysłem spożywczym. Biomasa z alg jest doskonałym źródłem składników żywności – jest bogata w łatwo przyswajalne i dobrze zbilansowane białko oraz charakteryzuje się wysoką zawartością makro- i mikroelementów występujących w łatwo przyswajalnych formach w postaci związków kompleksowych lub metaloorganicznych. W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki doświadczenia mającego na celu zbadanie wpływu dodatku do pieczywa żytniego mikroalg w różnych postaciach (*Arthrospira platensis* oraz *Ascophyllum nodosum* – suszona, granulowana i wędzona) na zawartość azotu, fosforu, żelaza oraz jodu. W celu zbadania biodostępności wymienionych pierwiastków, wyprodukowane pieczywo poddano symulowanemu procesowi trawienia w warunkach *in vitro*. Otrzymane dializaty oraz próbki pieczywa poddane mineralizacji wykorzystano do przeprowadzenia analiz zawartości wymienionych makro- i mikroelementów metodami spektrofotometrycznymi.

**Wyniki i wnioski.** Uzyskane wyniki wskazują na istotny statystycznie wpływ dodatku alg na wzrost poziomu omawianych pierwiastków. Największe różnice w zawartości analizowanych makro- i mikroelementów w stosunku do chleba bez dodatków otrzymano dla prób zawierających suszoną spirulinę (*Arthrospira platensis*) oraz *Ascophyllum nodosum* w postaci granulatu. Wprowadzone do żytniego pieczywa mikroalgi zapewniły również wzrost biodostępności żelaza oraz jodu.

**Słowa kluczowe:** mikroelementy, makroelementy, pieczywo, biodostępność

### Wprowadzenie

W ciągu ostatnich dwóch dekad wzrosło zainteresowanie stosowaniem alg w technologii żywności. Wynika to w głównej mierze z opracowania wydajnych spo-

---

Dr Ł. Byczyński, ORCID: 0000-0001-8221-7120, dr hab. prof. URK. R. Duliński ORCID: 0000-0002-0370-2556, Katedra Biotechnologii i Ogólnej Technologii Żywności, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149, Kraków; Kontakt: byczyński.lukasz@urk.edu.pl

sobów upraw mikroglonów w fotobioreaktorach lub otwartych zbiornikach recyrkulacyjnych na potrzeby przemysłu paliwowego. Wraz ze spadkiem cen ropy otrzymywanie biopaliw trzeciej generacji staje się mniej opłacalne, dlatego producenci biomasy algowej poszukują dla nich alternatywnych zastosowań. Biomasa algowa jest doskonałym źródłem składników żywności – jest bogata w łatwo przyswajalne i dobrze zbilansowane białko, posiada korzystny profil kwasów tłuszczowych, obfituje w polisacharydy pobudzające perystaltykę jelit. Ponadto charakteryzuje się wysoką zawartością mikro- i makroelementów (cynk, jod, brom, żelazo, miedź, fosfor, magnez) występujących w łatwo przyswajalnych formach w postaci związków kompleksowych lub metaloorganicznych [7, 18]. Warto jednak tutaj zaznaczyć, że w obrębie tego samego gatunku alg ich skład chemiczny nie jest stały i zależy od czynników warunkujących wzrost, takich jak: temperatura, pH, oświetlenie, zawartość minerałów w pożywce, stężenie dwutlenku węgla [2].

Opracowanie nowych produktów spożywczych opartych na algach lub otrzymanych z nich komponentach stanowi interesujące, lecz trudne w realizacji wyzwanie, jednak już teraz można wykorzystać algi jako dodatek do żywności. Wzbogacanie żywności, czyli fortyfikacja, polega na dodawaniu składników odżywczych do produktu, bez względu na to, czy były one tam obecne naturalnie, czy też nie. Takie wzbogacanie może mieć na celu korygowanie (fortyfikacja wyrównawcza) oraz zapobieganie niedoborom składników występujących w danej populacji (fortyfikacja polepszająca) [16, 17]. Wyniki badań żywieniowych przeprowadzonych w różnych krajach wykazały, że podaż niektórych mikroelementów (np. Fe i I) jest niewystarczająca i w niektórych populacjach nie spełnia zaleceń [23]. Za osoby zagrożone niedoborami uważa się kobiety w okresie ciąży, ludzi na restrykcyjnych dietach oraz dzieci i osoby starsze.

Pieczycwo obfituje głównie w przyswajalne węglowodany oraz błonnik pokarmowy, natomiast aminokwasy zawarte w pieczywie, chociaż charakteryzują się wysoką przyswajalnością, to jednak ich profil nie jest korzystny z uwagi na małą ilość aminokwasów egzogennych. Ponadto podczas wypieku ilość aminokwasów ulega zmniejszeniu – powstają produkty reakcji Maillard'a podczas łączenia się amin z cukrami. Z tego względu podejmowane są działania mające na celu wzbogacenie produktu finalnego w białka zwierzęce i tym samym aminokwasy ograniczające, głównie za sprawą dodatku mleka i jego przetworów na etapie wyrabiania ciasta [12]. Niektóre algi, szczególnie niebiesko-zielona cyjanobakteria – spirulina (*Arthrospira sp.*), charakteryzują się korzystnym profilem, z wysoką ilością aminokwasów egzogennych oraz dużą procentową zawartością samego białka [15]. Stąd fortyfikacja pieczywa algami wydaje się być korzystna, zwłaszcza w obliczu wzrastającej popularności żywności wegańskiej oraz typu fit.

Pieczycwo jest istotnym źródłem związków mineralnych ze względu nie tylko na skład, ale również dostępność i powszechność konsumpcji. Większą zawartością pier-

wiastków charakteryzują się pieczywa ciemne lub razowe, a to dlatego, że składniki mineralne występują głównie w okrywie nasion zbóż. Stąd też mąki o wysokim prze-miale i wysokooczyszczone cechuje mniejsza zawartość składników mineralnych [24]. Mimo wysokiej zawartości związków mineralnych w mąkach nisko oczyszczonych ich dostępność jest ograniczona ze względu na dużą zawartość składników antyodżywczych, głównie fitynianów oraz różnych frakcji błonnika. Dopiero na etapie fermentacji ciasta możliwe jest zwiększenie biodostępności tych składników pieczywa. Z uwagi na obecność zakwasu podczas fermentacji ciasto zyskuje korzystne cechy reologiczne, a dzięki wzrostowi kwasowości i wypieraniu tlenu – zmniejsza się ilość niekorzystnych mikroorganizmów gnilnych. Zwłaszcza fermentacja mąki żytniej zapewnia wzrost poziomu witamin (głównie niacyny i ryboflawiny) oraz aminokwasów egzogennych (lizyny, metioniny i tryptofanu). Ponadto fermentacja mlekowa przyczynia się do zmniejszenia zawartości składników antyżywniowych – głównie fitynianów, które tworzą kompleksy z makro- i mikroelementami [6].

Algi zyskują popularność w przemyśle spożywczym, głównie jako niekonwencjonalne źródło białka oraz substraty do otrzymywania naturalnych barwników (chlorofile, fikocyjaniny,  $\beta$ -karoten, astaksantyna) [22]. Jednak biomasa alg obfituje również w fosfor, a algi morskie bogate są w jod i żelazo. Udowodniono już, że glony stanowią wartościowy dodatek do pasz, który odpowiada za zwiększenie związków odżywczych w jajach, mleku czy mięsie [5]. Również ryby karmione algami wykazywały szybszy wzrost i wyższą zawartość wartościowych składników odżywczych oraz białka w ich mięsie [3]. Podejmowano także próby wprowadzania glonów do pieczywa, makaronu czy ciastek, jednak nie zbadano kompleksowo przyswajalności makro- i mikroelementów z takich produktów [1, 20].

Celem niniejszej pracy było określenie i porównanie zawartości wybranych mikro- i makroelementów w pieczywie żytnim wzbogaconym w algi w różnych postaciach (suszone, granulowane lub w postaci proszku) oraz ocena ich biodostępności w modelu symulującym układ pokarmowy człowieka.

## **Material i metody badań**

### *Material do badań*

Biomasę makroalgi morskiej (*Ascophyllum nodosum*) zakupiono w Seaweed & Co Ltd. (Wielka Brytania), a mikroalgi (*Spirulina platensis*) w Ecoduna GmbH, (Szal-lasweg 2, 2460 Bruck/Leitha, Austria). Natomiast sól algowa (AlgySalt<sup>®</sup>) pochodziła z firmy Setalg we Francji. Sól ta zawiera około 10-krotnie mniej sodu niż sól kuchenna, a pozyskuje się ją z ekstraktów morskich wodorostów różnych gatunków. Producent deklaruje, że może ona odtwarzać właściwości organoleptyczne i technologiczne chlorku sodu bez metalicznych posmaków oraz umożliwia zastąpienie soli w proporcji

1:1 w szerokiej gamie produktów, od mięsnych i owoców morza do dań gotowych, zup, sosów i przekąsek.

#### Przygotowanie ciasta

Pieczywo żytnie przygotowano w tradycyjnej piekarni „Prawdziwy Chleb” (P.P.H.U. Agnieszka Gajda-Sokołowska, 95-081 Dłutów, Stoczki-Porąbki 4). Surowcami do produkcji ciasta były: zakwas żytni, mąka żytnia typu 500 pochodząca z lokalnego młyna zbożowego (Jerzy Łaskiewicz i Synowie sp.j.), sól oraz woda. Surowce algowe wprowadzono w ilościach przedstawionych w tabeli 1, na etapie mieszenia ciasta. Z ręcznie wymieszanego ciasta formowano kęsy o masie około 1 kg, które umieszczano w metalowych formach i komorze fermentacyjnej o temperaturze 35,5 °C i stałej wilgotności. Po 180 minutach ciasta przenoszono do tradycyjnego pieca opalanego drewnem, rozgrzanego do temperatury 200 – 250 °C, gdzie pozostawały przez 30

Tabela 1. Zawartość preparatów algowych we wzbogaconym pieczywie żytnim (g/1000 g ciasta)

Table 1. The content of algae preparations in enriched rye bread (g/1000 g dough)

Próby – Pieczywo Samples - Breads	Dodatek do chleba / Additive to bread (g/1000 g)					
	Wędzona morska alga Smoked marine algae ( <i>Ascophyllum nodosum</i> ) <sup>2</sup>	Suszona morska alga Dried marine algae ( <i>Ascophyllum nodosum</i> ) <sup>2</sup>	Granulowana morska alga Granulated marine algae ( <i>Ascophyllum nodosum</i> ) <sup>3</sup>	Suszona spirulina Dried spir- ulina ( <i>Arthospira platensis</i> )	Sól algowa Algae salt	Sól Salt NaCl
Pieczywo 1 Bread 1	0,0	0,0	0,0	0,0	18,0	0,0
Pieczywo 2 Bread 2	5,0	5,0	0,0	50,0	10,0	0,0
Pieczywo 3 Bread 3	10,0	0,0	0,0	50,0	9,0	0,0
Pieczywo 4 Bread 4	0,0	10,0	20,0	50,0	0,0	10,0
Pieczywo 5 Bread 5	25,0	10,0	10,0	40,0	0,0	0,0
Pieczywo 6 Bread 6	0,0	15,0	10,0	10,0	0,0	10,0
Pieczywo 7 <sup>1</sup> Bread 7 <sup>1</sup>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,0

Objaśnienia / Explanatory notes:

<sup>1</sup> 7 to próba kontrolna - bez dodatku biomasy algowej / Bread 7 is the control sample, without algae biomass addition,

<sup>2</sup> alga sproszkowana (drobiny 0,1 mm) / powdered algae (particles 0.1 mm), <sup>3</sup> granulata (0,4 mm) / granulate (0.4 mm).

minut. Upieczone chleby w ciągu 24 godzin dostarczano do laboratorium, gdzie po wysuszeniu do stałej masy (w suszarce z termoobieganiem, temp. 50 °C) zmineralizowano oraz poddawano trawieniu *in vitro*.

#### *Oznaczanie zawartości suchej masy*

Zawartość suchej masy w badanych próbkach wyznaczano z użyciem wagosuszarki laboratoryjnej RadWag WPS 110S. Pieczywo 24 godziny po wypieku, w postaci oddzielonego od skórki miększu, naważono w ilości około 3 gramów i umieszczano na szalce urządzenia. Pomiarów dokonywano przy następujących parametrach: temperatura 120 °C, czas 5-7 minut, próbkowanie 15 s. Każdą próbę badano czterokrotnie. Obliczając procentową zawartość suchej masy, korzystano z wzoru: s.m. (%) = (aktualna masa próbki/ początkowa masa próbki) · 100 %.

#### *Przygotowanie mineralizatów*

W celu oznaczenia w próbkach zawartości fosforu, azotu oraz jodu, poddano je mineralizacji w aparacie Hach Digesdahl Digestion Apparatus (Hach Comp., USA), gdzie podczas reakcji kwasu siarkowego z perhydrolem powstaje kwas peroksymonosiarkowy (kwas caro)  $H_2SO_5$ , który jest silnym utleniaczem materiału węglowego.

Naważki pieczywa (około 0,5 g) przenoszono do kolbek mineralizacyjnych, zalewano 4 ml stężonego kwasu siarkowego i umieszczano w zestawie do spalania. Temperaturę płyty grzewczej ustawiano na 280 °C i włączano pompkę wodną. Próbkę zwęglano w kwasie przez 4 minuty, a następnie poprzez chłodnicę i lejek kapilarny stopniowo wprowadzano 15 cm<sup>3</sup> 30-procentowego roztworu nadtlenu wodoru. Mineralizację w tych warunkach kontynuowano do momentu aż płyn stawał się klarowny i przestawał wrzeć. Po schłodzeniu dodano 20 cm<sup>3</sup> 5 M roztworu wodorotlenku sodu, ilościowo przeniesiono do zlewki i wyregulowano pH do wartości 3,0. Całość przeniesiono do kolbki miarowej i dopełniono do 100 cm<sup>3</sup> wodą dejonizowaną. Tak przygotowany mineralizat przechowywano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, a następnie w 4 °C do momentu analizy. Każdą próbkę wykonano w trzech powtórzeniach.

#### *Oznaczanie zawartości fosforu*

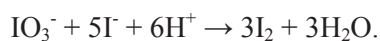
Zawartość fosforu w dializacie i próbkach zmineralizowanych oznaczano w reakcji jonów ortofosforanowych (V) zawartych w badanym materiale z 1 cm<sup>3</sup> molibdenianu (VI) amonu w kwaśnym środowisku. W wyniku tej reakcji powstaje sól, którą po 5 minutach zredukowano do błękitu molibdenowego przez dodatek 1 cm<sup>3</sup> metolu. Po 15 minutach do próbek wprowadzano 3 cm<sup>3</sup> wody i odczytywano absorbancję przy długości fali 660 nm (SPEKOL 1500, AnalytikJena AG, Niemcy). Zawartość fosforu obliczono z krzywej wzorcowej sporządzonej z wykorzystaniem roztworu  $KH_2PO_4$  (cz.d.a., POCH, Polska).

*Oznaczanie zawartości azotu*

Zawartość azotu w próbkach pieczywa oznaczono metodą z odczynnikiem Nesslerera. Po mineralizacji azot organiczny występuje w postaci jonu amonowego. Do 2 cm<sup>3</sup> próbki (odpowiednio rozcieńczonej) dodawano 1 cm<sup>3</sup> 1-procentowej gumy arabskiej oraz 1 cm<sup>3</sup> odczynnika Nesslerera. Wówczas jony amonowe reagowały z jodkiem potasu oraz jodkiem rtęci (II) pochodzącym z odczynnika i tworzyły trudno rozpuszczalny związek, który przy niewielkich stężeniach pozostaje w trwałym rozproszeniu dzięki gumie arabskiej. Absorbancję przy 430 nm odczytywano po upływie 10 minut od dodania odczynnika. Zawartość azotu obliczono z wykorzystaniem krzywej wzorcowej opracowanej z użyciem roztworu NH<sub>4</sub>Cl (cz.d.a., POCH, Gliwice).

*Oznaczenie zawartości jodu*

Zawartość jodu całkowitego oznaczano metodą jodoskrobiową, w której jod tworzy niebieski związek adsorpcyjny ze skrobią. Do kolbek miarowych o pojemności 25 cm<sup>3</sup> pobierano 10 – 20 cm<sup>3</sup> klarownego, bezbarwnego i obojętnego roztworu badanego, a następnie zakwaszono 1 cm<sup>3</sup> 1M roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i dodawano 0,1 cm<sup>3</sup> wody bromowej w celu utlenienia jonów jodkowych do jodanowych. Nadmiar bromu usunięto przez związanie z fenolem (0,1 cm<sup>3</sup> fenolu w 10-procentowym roztworze lodowatego kwasu octowego). Następnie dodawano 1 cm<sup>3</sup> świeżo przygotowanego 0,5-procentowego roztworu KJ – otrzymane jodany w środowisku kwaśnym, po dodaniu jonów jodkowych były przekształcane w jod cząsteczkowy zgodnie z reakcją:



Na koniec wprowadzano 1 cm<sup>3</sup> 1-procentowej skrobi rozpuszczalnej w 50-procentowej glicerynie. Kolbki miarowe uzupełniano wodą dejonizowaną do 25 cm<sup>3</sup>, mieszano i pozostawiano na 30 minut. Po tym czasie dokonano pomiarów spektrofotometrycznych przy 590 nm wobec wody dejonizowanej. Zawartość jodu obliczono z pomocą krzywej wzorcowej sporządzonej z wykorzystaniem roztworu KI (cz.d.a., POCH, Polska).

*Oznaczanie zawartości żelaza*

Zawartość żelaza oznaczono metodą z 1,10-fenantroliną. Do kolbki o pojemności 50 cm<sup>3</sup> wprowadzono 10 cm<sup>3</sup> próbki zawierającej maksimum 100 µg żelaza, w celu redukcji żelaza Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> aplikowano 2 cm<sup>3</sup> 10 procentowego roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy oraz 5 cm<sup>3</sup> 10- procentowego roztworu cytrynianu sodu. Następnie do próbek dodano 5 cm<sup>3</sup> 0,25 procentowego roztworu 1,10-fenantroliny w 0,1 M roztworze HCl. Zawartość kolbek uzupełniono wodą dejonizowaną do 50 cm<sup>3</sup> i dokładnie wymieszano. Intensywność powstałego pomarańczowego zabarwienia jest proporcjonalna do zawartości żelaza. Próbki inkubowano przez 10 minut, a następnie

zmierzono absorbancję roztworu przy długości fali równej  $\lambda = 512$  nm. Zawartość żelaza w badanych próbkach obliczono z pomocą krzywej wzorcowej sporządzonej z wykorzystaniem roztworu  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (cz.d.a., Chempur, Polska).

#### *Metoda in vitro – model układu pokarmowego*

Dla oznaczenia biodostępności mikro- i makroelementów badane pieczywo poddano symulacji trawienia przy zastosowaniu modelu *in vitro* opisanego w pracy Starzyńskiej-Janiszewskiej i wsp. [21].

Do strzykawk z obcięzonymi końcami naważono 0,5 g zhomogenizowanego materiału, dodawano 1 cm<sup>3</sup> wody redestylowanej i zamieszano (stosunek 1:2 – jak w jamie ustnej). Następnie próbki zakwaszono do pH 2, dodając 0,5 M roztworu HCl oraz 0,2 cm<sup>3</sup> roztworu pepsyny 6 mg/cm<sup>3</sup> (P6887, Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) i wodę redestylowaną w ilości zapewniającej objętość równą 2 cm<sup>3</sup> (stosunek 1:4 – jak w żołądku). Po wymieszaniu składników strzykawki zaklejano parafilmem i umieszczano w łaźni wodnej (Lauda Ecoline E200) o temperaturze 37 °C na 2 godziny. Po tym czasie wprowadzono 1 M roztwór NaHCO<sub>3</sub> w ilości zapewniającej pH 7 oraz 0,5 cm<sup>3</sup> roztworu pankreatyny (9 mg/cm<sup>3</sup>, (P-7545, Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy; 8×, United States Pharmacopeia) i wodę redestylowaną do objętości równej 2 cm<sup>3</sup> (stosunek 1:8 – jelito). Zawartość strzykawk wymieszano, przeniesiono do woreczków dializacyjnych (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy; 25 mm × 90 mm, MWCO 12000), zamknięto klipsami i umieszczano w plastikowych kolbach stożkowych zawierających 50 cm<sup>3</sup> buforu imidazolowego o pH 7. Kolby umieszczono w łaźni wodnej z wytrząsaniem (GFL 1092, 40 obrotów/minutę) i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 2 godziny. Otrzymany dializat posłużył do dalszych analiz.

W niniejszej pracy „biodostępność *in vitro*” zdefiniowano jako stosunek zawartości pierwiastków w dializacie do całkowitej ich zawartości w materiale wyjściowym wyrażony w % (g/g).

#### *Analiza statystyczna*

Dane eksperymentalne były poddawane jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) w celu wykrycia istotnych różnic między średnimi wyrażonych jako średnia ± odchylenie standardowe (SD). Różnice między wartościami średnimi zostały zweryfikowane przez test NIR przy  $p \leq 0.05$  za pomocą oprogramowania Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia, USA).

### **Wyniki i dyskusja**

Analizy mineralizatów próbek chlebów pozwoliły wykazać statystycznie istotny wpływ wzbogacenia algami na poziom wszystkich badanych pierwiastków. We wszystkich typach pieczywa, do których wprowadzono glony, obserwowano wzrost ilości azotu w stosunku do próby kontrolnej (1130 mg/100 g), jednak w pieczywie 6,

był on niewielki (1174 mg) i nieistotny statystycznie. Do tego pieczywa wprowadzono najmniejszą ilość suszonej spiruliny (10 g/kg ciasta). W przypadku pozostałych prób, gdzie wprowadzono od 40 do 50 g spiruliny – ilość azotu wzrastała o 18 do 36 % w stosunku do próby kontrolnej. Pieczywo 4, o najwyższej ilości azotu zawierało oprócz spiruliny, największą ilość granulowanej algi *Ascophyllum nodosum*. Natomiast pieczywo 1 – z dodatkiem soli algowej, charakteryzowało się najniższą zawartością azotu i nie różniło się istotnie do próby kontrolnej (pieczywo 7). Ilość azotu odzwierciedla poziom białka w pieczywie. Stosując przelicznik o wartości 5,83, charakterystyczny dla wszystkich typów mąki żytniej [9], można oszacować poziom białka w badanym pieczywie. Otrzymane wartości oscylują w zakresie od 6,35 do 8,98 g białka na 100 g chleba. Dla próby kontrolnej (7) poziom białka jest zbliżony do pieczywa żytniego pełnoziarnistego (6,8 g/100 g), przedstawionego w pracy Kawki [13]. Najwyższą zawartość białka stwierdzono natomiast w przypadku prób od 2 do 5, gdzie wprowadzono najwięcej mikroalg. Podobne zależności zaobserwowali Burcu i wsp. [4], którzy do pieczywa wprowadzili 10-procentowy dodatek spiruliny oraz Batista i wsp. [1], którzy suplementowali mikroalgami pszenne ciasteczka.

Podobne zależności, jak w przypadku azotu, zaobserwowano dla fosforu, gdzie najniższy poziom tego pierwiastka oznaczono również w pieczywie 1 oraz 6 i wartości te nie odbiegały istotnie od próbki kontrolnej (pieczywo 7). Tak, jak w przypadku azotu, najwyższą ilość fosforu zaobserwowano w przypadku pieczywa 4 (wzrost o 49 %), w dalszej kolejności znalazły się próby 3, 2 i 5. Według Przygody i wsp. [19] w pieczywie jasnym, żytnim fosfor występuje w ilości 68 mg/100 g, co jest wartością zbliżoną do badanego pieczywa kontrolnego (próba 7).

Można tym samym stwierdzić, że w przypadku azotu i fosforu najistotniejszy okazał się dodatek suszonej spiruliny (*Arthrospira platensis*) i granulowanej algi morskiej, natomiast wpływ wędzonej i suszonej *Ascophyllum nodosum* był istotnie mniejszy. Z kolei sól algowa nie miała żadnego wpływu na ilość azotu i fosforu w badanym pieczywie.

Nieco inaczej wyglądają wyniki poziomu żelaza w badanym pieczywie. Dodatek soli algowej w ilości 18 g/kg ciasta (próba 1) prawie dwukrotnie zwiększył poziom tego pierwiastka w pieczywie. Natomiast wprowadzenie do pieczywa suszonej spiruliny (*Arthrospira platensis*) skutkowało dwukrotnym zwiększeniem ilości żelaza w przypadku próby 6 oraz 4 ÷ 4,5 krotnym zwiększeniem w chlebach od 2 do 5. Najwyższą ilość żelaza odnotowano w pieczywie 4, które zawierało również dodatek granulowanej i suszonej algi *Ascophyllum nodosum*, jednak różnice między pieczywem 2, 3 i 4 nie były istotne statystycznie. Istotnie mniej żelaza niż w tych próbach zaobserwowano w chlebie 5, zawierającym 25 g/kg wędzonej algi morskiej oraz o 10 g/kg mniej spiruliny. Podobne zakresy zawartości żelaza (od 1,34 do 2,6 mg/100 g) w swoich badaniach otrzymali Grembecka i wsp. [10]. Natomiast w badaniach Burcu i wsp.



[4] dla pieczywa z 10-procentowym dodatkiem spiruliny zawartość żelaza wzrastała ponad czterokrotnie w stosunku do próby kontrolnej do poziomu 4,1 mg żelaza w 100 g produktu.

Z kolei zmierzony w badanych próbach poziom jodu wskazuje, że największą jego zawartością charakteryzowało się pieczywo 3 – było to o ponad 10 µg więcej, niż w pieczywie kontrolnym numer 7. Próby 2, 4, 5, i 6 również charakteryzowały się istotnie wyższą (o 5 ÷ 6 µg/100 g) zawartością jodu w stosunku do próby kontrolnej. Zawartość jodu w pieczywie 1 z dodatkiem soli algowej (59,72 µg/100 g) nie różniła się istotnie od wartości próby bez dodatków (60,27 µg/100 g), zawierającej jedynie chlorek sodu. Pieczywo bez dodatku soli (próba 5) a z wysoką zawartością wędzonej algi morskiej *Ascophyllum nodosum* wykazywało wyższą o około o 5 µg zawartość jodu niż pieczywo 1 oraz 7. Można stąd wnioskować, że tego typu dodatek można wykorzystać w zastępstwie soli jodowanej.

Tabela 2. Zawartość wybranych makro- i mikroelementów w pieczywie żytnim wzbogaconym w algi  
Table 2. Contents of selected micro- and macroelements in rye bread enriched with algae

Nazwa próby Name of sample	N g/100 g	P mg/100 g	Fe mg/100 g	I ug/100 g
Pieczywo 1 Bread 1	1,088 <sup>a</sup> ± 0,027	52,21 <sup>a</sup> ± 4,59	1,46 <sup>b</sup> ± 0,25	59,72 <sup>a</sup> ± 1,66
Pieczywo 2 Bread 2	1,372 <sup>cd</sup> ± 0,035	72,28 <sup>bc</sup> ± 4,48	3,63 <sup>d</sup> ± 0,23	66,63 <sup>b</sup> ± 1,10
Pieczywo 3 Bread 3	1,415 <sup>d</sup> ± 0,035	78,75 <sup>cd</sup> ± 5,30	3,57 <sup>d</sup> ± 0,18	70,43 <sup>c</sup> ± 1,16
Pieczywo 4 Bread 4	1,538 <sup>e</sup> ± 0,031	83,59 <sup>d</sup> ± 3,77	3,72 <sup>d</sup> ± 0,23	64,99 <sup>b</sup> ± 1,57
Pieczywo 5 Bread 5	1,332 <sup>c</sup> ± 0,036	69,18 <sup>b</sup> ± 5,97	3,07 <sup>c</sup> ± 0,19	65,31 <sup>b</sup> ± 1,59
Pieczywo 6 Bread 6	1,174 <sup>b</sup> ± 0,045	57,65 <sup>a</sup> ± 5,44	1,77 <sup>b</sup> ± 0,14	65,61 <sup>b</sup> ± 1,12
Pieczywo 7 Bread 7	1,130 <sup>ab</sup> ± 0,036	56,27 <sup>a</sup> ± 5,78	0,79 <sup>a</sup> ± 0,17	60,27 <sup>a</sup> ± 1,44

Objaśnienia / Explanatory notes:

Charakterystyka próbek zgodnie z tab. 1. / Profile of samples according to Tab. 1.

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviations; n = 3; a, b, c, d – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy p ≤ 0,05 / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly at p ≤ 0.05.

Zawartość badanych mikro- i makroelementów zbadano również w dializatach otrzymanych po symulacji trawienia pieczywa w warunkach *in vitro*. Otrzymane war-

tości posłużyły do obliczenia biodostępności tych pierwiastków, a wyniki zaprezentowano w tabeli 3. Biodostępność azotu w próbach 1, 2, 5 oscylowała wokół 50 % i była zbliżona do próby kontrolnej (52 %). Pieczywo 3 i 4, cechowało się niższą biodostępnością azotu 45 ÷ 46 %. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem zawartości azotu i spiruliny w chlebie spadała jego biodostępność (próby 3 i 4), natomiast pieczywo 6 z najniższym dodatkiem spiruliny (10 g) oraz dużą (15 g) dawką suszonej algi *Asco-phyllum nodosum*, charakteryzowało się najwyższą względną zawartością azotu w dializacie (prawie 61 %).

Biodostępność fosforu, najwyższa okazała się być dla próbki kontrolnej (81%) oraz pieczywa 2 (82 %). Pozostałe próby nie różniły się istotnie i otrzymane wartości oscylowały w zakresie od 55 do 63 %.

Tabela 3. Biodostępność *in vitro* wybranych makro- i mikroelementów w pieczywie żytnim wzbogaconym w algi

Table 3. *In vitro* bioavailability of selected micro- and macroelements in rye bread enriched with algae

Nazwa próby Name of sample	Biodostępność [%] / Bioavailability [%]			
	N	P	Fe	I
Pieczywo 1 Bread 1	50,04 <sup>abc</sup> ± 3,23	61,12 <sup>a</sup> ± 4,92	29,71 <sup>c</sup> ± 3,36	45,60 <sup>a</sup> ± 1,98
Pieczywo 2 Bread 2	50,75 <sup>bc</sup> ± 2,72	82,66 <sup>b</sup> ± 3,17	31,49 <sup>c</sup> ± 4,00	60,47 <sup>b</sup> ± 1,50
Pieczywo 3 Bread 3	46,12 <sup>ab</sup> ± 1,94	62,68 <sup>a</sup> ± 4,41	20,18 <sup>ab</sup> ± 2,82	59,52 <sup>b</sup> ± 2,31
Pieczywo 4 Bread 4	45,43 <sup>a</sup> ± 1,93	55,15 <sup>a</sup> ± 6,29	29,62 <sup>c</sup> ± 4,74	61,00 <sup>b</sup> ± 2,27
Pieczywo 5 Bread 5	50,25 <sup>abc</sup> ± 3,54	57,01 <sup>a</sup> ± 7,66	40,83 <sup>d</sup> ± 5,12	68,44 <sup>c</sup> ± 2,60
Pieczywo 6 Bread 6	60,91 <sup>d</sup> ± 3,31	54,46 <sup>a</sup> ± 6,31	24,48 <sup>bc</sup> ± 4,39	75,23 <sup>d</sup> ± 1,63
Pieczywo 7 Bread 7	52,22 <sup>c</sup> ± 2,15	80,55 <sup>b</sup> ± 6,63	16,67 <sup>a</sup> ± 5,12	62,64 <sup>b</sup> ± 2,08

Objaśnienia / Explanatory notes:

Charakterystyka próbek zgodnie z tab. 1. / Profile of samples according to Tab. 1.

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviations; n = 3; a, b, c, d – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p \leq 0,05$  / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ .

Wszystkie wprowadzone do pieczywa dodatki zwiększały biodostępność żelaza. Najmniej z 17 % do 20 ÷ 25 % (odpowiednio próby 3 i 6), a najwięcej – do 30 ÷ 40 % (próby 1, 2, 4 i 5). Najgorsze rezultaty uzyskano w przypadku pieczywa 3 (20 %),

a najlepsze w próbie 5 (prawie 41 %), która zawierała najwięcej dodatków algowych (75 g/kg ciasta). Frontela i wsp., [8] wykazali w swoich badaniach, że w przypadku chleba pełnoziarnistego biodostępność żelaza wynosi 26 %. Z kolei Burcu i wsp. [4] wykazali wzrost biodostępności żelaza do 47,24 % w pieczywie wzbogaconym w spirulinę.

Biodostępność jodu była zróżnicowana – najniższą wartością (46 %) cechowało się pieczywo 1 z dodatkiem soli algowej. Biodostępność w okolicach 60 ÷ 62 % charakteryzowała pieczywo kontrolne oraz próby 2, 3 i 4. Najwyższą biodostępność jodu odnotowano w przypadku pieczywa 5 i 6 (odpowiednio 68 i 75 %).

Otrzymane wyniki wskazują, że dodatek mikroalg wpłynął korzystnie na zawartość oraz biodostępność badanych pierwiastków. Najwyraźniej uwidaczniało się to w próbach, w których ilość wprowadzonych glonów była najwyższa.

### Wnioski

1. Badane pieczywo z dodatkiem alg charakteryzowało się zwiększoną zawartością azotu, fosforu, żelaza i jodu, zwłaszcza w próbach z dodatkiem wyższych dawek biomasy alg, czyli 50 g *Arthrospira platensis* oraz 10 ÷ 25 g *Ascophyllum nodosum* na kilogram ciasta.
2. Biodostępność badanych pierwiastków okazała się zróżnicowana. W próbach o wysokiej zawartości azotu jego biodostępność spadała o 5 ÷ 6 %, a przy niższej zawartości wzrastała o około 8 %. Biodostępność fosforu okazała się niższa od próby kontrolnej z wyjątkiem pieczywa 2. Biodostępność żelaza wzrastała we wszystkich próbach. Natomiast w przypadku jodu, jego biodostępność z soli algowej okazała się niższa niż z pieczywa kontrolnego, a w pieczywie 5 i 6 wyższa.
3. Modyfikacja oryginalnej receptury na tradycyjne pieczywo umożliwiła otrzymanie nowego funkcjonalnego produktu piekarniczego.

### Podziękowania

*Autorzy dziękują Pani Agnieszce Gajdzie-Sokołowskiej oraz Panu Hubertowi Sokołowskiemu prowadzącym piekarnię „Prawdziwy chleb” za przygotowanie partii eksperymentalnego pieczywa. Autorzy dziękują również Panu Adrianowi Karbowskiemu za dostarczone preparaty algowe.*

*Projekt finansowany z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach dotacji na działalność statutową.*

### Literatura

- [1] Batista A. P., Nicolai A., Fradinho P., Fragoso S., Bursic I., Rodolfi L., Biondi N., Tredici M. R., Sousa I., Raymundo A.: Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physi-

- cal and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Res.*, 2017, 26, 161-171.
- [2] Becker W.: *Microalgae in Human and Animal Nutrition*. W: Richmond A.(red.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Wiley-Blackwell U.K., 2013, pp 312-351.
- [3] Bin Dohaish E., Al Dhahri, M., Omar, H.: Potential application of the blue-green alga (*Spirulina platensis*) as a supplement in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2018, 16(6), 7883-7902.
- [4] Burcu A., Ezgi A., Oya I., Gülsün Ö., Ebru K., Miray E., Leyla U.: Nutritional and physicochemical characteristics of bread enriched with microalgae *Spirulina platensis*. *Int. J. Eng. Res. Appl.*, 2016, 6, (12), 30-38.
- [5] Chojnacka K., Saeid, A., Michalak I.: Możliwości zastosowania biomasy alg w rolnictwie. *Chemik*, 2012, 66 (11), 1235-1248.
- [6] Diowksza A.: Pozycja pieczywa w diecie. *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, 2012, 10, 16-17.
- [7] Fleurence J.: Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential use. *Trends Food Sci. Tech.*, 1999, 10, 25-28.
- [8] Frontela C., Ros G., Martínez C.: Phytic acid content and “in vitro” iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing. *J. Cereal Sci.*, 2011, 54, 173-179.
- [9] Greenfield H., Southgate D.A.T.: *Food composition data: production, management and use*. 2nd ed. FAO, Food & Agriculture Org of UN., USA, 2003.
- [10] Grembecka M., Kusiuk A., Szefer P.: Zawartość magnezu, fosforu, cynku i żelaza w różnych gatunkach pieczywa. *Bromat. Chem. Toksykol.* – XL, 2007, 4, 319 – 323
- [10] Hemalatha S., Platel K., Srinivasan K.: Influence of heat processing on the bioaccessibility of zinc and iron from cereals and pulses consumed in India. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2007, 21, 1-7.
- [11] Jędrzejczyk H., Hoffmann M.: Substancje polepszające jakość pieczywa. Część II. Polepszacze naturalne w produkcji pieczywa. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*. 2006, 16 (1), 58-62.
- [12] Kawka A.: Możliwości wzbogacania wartości odżywczej, dietetycznej i funkcjonalnej pieczywa. W: *Żywność wzbogacana i nutraceutyki – pod red. P. Gębczyńskiego i G. Jaworskiej*. PTTŻ, Oddz. Małopolski, Kraków 2009, ss. 109-122.
- [13] Kawka A.: Współczesne trendy w produkcji piekarskiej – wykorzystanie owsa i jęczmienia jako zbóż niechlebowych, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 3 (70), 25 –43.
- [14] Kim S.K., Kang, K.H.: Medicinal effects of peptides from marine microalgae. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2011, 64, 313-323.
- [15] Kolanowski W.: Wzbogacanie żywności. W: *Żywność wygodna i funkcjonalna pod red. F. Świderskiego*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2019, 229-245.
- [16] Kozłowska-Strawska J., Badora A., Chwil S.: Żywność funkcjonalna i tradycyjna – właściwości i wpływ na postawy konsumentów. *Probl Hig. Epidemiol.*, 2017, 98 (3), 212-216.
- [17] Lamer-Zarawska E.: Rośliny w kosmetyce w kosmetologii przeciwstarzeniowej. *Post. Kosm.*, 2012, 1, 33.
- [18] Przygoda B., Kunachowicz H., Nadolna I, Iwanow K.: Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2019.
- [19] Şahin O.I.: Functional and sensorial properties of cookies enriched with spirulina and dunaliella biomass. *J Food Sci. Technol.*, 2012, 57, 3639–3646 (2020).
- [20] Starzyńska-Janiszewska A., Stodolak B., Duliński R., Bączkiewicz M., Mickowska B., Wikiera A., Byczyński Ł.: Effect of solid-state fermentation tempe type on antioxidant and nutritional parameters of buckwheat groats as compared with hydrothermal processing. *J. Food Process. Preserv.*, 2016, 40 (2), 298-305.
- [21] Stolarzewicz I., Kapturowska A., Białecka-Florjańczyk E.: Mikrobiologiczne źródła barwników w technologii żywności. *Post. Mikrobiol.* 2012, 51( 3), 167-176.

- [22] Suliburska J., Krejpcio Z., Kołaczyk N.: Evaluation of the content and the potential bioavailability of iron from fortified with iron and non-fortified food products. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.* 2011, 10 (2), 239-243.
- [23] Ziemiański S.: *Normy żywienia człowieka. Fizjologiczne podstawy.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001.

#### THE EFFECT OF THE ADDITION OF ALGAE TO RYE BREAD ON THE CONTENT AND *IN VITRO* AVAILABILITY OF SELECTED MICRO- AND MACROELEMENTS

##### Summary

**Background.** Efficient methods of cultivating microalgae have been developed for the fuel industry in photobioreactors or open recirculation tanks. Reduced world fuel demand makes the production of third-generation biofuels less profitable. Algae producers are looking for alternative applications for them and have high hopes for the food industry. Algae biomass is an excellent source of food ingredients – it is rich in easily digestible and well-balanced protein and is characterized by a high content of macro- and microelements occurring in easily digestible forms as complex or organometallic compounds. The presented study shows the results of an experiment aimed at examining the effect of adding microalgae in various forms (*Arthrospira platensis* and *Ascophyllum nodosum* - dried, granulated and smoked) to rye bread on the nitrogen, phosphorus, iron and iodine content. In order to test the bioavailability of these elements, the produced bread was subjected to a simulated *in vitro* digestion process. The dialysates and mineralized bread samples obtained were used to analyze the content of the above-mentioned macro- and microelements using spectrophotometric methods.

**Results and conclusion.** The results obtained indicate a statistically significant effect of the addition of algae on an increase in the level of the elements discussed. The largest differences in the content of the analyzed macro- and microelements compared to the bread without additives were observed for the samples containing dried spirulina (*Arthrospira platensis*) and *Ascophyllum nodosum* in the form of granules. The microalgae introduced into the rye bread also increased the bioavailability of iron and iodine.

**Key words:** algae, microelements, macroelements, bread, bioavailability ☒