

EWELINA SIDOR, KAROLINA TRYBULEC, MONIKA TOMCZYK,
MAŁGORZATA DŻUGAN

SPIRULINA (*ARTHROSPIRA PLATENSIS*) JAKO SKŁADNIK NAPOJÓW FUNKCJONALNYCH

Streszczenie

Wprowadzenie: Spirulina jest zaliczana do kategorii tzw. super foods, których właściwości mają wpływać korzystnie na organizm człowieka i znalazła zastosowanie jako naturalny składnik barwiący żywność. Celem pracy była ocena właściwości przeciwutleniających i osmotycznych napojów przygotowanych na bazie różnych form spiruliny dostępnych w handlu i wody kokosowej jako naturalnego izotonicznego rozpuszczalnika. W oparciu o wyznaczone widma absorpcyjne i właściwości przeciwutleniające ekstraktów spiruliny (3 partie zielonej i 2 niebieskiej) wyselekcjonowano próbki o najwyższej aktywności do kolejnego etapu badań. Napoje wytworzono na bazie wody kokosowej (próba kontrolna) i spiruliny zielonej lub niebieskiej z rosnącym udziałem dodatku 0,1; 0,25 i 0,5 % w/v (łącznie 7 napojów). Porównano zawartość polifenoli, właściwości przeciwutleniające (DPPH) i osmotyczne wytworzonych napojów.

Wyniki i wnioski. Wykazano, że napoje na bazie niebieskiej spiruliny charakteryzują się wyższą, proporcjonalną do zastosowanego udziału dodatku, zawartością białka, polifenoli i aktywnością antyoksydacyjną niż napoje z zieloną spiruliną. Osmolalność wszystkich napojów zawierała się w granicach od 315 do 336 mOsm/kg H₂O, co odpowiada wymaganiom stawianym napojom izotonicznym. Napoje na bazie niebieskiej spiruliny charakteryzowały się intensywną niebieską barwą i lepszymi cechami organoleptycznymi w porównaniu do zielonej spiruliny i wody kokosowej, jednak dodatek 0,5 % niekorzystnie wpłynął na walory organoleptyczne napoju. Wytworzone napoje mogą być zaliczone do napojów funkcjonalnych, dobrze nawadniających organizm, a dodatkowo wzbogaconych w cenne składniki odżywcze.

Słowa kluczowe: *Arthrospira platensis*, spirulina, fikocyjanina, napój izotoniczny, aktywność antyoksydacyjna

Wprowadzenie

Spirulina to handlowa nazwa niebiesko-zielonych mikroalg występujących naturalnie w tropikalnych i subtropikalnych jeziorach, w których woda odznacza się wyso-

Dr inż. E. Sidor, ORCID: 0000-0002-3954-4940, mgr inż. K. Trybulec, dr inż. M. Tomczyk, ORCID: 0000-0002-4010-4352, prof. dr hab. M. Dżugan, ORCID: 0000-0003-1601-6296, Zakład Chemii i Toksykologii Żywności, Instytut Technologii Żywności i Żywnienia, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Cwiklińskiej 1a, 35-601 Rzeszów; Kontakt: ewelina.sidor.dokt@gmail.com

kimi wartościami pH oraz niezwykle dużą zawartością soli, zwłaszcza węglanów i wodorowęglanów [14]. Na skalę przemysłową spirulinę pozyskuje się z alg uprawianych w ciepłych wodach wielu krajów na całym świecie, a do największych producentów należą Stany Zjednoczone, Chiny, Tajlandia oraz Tajwan i Indie. Nazwa spiruliny pochodzi od spiralnych włókien o rozmiarach $50 \div 500 \mu\text{m}$ długości i $3 \div 4 \mu\text{m}$ szerokości [12, 13], które można obserwować w mikroskopie świetlnym [5]. Systematycznie spirulina obejmuje dwa gatunki: *Arthrospira platensis* i *Arthrospira maxima*, które stosowane są w technologii żywności do produkcji suplementów diety lub jako dodatki paszowe. Na rynku dostępna jest również *Arthrospira pacifica* – pozyskiwana wyłącznie na Hawajach.

Spirulina jest cyjanobakterią, która wykazuje właściwości antyoksydacyjne zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*, wynikające z jej bogatego składu chemicznego, w którym dominuje dobrze przyswajalne białko ($60 \div 70\%$), chlorofil, nienasycone kwasy tłuszczowe (kwas gamma-linolenowy – GLA), przeciwutleniacze, witaminy i minerały. Korzystne składniki zawarte w spirulinie są łatwo przyswajalne przez organizm, ponieważ ściany komórkowe alg nie zawierają celulozy i łatwo podlegają trawieniu w przewodzie pokarmowym człowieka [15].

Kompozycja związków bioaktywnych występujących w spirulinie wykazuje wysoki potencjał antyoksydacyjny, potwierdzony zarówno w prostych testach kolorymetrycznych, jak i w bardziej zaawansowanych badaniach na liniach komórkowych [8, 11, 13]. Wykazano, że ekstrakty niebiesko-zielonej mikroalgi, mają silniejsze właściwości przeciwutleniające niż witamina E, karoten czy też kwas galusowy, mogą hamować apoptyczną śmierć komórek fibroblastów myszy wywołaną przez wolne rodniki [23]. Szczególnie wysoki potencjał antyoksydacyjny przypisuje się fikocyjaninie (niebieski pigment spiruliny), z uwagi na jej udowodnione właściwości przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe oraz zdolność do „zmiatania” wolnych rodników i hamowania peroksydacji lipidów [15, 23].

Zielona spirulina występuje najczęściej w postaci suplementów diety w postaci proszku, tabletek, kapsułek lub w postaci płynnej, m.in. ekstraktów, olejków czy napojów. W sprzedaży można spotkać różne formy zielonej spiruliny: proszek, tabletki, kapsułki otrzymywane na bazie wysuszonych na słońcu alg oraz płynny wyciąg w ampułkach, tłoczony na zimno ze świeżych alg. W zależności od miejsca pozyskania, technologii produkcji i przerobu jej skład chemiczny, właściwości prozdrowotne, barwa i smak mogą się znacznie od siebie różnić [11]. Wysoką jakość suplementów diety na bazie spiruliny określa w dużej mierze intensywność ich barwy. Jeżeli tabletki bądź kapsułki są wyraźnie ciemnozielone, zawierają mniej dodatków wiążących, takich jak np. krzemionka, lecytyna sojowa lub stearynian magnezu [2]. Z kolei niebieska spirulina to suchy ekstrakt pozyskiwany z niebiesko-zielonych mikroalg, wzbogacony o skondensowaną fikocyjaninę – niebieski barwnik występujący w kompleksie

białkowym wchodzącym w skład fikobiliprotein (20 ÷ 28% suchej masy spiruliny). Pigment jest rozpuszczalny w wodzie oraz wrażliwy na wysoką temperaturę i zmiany pH, co ogranicza jego zastosowanie do barwienia produktów spożywczych.

Potencjał funkcjonalny spiruliny i jej wykorzystanie w produkcji żywności wynika ze stale odkrywanych prozdrowotnych korzyści z jej stosowania [16], stąd wydaje się być dobrym składnikiem do produkcji żywności funkcjonalnej. Rynek tej żywności w ciągu ostatnich lat stale wzrasta, a jednym z głównych asortymentów są napoje funkcjonalne. Są to produkty, które wpływają na poprawę kondycji organizmu i przynoszą określone korzyści fizjologiczne. Algi, do których należy spirulina, są jednym z najlepszych źródeł składników funkcjonalnych [3, 17], a na polskim rynku rośnie zainteresowanie spiruliną jako wszechstronnym dodatkiem do różnego rodzaju koktajli czy napojów typu smoothie. Dodatek spiruliny do koktajlu pozwala na pełne pokrycie dziennego zapotrzebowania na witaminę B12 [6]. Wciąż jednak nie ma danych dotyczących strat witamin oraz składników mineralnych w okresie przydatności do spożycia, dlatego też w tym zakresie niezbędne są dalsze badania [6].

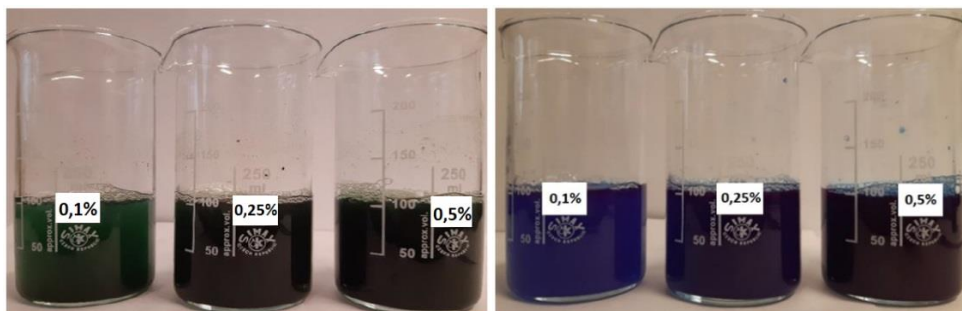
Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania zielonej i niebieskiej spiruliny w produkcji napojów i ocena ich potencjału antyoksydacyjnego i właściwości izotonicznych.

Material i metody

Material badany

Material badany stanowiły sproszkowane produkty handlowe zielonej spiruliny (*Spirulina platensis*) trzech różnych dystrybutorów (Targroch Filipowice, Fit-Shop Polska, BioPlanet, Polska) oraz dwie partie niebieskiej spiruliny producentów: The Organic Lab Nordic (Szwecja) oraz Ko-Ro Handels (Niemcy) (według etykiety ekstrakty ze *Spirulina platensis*). Partie spiruliny zakupiono w sprzedaży internetowej. Ekstrakty przygotowano poprzez zawieszenie 50 mg materiału w 5 cm³ rozpuszczalnika (woda, 96-procentowy etanol), ekstrakcję prowadzono w łaźni wodnej ultradźwiękowej (40 kHz, 800 W; Polsonic Sonic-10, Polska) przez 45 minut (temperatura w łaźni nie przekraczała 30 °C). Następnie próbki wirowano przez 5 min w wirówce laboratoryjnej przy 10 000 rpm (MPW-351R, Med. Instruments, Warszawa, Polska). Oddzielone supernatanty rozcieńczono do badań dwukrotnie odpowiednim rozpuszczalnikiem. Woda kokosowa Vita 100 % stosowana jako baza napoju została zakupiona na lokalnym rynku (dystrybutor ALLCOR S.C., Sokołów Podlaski). Według etykiety skład obejmował wodę z młodego kokosa,; wartość energetyczna produktu to 22 kcal/100 cm³, tłuszcz 0 g, węglowodany 5,5 g (w tym cukry 5,2 g), białko 0 g, sól 0,05 g, witamina C 4 mg w 100 cm³.

Wytworzono napoje funkcjonalne na bazie wody kokosowej z dodatkiem sproszkowanej zielonej (Z 2) oraz niebieskiej (N 2) spiruliny, o najwyższej aktywności antyoksydacyjnej, w 2 powtórzeniach (łącznie 7 napojów). Do odważonej porcji algi (0,1; 0,25 i 0,5 g) dodano po 100 cm³ wody kokosowej, całość wymieszano, uzyskując w ten sposób barwne roztwory 0,1; 0,25 i 0,5 % w/v (Fot. 1).



Fot. 1. Napoje z dodatkiem zielonej spiruliny (po lewej) i niebieskiej (po prawej)
Photo. 1. Drinks with the addition of green (left) and blue (right) spirulina

Metody badań

Pomiar widma absorbcyjności

Do pomiaru widma wykorzystano czytnik mikroplamki Epoch 2 (BioTek, USA). Odpipetowano 250 µl analizowanych ekstraktów wodnych i etanolowych spiruliny zielonej i niebieskiej do dołków płytki 96-dołkowej, następnie dokonano pomiaru absorbcyjności w zakresie długości fal $\lambda = 240 \div 800$ nm. Wyniki przedstawiono w formie widma ($A = f(\lambda)$).

Oznaczenie zawartości białka metodą Bradforda

Oznaczenie zawartości białka przeprowadzono, wykorzystując komercyjny zestaw Quick Start™ Bradford Protein Assay firmy BioRad zgodnie z instrukcją producenta. Do 5 µl badanej próbki (wodny ekstrakt z alg lub napój) dodano 250 µl odczynnika Bradforda. Po dokładnym wymieszaniu i 5 min inkubacji bez dostępu światła dokonano pomiaru absorbcyjności próbek względem próby zerowej (H₂O dest.) przy długości fali 595 nm za pomocą czytnika mikroplamki Epoch 2 firmy „BioTek” (USA). Wyniki przeliczono na zawartość białka w spirulinie w g/100 g w oparciu o krzywą wzorcową $y = 0,145 \cdot x$ wykonaną dla albuminy wołowej w zakresie stężeń 100 ÷ 1000 µg/ml.

*Oznaczanie właściwości przeciwutleniających metodą DPPH**

Do 20 μl badanej próbki dodano 180 μl odczynnika DPPH*. Próbę kontrolną stanowiła mieszanina 20 μl H₂O destylowanej i 180 μl odczynnika. Po 30 min inkubacji bez dostępu światła zmierzono absorbancję wszystkich próbek za pomocą czytnika mikroplitek przy długości fali 517 nm względem próby kontrolnej. Obliczono aktywność przeciwutleniającą na podstawie wzoru $AA = [(AB-AA)/AB] \times 100 \%$, gdzie: AA – absorbancja badanej próby; AB – absorbancja próby kontrolnej.

Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą FRAP

Odpipetowano 20 μl badanej próbki oraz 180 μl odczynnika FRAP. Próbę zerową przygotowano mieszając 20 μl H₂O destylowanej z 180 μl odczynnika FRAP. Próbki inkubowano w temperaturze 37 °C przez 10 minut. Absorbancję próbek mierzono przy długości fali 593 nm względem próby zerowej. Wyniki podawano w przeliczeniu na równoważniki troloksu $\mu\text{mol TE/g}$ spiruliny lub $\mu\text{mol TE/ml}$ napoju, obliczono na podstawie krzywej wzorcowej dla troloksu ($y = 0,152 \cdot x$; $R^2 = 0,9990$) przygotowanej w zakresie stężeń 25 ÷ 300 nmol/mL.

Oznaczenie całkowitej zawartości związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu

Oznaczenie TPC wykonano mieszając 20 μl próbki z 100 μl odczynnika Folina oraz 80 μl 7,5 % Na₂CO₃. Do próby zerowej użyto 20 μl H₂O destylowanej. Po 60 min inkubacji w ciemnym miejscu zmierzono absorbancję próbek przy długości fali 760 nm względem próby zerowej. Wyniki wyrażone jako równoważniki kwasu galusowego obliczono na podstawie krzywej wzorcowej dla kwasu galusowego ($y = 0,336 \cdot x$; $R^2 = 0,9970$) przygotowanej w zakresie stężeń 25 ÷ 150 $\mu\text{g/ml}$.

Oznaczenie osmolalności napojów

Do pomiaru osmolalności wytworzonych napojów wykorzystano krioskop Cryostar II LC (Funke Gerber, Berlin, Niemcy). Badanie osmolalności wykonano dla 100 μl próbki każdego napoju oraz wody kokosowej będącej bazą napojów. Wynik podano w jednostkach mOsm/kg H₂O.

Ocena organoleptyczna wytworzonych napojów

Przeprowadzono subiektywną ocenę smakowo-zapachową, oceniając barwę, smak i zapach wytworzonych napojów na bazie wody kokosowej oraz niebieskiej i zielonej spiruliny.

Obliczenia statystyczne

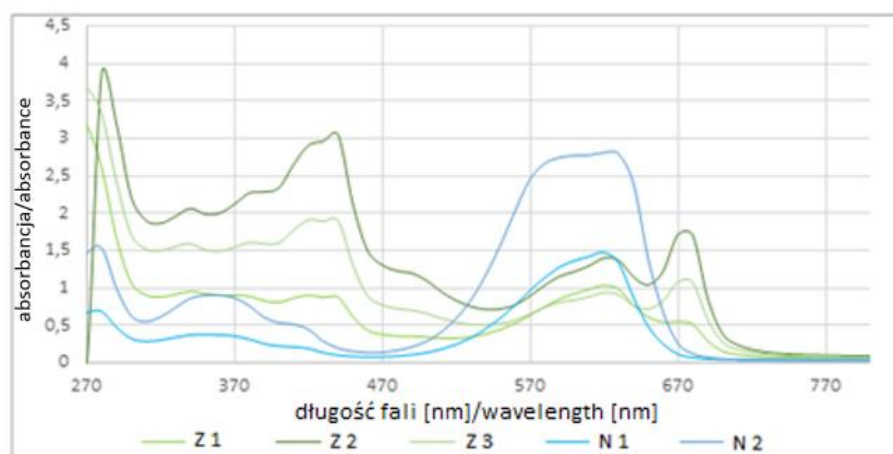
Dla uzyskanych wyników obliczono wartości średnie, odchylenie standardowe oraz korelację r-Pearsona. Zależność pomiędzy analizowanymi parametrami badano

wyznaczając współczynnik korelacji Pearsona. Różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi próbkami wyznaczono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z zastosowaniem testu Tukeya. Wszystkie obliczenia wykonano w programie Statistica 13.3.

Wyniki i dyskusja

Wybór spiruliny o najwyższej zawartości składników bioaktywnych

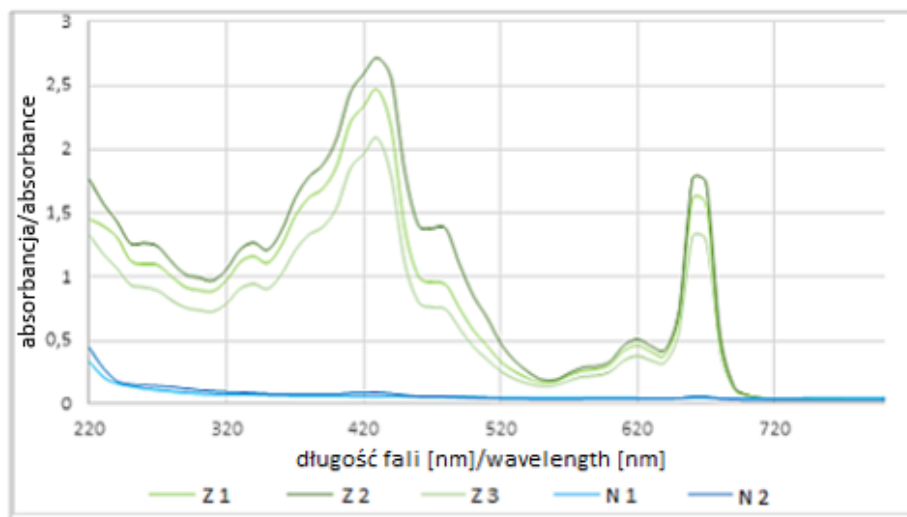
W celu porównania profilu naturalnych barwników w ekstraktach badanych próbek mikroalg (przygotowane w identycznych warunkach) dokonano pomiarów widm absorbancji UV/VIS w zakresie 240 ÷ 800 nm dla ekstraktów wodnych (Fig. 1) i etanolowych (Fig. 2).



Rys. 1. Pomiar widma ekstraktów wodnych zielonej (Z) i niebieskiej (N) spiruliny
Fig. 1. Spectrum measurement of water extracts of green (Z) and blue (N) spirulina

Ekstrakty wodne badanych próbek spiruliny zielonej (Z) wykazywały analogiczny przebieg widma (Fig. 1), z trzema pikami (maximami absorbancji) przy długości fali 440 nm (pik 1), szeroki pik w zakresie 570 ÷ 650 nm (pik 2) i 680 nm (pik 3). Wysokość pików była mocno zróżnicowana pomiędzy badanymi próbkami ($Z2 > Z3 > Z1$). Z kolei pik 2 dominował w widmie spiruliny niebieskiej, przy czym wysokość pików była istotnie większa dla spiruliny N2 niż N1. W oparciu o dane literaturowe, piki występujące w widmach wodnych ekstraktów spiruliny można zidentyfikować jako chlorofile (pik 1 i 3) oraz fikocyjaniny (pik 2) [10, 19, 20]. Potwierdzeniem poprawności identyfikacji są widma absorbcyjne dla ekstraktów etanolowych, które dla spiruliny zielonej wykazują wyłącznie piki charakterystyczne dla chlorofili (pik 1 i 3), natomiast nie zawierają pików pochodzących od białka fikocyjaniny (Fig.

2). W ekstraktach etanолоwych spiruliny niebieskiej nie stwierdzono obecności absorbujących barwników (brak ekstrakcji wywołany denaturacją białka).



Rys. 2. Pomiar widma ekstraktów etanолоwych zielonej (Z) i niebieskiej (N) spiruliny

Fig. 2. Spectrum measurement of ethanol extracts of green (Z) and blue (N) spirulina

Chlorofile są najbardziej rozpowszechnionymi barwnikami w przyrodzie, występują głównie jako chlorofil a i chlorofil b u wszystkich roślin przeprowadzających fotosyntezę, a maksimum absorpcji wynosi 430 i 662 nm dla chlorofilu a oraz 453 i 642 nm dla chlorofilu b [10, 19]. Wykazano nieznaczne różnice podczas analizy widm absorpcji chlorofilu ekstrahowanego różnymi rozpuszczalnikami. Największe różnice wykazywały widma pomiędzy eterem dietylowym (660 nm) a czystym metanolem (665,2 nm) dla chlorofilu a oraz odpowiednio 641,8 i 652,4 nm dla chlorofilu b [4]. Z kolei fikocyjanina wykazuje maksimum absorpcji w przedziale 620 ÷ 650 nm [20]. Inni autorzy analizowali wpływ zastosowania różnych rozpuszczalników na zmianę widma ekstraktów spiruliny biorąc także pod uwagę oznaczane typy barwników [22]. Do ekstrakcji barwników chlorofilowych oraz karotenoidowych autorzy wykorzystali aparat Soxhleta, natomiast do izolacji fikocyjaniny – technikę ekstrakcji na zimno (macerację). Zawartość barwników chlorofilowych w spirulinie odnotowano przy długości fali 652 ÷ 655 nm, dla karotenoidowych przy 450 nm, a dla fikocyjaniny przy 615 ÷ 625 nm.

Analizowano potencjał antyoksydacyjny mierzony jako zdolność do zmiatania rodnika DPPH[•] dla wodnych ekstraktów spiruliny (tabela 1). Największą zdolnością do wygaszania wolnych rodników DPPH[•] spośród partii zielonej spiruliny charakteryzo-

wała się próbka Z 2, zaś najmniejszą – Z 1. W przypadku spiruliny niebieskiej większymi wartościami odznaczała się spirulina N 2, a wszystkie przedstawione wyniki dla zielonej i niebieskiej spiruliny różniły się między sobą istotnie statystycznie ($p < 0,05$).

Tabela 1. Analiza potencjału antyoksydacyjnego (DPPH^{*}, FRAP), całkowitej zawartości związków polifenolowych (TPC) oraz białka w ekstraktach wodnych próbek zielonej i niebieskiej spiruliny

Table 1. Analysis of antioxidant potential (DPPH, FRAP), total polyphenolic compounds (TPC) and protein content in water extracts of green and blue spirulina samples

Oznaczenie próbki Sample designation	FRAP [μ M TE/g]	DPPH [*] [% inhibicji/ inhibition]	TPC [mg GAE/g]	Białko / Protein [g/100 g]
Z1	41,60 ^b \pm 0,20	28,41 ^b \pm 0,37	11,49 ^b \pm 0,22	60,34 ^c \pm 1,12
Z2	51,43 ^d \pm 0,33	35,67 ^d \pm 0,42	16,92 ^d \pm 0,60	57,42 ^b \pm 0,95
Z3	46,51 ^c \pm 0,87	32,95 ^c \pm 0,79	16,36 ^c \pm 0,63	66,81 ^d \pm 0,88
N1	19,14 ^a \pm 0,35	22,98 ^a \pm 0,32	9,29 ^a \pm 0,06	37,81 ^a \pm 0,15
N2	54,41 ^e \pm 0,52	37,50 ^e \pm 0,48	22,81 ^e \pm 0,17	37,04 ^a \pm 0,32

Objaśnienia / Explanatory notes:

a, b, c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy $p < 0,05$ / a, b, c – values marked with different letters differ statistically significantly at $p < 0,05$

W literaturze dostępne są informacje odnośnie do analizy zdolności ekstraktów alkoholowych (w 96 % et. OH) spiruliny do redukcji rodnika DPPH^{*} [25]. Takyar i wsp. [25] wykazali, że zdolność przeciwutleniająca oznaczona metodą DPPH^{*} jest zależna od dawki niebiesko-zielonej mikroalgi. W przypadku dawki 0,2 mg/cm³ zdolność zmiatania rodnika DPPH^{*} wynosiła 40,46 %, dla 0,4 mg/ml i 0,6 mg/ml odpowiadała wartościom 62,46 % oraz 77,12 %. Z kolei Castro i wsp. [7] oceniali aktywność przeciwutleniającą metodą DPPH w wodnych i metanolowych ekstraktach spiruliny poddanej i niepoddanej fermentacji, którą przeprowadzono w celu zwiększenia wartości nutraceutycznej spiruliny. Wartość wskaźnika DPPH^{*} dla niefermentowanego ekstraktu wodnego oraz metanolowego wynosiła około 11 mg AAE/g, a zdolność do zmiatania rodnika DPPH^{*} niefermentowanych roztworów wodnych i alkoholowych była porównywalna. Aktywność przeciwutleniającą różnych ekstraktów z alg badali Agregán i wsp. [1]. Stwierdzili, że makroalgi (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) wykazały wyższą aktywność przeciwutleniającą niż mikroalgi (w tym *Spirulina platensis*) we wszystkich testach, co tłumaczyli występowaniem w makroalgach florotanin, bogatych w związki wykazujące wysoką aktywność przeciwutleniającą.

Podobnie jak w przypadku testu DPPH^{*}, spośród ekstraktów spiruliny zielonej, największy potencjał redukujący jony żelaza (III) mierzony metodą FRAP stwierdzono

dla próbki Z 2. W przypadku analizy próbek spiruliny niebieskiej największy potencjał (54,41 $\mu\text{mol TE/g}$) wykazywała spirulina N 2. Takyar i wsp. [25] badając aktywność przeciwutleniającą *Arthrospira platensis*, dokonali pomiaru siły redukującej ekstraktów etanolowych (96 %) spiruliny w stosunku do jonów żelaza (III) za pomocą odczynnika FRAP. Podobnie jak w przypadku metody DPPH^{*}, wyższe stężenie mikroalg odpowiadało wyższej wartości w teście FRAP.

Oprócz aktywności przeciwutleniającej mierzonej bezpośrednio, w przygotowanych ekstraktach analizowano całkowitą zawartość związków polifenolowych. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych oznaczeń najwyższą wartością TPC w przypadku zielonej spiruliny odznaczała się próbka Z 2, natomiast w przypadku niebieskiej – N 2, ponadto wyniki były statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy próbkami zielonymi i niebieskimi, jak również w obrębie jednej odmiany. Biorąc pod uwagę kolor mikroalg, wyższe wartości TPC uzyskano dla spiruliny niebieskiej oznaczonej jako N 2, w porównaniu do pozostałych próbek. Na podstawie wyznaczonych współczynników korelacji stwierdzono, że ekstrakty spiruliny, które wykazywały silne działanie przeciwutleniające, zawierały dużą ilość związków polifenolowych ($r = 0,976$ oraz $r = 0,891$). Uśredniając wyniki TPC dla próbek zielonej oraz niebieskiej spiruliny, ale także biorąc pod uwagę rodzaj ekstrahenta można stwierdzić, że uzyskane wyniki są do siebie zbliżone, co może być związane ze zróżnicowaniem zawartości związków polifenolowych pomiędzy próbkami tego samego rodzaju. Castro i wsp. [7] poddali spirulinę fermentacji i wykazali, że wspomniany proces poprawia profil nutraceutyczny spiruliny. Wartości TPC w trakcie fermentacji wzrosły o 111,73 % w ciągu pierwszych 36 godzin w wyniku uwolnienia związków fenolowych, po bakteryjnej hydrolizie enzymatycznej ścian komórkowych spiruliny, a nieznaczny spadek TPC po początkowym okresie fermentacji, może być spowodowany degradacją termiczną niestabilnych substancji fenolowych.

Wyznaczone poziomy białka rozpuszczalnego były zgodne z zawartością białka deklarowaną przez producenta na etykiecie. Zaobserwowano istotnie niższą zawartość białka w próbkach spiruliny niebieskiej, w porównaniu do zielonej.

Analiza wytworzonych napojów funkcjonalnych

Do przygotowania napojów wykorzystano wodę kokosową, naturalny napój izotoniczny, charakteryzujący się niezbyt atrakcyjnym smakiem i podwyższoną mętnością. Jego połączenie z wyselekcjonowanymi próbkami spiruliny (Z2 i N2) ze względu na najlepsze właściwości antyoksydacyjne, miało na celu poprawę cech organoleptycznych i wzmocnienie właściwości antyoksydacyjnych. W tabeli 2 przedstawiono wyniki aktywności antyoksydacyjnej otrzymanych napojów oznaczonej testem FRAP, całkowitej zawartości związków polifenolowych oraz białka w zależności od wysokości zastosowanego dodatku mikroalgi.

Tabela 2. Analiza potencjału antyoksydacyjnego (DPPH, FRAP), całkowitej zawartości związków polifenolowych (TPC) oraz białka w napojach funkcjonalnych na bazie wody kokosowej oraz zielonej i niebieskiej spiruliny

Table 2. Analysis of antioxidant potential (DPPH, FRAP), total polyphenolic compounds (TPC) and protein content in functional drinks based on coconut water and green and blue spirulina

Rodzaj napoju Type of drink	Ilość dodatku spiruliny Spirulina addition amount	FRAP [$\mu\text{M TE}/\text{cm}^3$]	TPC [mg GAE/ cm^3]	Białko/ Protein [g/ cm^3]
Woda kokosowa (kontrola) Coconut water (control)	-	0,0398	0,336	0,006
Z 2	0,1%	4,04 ^b ± 0,19	2,19 ^b ± 0,04	0,121
	0,25%	6,73 ^a ± 0,10	3,85 ^c ± 0,16	0,148
	0,5%	8,88 ^c ± 0,16	5,20 ^a ± 0,05	0,291
N 2	0,1%	6,47 ^a ± 0,11	5,17 ^a ± 0,04	0,043
	0,25%	12,21 ^d ± 0,14	8,23 ^d ± 0,09	0,098
	0,5%	19,13 ^c ± 0,12	11,65 ^e ± 0,04	0,191

Objaśnienia: / Explanatory notes:

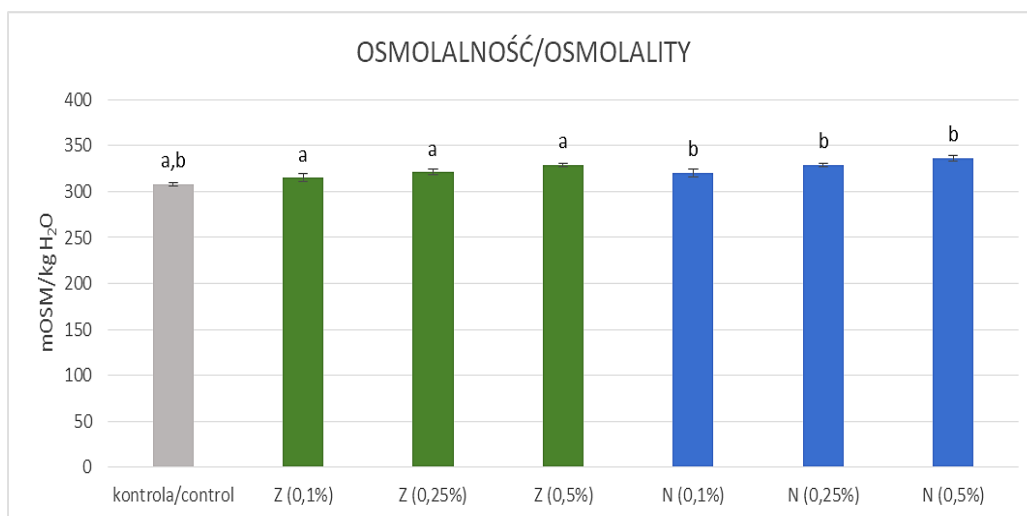
a, b, c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy $p < 0,05$ / a, b, c – values marked with different letters differ statistically significantly at $p < 0.05$

Aktywność przeciwutleniająca badanych napojów wrosła proporcjonalnie do rosnącego dodatku spiruliny. Wykazano, że dodatek niebieskiej spiruliny w większym stopniu wzbogaca napój w związki o działaniu antyoksydacyjnym, co nie było tak mocno widoczne podczas analizy ekstraktów spiruliny. Przy stężeniu spiruliny 0,1 % różnice pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą napoju z dodatkiem zielonej i niebieskiej spiruliny są porównywalne, ale zwiększanie dodatku do 0,25 oraz 0,5 % powoduje znacznie większy przyrost siły redukującej dla napoju z dodatkiem niebieskiej spiruliny w porównaniu do zielonej. Podobne obserwacje poczynili De Oliveira i wsp. [9], którzy oznaczali aktywność antyoksydacyjną testem FRAP dla napojów funkcjonalnych na bazie mleka czekoladowego z mikrokapsułkowaną zieloną spiruliną. Autorzy zaobserwowali, że zwiększanie udziału dodatku z 5 % do 8,75 % nie powodowało wzrostu wskaźnika FRAP (odpowiednio 177,28 oraz 150,82 $\mu\text{mol TE/g}$).

W otrzymanych napojach oznaczono całkowitą zawartość związków polifenolowych (tabela 2). Największą zawartością (11,65 mg GAE/g) związków polifenolowych wykazywał napój z 0,5-procentowym dodatkiem niebieskiej spiruliny, natomiast najmniejszą zawartość związków fenolowych (3,19 mg GAE/g) – napój z 0,1-procentowym dodatkiem zielonej spiruliny. W przypadku 0,5-procentowego stężenia zawartość związków polifenolowych w napoju z dodatkiem niebieskiej spiruliny była dwukrotnie wyższa niż w przypadku tego samego stężenia zielonej spiruliny. Najmniejsza zawartość polifenoli w przypadku napoju z niebieską spiruliną była porównywalna z największą zawartością polifenoli w napoju z zieloną spiruliną. Przedstawione wyniki

znajdują potwierdzenie w dostępnej literaturze. De Oliveira i in. [9] badali właściwości mikrokapsułkowanej spiruliny jako substratu do produkcji napojów funkcjonalnych na bazie mleka czekoladowego i ustalili całkowitą zawartość związków polifenolowych w przygotowanych napojach na poziomie 602,31 oraz 683,98 mg GAE/100 g, przy udziale spiruliny odpowiednio 5 % i 8,75 %. Podobne zależności zaobserwowano w badaniach własnych, gdzie większy dodatek *Arthrospira platensis* powoduje wzrost wartości TPC.

W celu potwierdzenia właściwości izotonicznych otrzymanych napojów sprawdzono ich osmolalność. Wartość osmolalności dla samej wody kokosowej wynosiła 308 mOsm/kg H₂O, po wprowadzeniu dodatku spiruliny proporcjonalnie wzrastała. Największą osmolalnością (336 mOsm/kg H₂O) charakteryzowały się napoje z dodatkiem niebieskiej spiruliny w ilości 0,5 %, a najmniejszą (315 mOsm/kg H₂O) – napoje z 0,1-procentowym dodatkiem spiruliny zielonej. Ponadto stwierdzono zależność pomiędzy udziałem spiruliny, a wielkością osmolalności (im większy dodatek spiruliny, tym wyższa wartość), jednak uzyskane wartości zawierały się w przedziale 315 ÷ 336 mOsm/kg H₂O.



Rys. 3. Osmolalność analizowanych napojów funkcjonalnych na bazie wody kokosowej i spiruliny

Fig. 3. Osmolality of the analyzed functional drinks based on coconut water and spirulina

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy $p < 0,05$ (osobno dla napojów ze spiruliny zielonej i niebieskiej) / a, b, c – values marked with different letters differ statistically significantly at $p < 0.05$ (separately for green and blue spirulina drinks)

Osmolalność napoju to informacja mówiąca o stężeniu substancji rozpuszczonych w jednym kilogramie rozpuszczalnika – wody. Na osmolalność w głównej mierze

wpływa zawartość węglowodanów oraz obecność chlorków, jonów sodu, wapnia, magnezu i potasu [21, 24]. Według danych literaturowych napoje można uznać za izotoniczne, jeżeli średnie wartości osmolalności mieściły się w przedziale $270 \div 330$ mOsm/kg H₂O [24]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wszystkie otrzymane napoje można zaliczyć do grupy napojów izotonicznych, gdyż ich wartość zawierała się w przedziale osmolalności charakterystycznej dla izotoników. Dodatek spiruliny wpływa nieznacznie na zwiększenie wartości osmolalności napojów ze względu na obecność węglowodanów oraz makro- i mikroelementów w jej składzie chemicznym.

W ocenie własnej najbardziej akceptowalne cechy organoleptyczne wykazywały napoje z 0,1-procentowym dodatkiem obu spirulin N i Z. Smak oraz zapach napojów był delikatnie wyczuwalny, jednak korzystniejszy niż wody kokosowej, przy czym intensywność barwy tych napojów zachęcała spożycia. Zwiększenie udziału dodatku do 0,25 % dla spiruliny zielonej niekorzystnie wpłynęło na cechy smakowo-zapachowe (wyczuwalny zapach alg). Napoje z dodatkiem 0,5 % spiruliny zarówno w przypadku zielonej jak i niebieskiej charakteryzowały się zbyt intensywnym zapachem i smakiem (charakterystycznym dla wodorostów) oraz zbyt intensywną, ciemną barwą.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że niezależnie od stężenia wyższe wartości osmolalności cechują napoje z dodatkiem niebieskiej spiruliny. Ponadto stwierdzono wysoką korelację pomiędzy osmolalnością a aktywnością antyoksydacyjną ($r = 0,986$) oraz zawartością związków fenolowych ($r = 0,928$), co dodatkowo wzmacnia jakość prozdrowotną otrzymanych napojów i zwiększa ich konkurencyjność w stosunku do komercyjnych odpowiedników, zawierających w składzie szereg E-dodatków, w tym barwniki.

Wnioski

1. Zielona spirulina (*Arthrospira platensis*) charakteryzuje się intensywnym kolorem związanym z obecnością kompleksu barwników chlorofilowych, karotenoidowych i fikocyjaniny, co zostało potwierdzone na podstawie widm absorbancji dla wodnych ekstraktów. Z kolei niebieska spirulina zawiera głównie wyizolowaną z zielonej spiruliny fikocyjaninę – niebieski barwnik. Obie formy wykazują właściwości antyoksydacyjne i zawartość białka rozpuszczalnego nie mniejszą niż 35 %, przy czym obserwowano duże zróżnicowanie składu chemicznego.
2. Wzbogacenie wody kokosowej dodatkiem zielonej lub niebieskiej spiruliny (0,1 ÷ 0,25 % w/v) pozwoliło otrzymać napój o wysokim potencjale antyoksydacyjnym, podwyższonej zawartości białka i osmolalności wymaganej dla napojów izotonicznych, co pozwala zaliczyć je do grupy napojów funkcjonalnych. Napój z niebieską spiruliną wykazywał korzystniejsze cechy organoleptyczne (barwa, zapach, smak).

Literatura

- [1] Agregán R., Munekata PES., Franco D., Carballo J., Barba F.J., Lorenzo JM. Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and Micro-Algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*). *Med. Plant. Foods*, 2018, 5, 2-33.
- [2] Arndt U. *Spirulina Chlorella AFA-ALGEN Lichtvolle Power-Nahrung für Körper und Geist*. Hans - Nietsch Verlag, 2019.
- [3] Boukid F., Castellari M. Food and Beverages Containing Algae and Derived Ingredients Launched in the Market from 2015 to 2019: a Front-of-Pack Labeling Perspective with a Special Focus on Spain. *Foods*, 2021, 10 (1), 173.
- [4] Britton G. Functions of intact carotenoids. Birkhauser Verlag AG Natural Functions, 2008, 4, pp. 189-212.
- [5] Bueschke, M. Alternative sources of protein in human nutrition. *Zeszyty Naukowe SGGW w Warszawie-Problemy Rolnictwa Światowego* 17.3, 2017, 49-59.
- [6] Castillejo N., Martínez-Hernández GB., Goffi V., Gómez PA., Aguayo E., Artés, F., Artés-Hernández F. Natural vitamin B12 and fucose supplementation of green smoothies with edible algae and related quality changes during their shelf life. *J. Sci. Food Agri.*, 2018, 98, 2411-2421.
- [7] Castro M., Shannon E., Abu-Ghannam N. Effect of Fermentation on Enhancing the Nutraceutical Properties of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). *Fermentation*, 2019, 5, 28.
- [8] Chu W.-L., Lim Y.-W., Radhakrishnan A.K., Lim P.-E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complement. Altern. Med.* 2010, 10 (53), 1-8.
- [9] De Oliveira B., Reis IM., Souza MB., Silva Bispo E., Maciel LF., Druzian JI., Tavares PPLG., Cerqueira AO, Morte ESM, Glória MBA., Deus VL, Santana LRR. Microencapsulation of *Spirulina sp.* LEB-18 and its incorporation in chocolate milk: Properties and functional potential. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2021, 148, 111674.
- [10] Gross J. Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids. Van Nostrand Reinhold, 1991.
- [11] Han P., Li J., Zhong H., Xie J., Zhang P., Lu O., Li J., Xu P., Chen P., Leng L., Zhou W. Antioxidation properties and therapeutic potentials of spirulina. *Algal Res. J.*, 2021, 55, 102240.
- [12] Jękot B., Rzewińska A., Hałaszk P., Rojowski J., Muszyńska B. Algae preparations as a source of beneficial healthy substances. *Medicina Internacia Revuo*, 2016, 27 (106), 4-10.
- [13] Jung F., Krüger-Genge A., Waldeck P., Küpper J.-H. *Spirulina platensis*, a super food? *J. Cellular Biotechnol.*, 2019, 5 (1), 43-54.
- [14] Karwowska K., Skotnicka M., Pieszko M. Substancje bioaktywne występujące w „zielonych” suplementach diety. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2020, 3, 129-136.
- [15] Kępińska-Pacelik J., Biel W. *Spirulina* – dlaczego określana jest mianem super food? *Przem. Spoż.* 2022, 76, 10-16.
- [16] Lafarga T., Fernández-Sevilla JM., González-López C., Acién-Fernández FG. *Spirulina* for the food and functional food industries. *Food Res. Int.*, 2020, 137, 109356.
- [17] Mehmood AMMT., Iyer AB., Arif S., Junaid M., Khan RS., Nazir W., Khalid N. Whey Protein-Based Functional Energy Drinks Formulation and Characterization. *Sports and Energy Drinks*, 2019, 10, 161-181.
- [18] Niccolai A., Bažec K., Rodolfi L. Lactic Acid Fermentation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) in a Vegetal Soybean Drink for Developing New Functional Lactose-Free Beverages. *Front. Microbiol.*, 2020, 11, 560684.
- [19] Porra RJ., Thompson WA., Kriedemann PE. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: veri-

- fication of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophysic. Acta Bioener.*, 1989, 975 (3), 384-394.
- [20] Ratha SK., Prasanna R. Bioprospecting microalgae as potential sources of "Green Energy"—challenges and perspectives. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2012, 48 (2), 109-125.
- [21] Rowlands S., Kopetschny BH., Badenhorst CE. The Hydrating Effects of Hypertonic, Isotonic and Hypotonic Sports Drinks and Waters on Central Hydration During Continuous Exercise: a Systematic Meta-Analysis and Perspective. *Sports Med.*, 2021, 34716905.
- [22] Saefurahman, G.; Rahman, A.A.; Hidayatuloh, S.; Farobie, O.; Abidin, Z. Continuous extraction of *Spirulina platensis* biopigments using different extraction sequences. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 2021, 749, 1-8.
- [23] Stanic-Vucinic D., Minic S., Milan R., Cirkovic Velickovic NT. *Spirulina* Phycobiliproteins as Food Components and Complements. *IntechOpen*, 2018, 10, 5772.
- [24] Stasiuk E., Przybyłowski P. Elektrochemiczne wskaźniki jakości w ocenie napojów izotonicznych. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 2015, 96 (4), 827-829.
- [25] Takyar T., Babak M., Khajavi SH., Reza S. Evaluation of antioxidant properties of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2018, 100, 244-249.

SPIRULINA (*ARTHROSPIRA PLATENSIS*) AS A COMPONENT OF FUNCTIONAL DRINKS

S u m m a r y

Background. *Spirulina* is categorized as so-called super foods, the properties of which are supposed to have a beneficial effect on the human body, and is used as a natural food coloring additive. The aim of the study was to evaluate the antioxidant and osmotic properties of beverages prepared using various forms of commercially available *spirulina* and coconut water as a natural isotonic solvent. Based on the determined absorption spectra and antioxidant properties of *spirulina* extracts (three batches of green and two batches of blue *spirulina*), samples with the highest activity were selected for the next stage of the study. Beverages were made using coconut water (control sample) and green or blue *spirulina* with increasing additions of 0.1, 0.25 and 0.5 % w/v (seven beverages in total). The polyphenol content, antioxidant (DPPH') and osmotic properties of the produced beverages were compared.

Results and conclusion. It was shown that drinks based on blue *spirulina* had higher protein, polyphenol content as well as antioxidant activity, proportional to the share of additive used, than drinks with green *spirulina*. The osmolality of all drinks ranged from 315 to 336 mOsm/kg H₂O, which meets the requirements for isotonic drinks. Drinks based on blue *spirulina* were characterized by an intense blue color and better organoleptic characteristics compared to green *spirulina* and coconut water, however, the addition of 0.5% adversely affected the organoleptic qualities of the drink. The beverages produced can be categorized as functional beverages, well hydrating the body and additionally enriched with valuable nutrients.

Key words: *Arthrospira platensis*, *spirulina*, phycocyanin, isotonic drink, antioxidant activity ☒