

Komitety Nauk o Żywności
Polskiej Akademii Nauk

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Polskie Towarzystwo Technologów Żywności

Bezpieczeństwo zdrowotne żywności Aspekty mikrobiologiczne, chemiczne i ocena towaroznawcza

Pod redakcją naukową
Joanny Stadnik i Izabelli Jackowskiej

Wydawnictwo Naukowe PTTŻ
Kraków 2015

Recenzenci naukowi

prof. dr hab. Barbara Baraniak, dr Monika Bojanowska, dr Renata Czeczko,
prof. dr hab. Zbigniew J. Dolatowski, dr hab. inż. Paweł Glibowski,
prof. dr hab. Jerzy Jamroz, dr hab. inż. Małgorzata Karwowska, dr Monika
Kordowska-Wiater, dr inż. Agnieszka Latoch, dr hab. Małgorzata Materska,
dr inż. Monika Michalak-Majewska, dr hab. Urszula Pankiewicz,
dr hab. Magdalena Polak-Berecka, dr Monika Pytko, prof. dr hab. Ewa Solarska,
dr inż. Bożena Sosnowska, dr hab. inż. Dariusz Stasiak, dr inż. Anna Stój,
dr hab. inż. Dominik Sz wajgier, prof. dr hab. Zdzisław Targoński,
dr hab. Adam Waśko, dr inż. Anna Wirkijowska, dr inż. Karolina Wójciak,
dr inż. Marta Zalewska-Korona

Redaktor techniczny

dr Monika Sujka

Projekt okładki

dr hab. inż. Dariusz M. Stasiak

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2015
Printed in Poland

Utwór nie może być kopiowany, przedrukowywany, jak również umieszczany na
nośnikach elektronicznych, w całości lub we fragmentach, bez pisemnej zgody
Wydawcy

Wydanie monografii dofinansowane
przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

ISBN 978-83-935421-7-8

Wydawca

POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOSTCI
WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

30-149 KRAKÓW, ul. Balicka 122, e-mail: wnpttz@wp.pl

Druk

Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków
tel./fax 12 280-71-51; www.akapit.krakow.pl
e-mail: wn@akapit.krakow.pl

SPIS TREŚCI

Charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Campylobacter</i> występujących w surowym mięsie drobiowym.....	5
Jakość handlowa hamburgerów drobiowych różnych producentów.....	15
Fenotypowa i genotypowa oporność na antybiotyki szczepów z rodzaju <i>Enterococcus</i> izolowanych z żywności gotowej do spożycia.....	25
Przeciwbakteryjne właściwości propolisu i mleczka pszczelego	37
Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktów etanolowych z szałwii i rozmarynu.....	47
Analiza wybranych aspektów jakościowych syropów malinowych	57
Ocena przeżywalności szczepów <i>Lactobacillus</i> spp. w funkcjonalnym soku aloesowym	67
Nowa metodyka genetycznej modyfikacji <i>Rhizopus oryzae</i> i <i>Rhizopus microsporus</i> za pomocą kolchicyny i benomylu.....	77
Kinetyka wzrostu wybranych szczepów drożdży z rodzaju <i>Rhodotorula</i> w podłożach z ziemniaczaną wodą sokową i glicerolem.....	87
Skuteczność wybranych enzymów w usuwaniu biofilmów bakteryjnych z powierzchni stali nierdzewnej.....	97
Biofilmy bakteryjne w produkcji żywności	109
Wpływ stężenia glicerolu i pH podłoża hodowlanego na kinetykę wzrostu drożdży paszowych <i>Candida utilis</i> ATCC 9950 w podłożach z odbiałczoną ziemniaczaną wodą sokową	121
Wpływ mycia wodą chlorowaną na pozostałości środków ochrony roślin w żywności pochodzenia roślinnego oraz ryzyko narażenia zdrowia konsumentów	131
Niedestrukcyjne techniki w kontroli jakości wyrobów mięsnych	145
Zastosowanie preparatów handlowych transglutaminazy pochodzenia mikrobiologicznego do wytworzenia mrożonych formowanych wyrobów z rozdrobnionego mięsa ryb.....	155
Obowiązek stosowania integrowanej ochrony roślin, a bezpieczeństwo żywności w Polsce	173
Zastosowanie techniki spektrofotometrycznej oraz impulsowej polarografii różnicowej do oznaczania zawartości kwasu askorbinowego	183

Zdolność różnych zakwasów piekarskich do degradacji trichotecenów z grupy B w cieście żytnim	193
Ocena jakości dżemów pomarańczowych	203
Analiza funkcjonowania systemu śledzenia ruchu i pochodzenia żywności (<i>traceability</i>) na przykładzie wybranego produktu spożywczego	213
Jakość i przydatność technologiczna śledzi (<i>Clupea harengus</i>) poławianych na Bałtyku południowym	223
Izolacja i identyfikacja szczepów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z wędlin surowo dojrzewających	233
Właściwości reologiczne i teksturalne majonezów pełnotłustych i o obniżonej zawartości tłuszczu dostępnych na rynku lubelskim	243
Zdolność toksynotwórcza wybranych izolatów <i>Fusarium</i> spp. otrzymanych z ziarna jęczmienia	255
Właściwości fizykochemiczne kefirów dostępnych na rynku lubelskim	265
Analiza zapraw do napojów o smaku malinowym dostępnych na rynku lubelskim	277
Bezpieczeństwo zdrowotne produktów wędzonych	287
Barwa i tekstura sera twarogowego kwasowego przechowywanego w różnych opakowaniach	299
Wiedza konsumentów na temat zafałszowań żywności	309
Ocena towaroznawcza piwa jasnego z produkcji własnej i browarów regionalnych	321
Analiza przeżywalności bakterii <i>L. monocytogenes</i> w ekologicznych wędlinach dojrzewających w czasie przechowywania	331
Zawartość metali ciężkich w zbożach konsumpcyjnych	339
Analiza jakościowa cydrów jabłkowych dostępnych na rynku Trójmiasta	349
Bezpieczeństwo mikrobiologiczne mięsnych produktów ekologicznych	359
Zanieczyszczenie olejów roślinnych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi	371
AUTORZY	381

CHARAKTERYSTYKA BAKTERII Z RODZAJU CAMPYLOBACTER WYSTĘPUJĄCYCH W SUROWYM MIĘSIE DROBIOWYM

BEATA BARTODZIEJSKA, ANNA SZOSLAND-FAŁTYN, BEATA PAZIAK-
DOMAŃSKA, JOANNA KRÓLASIK

Wprowadzenie

Po raz pierwszy pałeczki *Campylobacter* spp. zostały opisane w 1913 r. przez McFadyeana i Stocmana. Początkowo były zaliczane do rodzaju *Vibrio*. W latach 60 XX wieku wyizolowano je z kału ludzi, z objawami zapalenia jelit i wydzielono nowy rodzaj. Zgodnie z taksonomią, rodzaj *Campylobacter* wraz z rodzajem *Arcobacter* należy do rodziny *Campylobacteriaceae*, rzędu *Campylobacterales*.

Zakażenia pałeczkami *Campylobacter* u ludzi stanowią poważny problem epidemiologiczny. W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby zakażeń pokarmowych, których przyczyną są te drobnoustroje. Liczba zarejestrowanych na całym świecie biegunek wywołanych tymi bakteriami zbliża się do pół miliarda rocznie. W statystykach epidemiologicznych schorzeń układu pokarmowego (zwłaszcza krajów uprzemysłowionych) patogen ten izolowany jest od chorych z objawami stanów zapalnych jelit 3 do 4 razy częściej niż *Salmonella* i *Shigella*. W Wielkiej Brytanii, Irlandii, Holandii, Szwajcarii, Norwegii *Campylobacter* spp. jest głównym źródłem infekcji pokarmowych [Lindqvist i Lindblad, 2008; Moran i in., 2009; Guyard-Nicodème i in., 2015]. W Stanach Zjednoczonych *Campylobacter* stanowi najczęstszą przyczynę biegunek (2,4 milionów przypadków rocznie). W Polsce kampylobakterioza jest rzadko wykrywaną chorobą w wyniku niedostatecznej świadomości lekarzy i braku diagnostyki klinicznej.

Źródła zakażeń *Campylobacter* spp.

Campylobacter kolonizuje przewód pokarmowy wielu gatunków zwierząt domowych: bydła, świń, psów i kotów, również dzikich ptaków i ssaków, natomiast nie namnaża się w produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego, a jedynie w nich przeżywa [Wieczorek i Osek, 2010; Wieczorek i in., 2012; Götz i in., 2014].

Bakterie te są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, izoluje się je również z mleka oraz wód gruntowych. Jak wynika z doniesień literaturowych, to tusze drobiowe stanowią największe potencjalne źródło patogennych szczepów *Campylobacter*. Mechanizm zapoczątkowania infekcji na fermach pozostaje niewyjaśniony, lecz niezależnie od źródła zakażenia drobnoustroj rozpowszechnienia

się w stadach kurcząt bardzo szybko, doprowadzając do zakażenia 100% stada. Z uwagi na fakt, iż brak jest u ptaków objawów chorobowych, niemożliwa jest prewencyjna eliminacja osobników zainfekowanych [Godlewska i Jagusztyn-Krynicka, 2006]. Jak dotąd zabiegi poprawiające higienę na fermach nie dały oczekiwanych rezultatów w zapobieganiu zakażeniom *Campylobacter*. Inne metody, stosowane do eliminacji tych drobnoustrojów, zarówno w USA i UE, polegały na użyciu swoistych bakteriofagów oraz wprowadzeniu do powszechnego stosowania szczepionki odpornościowej dla drobiu, a także ludzi z grup ryzyka.

Do zanieczyszczenia tusz kurcząt pałeczkami *Campylobacter* dochodzi podczas ich uboju i rozbioru. Problemem higienicznym w ubojniach jest trudność w ograniczeniu zanieczyszczenia mikrobiologicznego drobiu rzeźnego. Drobnoustroje występujące na powierzchni ptaków i w ich przewodzie pokarmowym mogą być rozprowadzone na całą tuszkę drobiową. Podczas całego procesu technologicznego (skubanie, patroszenie, oparzanie, mycie, schładzanie itp.), nie eliminuje się, a jedynie obniża liczbę drobnoustrojów, w tym *Campylobacter*, a dzielenie tuszek może dodatkowo spowodować mikrobiologiczne zanieczyszczenie mięśni. Wilgotne tuszki drobiowe i ich porowata powierzchnia skóry zapewniają bardzo dobre warunki przeżycia tych bakterii [Szczepańska i in., 2007].

W krajach rozwiniętych przyczyną zatruć pokarmowych *Campylobacter* spp. jest najczęściej niedogotowany lub niedopieczony drób, niepasteryzowane mleko lub woda oraz żywność gotowa do spożycia (ready-to eat), która uległa kontaminacji tym patogenem [Rożynek i in., 2005; Josefsen i in., 2015]. Dlatego też, należałoby wyeliminować możliwość wystąpienia skażenia krzyżowego, poprzez stosowanie zasad higieny w chłodniach, a także w domowych lodówkach [Lindqvist i Lindblad, 2008]. Jak podają dane literaturowe, nawet 90% tusz kurcząt, znajdujących się w sprzedaży, jest zakażonych pałeczkami *Campylobacter*, a 80% przypadków kampylobakterioz u ludzi wywołanych jest przez spożycie, skażonego pałeczkami *Campylobacter* spp., mięsa drobiowego.

Kampylobakterioza

Zarówno na świecie jak i w Polsce, obserwuje się tendencje wzrostowe spożycia mięsa drobiowego. W przeliczeniu na jednego mieszkańca, w ciągu ostatnich ośmiu lat, zaobserwowano 50% wzrost konsumpcji drobiu [Maćkiw i in., 2011]. Zwiększona produkcja, a co za tym idzie konsumpcja drobiu, spowodowała wzrost zachorowań na kampylobakteriozę u ludzi. Jest to choroba odzwierzęca, o niejednoznacznych objawach, głównie ze strony przewodu pokarmowego, od słabych do silnych stanów zapalnych jelita z krwawą i śluzową biegunką. Choroba zazwyczaj rozpoczyna się 2-5 dni po spożyciu zakażonej żywności, może mieć bardzo wyniszczający przebieg i trwać nawet do 10 dni. U osób z obniżoną odpornością dochodzi często do uogólnionych infekcji *Campylobacter* spp., zakażenia narządów wewnętrznych i/lub posocznicy.

Konsekwencją infekcji *C. jejuni* mogą być choroby autoimmunologiczne (reaktywny artretyzm) lub choroby neurologiczne (zespół Guillaina-Barré- GBS lub zespół Miller-Fisher- MFS) [Godlewska i Jagusztyn-Krynicka, 2006; Haddad i in., 2009; Wieczorek i Osek, 2010; Ganan i in., 2012; Guyard-Nicodème i in., 2015]. Około 40 % przypadków GBS jest następstwem infekcji *Campylobacter*, co stanowi 1-2 przypadków na 1000 zdiagnozowanych infekcji. Wystąpienie objawów neurologicznych zależne jest zarówno od serotypu bakterii, jak również genotypu pacjenta i czynników regulujących jego odpowiedź immunologiczną. Dawka zakaźna dla człowieka jest bardzo niska i wynosi 500-800 jtk, podczas gdy w 1 g treści jelita kurcząt rzeźnych może znajdować się do 10^{10} komórek *Campylobacter* spp. [Godlewska i Jagusztyn-Krynicka, 2006; Woźniak i Wieliczko, 2009; Josefsen i in., 2015].

Charakterystyka szczepów

Do rodzaju *Campylobacter* należą 32 gatunki i 13 podgatunków [<http://www.bacterio.net>]. Z przypadków kampylobakteriozy u ludzi, najczęściej izolowane są *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei* i *C. coli* [Krutkiewicz, 2008].

Morfologicznie są to biegunowo urzęsione, nieprzetrwalnikujące, helikalne Gram-ujemne bakterie o wymiarach $0,2 - 0,8 \mu\text{m} \times 0,5 - 5,0 \mu\text{m}$. Często łączące się w pary i wykazujące ruch korkociągowy, widoczny w preparatach przyżyciowych. Posiadają formy VBNC “żywe lecz nie dające się hodować” (VBNC - ang. *viable but nonculturable*), są oksydazo i katalazo dodatnie. Do wzrostu wymagają atmosfery mikroaerofilnej z podwyższonym dodatkiem dwutlenku węgla [Silva i in., 2011; Bolton, 2015; Josefsen i in., 2015]. Szybko giną w normalnej atmosferze, natomiast przeżywają w systemach pakowania z zastosowaniem modyfikowanej atmosfery (MAP) oraz próżni (VP). Warunki te sprzyjają rozwojowi tych bakterii, przez co zwiększa się możliwość wywołania infekcji u ludzi, zwłaszcza, że takie systemy pakowania są coraz częściej stosowane przez producentów świeżego mięsa, w celu wydłużenia jego trwałości.

Są to drobnoustroje termotolerancyjne, zdolne do bytowania w jelicie ptaków w temperaturze 42°C , jak i w przewodzie pokarmowym człowieka. Temperaturą optymalną do wzrostu jest 42°C . Giną w trakcie pasteryzacji (w $60^{\circ}\text{C}/15$ minut.) oraz podczas chlorowania wody, są wrażliwe na promieniowanie mikrofalowe, a także na niektóre przyprawy np. czosnek czy oregano. Pałeczki *Campylobacter* są wrażliwe na wysuszenie, a minimalna aktywność wody wymagana do wzrostu wynosi 0,987 (2% NaCl), nie mniej jednak badania wykazały obecność żywych komórek tych drobnoustrojów na drewnianych deskach używanych do krojenia.

Pomimo, iż bakterie z rodzaju *Campylobacter* nie są zdolne do namnażania w niskich temperaturach, wykazano, iż czas ich przeżywalności w temperaturze 2°C jest 15 razy dłuższy niż w temperaturze 20°C . Ponadto *C. jejuni* może przetrwać kilka miesięcy w zamrożonym mięsie [Haddad i in., 2009].

Mechanizmy chorobotwórczości *Campylobacter* nie zostały w obecnej chwili wyjaśnione w dostateczny sposób. Oznaczono jednak szereg genów chorobotwórczości, których produkty ekspresji biorą udział w poszczególnych etapach zakażenia, zwłaszcza warunkujące ruchliwość, adhezję drobnoustrojów do komórek nabłonka jelitowego czy produkcję toksyn [Wieczorek i in., 2012; Bolton, 2015].

W 2000 r. określona została całkowita sekwencja genomu *Campylobacter*, a naukowcy w trzech ośrodkach w Wielkiej Brytanii pracują nad poznaniem, za co odpowiedzialne są poszczególne geny. Stwierdzono także, że geny odpowiedzialne za wytwarzanie czynników, decydujących o zjadliwości tych pałeczek są zupełnie inne niż geny, kodujące substancje chorobotwórcze u pozostałych drobnoustrojów. Z drugiej strony organizmy te wydają się mieć kilka kopii genu kodującego enzym, warunkujący zmiany na zewnętrznej powierzchni bakterii. Okazało się, że ponad jedna trzecia genów nie ma nigdzie w naturze znanych odpowiedników, sugerując, że strategia infekcji stosowana przez *Campylobacter* jest unikalna. Jeden z torów badań ma wyjaśnić mechanizmy ekspresji genów *C. jejuni* oraz ilość i rodzaj białek wytwarzanych w sytuacji narażenia na niekorzystne warunki środowiskowe. Przeprowadzone badania porównawcze genomów, transkryptomów i proteomów wybranych szczepów *Campylobacter*, potwierdziły ich genetyczną zmienność. Każdy szczep zawiera unikatowe geny, warunkujące głównie różnice w budowie osłon komórkowych (lipopolisacharydu, otoczki białkowej) oraz przebiegu procesów restrykcji i modyfikacji DNA. Podstawowe geny kodujące czynniki wirulencji, czyli adhezyny, obecne są w genomach wszystkich szczepów. Główne różnice w zawartości materiału genetycznego lub regulacji jego ekspresji, warunkujące zdolność do zasiedlania różnorodnych nisz ekologicznych, dotyczą prawdopodobnie zmienności procesów metabolicznych tych drobnoustrojów [Jagusztyn-Krynicka i in., 2006]. Mechanizmy tych procesów pozostają nadal nie w pełni poznane.

Diagnostyka laboratoryjna *Campylobacter* w mięsie drobiowym

Termotolerancyjne bakterie z rodzaju *Campylobacter* izoluje się zgodnie z procedurą opisaną wg PN-EN ISO 10272-1:2007. Metoda obejmuje posiew do podłoża płynnych namnażających i na stałe wybiórczo-namnażające. Potwierdzenie obecności pałeczek *Campylobacter* przeprowadza się na podstawie oceny cech mikroskopowych, a także biochemicznych: test na obecność oksydazy, brak wzrostu w warunkach tlenowych, w temp. 41,5°C oraz brak wzrostu w atmosferze mikroaerofilnej w temp. 25 °C. Różnicowanie do gatunku określa się poprzez ocenę wrażliwości lub oporności na kwas nalidyksowy i cefalotynę oraz zdolność hydrolizy hipuranu sodu i octanu indoksyli. Ze względu na coraz częściej obserwowaną lekooporność, określenie przynależności gatunkowej jest utrudnione i coraz mniej wiarygodne. Dlatego też, coraz częściej stosuje się identyfikację

gatunkową przy pomocy testu API Campy (bioMerieux) i/lub metodą PCR Multiplex [Krutkiewicz, 2008; Gharst i in., 2013].

Diagnostyka, oparta o klasyczne metody hodowli, jest czasochłonna. Aby skrócić czas wykrywania obecności *Campylobacter*, opracowano testy serologiczne typu „Singlepath® Campylobacter”, pozwalające na określenie rodzaju bakterii, na etapie wstępnego namnażania na pożywce płynnej. Testy te charakteryzują się wysoką swoistością 98 % oraz specyficznością 100% i mogą być stosowane do monitoringu zakażeń *Campylobacter* na poszczególnych etapach produkcji mięsa drobiowego.

Diagnostyka kliniczna kampylobakteriozy

Diagnostyka laboratoryjna kampylobakteriozy opiera się na wynikach badania bakteriologicznego, obejmującego bezpośrednie badanie mikroskopowe, najczęściej kału lub treści jelita grubego, oraz na izolacji i identyfikacji drobnoustrojów. Bezpośrednie przyżyciowe badanie mikroskopowe, pozwala na stwierdzenie obecności ruchliwych pałeczek w badanym materiale. Badane próbki materiału klinicznego posiewa się na pożywki wzbogacone, najczęściej z dodatkiem krwi, suplementowane antybiotykami, działającymi selektywnie na wzrost drobnoustrojów. Hodowlę inkubuje się w temp. 37 - 42°C od 3 do 6 dni, w zmodyfikowanej atmosferze, o podwyższonym do 10% poziomie dwutlenku węgla. Następnie izoluje się bakterie z rodzaju *Campylobacter*, a dalszą diagnostykę, pozwalającą określić gatunek, prowadzi się na podstawie oceny cech morfologicznych kolonii oraz cech biochemicznych, z zastosowaniem testu API Campy. Do identyfikacji gatunkowej *C. jejuni* i *C. coli* stosuje się również testy serologiczne, w których bada się reakcje z antygenami: białek powierzchniowych oraz osłon komórkowych. Inne metody to biotypowanie lub fagotypowanie. Metody biologii molekularnej służą głównie do badania homologii izolowanych szczepów.

Lekooporność *Campylobacter* spp.

W ciągu kilkunastu lat oporność *Campylobacter* na antybiotyki i chemioterapeutyki wzrosła prawie dwukrotnie. Dotyczy ona szczepów izolowanych od zwierząt, ludzi jak i z żywności i jest efektem m.in. ich nadużywania. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 2005 r. „w sprawie rejestrów zakażeń zakładowych oraz raportów o występowaniu tych zakażeń” zalicza *C. jejuni* do grupy drobnoustrojów chorobotwórczych o szczególnej zjadliwości i oporności wielolekowej. Jeszcze do niedawna u zwierząt rzeźnych można było stosować antybiotyki, które eliminowały chorobotwórcze drobnoustroje, przez co stymulowały wzrost ich masy ciała. Dopiero od 1998 r. w UE, a od 2006 r. w Polsce, antybiotyki paszowe można stosować jedynie w celach leczniczych.

Wysoka lekooporność szczepów *Campylobacter* stanowi problem w wyborze skutecznej antybiotykoterapii u ludzi. Lekami z wyboru, stosowanymi w leczeniu

kampylobakteriozy i innych niezdiagnozowanych stanów zapalnych jelit, są: erytromycyna i fluorochinolony, rzadziej tetracykliny i gentamycyna. Wśród szczepów izolowanych w krajach UE, wysoki odsetek stanowiły pałeczki *Campylobacter* odporne na fluorochinolony, wrażliwe na makrolity, pochodzące od chorych ludzi, zwierząt gospodarskich, w tym brojlerów. Oporność na fluorochinolony jest wynikiem mutacji w genie kodującym gyrazę, zmniejszającym powinowactwo do fluorochinolonów. Przyczyną tego zjawiska jest zbyt częste stosowanie tych antybiotyków na fermach drobiu [Wasył i Osek, 2008; Woźniak i Wieliczko, 2009].

Dlatego też, konieczne jest monitorowanie lekooporności bakterii należących do rodzaju *Campylobacter*, a w szczególności *C. jejuni* i *C. coli*, gdyż są one w 99% przypadków przyczyną zachorowań ludzi. Szczepy te posiadają geny umożliwiające ekspresję oporności i mogą przekazywać je innym drobnoustrojom, jak również markery odpowiedzialne za wywoływanie kampylobakteriozy u ludzi [Guyard-Nicodème i in., 2015].

Podsumowanie

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) opracował opinię dotyczącą wpływu na zdrowie publiczne środków kontroli, powodujących obniżenie występowania bakterii *Campylobacter* u kurcząt, jak również w samym mięsie drobiowym oraz w jakim stopniu redukcja bakterii *Campylobacter* w stadach kurcząt wpłynęłyby na obniżenie przypadków kampylobakteriozy wśród ludności UE.

Jak wynika z raportów zoonotycznych, w Europie choroba ta jest najczęściej występującą spośród tych, gdzie czynnik etiologiczny wnika do organizmu drogą pokarmową. Liczba zarejestrowanych i potwierdzonych przypadków tej odzwierzęcej choroby utrzymuje się na wysokim poziomie. W krajach UE w latach 2011 i 2012 odnotowano odpowiednio 220209 i 214268 zachorowań na kampylobakteriozę [EFSA, 2013; EFSA, 2014]. W 2013 r. odsetek zachorowań u ludzi, przewyższył zachorowania na salmonellozę [EFSA, 2015]. Ze względu na fakt iż, większość przypadków tej zoonozy nie jest w ogóle diagnozowana, szacuje się, że liczba zachorowań może sięgać nawet 9 milionów przypadków rocznie. Koszt leczenia z publicznych systemów opieki zdrowotnej oraz koszt strat w produkcji, szacowany jest na około 2,4 miliardy euro rocznie w całej UE [Göhlz i in., 2014].

Środki zapobiegawcze, zastosowane przed ubojem mogą spowodować spadek przypadków choroby nawet o 50%. Metody te to ochrona przed wnikaniem bakterii do budynków hodowlanych, oraz zmniejszenie ilości bakterii w jelitach ptaków. Stosowanie ekranów przeciw owadom, obniżenie wieku rzeźnego kurcząt i zaostrzenie norm higienicznych to również jeden z elementów prewencji. Gotowanie mięsa na skalę przemysłową lub napromieniowanie mięsa, również pozwoliłoby zredukować ilość bakterii *Campylobacter*, obecnych w mięsie.

Innym rozwiązaniem jest mrożenie tusz przez dwa do trzech tygodni, które redukuje zanieczyszczenie mikrobiologiczne do 90 %. Jednakże jest to proces bardzo kosztowny [Ganan i in., 2012]. Krótkoterminowe mrożenie tusz (2-3 dni), polewanie tusz wodą o temperaturze 80°C przez 20 sekund, czy stosowanie środków chemicznych takich jak np. kwas mlekowy zmniejszają ryzyko występowania bakterii od 50 do 90%. Dlatego też, wciąż poszukuje się nowych rozwiązań, które skutecznie eliminowałyby te patogeny zarówno na fermach drobiu oraz w mięsie drobiowym.

Literatura

- [1] Bolton D.J.: *Campylobacter* virulence and survival factors. Food Microbiology, 2015, 48, 99-108.
- [2] Dz.U.2005 nr 54 poz.484. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie rejestrów zakażeń zakładowych oraz raportów o występowaniu tych zakażeń.
- [3] EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA Journal, 2013, 11(4), 3129.
- [4] EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. EFSA Journal 2014, 12(2), 3547.
- [5] EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal, 2015;13(1), 3991.
- [6] Ganan M., Silvan J.M., Carrascosa A.V., Martinez-Rodriguez A.J.: Alternative strategies to use antibiotics or chemical products for controlling *Campylobacter* in the food chain. Food Control, 2012, 24, 6-14.
- [7] Gharst G., Oyarzabal O. A., Hussain S. K.: Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95, 84-92.
- [8] Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E. K.: Magiczna pałeczka, Academia, 2006, 4(8), 40-42.
- [9] Götz G., Rosner B., Hofreuter D., Josenhans C., Kreienbrock L., Löwenstein A., Schielke A., Stark K., Sauerbaum S., Wieler L., Alter T.: Relevance of *Campylobacter* to public health- the need for a one health approach. International Journal of Medical Microbiology, 2014, 304, 817-823.
- [10] Guyard-Nicodème M., Rivoal K., Houard E., Rose V., Quesne S., Mourand G., Rouxel S., Kempf I., Guillier L., Gauchard F., Chemaly M.: Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets. International Journal of Food Microbiology, 2015, 203, 8-14.

- [11] Haddad N., Burns Ch.M., Bolla J.M., Prevost H., Federighi M., Drider D., Cappelier J.M.: Long-term survival of *Campylobacter jejuni* at low temperatures is dependent on polynucleotide phosphorylase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23), 7310-7318.
- [12] Jagusztyn-Krynicka E.K., Wyszynska A., Łasica A.M.: Oddziaływanie *Campylobacter jejuni* z komórkami eukariotycznymi - komensalizm a chorobotwórczość. *Postępy Mikrobiologii*, 2006, 45, 1, 11-17.
- [13] Josefsen M.H., Bhunia A.K., Engvall O.E., Fachmann M.S.R., Hoorfar J.: Monitoring *Campylobacter* in the poultry production chain - from culture to genes and beyond. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 112(5), 118-125.
- [14] Krutkiewicz A.: Kampanylobakteriozy u ludzi i zwierząt. *Życie Weterynaryjne*, 2008, 83(4), 285-289.
- [15] Lindqvist R., Lindblad M.: Quantitative risk assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. and cross-contamination during handling of raw broiler chickens evaluating strategies at the producer level to reduce human campylobacteriosis in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 121, 41-52.
- [16] Maćkiw E., Korsak D., Tomczuk K., Stoś K.: Ocena stopnia kontaminacji bakteriami *Campylobacter* spp. produktów drobiarskich dostępnych w handlu detalicznym. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2011, 3, 678-682.
- [17] Moran L., Scates P., Madden R. H.: Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(9), 1830-1835.
- [18] PN-EN ISO 10272-1:2007+ Ap1:2008 Mikrobiologia żywności i pasz Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 1: Metoda wykrywania.
- [19] Rożynek E., Dzierżanowska-Fangrat K., Józwiak P.: Prevalance of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses: *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54, 615-619.
- [20] Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2, 1-12.
- [21] Szczepańska B., Klawke J.J., Szady-Grad M., Jurgoński A., Andrzejewska M.: Występowanie bakterii z rodzaju *Campylobacter* u drobiu w trakcie procesu ubojowego. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2007, 88(1), 78-83.
- [22] Wasyl D., Osek J.: Monitorowanie występowania oporności na antybiotyki u szczepów *Salmonella* i *Campylobacter* izolowanych od zwierząt. *Życie Weterynaryjne*, 2008, 83(2), 107-110.

- [23] Wieczorek K., Osek J.: Występowanie *Campylobacter* spp. w stadach oraz w tuszach brojlerów w krajach Unii Europejskiej w świetle badań monitoringowych. *Życie Weterynaryjne*, 2010, 85(6), 534-537.
- [24] Wieczorek K., Szewczyk R., Osek J.: Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from retail raw meat in Poland. *Veterinarni Medicina*, 2012, 57(6), 293-299.
- [25] Woźniak A., Wieliczko A.: Mechanizmy oporności drobnoustrojów rodzaju *Campylobacter* wobec wybranych chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych. *Medycyna Weterynaryjna*, 2009, 65(3), 160-165.
- [26] <http://www.bacterio.net> 25.03.2015

JAKOŚĆ HANDLOWA HAMBURGERÓW DROBIOWYCH RÓŻNYCH PRODUCENTÓW

ANETA CEGIELKA, RÓŻA WÓJCIK

Streszczenie

Celem pracy była ocena jakości czterech sortymentów hamburgerów drobiowych z dodatkiem mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie (MDOM), wyprodukowanych w Polsce, dostępnych w handlu detalicznym (sklep wielkopowierzchniowy) w roku 2013. Zakres badań obejmował oznaczenie podstawowego składu chemicznego metodą spektrometrii transmisyjnej w bliskiej podczerwieni (NIR), oznaczenie zawartości soli kuchennej metodą potencjometryczną, instrumentalny pomiar siły cięcia i parametrów barwy (L^* , a^* , b^*) oraz ocenę pożądaności konsumenckiej produktów. Wyniki badań wskazują na nieznaczne, ale statystycznie istotne zróżnicowanie zawartości białka i tłuszczu w hamburgerach, wynikające najprawdopodobniej z rodzaju i ilości MDOM użytego do produkcji oraz innych składników i dodatków funkcjonalnych. Różnice w składzie recepturowym produktów powodowały istotne zróżnicowanie parametrów barwy. Badane sortymenty charakteryzowały się stosunkowo niską pożądanością konsumencką w zakresie wszystkich ocenianych wyróżników. Najwyższą notę w ocenie ogólnej pożądaności uzyskał produkt cechujący się największym udziałem czerwieni w ogólnym tonie barwy oraz największą wartością siły cięcia.

Słowa kluczowe: mięso drobiowe oddzielone mechanicznie, hamburgery, jakość

Wprowadzenie

W przetwórstwie mięsa w Polsce od kilkunastu lat intensywnie rozwija się sektor żywności wygodnej, określanej również mianem „gotowej do spożycia” [Adamczyk, 2010]. Jednym z wygodnych produktów mięsnych cieszących się rosnącą popularnością są hamburgery drobiowe. Mimo, że nazwa „hamburger” wywodzi się od produktów wytwarzanych z wołowiny, to w praktyce przemysłowej i handlowej często używana jest również w odniesieniu do podobnych wyrobów, produkowanych z mięsa zwierząt innych gatunków, w tym drobiu [Krauß, 2007; Krygier i Maksimowicz, 2008].

Hamburgery drobiowe są często zaliczane przez producentów do wyrobów garmazeryjnych ze względu na specyfikę procesu produkcyjnego, obejmującego takie etapy jak: rozdrabnianie surowca mięsnego i tłuszczowego oraz obróbkę termiczną gotowego wyrobu. Produkcja wyrobów tego typu stwarza przedsiębiorstwom przetwórstwa drobiowego możliwość racjonalnego

zagospodarowania surowców o ograniczonej przydatności technologicznej. Z powyższych względów hamburgery drobiowe zawierają w składzie surowcowym mięso drobiowe oddzielone mechanicznie (MDOM) oraz mięso pozyskane z tuszek niższych klas jakościowych, np. kur po okresie nieśności [Grabowski i Kijowski, 2004].

MDOM jest rozdrobnioną masą mięso-tłuszczową, otrzymaną z całych, schłodzonych lub zamrożonych tuszek patroszonych lub fragmentów tuszek (oprócz głów, łap i skóry szyi) pozbawionych najcenniejszych mięśni, tj. piersiowych i udowych. Higieniczne warunki jego produkcji określono w rozporządzeniu (WE) nr 853/2004.

Mięso drobiowe oddzielone mechanicznie jest surowcem łatwo dostępnym i względnie tanim. Wynika to z rosnącej produkcji drobiu rzeźnego i konieczności zagospodarowania coraz większej ilości kości mostka i grzbietu oraz nóg wraz z przyległymi fragmentami tkanki mięśniowej, łącznej i tłuszczu, jakie pozostają po wykrojeniu mięśni piersiowych i udowych. MDOM różni się od mięsa wykrawanego ręcznie lub maszynowo pod względem konsystencji, składu chemicznego, trwałości przechowalniczej oraz właściwości technologicznych, co ogranicza jego wykorzystanie przetwórcze do produktów poddawanych obróbce termicznej. Jednak jego cechy jakościowe sprawiają, że jest ono wystarczająco atrakcyjnym surowcem do produkcji przetworów mięsnych znacznym stopniu rozdrobnienia, do których należą wyroby garmazeryjne [Perlo i in. 2006; Pietrzak i in. 2011; Stangierski i in., 2011; Bełkot i in., 2013].

Jakość drobiowych produktów garmazeryjnych, rozumiana m.in. jako spełnienie wymagań w zakresie cech sensorycznych, jest uzależniona od udziału MDOM w składzie surowcowym [Perlo i in. 2006]. W praktyce MDOM stanowi często nawet powyżej 70% masy wszystkich surowców użytych do produkcji [Bełkot i in., 2013]. Składniki niemięsne stosowane poza surowcami drobiowymi, takie jak składniki skrobiowe oraz preparaty białkowe, służą natomiast uzyskaniu zamierzonej jakości technologicznej oraz wydajności produktu gotowego [Krygier i Maksimowicz 2008; Pereira i in. 2011].

Celem niniejszej pracy była ocena jakości dostępnych w handlu detalicznym hamburgerów drobiowych, których podstawowym składnikiem było MDOM z kurcząt i indyków.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły cztery sortymenty hamburgerów drobiowych wytworzone przez polskich producentów, zakupione w drugiej połowie 2013 roku na rynku warszawskim w sklepie wielkopowierzchniowym (należącym do jednej z dużych sieci handlowych), w czterech seriach obejmujących różne partie produkcyjne. Składniki surowcowe hamburgerów drobiowych na podstawie informacji zamieszczonych na etykietach przedstawiono w Tabeli 1.

Tab. 1. Skład surowcowy hamburgerów drobiowych

Oznaczenie produktu	Skład surowcowy
A	mięso oddzielone mechanicznie z kurcząt 73%, woda, mąka pszenna (gluten), sól spożywcza, wzmacniacz smaku E 621, mieszanka przypraw, aromaty, mąka sojowa, białko sojowe, skrobia ziemniaczana, regulator kwasowości: E 262i, przeciwutleniacze: E 330, E 300, substancja konserwująca E 250
B	mięso oddzielone mechanicznie z kurcząt 75%, woda, mąka pszenna (gluten), skrobia ziemniaczana, mąka sojowa, białko sojowe, sól, mieszanka przypraw, wzmacniacz smaku: E 621, substancja konserwująca E 250
C	mięso oddzielone mechanicznie z kurczaka, woda, mąka pszenna (gluten), białko sojowe, sól, olej roślinny, substancja konserwująca E 250, maltodekstryna, dekstroza, wzmacniacz smaku E 621, przeciwutleniacz E 316, substancja spulchniająca E 503i, przyprawy, aromaty
D	mięso oddzielone mechanicznie z indyka 38,7%, mięso indycze 25,8%, woda, mąka pszenna, regulator kwasowości: E 503, skrobia, białko sojowe, sól, przyprawy, aromaty, olej roślinny, maltodekstryna, glukoza, wzmacniacz smaku: E 621, przeciwutleniacz: izoaskorbinian sodu, substancja konserwująca: azotyn sodu

Część analityczna pracy obejmowała oznaczenia zawartości wody, białka i tłuszczu w hamburgerach drobiowych metodą spektrometrii transmisyjnej w bliskiej podczerwieni (NIR) [PN-A-82109:2010] przy użyciu aparatu Infralab 710 (Envag, Polska) oraz NaCl przy użyciu potencjometru TitroLine (Metrohm, Szwajcaria). Pomiar parametrów barwy (L^* , a^* , b^*) metodą odbiciową wykonywano przy użyciu kolorymetru Minolta CR-200 (Konica Minolta, Japonia) z otworem pomiarowym o średnicy 8 mm, przy następujących parametrach: oświetlenie D_{65} , obserwator o polu widzenia 10° . Przed każdą partią pomiarową aparat kalibrowano stosując wzorzec bieli. Pomiar barwy wykonywano w układzie CIE (1978) $L^*a^*b^*$ w trzech różnych punktach na powierzchni produktu, a uzyskane wyniki uśredniano. Pomiar tekstury hamburgerów wykonywano przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Zwicki 1120 (Zwick, Niemcy). Mierzono wartość maksymalnej siły niezbędnej do przecięcia próbki produktu (90 x 40 x 8 mm) za pomocą przystawki Warnera-Bratzlera wyposażonej w nóż płasko ścięty, poruszający się z prędkością 50 mm/min. Pomiar wykonywano trzykrotnie, a uzyskane wyniki uśredniano.

Ocenę pożądanłości konsumenckiej hamburgerów drobiowych ogrzanych na grillu elektrycznym do temperatury w centrum 55-60°C wykonywał

10-osobowy zespół (5 kobiet i 5 mężczyzn, wiek oceniających 20-55 lat) na podstawie strukturalizowanej graficznej skali 10-punktowej, na której 0 oznaczało najmniejszą, a 10 pkt największą pożądalność danej cechy. Ocenie poddano: barwę, smakowitość, twardość, soczystość i ogólną pożądalność produktów. Każda z osób otrzymywała do oceny cztery zakodowane próbki hamburgerów (ćwiartki produktów) oraz wodę do przeplukania jamy ustnej. Przed przystąpieniem do oceny organoleptycznej zespół oceniający przeszkolono definiując poszczególne wyróżniki jakości oraz sposób wykonywania oceny. Smakowitość zdefiniowano jako ogólne wrażenie smakowo-zapachowe podczas żucia i przełykania kęsa produktu, twardość jako „siłę” niezbędną do rozdrobnienia kęsa produktu do postaci umożliwiającej połknięcie, zaś soczystość jako „stopień nawilżenia” produktu odczuwalny w jamie ustnej.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej (program Statgraphics Plus 4.1, Manugistics, USA) stosując jednoczynnikową analizę wariancji ($p < 0,05$). Testowanie szczegółowe wykonano za pomocą testu Tukeya ($p < 0,05$). W przypadku każdego sortymentu hamburgerów analizę składu chemicznego wykonywano ośmiokrotnie (dwa pomiary dla każdej z czterech partii produkcyjnych; $n=8$), pomiar barwy oraz siły cięcia dwunastokrotnie (trzy pomiary dla każdej z czterech partii produkcyjnych; $n=12$). W przypadku oceny sensorycznej analizie poddano 40 próbek (dziesięć próbek w czterech sesjach; $n=40$). W celu określenia zależności między wybranymi wyróżnikami jakości organoleptycznej oraz fizyko-chemicznymi przeprowadzono analizę korelacji liniowej.

Wyniki i dyskusja

W składzie surowcowym receptur ocenianych sortymentów hamburgerów drobiowych znajdowało się mięso drobiowe oddzielone mechanicznie z kurcząt (produkty A, B i C) lub z indyka (produkt D; Tab. 1). Udział MDOM był zróżnicowany i wynosił od 38,7% (produkt D) do 75% (produkt B). W produkcie D oprócz MDOM użyto mięsa indyczego, w pozostałych produktach nie znajdowały się surowce mięsne. W przypadku produktu C nie podano ilościowej zawartości MDOM. Umieszczenie tego surowca na pierwszym miejscu w wykazie składników pozwala jedynie wnioskować, iż dominował on pod względem ilościowym. Składnikami niemięsnymi użytymi do wytworzenia produktów były: woda, mąka pszenna, skrobia ziemniaczana, sól spożywcza, wzmacniacze smaku, mieszanki przypraw, aromaty, mąka sojowa, białko sojowe, olej roślinny, regulator kwasowości.

W badaniach chemicznych ocenianych wyrobów, mimo różnorodności surowców użytych do produkcji, stwierdzono nieistotne ($p > 0,05$) różnice w zawartości wody i soli kuchennej (Tab. 2). Natomiast produkty B i D zawierały istotnie ($p < 0,05$) więcej białka niż produkt A. Najmniej tłuszczu - istotnie ($p < 0,05$) mniej niż produkty A i B – i najwięcej wody zawierał produkt C.

Oceniane produkty rynkowe wykazywały zgodność z wymaganiami zawartymi w nieobligatoryjnej normie PN-A-86528:1996 dla drobno rozdrobnionych wyrobów garmazeryjnych gotowych z mięsa drobiowego, w których zawartość tłuszczu nie powinna być większa niż 30%, zaś soli kuchennej niż 2,5%.

Tab. 2. Chemiczne i fizyczne wyróżniki jakości hamburgerów drobiowych

Cecha	Produkt			
	A	B	C	D
	$\bar{x}_{sr} \pm SD$	$\bar{x}_{sr} \pm SD$	$\bar{x}_{sr} \pm SD$	$\bar{x}_{sr} \pm SD$
Zawartość wody [%]	66,63 $\pm$ 0,59a	66,43 $\pm$ 0,64a	67,13 $\pm$ 0,15a	66,71 $\pm$ 0,40a
Zawartość białka [%]	15,61 $\pm$ 0,13a	16,11 $\pm$ 0,29b	15,91 $\pm$ 0,31ab	16,03 $\pm$ 0,34b
Zawartość tłuszczu [%]	14,68 $\pm$ 0,77b	17,73 $\pm$ 1,37b	13,03 $\pm$ 0,75a	13,53 $\pm$ 0,91ab
Zawartość NaCl [%]	2,02 $\pm$ 0,01a	1,99 $\pm$ 0,05a	2,01 $\pm$ 0,10a	2,06 $\pm$ 0,06a
Siła cięcia [N]	10,32 $\pm$ 0,69a	10,79 $\pm$ 1,08a	17,79 $\pm$ 1,23c	11,73 $\pm$ 1,06b
Parametr barwy L*	45,85 $\pm$ 1,23b	47,93 $\pm$ 1,11c	41,21 $\pm$ 1,26a	54,49 $\pm$ 1,99d
Parametr barwy a*	14,54 $\pm$ 0,81b	15,49 $\pm$ 1,11b	16,73 $\pm$ 1,16c	12,28 $\pm$ 0,81a
Parametr barwy b*	11,48 $\pm$ 1,10a	13,13 $\pm$ 1,09b	11,69 $\pm$ 1,65a	15,00 $\pm$ 1,58c

$\bar{x}_{sr}$ – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, a,b – wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$)

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zbliżone do wyników przedstawionych przez innych autorów. Według Krygiera i Maksymowicz [2008] zawartość białka i tłuszczu w hamburgerach dostępnych na polskim rynku wynosiła odpowiednio: 10,1÷24,2% oraz 8,2÷20,5%. Tak szeroki rozstęp wyników wynikał z faktu, iż ocenie poddano produkty o różnym składzie surowcowym: wołowe, drobiowe, rybne i warzywne. Natomiast Cegiełka i Pęczkowska [2008] w badaniach jakości hamburgerów drobiowych z mięsa indyczego oddzielonego mechanicznie stwierdziły, że produkty te zawierały od 62,6 do 63,2% wody, od 15,5 do 15,9% białka i od 13,6% do 15,2% tłuszczu.

Różnice w składzie recepturowym produktów, polegające na różnym udziale MDOM oraz doborze składników niemięsnych wspomagających białka mięśniowe w kształtowaniu tekstury miały istotny wpływ na siłę cięcia hamburgerów drobiowych (Tab. 2). Istotnie ($p < 0,05$) największą siłą cięcia cechował się produkt C. Był to produkt o najmniejszej zawartości tłuszczu spośród poddanych ocenie.

Dane literaturowe wskazują, że tekstura produktów mięsnych typu „burger” może być modyfikowana również przez zastosowanie składników węglowodanowych, np. preparatów błonnikowych. Na podstawie instrumentalnych

pomiarów siły cięcia wykazano, że wprowadzenie błonnika pszennego do składu recepturowego skutkowało istotnym zwiększeniem twardości hamburgerów wołowych [Cegiełka i Bonderski, 2010] oraz hamburgerów z mięsa indyczego oddzielonego mechanicznie [Cegiełka i Pęczkowska, 2008].

Badane sortymenty hamburgerów drobiowych różniły się między sobą istotnie ($p < 0,05$) pod względem wszystkich mierzonych parametrów barwy: L^* , a^* i b^* (Tab. 2). Spośród wszystkich czterech wyrobów istotnie ($p < 0,05$) najjaśniejszą barwą i najmniejszym udziałem czerwieni w ogólnym tonie barwy charakteryzował się produkt D, w składzie którego znajdowało się mięso oddzielone mechanicznie z indyka oraz mięso indycze wykrawane ręcznie. Natomiast istotnie ($p < 0,05$) najmniejszą wartość parametru L^* oraz największą wartość parametru a^* barwy stwierdzono dla produktu C. Mimo, że producent wyrobu C nie podał ilościowego udziału mięsa oddzielonego mechanicznie z kurcząt w składzie surowcowym, to ciemna barwa oraz wysoki udział czerwieni w tonie barwy mogłyby wskazywać na wysoką zawartość tego składnika. Na barwę produktów mięsnych może mieć także wpływ ilość i rodzaj użytych przypraw, jednak w przypadku wyrobu C nie podano szczegółowo, jakie przyprawy użyto, ograniczając się jedynie do wymienienia kategorii składników.

W innych badaniach dotyczących żywności wygodnej Perlo i in. [2006] wykazali, że zwiększanie udziału MDOM kosztem mięsa wykrawanego ręcznie w składzie surowcowym nuggetsów z kurcząt spowodowało wzrost wartości parametru a^* i obniżenie wartości parametru L^* barwy. Natomiast Pereira i in. [2011] zalecają zastosowanie dodatku białka kolagenowego do parówek wyprodukowanych z udziałem MDOM w celu ograniczenia obniżenia wartości parametru a^* barwy oraz zapobieżenia istotnemu obniżeniu twardości instrumentalnej produktu.

Wyniki oceny pożądalności konsumenckiej hamburgerów drobiowych wskazują, że badane sortymenty charakteryzowały się stosunkowo niską jakością sensoryczną, gdyż noty średnie uzyskane w ocenie poszczególnych wyróżników sensorycznych nie były wyższe niż 5,6 pkt w skali 10-punktowej (Tab. 3). Badane produkty nie różniły się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) pod względem pożądalności barwy, twardości oraz soczystości. Analizując wyniki oceny barwy można przypuszczać, iż nieco bardziej pożądaną barwą wśród hamburgerów drobiowych jest barwa ciemniejsza. Na podstawie analizy korelacji liniowej nie stwierdzono jednak istotnej zależności między konsumencką pożądalnością barwy hamburgerów a wartością parametrów barwy L^* i a^* mierzonych instrumentalnie (wartość współczynnika korelacji odpowiednio: $r = -0,003$ i $r = 0,005$).

Produkt C, cechujący się największą wartością siły cięcia i najmniejszą zawartością tłuszczu uzyskał notę średnią w ocenie twardości nieistotnie ($p > 0,05$) wyższą w stosunku do pozostałych hamburgerów. Twardość hamburgerów drobiowych oceniana przez konsumentów nie była jednak statystycznie istotnie

skorelowana z siłą cięcia oraz zawartością tłuszczu w produktach (wartość współczynnika korelacji odpowiednio: $r = -0,006$ i $r = 0,167$).

Tab. 3. Wyniki oceny pożądalności konsumenckiej hamburgerów drobiowych

Cecha	Produkt			
	A	B	C	D
	$\bar{x}_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	$\bar{x}_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	$\bar{x}_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	$\bar{x}_{\text{sr}} \pm \text{SD}$
Barwa [pkt]	$4,3 \pm 1,9a$	$4,1 \pm 1,5a$	$4,9 \pm 2,4a$	$4,8 \pm 1,8a$
Smakowitość [pkt]	$5,2 \pm 1,6a$	$4,2 \pm 2,1a$	$5,2 \pm 2,3ab$	$5,6 \pm 1,9b$
Twardość [pkt]	$3,9 \pm 1,3a$	$3,9 \pm 2,4a$	$4,8 \pm 2,0a$	$4,1 \pm 1,2a$
Soczystość [pkt]	$4,4 \pm 1,7a$	$4,8 \pm 2,1a$	$4,2 \pm 2,2a$	$4,3 \pm 1,8a$
Ogólna pożądalność [pkt]	$4,3 \pm 1,9a$	$4,3 \pm 1,8a$	$5,2 \pm 2,0b$	$4,8 \pm 1,9ab$

Objaśnienia jak do Tab. 2.

Produkt B, zawierający najwięcej tłuszczu, oceniono jako najbardziej pożądany pod względem soczystości. Stwierdzone różnice nie były jednak istotne ($p > 0,05$) statystycznie. Ponadto wykazano, że soczystość hamburgerów nie była istotnie liniowo zależna od zawartości tłuszczu i wody (wartość współczynnika korelacji odpowiednio: $r = 0,161$ i $r = -0,156$).

Najbardziej pożądaną smakowitością cechował się produkt D, który w ocenie tego wyróżnika uzyskał istotnie ($p < 0,05$) wyższą notę średnią niż produkty A i B. W składzie surowcowym tego wyrobu oprócz mięsa indyczego oddzielonego mechanicznie zastosowano mięso indycze wykrawane maszynowo.

Najwyższą notę w ocenie ogólnej pożądalności uzyskał produkt C, który oceniono jako istotnie bardziej pożądany niż produkty A i B. Analizując uzyskane wyniki oceny pożądalności konsumenckiej - pomimo nieistotnych różnic - stwierdzono, że produkt ten był preferowany przez oceniających pod względem pożądalności barwy i twardości. Pod względem smakowitości produkt C nie różnił się istotnie od produktu D, ocenionego jako najbardziej pożądany.

Na potrzebę optymalizacji udziału MDOM w składzie surowcowym wyrobów garmazeryjnych i zaliczanych do żywności wygodnej w celu otrzymania gotowego produktu w pełni satysfakcjonującego pod względem sensorycznym wskazują wyniki uzyskane przez Perlo i in. [2006]. Autorzy podają, że zastąpienie w składzie nuggetsów do 40% mięsa wykrawanego ręcznie przez MDOM nie pogorszyło istotnie wyglądu i barwy oraz twardości produktu finalnego. W przypadku produktów typu „burger” pogorszenie odbioru sensorycznego niektórych wyróżników jakości może być spowodowane zastąpieniem tłuszczu zwierzęcego olejem roślinnym [Cegiełka, 2011] lub zastosowaniem dodatku błonnika pszennego [Cegiełka i Bonderski, 2010].

Wnioski

1. Oceniane sortymenty hamburgerów drobiowych różniły się nieznacznie, ale statystycznie istotnie pod względem zawartości białka i tłuszczu, co najprawdopodobniej wynikało z odmiennego składu recepturowego, tj. ilości MDOM oraz zastosowania składników niemięsnych.
2. Różnice w składzie recepturowym produktów miały istotny wpływ na siłę cięcia hamburgerów drobiowych. Istotnie najwyższą siłą cięcia cechował się produkt o najmniejszej analitycznej zawartości tłuszczu spośród poddanych analizie.
3. Istotnie najjaśniejszą barwą i najmniejszym udziałem czerwieni w barwie cechował się wyrób wyprodukowany z mięsa oddzielonego mechanicznie z indyka. Produkt ten jako jedyny zawierał w składzie surowcowym oprócz mięsa oddzielonego mechanicznie mięso drobiowe (indycze) wykrawane mechanicznie.
4. Wyniki oceny pożądalności konsumenckiej hamburgerów drobiowych wskazują, że badane sortymenty hamburgerów charakteryzowała stosunkowo niska jakość sensoryczna. Istotnie największą ogólną pożądalnością konsumencką cechował się produkt charakteryzujący się największą siłą cięcia oraz największym udziałem czerwieni w ogólnym tonie barwy. Na podstawie analizy korelacji liniowej nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności między ogólną pożądalnością sensoryczną hamburgerów drobiowych a wyróżnikami jakości określanymi z zastosowaniem metod instrumentalnych: siłą cięcia, jasnością barwy (L^*), udziałem barwy czerwonej (a^*) oraz udziałem barwy żółtej (b^*) w ogólnym tonie barwy.

Literatura

- [1] Adamczyk G.: Popularność „żywności wygodnej”. *Journal of Agribusiness and Rural Development*, 2010, 4(18), 5-13.
- [2] Bełkot Z., Ziomek M., Gondek M.: Wartość odżywcza odzyskanego mechanicznie mięsa kurcząt i gęsi. *Medycyna Weterynaryjna*, 2013, 69, 499-504.
- [3] Cegiełka A.: Wpływ stopnia wymiany podgardla wieprzowego mieszaniną olejów roślinnych na jakość burgerów drobiowych. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu*, 2011, (205), 158-163.
- [4] Cegiełka A., Bonderski M.: Wpływ dodatku preparatów błonnika pszennego na jakość hamburgerów wołowych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2010, (552), 29-37.
- [5] Cegiełka A., Pęczkowska M.: Wpływ wielkości dodatku preparatu błonnika pszennego na jakość hamburgerów drobiowych. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego*, 2008, 46, (2), 1-9.

- [6] Grabowski T., Kijowski J.: Technologia przetworów drobiowych. W: Mięso i przetwory drobiowe. Technologia, higiena, jakość. Red.: Grabowski T., Kijowski J. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2004, 265-269.
- [7] Krauß I.: Auf den Spuren eines essbaren Mythos. Fleischwirtschaft, 2007, 87, (8), 77.
- [8] Krygier K., Maksimowicz K.: Jakość hamburgerów dostępnych na polskim rynku. Przemysł Spożywczy, 2008, 62, (1), 27-29.
- [9] Makała H.: Właściwości i wykorzystanie mięsa mechanicznie odkostnionego - wybrane zagadnienia. Gospodarka Mięsna, 2012, (4), 12-16.
- [10] Mielnik M.B., Aaby K., Rolfsen K., Ellekjaer M.R., Nilson A.: Quality of comminuted sausages formulated from mechanically deboned poultry meat. Meat Science, 2002, 61, 73-84.
- [11] Pereira A.G.T., Ramos E.M., Teixeira J.T., Cardoso G.P., Ramos A.L.S., Fontes P.R.: Effects of the quality of mechanically deboned poultry meat and collagen fibers on quality characteristics of frankfurter-type sausages. Meat Science, 2011, doi: 10.1016/j.meatsci.2011.05.022.
- [12] Perlo F., Bonato P., Teira G., Fabre R., Kueider S.: Physicochemical and sensory properties of chicken nuggets with washed mechanically deboned chicken meat: Research note. Meat Science, 2006, doi: 10.1016/j.meatsci.2005.09.007.
- [13] Pietrzak D., Słowiński M., Mroczek J.: Mięso drobiowe odkostnione mechanicznie. Przemysł Spożywczy, 2011, 65, (7/8), 68-71.
- [14] PN-A-86528:1996. Produkty drobiarskie. Wyroby garmażeryjne gotowe z mięsa drobiowego. Wymagania i metody badań.
- [15] PN-A-82109:2010. Mięso i przetwory mięsne. Oznaczenie zawartości tłuszczu, białka i wody. Metoda spektrometrii transmisyjnej w bliskiej podczerwieni (NIR) z wykorzystaniem kalibracji na sztucznych sieciach neuronowych (ANN).
- [16] 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. Dz. Urz. UE L 139, s. 55, z 30.04.2004 (z późn. zm.).
- [17] Stangierski J., Kijowski J., Konieczny P.: Jakość i wykorzystanie mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie. Towaroznawstwo w kształtowaniu jakości i cech prozdrowotnych żywności. Zeszyty Naukowe, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, 2011, (205), 201-211.

FENOTYPOWA I GENOTYPOWA OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI SZCZEPÓW Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS* IZOLOWANYCH Z ŻYWNOŚCI GOTOWEJ DO SPOŻYCIA

WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, ANNA ZADERNOWSKA,
LUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

Streszczenie

Celem badań było określenie fenotypowej i genotypowej oporności na antybiotyki szczepów z rodzaju *Enterococcus* spp. izolowanych z żywności (n=60) przeznaczonej do bezpośredniego spożycia, zakupionej w barach, restauracjach i fast foodach. Wyizolowano 48 szczepów, które techniką PCR zidentyfikowano jako: *E. faecalis* (n=21), *E. faecium* (n=16), *E. casseliflavus* (n=6), *E. durans* (n=3), *E. hirae* (n=2). Największy odsetek szczepów wykazywał oporność na tetracyklinę (50,0%), streptomycynę (43,8%), erytromycynę (43,8%) i rifampicynę (35,4%). U izolatów fenotypowo opornych na tetracyklinę najczęściej stwierdzano obecność genów *tet(M)* i *tet(L)*, rzadziej *tet(K)*. U wszystkich izolatów z genem *tet(M)* obecny był transpozon koniugacyjny z rodziny Tn916/Tn1545. Oporność na makrolidy kodowana była najczęściej przez gen *erm(B)*. Najczęściej oznaczanym genem wśród izolatów opornych na aminoglikozydy był *ant(6')-Ia*.

Słowa kluczowe: *Enterococcus* spp., antybiotykooporność, geny oporności

Wprowadzenie

Narastanie lekooporności wśród bakterii przez lata skupiało uwagę badaczy głównie na zagadnieniach związanych z klinicznymi aspektami tego zjawiska. Dopiero od niedawna uwagę badaczy skupiają inne obszary. Badania wykazały m.in., że jednym ze źródeł rozprzestrzeniania antybiotykooporności mogą być szczepy izolowane z żywności [Gazzola i in., 2012; Wang, 2012].

Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* są, zaraz po mikroflorze przetrwalnikującej, jednym z najbardziej odpornych na warunki panujące podczas przetwarzania żywności rodzajem bakterii. Są w stanie przeżyć w temperaturze 60°C/30 minut. Charakteryzują się dużymi zdolnościami adaptacyjnymi. Rosną w zakresie temperatur od 10 do 45°C, przy pH 4,5-9,6, w obecności 6,5% NaCl, tolerują też wysokie stężenia żółci (do 40%) [Foulquie Moreno i in., 2006]. Wszystkie te cechy sprawiają, że często stanowią tzw. „mikroflorę resztkową” w żywności. Znaczenie paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* w żywności ma dwojaki charakter. Przez wiele lat ich obecność w żywności wiązano

z niedostateczną jakością higieniczną. Z drugiej strony ze względu na zdolność do metabolizowania cytrynianów odgrywają istotną rolę w produkcji serów dojrzewających w rejonach śródziemnomorskich [Schirru i in., 2012]. Ponadto, mimo, że przez wiele lat uważane były za drobnoustroje niepatogenne, obecnie obserwuje się rosnące znaczenie enterokoków jako czynnika etiologicznego zakażeń u ludzi, głównie szpitalnych. Enterokoki wywołują zakażenia o bardzo różnym obrazie klinicznym: bakteriemie, posocznice, zapalenie wsierdza, zakażenia dróg moczowych czy zakażenia układu oddechowego [Lindenstrau i in., 2011].

Wiele publikacji poświęcono charakterystyce enterokoków pochodzenia klinicznego, natomiast wiedza na temat antybiotykooporności i obecności genów kodujących oporność u izolatów z żywności jest wciąż znikoma. Ponadto większość autorów skupia swoje badania na żywności surowej, która przed konsumpcją jest poddawana obróbce (choćby termicznej), podczas której większość mikroorganizmów i przenoszonych przez nie genów oporności ulega zniszczeniu. Niewielka liczba doniesień traktuje o żywności gotowej do spożycia jak sery czy kielbasy, natomiast brak jest doniesień na temat żywności serwowanej w barach, restauracjach i fast foodach. W krajach rozwijających się tego typu żywność jest coraz chętniej spożywana przez konsumentów. Toteż celem prowadzonych badań było określenie częstości występowania szczepów z rodzaju *Enterococcus* w próbkach żywności przeznaczonej do bezpośredniego spożycia serwowanej w barach, restauracjach i fast foodach, określenie wśród nich liczby szczepów opornych na antybiotyki oraz oznaczenie obecności determinant genetycznych odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki.

Materiał i metody badań

Badaniom poddano 60 próbek dań gotowych do spożycia: sushi, kebaby, sałatki, kanapki. Naważkę 10g namnażano w 90ml zbuforowanej wody peptonowej (Merck) w 37°C/24h. Po inkubacji wykonywano posiew izolacyjny na podłoże Słanetz'a i Bartley'a (Merck) - 37°C/24h. Celem identyfikacji, charakterystyczne kolonie przesiewano na podłoże BHI agar (Merck), wyrosłe po inkubacji (37°C/24h) kolonie zawieszano w buforze Tris-EDTA i poddawano lizie lizosomem (0.6 mg/ml) (A&A Biotechnology). DNA genomowe izolowano z użyciem zestawu Genomic Mini DNA purification kit (A&A Biotechnology). Identyfikację techniką PCR prowadzono zgodnie z protokołami zaproponowanymi przez innych autorów (Tab. 1.). Określano przynależność szczepów do gatunków: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae*. Rozdział produktów reakcji PCR prowadzono w 1,5% żelu agarozowym (Promega) w buforze 1xTBE (pH8,3). Wielkość produktów amplifikacji wyznaczano markerem wielkości 100pb (Thermo Scientific, Fermentas). Żele barwiono bromkiem etydy i wizualizowano z pomocą światła UV w transluminatorze (Gel-doc; Bio-Rad Hercules). W badaniach zastosowano

startery zsyntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie).

Tab. 1. Sekwencje starterów użytych w reakcjach PCR do identyfikacji izolatów

Rodzaj/gatunek	Sekwencja starterów (5'→3')	Produkt (pz)	Źródło
<i>Enterococcus</i> spp.	TCAACCGGGGAGGGT ATTACTAGCGATTCCGG	733	Deasy i in., 2000
<i>E. faecalis</i>	TCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT	941	Dutka-Malen i in., 1995
<i>E. faecium</i>	TTGAGGCAGACCAGATTGACG TATGACAGCGACTCCGATTCC	658	Dutka-Malen i in., 1995
<i>E. casseliflavus</i>	CGGGGAAGATGGCAGTAT CGCAGGGACGGTGATTTT	488	Kariyama i in., 2000
<i>E. gallinarum</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822	Kariyama i in., 2000
<i>E. durans</i>	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA TGAATCATATTGGTATGCAGTCCG	186	Knijff i in., 2001
<i>E. hirae</i>	TTTTGTAGACCTCTTCCGGA	377	Knijff i in., 2001

W celu potwierdzenia specyficzności zastosowanych metod, przeprowadzono równocześnie reakcję z DNA szczepów referencyjnych: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 19434, *E. gallinarum* ATCC 49573, *E. casseliflavus* ATCC 25788, *E. durans* ATCC 6056, *E. hirae* ATCC 8043.

Tab. 2. Sekwencje starterów użytych do detekcji transpozonu Tn916/Tn1545 oraz genów kodujących oporność na antybiotyki w reakcjach PCR

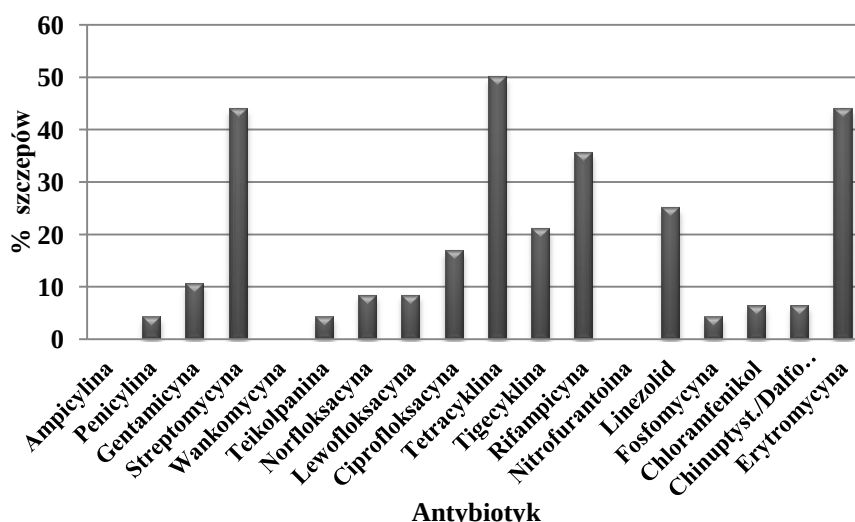
Gen	Sekwencja starterów (5'→3')	Produkt (pz)	Źródło
<i>tetM</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTTCGTACACAC	406	Roberts, 1994
<i>tetL</i>	TGGTGAATGATAGCCCAT CAGGAATGACAGCACGCTAA	229	Roberts, 1994
<i>tetK</i>	TTATGGTGGTTGTAGCTAGAAA AAAGGGTTAGAACTCTTGAAA	348	Gevers i in., 2003
<i>tetW</i>	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGCGTATCCACAATGTAAAC	168	Aminov i in., 2001
<i>tetO</i>	ACGGARAGTTTATTGTATACC TGGCGTATCTATAATGTTGAC	171	Aminov i in., 2001
<i>ermB</i>	TGGTATTCCAAATGCGTAATG CTGTGGTATGGCGGTAAGT	745	Latini i in., 1999
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	CAGAGCCTTGGAAGATGAAG CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC	348	Vakulenko i in., 2003
<i>aph(2'')-Ib</i>	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867	Vakulenko i in., 2003
<i>aph(2'')-Ic</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	Vakulenko i in., 2003
<i>aph(2'')-Id</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641	Vakulenko i in., 2003
<i>aph(3'')-IIIa</i>	GGCTAAAAATGAGAATATCACC GG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523	Vakulenko i in., 2003
<i>ant(4')-Ia</i>	CAAAGTGTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAAC	294	Vakulenko i in., 2003
<i>int (Tn916/Tn1545)</i>	GCGTGATTGTATCTCACT GACGCTCCTGTTGCTTCT	1028	Gevers i in., 2003

Oporność na antybiotyki oznaczano metodą dyfuzyjno-krążkową, zgodnie z wytycznymi KORLD (Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów) oraz ogólnoświatowymi standardami CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). W badaniach zastosowano 17 antybiotyków: ampicylina 10 µg (AMP), chloramfenikol 30 µg (CL), ciprofloksacyna 5 µg (CIP), fosfomicyna 200 µg (FOT), gentamicyna 120 µg (CN), levofloksacyna 5 µg (LEV), linezolid 30 µg (LZD), nitrofurantoina 300 µg (F), norfloksacyna 10 µg (NOR), rifampicyna 5 µg (RD), streptomycyna 300 µg (S), teicoplanina 30 µg (TEC), tetracyklina 30 µg (TE), penicilina G 10 IU (P), wancomycyna 30 µg (VA), erytromycyna 5 µg (E). Posiewy wykonywano na podłożu agarowym Mueller-Hinton (Merck). Jako szczepy testowe zastosowano *E. faecalis* ATCC 29212 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Obecność genów kodujących oporność na tetracykliny, makrolidy i aminoglikozydy oznaczano zgodnie z protokołami zaproponowanymi wcześniej (Tab.2).

Wyniki i dyskusja

Badaniom poddano 60 próbek produktów gotowych do spożycia zakupionych w barach, restauracjach i fast-foodach. Obecność paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* stwierdzono w 68,3% analizowanych próbek. Łącznie wyizolowano 48 szczepów zaklasyfikowanych do rodzaju *Enterococcus*. Ich identyfikacja oparta na technice PCR pozwoliła na wyodrębnienie 5 gatunków. Najliczniej reprezentowanymi były *E. faecalis* (n=21/43,8%), *E. faecium* (n=16/33,3) oraz *E. casseliflavus* (n=6/12,5%). Pojedyncze izolaty zaklasyfikowano do rodzajów *E. durans* (n=3/6,25%) oraz *E. hirae* (n=2/4,2%).



Rys. 1. Oporność izolatów z rodzaju *Enterococcus* ogółem

Największy odsetek szczepów wykazywał oporność na tetracyklinę (50,0%), streptomycynę (43,8%), erytromycynę (43,8%) i rifampicynę (35,4%). Żaden z badanych szczepów nie wykazywał oporności na wankomycynę, ampicylinę i nitrofurantoinę (Rys.1).

Zaobserwowano różnice w profilach oporności szczepów należących do różnych gatunków (Tab. 3). Izolaty *E. faecalis* najczęściej wykazywały oporność na tetracyklinę (n=13; 61,9%), następnie na streptomycynę (n=11; 52,4%), linezolid (n=8; 38,1% oraz erytromycynę i rifampicynę (n=7, 33,3%). Na pozostałe antybiotyki izolaty z gatunku *E. faecalis* wykazywały oporność w granicach od 19% do 4,8%. Nie stwierdzono oporności na wankomycynę, teikolpaninę, nitrofurantoinę oraz fosfomycynę.

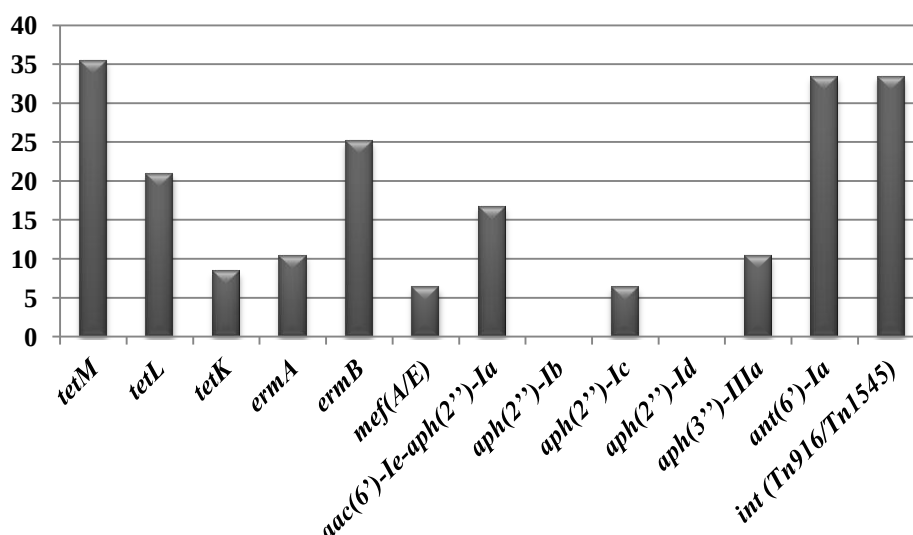
Izolaty z gatunku *E. faecium* najczęściej wykazywały oporność na erytromycynę (n=10; 62,5%), następnie na streptomycynę (n=8; 50%), tetracyklinę i tigecyklinę (n=7; 43,8%), rifampicynę (n=5, 31,3%), ciprofloksacynę (n=4; 25%). Na pozostałe antybiotyki izolaty z gatunku *E. faecium* wykazywały oporność w granicach od 18,8% do 6,3%. Żaden z izolatów nie był oporny na ampicylinę, gentamycynę, wankomycynę, nitrofurantoinę i chloramfenikol.

Tab. 3. Wyniki oporności u poszczególnych gatunków z rodzaju *Enterococcus* izolowanych z żywności gotowej do spożycia

Liczba (%) szczepów w obrębie gatunku, wykazujących oporność na dany antybiotyk					
	<i>E. faecalis</i> n = 21	<i>E. faecium</i> n = 16	<i>E.casseliflavus</i> n = 6	<i>E. durans</i> n = 3	<i>E.hirae</i> n = 2
Ampicylina	0	0	0	0	0
Penicylina	1 (4,8)	1 (6,3)	0	0	0
Gentamycyna	3 (14,3)	0	2 (33,3)	0	0
Streptomycyna	11 (52,4)	8 (50,0)	2 (33,3)	0	0
Wankomycyna	0	0	0	0	0
Teikolpanina	0	1 (6,3)	1 (16,7)	0	0
Norfloksacyna	2 (9,5)	2 (12,5)	0	0	0
Lewofloksacyna	1 (4,8)	3 (18,8)	0	0	0
Ciprofloksacyna	4 (19,0)	4 (25,0)	0	0	0
Tetracyklina	13 (61,9)	7 (43,8)	1 (16,7)	1 (33,3)	2 (100)
Tigecyklina	3 (14,3)	7 (43,8)	0	0	0
Rifampicyna	7 (33,3)	5 (31,3)	2 (33,3)	1 (33,3)	2 (100)
Nitrofurantoina	0	0	0	0	0
Linezolid	8 (38,1)	3 (18,8)	1 (16,7)	0	0
Fosfomycyna	0	1 (6,3)	1 (16,7)	0	0
Chloramfenikol	2 (9,5)	0	1 (16,7)	0	0
Chinuptystyna/ Dalfoprytyna	nb.	2 (12,5)	1 (16,7)	0	0
Erytromycyna	7 (33,3)	10 (62,5)	0	2 (66,7)	2 (100)

Wśród izolatów z gatunku *E. casseliflavus* najczęściej stwierdzano oporność wobec streptomycyny, gentamycyny i rifampicyny (n=2; 33%) . Na antybiotyki z grupy tetracyklin, linezolid, chinuprystynę/dalfoprystynę, chloramfenikol i fosfomycynę oporność stwierdzano najwyżej u jednego szczepu (16,7%). Natomiast wszystkie izolaty z tego rodzaju charakteryzowały się wrażliwością na 8 badanych antybiotyków: wankomycynę, tigecyklinę, erytromycynę, nitrofurantoinę oraz antybiotyki z grupy fluorochinolonów.

U izolatów z rodzajów *E. durans* i *E. hirae* stwierdzono oporność jedynie wobec 3 antybiotyków: tetracykliny, rifampicyny i erytromycyny. Na pozostałe antybiotyki szczepy były wrażliwe. Jako, że najczęściej stwierdzano oporność wobec aminoglikozydów (streptomycyna, gentamycyna), tetracyklin (tetracyklina, tigecyklina) i makrolidów (erytromycyna) badano obecność genów kodujących te grupy antybiotyków.



Rys. 2. Występowanie genów kodujących oporność na tetracykliny, makrolidy, aminoglikozydy oraz transpozonu Tn916/Tn1545 u szczepów z rodzaju *Enterococcus*

U izolatów fenotypowo opornych na tetracyklinę najczęściej stwierdzano obecność genów *tet(M)* i *tet(L)*. U żadnego z izolatów nie stwierdzono obecności innych, poza *tet(K)* genów odpowiedzialnych za aktywne usuwanie antybiotyku z komórki (tzw. mechanizm efflux). Gen *tet(K)* oznaczono jedynie wśród izolatów z gatunku *E. faecalis*. Nie stwierdzono obecności genu *tet(O)* oraz *tet(W)* (Rys. 2).

Wśród genów kodujących oporność na makrolidy, najczęściej stwierdzano obecność genu *erm(B)*, którego mechanizm ekspresji polega na zaburzoną transporcie antybiotyku do wnętrza komórki. Pozostałe geny kodujące

makrolidy: *erm*(A), *mef*(A/E) oznaczono u jedynie u szczepów z gatunku *E. faecalis* i *E. faecium*.

W przenoszeniu genów oporności na antybiotyki oprócz plazmidów koniugacyjnych uczestniczą także inne mobilne elementy genetyczne np. transpozony zwane też "wędrującymi genami" lub "skaczącymi genami". W związku z powyższym oznaczano także obecność transpozonu koniugacyjnego z rodziny Tn916-Tn1545, kodowanego przez gen integrazy *int*. Na transpozonie tym zlokalizowane są m in. geny *tet*(M) i *erm*(B). Obecność genu *int* oznaczono u ponad 33,3% izolatów.

Najczęściej oznaczanymi genami kodującymi oporność na antybiotyki aminoglikozydowe były *ant*(6')-Ia (33,3%); *aac*(6')-Ie-*aph*(2'')-Ia (16,6%) oraz *aph*(3'')-IIIa (10,4%). Jedynie u izolatów z gatunku *E. faecalis* stwierdzono obecność genu *aph*(2'')-Ic. Obecność genów kodujących oporność na poszczególne grupy antybiotyków zdecydowanie częściej obserwowano u izolatów z rodzaju *E. faecalis* i *E. faecium* (Tab. 4).

Tab. 4. Obecność genów oporności u poszczególnych gatunków z rodzaju *Enterococcus* izolowanych z żywności gotowej do spożycia

Liczba (%) szczepów w obrębie gatunku, wykazujących oporność na dany antybiotyk					
	<i>E. faecalis</i> n = 21	<i>E. faecium</i> n = 16	<i>E. casseliflavus</i> n = 6	<i>E. durans</i> n = 3	<i>E. hirae</i> n = 2
<i>tetM</i>	11 (52,4)	5 (31,3)	0	1 (33,3)	0
<i>tetL</i>	7 (33,3)	2 (12,5)	1 (16,7)	0	0
<i>tetK</i>	4 (19,0)	0	0	0	0
<i>ermA</i>	2 (9,5)	3 (18,8)	0	0	0
<i>ermB</i>	4 (19,0)	7 (43,8)	0	0	1 (50,0)
<i>mef</i> (A/E)	1 (4,8)	2 (12,5)	0	0	0
<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia	3 (14,3)	4 (25,0)	1 (16,7)	0	0
<i>aph</i> (2'')-Ib	0	0	0	0	0
<i>aph</i> (2'')-Ic	3 (14,3)	0	0	0	0
<i>aph</i> (2'')-Id	0	0	0	0	0
<i>aph</i> (3'')-IIIa	5 (23,1)	0	0	0	0
<i>ant</i> (6')-Ia	7 (33,3)	7 (43,8)	2 (33,3)	0	0
<i>int</i> (Tn916/Tn1545)	11 (52,4)	5 (31,3)	0	1 (33,3)	0

Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* to drobnoustroje będące naturalną mikroflorą przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt skąd bardzo często dostają się do środowiska oraz żywności. Dane literaturowe wskazują na ich częste występowanie w mięsie, zwłaszcza drobiu i wieprzowinie [Silfrany i in., 2013], serach, kielbasach fermentowanych [Chajęcka-Wierzchowska i in., 2012] czy rybach [Hammad i in., 2014]. Okazuje się zatem, że łańcuch żywieniowy może odgrywać kluczową rolę w transmisji oporności [Marshall i in., 2009]. Analiza uzyskanych w niniejszej pracy wyników potwierdza częste występowanie

antybiotykoopornych enterokoków w żywności gotowej do spożycia. W przeprowadzonych badaniach oporność na przynajmniej jeden antybiotyk stwierdzono u ponad połowy wyizolowanych szczepów. Najczęściej stwierdzano oporność na tetracyklinę, która kodowana była przez geny odpowiedzialne za aktywne usuwanie antybiotyku z komórki (tzw. mechanizm efflux) *tet(L)* i *tet(K)* oraz gen *tet(M)*, który uniemożliwia związanie rybosomu z antybiotykiem [Roberts, 2005]. Są to geny powszechnie występujące także u izolatów klinicznych [Huys i in., 2004]. Zazwyczaj kodowane są na mobilnych elementach koniugacyjnych (np. oznaczonym w tej pracy transpozonie Tn916/Tn1545), co powoduje, że mogą być łatwo przenoszone i przekazywane innym bakteriom w tym mikroflorze przewodu pokarmowego człowieka [Wilcks i in., 2005].

Na transpozonie koniugacyjnym Tn916/Tn1545 często umiejscowione są także geny *erm(B)* [Hummel i in., 2007]. Mechanizm ich ekspresji polega na zaburzonym transporcie antybiotyku do wnętrza komórki co powoduje zmianę miejsca docelowego działania antybiotyku [Portillo i in., 2000]. Są to najbardziej rozpowszechnione wśród enterokoków geny kodujące oporność na makrolidy. Szacuje się, że powszechne występowanie w żywności, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego, oporności na makrolidy może wynikać ze podawania zwierzętom tylozyny, antybiotyku z grupy makrolidów, co mogło powodować wykształcenie oporności krzyżowej na nie [Thumu i Halami, 2012].

Niepokojący jest także wysoki odsetek szczepów opornych na aminoglikozydy, ponieważ są one uważane za antybiotyki wyboru w leczeniu infekcji enterokokowych (w kombinacji z glikopeptydami lub/i β -laktamami). Niestety oporność na aminoglikozydy opisywali także inni badacze analizujący m.in. sery i wędliny [Hayes i in., 2003; De Jong i in., 2009].

Wśród izolatów nie stwierdzono co prawda szczepów opornych na wankomycynę, natomiast niepokój budzi oporność na linezolid, uważany za lek ostatniej szansy w zakażeniach wankomycynoopornymi paciorkowcami z rodzaju *Enterococcus*.

Wnioski

Żywność gotowa do spożycia, może być istotnym źródłem opornych i wieloopornych ziarniaków z rodzaju *Enterococcus* spp. Bakterie te będąc nośnikami genów oporności mogą przekazywać je innym rodzajom. Niepokojący jest również fakt ciągłego wzrastania odsetka szczepów opornych izolowanych z żywności. Problem antybiotykooporności jest problemem globalnym, a żywność jest naturalnym rezerwuarem zarówno opornych ziarniaków jak i genów determinujących oporność rozprzestrzeniających się horyzontalnie. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność monitorowania żywności, pod kątem obecności antybiotykoopornych paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* oraz możliwości przenoszenia i przekazywania genów oporności na antybiotyki.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/N/NZ9/01630.

Literatura

- [1] Aminov R. I., Garrigues-Jeanjean N., Mackie R.I.: Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67, 22–32.
- [2] Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Nalepa B., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in ready-to-eat food of animal origin. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(39), 6773-6780.
- [3] De Jong A., Bywater R., Butty P., Deroover E., Godinho K., Klein U., Marion H., Simjee S., Smets K., Thomas V., Vallé M., Wheadon A.: A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 63, 733–744.
- [4] Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M., Beresford T.P.: A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, 23(4), 510-522.
- [5] Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P.: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33, 24–27.
- [6] Foulquie Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L.: The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106, 1–24.
- [7] Gazzola S., Fontana C., Bassi D., Cocconcelli P.S.: Assessment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture-dependent and independent methods. *Food Microbiology*, 2012, 30, 348-354.
- [8] Gevers, D., Danielsen M., Huys G., Swings J.: Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69, 1270-1275.
- [9] Hammad A.M., Shimamoto T., Shimamoto T.: Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Food Control*, 2014, 19, 886-892.
- [10] Hayes J.R., English L.L., Carter P.J., Proescholt T., Lee K.Y., Wagner D.D., White D.G.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 7153-7160.

- [11] Hummel A.S., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.: Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3), 730-739.
- [12] Huys G., D'Haene K., Collard J.-M., Swings J.: Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70, 1555–1562.
- [13] Kariyama R., Mitsuhashi R., Chow J. W., Clewell D. B., Kumon H.: Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000. 38, 3092-3095.
- [14] Knijff, E., Dellaglio F., Lombardi A., Andrighetto C., and Torriani S.: Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *Journal of Microbiological Methods* 2001, 47, 35-40.
- [15] Latini L., Ronchetti M.P., Merolla R., Guglielmi F., Bajaksouzian S., Villa M.P., Jacobs M.R., Ronchetti R.: Prevalence of *mef*(E), *erm* and *tet*(M) genes in *Streptococcus pneumoniae* strains from central Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 13, 29–33.
- [16] Lindenstrau A.G., Pavlovic M., Bringmann A., Behr J., Ehrmann M.A., Vogel R.F.: Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34, 553-560.
- [17] Portillo A., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Alonso A., Martinez J. L. and Torres C.: Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44, 967–971.
- [18] Roberts M.C.: Epidemiology of tetracycline resistance determinants. *Trends in Microbiology*, 1994, 2, 353–357.
- [19] Roberts M.C.: Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 245, 195-203.
- [20] Schirru S., Todorov S.D., Favaro L., Mangia N.P., Basaglia M., Casella S., Comunian R., Franco B.D.G.M., Deiana P.: Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. *Food Control*, 2012, 25(1), 309-320.
- [21] Silfrany R.O., Caba R.E., Soli'S De Los Santos F., Hanning I.: Detection of quinolones in poultry meat obtained from retail centers in Santiago Province, the Dominican Republic. *Journal of Food Protection*, 2013, 76(2), 352-354.
- [22] Thumu S.C.R., Halami P.M.: Acquired resistance to Macrolide-Lincosamide–Streptogramin antibiotics in Lactic Acid Bacteria of food origin. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52, 530–537.
- [23] Vakulenko S.B., Donabedian S.M., Voskresenskiy A.M., Voskresenskiy A.M., Zervos M.J., Lerner S.A.: Multiplex PCR for detection

- of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47, 1423-1426.
- [24] Wang H.: The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Scientific and Technical Review.*, 2012, 31, 249-260.
- [25] Wilcks A., Andersen S.R., Licht T.R.: Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from raw food. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243, 15-19.

PRZECIWBAKTERYJNE WŁAŚCIWOŚCI PROPOLISU I MLECZKA PSZCZELEGO

ALEKSANDRA EJSMONT, ANNA ZADERNOWSKA, ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

Streszczenie

Przeciwbakteryjne oddziaływanie produktów pszczelich jest ściśle związane ze składem chemicznym, regionem pochodzenia i rodzajem pożytków, z których je pozyskano. Celem pracy było określenie aktywności przeciwbakteryjnej 10% bezalkoholowego i etanolowego ekstraktu propolisu oraz mlecza pszczelego o stężeniach 100%, 80%, 50% i 20%. Działanie przeciwdrobnoustrojowe produktów pszczelich badano metodą studzienkową. Próbę kontrolną dla propolisu stanowił alkohol etylowy, natomiast dla mlecza pszczelego płyn fizjologiczny. Jako szczepy testowe zastosowano: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* wyizolowane z żywności. 24 godzinne hodowle szczepów testowych rozcieńczono do 0,5 skali McFarlanda, następnie posiewano powierzchniowo na podłożu Müllera-Hintona. Studzienki wycinano przy użyciu jałowego korkoboru o średnicy $\varnothing=7\text{mm}$. Do studzienek dodawano po 100 μl badanych roztworów. Badania wykonano w trzech powtórzeniach. Hodowle inkubowano w warunkach optymalnych dla rozwoju stosowanych szczepów. Po inkubacji mierzono strefy zahamowania wzrostu testowych szczepów. Zarówno propolis, jak i mleczko pszczele charakteryzują się silnym działaniem przeciwdrobnoustrojowym zarówno względem drobnoustrojów gramododatnich jak i gramujemnych. Nie zauważono różnic pomiędzy działaniem etanolowego ekstraktu i wodnego roztworu propolisu. Wszystkie badane stężenia mlecza pszczelego wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe. Najsilniejsze działanie zaobserwowano w 100% i 80% stężeniu. Nie zauważono różnic w przeciwbakteryjnym działaniu mlecza pszczelego o stężeniu 50% oraz 20%.

Słowa kluczowe: właściwości przeciwdrobnoustrojowe, propolis, mleczko pszczele, apiterapia

Wprowadzenie

Produkty pszczele stosowane są w profilaktyce, jako środki przeciw dolegliwościom i zakażeniom wywoływanym przez liczne drobnoustroje. Wykorzystanie produktów pszczelich, takich jak propolis lub mleczko pszczele nosi nazwę apiterapii [Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2007].

Propolis

Słowo propolis pochodzi z języka greckiego i w tłumaczeniu oznacza kit pszczeli. Jest to substancja o klejącej i ciągliwej konsystencji. Przybiera kolor ciemnożółty, brunatny, zielony aż do pomarańczowego. Propolis cechuje się bardzo intensywnym zapachem. Wytwarzany jest w wyniku mieszania substancji żywicznych pochodzących z pąków roślin wraz z enzymami gruczołów ślinowych pszczół [Wilde, 2008]. W zastosowaniu propolisu do dalszych badań lub wykorzystania w przemyśle m.in. farmaceutycznym lub kosmetycznym wskazane jest przygotowanie koncentratu propolisowego na drodze ekstrakcji 70% roztworem etanolu, a następnie zagęszczając go pod zmniejszonym ciśnieniem [Kędzia, 2006, Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2006].

W składzie chemicznym propolisu zdecydowanie dominują związki fenolowe, do których zaliczamy m.in. galanginę, chryzynę, a także pinocembrinę. Stanowią one przeszło 78% w zagęszczonym wyciągu propolisu. Substancje lipidowe, do których zaliczamy kwasy tłuszczowe wraz z ich estrami, węglowodory oraz sterole stanowią średnio 10,8% składu chemicznego propolisu. Terpeny występujące w skoncentrowanym wyciągu propolisu stanowią jedynie 0,8% jego składu chemicznego. Dotychczasowo w propolisie stwierdzono obecność 30 biopierwiastków, pomiędzy którymi w największych ilościach występują: wapń, cynk, mangan, glin, krzem, a także żelazo. W niewielkich ilościach występują: białka, witaminy, enzymy, wolne aminokwasy, a także węglowodany. Kwas kawowy, flawonony oraz flawony łącznie z estrami przyczyniają się do zahamowania rozwoju bakterii pochodzenia zwierzęcego oraz roślinnego, powodujących zanieczyszczenia pyłku oraz wody przynoszonej przez pszczoły do ula [Gliński i in. 2011].

Pierwsze informacje o właściwościach zdrowotnych propolisu wywodzą się z doniesień ludowych, które podają, że propolis wykazuje działanie przeciwbólowe silniejsze od działania nowokainy. Propolis ze względu na szerokie spektrum działania względem bakterii gramododatnich, gramujemnych oraz wielu gatunków grzybów i wirusów stosowany jest w różnych postaciach, m.in. w formie ekstraktu - produkt o wysokiej zawartości substancji czynnych. Znajduje zastosowanie w kosmetyce, farmacji oraz zestawach żywnościowych. Wyciąg z propolisu z dodatkiem glikolu propylenowego - jest stosowany w kosmetyce i dermatologii, jako środek stymulujący regenerację tkanek. Wyciąg z propolisu rozpuszczalny w tłuszczach - znalazł zastosowanie głównie w kosmetyce przy produkcji środków regenerujących i ochronnych takich jak balsamy do ust. Ekstrakt propolisu rozpuszczalny w wodzie występuje w produktach o działaniu przeciwegrzybicznym i przeciwłupieżowym. Szlachetne woski propolisu stosowane są, jako środki regenerujące po operacjach w formie maści i kremów. Mączka propolisowa i fitokompleks propolisowy znalazły zastosowanie w produkcji gotowych zestawów żywnościowych, a także ich konserwacji [Kałużny, 1992]. Uznaje się, że za właściwości przeciwdrobnoustrojowe propolisu odpowiedzialne

są flawonoidy i estry kwasów fenolowych. Ich ilość w propolisie zależy jest od regionu zbioru i pożytków, z których powstał [Lu i in., 2005]. Jednym z najbogatszych źródeł flawonoidów i związków fenolowych jest etanolowy ekstrakt propolisu - EEP. Charakteryzuje się on licznymi właściwościami, w tym działaniem przeciwbakteryjnym. Liczne badania propolisu wykazują, że działa on hamująco względem bakterii gramdodatnich oraz gramujemnych takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus mutans* [Alencar i in. 200, Cardoso i in. 2010], *Streptococcus viridans*, *Enterococcus* ssp., [Salomão i in. 2008], *Salmonella* [Fernandes, 2005]. Wysoką wrażliwość na działanie etanolowego wyciągu propolisu wykazują dwoinki zapalenia płuc *Diplococcus pneumoniae*, prątki gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*, a także *Neisseria catarrhalis* [Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2013]. Kit pszczeli zawierający w swoim składzie niewielkie stężenia galanginy bardzo silnie działają na szczepy gronkowca złocistego niewrażliwego na działanie penicylin oraz metycilinę - MRSA, który od wielu lat stanowi jedną z głównych przyczyn zakażeń szpitalnych oraz pozaszpitalnych. Ekstrakt propolisu znalazł zastosowanie w leczeniu opornego na antybiotyki makrolidowe (np. erytromycynę) paciorkowca ropnego *Streptococcus pyogenes* będącego przyczyną dolegliwości związanych m.in. z układem oddechowym, takich jak zapalenie gardła i migdałków podniebiennych a nieleczony może prowadzić do paciorkowcowego zespołu wstrząsu toksycznego - *streptococcal toxic shock syndrome* [Stefańska 2003, Wojtyczka i in., 2012, Szczypa i in. 2013]. Badania kliniczne dotyczące właściwości zdrowotnych propolisu dowiodły, że działa on korzystnie na cały organizm. Naukowcy w licznych publikacjach wskazują na zróżnicowane działanie propolisu względem bakterii, grzybów, a także pierwotniaków. Propolis działa na patogeny, np. gronkowce, paciorkowce i maczugowce. Suchy [1974] w przeprowadzonych badaniach wskazał na wpływ propolisu w leczeniu rzęsistka pochwowego *Trichomonas vaginalis*. Ulegał on całkowitemu zniszczeniu pod wpływem działania alkoholowym roztworem propolisu w stężeniu od 3 do 9 mg/ml w czasie 24 godzin. Niewielkie stężenia propolisu (0,05 - 0,15 mg/mg) wystarczą do zniszczenia żywych form pierwotniaka *Toxoplasma gondii* wywołującego u ludzi chorobę odzwierzęcą - toksoplazmozę. Liu i in. [2012] udowodnili, że zawarty w propolisie antyoksydacyjny flawonoid pinocembryna powoduje zatrzymanie neurodegeneracyjnego oddziaływania β -amyloidów na neurony w mózgu odpowiadające za rozwój choroby Alzheimer'a.

Mleczko pszczele

Mleczkiem pszczelim nazywamy wydzielinę pochodzącą z gruczołów gardzieliowych i żuwaczkowych pszczół robotnic - karmicielek. Gruczoły te uaktywniają się pomiędzy 3, a 6 dniem życia takiej pszczoły. pH mleczka pszczelego wynosi od 4,1 do 4,8. Jest ono barwy jasnokremowej do niebieskoszarej posiada ostry specyficzny zapach. W smaku jest cierpko

kwaśne, natomiast w konsystencji półpłynne, gęste i maziste przypominające śmietankę [Wilde, 2008].

W mleczku pszczelim wyróżniamy 7 grup związków chemicznych: tłuszcze, białka i peptydy, cukry, substancje mineralne, aminokwasy, hormony oraz witaminy [Prabucki, 1998, Wilde, 2008]. Mleczko pszczele znalazło zastosowanie jako środek wspomagający tradycyjne formy leczenia. Pomaga uzupełnić niedobory substancji w codziennej diecie. Dzięki swoim właściwościom biologicznym wspomaga funkcjonowanie układu nerwowego i poprawia kondycję psychiczną. Za właściwości przeciwdrobnoustrojowe mleczka pszczelego względem bakterii gramdodatnich jak i gramujemnych odpowiadają takie składniki jak: kwasy tłuszczowe 3-hydroksydodekanowy, 11-oksydodekanowy, 11-S-hydroksydodekanowy, a także niektóre peptydy i proteiny. Mleczko pszczele hamuje bakterie gramdodatnie oraz gramujemne, przy czym silniejsze działanie zaobserwowano względem drobnoustrojów gramdodatnich. Działanie antybakteryjne mleczka pszczelego jest spowodowane obecnością nadktenu wodoru oraz polipeptydów: rojalizyny i jellein [Fontana, 2004]. Jelleiny I do III wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową względem bakterii gramdodatnich oraz gramujemnych, a także wobec drożdży *Candida albicans* [Gliński i in. 2011, Bogdanov i in. 2014]. Miejscem docelowego działania rojalizyn jest ściana komórki bakteryjnej. Rojalizyny są aktywne szczególnie wobec *Peantibacillus larvae*. Garcia i in. [2010] w swoich badaniach wskazują na działanie przeciwbakteryjne mleczka pszczelego względem *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Mleczko pszczele poddane rozcieńczeniu w eterze, alkoholu, acetonie i wodzie ma zdolność zahamowania rozwoju paciorkowców, dwoinek zapalenia płuc, prątków gruźlicy, gronkowca złocistego, pałeczki okrężnicy, duru brzuszego a także czerwoni. Unieszkodliwia wirusy grypy, opryszczki, hamuje rozwój drożdżaków i pleśni [Kałużny, 1992]. Moselhy i in. [2013] przeprowadził badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych mleczka pszczelego metodą studzienkową. Testowymi szczepami były gramdodatnie *Staphylococcus aureus* oraz *Bacillus subtilis*, gramujemne *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*, pleśnie *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* oraz drożdże *Candida albicans*. Uzyskał następujące wyniki: Mleczko pszczele zahamowało rozwój drobnoustrojów gramdodatnich oraz drożdży i pleśni, natomiast wśród drobnoustrojów gramujemnych strefy zahamowania wzrostu stwierdzono wyłącznie wobec szczepów *Escherichia coli*.

Celem pracy było określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej 10% etanolowego ekstraktu propolisu, wodnego roztworu propolisu i mleczka pszczelego w stężeniach 100%, 80%, 50% i 20% względem bakterii patogennych wyizolowanych z żywności.

Material i metody badań

Materiał do badań stanowiły: 10% etanolewy ekstrakt propolisu, 10% wodny roztwór propolisu, a także mleczko pszczele w stężeniach 100%, 80%, 50% i 20%, zakupione w sklepie z produktami pszczelarskimi. Testowe szczepy *Salmonella sp.* (6 szczepów: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27), którym nadano w tabeli numery od 1 do 6), *Listeria monocytogenes* (6 szczepów: 47, 50, 51, 52, 57, 60), którym nadano w tabeli numery od 1 do 6) oraz *Staphylococcus aureus* (6 szczepów: 17240, 16270, 17260, 15342, 20041, ak2), którym nadano w tabeli numery od 1 do 6) wyizolowane we wcześniejszych badaniach z żywności gotowej do spożycia (RTE), pochodzący z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności. Szczepy aktywowano w bulionie odżywczym (MERCK). 24 godzinne hodowle szczepów testowych rozcieńczono do 0,5 w skali McFarlanda. W celu oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej na podłożu Müllera-Hintona (MERCK) posiewano powierzchniowo 100µl hodowli szczepów drobnoustrojów, następnie przy użyciu jałowego korkobora o średnicy $\varphi=7$ mm wycinano w każdej płytce po 3 studzienki. Do każdej z nich dodawano kolejno po 100µl 10% etanolewego roztworu propolisu (EEP) oraz 10% bezalkoholowego roztworu propolisu. Jako próbę kontrolną zastosowano alkohol etylowy (70%). Do badań przeciwbakteryjnego działania mleczka pszczelego, w podłożu przygotowanym, jak w badaniu propolisu wycinano 5 studzienek i dodawano po 100µl świeżego mleczka pszczelego w 100% stężeniu oraz w roztworach 80%, 50% oraz 20%. Mleczko pszczele rozcieńczano w płynie fizjologicznym, który zastosowano również, jako próbę kontrolną. Badanie prowadzono każdorazowo w trzech powtórzeniach. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 h. Po inkubacji mierzono suwmiarką strefę zahamowania wzrostu drobnoustrojów. Wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej propolisu przedstawione są w Tabeli 1.

Wyniki i dyskusja

Uzyskane w przeprowadzonych badaniach wyniki wskazują, że propolis to produkt o właściwościach przeciwbakteryjnych. Zahamowanie wzrostu zaobserwowano u wszystkich badanych drobnoustrojów, zarówno gramdodatnich, jak i gramujemnych. Nieznacznie silniejsze działanie etanolewego ekstraktu propolisu, a także bezalkoholowego roztworu propolisu stwierdzono względem *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*, których strefy zahamowania wzrostu niektórych szczepów wynosiły kolejno od 13,5 do 16,5 mm oraz od 12 do 14,5 mm. Nie stwierdzono jednak różnic w antybakteryjnym działaniu pomiędzy etanolewym, a bezalkoholowym ekstraktem propolisu. Zbliżone wyniki przedstawił w swojej publikacji Stepanović i in. [2003], który w badaniach przeciwbakteryjnych właściwości propolisu względem gronkowca złocistego zaobserwował strefy zahamowania wzrostu w granicach od 9 do 13 mm. Wyniki zbliżone do uzyskanych względem aktywności propolisu wobec

Salmonella sp. przedstawił Kędzia i Hołderna - Kędzia [2009], dla której średnia strefa zahamowania wzrostu wynosiła 11 mm.

Tab. 1. Antybakteryjne działanie propolisu [mm]

Stężenie 10%		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
		<i>Salmonella sp.</i>						<i>Listeria monocytogenes</i>						<i>Staphylococcus aureus</i>					
Propolis	Roztwór alkoholowy	12,5	11	12,5	12,5	14,5	12	14,5	13,5	14,5	15	16,5	14	14,5	13,5	14	13,5	12	14
	Roztwór bezalkoholowy	11	11,5	11	13	13,5	13,5	15	14	12,5	12,5	15,5	14	15	14	13,5	14,5	11,5	16

W tabeli nr 2 przedstawiono wyniki antybakteryjnego działania mlecza pszczelego.

Tab. 2. Antybakteryjne działanie mlecza pszczelego [mm]

Mleczko pszczele		Stężenie [%]	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
			<i>Salmonella sp.</i>						<i>Listeria monocytogenes</i>						<i>Staphylococcus aureus</i>					
	100	16,5	16,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17	18,5	17	17,5	18	16,5	17,5	17,5	19	17,5	17,5
	80	14,5	15,5	16,5	15,5	16,5	17	16,5	15,5	18,5	15,5	16,5	15,5	15,5	15,5	15,5	17,5	16,5	17,5	17,5
	50	13,5	12,5	14,5	14	15	14,5	14,5	13	16,5	15,5	14,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	15,5	15,5	15,5
	20	12,5	12,5	11,5	12	12,5	12,5	13,5	12	13,5	13,5	13,5	12,5	11,5	11,5	7,5	12	13,5	14,5	14,5

Mleczko pszczele jest produktem o silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Najsilniejsze działanie stwierdzono stosując mleczko nierozcieńczone. Średnice zahamowania wzrostu wszystkich badanych drobnoustrojów wynosiły powyżej 15 mm. Nieznacznie słabszym działaniem wykazało się mleczko pszczele o stężeniu 80%, które spowodowało powstanie stref zahamowania wzrostu 6 szczepów *Salmonella sp.* wynoszących od 14,5 do 17,5 mm, 6 szczepów *Listeria monocytogenes* wynoszących od 15,5 do 18,5 mm oraz 6 szczepów *Staphylococcus aureus* wynoszących od 15,5 do 17,5 mm.

Nie zauważono różnic pomiędzy przeciwdrobnoustrojowym działaniem 50% i 20% mlecza pszczelego, których strefy zahamowania wzrostu wahają się w granicach od 7,5 do 16,5 mm. Prezentowane wyniki są zbieżne z wynikami przedstawionymi przez Garcia i in. [2010], w których wielkość stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów *Staphylococcus aureus* powodowanych przez nierozcieńczone mleczo pszczele wynosiła od 14,7 do 17,3 mm, przez mleczo pszczele o 80% stężeniu wynosiła od 6,7 do 14,7 mm, przez mleczo pszczele o 50% stężeniu 5,7 mm, natomiast stosując 20% stężenie mlecza pszczelego nie stwierdzono zahamowania wzrostu.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań, których celem było określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej 10% etanolowego ekstraktu propolisu, wodnego roztworu propolisu i mlecza pszczelego stężeniach 100%, 80%, 50% i 20% względem bakterii patogennych wyizolowanych z żywności, możliwe było sformułowanie następujących wniosków:

- Zarówno propolis jak i mleczo pszczele charakteryzują się silnym działaniem przeciwdrobnoustrojowym zarówno względem bakterii gramdodatnich jak i gramujemnych.
- Nie zauważono różnic pomiędzy działaniem 10% etanolowego i bezalkoholowego roztworu propolisu
- Mleczo pszczele wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe względem szczepów testowych już w 20% stężeniu.
- Nie zauważono różnic w przeciwbakteryjnym działaniu mlecza pszczelego w 50% i 20% stężeniu.

Literatura

- [1] Alencar S.M, Oldoni T.L.C, Castro M.L, Cabral I.S.R, Costa-Neto C.M, Cury J.A, Rosalen P.L, Ikegaki M.: Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis; Red propolis. *Journal of Ethno-Pharmacology*, 2007, 5, 278-283.
- [2] Bogdanov S. i in.: Royal Jelly, Bee Brood, Composition, Health, Medicine: A Review. *Bee Product Science*, 2014, 2, 1-35.
- [3] Cardoso R.L., Maboni F., Machado G., Alves S.H., de Vargas A.C.: Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Veterinary Microbiology*, 2010, 142, 432-434.
- [4] Fernandes A Jr., Balestrin E.C., Montelli A.C.: Propolis:anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias de Instituto Oswaldo Cruz*, 2005, (5)100, 563-566.

- [5] Fontana R., Mendes M.A., de Souza B.M., Konno K., Cesar L.M.M., Malaspina O., Palma M.S.: Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees. *Peptides*, 2004, 25, 919-928.
- [6] Garcia M., Finola M.S., Marioli J.M.: Antibacterial activity of Royal Jelly against bacteria capable of infecting cutaneous wounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2010, 2(3), 93-99.
- [7] Gliński Z., Buczek K., Marć M.: Zjawiska i mechanizmy odporności przeciwwzakaźnej pszczoły miodnej - nowe osiągnięcia. *Życie Weterynaryjne*, 2011, 86(9), 684-693.
- [8] Kałużny E.: *Pszczoła apteczka*. Wyd. II. Wydawnictwo Apiherba, Leszno 1992.
- [9] Kędzia B., Hołderna-Kędzia E.: Wykorzystanie propolisu i miodu w zakażeniach. *Postępy Fitoterapii*, 2007, 4, 202-206.
- [10] Kędzia B., Hołderna-Kędzia E.: Produkty pszczele w żywieniu i suplementacji diety. *Postępy Fitoterapii*, 2006, 4, 213-222.
- [11] Kędzia B., Hołderna-Kędzia E.: Działanie propolisu krajowego na drobnoustroje chorobotwórcze pochodzące od ludzi i zwierząt. *Postępy Fitoterapii*, 2009, 2, 98-105.
- [12] Kędzia B., Hołderna-Kędzia E.: Aktywność antybiotyczna propolisu krajowego i europejskiego. *Postępy Fitoterapii*, 2013, 2, 97-107.
- [13] Kędzia B.: Skład chemiczny i aktywność biologiczna propolisu pochodzącego z różnych rejonów świata. *Postępy Fitoterapii*, 2006, 1, 23-25.
- [14] Lu L.C., Chen Y.W., Chou C.C.: Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 2(102), 213-220.
- [15] Liu R., Wu C., Zhou D., Yang F., Tian S., Zhang L., Zhang T., Du G.: Pinocembrin protects against β -amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. *Biomedcentral Medicine*, 2012, 10, 105.
- [16] Moselhy W.A., Fawzy A.M., Kamel A.A.: An evaluation of the potent antimicrobial effects and unsaponifiable matter analysis of the royal jelly. *Life Science Journal*, 2013, 2(10), 290-296.
- [17] Prabucki J.: *Pszczelnictwo: praca zbiorowa*. Wydawnictwo Albatros, Szczecin 1998.
- [18] Salomão K., Periera P.R.S., Campos L.C., Borba C.M., Cabello P.H., Marucci M.C, de Castro S.: Brazilian Propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2008, 5, 317-324.
- [19] Stefańska J.: Oporność gronkowców złocistych na środki przeciwbakteryjne, *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie*, 2003, 3, 18-24.

- [20] Stepanović S., Antić N., Dakić I., Švabić-Vlahović M.: Invitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, 2003, 158, 353-357.
- [21] Suchy H, Sheller S.: Dalsze badania nas zastosowaniem propolisu w ginekologii. *Przegląd Lekarski*, 1974, 31, 646.
- [22] Szczypa K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Epidemiologia zakażeń *Streptococcus pyogenes*, struktura klonalna populacji, antybiotykooporność. *Postępy Mikrobiologii*, 2013, 52, 3, 223-232.
- [23] Wilde J.: Hodowla pszczół. Wydawnictwo PWRiL, Poznań 2008.
- [24] Wojtyczka R., Kubina R., Kabała-Dzik A., Bułdak R.J.: Aktywność przeciwdrobnoustrojowa etanolowego roztworu propolisu. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, 2012, 66, 2.

AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA EKSTRAKTÓW ETANOLOWYCH Z SZAŁWII I ROZMARYNU

ELŻBIETA HAĆ-SZYMAŃCZUK, EDYTA LIPÍŃSKA, KAMIL
PIWOWAREK, MAGDALENA FILIPECKA

Streszczenie

Celem pracy było otrzymanie 40% ekstraktów etanolowych z szaławii i rozmarynu, określenie ich składu chemicznego oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do bakterii: *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Tetracoccus* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus vulgaris* 458, *Proteus mirabilis* 180, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* 196 oraz *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076. Ekstrakty otrzymywano metodą ekstrakcji ciągłej w automatycznym aparacie Soxhleta. Zawartość suchej substancji szaławii i rozmarynu w otrzymanych ekstraktach etanolowych określono metodą suszarkowo-wagową. Do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów wykorzystano oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) ekstraktów. Oznaczano również strefy zahamowania wzrostu bakterii metodą krążkowo-dyfuzyjną. Zarówno ekstrakt etanolowy z szaławii, jak i z rozmarynu charakteryzowały się największym udziałem kwasu rozmarynowego (odpowiednio 0,616 i 4,006 mg·cm⁻³), kwasu chlorogenowego (0,048 i 0,068 mg·cm⁻³) oraz rutozydu (0,026 i 0,060 mg·cm⁻³). Związkami obecnymi tylko w ekstrakcie z szaławii była epikatechina, myricetyna oraz resweratrol. Ekstrakt etanolowy z szaławii był bardziej skuteczny w hamowaniu wzrostu drobnoustrojów w porównaniu z ekstraktem z rozmarynu, co uwidoczniło się w niższych wartościach MIC oraz MBC wyznaczonych dla tego ekstraktu. Aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów etanolowych z szaławii i rozmarynu potwierdzono również w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem metody krążkowo-dyfuzyjnej. Wielkość stref zahamowania wzrostu w przypadku ekstraktu etanolowego z szaławii zawierała się w granicach od 3,9 (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) do 10,8 mm (*Micrococcus* sp.), natomiast najbardziej wrażliwe na działanie ekstraktu etanolowego z rozmarynu okazały się bakterie *Proteus mirabilis* 180 (10,8 mm).

Słowa kluczowe: szaławia, rozmaryn, ekstrakty, MIC, MBC

Wprowadzenie

W odpowiedzi na znaczne zainteresowanie konsumentów żywnością naturalną, pozbawioną chemicznych konserwantów, producenci coraz częściej stosują ekstrakty i olejki eteryczne pozyskiwane z roślin przyprawowych [Tsigarida i in., 2000; Burt, 2004]. Surowce roślinne od dawna są cenione ze względu na swoje walory smakowo-zapachowe oraz właściwości stabilizujące. Według Davidsona i Zivanovica [2003] najsilniejsze działanie konserwujące wśród roślin przyprawowych wykazują: goździki, cynamon, oregano, tymianek, szalwia, rozmaryn, bazylia oraz wanilia.

Dowodzono, że szalwia jest aktywna wobec bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus epidermidis*), natomiast bakterie Gram-ujemne (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) oraz patogenne szczepy grzybów (*Candida albicans*) nie są wrażliwe na jej działanie [Kuźma i in., 2005; Farcasanu i in., 2006]. Shirazini i in. [2008] przeprowadzili badania, w których wykazali działanie przeciwbakteryjne szalwii również wobec bakterii *Proteus vulgaris*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* oraz *Salmonella Typhi*.

Ekstrakty uzyskane z rozmarynu stosunkowo słabo hamują rozwój bakterii Gram-ujemnych, natomiast w ilości 0,06-1,0% ograniczają wzrost Gram-dodatnich patogenów, takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* czy *Bacillus cereus*. Pleśnie z rodzaju *Penicillium* oraz *Botrytis* rozwijają się znacznie wolniej w środowisku zawierającym wyciąg rozmarynowy, a karnozol oraz kwas karnozowy (składniki ekstraktów z rozmarynu) wstrzymują aktywność życiową lekoopornych szczepów *Staphylococcus aureus*. Szczególnie wrażliwe na działanie ekstraktów z rozmarynu są bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Brochothrix* [Del Campo i in., 2000; Moyosoluwa i in., 2004; Fernandez-Lopez i in., 2005].

Celem pracy było otrzymanie 40% ekstraktów etanolowych z szalwii i rozmarynu, określenie ich składu chemicznego oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do wybranych szczepów bakterii.

Material i metody badań

Ekstrakty etanolowe z suszu szalwii i rozmarynu otrzymano metodą ekstrakcji ciągłej z użyciem uniwersalnego systemu ekstrakcyjnego B-811 (Universal Extraction System B-811) w automatycznym aparacie Soxhleta. Do przygotowania każdego ekstraktu używano po 40 g suszu rozłożonego do 8 gilz ekstrakcyjnych (po 5 g w każdej gilzie). Jako rozpuszczalnika używano 40% alkoholu etylowego. Surowiec w pojedynczej gilzie ekstrahowano 150 cm³ rozpuszczalnika przez 15 cykli, utrzymując temperaturę jego wrzenia. Uzyskane porcje połączono, otrzymując po około 550 cm³ ekstraktów surowych, które przesączono przez filtr bibułowy. Następnie każdy z ekstraktów zagęszczono w rotacyjnej wyparce Rotovaporator R-205 do uzyskania 40 g, odpowiadających masie suszu użytego do otrzymania ekstraktu. Zawartość suchej substancji szalwii i rozmarynu

w otrzymanych ekstraktach określono metodą suszarkowo-wagową. Ekstrakty przechowywano w temperaturze 4°C, w butelkach z ciemnego szkła.

Oznaczenia i identyfikację wybranych na podstawie danych literaturowych [Tepe i in., 2005; Longaray Delamare i in., 2007] związków chemicznych w ekstraktach prowadzono metodą HPLC za pomocą chromatografu cieczowego Agilent 1200 z detektorem DAD. Zastosowano: kolumnę Zorba Eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm), nastrzyk 5µl, przepływ 0,8 cm³·min⁻¹, detekcja UV λ 210 i 325 nm. Do rozdziału związków zastosowano 2 eluenty - A: acetonitryl i B: 0,05% roztwór kwasu trifluorooctowego. Do analizy danych użyto programu EZ Chrome Elite.

Do oznaczenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów wykorzystano szczepy bakterii, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW: *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Tetracoccus* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus vulgaris* 458, *Proteus mirabilis* 180, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* 196 oraz *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076. Dla każdego szczepu wyznaczano minimalne stężenie hamujące ekstraktów etanolowych [mg·cm⁻³] (MIC, ang. Minimal Inhibitory Concentration) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze [mg·cm⁻³] (MBC, ang. Minimal Bactericidal Concentration). Do powyższych oznaczeń wykorzystywano metodykę zgodną ze standardami NCCLS [Inouye i in. 2001]. W metodzie makrorozcieńczeń wyznaczania MIC stosowano podwójny test szeregowy, w którym do pierwszej probówki zawierającej 2 cm³ płynnego podłoża Mueller-Hinton wprowadzano ekstrakty etanolowe zawierające 6,89 mg s.s·cm⁻³. Zawartość pierwszej probówki dokładnie mieszano i przenoszono 2 cm³ podłoża wraz z ekstraktem do kolejnej probówki. Otrzymywano w ten sposób szereg o malejącym stężeniu ekstraktów etanolowych z szalwii i rozmarynu. Do dalszych badań wykorzystywano 24-godzinne hodowle bakterii w płynnym bulionie wzbogaconym. Liczebność używanego inokulum bakteryjnego wynosiła 1,0·10⁷ jtk·cm⁻³. Przygotowywano również próbę kontrolną, którą była probówka z hodowlą drobnoustrojów bez ekstraktów etanolowych. Zaszczepione inokulum bakteryjnym szeregi z ekstraktami oraz próbę kontrolną inkubowano w temperaturze 37 ± 1°C przez 20-24 godziny. Wartość MIC wyznaczało najmniejsze stężenie ekstraktów, przy którym nie obserwowano wizualnie wzrostu (zmętnienia podłoża) badanego szczepu bakterii, a jednocześnie poprzedzało stężenie, w którym wzrost był widoczny. Minimalne stężenie bakteriobójcze MBC określano wybierając te rozcieńczenia ekstraktów, w których nie obserwowano wzrostu danego drobnoustroju. Pobierano i przenoszono na płytki Petriego 0,1 cm³ wybranych w ten sposób hodowli a następnie zalewano podłożem Mueller-Hinton. Inkubację prowadzono przez 16-20 godzin w temperaturze 37 ± 1°C. Wartość MBC stanowiło stężenie ekstraktu, przy którym wystąpiło zmniejszenie liczby

żywych bakterii o 99,9%. Powyższe oznaczenia wykonywano w czterech powtórzeniach.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów wyznaczano również metodą krążkowo-dyfuzyjną. Szczepy bakteryjne z 24-godzinnych hodowli o liczebności $1,0 \cdot 10^5$ jtk $\cdot$ cm $^{-3}$ wysiewano wgłębnie w ilości 0,1 cm 3 na płytki Petriego i zalewano podłożem Mueller-Hinton. Po zestaleniu się podłoża, na jego powierzchni umieszczano 4 jałowe krążki z bibuły o średnicy 6 mm. Na 3 krążki наносono po 15 μ l ekstraktu, natomiast na czwarty, który stanowił próbę kontrolną, наносono 40% alkohol etylowy. Płytki inkubowano w temperaturze $37 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 24 godziny. Strefy zahamowania wzrostu bakterii mierzono za pomocą suwmiarki. Wyniki podawano, po odjęciu średnicy krążka oraz strefy zahamowania wzrostu dla próby kontrolnej, w milimetrach [Kraśniewska i in., 2010]. Oznaczenie to wykonano w 12 powtórzeniach. Analizę statystyczną uzyskanych podczas wyznaczania stref zahamowania wzrostu metodą krążkowo-dyfuzyjną przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu Microsoft Excel 2010, obliczając wartość średnią oraz odchylenie standardowe.

Wyniki i dyskusja

Zarówno 40% ekstrakt etanolowy z szaławii, jak i z rozmarynu zawierały w większości te same związki chemiczne, ale w innych ilościach (Tab. 1). Ekstrakt etanolowy z szaławii charakteryzował się największym udziałem kwasów: rozmarynowego (0,616 mg $\cdot$ cm $^{-3}$), *p*-kumarynowego (0,256 mg $\cdot$ cm $^{-3}$), benzoosowego (0,072 mg $\cdot$ cm $^{-3}$) oraz chlorogenowego (0,048 mg $\cdot$ cm $^{-3}$). W ekstrakcie etanolowym z rozmarynu kwasu rozmarynowego było blisko sześć razy więcej (4,006 mg $\cdot$ cm $^{-3}$) niż w ekstrakcie z szaławii. Oznaczono w tym ekstrakcie również dużą ilość karnozolu (0,468 mg $\cdot$ cm $^{-3}$), kwasu ferulowego (0,112 mg $\cdot$ cm $^{-3}$) i chlorogenowego (0,068 mg $\cdot$ cm $^{-3}$). Natomiast nie stwierdzono w nim obecności związków takich jak epikatechina, myrycetyna oraz resweratrol, obecnych w ekstrakcie z szaławii.

Substancje czynne występujące w ekstraktach roślinnych są zróżnicowane w zakresie budowy strukturalnej. Różnią się one długością i stopniem rozgałęzienia łańcuchów oraz liczbą pierścieni aromatycznych. Jamroz [2007] podaje, że najczęściej występują w roślinach: flawony i flawonoidy (m.in. katechiny), terpenoidy (m.in. mentol i kapsaicyna) oraz związki fenolowe (tymol, karwakrol, kwas kawowy i eugenol). Za właściwości przeciwdrobnoustrojowe roślin odpowiedzialne są w głównej mierze fenole (np. eugenol, karwakrol, tymol) oraz aldehyd cynamonowy. Zaouoli i in. [2010] podają, że Gram-ujemne pałeczki *Klebsiella pneumoniae* są wrażliwe na olejki eteryczne z rozmarynu zawierające duże ilości borneolu, natomiast Gram-dodatnie ziarniaki *Staphylococcus aureus* - na formy bogate w α -pinen.

Tab. 1. Skład chemiczny ekstraktów etanolowych z szałwii i rozmarynu [$\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$]

Związek chemiczny	Czas retencji [min]	Ekstrakt z szałwii	Ekstrakt z rozmarynu
		Stężenie [$\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$]	
Kwas chlorogenowy	2,83	0,048	0,068
Epikatechina	3,80	0,010	0,000
Kwas kawowy	4,33	0,014	0,012
Rutozyd	5,83	0,026	0,060
Kwas <i>p</i> -kumarynowy	7,04	0,256	0,006
Kwas ferulowy	8,08	0,004	0,112
Kwas benzoesowy	11,87	0,072	0,012
Kwas rozmarynowy	12,70	0,616	4,006
Myrycetyna	12,80	0,002	0,000
Resweratrol	15,51	0,010	0,000
Kwercetyna	18,69	0,004	0,006
Karnozol	25,73	0,006	0,468

Ekstrakt etanolowy z szałwii zawierający od 0,43 do 0,86 $\text{mg s.s}\cdot\text{cm}^{-3}$ wykazał działanie hamujące (MIC) wzrost wszystkich analizowanych bakterii Gram-dodatnich (Tab. 2). Natomiast wśród bakterii Gram-ujemnych najbardziej wrażliwe na jego działanie były bakterie *Proteus vulgaris* 458. Podobną tendencję zaobserwowano w oznaczeniu jego działania bakteriobójczego (MBC). Ekstrakt etanolowy z rozmarynu, w porównaniu z ekstraktem z szałwii, wykazał się nieco mniejszym działaniem hamującym wzrost badanych bakterii, ponieważ w większości przypadków wartości MIC były wyższe z oznaczonymi dla ekstraktu z szałwii. Wartości MIC ekstraktu z rozmarynu wyznaczone dla bakterii Gram-ujemnych były wyższe w porównaniu z wartościami wyznaczonymi dla bakterii Gram-dodatnich, co świadczy o oporności tych drobnoustrojów na działanie aktywnych składników zawartych w tym ekstrakcie.

Otrzymane w niniejszej pracy wartości MIC i MBC nie znalazły odzwierciedlenia w danych literaturowych. Wynika to prawdopodobnie z wykorzystania 40% ekstraktów etanolowych, które nie miały zastosowania w dotychczas prowadzonych badaniach. Najczęściej w doświadczeniach stosowane są olejki eteryczne. Kivrak i in. [2009] porównywali aktywność olejku eterycznego i ekstraktu alkoholowego uzyskanego z *Salvia potentillifolia*. Największe zahamowanie wzrostu, zarówno w przypadku olejku eterycznego, jak i ekstraktu alkoholowego uzyskano dla szczepu *Bacillus subtilis*. Dla ekstraktu alkoholowego uzyskano wartość $\text{MIC}=17\ \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-3}$, natomiast dla olejku eterycznego $27,5\ \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-3}$. Buchwald i in. [2007] badali aktywność wyciągu etanolowego z korzeni *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Autorzy podają, że najbardziej wrażliwe na działanie ekstraktu

alkoholowego były bakterie *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Uzyskano dla tych bakterii wartości MIC w zakresie 1,0-10,0 mg·cm⁻³.

Tab. 2. Wartości MIC oraz MBC ekstraktów etanolowych z szałwii i rozmarynu dla wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [mg s.s·cm⁻³]

Szczep bakterii	Ekstrakt z szałwii		Ekstrakt z rozmarynu	
	MIC	MBC	MIC	MBC
	[mg s.s·cm ⁻³]			
<i>Micrococcus</i> sp.	0,43	0,86	0,86	1,72
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,43	0,86	1,72	3,44
<i>Tetracoccus</i> sp.	0,43	0,43	0,43	1,72
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	0,86	0,86	0,86	1,72
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,86	1,72	6,89	6,89
<i>Proteus vulgaris</i> 458	0,43	0,43	3,44	6,89
<i>Proteus mirabilis</i> 180	1,72	3,43	6,89	> 6,89
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,72	1,72	6,89	> 6,89
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 196	1,72	1,72	6,89	6,89
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	3,43	3,43	> 6,89	> 6,89

Aktywność przeciwdrobnoustrojową 40% ekstraktów etanolowych z szałwii i rozmarynu potwierdzono w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem metody krążkowo-dyfuzyjnej (Tab. 3). Wielkość stref zahamowania wzrostu w przypadku ekstraktu z szałwii zawierała się w granicach od 3,9 (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) do 10,8 mm (*Micrococcus* sp.). Nie stwierdzono wyraźnych różnic w wielkości stref zahamowania wzrostu będących efektem działania ekstraktu z szałwii między bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi. W przypadku ekstraktu z rozmarynu strefy zahamowania wzrostu bakterii były nieznacznie mniejsze niż dla ekstraktu z szałwii w przypadku drobnoustrojów *Micrococcus* sp., *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Proteus vulgaris* 458, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* 196 i *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Najbardziej wrażliwe na działanie ekstraktu etanolowego z rozmarynu okazały się bakterie *Proteus mirabilis* 180.

Salehi i in. [2007] badali wpływ ekstraktu etanolowego z *Salvia sahendica*, który nanoszono na krążki bibuły w objętości 2,5 µl na krążek. Zdaniem autorów, ekstrakt ten nie hamuje wzrostu *E. faecalis*. Odmiennego zdania są Hayouni i in. [2008], gdyż wyznaczona przez nich strefa zahamowania wzrostu *E. faecalis* z zastosowaniem 20 µl olejku eterycznego z *Salvia officinalis* wynosiła 12 mm. Natomiast Kelen i Tepe [2008] prowadzili doświadczenie mające na celu określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z trzech rodzajów szałwii. Najbardziej aktywne były wyciągi uzyskane z *Salvia aramiensis*

i *S. aucheri* var. *aucheri* wobec szczepu *Escherichia coli*, gdzie strefy zahamowania wzrostu wynosiły odpowiednio 11,0 i 12,0 mm. Natomiast w przypadku Gram-ujemnych pałeczek *Klebsiella pneumoniae* najbardziej skuteczny okazał się ekstrakt z *Salvia aramiensis*, który spowodował powstanie stref zahamowania wzrostu tego drobnoustroju o średnicy 11,0 mm.

Tab. 3. Strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów w wyniku działania ekstraktów etanolowych z szałwii i rozmarynu [mm] (wartości średnie i odchylenia - SD)

Szczep bakterii	Ekstrakt z szałwii	Ekstrakt z rozmarynu
	[mm] $\pm$ SD	
<i>Micrococcus</i> sp.	10,8 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 0,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	5,0 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 0,4
<i>Tetracoccus</i> sp.	4,4 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10,6 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 0,3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	3,9 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,3
<i>Proteus vulgaris</i> 458	7,4 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,3
<i>Proteus mirabilis</i> 180	10,5 $\pm$ 0,5	10,8 $\pm$ 0,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4,0 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 196	6,3 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,3
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	8,0 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 0,5

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa rozmarynu w dużej mierze zależy od jego składu chemicznego, szczególnie od zawartości olejków lotnych, od pory zbioru i chemotypu rośliny. Bozin i in. [2007] podają, że silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wykazuje olejek eteryczny niż ekstrakty wodne czy też metanolowe z rozmarynu. Celiktas i in. [2007] badali aktywność przeciwdrobnoustrojową olejku eterycznego i ekstraktu metanolowego uzyskanego z *Rosmarinus officinalis*, pochodzącego z różnych regionów. Skuteczność ich działania sprawdzono wobec bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*. Autorzy stwierdzili umiarkowaną aktywność olejku eterycznego oraz niską - ekstraktu alkoholowego wobec badanych szczepów bakterii. W doświadczeniu tym wykazano, że szczepy *Enterococcus faecalis* i *Proteus vulgaris* były najbardziej wrażliwe na działanie olejków i ekstraktów z rozmarynu, czego nie potwierdzono w niniejszej pracy.

Wnioski

1. Ekstrakty etanolowe z szałwii i rozmarynu odznaczały się aktywnością przeciwdrobnoustrojową względem większości użytych w doświadczeniu bakterii. Było to spowodowane zawartością w ekstraktach związków takich jak kwas rozmarynowy, chlorogenowy i kawowy oraz rutozyd.

2. Bakterie Gram-dodatnie były nieco bardziej wrażliwe niż bakterie Gram-ujemne na działanie ekstraktów etanolowych z szalwii i rozmarynu. Wśród bakterii Gram-dodatnich szczepem najbardziej wrażliwym na ich działanie okazał się *Tetracoccus* sp., a wśród bakterii Gram-ujemnych - *Proteus vulgaris* 458.
3. Najsilniejsze działanie hamujące oraz bakteriobójcze (najniższe wartości MIC oraz MBC) w stosunku do większości badanych bakterii wykazywał ekstrakt z szalwii. Można wnioskować, że jest on źródłem substancji aktywnych, które hamują wzrost i rozwój wybranych szczepów bakterii.
4. Uzyskane wyniki wskazują, że 40% ekstrakty etanolowe z szalwii i rozmarynu mogą być skutecznymi środkami konserwującymi, wykorzystywanymi do utrwalania produktów spożywczych.

Badanie wykonane w ramach projektu badawczego własnego nr N N312 257040

Literatura

- [1] Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik J.: Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2007, 55(19), 7879-7885.
- [2] Buchwald W., Hołderna-Kędzia E., Mścisz A.: Aktywność mikrobiologiczna wyciągu etanolowego z korzeni szalwii czerwonokorzeniowej (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) uprawianej w Polsce. Postępy Fitoterapii, 2007, 3, 133-135.
- [3] Burt S.: Essential oils, their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94, 223-253.
- [4] Celiktaş Y. O., Kocabaş E. E., Bedir E.: Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry, 2007, 1(100), 553-559.
- [5] Davidson P.M., Zivanovic S.: The use of natural antimicrobials. In: Food preservation techniques. ed. Bøgh-Sørensen L., Zeuthen P., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, 2003, 10-15.
- [6] Del Campo J., Amiot M-J., Nguyen-The Ch.: Antimicrobial effect of rosemary extracts. Journal of Food Protection, 2000, 63(10), 1359-1368.
- [7] Farcasanu I.O., Opera E.: Ethanol extracts of *Salvia officinalis* exhibit antifungal properties against *Saccharomyces cerevisiae* cells. Analele Universitatii Bucuresti, Chimie, 2006, 15(1), 51-55.
- [8] Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez-Alvarez J. A., Kuri V.: Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. Meat Science, 2005, 69(3), 371-380.

- [9] Hayouni El A., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J.-Y., Mohammed H., Hamdi M.: Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils. Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125, 242-251.
- [10] Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T.: Screening of the antibacterial effects of a variety of essentials oils on respiratory tract pathogens, using the modified dilution assay method. Journal of Infection and Chemotherapy 2001, 7(11), 251-254.
- [11] Jamroz D.: Mikrobiologiczne i antymikrobiologiczne dodatki paszowe. Cz. II. Magazyn Weterynaryjny, 2007, 16(2), 61-65.
- [12] Kelen M., Tepe B.: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essentials oils of three *Salvia* species from Turkish flora. Bioresource Technology, 2008, 99(10), 4096-4100.
- [13] Kivrak İ., Duru M.E., Öztürk M., Mercan N., Harmandar M., Topcu G.: Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. Food Chemistry, 2009, 116, 470-479.
- [14] Kraśniewska K., Gniewosz M., Bączek K.: Przeciwbakteryjne właściwości filmów pullulanowych z dodatkiem ekstraktów z wiaźówki błotnej (*Filipendula almaria*). Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2010, 553, 139-145.
- [15] Kuźma Ł., Różalski M., Walencka E., Różalska B., Wysokińska H.: Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. Phytomedicine, 2005, 14(1), 31-35.
- [16] Longaray Delamare A.P., Moschen-Pistorello I. T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S.: Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food Chemistry, 2007, 100, 603-608.
- [17] Moyosoluwa O., Kaatz G. W., Gibbons S.: Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. Phytochemistry, 2004, 65(24), 3249-3254.
- [18] Salehi P., Sonboli A., Ebrahimi S.N., Yousefzadi M.: Antibacterial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Salvia sahendica* in different phenological stages. Chemistry of Natural Compounds, 2007, 43 (3), 328-330.
- [19] Shirazini M.H., Ranjabar R., Eshraghi S., Amin G., Seyed Nouri M., Bazzaz N.: Inhibitory effects of sage extract on the growth of enteric bacteria. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2008, 11(3), 487-489.

- [20] Tepe B., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M.: Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). Food Chemistry, 2005, 90, 333-340.
- [21] Tsigarida E., Skandamis P., Nychas G.J.E.: Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89, 901-909.
- [22] Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M.: Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food Chemistry of Toxicology, 2010, 48(11), 3144-3152.

ANALIZA WYBRANYCH ASPEKTÓW JAKOŚCIOWYCH SYROPÓW MALINOWYCH

EWA JABŁOŃSKA-RYŚ, MARTA ZALEWSKA-KORONA, ANETA SŁAWIŃSKA, WOJCIECH RADZKI, MONIKA MICHALAK-MAJEWSKA, WALDEMAR GUSTAW, KATARZYNA SKRZYPCZAK, ALEKSANDRA CIOŁKOWSKA

Streszczenie

W pracy dokonano analizy wybranych aspektów jakościowych dostępnych na rynku syropów malinowych jedenastu producentów. Ocena obejmowała oznaczanie zawartości ekstraktu, związków fenolowych oraz antocyjanów w napojach sporządzonych z syropów. Ponadto rozcieńczone syropy poddawano analizie barwy oceniając jasność L^* , parametry chromatyczności a^* i b^* oraz intensywność i nasycenie. Analiza danych zawartych na etykiecie badanych produktów wykazała, że syropy o smaku malinowym są zróżnicowane zarówno pod względem udziału soku malinowego jak i innych składników objętych recepturą. Badane syropy były istotnie zróżnicowane pod względem zawartości związków fenolowych i antocyjanów, a także analizowanych parametrów barwy.

Słowa kluczowe: syrop malinowy, barwa, antocyjany, związki fenolowe

Wprowadzenie

Malina (*Rubus idaeus* L.) była uprawiana już w starożytności, głównie jako roślina lecznicza. Obecnie w ziołolecznictwie stosowane są owoce w postaci świeżej i suszonej oraz liście. Owoce maliny są doskonałym surowcem do produkcji syropu malinowego, który jest tradycyjnym środkiem napotnym, stosowanym powszechnie w leczeniu grypy i chorób grypopodobnych. Owocom maliny przypisuje się właściwości napotne, przeciwzapalne i przeciwgorączkowe (Krauze-Baranowska i Majdan, 2009). Związkami chemicznymi, charakterystycznymi dla owoców malin są związki polifenolowe, głównie antocyjany i elagotaniny. Zawartość antocyjanów w malinach wzrasta w miarę ich dojrzewania, podczas gdy zawartość wielu innych związków fenolowych ulega redukcji (Wang i Lin, 2000, Beekwilder, 2005). Uważa się że za właściwości przeciwzapalne owoców maliny odpowiadają między innymi antocyjany, hamując aktywność enzymów stanu zapalnego (cyklooksygenaz COX-I i COX-II) (Seeram i in., 2001).

Polska jest znaczącym producentem malin na świecie. W latach 2010-2012 udział Polski w światowej produkcji malin wyniósł 19,1% (Zaremba, 2014).

Maliny są wysoce cenionym surowcem owocowym ze względu na walory smakowe, charakteryzują się jednak krótką trwałością pozbiorną i dużą podatnością na uszkodzenia, dlatego też tak istotną rolę odgrywa ich przetwórstwo. Dominującym kierunkiem przetwórstwa malin jest mrożenie, owoce służą również do produkcji dżemów, konfitur, soków, win owocowych, nalewek i syropów.

Według Berdowskiego (1991) syropy owocowe to klarowne moszcze owocowe wysycone cukrem do łącznej zawartości ekstraktu 66%. Poprzez tak duży dodatek cukru pierwotne stężenie wszystkich składników soku ulega około 3-krotnemu zmniejszeniu, co powoduje obniżenie kwasowości do 0,2-0,3%. Z tego powodu syropy owocowe są często dokwaszane, głównie kwasem cytrynowym. W tradycyjnej technologii cukier i ewentualnie kwas cytrynowy są jedynymi dodatkami do składnika owocowego, a trwałość syropu osiąga się poprzez zastosowanie procesu pasteryzacji lub rozlewu na gorąco do wyjałowionych opakowań. Obecnie znaczna część syropów jest konserwowana chemicznie.

Asortyment syropów owocowych jest bardzo szeroki, a produkty te cieszą się dużą popularnością wśród konsumentów, którzy w roku 2013 wydali na te produkty 311 mln zł (Kociubińska, 2014). Wśród bogatej oferty, obejmującej zarówno tradycyjne smaki owocowe jak i smaki z różnego rodzaju dodatkami (ziołami, owocami egzotycznymi, owocami dziko rosnącymi) największą popularnością cieszą się syropy malinowe, które w tej kategorii produktów mają ponad 50% udziału. Dane te są jeszcze większe i sięgają 70%, jeżeli oprócz syropów malinowych bierze się pod uwagę również syropy malinowe z dodatkami, np. kwiatem lipy, cytryną, czy owocami róży (Dawiec, 2012).

Syropy owocowe są ekonomiczną alternatywą dla soków, nektarów, czy gotowych napojów. Konsumenty stosują je głównie do rozcieńczenia z wodą lub jako dodatek do gorącej herbaty. Produkty te są również stosowane jako dodatek do piwa i innych napojów alkoholowych (drinki), deserów i słodkich dań (lody, naleśniki, budynie). W okresie jesienno zimowym dużą popularnością cieszą się tak zwane syropy prozdrowotne, np. malina z lipą, malina z dodatkiem witamin, które stosowane z gorącą herbatą tworzą napój rozgrzewający (Kociubińska, 2014). Na rynku dostępne są również syropy o obniżonej zawartości cukru, syropy bez konserwantów, sztucznych barwników, czy aromatów. Niektórzy producenci deklarują, że ich produkty mają cechy podobne do syropów tradycyjnie robionych w domach.

Faktyczny skład i jakość syropów nie zawsze są zgodne z tym, co sugeruje etykieta. Według danych IJHARS (Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych) w 2011 roku ponad 48% partii syropów owocowych poddanych kontroli wykazało nieprawidłowości pod względem znakowania. Artykuły żywnościowe muszą być oznakowane zgodnie z obowiązującymi przepisami, a informacje na etykiecie czy opakowaniu produktu nie mogą wprowadzać konsumenta w błąd. Jednym z przykładów było podanie nazwy „Syrop Malina” sugerującej, że smak produktu pochodzi od użytego soku

lub koncentratu owocowego, podczas gdy umieszczona w innym miejscu, często mniej widocznym, nazwa „Syrop owocowy o smaku malinowym” wskazuje na zastosowanie aromatu. Podobnie zamieszczenie na opakowaniu sformułowania „Smak tradycji” sugerowało, że syrop otrzymano wyłącznie z soku owocowego i cukru, podczas gdy w składnikach wymieniono substancje dodatkowe. Kolejną nieprawidłowością było podanie składników w nieprawidłowej kolejności, bez zachowania porządku malejącego według ich masy, czy też umieszczenie grafiki sugerującej inny niż faktycznie skład surowca (Anonim, 2012). Pocieszającym wydaje się fakt, że przeprowadzona 2 lata później kontrola wykazała nieprawidłowości w przypadku już tylko 14,6% partii syropów (Anonim, 2014).

Wymagania dotyczące jakości handlowej, określone w przepisach krajowych i unijnych dla niektórych artykułów rolno-spożywczych zapewniają powtarzalność cech wyrobów gotowych i są gwarancją, że produkty oferowane pod tą samą nazwą handlową będą miały zbliżone parametry, mieszczące się w ustalonych normach. Syropy owocowe należą do dużej grupy artykułów żywnościowych, dla których takich wytycznych nie ma. Brak obligatoryjnych norm daje producentom możliwość modyfikowania składu wyrobów, a do handlu trafiają wyroby pod taką samą nazwą i należące do tej samej grupy produktów, ale istotnie różniące się smakiem, czy też składem. Stan taki sprzyja wprowadzaniu na rynek produktów o różnej jakości.

Celem pracy była ocena wybranych aspektów jakościowych syropów malinowych dostępnych na rynku.

Material i metody badań

Materiał do badań stanowiły syropy o smaku malinowym jedenastu producentów dostępne na polskim rynku, zakupione w handlu detalicznym. Producentów syropów oznaczono kodami (A – K), deklarowany skład syropów przedstawiono poniżej:

A - Syrop o smaku malinowym; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, cukier, zagęszczony sok aroniowy (1,2%), aromat, stabilizator: karboksymetyloceluloza, substancje słodzące: cyklaminian sodu, aspartam, sacharynian sodu, acesulfam K, substancje konserwujące: sorbinian potasu, benzoosan sodu, **zagęszczony sok malinowy (0,5%)**, barwnik: karmel amoniakalno-siarczynowy, przeciwutleniacz: kwas askorbinowy;

B - Syrop owocowy o smaku malinowym; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, woda, zagęszczony sok aroniowy, kwas cytrynowy - regulator kwasowości, **zagęszczony sok malinowy o ekstrakcie ogólnym 65% (0,19%)**, zagęszczone soki: z czarnej porzeczki i marchwi, kwas askorbinowy - przeciwutleniacz, aromat;

C - Syrop o smaku malinowym; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, **sok malinowy (19%) z soku zagęszczonego**, sok aroniowy (11%) z soku zagęszczonego, woda, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, aromat,

przeciwutleniacz: kwas askorbinowy, barwnik: karmel amoniakalno-siarczynyowy, zawiera 30% soku owocowego;

D - Syrop owocowy o smaku malinowym; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, woda, zagęszczony sok wieloowocowy, **zagęszczony sok malinowy (0,3%)**, antocyjany, karmel - barwnik, kwas cytrynowy - regulator kwasowości, witamina C - substancja wzmacniająca, aromat;

E - Syrop owocowy o smaku Malina; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, cukier, woda, **zagęszczony sok malinowy (0,32%)**, koncentraty: czarna porzeczka, marchew, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, barwnik: karmel amoniakalno-siarczynyowy, aromat;

F - Syrop owocowy o smaku malinowym; skład: woda, syrop glukozowo-fruktozowy, **sok malinowy (2,3%) z soku zagęszczonego**, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, zagęszczony sok aroniowy, aromat, substancje słodzące: cyklaminy sodu, sacharyny sodu, aspartam, acesulfam K, ekstrakt z czerwonych winogron, stabilizator: karboksymetyloceluloza, barwnik: karmel amoniakalno-siarczynyowy, substancje konserwujące: sorbinian potasu, benzoesany sodu, przeciwutleniacz: kwas askorbinowy;

G - Zaprawa do napojów o smaku malinowym; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, cukier, woda, sok aroniowy z zagęszczonego soku aroniowego, **sok malinowy z zagęszczonego soku malinowego (0,1%)**, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, aromat, barwnik: E150d, substancja wzbogacająca: witamina C;

H - Zaprawa do napojów o smaku malinowym; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, woda, kwas cytrynowy - regulator kwasowości, zagęszczony sok aroniowy, aromat malinowy, **sok malinowy (0,8%) z koncentratu soku malinowego**, witamina C - substancja wzbogacająca, substancja konserwująca: benzoesany sodu;

I - Syrop owocowy o smaku malinowym; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, zagęszczony sok aroniowy, woda, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, **sok malinowy z zagęszczonego soku malinowego (0,3%)**, aromat, przeciwutleniacz: kwas askorbinowy, barwnik: E150d;

J - Syrop owocowy o smaku malinowym; skład: syrop glukozowo-fruktozowy, woda, **sok malinowy (10%) odtworzony z zagęszczonego soku malinowego**, zagęszczony sok aroniowy, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, aromat malinowy, przeciwutleniacz: kwas askorbinowy, barwnik: karmel amoniakalno-siarczynyowy (E150d);

K - Syrop o smaku malinowym; skład: cukier, syrop glukozowo-fruktozowy, **soki z soków zagęszczonych z: malin (19%) i aronii (11%)**, woda, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, substancja wzbogacająca: witamina C, barwnik: karmel, aromat;

Do badań syropy malinowe rozcieńczano przegotowaną i ostudzoną do temperatury 21°C wodą w stosunku 1:10, zgodnie z zaleceniami producentów.

W tak przygotowanych napojach oznaczano zawartość ekstraktu, związków fenolowych, antocyjanów oraz dokonano pomiaru barwy.

Ekstrakt oznaczano metodą refraktometryczną wg Polskiej Normy PN-EN 12143:2000.

Związki fenolowe, po ekstrakcji wodnej, oznaczano z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu'a, mierząc absorbancję przy długości fali 765 nm w spektrofotometrze Helios Gamma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) metodą opisaną przez Singletona i innych (1999). Krzywą kalibracyjną wykreślono z użyciem kwasu galusowego. Wynik wyrażano jako mg równoważnika kwasu galusowego (GAE) w 100 ml rozcieńczonego syropu.

Antocyjany ogółem oznaczano zgodnie z metodyką Giusti i Wrolstada (2001), z odczytem absorbancji przy pH 1,0 i 4,5 oraz $\lambda = 510$ i 700 nm. Wyniki wyrażano jako mg cyjanidyno-3-glukozydu (CG) w 100 ml rozcieńczonego syropu.

Do opisywania barwy wykorzystano opracowany przez Międzynarodową Komisję Oświetleniową (CIE) model barw CIE $L^*a^*b^*$. Parametry barwy oznaczano w świetle przechodzącym, przy użyciu spektrofotometru sferycznego 8200 Series (X-Rite). Aparat wykalibrowano na wzorcu bieli. W celu dokonania pomiarów rozcieńczone syropy umieszczano w szklanej kuwecie pomiarowej o grubości 20 mm. Rejestrowano wartości składowe L^* - jasność w zakresie od 0 (barwa czarna) do 100 (barwa biała), a^* - odpowiada chromatyczności od czerwonej do zielonej (wartości ujemne wskazują na większy udział w barwie próby koloru zielonego, wartości dodatnie na większy udział w barwie koloru czerwonego), b^* - odpowiada chromatyczności od żółtej do niebieskiej (wartości ujemne wskazują na większy udział w barwie próby koloru niebieskiego, wartości dodatnie na większy udział w barwie koloru żółtego). Wykorzystując parametry barwy L^* , a^* , b^* obliczono nasycenie ($\sqrt{a^{*2}+b^{*2}}$) oraz intensywność barwy (a^*/b^*).

Wszystkie oznaczenia były wykonywane w pięciu powtórzeniach. Wyniki opracowano statystycznie testem Tukeya na poziomie istotności $p < 0,05$, przy użyciu programu Statistica 9.

Wyniki i dyskusja

Producenci syropów zachęcają konsumentów do zakupu wizerunkiem dorodnych malin na etykiecie, podczas gdy z analizy danych umieszczonych na opakowaniu wynika, że dominującymi składnikami syropu jest cukier i/lub syrop glukozowo-fruktozowy, natomiast zagęszczony sok malinowy stanowi często jedynie ułamek procenta. Za smak i zapach produktu odpowiadają aromaty, a nie sok, barwę zazwyczaj kształtują inne niż malinowy soki owocowe, zazwyczaj sok aroniowy oraz barwniki (karmel amoniakalno-siarczynowy).

Badane syropy charakteryzowały się zróżnicowanym deklarowanym udziałem soku malinowego. Ilość tego składnika podawana jest jako procentowy udział soku zagęszczonego lub soku odtworzonego z soku zagęszczonego i w badanych produktach wynosiła od 0,1 do 19%. Wszystkie produkty zawierały w swoim

składzie syrop glukozowo-fruktozowy, większość (9 produktów) zawierała sok aroniowy, wszystkie wzbogacano w aromat.

Syropy dwóch producentów (A i F) zawierały sztuczne substancje słodzące, były to produkty o obniżonej zawartości cukru, których ekstrakt po rozcieńczeniu wodą w stosunku 1:10 wynosił odpowiednio 3,9 oraz 3% (Tab. 1.). Produkty te zawierały również dodatek chemicznych substancji konserwujących. Pozostałe syropy w postaci rozcieńczonej posiadały ekstrakt w granicach od 7 do 7,9%. W badaniach Drużyńskiej i Plewki (2012) dla 3 analizowanych syropów malinowych nierozcieńczonych uzyskano wyniki w granicach od 65,7 do 69,9%, co po uwzględnieniu rozcieńczenia daje wartości niższe niż w badaniach własnych.

Zawartość związków fenolowych w napojach sporządzonych z syropów była istotnie zróżnicowana i mieściła się w granicach od 0,53 (producent E) do 5,96 mg GAE/100 ml (producent J) (Tab. 1.). Drużyńska i Plewka (2012) podają zawartość polifenoli w zakresie od 37,32 do 41,25 mg GAE na 100 ml nierozcieńczonego syropu malinowego.

Zawartość antocyjanów wyrażonych jako mg cyjanidyno-3-glukozydu była również istotnie zróżnicowana i mieściła się w zakresie od 0,11 (producent H) do 0,75 mg CG/100 ml rozcieńczonego syropu (producent K) (Tab. 1.). Wysoką zawartość antocyjanów (0,72 mg CG/100 ml) stwierdzono w napoju sporządzanym z syropu producenta D, który jednocześnie deklaruje w składzie produktu dodatek tych barwników.

Wykazano wysoką korelację pomiędzy zawartością antocyjanów a parametrami barwy: jasnością L^* ($R = -0,8572$), parametrem chromatyczności a^* ($R = 0,9073$) oraz nasyceniem ($R = 0,9310$). Wyniki te wskazują, że barwa badanych syropów zdecydowanie zależy od udziału w nich barwników antocyjanowych, których źródłem są soki owocowe uwzględnione w recepturze (malinowy, aroniowy, porzeczkowy), czy też ekstrakt z czerwonych winogron (producent F). Nie wykazano korelacji pomiędzy zawartością antocyjanów a intensywnością barwy. Być może spowodowane jest to udziałem innych barwników (nie antocyjanowych), których wkład w ten parametr barwy jest znaczący. Aż 9 na 11 producentów stosowało jako dodatek do syropów barwnik E 150d (karmel amoniakalno-siarczynowy), a dwóch (B i E) dodatek soku z marchwi (karotenoidy).

Syropy były istotnie zróżnicowane pod względem badanych parametrów barwy (Tab. 2.). Parametr L^* świadczy o jasności barwy, im wyższa jest jego wartość, tym badany produkt jest jaśniejszy. W analizowanych syropach wartość parametru L^* mieściła się w zakresie od 44,90 (producent C, deklarujący w swoim wyrobie zawartość 19% soku malinowego i 11% soku aroniowego) do ponad 89 (producenci H i I).

Parametr chromatyczności a^* świadczy o udziale barwy czerwonej w syropach. Największą wartość tego parametru stwierdzono w napoju sporządzanym z syropu producenta K (61,41), a najmniejszą, zaledwie 14,22, w napoju producenta H

(zaprawa do napojów o smaku malinowym). Ten sam produkt charakteryzował się również najniższą wartością parametru b^* (7,83), najniższą wartością nasycenia barwy (16,23) oraz łącznie z syropem producenta A najsłabszą intensywnością barwy (1,82).

Tab.1. Zawartość ekstraktu, związków fenolowych i antocyjanów w roztworach syropów malinowych

Kod producenta	Ekstrakt [%]	Związki fenolowe [mg GAE/100 ml]	Antocyjany [mg CG/100 ml]
A	$3,9^b \pm 0,06$	$1,73^b \pm 0,27$	$0,14^a \pm 0,02$
B	$7,2^d \pm 0,06$	$2,86^{d,e} \pm 0,07$	$0,46^{b-e} \pm 0,00$
C	$7,0^c \pm 0,06$	$4,97^g \pm 0,04$	$0,60^{d-f} \pm 0,05$
D	$7,8^{f,g} \pm 0,06$	$3,10^e \pm 0,06$	$0,72^{e-f} \pm 0,05$
E	$7,5^e \pm 0,10$	$0,53^a \pm 0,10$	$0,39^{a-d} \pm 0,05$
F	$3,0^a \pm 0,06$	$1,98^{b,c} \pm 0,07$	$0,23^{a,b} \pm 0,07$
G	$7,7^{e,f} \pm 0,06$	$2,25^c \pm 0,09$	$0,31^{a-c} \pm 0,05$
H	$7,9^g \pm 0,06$	$2,80^{d,e} \pm 0,09$	$0,11^a \pm 0,06$
I	$7,2^d \pm 0,10$	$2,73^d \pm 0,10$	$0,31^{a-c} \pm 0,12$
J	$7,1^{c,d} \pm 0,06$	$5,96^h \pm 0,19$	$0,58^{c-f} \pm 0,21$
K	$7,8^{f,g} \pm 0,06$	$3,64^f \pm 0,14$	$0,75^f \pm 0,16$
średnia	6,7	2,96	0,42

Tab. 2. Parametry barwy roztworów syropów malinowych

Kod producenta	Jasność L^*	Parametr chromatyczności a^*	Parametr chromatyczności b^*	Intensywność	Nasycenie
A	$76,45^j \pm 0,06$	$30,07^b \pm 0,05$	$16,50^d \pm 0,06$	$1,82^a \pm 0,01$	$34,30^b \pm 0,05$
B	$60,59^d \pm 0,01$	$54,55^i \pm 0,06$	$16,87^e \pm 0,06$	$3,23^g \pm 0,01$	$57,10^i \pm 0,07$
C	$44,90^a \pm 0,06$	$51,48^h \pm 0,04$	$20,76^b \pm 0,05$	$2,48^e \pm 0,01$	$55,51^h \pm 0,03$
D	$51,57^b \pm 0,02$	$61,15^j \pm 0,07$	$31,47^i \pm 0,06$	$1,94^b \pm 0,00$	$68,77^j \pm 0,08$
E	$66,87^f \pm 0,06$	$48,63^f \pm 0,06$	$11,52^c \pm 0,07$	$4,22^h \pm 0,02$	$49,97^f \pm 0,06$
F	$72,40^h \pm 0,05$	$35,04^c \pm 0,06$	$17,41^f \pm 0,05$	$2,01^c \pm 0,01$	$39,13^c \pm 0,04$
G	$69,52^g \pm 0,05$	$46,93^e \pm 0,06$	$10,76^b \pm 0,06$	$4,36^i \pm 0,02$	$48,15^e \pm 0,07$
H	$89,52^j \pm 0,12$	$14,22^a \pm 0,06$	$7,83^a \pm 0,05$	$1,82^a \pm 0,01$	$16,23^a \pm 0,06$
I	$89,42^j \pm 0,06$	$36,49^d \pm 0,05$	$16,74^e \pm 0,06$	$2,18^d \pm 0,01$	$40,15^d \pm 0,02$
J	$60,84^e \pm 0,07$	$50,16^g \pm 0,05$	$19,21^g \pm 0,06$	$2,61^f \pm 0,01$	$53,71^g \pm 0,03$
K	$53,10^c \pm 0,05$	$61,41^k \pm 0,01$	$31,37^i \pm 0,05$	$1,96^b \pm 0,00$	$68,96^k \pm 0,03$
średnia	66,83	44,56	18,22	2,60	48,36

Najwyższe wartości parametrów intensywności i nasycenia barwy stwierdzono odpowiednio w napojach sporządzonych z syropów producentów G (4,36) oraz K (68,96).

Wyniki dotyczące zawartości antocyjanów oraz barwy syropów nie mogą być porównane do danych uzyskanych przez innych autorów, gdyż temat ten nie był wcześniej podejmowany.

Wnioski

1. Dostępne na rynku syropy o smaku malinowym są zróżnicowane zarówno pod względem udziału soku malinowego jak i innych składników objętych recepturą (analiza danych zawartych na etykiecie badanych produktów).
2. Badane syropy były istotnie zróżnicowane pod względem zawartości związków fenolowych i antocyjanów, a także analizowanych parametrów barwy.
3. Stwierdzono wysoką korelację pomiędzy zawartością antocyjanów w syropach a jasnością L^* , parametrem chromatyczności a^* oraz nasyceniem barwy.
4. Na intensywność barwy prawdopodobnie mają wpływ dodawane do syropów barwniki (karmel amoniakalno-siarczynowy), gdyż nie stwierdzono korelacji pomiędzy tym parametrem barwy a zawartością antocyjanów.

Literatura

- [1] Anonim: Sprawozdanie Roczne 2011, pod red. Zdrojewska I. IJHARS, Warszawa 2012.
- [2] Anonim: Sprawozdanie Roczne 2013, pod red. Zdrojewska I. IJHARS, Warszawa 2014.
- [3] Beekwilder J., Jonker H., Meesters P., Hall R. D., van der Meer I. M., de Vos C. H. R.: Antioxidant in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 3313-3320.
- [4] Berdowski J.B.: Obliczenia technologiczne w przetwórstwie owoców i warzyw. Normy i normatywy. Stowarzyszenie Inżynierów i Techników Przemysłu Spożywczego, Warszawa 1991.
- [5] Dawiec M.: Herbata z syropem. *Hurt i Detal*, 2012, 9(79), 24-26.
- [6] Drużyńska B., Plewka K.: Ocena towaroznawcza syropów malinowych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2012, 45(3), 634-638.
- [7] Giusti M. M., Wrolstad R. E.: Anthocyanins: Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: *Current protocols in food analytical chemistry*. Ed. R. E. Wrolstad. John Wiley and Sons, New York, 2001.
- [8] Kociubińska M.: Czas na syropy. *Hurt i Detal*, 2014, 10(104), 62-65.
- [9] Krauze-Baranowska M., Majdan M.: Owoce malin - źródło cennych leczniczo metabolitów wtórnych i witamin, *Panacea*, 2009, 1(26), 14-15.
- [10] PN-EN 12143:2000 Soki owocowe i warzywne - Oznaczanie zawartości substancji rozpuszczalnych metodą refraktometryczną.
- [11] Seeram N., Momin R., Nair M., Bourquin L.: Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, 2001, 8, 362-69.
- [12] Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, 299, 152-178.

- [13] Wang S., Lin H.: Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and development stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 140-146.
- [14] Zaremba Ł.: Polski I światowy rynek malin i ich przetworów. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Problemy Rolnictwa Światowego*, 2014, 14(1), 148-156.

OCENA PRZEŻYWALNOŚCI SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS* SPP. W FUNKCJONALNYM SOKU ALOESOWYM

ALEKSANDRA KOCOT, MAGDALENA OLSZEWSKA, MARTA
GORYWODA, ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

Streszczenie

Wśród społeczeństwa rośnie zainteresowanie żywnością funkcjonalną. Producenci żywności, wychodząc naprzeciw potrzebom konsumentów, wzbogacają żywność o szereg składników, które mają wywołać korzystny wpływ na organizm człowieka. Jednymi z najczęściej stosowanych dodatków funkcjonalnych są szczepy bakterii probiotycznych. Prozdrowotny efekt takiej żywności polega m.in. na stymulacji układu odpornościowego człowieka, utrzymaniu równowagi mikroflory jelitowej oraz perystaltyki jelit czy zahamowaniu rozwoju komórek nowotworowych. W niniejszej pracy zbadano przeżywalność szczepów *Lactobacillus* spp. podczas 32-dniowego przechowywania w temperaturze pokojowej w soku aloesowym. Do oceny przeżywalności pałeczek zastosowano dwie metody analizy ilościowej: metodę posiewów powierzchniowych oraz metodę opartą na barwieniu fluorescencyjnym komórek. Do barwienia komórek zastosowano zestaw LIVE/DEAD BacLight™ Viability Kit, który pozwolił na ocenę stanu fizjologicznego komórek pod względem spójności błon cytoplazmatycznych. Wyniki liczebności pałeczek *Lactobacillus* spp. oznaczonej metodą płytkową pokazały, że rozwój szczepów *Lactobacillus* spp. następował do 9 dnia przechowywania, po czym liczebność komórek zmniejszyła się do około $6.5 \log$ jtk/mL. Liczebność komórek uzyskana z zastosowaniem barwienia fluorescencyjnego była najwyższa między 5 a 19 dniami utrzymała się na poziomie $6.5 \log$ komórek/mL do ostatniego dnia przechowywania. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że sok aloesowy jest dobrym środowiskiem rozwoju i przeżywania pałeczek *Lactobacillus* spp., potrzebne są jednak dalsze badania nad funkcjonalnością tego typu soku z dodatkiem szczepów *Lactobacillus* spp. i opracowaniem technologii jego wytwarzania.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus* spp., przeżywalność, żywność funkcjonalna

Wprowadzenie

W dzisiejszym świecie wzrasta zainteresowanie zdrową żywnością oraz żywnością funkcjonalną. Wynika to z coraz większej świadomości społeczeństwa na temat sposobów odżywiania się oraz wpływu diety na stan zdrowia. Ponadto konsumenci oczekują, że produkt spożywczy dostarczy im dodatkowych korzyści, ponad efekt odżywczy, że wpłynie pozytywnie na samopoczucie oraz poprawi stan

zdrowia (Kudelka i Łobaza, 2007). W związku z tym dynamicznie rozwijają się różne dziedziny nauki, takie jak biotechnologia i mikrobiologia, które pozwalają uzyskać nowe rodzaje żywności funkcjonalnej. Obok klasycznych metod stosowanych w mikrobiologicznej analizie żywności rozwijają się metody oparte na fluorescencji, które znacznie przyspieszają czas otrzymania wyników analiz takich parametrów jak liczebność, stan fizjologiczny oraz metabolizm drobnoustrojów (Daims i Wagner, 2007). Wiele spośród prowadzonych obecnie badań nad funkcjonalnością oraz przeżywalnością bakterii w różnych środowiskach dotyczy pałeczek fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* (Zielińska, 2005). Zastosowanie szczepów *Lactobacillus* spp. do produkcji soków typu „bio” może zatem pozwolić na pozyskanie produktów o nowych właściwościach, wywierających efekt prozdrowotny na organizm człowieka.

Celem pracy była ocena przeżywalności szczepów *Lactobacillus* spp. wyizolowanych z kiszonych ogórków i kapusty podczas 32-dniowego przechowywania w temperaturze pokojowej w soku aloesowym z zastosowaniem klasycznej metody płytkowej oraz barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™ Viability Kit.

Materiał i metody badań

Przebadano 11 szczepów *Lactobacillus* spp. wyizolowanych z kiszonych warzyw pochodzących z różnych regionów Polski. Posiewy próbek soku wykonano na podłożu MRS-agar (Merck) i inkubowano w 30 °C przez 48 godzin w warunkach beztlenowych (Anaerocult®C, Merck). 24-godzinne hodowle szczepów *Lactobacillus* spp. w bulionie MRS posłużyły do zaszczepienia soku aloesowego z 1 % dodatkiem kwasu cytrynowego. Inokulum dodano w stosunku 1:10 tak, aby sok zawierał 10^6 - 10^7 komórek bakteryjnych na 1 mL. Soki przechowywano przez 32 dni w temperaturze pokojowej, a liczebność pałeczek *Lactobacillus* spp. oznaczono bezpośrednio po zaszczepieniu oraz 1, 5, 9, 12, 19 i 32 dnia przechowywania. Liczebność pałeczek oznaczono z zastosowaniem dwóch metod - klasycznej metody płytkowej oraz metody barwienia fluorescencyjnego komórek w połączeniu z analizą mikroskopową. Do oznaczenia liczebności *Lactobacillus* spp. metodą płytkową wykonano szereg 10-krotnych rozcieńczeń w jałowym płynie fizjologicznym (0,85% NaCl). Odpowiednie rozcieńczenia posiano powierzchniowo na podłożu MRS-agar. Inkubację posiewów prowadzono w 30 °C przez 48 godzin. Po tym czasie policzono kolonie i podano liczbę w log jtk/mL. Analiza mikroskopowa z zastosowaniem barwienia fluorescencyjnego komórek wymagała przygotowania rozcieńczeń próbek soku w sterylnym płynie fizjologicznym w stosunku 1:10. Następnie przeprowadzono barwienie za pomocą zestawu LIVE/DEAD BacLight™ Viability Kit wg specyfikacji producenta. Próbkę przefiltrowano używając aparatu filtracyjnego (MILLIPORE) i czarnych filtrów poliwęglanowych (Millipore ISOPORE™) typu 2 µm, Ø 13 mm. Filtry umieszczono na szkiełkach

podstawowych, dodając olejek *BackLight™ Mounting Oil* (Invitrogen, Molecular Probes) i zamykając szkiełkami nakrywkowymi. Obserwację mikroskopową przeprowadzono przy pomocy mikroskopu epifluorescencyjnego OLYMPUS BX51. Do komputerowej analizy obrazu użyto programu CellSens Dimension System 1.5 (Olympus), który umożliwił liczenie komórek z obrazów mikroskopowych. Z każdego preparatu wykonano 10 zdjęć, które posłużyły do obliczenia log komórek/mL. Wykonano również analizę statystyczną z użyciem programu STATISTICA wersja 10 (StatSoft®). Do porównania wyników uzyskanych z zastosowaniem metody płytkowej i fluorescencyjnej wykonano analizę ANOVA jednoczynnikowa lub test U Manna-Whitneya. W celu sprawdzenia czy liczebność pałeczek *Lactobacillus* spp. zmieniła się statystycznie istotnie podczas przechowywania wykonano test ANOVA z powtórzonymi pomiarami lub jej nieparametryczny odpowiednik rang Friedmana. Istotność różnic analizowano na poziomie prawdopodobieństwa granicznego $p=0.05$.

Wyniki i dyskusja

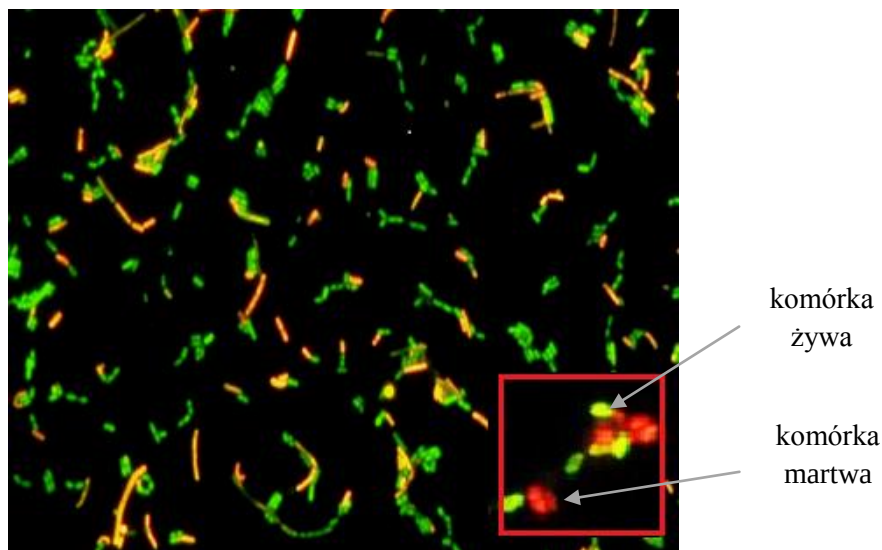
Efektom posiewu izolacyjnego próbek żywności na podłoże MRS-agar była makroskopowa i mikroskopowa ocena morfologii kolonii i komórek pałeczek fermentacji mlekowej. Kolonie *Lactobacillus* spp. wyrosły w postaci okrągłych, cytrynowych lub kremowo-cytrynowych, lekko wypukłych, błyszczących kolonii z równym brzegiem (Rys. 1). W celu określenia liczebności pałeczek *Lactobacillus* spp. po dodaniu do soku w trakcie przechowywania wykonywano posiewy powierzchniowe stosując ten sam rodzaj podłoża i warunki inkubacji.



Rys. 1. Morfologia kolonii szczepu *Lactobacillus* sp. 5.1 po 48-godzinnej inkubacji w warunkach beztlenowych na podłożu MRS.

Zastosowanie zestawu barwników fluorescencyjnych LIVE/DEAD BacLight™ Viability Kit pozwoliło na obserwację morfologii pojedynczych komórek

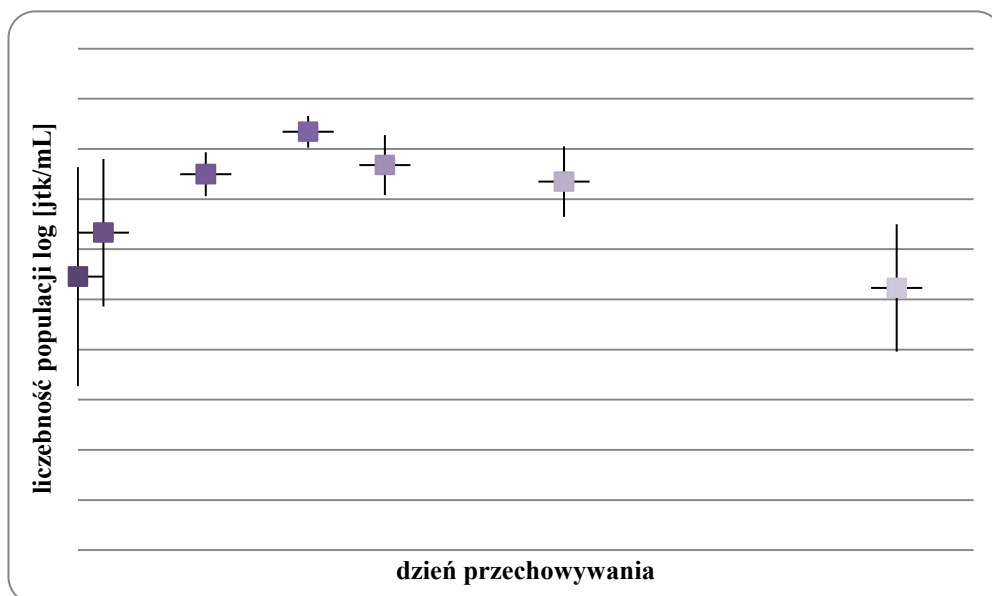
oraz liczebności komórek żywych i komórek martwych, widocznych w obrazie mikroskopowym odpowiednio jako komórki zielone i komórki czerwone (Rys. 2). Zastosowane fluorochromy wybarwiły komórki ze względu na spójność błon cytoplazmatycznych. Zielone komórki są efektem barwienia SYTO[®]9, który ma małą masę cząsteczkową i wnika tylko do wnętrza komórek o spójnych błonach. Komórki czerwone są natomiast wybarwione jodkiem propidyny (PI), który charakteryzuje się dużą masą molekularną i z tego powodu wnika jedynie do komórek z przerwą ciągłości błony cytoplazmatycznej (Joux i Lebaron, 2002). Równoległe zastosowanie metody fluorescencyjnego barwienia komórek oraz klasycznej metody płytkowej w ilościowej analizie soku umożliwiło ocenę przeżywalności komórek *Lactobacillus* spp. w soku aloesowym na podstawie innych parametrów niż tylko wzrost na podłożu mikrobiologicznym.



Rys. 2. Obraz mikroskopowy komórek *Lactobacillus* spp. 4.1 wybarwionych zestawem LIVE/DEAD BacLight[™] Viability Kit.

Na podstawie wyników uzyskanych z zastosowaniem metody płytkowej zaobserwowano, że wszystkie szczepy *Lactobacillus* spp. wykazały wzrost populacji do 9 dnia przechowywania soku, a maksymalna liczebność pałeczek *Lactobacillus* spp. w tym dniu była na poziomie nieznacznie wyższym niż 8 log jtk/mL (Rys. 3). W zależności od liczebności początkowej pałeczek *Lactobacillus* spp., zaobserwowano przyrost populacji o 0.5-1.5 rzędu logarytmicznego. Od 9 dnia liczebność pałeczek *Lactobacillus* spp. zaczęła się zmniejszać i ostatecznie osiągnęła wartość 6.5 log jtk/mL w ostatnim dniu.

Na podstawie wyników liczebności komórek żywych *Lactobacillus* spp. wybarwionych zestawem LIVE/DEAD BacLight[™] zaobserwowano, że zmieniała się ona istotnie podczas przechowywania w soku aloesowym ($p < 0.01$).



Rys. 3. Liczebność populacji pałeczek *Lactobacillus* spp. w soku aloesowym podczas 32-dniowego przechowywania w temperaturze pokojowej oznaczona metodą płytkową

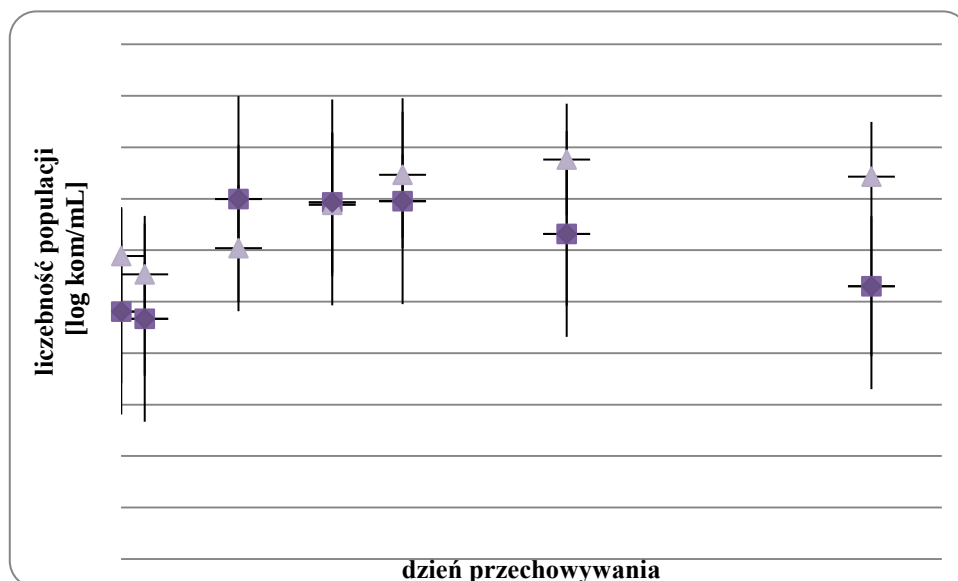
W momencie zaszczepienia oraz 1 dnia liczba komórek żywych była na podobnym poziomie. Największą liczebność komórek żywych oznaczono w przedziale między 5 a 12 dniem przechowywania, średnio było to log 7.5 kom./mL (Rys. 4). W kolejnych dniach następowało obniżenie liczby komórek żywych, świadczące o powolnym zamieraniu populacji *Lactobacillus* spp. na co wskazują wyniki liczebności komórek obu zastosowanych metod analizy ilościowej.

Zastosowanie metody płytkowej oraz metody fluorescencyjnego barwienia komórek pozwoliło porównać istotność różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi z zastosowaniem obu metod w każdym punkcie pomiarowym (Tab. 1). Istotne statystycznie różnice zaobserwowano w 1, 9, 12 i 19 dniu przechowywania, jednak były one bliskie progu istotności, $p=0.05$, czyli pomimo tych różnic, wyniki liczebności uzyskane z zastosowaniem obu metod pozwoliły zaobserwować podobne tendencje wzrostu i zamierania populacji *Lactobacillus* spp.

Tab. 1. Istotność różnic statystycznych między metodą fluorescencyjną i płytkową w każdym punkcie pomiarowym

dzień	0	1	5	9	12	19	32
p	0.4109	0.0047*	0.1598	0.0032*	0.0389*	0.0403*	0.9007

*różnice istotne statystycznie



Rys. 4. Liczebność populacji pałeczek *Lactobacillus* spp. w soku aloesowym podczas 32-dniowego przechowywania w temperaturze pokojowej oznaczona metodą fluorescencyjną ($\blacktriangle$ - komórki żywe, $\blacksquare$ - komórki martwe).

Badanie przeżywalności komórek *Lactobacillus* spp. w soku aloesowym z zastosowaniem metody płytkowej i metody fluorescencyjnego barwienia komórek, pozwoliło zanalizować populację pałeczek nie tylko na podstawie zdolności wzrostu na podłożu mikrobiologicznym, ale również z uwzględnieniem spójności błon cytoplazmatycznych komórek (Leuko i in., 2004; Berney i in., 2007). Metoda fluorescencyjnego barwienia pozwala na oznaczenie wszystkich komórek w populacji, zarówno żywych jak i martwych bez względu na zdolność wzrostu na podłożach mikrobiologicznych czy warunki środowiskowe, które mogą np. zahamować wzrost lub obniżyć przeżywalność drobnoustrojów. Uzyskane wyniki badań sugerują, że sok aloesowy nie wpływa hamująco na wzrost *Lactobacillus* spp., a wręcz, jest dobrym środowiskiem rozwoju i przeżywania pałeczek *Lactobacillus* spp.

Metody analityczne oparte na fluorescencji charakteryzują się szeregiem zalet. Największą spośród nich jest badanie stanu fizjologicznego drobnoustrojów na podstawie parametrów innych niż dzielenie się komórek. Metody te są dokładne i szybkie, przez co są coraz powszechniej stosowane w mikrobiologicznej analizie żywności. Wielu badaczy (Auty i in., 2001; Moreno i in., 2006; Gatti i in., 2006; Lahtinen i in., 2006) wykazało wyższość technik fluorescencyjnych nad metodami tradycyjnymi. Z zastosowaniem barwienia fluorescencyjnego uzyskiwano wyższe wyniki liczebności komórek drobnoustrojów niż na podstawie wzrostu na podłożach mikrobiologicznych, oznaczono również komórki w stanie aktywnym, ale niehodowalnym (VBNC – viable but nonculturable), który był

indukowany w komórkach pod wpływem stresu środowiskowego. Wykazano także, że techniki fluorescencyjne są użyteczne do określania zmian stanu fizjologicznego drobnoustrojów m. in. zachodzących w czasie długotrwałego przechowywania (Corich i in., 2004). Rault i in. (2007) z zastosowaniem barwników CFDA/PI (diocetan karboksyfluoresceiny/jodek propidyny) zbadali przeżywalność *Lactobacillus delbrueckii* podczas przechowywania w stanie głębokiego zamrożenia. Łaniewska-Trokenheim i in. (2010) zbadali przeżywalność *Lactobacillus* spp. w mleku przechowywanym przez 14 dni w oparciu o barwienie CFDA. Z kolei Warmińska-Radyko i in. (2010) ocenili przeżywalność szczepów *Lactococcus lactis* w mleku przechowywanym przez 28 dni na podstawie barwienia LIVE/DEAD® BacLight™.

W mikrobiologicznych badaniach żywności rutynowo stosowana metoda płytkowa sprawdza się w oznaczaniu liczebności drobnoustrojów w różnych produktach spożywczych. Szczególnie ważna jest liczebność populacji żywych komórek w produktach probiotycznych, które powinny zawierać ich $>10^6$ jtk/mL w całym okresie przydatności do spożycia (Kołożyn-Krajewska, 2001). Zielińska i in. (2008) zbadali przeżywalność szczepu *Lactobacillus casei* KN 291 w napoju sojowymi wykazali, że szczep ten przeżywa przez 28 dni w środowisku napoju sojowego przechowywanego w temperaturze 5°C i 10°C. Liczba komórek szczepu *L. casei* KN 291 wzrastała do 8 dnia przechowywania w temperaturze 5°C i do 4 dnia w temperaturze 10°C. Yoon i in. (2004) zbadali przeżywalność szczepów *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus acidophilus* LA39, *Lactobacillus plantarum* C3, *Lactobacillus casei* A4, *Lactobacillus delbrueckii* D7) w soku pomidorowym. Wykazali, że po 4 tygodniach przechowywania w temperaturze 4°C liczba komórek wyniosła 10^8 jtk/mL. Yoon i in. (2006) ocenili przeżywalność szczepów *Lactobacillus* spp. (*L. casei* A4, *L. plantarum* C3 i *L. delbrueckii* D7) w soku z kapusty. Oznaczyli liczbę komórek na poziomie 10^8 jtk/mL po 48 godzinach fermentacji w 30 °C. Podczas fermentacji monitorowali zmiany takich parametrów jak: kwasowość, koncentracja cukrów oraz liczba żywych komórek. Wykazali, że szczep *L. casei* produkuje mniej kwasu mlekowego niż pozostałe dwa badane szczepy. Po 4 tygodniach przechowywania w temperaturze 4 °C liczebność szczepów *L. plantarum* i *L. delbrueckii* wyniosła odpowiednio 10^7 i 10^5 jtk/mL. Natomiast *L. casei* nie przeżył w soku z kapusty 2 tygodniowego przechowywania w warunkach chłodniczych. Nuallakul i Charalampopoulos (2011) zbadali przeżywalność pałeczek fermentacji mlekowej w różnych sokach, np. *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 w sokach owocowych (sok pomarańczowy, grejpfrutowy, z czarnej porzeczki, ananasowy, z granatu, żurawinowy, cytrynowy) w trakcie 6 tygodni przechowywania w temperaturze 4 °C. Stwierdzono, że *L. plantarum* NCIMB 8862 wykazuje dobrą przeżywalność w soku pomarańczowym, grejpfrutowym, z czarnej porzeczki, ananasowym i cytrynowym, natomiast dużo słabszą w soku żurawinowym i soku z granatu, gdyż nastąpiło w nich szybkie obniżenie liczebności żywych komórek.

Analizę przeżywalności następujących szczepów: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei* w soku z granatu w trakcie 4 tygodni przechowywania w temperaturze 4 °C przeprowadził Mousavi i in. (2011). Wykazali, że liczebność żywych komórek *L. acidophilus* i *L. paracasei* po tygodniu przechowywania znacznie obniżyła się. Inaczej zachowały się szczepy *L. delbrueckii* i *L. plantarum*, które spełniły kryterium wysokiej przeżywalności, ale tylko po skróceniu czasu przechowywania do 2 tygodni, gdyż liczebność żywych komórek po tym czasie wyniosła 10^5 jtk/mL.

Wzbogacanie soków w drobnoustroje probiotyczne wydaje się być w dzisiejszych czasach koniecznością. Trudno jednak zestawić dany sok z konkretnym szczepem tak, aby zachować żywotność drobnoustrojów przez okres przydatności produktu do spożycia. Z tego powodu prowadzi się wiele badań nad przeżywalnością drobnoustrojów w różnych sokach jak również w innych produktach spożywczych. Żywe kultury bakterii fermentacji mlekowej, dodawane do żywności, muszą także przeżyć w warunkach przewodu pokarmowego. W związku z tym bardzo ważna jest liczba żywych komórek, które wprowadzamy do organizmu - im więcej ich będzie, tym większa szansa, że część z nich przeżyje w stresowych warunkach występujących w żołądku i jelicie cienkim oraz skolonizuje nabłonek jelit, wykazując efekt prozdrowotny. Wysoka przeżywalność szczepów *Lactobacillus* spp. podczas długoterminowego przechowywania w soku aloesowym potwierdzona dwiema metodami analizy ilościowej wskazuje na duży potencjał tych drobnoustrojów jako funkcjonalnego dodatku do soku z aloesu.

Wnioski

1. Wyniki uzyskane z zastosowaniem dwóch metod analizy ilościowej, metody płytkowej oraz barwienia z użyciem barwników fluorescencyjnych, pozwalają stwierdzić, że pałeczki *Lactobacillus* spp. wykazują dobrą przeżywalność w soku aloesowym. Liczba komórek populacji *Lactobacillus* spp. zwiększyła się między 1 a 12 dniem przechowywania, a następnie obniżała się między 12 a 32 dniem, i ostatecznie wyniosła 6.5 jednostek logarytmicznych.
2. Zastosowanie dwóch metod analizy ilościowej pozwoliło ocenić przeżywalność komórek *Lactobacillus* spp. nie tylko na podstawie zdolności do dzielenia się komórek i wzrostu na podłożu syntetycznym, ale również na podstawie spójności błon cytoplazmatycznych. Możliwe było więc przeprowadzenie dokładniejszej analizy niż pozwala na to zastosowanie tylko metody konwencjonalnej.
3. Pod względem przeżywalności, szczepy *Lactobacillus* spp. mogą być stosowane jako dodatek do soku aloesowego. Istnieje jednak konieczność dalszych badań w zakresie funkcjonalności szczepów, opracowania technologii produkcji tego typu soku i in.

Literatura

- [1] Auty M.A.E., Gardiner G.E., McBrearty S.J., O'Sullivan E.O., Mulvihill D.M., Collins J.K., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross R.P.: Direct In Situ Viability Assessment of Bacteria in Probiotic Dairy Products Using Viability Staining in Conjunction with Confocal Scanning Laser Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67, 420-425.
- [2] Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H.U., Egli T.: Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 3283-3290.
- [3] Corich V., Soldati E., Giacomini A.: Optimization of fluorescence microscopy techniques for the detection of total and viable lactic acid bacteria in whey starter cultures. *Annals of Microbiology*, 2004, 54, 335-342.
- [4] Daims H., Wagner M.: Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75, 237-248.
- [5] Gatti M., Bernini V., Lazzi C., Neviani E.: Fluorescence microscopy for studying the viability of micro-organisms in natural whey starters. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 42, 338-343.
- [6] Joux F., Lebaron P.: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level, *Microbes and Infection*, 2002, 2(12), 1523-1535.
- [7] Kołożyn-Krajewska D.: Żywność probiotyczna w aspekcie bezpieczeństwa zdrowotnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, 4, 93-98.
- [8] Kudelka W., Łobaza D.: Charakterystyka żywności funkcjonalnej. *Zeszyty naukowe Akademii Ekonomicznej w Krakowie*, 2007, 743, 91-120.
- [9] Lahtinen S.J., Gueimonde M., Ouwehand A.C., Reinikainen J.P., Salminen S.J.: Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiology*, 2006, 23, 571-577.
- [10] Leuko S., Legat A., Fendrihan S., Stan-Lotter H.: Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight Kit for Detection of Extremophilic Archaea and Visualization of Microorganisms in Environmental Hypersaline Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70, 6884-6886.
- [11] Łaniewska-Trokenheim Ł., Olszewska M., Mikš-Krajnik M., Zadernowska A.: Patterns of survival and volatile metabolites of selected *Lactobacillus* strains in long-term incubation in milk. *Journal of Microbiology*, 2010, 48, 445-451.
- [12] Moreno Y., Collado M.C., Ferrús M.A., Cobo J.M., Hernández E., Hernández M.: Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4° C using LIVE/DEAD® BacLight™ staining and conventional plate counts. *International Journal of Food Science and Technology*, 2006, 41, 275-280.

- [13] Mousavi Z.E., Mosavi S.M., Razavi S.H., Emam-Djomeh Z., Kiani H.: Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27, 123-128.
- [14] Nuallkaekul S., Charalampopoulos D.: Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146, 111-117.
- [15] Rault A., Beal C., Ghorbal S., Ogier J.-C., Bouix M.: Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, 2007, 55, 35-43.
- [16] Sunny-Roberts E.O., Knorr D.: Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.*, 2008, 25, 183-189.
- [17] Yoon Y.K., Woodams E.E., Hang Y.D.: Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *The Journal of microbiology*, 2004, 42, 315-318.
- [18] Yoon Y.K., Woodams E.E., Hang Y.D.: Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 1427-1430.
- [19] Zielińska D.: Dobór szczepów bakterii *Lactobacillus* i ustalenie warunków fermentacji napoju sojowego. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 2005, 2, 289-297.
- [20] Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D., Goryl A.: Modele przeżywalności bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 2008, 5, 126-134.

NOWA METODYKA GENETYCZNEJ MODYFIKACJI *RHIZOPUS* *ORYZAE* I *RHIZOPUS MICROSPORUS* ZA POMOCĄ KOLCHICYNY I BENOMYLU

MONIKA KORDOWSKA-WIATER, MAGDALENA POLAK-BERECKA,
ADAM WAŚKO, ZDZISŁAW TARGOŃSKI

Streszczenie

Grzyby z rodzaju *Rhizopus* charakteryzują się zdolnością do wytwarzania kwasu fumarowego z różnych substratów. Kwas fumarowy jest stosowany w przemyśle spożywczym jako naturalny środek konserwujący i zakwaszający, w przemyśle paszowym oraz chemicznym jako substrat w reakcjach polimeryzacji czy estryfikacji. Badania pokazują, że grzyby *Rhizopus* zdolne są produkować kwas fumarowy w podłożu z glicerolem. W celu zwiększenia efektywności procesu stosuje się modyfikacje genetyczne grzyba. W prezentowanych badaniach po raz pierwszy użyto kolchicyny do poliploidyzacji, a następnie benomylu do haploidyzacji szczepów *R. oryzae* i *R. microsporus*, aby spowodować losowe zmiany materiału genetycznego. W kolejnym kroku zastosowano selekcję mutantów na podłożu z glicerolem i zielenią brylantową, aby wyizolować najefektywniejsze szczepy, które następnie były sprawdzone pod kątem zdolności do produkcji kwasu fumarowego w podłożu płynnym z glicerolem. Wyizolowano po 10 szczepów *R. oryzae* R-15 i R-18 oraz 6 izolatów *R. microsporus* R-67. Uzyskano trzy szczepy R-15: R-15-1, R-15-4 i R-15-8 i dwa szczepy R-18: R-18-1 i R-18-4, które produkowały kwas efektywniej niż szczepy rodzicielskie, dając wydajności 0,18-0,21 g/g. Dwa najefektywniejsze mutanty, R-15-4 i R-18-4, produkowały kwas fumarowy z wydajnością wyższą o około 17% w porównaniu ze szczepami rodzicielskimi. Szczep R-67 okazał się być bardziej wrażliwy na stosowane w modyfikacjach związki chemiczne i uzyskane mutanty były słabsze niż szczep rodzicielski i nie spełniły oczekiwań produkcyjnych.

Słowa kluczowe: kwas fumarowy, glicerol, *Rhizopus*, kolchicyna, benomyl

Wprowadzenie

Jednym z głównych metabolitów wytwarzanych przez grzyby strzępkowe *Rhizopus* sp. jest kwas fumarowy. Znajduje on zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Stosowany jest w przemyśle spożywczym jako naturalny środek konserwujący i zakwaszający (dodawany do wyrobów piekarniczych, deserów, rozpuszczalnych, sproszkowanych herbat, gum do żucia, napojów owocowych), oznaczony symbolem E297. W przemyśle paszowym może być stosowany jako

dodatek do pasz dla bydła, redukujący emisję metanu. Ze względu na swoją strukturę, dwie grupy karboksylowe oraz podwójne wiązanie, jest dogodnym substratem w reakcjach polimeryzacji czy estryfikacji. Zastosowanie kwasu fumarowego, jako surowca w produkcji żywic poliestrowych, papierowych, czy alkilowych, zapewnia nietoksyczność i większą twardość uzyskiwanych polimerów [Riscaldati i in., 2000; Roa Engel i in., 2008]. Kwas fumarowy jest najefektywniej produkowany przez grzyby z rodzaju *Rhizopus* z glukozy. Innymi surowcami mogą być odpady ligninocelulozowe np. hydrolizaty słomy kukurydzianej lub drewna eukaliptusowego [Ferreira i in., 2013]. Nowym substratem może być również glicerol, otrzymywany obecnie w dużych ilościach jako odpad w produkcji biodiesla [Nicol, 2012]. Jednak wydajności tego procesu nie są wysokie, co jest przyczyną ciągłych poszukiwań zwiększenia efektywności fermentacyjnej.

Do czynników determinujących ilość kwasu fumarowego, wytwarzanego metodą biotechnologiczną należą rodzaj zastosowanego szczepu grzyba oraz metody hodowli. Produkcja kwasu fumarowego może być intensyfikowana na drodze inżynierii genetycznej i metabolicznej poprzez przypadkową mutagenizację szczepów produkcyjnych [Kang i in., 2010; Yu i in., 2012], transformację czy fuzję protoplastów [Kordowska-Wiater i in., 2012]. Inną metodą, nie wykorzystującą narzędzi inżynierii genetycznej, jest doskonalenie szczepów na drodze poliploidyzacji jąder komórkowych przy użyciu kolchicyny i haploidyzacji przy użyciu benomylu stosowane dotychczas na komórki grzyba *Trichoderma* [Toyama i in., 2003; Toyama i in., 2007]. Kolchicyna jako czynnik zaburzający podziały komórkowe powoduje zahamowanie procesu mitozy, czego efektem jest autopoliploidyzacja jąder komórkowych, benomyl natomiast przyczynia się do powstania zmienności na drodze delekcji i rekombinacji chromosomów [Toyama i in., 2004]. Założenie uzyskania szczepów o wzmożonej zdolności do wytwarzania kwasu fumarowego opiera się na amplifikacji genów w procesie poliploidyzacji chromosomów. Do tej pory metoda ta nie była stosowana do doskonalenia szczepów *Rhizopus*.

Celem pracy było genetyczne udoskonalenie produkcyjnych szczepów grzybów z gatunków *Rhizopus oryzae* i *Rhizopus microsporus* na drodze poliploidyzacji z wykorzystaniem kolchicyny, a następnie haploidyzacji za pomocą benomylu.

Materiał i metody badań

Mikroorganizmy

Szczepy grzybów: *Rhizopus oryzae* NBRC 4756 (R-15), *R. oryzae* NBRC 4773 (R-18) i *R. microsporus* R-67 izolowany z żyta były przechowywane na skosach agarowych PDA w temp. 4°C. Szczepy zostały wyselekcjonowane na podstawie ich zdolności do produkcji kwasu fumarowego z glicerolu.

Podłoża hodowlane

Podłoże do przechowywania szczepów: PDA – agar glukozowo-ziemniaczany.

Podłoże do hodowli *Rhizopus*: KH_2PO_4 2 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g/l; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l; CaCl_2 0.3 g/l; ekstrakt drożdżowy 1.0 g/l; roztwór mikroelementów ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; ZnSO_4) 0.5 ml/l; Tween 80 1 ml /l; glukoza 10 or 20 g /l; pH 6.0.

Podłoże do poliploidyzacji: podłoże do hodowli z dodatkiem 0,1% (w/v) kolchicyny.

Podłoże izolacyjne: PDA z dodatkiem Tritonu X-100 w stężeniu 0,1% (w/v).

Podłoże do haploidyzacji: PDA z dodatkiem benomylu w stężeniu 1,2 $\mu\text{g/ml}$.

Podłoże selekcyjne: KH_2PO_4 2 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g/l; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l; CaCl_2 0.3 g/l; ekstrakt drożdżowy 1.0 g/l; roztwór mikroelementów ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; ZnSO_4) 0.5 ml/l; Tween 80 1 ml/l; glicerol 10 g/l; zieleń bromokrezolowa 0,1 g/l; agar 20 g/l; pH 6.0.

Podłoże produkcyjne: KH_2PO_4 2 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g/l; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l; CaCl_2 0.3 g/l; ekstrakt drożdżowy 1.0 g/l; roztwór mikroelementów ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; ZnSO_4) 0.5 ml /l; Tween 80 1 ml/l; glicerol 40 g/l; pH 6.0.

Przygotowanie młodych hodowli *Rhizopus*

Podłoża do hodowli *Rhizopus* o objętości 50 ml w kolbach 100 ml zaszczerpiono zawiesinami zarodników szczepów R-15, R-18 i R-67 i inkubowano w temp. 32°C na wytrząsarce Infors Minitron przy 180 obr/min. Co godzinę monitorowano pod mikroskopem w preparatach przyżyciowych kiełkowanie zarodników i wzrost młodych strzępek uzyskując młode hodowle grzybów R-15 i R-18 po 6 h , a szczepu R-67 po 7 h inkubacji.

Poliploidyzacja jąder komórkowych *Rhizopus* (R-15, R-18 i R-67)

Uzyskanymi w poprzednim etapie młodymi, rozwijającymi się grzybniami zaszczerpiono płynne podłoża z kolchicyną o objętości 25 ml w kolbach 100 ml. Prowadzono hodowle na wytrząsarce Infors Minitron, przy 200 obr/min w temp. 32°C przez 10 dni. W tym czasie prowadzono obserwację wzrostu grzybni i wykonywano preparaty barwione metodą Piekarskiego-Robinowa w celu obserwacji jąder komórkowych. Równolegle prowadzono hodowle kontrolne trzech szczepów w podłożu nie zawierającym kolchicyny.

Uzyskanie pojedynczych kolonii grzybów

Przeszczerpiono fragmenty grzybni każdego szczepu na płytki Petriego z podłożem PDA z dodatkiem Tritonu X-100 i prowadzono inkubację w temp. 32°C przez 6 dni (R-15 i R-18) oraz przez 10 dni (R-67).

Haploidyzacja jąder komórkowych

Przeszczepiono fragmenty grzybni w/w szczepów na podłoże PDA z dodatkiem benomylu w stężeniu 1,2 µg/ml, które dobrano na podstawie wcześniejszych badań w celu haploidyzacji jąder. Inkubacja przebiega w temp. 32°C. Po trzytygodniowej hodowli grzybów *Rhizopus* R-15, R-18 i R-67 uzyskano po 10 izolatów szczepów R-15 i R-18 oraz 6 izolatów szczepu R-67.

Selekcja izolatów

Selekcję uzyskanych izolatów prowadzono na stałym podłożu selektywnym pod kątem produkcji kwasów z glicerolu. Dokonano pomiaru wielkości stref odbarwionego podłoża wokół kolonii izolatów zakwaszających podłoże (obserwacja zmiany barwy podłoża z zielonej na żółtą). Wybrane kolonie zostały przeszczepione na świeże skosy agarowe PDA i poddane inkubacji w temp. 32°C do uzyskania wzrostu.

Produkcja kwasu fumarowego z glicerolu

Podłoże produkcyjne o objętości 50 ml w kolbach Erlenmeyera 100 ml zostało zaszczerpione fragmentami grzybni otrzymanych izolatów *Rhizopus* R-15, R-18 i R-67. Hodowle płynne prowadzono w temp. 32°C na wytrząsarce Infors Minitron, przy 200 obr/min przez 7 dni. Po 24 h hodowli oznaczano pH i dodawano 10% (w/v) roztwór CaCO₃ do uzyskania pH 5,4. Po tygodniu oznaczono odczyn hodowli oraz pobrano i przygotowano próbki do analizy chromatograficznej HPLC. W tym celu hodowle traktowano 7,8% roztworem H₂SO₄, sterylizowano przez 15 min w 121 °C, aby odzyskać kwas fumarowy z fumaranu wapnia. Następnie próbki odbiałczano acetonitrylem (1:1) i odwirowano przy 13000 obr/min, aby usunąć białka. Uzyskane supernatanty przeznaczono do analizy HPLC.

Oznaczenie kwasu fumarowego i glicerolu

Zawartość pozostałego w hodowlach glicerolu oraz wytworzonego kwasu fumarowego oznaczono na chromatografii cieczowej firmy Gilson wyposażonym w detektory UV-Vis i RI, autosampler i integrator. Do rozdzielania użyto kolumny Bio-Rad HPX-87H termostatowanej w temp. 65 °C, fazę ruchomą stanowił 0,05 M H₂SO₄ a szybkość przepływu wynosiła 0,5 ml/min. Analiza stężeń kwasu fumarowego była dokonana za pomocą oprogramowania UniPoint (Gilson, Francja), a stężenia glicerolu oznaczono za pomocą programu Chromax 2007 (Pol-lab, Poland) w oparciu o odpowiednie wzorce.

Wyniki i dyskusja

Metoda modyfikacji genetycznej oparta o autopoliploidyzację za pomocą kolchicyny, a następnie haploidyzację jąder komórkowych grzybów z użyciem benomylu była do tej pory prowadzona na grzybach z rodzaju *Trichoderma*

[Toyama i in., 2003; Toyama i in., 2007] natomiast prezentowane doniesienie jest pierwszą publikacją dotyczącą wykorzystania tej metody na komórkach *Rhizopus*. Metoda selekcji na podłożu z zielenią brylantową była z kolei opisywana w różnych publikacjach dotyczących mutagenyzy grzybów *Rhizopus* za pomocą promieniowania UV, γ , laserowego femtosekundowego w kierunku zwiększenia efektywności produkcji kwasu fumarowego przez te grzyby [Huang i in., 2010; Kang i in., 2010; Yu i in., 2012]. W wyniku przeprowadzonej selekcji otrzymano na płytkach Petriego po 10 izolatów *Rhizopus* R-15 i R-18 oraz 6 izolatów R-67 wykazujących aktywność kwasotwórczą. Średnice odbarwionego podłoża wokół kolonii grzybów porównywano ze średnicami hodowli kontrolnych i wyliczono procentowy wzrost zdolności kwasotwórczych dla poszczególnych izolatów, co przedstawiono w Tabeli 1. Siedem izolatów *Rhizopus* R-15 charakteryzowało się wzrostem zdolności kwasotwórczych w porównaniu ze szczepem kontrolnym w zakresie 5- 35%. Najefektywniejsze okazały się izolaty R-15-1 i R-15-4. Spośród izolatów R-18 tylko trzy charakteryzowały się poprawą zdolności kwasotwórczych w porównaniu z kontrolnym szczepem w zakresie 6,25- 18,75%, a najlepszym izolatem był R-18-4.

Tab. 1. Wstępna selekcja uzyskanych izolatów *Rhizopus* na płytkach Petriego

Szczep	Średnica strefy [mm]	Wzrost zdolności kwasotw. [%]	Szczep	Średnica strefy [mm]	Wzrost zdolności kwasotw. [%]
R-15-1	50	25	R-18-1	34	6.25
R-15-2	44	10	R-18-2	32	-
R-15-3	46	15	R-18-3	26	-
R-15-4	54	35	R-18-4	38	18.75
R-15-5	40	-	R-18-5	32	-
R-15-6	44	10	R-18-6	36	12.5
R-15-7	40	-	R-18-7	22	-
R-15-8	44	10	R-18-8	28	-
R-15-9	38	-	R-18-9	30	-
R-15-10	42	5	R-18-10	30	-
R-15 K	40	-	R-18 K	32	-
R-67-1	10	-	R-67-5	0	-
R-67-2	30	50	R-67-6	0	-
R-67-3	0	-	R-67 K	20	-
R-67-4	0	-			

Szczep *Rhizopus* R-67 okazał się być bardziej wrażliwy na działanie kolchicyny, a zwłaszcza benomylu, charakteryzował się wolniejszym wzrostem i uzyskano sześć izolatów, z których tylko jeden odznaczał się wyższą o 50% zdolnością do tworzenia kwasów niż szczep kontrolny.

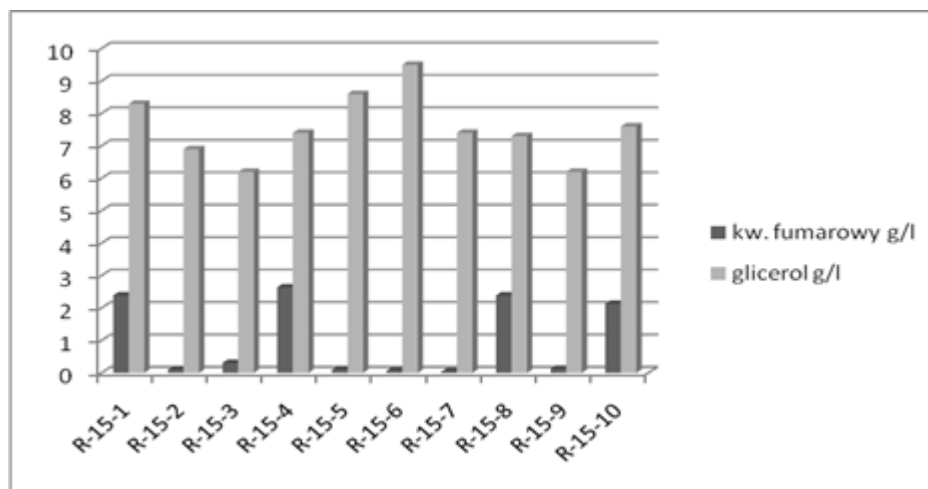
Wyselekcjonowane szczepy zostały przebadane pod kątem produkcji kwasu fumarowego z glicerolu jako źródło węgla i energii. Wszystkie izolaty hodowano w płynnym podłożu, w optymalnych warunkach temperatury i napowietrzania. Zaobserwowano, że grzyby poddane działaniu kolchicyny i benomylu charakteryzowały się tworzeniem drobnych pelletów podczas hodowli, choć szczepy kontrolne tworzyły grzybnię zbitą lub duże pellety. Po siedmiu dniach oznaczono stężenia pozostałego glicerolu i wytworzonego kwasu fumarowego. Wyniki dla izolatów R-15 i R-18 przedstawiono na rysunkach 1 i 2 oraz w Tabeli 2. Z rysunków wynika, że najwyższe stężenia kwasu fumarowego uzyskano w hodowlach R-15-1, R-15-4, R-15-8 i R-15-10 – 2,13-2,64 g/l, zaś wydajności tych hodowli mieściły się w zakresie 0,17-0,21 g/g.

Tab. 2. Wydajności kwasu fumarowego z glicerolu uzyskane przez modyfikowane szczepy *Rhizopus*

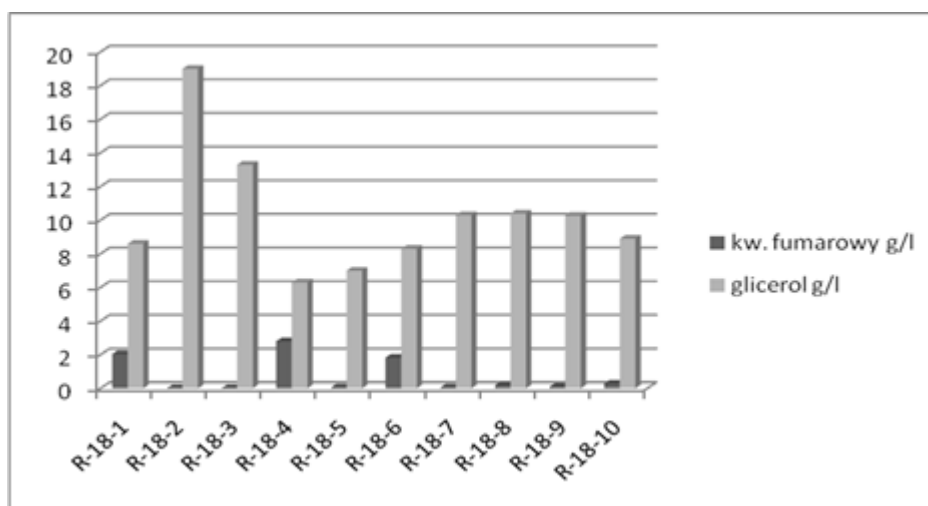
Szczep	Wydajność g/g	Szczep	Wydajność g/g
R-15-1	0,2	R-18-1	0,18
R-15-2	0,008	R-18-2	0,012
R-15-3	0,02	R-18-3	0,002
R-15-4	0,21	R-18-4	0,2
R-15-5	0,009	R-18-5	0,04
R-15-6	0,007	R-18-6	0,16
R-15-7	0,003	R-18-7	0,005
R-15-8	0,19	R-18-8	0,019
R-15-9	0,009	R-18-9	0,01
R-15-10	0,17	R-18-10	0,026
R-15 K	0,18	R-18 K	0,17

W hodowlach R-18 odnotowano najwyższe stężenia kwasu fumarowego w zakresie 1,83 – 2,8 g/l u R-18-1, R-18-4 i R-18-6 przy wydajnościach w zakresie 0,16-0,2 g/g. Warto nadmienić, że wydajności w hodowlach szczepów kontrolnych, rodzicielskich wynosiły odpowiednio 0,18 i 0,17 g/g (Tabela 2). Wyniki wskazały na 1,17-krotny wzrost wydajności dla uzyskanych najefektywniejszych izolatów (R-15-4 i R-18-4) w porównaniu ze szczepami

rodzicielskimi. Natomiast izolaty szczepu R-67 (R-67-1 i R-67-2) rosły w hodowlach bardzo słabo i produkowały kwas fumarowy w niskich stężeniach. W swoich badaniach, nad produkcją kwasu fumarowego przez szczepy *Rhizopus*, Komoń i in. [2013a; 2013b] wykazali, że *R. oryzae* ATCC 20344 był najefektywniejszym producentem i wytwarzał 15 g/l lub 20 g/l kwasu z 30 g/l surowego glicerolu w hodowli wytrząsanej lub bioreaktorowej, natomiast na czystym glicerolu jako źródle węgla, grzyby rosły bardzo słabo i produkowały nieznaczne ilości kwasu fumarowego.



Rys. 1. Zawartość kwasu fumarowego i pozostałego glicerolu w hodowlach zmodyfikowanych szczepów *R. oryzae* R-15



Rys. 2. Zawartość kwasu fumarowego i pozostałego glicerolu w hodowlach zmodyfikowanych szczepów *R. oryzae* R-18

Kordowska-Wiater i in. [2012] w badaniach dotyczących produkcji kwasu fumarowego z glicerolu przez fuzanty *R. oryzae* i *R. microsporus* wykazali zróżnicowane uzdolnienia otrzymanych w drugiej rundzie fuzji izolatów, wyższe średnio 1,46-krotnie w stosunku do szczepów wyjściowych. Uzyskali oni stężenia kwasu w podłożu produkcyjnym, w zakresie 3,4 - 4,1 g/l oraz wydajności w zakresie 0,2-0,27 g/g dla różnych fuzantów, podczas gdy szczepy rodzicielskie wytwarzały około 3 g/l kwasu z 20 g/l glicerolu. Badania, w których opisywano zdolności produkcyjne mutantów *Rhizopus* zwykle dotyczyły wykorzystania glukozy jako źródła węgla, gdzie efektywność fermentacji była wyższa. Kang i in. [2010] uzyskali mutant *R. oryzae* RUR709 po działaniu promieni UV i γ , który produkował 26,2 g/l kwasu w hodowli okresowej w kolbach, i 32,1 g/l w hodowli bioreaktorowej w warunkach optymalnych opracowanych metodą płaszczyzny odpowiedzi (RSM –response surface methodology); uzyskując wydajność kwasu fumarowego na poziomie 0,45 g/g, 1,9-krotnie wyższą niż szczep rodzicielski. Z kolei mutant *R. oryzae* ZJU11 uzyskany przez Huang i in. [2010] po 4 rundach mutagenazy UV produkował 57,4 g/l i 41,1 g/l kwasu fumarowego w hodowli okresowej, i w bioreaktorowej z 85 g/l glukozy, dając dwukrotny w porównaniu ze szczepem rodzicielskim wzrost wydajności. Mutanty *R. oryzae* ME-F01, opisane przez Fu i in. [2010], otrzymane po mutagenizie promieniami UV i działaniem NTG wytwarzały ok. 50 g/l kwasu fumarowego ze 100 g/l glukozy, i dla najlepszego mutantu uzyskano 1,21-krotny wzrost produkcji kwasu fumarowego w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki wskazują, że metoda modyfikacji szczepów *Rhizopus* za pomocą kolchicyny i benomylu w niewielkim stopniu przyczyniła się do zwiększenia efektywności produkcji kwasu fumarowego z glicerolu i wymaga dalszych badań.

Wnioski

1. Zastosowana procedura modyfikacji genetycznej grzybów z rodzaju *Rhizopus* z użyciem kolchicyny i benomylu okazała się skuteczna.
2. W wyniku przeprowadzonej modyfikacji grzybów *Rhizopus* za pomocą kolchicyny i benomylu wyizolowano po 10 szczepów *R. oryzae* R-15 i R-18 oraz 6 izolatów *R. microsporus* R-67.
3. Uzyskano trzy szczepy R-15: R-15-1, R-15-4 i R-15-8 i dwa szczepy R-18: R-18-1 i R-18-4, które produkowały kwas efektywniej niż szczepy rodzicielskie, dając wydajności 0,18-0,21 g/ g.
4. Dwa najefektywniejsze mutanty R-15-4 i R-18-4 produkowały kwas fumarowy z wydajnością wyższą o około 17% w porównaniu ze szczepami rodzicielskimi.
5. Mutanty szczepu R-67 były bardziej wrażliwe na stosowane w modyfikacjach związki chemiczne i nie spełniły oczekiwań produkcyjnych.

Publikacja została zrealizowana w ramach projektu PO IG 01.01.02-00-074/09
Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioili i kwasów dikarboksylowych

Literatura

- [1] Ferreira J.A., Lennartsson P.R., Edebo L., Taherzadeh M.: Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresource Technology*, 2013, 135, 523-532.
- [2] Fu Y-Q., Xu Q., Li S., Chen Y., Huang H.: Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of fumaric acid by reducing ethanol synthesis pathway. *Korean Journal of Chemistry Engineering*, 2010, 27(1), 183-186.
- [3] Huang L., Wei P., Zang R., Xu Z., Cen P.: High-throughput screening of high-yield colonies of *Rhizopus oryzae* for enhanced production of fumaric acid. *Annals of Microbiology*, 2010, 60, 287-292.
- [4] Kang S.W., Lee H., Kim D., Lee D., Chun G.-T., Lee J., Kim S.W., Park C.: Strain development and medium optimization for fumaric acid production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2010, 15, 761-769.
- [5] Komoń E., Wyrostek J., Targoński Z.: Bioconversion of crude glycerol to fumaric acid by *Rhizopus oryzae* through supplementation with soybean components. 3rd Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection–MIKROBIOT, Łódź, 2013a.
- [6] Komoń E., Wyrostek J., Kuzdraliński A., Targoński Z.: Biodiesel-derived crude glycerol as a substrate for fumaric acid production by fungus of the genus *Rhizopus*. 5th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH, Kraków, 2013b.
- [7] Kordowska-Wiater M., Polak-Berecka M., Waśko A., Targoński Z.: Protoplast fusion of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* for enhanced fumaric acid production from glycerol. *BioTechnologia*, 2012, 93(4), 425-430.
- [8] Nicol R.W., Marchand K., Lubitz W.D.: Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93, 1865-1875.
- [9] Riscaldati E., Moresi M., Federici F., Petruccioli M.: Direct ammonium fumarate production by *Rhizopus arrhizus* under phosphorous limitation. *Biotechnology Letters*, 2000, 22, 1043–1047.
- [10] Roa Engel C.A., Straathof A.J.J., Zijlmans T.W., van Gulik W.M., van der Wielen L.A.M.: Fumaric acid production by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78, 379–389.
- [11] Toyama H., Yano M., Gisushi A., Hotta T., Toyama N.: Active nuclear shuffling system using a swollen conidium of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 105-108, 821-824.
- [12] Toyama H., Yano M., Hotta T., Toyama N.: Filter paper degrading ability of a *Trichoderma* strain with multinucleate conidia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 136-140, 155-160.

- [13] Toyama H., Yano M., Hotta T.: Polykaryon formation using a swollen conidium of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, 113-116, 325-334.
- [14] Xu Q., Li S., Fu Y., Tai C., Huang H.: Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresource Technology*, 2010, 101, 6262-6264.
- [15] Yu S., Huang D., Wen J., Li S., Chen Y., Jia X.: Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by femtosecond laser irradiation. *Bioresource Technology*, 2012, 114, 610-615.

KINETYKA WZROSTU WYBRANYCH SZCZEPÓW DROŻDŻY Z RODZAJU *RHODOTORULA* W PODŁOŻACH Z ZIEMNIACZANĄ WODĄ SOKOWĄ I GLICEROLEM

ANNA MARIA KOT, STANISŁAW BŁĄŻEJAK, IWONA GIENTKA,
LIDIA STASIAK-RÓŻAŃSKA, MAREK KIELISZEK

Streszczenie

Wraz z rozwojem cywilizacji nastąpił rozwój przemysłu i związany z tym wzrost ilości produktów odpadowych. Rosnąca świadomość ekologiczna społeczeństwa oraz troska o środowisko naturalne skłoniły do poszukiwania nowych sposobów utylizacji i zagospodarowania problematycznych odpadów. Duże nadzieje pokłada się w metodach biotechnologicznych, które nie tylko umożliwiają biodegradację produktów ubocznych ale także pozyskanie nowego produktu o wartości dodanej takiego jak np. biomasa drożdży. Celem pracy było porównanie dynamiki wzrostu drożdży *R. glutinis*, *R. mucilaginosa* oraz *R. gracilis* w podłożach modelowych przygotowanych z dwóch surowców odpadowych. Jako źródło węgla zastosowano glicerol, a jako źródło azotu odbiałczoną ziemniaczaną wodę sokową. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wszystkie szczepy drożdży posiadały zdolność do wzrostu w podłożach modelowych, a kinetyka wzrostu była cechą indywidualną danego szczepu zależną od stężenia glicerolu w środowisku hodowlanym. W przypadku hodowli drożdży *R. mucilaginosa* oraz *R. gracilis* zwiększanie zawartości glicerolu w podłożu skutkowało zmniejszeniem właściwej szybkości wzrostu oraz wydłużeniem czasu generacji w porównaniu do podłoża kontrolnych. Podczas hodowli drożdży *R. glutinis* taką samą tendencję stwierdzono w pożywkach zawierających powyżej 5% tego związku. We wszystkich podłożach modelowych najwyższy wzrost (ΔOD) oraz szybkość właściwą wzrostu (μ_{max}) wykazał szczep drożdży *R. glutinis*. Dodatek glicerolu do środowiska w ilości powyżej 10% (m/v) znacznie ograniczał wzrost badanych szczepów drożdży.

Słowa kluczowe: odpady, biodiesel, *Rhodotorula*, Bioscreen C

Wprowadzenie

W przypadku niektórych odpadów przemysłowych brak jest racjonalnych koncepcji zagospodarowania, a ich utylizacja w warunkach naturalnych może doprowadzić do degradacji środowiska naturalnego. Do takich produktów ubocznych należą m.in. odbiałczona ziemniaczana woda sokowa powstająca podczas produkcji skrobi ziemniaczanej oraz frakcja glicerynowa wytworzona podczas produkcji biodiesla. Produkcja skrobi ziemniaczanej w Europie wynosiła

w ostatnich latach około 1,7 mln ton rocznie. W Polsce wartość ta utrzymuje się od kilku lat na stałym poziomie, wynoszącym około 105 tys. ton [Dzwonkowski, 2012]. Głównym produktem ubocznym powstającym podczas produkcji skrobi ziemniaczanej jest ziemniaczana woda sokowa. Szacuje się, że podczas przerobu 1000 ton ziemniaków powstaje około 600 m³ ziemniaczanej wody sokowej [Bzducha-Wróbel i in., 2014]. Ziemniaczana woda sokowa zawiera średnio 2,9-4,3% suchej substancji, z czego białko stanowi 0,93-1,57%, cukry 0,5-0,8%, tłuszcz 0,2%, związki mineralne 1%. Odpad ten charakteryzuje się wysoką wartością wskaźnika ChZT, który wynosi co najmniej 20000 mg O₂/L [Lubiewski i in., 2006].

Frakcja glicerynowa składa się głównie z glicerolu w ilości 50-65%, a pozostałą część stanowią metanol, wolne kwasy tłuszczowe, mono- i diacyloglicerole, fosfolipidy, tokoferole, barwniki, mydła, woda oraz resztki katalizatora [Gaca, 2006]. W 2012 roku całkowita ilość wyprodukowanego biodiesla wyniosła ponad 23 mln ton, z czego przeszło 39% wytworzono w Unii Europejskiej [Internet 2]. W Polsce sektor biopaliw stale się rozwija. W 2010 roku produkcja wynosiła około 400 tys. ton, a ilość ta pokryła jedynie 44% krajowego zapotrzebowania [Roszkowski, 2012]. Według dostępnych danych, ilość wytworzonego w 2013 roku biodiesla wzrosła do około 650 tys. ton [Internet 1].

Problemy powstające w trakcie utylizacji ziemniaczanej wody sokowej oraz glicerolu stały się podstawą do poszukiwania nowych biotechnologicznych metod ich przetwarzania, które umożliwiłyby skuteczną biodegradację z jednoczesnym wytworzeniem produktu o wartości dodanej.

Drożdże z rodzaju *Rhodotorula* występują powszechnie w wodzie, glebie, powietrzu oraz na roślinach i zwierzętach. Do niedawna były postrzegane wyłącznie jako saprofity psujące żywność [Lewicka i in., 2009] czy też jako czynnik etiologiczny grzybicy skórnych [Wirth i Goldani, 2012]. W ostatnich latach stwierdzono, że drożdże te są zdolne do syntezy wielu metabolitów o znaczeniu przemysłowym. Biomasa tych mikroorganizmów może stanowić źródło tłuszczu [Saenge i in., 2011], karotenoidów [Hernández-Almanza i in., 2014] lub enzymów takich jak amoniakoliza fenyloalaninowa [Zhu i in., 2014] oraz α -L-arabinofuranozydaza [Martínez i in., 2006]. Ponadto drożdże z rodzaju *Rhodotorula* zdolne są do wzrostu i syntezy metabolitów w podłożach zawierających surowce odpadowe, co zwiększa ekonomiczną opłacalność procesów biotechnologicznych [Xue i in., 2008; Schneider i in., 2013; Błażej i in., 2014].

Z technologicznego i ekonomicznego punktu widzenia, ważną cechą procesów biotechnologicznych jest szybkość wzrostu mikroorganizmów, ponieważ od niej zależy stopień biodegradacji odpadów oraz ilość wytworzonej biomasy komórkowej. Wygodnym narzędziem pozwalającym wstępnie ocenić zdolność wzrostu jest aparat Bioscreen C, który umożliwia prowadzenie jednocześnie 200 mikrohodowli drobnoustrojów. W urządzeniu tym monitorowanie wzrostu odbywa się podstawie zmian gęstości optycznej.

Celem pracy było porównanie kinetyki wzrostu trzech szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula* podczas hodowli w podłożach przygotowanych z ziemniaczanej wody sokowej suplementowanej różnymi dawkami glicerolu.

Materiał i metody badań

Materiał biologiczny badań stanowiły trzy szczepy drożdży: *Rhodotorula glutinis* LOCK 0051, *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 oraz *Rhodotorula gracilis* pochodzące z Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW w Warszawie.

Ziemniaczaną wodę sokową przygotowano w warunkach laboratoryjnych z ziemniaków odmiany Irga, według metodyki opracowanej na podstawie etapów procesu technologicznego otrzymywania skrobi ziemniaczanej w krochmalniach. Umyte ziemniaki rozdrabniano mechanicznie, w wyniku czego nastąpiło oddzielenie soku komórkowego od pulpy ziemniaczanej. Pozostałości skrobi z wody sokowej usuwano poprzez wirowanie przy 3000g przez 20 minut (Centrifuge 5810, Eppendorf). W celu wytrącenia białka ziemniaczanego, wodę sokową zakwaszano roztworem kwasu solnego do pH 5,0 i ogrzewano w temperaturze 117°C przez 10 minut. Białko oddzielano od roztworu przez filtrację. Uzyskaną w ten sposób ziemniaczaną wodę sokową sterylizowano (121°C/20 min) i do czasu wykorzystania przechowywano w temperaturze pokojowej. Ziemniaczana woda sokowa zawierała 1,34% cukrów redukujących (oznaczonych metodą Millera) oraz 1,29% białka ogółem (oznaczonego metodą Kjeldahla).

W badaniach zastosowano dwa podłoża kontrolne: YPD (glukoza 20 g/L, pepton 20 g/L, ekstrakt drożdżowy 10 g/L) oraz odbiałczoną ziemniaczaną wodę sokową (W). Podłoża modelowe przygotowano na bazie ziemniaczanej wody sokowej, która stanowiła źródło azotu oraz glicerolu stanowiącego źródło węgla (POCH, Polska), który dodawano w ilości 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 oraz 25% (m/v). W dalszej części pracy podłoża modelowe oznaczono odpowiednio następującymi skrótami: W+G2%, W+G3%, W+G4%, W+G5%, W+G10%, W+G15%, W+G20% oraz W+G25%. Kwasowość czynną podłoży ustalono na początku hodowli poziomie $5,0 \pm 0,1$.

Do przygotowania inokulum zastosowano płynne podłoże YPD o początkowej kwasowości czynnej $5,0 \pm 0,1$. Hodowle badanych szczepów drożdży prowadzono w kolbach płaskodennych, na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej przy 200 rpm/min (SM-30 Control, Edmund Bühler) w temperaturze 28°C przez 18 - 24 godziny, tak aby w inokulum znajdowało się ok. 1×10^6 jtk/cm³ (liczbę komórek drożdży określano w komorze Thoma). Po tym czasie pobierano jałowo 1 cm³ podłoża i odwirowywano (2000g/10 minut, MiniSpin Plus, Eppendorf), następnie biomasę drożdży przemywano jałową solą fizjologiczną i wirowano. Supernatant zlewano, a biomasę zawieszano w 1 cm³ odpowiedniego podłoża kontrolnego lub modelowego. Następnie inokulum przenoszono ilościowo do probówek zawierających 9 cm³ odpowiedniego podłoża kontrolnego lub modelowego.

Hodowle wybranych szczepów drożdży w podłożach kontrolnych oraz modelowych prowadzono w automatycznym aparacie Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finlandia). Do jednej mikrostudzienki znajdującej się na płycie wprowadzono 300 μ l zaszczepionego podłoża (ok. 1×10^5 jtk/cm³). Jednocześnie w celu kontroli jałowości przygotowano próbki niezaszczepione. Hodowle prowadzono przez 120 godzin, w temperaturze 28°C przy intensywnym wytrząsaniu. Pomiaru gęstości optycznej dokonywano co 2 godziny przy zastosowaniu filtra szerokopasmowego $\lambda = 420\text{--}580$ nm.

Na podstawie wyników uzyskanych z pięciu równoległych powtórzeń sporządzono wykresy zależności pomiędzy gęstością optyczną hodowli (OD), a czasem jej trwania w arkuszu programu Microsoft Office Excel 2013. Następnie wyznaczono czas trwania fazy adaptacyjnej (Δt_{lag}), fazy logarytmicznej (Δt_{log}) oraz minimalną i maksymalną wartość OD w fazie wzrostu logarytmicznego. Współczynnik właściwej szybkości wzrostu (μ_{max}) obliczono wykorzystując wzór: $\mu_{\text{max}} = (\ln OD_{\text{max}} - \ln OD_{\text{min}}) / \Delta t_{\text{log}}$. Czas generacji (g) wyznaczono ze wzoru: $g = \ln 2 / \mu_{\text{max}}$. Ponadto określono również całkowity przyrost gęstości optycznej hodowli (ΔOD).

Wyniki i dyskusja

Charakterystyki wzrostu wybranych szczepów z rodzaju *Rhodotorula* dokonano na podstawie zmian wartości gęstości optycznej w poszczególnych godzinach hodowli w aparacie Bioscreen C. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tab. 1, 2 oraz 3.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że badane drożdże z rodzaju *Rhodotorula* były zdolne do wzrostu w podłożach kontrolnych oraz wybranych podłożach modelowych. We wszystkich przypadkach najwyższy całkowity przyrost gęstości optycznej hodowli odnotowano w syntetycznym podłożu kontrolnym YPD oraz podłożu zawierającym ziemniaczaną wodę sokową. Czas trwania poszczególnych faz wzrostu w tych podłożach był zależny od szczepu. Najszybciej do nowego środowiska przystosowały się komórki drożdży *Rhodotorula mucilaginosa*, a czas trwania fazy adaptacyjnej wynosił 4 godziny (tab. II). Podczas hodowli drożdży *Rhodotorula glutinis* oraz *Rhodotorula gracilis* czas trwania tej fazy był dłuższy i wynosił odpowiednio 10 i 16 godzin (Tab. 1 i 3).

Drożdże *R. mucilaginosa* oraz *R. gracilis* wykazały najszybsze tempo wzrostu, wyrażone jako współczynnik μ_{max} , w podłożach kontrolnych. Czas generacji w podłożach YPD oraz W wynosił ok. 14 godzin dla *R. mucilaginosa* (Tab. 2) oraz ok. 24 godzin dla *R. gracilis* (Tab. 3). Drożdże *R. glutinis* wykazały natomiast najwyższe tempo wzrostu w podłożach modelowych zawierających ziemniaczaną wodę sokową suplementowaną 2, 3 i 4% dodatkiem glicerolu. We wszystkich przypadkach zarówno czas trwania fazy adaptacyjnej jak i logarytmicznej był zbliżony i wynosił 10 - 12 h. Najwyższą wartość współczynnika μ_{max} stwierdzono w podłożu z 3% dodatkiem glicerolu ($0,0533 \text{ h}^{-1}$). W przypadku podłoża W+G2%,

W+G3% oraz W+G4% czas generacji był niższy niż w obu podłożach kontrolnych, natomiast dla hodowli w podłożu W+G5% zbliżony do wartości uzyskanej w podłożu zawierającym wyłącznie ziemniaczaną wodę sokową (Tab. 1).

Tab. 1. Parametry charakteryzujące wzrost drożdży *Rhodotorula glutinis* LOCK 0051 w podłożach kontrolnych oraz modelowych zawierających różne stężenia glicerolu

Podłoże	Δt_{lag} [h]	Δt_{log} [h]	μ_{max} [h ⁻¹]	g [h]	ΔOD
YPD	10	14	0,0412	16,8	1,741
W	10	12	0,0489	14,2	1,482
W+G2%	10	12	0,0513	13,5	1,436
W+G3%	12	10	0,0533	13,0	1,383
W+G4%	12	12	0,0516	13,4	1,411
W+G5%	12	12	0,0471	14,7	1,363
W+G10%	14	14	0,0395	17,5	1,320
W+G15%	10	18	0,0266	26,0	1,259
W+G20%	24	44	0,0071	97,1	0,610
W+G25%	20	54	0,0064	107,6	0,639

Tab. 2. Parametry charakteryzujące wzrost drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 w podłożach kontrolnych oraz modelowych zawierających różne stężenia glicerolu

Podłoże	Δt_{lag} [h]	Δt_{log} [h]	μ_{max} [h ⁻¹]	g [h]	ΔOD
YPD	4	18	0,0467	14,8	1,612
W	4	8	0,0478	14,5	1,452
W+G2%	4	10	0,0382	18,2	1,394
W+G3%	4	12	0,0362	19,1	1,304
W+G4%	6	10	0,0339	20,4	1,287
W+G5%	6	12	0,0309	22,4	1,234
W+G10%	8	12	0,0242	28,6	1,170
W+G15%	8	16	0,0152	45,5	1,096
W+G20%	80	faza logarytmiczna nie zakończyła się do 120 h			0,812
W+G25%	brak wzrostu				

Tab. 3. Parametry charakteryzujące wzrost drożdży *Rhodotorula gracilis* w podłożach kontrolnych oraz modelowych zawierających różne stężenia glicerolu

Podłoże	Δt_{lag} [h]	Δt_{log} [h]	μ_{max} [h ⁻¹]	g [h]	ΔOD
YPD	16	22	0,0288	24,0	1,293
W	16	20	0,0280	24,7	1,246
W+G2%	20	26	0,0227	30,5	1,138
W+G3%	22	26	0,0215	32,3	1,144
W+G4%	30	26	0,0213	32,5	1,141
W+G5%	32	30	0,0200	34,6	1,109
W+G10%	52	30	0,0166	41,7	0,932
W+G15%	52	40	0,0071	97,4	0,666
W+G20%	60	faza logarytmiczna nie zakończyła się do 120 h			0,540
W+G25%	brak wzrostu				

Podobnie jak w przypadku hodowli *R. glutinis*, szybkość wzrostu drożdży *R. mucilaginosa* w podłożach modelowych z 2, 3, 4 i 5% dodatkiem glicerolu była do siebie zbliżona, jednak niższa niż w obu podłożach kontrolnych. Podczas hodowli drożdży *R. mucilaginosa* w podłożach W+G2% oraz W+G3% czas trwania fazy adaptacyjnej był taki sam jak w podłożach kontrolnych. Zmniejszeniu uległa natomiast właściwa szybkość wzrostu do 0,0382 h⁻¹ (W+G2%) oraz 0,0362 h⁻¹ (W+G3%), co skutkowało wydłużeniem czasu podwojenia biomasy do 18 i 19 godzin. W podłożach suplementowanych w 4 i 5% dodatek glicerolu również stwierdzono obniżenie właściwej szybkości wzrostu do 0,0339 h⁻¹ (W+G4%) oraz 0,0309 h⁻¹ (W+G5%) oraz wydłużenie czasu generacji do nieco ponad 20 godzin (Tab. 2). Najślabszy wzrost w podłożach suplementowanych w 2, 3, 4 i 5% glicerolu wykazał szczep *Rhodotorula gracilis*. Odnotowano, że podczas hodowli w tych podłożach komórki drożdży długo przystosowywały się do nowego środowiska, a czas trwania fazy adaptacyjnej był znacznie dłuży niż w przypadku pozostałych dwóch szczepów. Również znacznie wydłużył się czas generacji, w porównaniu do pozostałych szczepów (Tab. 3). Podczas hodowli testowanych szczepów drożdży w podłożach modelowych stwierdzono, że wraz ze zwiększeniem stężenia glicerolu w środowisku zmniejszał się całkowity przyrost gęstości optycznej.

Suplementacja podłoży modelowych glicerolem w stężeniach 10 i 15% spowodowała zmniejszenie właściwej szybkości wzrostu badanych szczepów drożdży oraz wydłużenie czasu generacji. Najlepszy wzrost w tych podłożach wykazały drożdże *R. glutinis*, a współczynniki właściwej szybkości wzrostu równe były 0,0395 h⁻¹ (W+G10%) oraz 0,0266 h⁻¹ (W+G15%) (Tab. 1). Najślabszym wzrostem natomiast charakteryzował się szczep *R. gracilis*. Wyznaczone wartości μ_{max} wynosiły jedynie 0,0166 h⁻¹ oraz 0,0071 h⁻¹, a czas generacji zwiększył się

aż do 41,7 oraz 97,4 godzin odpowiednio dla hodowli w podłożach W+G10% i W+G15%. Warto również podkreślić, że w tych podłożach czas trwania fazy przystosowawczej równy był aż 52 godziny (Tab. 3).

Drożdże *R. glutinis* wykazały zdolność do wzrostu w podłożach zawierających ziemniaczaną wodę sokową oraz najwyższe dawki glicerolu, tj. 20 i 25%. Podczas tych hodowli nastąpiło znaczne wydłużenie trwania fazy adaptacyjnej (24 i 20 h), logarytmicznego wzrostu (44 i 54 h) oraz spowolnienie tempa wzrostu komórek (Tab. 1). Dynamika wzrostu drożdży *R. mucilaginosa* oraz *R. gracilis* w podłożu W+G20% była podobna. Nastąpiło znaczące wydłużenie fazy adaptacyjnej, odpowiednio do 60 i 80 godzin, a faza wzrostu logarytmicznego nie zakończyła się do 120 h, w związku z tym niemożliwe było wyznaczenie parametrów charakteryzujących wzrost. Drożdże *R. mucilaginosa* oraz *R. gracilis* nie były zdolne do wzrostu w podłożu suplementowanym 25% dodatkiem glicerolu (Tab. 2 i 3).

Saenge i in. [2011] prowadzili hodowle drożdży *R. glutinis* TISTR 5159 w podłożach zawierających jako źródło azotu siarczan amonu, a jako źródło węgla glicerol w stężeniu 5, 9,5 i 14%. Wzrost określano na podstawie plonu biomasy komórkowej. Podobnie jak w niniejszej pracy stwierdzono, że wysokie stężenie glicerolu w środowisku hodowlanym znacznie spowalnia wzrost drożdży *R. glutinis*.

Błażej i in. [2014] zastosowali w hodowlach wglębnych drożdży *R. gracilis* ziemniaczaną wodę sokową jako źródło azotu oraz glicerol (5, 10, 15 i 20%) jako źródło węgla. Najwyższy wzrost badanego szczepu drożdży (wyrażony jako plon biomasy) uzyskano w podłożu z 5% dodatkiem glicerolu. Również odnotowano, że wzrastające stężenie ograniczało wzrost drożdży.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że czynnikiem determinującym wzrost badanych szczepów w podłożach modelowych była zawartość glicerolu w środowisku hodowlanym. W przypadku drożdży *R. mucilaginosa* oraz *R. gracilis* zwiększanie jego stężenia w podłożu skutkowało zmniejszeniem właściwej szybkości wzrostu oraz wydłużeniem czasu generacji w porównaniu do podłoży kontrolnych. Podczas hodowli *R. glutinis* taką samą tendencję stwierdzono w pożywkach zawierających powyżej 5% tego związku. Spowolnienie wzrostu badanych szczepów prawdopodobnie wynikało ze stresu osmotycznego wywołanego zwiększonym stężeniem glicerolu. Ciśnienie osmotyczne środowiska hodowlanego jest bowiem jednym z ważniejszych parametrów warunkujących wzrost drobnoustrojów [Sochocka i Boratyński, 2011]. Glicerol, jako substancja o wysokiej lepkości [Quispe i in., 2013], mógł również w pewnym stopniu oblepić komórki drożdży, utrudniając im wykorzystywanie składników odżywczych obecnych w środowisku.

Wnioski

1. Badania wykazały, że glicerol oraz odbiałczona ziemniaczana woda sokowa mogą stanowić składniki podłoży hodowlanych stosowanych do produkcji biomasy drożdży z rodzaju *Rhodotorula*.
2. Szybkość wzrostu drożdży w podłożach modelowych była zależna od zawartości glicerolu w środowisku hodowlanym. Najwyższy wzrost (ΔOD) oraz szybkość właściwą wzrostu (μ_{max}) w tych podłożach stwierdzono podczas hodowli drożdży *Rhodotorula glutinis* LOCK 0051.
3. Glicerol w stężeniu powyżej 10% (m/v) hamował wzrost badanych szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula*.

Literatura

- [1] Adamczak M., Bornscheuer U.T., Bednarski W.: The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009, 111(8), 808–813.
- [2] Błażej S., Gientka I., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Różańska L., Maszewska M. 2014: Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu przez drożdże *Rhodotorula gracilis* w podłożach zawierających ziemniaczaną odpadową wodę sokową wzbogaconą glicerolem. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2014, 576, 3–12.
- [3] Bzducha-Wróbel A., Błażej S., Molenda M., Reczek L.: Biosynthesis of $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. *European Food Research and Technology*, 2014, doi: 10.1007/s00217-014-2406-6.
- [4] Dzwonkowski W.: Perspektywy rynku skrobi i produkcji ziemniaków skrobiowych w kontekście zmian Wspólnej Polityki Rolnej. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 2012, 265, 99–108.
- [5] Gaca J.: Faza glicerynowa po produkcji biodiesla - odpad czy cenny surowiec? *Czysta Energia*, 2006, 11, 34-35.
- [6] Hernández-Almanza A., Montanez J.C., Aguilar-González M.A., Martínez-Ávila C., Rodriguez-Herrera, Aguilar C.A.: *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 2014, 5, 64 - 72.
- [7] Internet1: http://www.ure.gov.pl/pl/rynkienergii/paliwaciekle/biokomponentyi/biopal/dane_dotyczace-rynku-b, dostęp w dniu 22.02.2015.
- [8] Internet 2: <http://wpr.pl/produkcja-biodiesla-zwalnia>, dostęp w dniu 22.02.2015.
- [9] Lewicka A., Błażej S., Migdal M.: Tradycyjne i nowe kierunki biotechnologicznego wykorzystania drożdży z rodzaju *Rhodotorula*. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, 3 (64), 19 - 31.
- [10] Lubiewski Z., Śmigielska H., Lewandowicz G., Balcerek W.: Charakterystyka odcieku po koagulacji białka pozyskiwanego w toku kampanii

- krochmalniczej. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2006, 511, 617-626.
- [11] Martínez C., Gertosio C., Labbe A., Pérez R., Ganga M.A.: Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. Electronic Journal of Biotechnology, 2006, 9(4), doi: 10.2225/vol9-issue4-fulltext-8.
 - [12] Quispe C.A.G., Coronado C.J.R., Carvalho J.A.: Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2013, 27, 475-493.
 - [13] Roszkowski A.: Biodiesel w UE i Polsce - obecne uwarunkowania i perspektywy. Problemy Inżynierii Rolniczej, 2012, 77(3), 65-78.
 - [14] Saenge Ch., Cherisilp B., Suksaroge T., Bourtoom T.: Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochemistry, 2011, 46, 210-218.
 - [15] Schneider T., Graeff-Hönniger S., French W.T., Hernandez R., Merkt N., Claupein W., Hetrick M., Pham P.: Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. Energy, 2013, 61, 34-43.
 - [16] Sochocka M., Boratyński J.: Osmoregulacja - ważny parametr rozwoju bakterii. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2011, 65, 714-724.
 - [17] Wirth F., Goldani L.Z.: Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2012, doi: 10.1155/2012/465717.
 - [18] Xue F., Miao J., Zhang X., Luo H., Tan T.: Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresource Technology, 2008, 99, 5923-5927.
 - [19] Zhu L., Zhou L., Cui W., Liu Z., Zhou Z.: Mechanism-based site-directed mutagenesis to shift the optimum pH of the phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis* JN-1. Biotechnology Reports, 2014, 3, 21-26.

SKUTECZNOŚĆ WYBRANYCH ENZYMÓW W USUWANIU BIOFILMÓW BAKTERYJNYCH Z POWIERZCHNI STALI NIERDZEWNEJ

JOANNA KRÓLASIK, ANNA SZOSLAND-FALTYN, BEATA PAZIAK-
DOMAŃSKA, BEATA BARTODZIEJSKA

Streszczenie

Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na płaszczyznach nieożywionych stanowi nadal poważny problem w wielu dziedzinach życia, m. in. w przemyśle spożywczym. Jednym z głównych źródeł skażenia produktów spożywczych są urządzenia i sprzęt produkcyjny, na których łatwo dochodzi do kolonizacji drobnoustrojów i tworzenia się biofilmów, szczególnie w sytuacjach gdy procesy mycia i dezynfekcji nie są w pełni efektywne. Coraz częściej zwraca się uwagę na możliwość wykorzystania enzymów do eradykacji biofilmów z powierzchni użytkowych. Celem badań było wykazanie, jaka jest skuteczność wybranych enzymów w usuwaniu biofilmów bakteryjnych, utworzonych na powierzchni stali nierdzewnej. Materiał biologiczny stanowiły trzy szczepy bakterii: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus hominis*, wyizolowane z powierzchni produkcyjnych kontaktujących się z żywnością w zakładzie przemysłu spożywczego. W pracy oceniono skuteczność działania pięciu enzymów: α -glukozydaza, β -galaktozydaza, pektynaza, proteaza i lipaza. Wykazano, że zastosowanie pojedynczych enzymów było mało efektywne w usuwaniu biofilmów. Najbardziej skuteczne były mieszaniny 5 enzymów hydrolizujących trzy grupy związków (białka, polisacharydy i lipidy), po aplikacji której uzyskano zadowalający stopień redukcji drobnoustrojów, wynoszący od 2,43 do 4,24 log.

Słowa kluczowe: biofilm, enzymy, dezynfekcja, EPS

Wprowadzenie

Biofilmy to przestrzenne, wielokomórkowe struktury drobnoustrojów, należących do jednego lub kilku gatunków, wykazujących zdolność przylegania do siebie nawzajem i do powierzchni stałych (biologicznych i abiotycznych), otoczone warstwą wytwarzanych przez siebie zewnątrzkomórkowych biopolimerów [Costerton i in., 1995]. Głównym komponentem błon biologicznych są pozakomórkowe substancje wytwarzane przez mikroorganizmy, tzw. EPS (ang. Extracellular Polymeric Substances), które wchłaniają wodę, wychwytują znajdujące się w niej substancje odżywcze i utrzymują biofilm w całości. Zewnątrzkomórkowe biopolimery, wytwarzane przez drobnoustroje obejmują

różne klasy makromolekuł, jak: polisacharydy, białka, kwasy nukleinowe, glikoproteiny, fosfolipidy, które tworzą ochronną warstwę śluzu [Costerton, 1999]. Budowa chemiczna egzopolisacharydów może wykazywać specyficzność gatunkową lub szczepową zarówno, co do układu cukrów, jak i rodzaju wiązań chemicznych. Tworzenie się różnych typów wiązań między cukrami prowadzi do powstawania złożonych polisacharydów, wśród których zidentyfikowano między innymi: alginian, ksantan, pululan, celuloza, dekstran, glikogen. Dokładny skład EPS, wytwarzanego przez bakterie tworzące biofilm nie jest jeszcze do końca poznany i stanowi obecnie przedmiot zainteresowania wielu badaczy [Böckelmann i in., 2003; Delbarre-Ladrat i in., 2014; Yang i in., 2015]. Tworzenie biofilmów bakteryjnych na powierzchniach abiotycznych jest procesem bardzo złożonym, warunkowanym wieloma czynnikami tj.: wydzielanie przez drobnoustroje zewnątrzkomórkowych substancji, hydrofobowość/hydrofilowość oraz ładunek powierzchni komórki, faza wzrostu bakterii, rodzaj i charakter powierzchni, czynniki środowiskowe (pH, temperatura, dostępność substancji odżywczych, siła jonowa; obecność specyficznych substancji) oraz obecność innych mikroorganizmów. Wytwarzanie i sekrecja biopolimerów (EPS), ma największy wpływ na powstawanie biofilmów bakteryjnych, a ponadto stanowi podstawowy mechanizm ich oporności na czynniki antymikrobiologiczne. Warstwa śluzu złożona z tych substancji tworzy barierę przepuszczalności do powierzchni komórek, chroni je przed fagocytozą, wysychaniem, promieniowaniem UV, zmianami wartości pH, a także obniża tempo dyfuzji środków przeciwdrobnoustrojowych przez warstwy biofilmu i utrudnia dotarcie składników toksycznych do głębszych warstw błony biologicznej [Baker i in., 2010; Czaczyk i Myszk, 2007, Szczotko, 2007]. De Beer i in. (1994) wykazali, że penetracja cząstek aktywnego chloru przez biofilm *Pseudomonas aeruginosa* zachodzi znacznie wolniej, niż w zawiesinie tych bakterii.

Środowisko przetwórstwa żywności, z uwagi na zasobność w składniki odżywcze i wodę, to miejsce sprzyjające powstawaniu biofilmów. Na powierzchniach stykających się z żywnością, występowanie komórek *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* czy *Streptococcus thermophilus* jest od 500 do 50000 razy rzadsze, niż błon biologicznych tych bakterii. Zjawisko to może być bezpośrednią przyczyną niekorzystnych zmian organoleptycznych produktu i psucia się żywności. Ponadto, adhezja mikroorganizmów do powierzchni stałych może powodować zakażenie żywności drobnoustrojami chorobotwórczymi [Myszk i Czaczyk, 2007]. Tworzenie błon biologicznych w przemyśle spożywczym jest również przyczyną blokowania mechanicznego przepływu cieczy, hamowania procesów wymiany ciepła i korozji powierzchni metalowych. Według wielu autorów tworzenie biofilmów na powierzchniach produkcyjnych stanowi również, główną przyczynę niskiej skuteczności, wykonywanych w zakładach zabiegów mycia i dezynfekcji [Berthold, 2007; Królasik i in., 2010; Sałek, 2008].

W celu usunięcia biofilmów z powierzchni nieożywionych stosuje się różne metody. W zakładach przemysłu spożywczego, najszersze zastosowanie znalazła dezynfekcja chemiczna, jednak stosowanie środków chemicznych do zabicia drobnoustrojów przyczepionych do danej powierzchni nie zawsze jest skuteczne, ze względu na zakres działania tych substancji oraz ich ograniczoną penetrację przez strukturę biofilmu. Komórki mikroorganizmów stanowiące część biofilmu są do 1000 razy oporniejsze na działanie substancji toksycznych (środki dezynfekcyjne, antybiotyki, surfaktanty) niż te, które pozostają w zawiesinie. Potwierdzają to wyniki badań przeprowadzonych, między innymi przez autorów niniejszej pracy, którzy wykazali, iż chemiczne preparaty dezynfekcyjne stosowane powszechnie do dezynfekcji powierzchni produkcyjnych w przemyśle spożywczym są nieefektywne w użytkowych stężeniach, w stosunku do błon biologicznych, mimo wykazywanej *in vitro* aktywności użytych związków, a główną przyczyną oporności bakterii w biofilmie jest obecność ochronnej warstwy EPS, wytwarzanej przez drobnoustroje [Królasik i in., 2008; Królasik i in., 2010].

Coraz częściej zwraca się uwagę na możliwość wykorzystania enzymów do eradykacji biofilmów z powierzchni użytkowych. Ich zadaniem jest rozkład złożonej przestrzeni biofilmu na mniejsze, łatwe do usunięcia fragmenty, jak również rozkład zaadsorbowanej na powierzchni stałej warstwy kondycjonującej, składającej się z polisacharydów, białek i lipidów. Warstwa kondycjonująca na płaszczyznach kontaktujących się z żywnością może inicjować proces adhezji pojedynczych komórek i wspomagać tworzenie się biofilmu. Zastosowanie enzymów hydrolizujących polisacharydy oraz białka zewnątrzkomórkowe drobnoustrojów może w znacznym stopniu zwiększyć skuteczność dezynfekcji, dzięki lepszej penetracji środka dezynfekcyjnego do wnętrza biofilmu. Znane jest już stosowanie enzymów proteolitycznych do usuwania białek z rurociągów i urządzeń produkcyjnych w przemyśle mleczarskim oraz z powierzchni soczewek kontaktowych. Enzymy mogą być wykorzystane również do eradykacji biofilmów, z powierzchni użytkowych w przemyśle spożywczym. W praktyce jednak, stosowanie enzymów do usuwania biofilmu bakteryjnego jest nadal ograniczone, ze względu na niskie ceny i powszechną dostępność chemicznych preparatów dezynfekcyjnych. Ponadto, brak techniki ilościowej oceny efektywności enzymów wobec biofilmów, jak również wąska aktywność enzymatyczna obecnych na rynku preparatów ogranicza ich praktyczne użycie [Myszka i Czaczyk, 2007]. Podjęte w prezentowanej pracy badania nad wykorzystaniem enzymów do inaktywacji biofilmów wynikają z potrzeby poszukiwania nowych alternatywnych metod skutecznej eliminacji tych struktur z powierzchni stałych w sytuacji, w której powszechnie stosowane chemiczne środki dezynfekcyjne nie zawsze są efektywne. Ponadto, zakłady produkcji spożywczej używają coraz częściej sprzętu wrażliwego na intensywne stosowanie detergentów alkalicznych i pod wysokim ciśnieniem,

co wymaga aplikacji innej generacji środków myjących i dezynfekcyjnych. Nie bez znaczenia jest również proekologiczny aspekt podejmowanych badań, ponieważ całkowita biodegradowalność enzymatycznego preparatu, bez negatywnego wpływu na środowisko, pozwoli producentom żywności uniknąć problemów w kwestii oczyszczania ścieków. Celem podjętych badań była ocena skuteczności usuwania biofilmów bakteryjnych z powierzchni stali nierdzewnej przy użyciu wybranych enzymów.

Material i metody badań

Materiał biologiczny stanowiły trzy szczepy bakterii: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus hominis*. Drobnoustroje zostały wyizolowane z powierzchni produkcyjnych kontaktujących się z żywnością, po zakończonych procesach mycia i dezynfekcji w zakładzie, który nie posiadał zainstalowanego systemu CIP (clean-in-place). Do badań wybrano bakterie, należące do gatunków najczęściej wykrywanych na badanych powierzchniach produkcyjnych, charakteryzujące się zdolnością do tworzenia biofilmów na materiałach użytkowych, stosowanych w przemyśle spożywczym.

W badaniach wykorzystano stal nierdzewną o niskiej zawartości węgla, chromowo-niklową typ 304, o współczynniku chropowatości $R_z = 7,4$, powszechnie stosowaną do konstrukcji urządzeń i powierzchni produkcyjnych.

W pracy oceniono skuteczność usuwania biofilmów z powierzchni abiotycznej przy użyciu pięciu enzymów: α -glukozydaza, β -galaktozydaza, pektynaza, proteaza, lipaza. Informacje o enzymach przedstawiono w Tabeli 1.

Tab. 1. Charakterystyka enzymów użytych do badań

L.p.	Nazwa enzymu /preparatu	Pochodzenie enzymu	Aktywność enzymu
1.	α -glukozydaza (Sigma G-5003)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	≥ 10 units/mg
2.	β -galaktozydaza (Sigma G-5160)	<i>Aspergillus oryzae</i>	8,9 units/mg
3.	Pectinase (Sigma P-2611 (<i>Pectinex® Ultra SPL</i> , Novozyme))	<i>Aspergillus aculeatus</i>	$\geq 3,8$ units/ml
4.	Protease (Sigma P-6110)	<i>Aspergillus oryzae</i>	≥ 500 units/g
5.	Lipaza typu II (SigmaL-3126)	trzustka świni	100-400 units/mg

Przechowywanie i aktywacja bakterii

Drobnoustroje przechowywano w bulionie kazeinowo-sojowym (TSB) z dodatkiem glicerolu w temperaturze -20°C lub na podłożu stałym kazeinowo-sojowym (TSA), w temperaturze 4°C . Do celów doświadczalnych drobnoustroje przeszczepiano na skosy i inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 h. Czystość mikrobiologiczną badanych szczepów bakteryjnych sprawdzano w preparatach mikroskopowych barwionych metodą Grama.

Tworzenie biofilmu na powierzchni stali nierdzewnej

Przed przystąpieniem do doświadczeń badane powierzchnie abiotyczne przygotowano według metodyki zaproponowanej przez Joseph i in. (2001). Płytki ze stali nierdzewnej typ 304-G, o wymiarach $5 \times 5 \times 0,1$ cm przemywano acetonem, następnie wytrawiano poprzez zanurzenie w roztworze 5N HCl przez 15 minut, a w dalszym etapie myto w roztworze detergentu i spłukiwano wodą destylowaną. Po wysuszeniu płytki umieszczano w szklanym naczyniu i sterylizowano w autoklawie, w temperaturze 121°C przez 15 minut.

W celu uzyskania biofilmów płytki ze stali nierdzewnej umieszczano w zlewkach, zawierających 180 ml płynnej pożywki TSB rozcieńczonej dziesięciokrotnie i 20 ml hodowli drobnoustrojów, zawierającej 10^6 jtk/ml. Hodowle prowadzono na wytrząsarce, przy 50 obr/min, w temperaturze 20°C przez 48 godzin. Następnie płytki wyjmowano i przemywano roztworem PBS, celem usunięcia komórek, nietrwale związanych z badanymi powierzchniami. Następnie, określano ilość komórek w biofilmie metodą wymazu i posiewu na płytce agarowej TSA. Wymazy pobierano przy użyciu jałowych tamponów, które umieszczano w butelkach, zawierających płyn płuczący i wytrząsano przez 1 minutę. Po przygotowaniu serii dziesięciokrotnych rozcieńczeń wykonano posiew na płytce z podłożem stałym TSA. Posiewy inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Ogólną liczbę drobnoustrojów (L) na 1 cm^2 badanej powierzchni obliczono według wzoru:

$$L = (a \times b)/c$$

gdzie:

a – liczba drobnoustrojów w 1 ml zawiesiny wyjściowej

b – objętość zawiesiny wyjściowej

c – wielkość badanej powierzchni w cm^2

Płytki z utworzonym biofilmem użyto do oceny skuteczności bakteriobójczego działania enzymów.

Ocena efektywności działania enzymów na biofilmy bakteryjne

Badania przeprowadzono na biofilmach 48 - godzinnych, uzyskanych w warunkach łagodnego ruchu pożywki. W każdym doświadczeniu, na powierzchnię trzech płytek z biofilmem наносzono roztwory badanych enzymów i pozostawiano w kontakcie przez 10 minut. Następnie płytki dokładnie

splukiwano płynem płuczącym i pozostawiano na 2 minuty do osuszenia. Próbkami kontrolnymi były płytki z biofilmem, poddane działaniu jałowej wody destylowanej.

Liczbę jtk/cm² na płytkach kontrolnych (N) oraz po procedurze badania (N_a) określano metodą wymazu. Stopień redukcji (R) liczby zdolnych do życia bakterii w biofilmach, po działaniu enzymów obliczono według wzoru:

$$R = \log [N/N_a]$$

gdzie:

N - liczba jtk/cm² w biofilmie,

N_a - liczba jtk/cm² w biofilmie po działaniu enzymu

Analiza statystyczna wyników badań

Wyniki badań poddawano analizie statystycznej w programach komputerowych: *Excel*, 2007 i *Statistica* 6,0 (PL) wykorzystując następujące parametry i testy: odchylenie standardowe, test istotności różnic - analizę wariancji ANOVA.

Wyniki i dyskusja

Przedmiotem prezentowanych badań, była ocena wrażliwości biofilmów bakteryjnych na działanie enzymów oraz ich mieszanin, zastosowanych w różnych stężeniach. Celem jej było stwierdzenie, w jakim stopniu poszczególne enzymy naruszają strukturę biofilmów i działają dezaktywująco na zawarte w nich komórki bakterii. Wyboru enzymów dokonano na podstawie danych literaturowych, przedstawiających analizę składu chemicznego EPS różnych bakterii i charakterystykę wiązań chemicznych występujących pomiędzy zidentyfikowanymi związkami. Ponadto, enzymy te wykazywały destrukcyjne działanie wobec EPS niektórych bakterii [Böckelmann i in., 2003; Delbarre-Ladrat i in., 2014; Pettit i in., 2004]. Przeprowadzono modelowe badania na biofilmach, utworzonych w warunkach laboratoryjnych, symulujących środowisko przetwórstwa żywności (oligotroficzne warunki wzrostu, temperatura inkubacji 20°C). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów z użyciem pojedynczych enzymów zestawiono w Tabeli 2.

Przeprowadzone badania wykazały, że enzymy hydrolizujące polisacharydy czyli β-galaktozydaza i α-glukozydaza najefektywniej dezaktywowały biofilm *Micrococcus luteus*. Wartość redukcji komórek tego drobnoustroju na powierzchni stali nierdzewnej, po zastosowaniu 5% roztworów wynosiła odpowiednio 1,23 i 1,70 log. Dwukrotne zwiększenie stężenia β-galaktozydazy nie wpłynęło na znaczący spadek liczby bakterii w biofilmie *Micrococcus luteus*, w przeciwieństwie do α-glukozydazy, po użyciu której w stężeniu 10% wartość redukcji osiągnęła 2,50 log. Biofilmy *Pseudomonas putida* i *Staphylococcus hominis* wykazywały niską wrażliwość na zastosowane enzymy, a najwyższe uzyskane wartości redukcji, przy stężeniu 10% nie przekraczały 1,24 log.

Pektynaza wykazywała silne działanie destrukcyjne na biofilm *Micrococcus luteus*. Powodowała ona redukcję tych bakterii na poziomie od 1,79 log przy stężeniu 5%, do 2,93 log, przy stężeniu 10%. Biofilmy *Pseudomonas putida* i *Staphylococcus hominis* były mniej wrażliwe na działanie pektynazy, a uzyskane wartości redukcji nie przekraczały 1,69 log, nawet po zastosowaniu 10% roztworu.

Badania z użyciem proteazy wykazały, iż enzym ten najefektywniej usuwał biofilm *Staphylococcus hominis*, w przypadku którego uzyskana wartość redukcji komórek kształtowała się na poziomie, od 2,12 przy stężeniu 5%, do 3,11 log po zastosowaniu 10% roztworu. Mniejszą wrażliwość na działanie proteazy wykazywał biofilm *Pseudomonas putida*, w którym wartość redukcji komórek była średnio o 1 log niższa, w porównaniu z biofilmem *Staphylococcus hominis*. Biofilm *Micrococcus luteus* był odporny na działanie 5% roztworu proteazy, natomiast większe stężenia enzymu (7,5% i 10%) były znacznie bardziej efektywne i powodowały redukcję komórek osiągającą 1,46 log. Lipaza efektywnie dezaktywowała biofilm *Micrococcus luteus* i *Pseudomonas putida*, w przypadku których wartość redukcji kształtowała się na poziomie, około 1,5 log niezależnie od zastosowanego stężenia enzymu. Małą wrażliwość na działanie lipazy wykazywał biofilm *Staphylococcus hominis* i nawet po zastosowaniu 10% roztworu wartość redukcji komórek tych bakterii była poniżej 1 log.

Przeprowadzone badania wykazały, że skuteczność działania enzymów na poszczególne biofilmy bakteryjne była zróżnicowana. Można to wytłumaczyć różnym składem macierzy EPS, wytwarzanej przez poszczególne drobnoustroje, osadzające się na powierzchni stali nierdzewnej. EPS użytego do badań szczepu *Micrococcus luteus* zawierał przede wszystkim polisacharydy, natomiast EPS *Staphylococcus hominis* zawierał duże ilości białek (wyniki nieprezentowane). Dlatego też biofilm *Micrococcus luteus* był efektywniej eliminowany przy użyciu enzymów hydrolizujących polisacharydy, natomiast biofilm *Staphylococcus hominis*, wykazywał większą wrażliwość na działanie proteazy. Jako podstawowe składniki tworzące EPS wymienia się głównie polisacharydy i białka, jednak jak wykazały przeprowadzone doświadczenia duże znaczenie w budowie tej struktury odgrywają również komponenty lipidowe. Dowodem tego jest uzyskany efekt dezaktywacji biofilmów po zastosowaniu lipazy, podobny do tego, jaki wywoływały enzymy hydrolizujące polisacharydy i białka. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zastosowanie pojedynczych enzymów do eradykacji biofilmów jest mało efektywne, a destabilizacja jednego ze składników EPS jest niewystarczająca do usunięcia błon biologicznych z powierzchni abiotycznej. Co więcej, należy spodziewać się, że w środowisku naturalnym efekt działania pojedynczego enzymu będzie jeszcze mniej zauważalny, ponieważ błony biologiczne powstające w takich warunkach mogą być złożone z jednego, kilku, a nawet kilkunastu gatunków, a ich funkcjonowanie oparte jest na wzajemnej współpracy poszczególnych mikroorganizmów. Aby skutecznie eliminować biofilmy potrzebna jest więc mieszanina enzymów rozkładających trzy grupy związków: białka, cukry i tłuszcze.

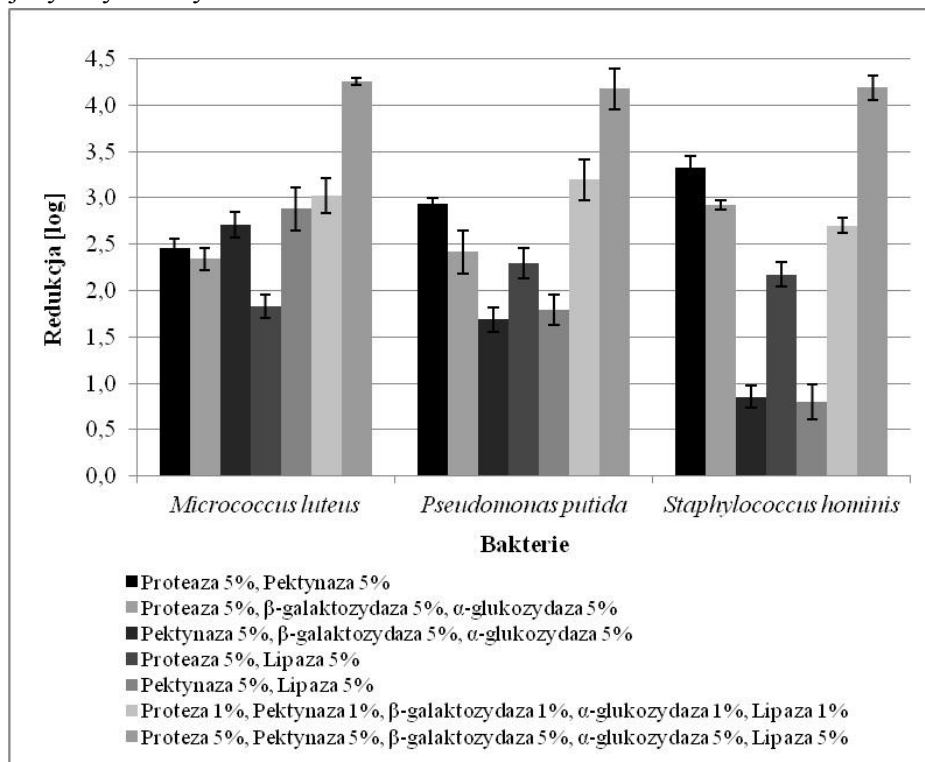
Tab. 2. Redukcja liczby komórek w biofilmach po działaniu enzymów

Enzym		Redukcja komórek w biofilmie [$\log_{10}$] $\pm$ SD		
Nazwa	Stężenie [%]	Biofilm <i>Micrococcus luteus</i> $6,22 \pm 0,28 \log$ jtk/cm ²	Biofilm <i>Pseudomonas putida</i> $6,18 \pm 0,22 \log$ jtk/cm ²	Biofilm <i>Staphylococcus hominis</i> $5,98 \pm 0,33$ $\log$ jtk/cm ²
β -galaktozydaza	5	$1,23^a \pm 0,28$	$0,73^b \pm 0,35$	$0,55^b \pm 0,21$
	7,5	$1,55^a \pm 0,32$	$1,03^b \pm 0,13$	$0,97^b \pm 0,37$
	10	$1,69^a \pm 0,24$	$1,24^b \pm 0,23$	$1,12^b \pm 0,09$
α -glukozydaza	5	$1,70^a \pm 0,30$	$0,93^b \pm 0,13$	$0,99^b \pm 0,15$
	7,5	$2,21^a \pm 0,18$	$1,07^b \pm 0,07$	$1,15^b \pm 0,26$
	10	$2,50^a \pm 0,27$	$1,12^b \pm 0,10$	$1,17^b \pm 0,12$
Pektynaza	5	$1,79^a \pm 0,18$	$1,00^b \pm 0,10$	$0,67^c \pm 0,24$
	7,5	$2,49^a \pm 0,12$	$1,35^b \pm 0,12$	$1,07^c \pm 0,05$
	10	$2,93^a \pm 0,29$	$1,69^b \pm 0,19$	$1,36^c \pm 0,15$
Proteaza	5	$0,22^a \pm 0,09$	$1,42^b \pm 0,20$	$2,12^c \pm 0,33$
	7,5	$1,43^a \pm 0,13$	$1,56^a \pm 0,18$	$2,34^b \pm 0,32$
	10	$1,46^a \pm 0,11$	$1,79^b \pm 0,23$	$3,11^c \pm 0,14$
Lipaza	5	$1,42^a \pm 0,26$	$1,42^a \pm 0,24$	$0,43^b \pm 0,24$
	7,5	$1,51^a \pm 0,49$	$1,39^a \pm 0,41$	$0,78^b \pm 0,13$
	10	$1,60^a \pm 0,10$	$1,53^a \pm 0,10$	$0,88^b \pm 0,08$

a, b, c – średnie oznaczone różnymi literami w wierszu różnią się istotnie przy $P < 0,05$

Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników założono, że zastosowanie mieszaniny enzymów do eliminacji biofilmów wzmocni efekt działania każdego z pojedynczych składników, co umożliwi również użycie ich w niższych stężeniach. Uzyskanie zadowalającej skuteczności preparatu przy użyciu niewielkich ilości enzymów jest niezwykle istotne z ekonomicznego punktu widzenia dla potencjalnych producentów tego typu środków. Dlatego też, podjęto dalsze badania z użyciem mieszanin enzymów o różnym składzie i stężeniu. Wykazały one, że biofilmy bakteryjne były najefektywniej dezaktywowane mieszaniną, zawierającą pięć enzymów, w stężeniu 5%, a odnotowany poziom

redukcji komórek był bardzo wysoki, ponad 4 log (rys. 1). Dobrym efektem bólczym odznaczała się również ta sama mieszanina enzymów, ale w niższym stężeniu 1% oraz roztwory zawierające po 5% proteazy i pektynazy, a także po 5% proteazy, α -glukozydazy i β -galaktozydazy. Po ich użyciu liczba drobnoustrojów spadała o 2,43 - 3,45 log. Pozostałe mieszaniny enzymów były efektywne tylko wobec biofilmów niektórych bakterii, tak jak to miało miejsce w przypadku użycia pojedynczych enzymów.



Rys. 1. Redukcja liczby komórek w biofilmach po działaniu mieszanin enzymów

Podobne wyniki uzyskali Orgaz i in. (2007) w badaniach nad skutecznością usuwania biofilmu *Pseudomonas fluorescens* przy użyciu enzymów degradujących polisacharydy. Otrzymane przez autorów wartości redukcji, po zastosowaniu pojedynczych enzymów kształtowały się na poziomie poniżej 1 log, natomiast ich mieszaniny powodowały spadek liczby drobnoustrojów o 2,35-2,59 log.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz wyników uzyskanych przez innych autorów można stwierdzić, że wykorzystanie enzymów do dezaktywacji biofilmów, wymaga zastosowania ich w postaci mieszanin, katalizujących rozpad różnych grup związków (cukrów, białek i tłuszczów) oraz użycia znacznie wyższych stężeń, od występujących w dostępnych obecnie komercyjnych preparatach dezynfekcyjnych [Augustin i in., 2004; Leroy i in., 2008; Teh i in., 2014].

Wnioski

1. Zastosowanie pojedynczych enzymów do usuwania biofilmów jest mało efektywne. Preparaty enzymatyczne, przeznaczonego do inaktywacji biofilmów powinny zawierać enzymy katalizujące rozkład trzech podstawowych grup związków budujących EPS: polisacharydów, białek i lipidów.
2. Badania na biofilmach, z uwagi na ich wysoką oporność są niezbędnym elementem oceny aktywności bójczej preparatów enzymatycznych, przeznaczonych do praktycznego stosowania w przemyśle spożywczym.

Literatura

- [1] Augustin M., Ali-Vehmas T., Atroshi F.: Assesment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2004, 7 (1), 55-64.
- [2] Baker M.G., Lalonde S.V., Konhauser K.O., Foght J.M.: Role of extracellular polymeric substances in the surface chemical reactivity of *Hymenobacter aerophilus*, a psychrotolerant bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (1), 102-109.
- [3] Berthold A.: Biofilm w przemyśle spożywczym. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2007, 1, 60-66.
- [4] Böckelman U., Szewzyk U., Grohmann E.: A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55, 201-211.
- [5] Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M.: Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 1995, 41, 711-745.
- [6] Costerton J.W.: The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, 22, 551-563.
- [7] Czaczyk K.: Adhezja mikroorganizmów do powierzchni stykających się z żywnością. *Przemysł Spożywczy*, 2005, 2, 28-31.
- [8] Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia*, 2007, 1 (76), 40-52.
- [9] De Beer D., Srinivasan R., Stewart P.S.: Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60, 4339-4344.
- [10] Delbarre-Ladrat C., Sinquin C., Lebellenger L., Zykwińska A.: Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Frontiers in Chemistry*, 2014, 2 (85), 1-15.
- [11] Królasik J., Szosland-Fałtyń A., Majczyńska D.: Skuteczność wybranych preparatów dezynfekcyjnych stosowanych w przemyśle spożywczym wobec biofilmów bakteryjnych. *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, 2008, 63, 103-111.

- [12] Królasik J., Żakowska Z., Krępska M., Klimek L.: Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent . Polish Journal of microbiology, 2010, 59 (4), 281-287.
- [13] Leroy C., Delbarre C., Ghillebaert F., Compere C., Combes D.: Effect of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. Bioufouling, 2008, 24 (1), 11-12.
- [14] Myszka K., Czaczyk K.: Metody usuwania biofilmów bakteryjnych z powierzchni stałych. Przemysł Spożywczy, 2007, 2, 18-21.
- [15] Orgaz B., Neufeld R.J., SanJose C.: Single-step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40, 1045-1051.
- [16] Pettitt M.E., Henry S.L., Callow M.E., Callow J.A., Clare A.S.: Activity of commercial enzymes on settlement and adhesion of cypris larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*, spores of green alga *Ulva linza*, and the diatom *Navicula perminuta*. Bioufouling, 2004, 20 (6), 299-311.
- [17] Sałek A.: Powstawanie biofilmu w warunkach przemysłowych. Cz. 1. Lokalizacja i likwidacja biofilmu. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2008, 9, 16-17.
- [18] Szczotko M. : Biofilm – krótka charakterystyka obrostów mikrobiologicznych związanych z instalacjami wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 2007, 58 (4), 667-675.
- [19] Teh K.H., Flint S., Palmer J., Andrewes P., Bremer P.: Biofilm-an unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? International Dairy Journal, 2014, 34, 32-40.
- [20] Yang H., Deng J., Yuan Y., Daidi F., Zhang Y., Zhang R., Han B.: Two novel exopolysaccharides from *Bacillus amyloliquefaciens* C-1: antioxydation and effect on oxidative stress. Current Microbiology, 2015, 70, 298-306.

BIOFILMY BAKTERYJNE W PRODUKCJI ŻYWNOŚCI

ALINA KUNICKA-STYCZYŃSKA

Streszczenie

Biofilmy powstające w warunkach przemysłowych stanowią wielogatunkowe zespoły mikroorganizmów zlokalizowane w miejscach trudno dostępnych dla czynników myjących. Składnikami biofilmów mogą być bakterie saprofityczne i patogeny z rodzaju *Salmonella*, *Listeria*, czy *Escherichia*. W pracy przedstawiono przykłady biofilmów bakteryjnych tworzonych na powierzchniach abiotycznych w środowisku produkcji żywności oraz uwarunkowania ich tworzenia. Wskazano nowe metody kontroli i eradykacji biofilmów, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania substancji pochodzenia naturalnego.

Słowa kluczowe: biofilm, środowisko produkcji, zanieczyszczenia krzyżowe, żywność

Wprowadzenie

Wysokie wymagania jakościowe stawiane produktom spożywczym oraz duża konkurencja na rynku żywności powodują nie tylko konieczność zachowania ścisłej kontroli produktu końcowego trafiającego do konsumenta, ale również potrzebę ustawicznego monitoringu linii produkcyjnych. W praktyce, wypracowano skuteczne procedury mycia i dezynfekcji linii technologicznych, zapewniające właściwy stan higieny środowiska produkcyjnego. Problemem przemysłu są jednak nadal mikroorganizmy zasiedlające środowisko produkcji i nabywające oporność na środki dezynfekcyjne stosowane w zakładzie. O ile komórki w formie planktonu są stosunkowo łatwe do usunięcia, to pojawianie się biofilmów i ich rozwój stanowi problem niemal każdego producenta żywności. Badania prowadzone w czasie ostatnich dziesięciu lat wskazują na biofilmy bakteryjne, jako jedno z najgroźniejszych zjawisk zakłócających cykl produkcyjny i zagrażających bezpieczeństwu produktów [Lindsay i von Holy, 2006].

Biofilmy powstające w warunkach przemysłowych stanowią wielogatunkowe zespoły mikroorganizmów tworzące błony biologiczne zlokalizowane zwykle w miejscach trudno dostępnych dla czynników myjących. Składnikami biofilmów mogą być zarówno bakterie saprofityczne, jak i patogenne takie jak *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, czy *Pseudomonas aeruginosa* [Frank, 2001]. Zależnie od rodzaju stosowanych surowców i czynników fizycznych (temperatura, aktywność wody, ciśnienie hydrostatyczne) bądź chemicznych (stabilizatory, konserwanty, dodatki do żywności wzmacniające smak i zapach) niszczących komórki podczas produkcji, następuje selekcja

mikroorganizmów, a tworzące się biofilmy znacząco różnią się składem jakościowym. Równocześnie, powszechnie uznaje się, że powstawanie biofilmów podnosi oporność patogenów i zwiększa prawdopodobieństwo ich przeżycia w warunkach chłodzenia i zamrażania, pasteryzacji, w środowiskach o niskiej kwasowości, w środowiskach o wysokim zasoleniu, czy w obecności dezynfektantów [Books i Flint, 2008]. Nie należy jednak zapominać, że w przypadku produkcji żywności fermentowanej (np. tradycyjnych fermentowanych wędlin), tworzenie biofilmów przez technologicznie użyteczne bakterie np. z rodzajów *Staphylococcus* i *Lactobacillus*, może być pożądane ze względu na potencjalną stymulację procesów fermentacji mięsa i ochronę przed tworzeniem biofilmów złożonych z bakterii gnilnych i patogenów [Giaouris i in., 2014].

Dlaczego powstają biofilmy?

Molekularne mechanizmy tworzenia biofilmów w środowiskach produkcji żywności są bardzo złożone. Zidentyfikowano wiele genów wykazujących odmienną ekspresję w warunkach biofilmu w porównaniu z formami planktonicznymi, przy czym istotną rolę odgrywa tu również przestrzenna lokalizacja komórek w obrębie biofilmu [Van Houdt i Michiels, 2010; Renier i in., 2011; Kalia i in., 2012].

Komórki bakterii włączone do struktury biofilmu odnoszą niewątpliwie korzyści. Układ biofilmu zapewnia komórkom ochronę przed czynnikami stresu środowiskowego, stwarzając swego rodzaju „schronienie” i umożliwiając zachowanie homeostazy. Ponadto, zapewnia lepszą pozycję w warunkach konkurencji o dostępne substancje odżywcze, zwykle w środowisku w nie ubogim. Biofilm daje możliwości czerpania korzyści wynikających z interakcji metabolicznych (począwszy od komensalizmu, poprzez kooperację do mutualizmu) pomiędzy mikroorganizmami należącymi do różnych rodzajów. Ułatwiony horyzontalny transfer genów jest szczególnie istotny w procesie nabywania nowych adaptacyjnych cech fenotypowych, co prowadzi do szybkiej ewolucji adaptacyjnej mikroorganizmu i przewagi wyselekcjonowanych linii komórkowych [Molin i Tolker-Nielsen, 2003; Giaouris i in., 2014].

Charakterystyczna dla biofilmów tworzonych w środowiskach produkcji żywności jest ich znacznie większa oporność na środki sanityzujące, w porównaniu do form planktonicznych. Mechanizm oporności jest również złożony, a proponowane hipotezy wskazują na wielokierunkową odpowiedź układu na czynniki stresu środowiskowego. Uważa się, że zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (EPS, ang. *extracellular exopolymeric substances*), lipopolisacharydowe endotoksyny bakteryjne (LPS, ang. *lipopolysaccharides*) oraz struktury zewnątrzkomórkowe takie jak fimbrie, pili i rzęski stanowiące matrix biofilmu, są fizyczną barierą ograniczającą dyfuzję substancji toksycznych w obrębie biofilmu [Czaczyk i Myszka, 2007]. Transportowe białka membranowe,

odgrywające kluczową rolę w procesie usuwania substancji toksycznych z komórki, mogą być kodowane plazmidowo. Horyzontalny transfer genów kodujących te białka jest znacznie ułatwiony w strukturze biofilmu [Renier i in., 2011]. Koordynacja zmiany ekspresji genów w komórkach tworzących biofilm możliwa jest dzięki systemowi komunikacji *quorum sensing*, stanowiącym sygnalizator zagęszczenia populacji [Williams i in., 2007; Myszka i Czaczyk, 2010]. Zmiana ta następuje po przekroczeniu progowego stężenia specyficznych cząsteczek sygnalizacyjnych (autoinduktorów). Rodzaj autoinduktorów i systemy regulacji ekspresji genów są odmienne u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Autoinduktorami bakterii Gram-dodatnich są oligopeptydy przenoszone poza komórkę przy pomocy białka transportowego zależnego od ATP. System bakterii Gram-ujemnych jest złożony z cząsteczek sygnalizacyjnych laktonu N-acylo-L-homoseryny (ang. AHL, *acyl-L-homoserine lactone*), syntaz autoinduktora LuxI i białkowych regulatorów transkrypcyjnych LuxR [González i Keshavan, 2006]. Stwierdzono, że zjawisko *quorum sensing* pełni rolę regulacyjną również w adhezji bakterii do powierzchni abiotycznych i biotycznych, a komórka łączy się z powierzchnią tą stroną, gdzie stężenie AHL jest mniejsze [Wei i Lai, 2006].

W biofilmie dochodzi do różnicowania się komórek bakterii, które występują w różnych stanach fizjologicznych. Powstają komórki odporne, zdolne do przetrwania w obecności czynników sanityzujących określane jako *persister cells*. Komórki te nie są mutantami i stanowią niewielką część populacji bakterii, nie wykazują wzrostu, ale prowadzą bardzo powolny metabolizm. Podejmują wzmożoną aktywność metaboliczną po ustąpieniu działania czynnika stresu, a ich obecność w biofilmie uznaje się za kluczową dla oporności na cytostatyki [Carpentier i in., 2012; Leszczyńska i in., 2013]. W biofilmach dochodzi także do modyfikacji mikro-środowiska poprzez np. lokalne zmiany pH, czy aktywności wody, co może skutkować obniżeniem aktywności poszczególnych związków dezynfekcyjnych [Gilbert i in., 2002].

Biofilm można zatem określić jako strukturę umożliwiającą przetrwanie mikroorganizmów we wrogim środowisku, w odpowiedzi na stale zmieniające się czynniki stresu środowiskowego [Araújo i in., 2011].

Biofilmy w środowisku produkcji żywności

W pierwszym etapie tworzenia biofilmu, adhezji komórek bakterii do powierzchni abiotycznych, można wyróżnić dwie fazy: odwracalną i nieodwracalną. Adhezja odwracalna jest wynikiem oddziaływań elektrostatycznych i sił van der Waalsa, gdy komórki bakterii znajdują się w odległości 2-50 nm od powierzchni [Miron i in., 2001; Myszka i Czaczyk, 2011]. W fazie adhezji nieodwracalnej następuje tworzenie par i kompleksów jonowych, występują oddziaływania dipol-dipol, hydrofobowe, jon-dipol, jon-jon, wiązania kowalencyjne i wodorowe [Marshall i in., 1971].

Po zakończeniu adhezji nieodwracalnej, rozpoczyna się proces dojrzewania

biofilmu. Tworzenie biofilmów powoduje trudności w utrzymaniu higieny produkcji, a trudne do eradykacji biofilmy bakteryjne stanowią rezerwuár komórek zanieczyszczających wytwarzane produkty. Biofilmy mogą powodować również problemy technologiczne w produkcji żywności, takie jak powstawanie śluzów zmieniających parametry reologiczne produktów, zakłócenia przepływu ciepła w wymiennikach i ekstraktorach, korozję mikrobiologiczną powierzchni produkcyjnych oraz znaczące obniżenie skuteczności mycia i dezynfekcji linii [Araújo i in., 2011; Kiskó i Szabó-Szabó, 2011]. Nowoczesne przetwórstwo żywności sprzyja tworzeniu biofilmów i selekcyjonowaniu się bakterii wykazujących tendencje do budowania tej struktury na powierzchniach abiotycznych. Złożoność linii technologicznych, masowe wytwarzanie produktu, długie cykle produkcyjne oraz ogromne powierzchnie kontaktu z żywnością stwarzają warunki do niezakłóconego tworzenia i rozwoju biofilmu bakteryjnego [Lindsay i von Holy, 2006].

Wiele danych literaturowych wskazuje na powszechność powstawania na powierzchniach produkcyjnych wchodzących w kontakt z żywnością biofilmów złożonych z bakterii patogennych przenoszonych drogą pokarmową. Bogate dane dotyczące biofilmów *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, czy *Campylobacter jejuni* zostały zebrane w artykule przeglądowym Giaouris i in. [2014].

W środowisku produkcji przetworów mięsnych elementami biofilmu są powszechnie występujące na powierzchni mięsa bakterie *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus* spp., *E. coli*, *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Leuconostoc* spp. *Enterococcus* spp. oraz patogeny *S. enterica*, *L. monocytogenes* [Giaouris i in., 2014]. W produkcji przetworów mlecznych na wewnętrznych powierzchniach linii pasteryzacji powstają biofilmy, gdzie dominują *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Shigella* spp. i *S. aureus* [Sharma i Anand, 2002]. Na powierzchni taśm transporterów oraz jednostek napełniających w zakładzie produkującym lody znajdowano biofilmy *L. monocytogenes* oraz *Shigella* spp. [Gunduz i Tuncel, 2006]. W zakładach przetwórstwa rybnego dominują biofilmy złożone z *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Listeria* spp. i *Serratia liquefaciens* [Bagge-Ravn i in., 2003; Guobjornsdottir i in., 2005]. Na powierzchni linii produkcyjnych przetwarzających krewetki przeważają biofilmy bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, głównie *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas putida* [Guobjornsdottir i in., 2005]. W przemyśle sokowym, w produkcji soków i koncentratów soków owocowych problem stanowi biofilm tworzony przez acydotermofilne bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* [dos Anjos i in., 2013]. Najczęściej wykrywane zepsucia skoncentrowanych soków owocowych wywoływane są przez bakterie *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Komórki oraz spory tych bakterii tworzą na powierzchni stali nierdzewnej, PVC oraz nylonu biofilm, trudny do usunięcia nawet przez roztwory czwartorzędowych soli amoniowych [dos Anjos i in., 2013].

Powierzchnie linii technologicznych w przemyśle spożywczym stanowią środowisko szczególnie dogodne do rozwoju biofilmu ze względu na dostęp

substancji odżywczych zwykle w długich okresach jednego cyklu produkcji. Reszki produktów spożywczych pozostałe na powierzchniach działają kondycjonująco na biofilm bakteryjny. Stwierdzono, że biofilmy utworzone przez *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. oraz *Yersinia enterocolitica* na powierzchniach urządzeń służących do rozdrabniania mięsa zanieczyszczonych resztkami surowca, są usuwane ze znacznie niższą skutecznością niż biofilmy tworzone na czystych powierzchniach tych samych urządzeń [Allan i in., 2003]. Odmienne, inne badania dowodzą, że odtłuszczone mleko powoduje obniżenie stopnia adhezji *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *Serratia marcescens* do powierzchni stali nierdzewnej [Barnes i in., 1999]. Równocześnie, mleko rozcieńczone stymulowało tworzenie biofilmu patogenów [Hood i Zottola, 1997]. Kondycjonowanie powierzchni abiotycznych poprzez utworzenie filmu substancji organicznych takich jak białka mleka, wołowiny, wieprzowiny czy nawet lipopolisacharydów wytwarzanych przez bakterie, odgrywa kluczową rolę w procesie adhezji komórek [Shi i Zhu, 2009]. Istotne znaczenie ma także rodzaj i stężenie substancji kondycjonujących [Myszka i Czaczky, 2011]. Adhezja komórek zależy też od innych czynników: kwasowości środowiska, temperatury, rodzaju bakterii, stanu fizjologicznego i wieku populacji.

Obecność biofilmu bakteryjnego na powierzchniach przemysłowych stwarza zagrożenie zanieczyszczeń krzyżowych i wniesienia patogenów do żywności. Według danych WHO, zanieczyszczenia krzyżowe stanowiły główną przyczynę 32% zbiorowych zatruć pokarmowych w Wielkiej Brytanii w latach 1999-2000 [WHO, 2003]. Wnoszenie bakterii uwolnionych z biofilmu lub fragmentów biofilmu może wystąpić na każdym etapie łańcucha produkcji i dystrybucji, jak również w domu konsumenta. Odnotowano trzykrotnie więcej zatruć pokarmowych spowodowanych zanieczyszczeniami krzyżowymi w domach prywatnych, niż mających źródło w miejscach żywienia zbiorowego [Redmond i Griffith, 2003]. Rozmiar niebezpieczeństwa zanieczyszczeń krzyżowych zależy nie tylko od warunków higieny, ale również od wielu czynników środowiskowych. W przypadku żywności wymagającej porcjowania, kluczowym wydaje się być rodzaj materiału ostrzy, ale również ich kształt, częstotliwość cięcia, czy nacisk. Badania nad przenoszeniem bakterii patogennych podczas plasterkowania wędlin wskazują, że komórki *S. aureus* i *E. coli* O157:H7 adherujące do powierzchni ostrzy zostały przeniesione na powierzchnie wszystkich z 20 kolejnych plastrów szynki, niezależnie od poziomu zanieczyszczenia ostrza [Pérez-Rodríguez i in., 2007]. Szersze badania zanieczyszczeń krzyżowych bakteriami *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. przenoszonymi pomiędzy różnego rodzaju urządzeniami i wędlinami delikatesowymi nie pozwalają jednak na ustalenie jednoznacznego modelu, umożliwiającego prognozowanie ryzyka zanieczyszczenia produktów [Giaouris, 2014].

Substancje pochodzenia naturalnego oraz nowe metody w kontroli biofilmów

Pomimo że procedury mycia i dezynfekcji powierzchni przemysłowych są opracowywane i doskonalone od wielu lat, skuteczność usuwania biofilmu

bakteryjnego nadal nie jest zadowalająca. W przemyśle stosuje się wiele czynników dezynfekujących np.: chlor, jodyna, chloraminy, nadtlenek wodoru, ozon, kwas nadoctowy, czwartorzędowe sole amoniowe [Olszewska, 2013]. Wadą stosowanych obecnie metod sanityzacji jest toksyczność pozostałości środków dezynfekcyjnych oraz stymulacja oporności bakterii wchodzących w skład biofilmu. Negatywny odbiór nadmiaru związków chemicznych stosowanych w produkcji żywności spotyka się również z brakiem akceptacji konsumentów. Poszukuje się zatem nowych substancji, efektywnie niszczących biofilmy bakteryjne. Alternatywą dla powszechnie stosowanych dezynfektantów są substancje naturalne pochodzenia roślinnego, takie jak ekstrakty roślinne, olejki eteryczne, a nawet hydrolaty. Zaletą tych substancji jest niska toksyczność lub jej brak, pełna degradowalność oraz akceptacja konsumentów, oczekujących produkcji żywności na drodze naturalnej. Dodatkowym atutem substancji pochodzenia roślinnego jest ich stosunkowo wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa i brak nabywania przez bakterie oporności.

Pierwsze badania możliwości wykorzystania karwakrolu, składnika olejków oregano i tymiankowego, do kontroli wzrostu biofilmu *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *S. aureus* i *Saccharomyces cerevisiae* tworzonego na powierzchni stali nierdzewnej przeprowadzono w 2001 roku [Knowles i Roller, 2001]. Skuteczność karwakrolu w usuwaniu biofilmu była porównywalna z działaniem komercyjnych dezynfektantów opartych na nadtlenu wodoru i kwasie nadoctowym. Te obiecujące wyniki wytyczyły nowy nurt badań nad odpowiedzią biofilmów bakteryjnych na substancje pochodzenia naturalnego. Komercyjne preparaty stanowiące mieszaniny olejków eterycznych wykazywały dobrą aktywność wobec zestawu wyselekcjonowanych szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych tworzących biofilmy [Al-Shuneigat, 2005]. Praktyczne zastosowanie olejków eterycznych, ich składników i ekstraktów roślinnych do eradykacji biofilmu w zakładach produkujących żywność jest jednak ograniczone ze względu na intensywny zapach. Użycie tych substancji w stężeniach powyżej 1% może istotnie zmieniać cechy organoleptyczne produktów. Rozwiązaniem mogą być mieszaniny dezynfektantów syntetycznych z substancjami pochodzenia naturalnego. Badania takich mieszanin wskazują, że nawet łagodne surfaktanty micelarne w połączeniu z eugenolem i karwakrolem hamowały wzrost biofilmu *L. monocytogenes* i *E. coli* O157:H7 [Perez-Conesa i in., 2006].

Wśród nowych strategii kontroli biofilmu w warunkach przemysłowych jest stosowanie enzymów niszczących EPS. Dobre efekty w usuwaniu biofilmu *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. fluorescens* i *P. aeruginosa* z powierzchni stali oraz propylenu uzyskano po zastosowaniu mieszaniny oksydoreduktaz i hydrolaz polisacharydów [Johansen i in., 1997]. Połączenie enzymów sacharolitycznych i proteolitycznych z surfaktantami oraz czynnikami dyspergującymi i chelatującymi skutkowało również zwiększeniem efektywności usuwania biofilmu w porównaniu do skuteczności działania samych enzymów [Lequette i in., 2010]. Wzmocnienie działania enzymów na biofilm można uzyskać przez

równoczesne stosowanie czynników fizycznych. W badaniach modelowych biofilmu *E. coli* tworzonego na powierzchni stali nierdzewnej w hodowlach z mlekiem stwierdzono synergistyczne działanie enzymów proteolitycznych i glikolitycznych oraz fal ultradźwiękowych [Oulahal-Lagsir i in., 2003]. Interesującym kierunkiem badań w kontroli tworzenia biofilmu jest próba zakłócenia *quorum sensing* [Lazar, 2011], co jednak w warunkach przemysłowych wydaje się być utrudnione, ze względu na niehomogenność biofilmu wynikającą z obecności cząstek żywności oraz składników mineralnych [Giaouris, 2014]. W poszukiwaniach skutecznych metod eradykacji biofilmu, prowadzone są badania nad wykorzystaniem bakteriofagów [Soni i Nannapaneni, 2010], bakterii mlekowych i ich bakteriocyn [Ndahetuye i in., 2012], enterocyny AS-48 [Gómez i in., 2012]. Szersze zastosowanie aplikacyjne w warunkach przemysłowych wydają się mieć techniki wykorzystujące biobójcze czynniki fizyczne i chemiczne takie jak: fotokataliza [Chorianopoulos i in., 2011], promieniowanie jonizujące [Niemira i Solomon, 2005], promieniowanie UV [Bae i Lee, 2012], ozonowanie i ultradźwięki [Baumann i in., 2009], czy mikro- i nanoemulsje [Teixeira i in., 2007].

Podsumowanie

Pomimo wprowadzenia kompleksowych systemów mycia i dezynfekcji oraz stałego monitoringu czystości mikrobiologicznej środowiska produkcji, biofilmy bakteryjne nadal stanowią problem dla przemysłu spożywczego. Opanowanie tego zjawiska wymaga głębszego rozpoznania czynników środowiskowych warunkujących adhezję bakterii do powierzchni abiotycznych, czynników regulacji metabolicznych oraz interakcji międzykomórkowych w strukturze rosnącego biofilmu. Ze względu na niską skuteczność powszechnie stosowanych w przemyśle dezynfektantów, konieczne jest poszukiwanie nowych, alternatywnych substancji efektywnie zwalczających biofilm bakteryjny w warunkach przemysłowych. Rezultaty prowadzonych w ostatnich latach intensywnych badań nad kontrolą biofilmu bakteryjnego wskazują na potencjalne możliwości kontroli metodami biologicznymi (enzymy, bakterie mlekowe, bakteriocyny, bakteriofagi), jak również z wykorzystaniem czynników fizycznych i chemicznych (ultradźwięki, promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe, ozonowanie, substancje chemiczne w formie mikro- i nanoemulsji).

Literatura

- [1] Allan J.T., Yan Z., Genzlinger L.L., Kornacki J.L.: Temperature and biological soil effects on the survival of selected foodborne pathogens on a mortar surface. *Journal of Food Protection*, 2004, 67(12), 2661-2665.
- [2] Al-Shuneigat J., Cox S.D., Markham J.L. Effects of a topical essential oil-containing formulation on biofilm-forming coagulase-negative staphylococci. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41(1), 52-55.

- [3] Araújo P., Lemos M., Mergulhão F., Melo L., Simões M.: Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. Science against microbial pathogens - communicating current research and technological advances. Méndez-Vilas A. ed., Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 2011, 826-834.
- [4] Bae Y.M., Lee S.Y.: Inhibitory effects of UV treatment and a combination of UV and dry heat against pathogens on stainless steel and polypropylene surfaces. Journal of Food Science, 2012, 77(1), M61-M64.
- [5] Bagge-Ravn D., Ng Y., Hjelm M., Christiansen J.N., Johansen C., Gram L.: The microbial ecology of processing equipment in different fish industries - analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. International Journal of Food Microbiology, 2003, 87(3), 239-250.
- [6] Barnes L.M., Lo M F., Adams M.R., Chamberlain A.H.: Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10), 4543-4548.
- [7] Baumann A.R., Martin S.E., Feng H.: Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. Journal of Food Protection, 2009, 72(6), 1306-1309.
- [8] Brooks J.D., Flint S.H.: Biofilms in the food industry: Problems and potential solutions. International Journal of Food Science and Technology, 2008, 43(12), 2163-2176.
- [9] Carpentier B., Khamisse E., Firmesse O., Christeans S.: Bacterial persistence and transient survival on open surfaces. Journal of Hygienic Engineering and Design, 2012, 1(1), 54-56.
- [10] Chorianopoulos N.G., Tsoukleris D.S., Panagou E.S., Falaras P., Nychas G.-J.: Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. Food Microbiology, 2011, 28(1), 164-170.
- [11] Czaczyk K., Myszka K.: Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. Polish Journal of Environmental Studies, 2007, 16(6), 799-806.
- [12] dos Anjos M.M, Ruiz S.P., Nakamura C.V., de Abreu Filho B.A.: Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores and biofilm to industrial sanitizers. Journal of Food Protection, 2013, 76(8), 1408-1413.
- [13] Frank J.F.: Microbial attachment to food and food contact surfaces. Advances in Food and Nutrition Research, 2001, 43, 319-370.
- [14] Giaouris E., Heir E., Hébraud M., Chorianopoulos N., Langsrud S., Møretrø T., Habimana O., Desvaux M., Renier S., Nychas G.-J.: Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. Meat Science, 2014, 97(3), 298-309.

- [15] Gilbert P., Allison D.G., McBain A.J.: Biofilms *in vitro* and *in vivo*: Do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(s1), 98S-110S.
- [16] Gómez N.C., Abriouel H., Grande M.A., Pulido R.P., Gálvez A.: Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 2012, 30(1), 51-58.
- [17] González J.E., Keshavan N.D.: Messing with bacterial *quorum sensing*. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2006, 70(4), 859-875.
- [18] Gunduz G.T., Tuncel G.: Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 89(3-4), 329-336.
- [19] Guobjornsdottir B., Einarsson H., Thorkelsson G.: Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gramnegative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 2005, 43(1), 55-61.
- [20] Hood S.K., Zottola E.A.: Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 37(2-3), 145-153.
- [21] Johansen C., Falholt P., Gram L.: Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9), 3724-3728.
- [22] Kalia D., Merey G., Nakayama S., Zheng Y., Zhou J., Luo Y., Guo M., Roembke B.T., Sintim H.O.: Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews*, 2012, 42(1), 305-341.
- [23] Kiskó G., Szabó-Szabó O.: Biofilm removal of *Pseudomonas* strains using hot water sanitation. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 2011, 4, 69-79.
- [24] Knowles J., Roller S.: Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(10), 1542-1548.
- [25] Lazar V.: Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*, 2011, 17(6), 280-285.
- [26] Lequette Y., Boels G., Clarisse M., Faille C.: Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 2010, 26(4), 421-431.
- [27] Leszczynska D., Matuszewska E., Kuczynska-Wisnik D., Furmanek-Blaszk B., Laskowska E.: The formation of persister cells in stationary-phase cultures of *Escherichia coli* is associated with the aggregation of endogenous proteins. *PLoS ONE*, 2013, 8(1), e54737, doi: 10.1371/journal.pone.0054737.
- [28] Lindsay D., von Holy A.: What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *British Food Journal*, 2006, 108(1), 27-37.

- [29] Marshall K.C., Stout R., Mitchell R.: Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology*, 1971, 68(3), 337-348.
- [30] Miron J., Ben-Ghedalia D., Morrison M.: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(6), 1294-1309.
- [31] Molin S., Tolker-Nielsen T.: Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(3), 255-261.
- [32] Myszka K., Czaczyk K.: Bacterial biofilms on food contact surfaces a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2011, 61(3), 173-180.
- [33] Myszka K., Czaczyk K.: Mechanizm *quorum sensing* jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2010, 64, 582-589.
- [34] Ndahetuye J.B., Koo O.K., O'Bryan C.A., Ricke S.C., Crandall P.G.: Role of lactic acid bacteria as a biosanitizer to prevent attachment of *Listeria monocytogenes* F6900 on deli slicer contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 2012, 75(8), 1429-1436.
- [35] Niemira B.A., Solomon E.B.: Sensitivity of planktonic and biofilm-associated *Salmonella* spp. to ionizing radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5), 2732-2736.
- [36] Oulahal-Lagsir N., Martial-Gros A., Bonneau M., Blum L.J.: "Escherichia coli-milk" biofilmremoval from stainless steel surfaces: Synergism between ultrasonic waves and enzymes. *Biofouling*, 2003, 19(3), 159-168.
- [37] Perez-Conesa D., McLandsborough L., Weiss J. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellarencapsulated eugenol and carvacrol. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(12), 2947-2954.
- [38] Pérez-Rodríguez F., Valero A., Todd E.C., Carrasco E., García-Gimeno R.M., Zurera G.: Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. *Meat Science*, 2007, 76(4), 692-699.
- [39] Redmond E.C., Griffith C.J.: Consumer food handling in the home: A review of food safety studies. *Journal of Food Protection*, 2003, 66(1), 130-161.
- [40] Renier S., Hébraud M., Desvaux M.: Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional face of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(4), 835-850.
- [41] Sharma M., Anand S.K.: Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - a case. *Food Control*, 2002, 13(6-7), 469-477.
- [42] Shi X., Zhu X.: Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20(9), 407-413.

- [43] Soni K.A., Nannapaneni R.: Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *Journal of Food Protection*, 2010, 73(8), 1519-1524.
- [44] Teixeira P.C., Leite G.M., Domingues R.J., Silva J., Gibbs P.A., Ferreira J.P.: Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 118(1), 15-19.
- [45] Van Houdt R., Michiels C.W.: Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(4), 1117-1131.
- [46] Wei J.R., Lai H.C.: N-acylhomoserine lactone-dependent cell to cell communication and social behavior in the genus *Serratia*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296(2-3), 117-124.
- [47] WHO (World Health Organization). Eighth report 1999-2000 of WHO Surveillance Programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe, 2003, http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm.
- [48] Williams P., Winzer K., Chan W.C., Cámara M.: Look who's talking: communication and *quorum sensing* in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2007, 362(1483), 1119-1134.

**WPLYW STEZENIA GLICEROLU I pH PODLOZA
HODOWLANEGO NA KINETYKE WZROSTU DROZDZY
PASZOWYCH *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 W PODLOZACH
Z ODBIALCZONĄ ZIEMNIACZANĄ WODĄ SOKOWĄ**

AGNIESZKA KURCZ, STANISŁAW BŁAŻEJAK, ANNA BZDUCHA-
WRÓBEL, LIDIA STASIAK-RÓŻAŃSKA, MAREK KIELISZEK

Streszczenie

Produkcja biomasy komórkowej drożdży jest relatywnie tania, co w dużej mierze związane jest z możliwością zastosowania do ich hodowli surowców będących odpadami z różnych gałęzi przemysłu. W ten sposób osiąga się dodatkową korzyść, gdyż usuwanie wielu odpadów i produktów ubocznych z różnych procesów technologicznych stanowi zwykle poważny problem, zarówno dla zakładu produkcyjnego, jak i środowiska naturalnego. Jednocześnie można uzyskać biomasę drożdżową bogatą w białko, tłuszcz, witaminy, składniki mineralne oraz prebiotyczne polisacharydy. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu różnego stężenia glicerolu w pożywce oraz kwasowości czynnej środowiska na wzrost drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 w podłożach z odbiałczoną ziemniaczaną wodą sokową. Doświadczenie przeprowadzano w mikrohodowlach aparatu Bioscreen C, wykorzystując jako podłoża kontrolne YPD oraz ziemniaczaną wodę sokową, a jako doświadczalne ziemniaczaną wodę sokową wzbogaconą różnym dodatkiem glicerolu. Kwasowość czynną (pH) ustalono na poziomie 4,0 lub 5,0. Najwyższy wzrost badanego szczepu drożdży uzyskano podczas hodowli w podłożu z 5% dodatkiem glicerolu o pH 5,0. Wskazuje na to zarówno wysoki przyrost gęstości optycznej podczas prowadzenia hodowli (1,442), jak i korzystne parametry kinetyki wzrostu ($\mu_{\max}=0,022$ i $g=31,11$). Z kolei wyższe stężenia glicerolu (od 15%) działały hamująco na wzrost badanego szczepu drożdży. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że glicerol i odbiałczona ziemniaczana woda sokowa mogą być wykorzystywane jako źródło węgla i azotu do produkcji biomasy drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950.

Słowa kluczowe: Bioscreen, *Candida utilis*, glicerol, ziemniaczana woda sokowa, SCP, utylizacja odpadów

Wprowadzenie

Koncepcja produkcji biomasy i wykorzystania mikroorganizmów jako źródła składników żywności dla ludzi i zwierząt powstała już na początku dwudziestego

wieku. Termin SCP (single-cell protein) został po raz pierwszy użyty w Massachusetts Institute of Technology w 1966 roku, aby przedstawić ideę zastosowania biomasy jednokomórkowców jako żywności [Jay, 1992]. Można wymienić szereg jego zalet, dzięki którym przewyższa białko pochodzenia roślinnego. Do najważniejszych należą krótki czas generacji drobnoustrojów oraz wysoka zawartość odpowiedniej jakości białka w komórkach. Istotny jest również fakt, że produkcja SCP może być prowadzona w procesie ciągłym i jest niezależna od zmian klimatycznych [Lipińska i in., 2010; Rywińska i in., 2013].

Spośród wszystkich grup mikroorganizmów największą popularnością cieszą się drożdże paszowe, na przykład *Candida utilis*. Gatunek ten został uznany przez FDA (Food and Drug Administration - Agencja Żywności i Leków) za bezpieczny do spożycia przez ludzi i zwierzęta oraz wpisany na listę GRAS (Generally Recognised As Safe – uważane za bezpieczne) [Internet 1]. Drożdże te charakteryzują się wysoką zawartością białka, w skład którego wchodzi duża ilość aminokwasów egzogennych, a w szczególności lizyny. Ponadto biomasa tych drożdży może stanowić źródło witamin z grupy B oraz składników mineralnych (w postaci biopleksów) [Błażej i Duszkiewicz-Reinhard, 2004; Kieliszek i in., 2012]. Istotną rolę odgrywają również składniki ściany komórkowej drożdży, przede wszystkim oligomannany i β -glukany, wykazujące działanie prebiotyczne dla mikroflory przewodu pokarmowego oraz immunomodulacyjne [Bzducha-Wróbel i in., 2013].

Drożdże z rodzaju *Candida* należą do tzw. drożdży dzikich, które w przeciwieństwie do szlachetnych (*Saccharomyces*) nie są wymagające pod względem wykorzystywanego źródła węgla oraz obecności induktorów wzrostu (witamin, aminokwasów) [Walker, 1998]. Optymalna temperatura ich wzrostu wynosi ok. 25-30°C, a pH mieści się w zakresie 4,0-6,0 [Błażej, 2006; Juszczak i in., 2005]. Drożdże *Candida utilis* posiadają złożony metabolizm, który umożliwia wzrost na różnorodnych źródłach węgla (cukry, alkohole, kwasy organiczne, węglowodory) oraz związkach azotowych (zarówno organicznych jak i nieorganicznych) [Walker, 1998; Lipińska i in., 2010]. Umożliwia to wykorzystywanie do ich produkcji surowców odpadowych, takich jak melasa, ługi posiarzynowe, hydrolizaty drewna, odpady skrobiowe i ligninocelulozowe, a także serwatka. Stanowią one tanie źródło węgla dla drożdży paszowych, a niekiedy również związków azotowych, fosforu i składników mineralnych [Juszczak i in., 2005; Munawar i in., 2010].

W ostatnich latach poszukuje się nowych surowców odpadowych, które mogą być wykorzystywane w procesach biotechnologicznych, jednocześnie umożliwiając ich ekonomiczną utylizację. Należą do nich między innymi zmielone muszle krewetkowe, odpady z przemysłu mięsnego, wytloki z pomarańczy oraz odpady tłuszczowe z procesów smażalniczych [Musiał i in., 2004; Juszczak i in., 2005; Lipińska i in., 2010]. Jednym z takich surowców może być również glicerol, powstający jako produkt uboczny w procesie otrzymywania estrów metylowych

kwasów tłuszczowych (biodiesla). Najczęściej wykorzystywany jest on w przemyśle kosmetycznym. Ponadto może stanowić dobre źródło węgla dla niektórych drobnoustrojów i jest prekursorem do produkcji wielu cennych metabolitów [Amaral i in., 2009]. Liczne badania [Juszczak i in., 2005; Komorowski i Błażej, 2011; Taccari i in., 2012; Bzducha-Wróbel i in., 2013] dowodzą, że glicerol może być z powodzeniem wykorzystywany w produkcji biomasy drożdży paszowych, które są w stanie asymilować go jako jedyne źródło węgla.

Jako źródło azotu i składników mineralnych dla drożdży mogą być wykorzystywane odpady z przetwórstwa ziemniaczanego i skrobiowego [Muniraj i in., 2013; Błażej i in., 2014]. W procesie produkcji skrobi ziemniaczanej powstają duże ilości odpadów, w tym głównie ziemniaczanej wody sokowej (około 600 ton przy przerobie 1000 ton ziemniaków). W celu utylizacji poddaje się ją procesowi kwasowo-termicznej koagulacji (odbiałczania), a następnie stosuje do nawożenia pól i łąk. Ze względu na wysoki ładunek zanieczyszczeń odbiałczanej ziemniaczanej wody sokowej (wskaźnik ChZT ok. 30 000 mg O₂ · L⁻¹), metoda ta może budzić pewne obawy z punktu widzenia ochrony środowiska. Z tego powodu wskazane jest poszukiwanie alternatywnych metod utylizacji tego odpadu [Miedzianka i in., 2010; Bzducha-Wróbel i in., 2014], na przykład wykorzystując go w procesach biotechnologicznych [Nowak i in., 2013; Liu i in., 2013; Błażej i in., 2014].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu różnego stężenia glicerolu w pożywce oraz kwasowości czynnej środowiska na wzrost drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 w podłożach z odbiałczoną ziemniaczaną wodą sokową.

Materiał i metody badań

Do badań wykorzystywano szczep drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 pochodzący z Amerykańskiej Kolekcji Czystych Kultur.

Do przygotowania inokulum oraz jako podłoże kontrolne zastosowano standardowe podłoże YPD [Błażej i in., 2014]. Jako drugie podłoże kontrolne wykorzystano odbiałczoną ziemniaczaną wodę sokową. Podłoża doświadczalne stanowiła woda sokowa wzbogacona glicerolem w stężeniu 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 i 25% (w/v). Podłoża przygotowano w dwóch wariantach, ustalając kwasowość czynną (pH) środowiska na poziomie 4,0 lub 5,0.

Odbiałczona ziemniaczana woda sokowa została przygotowana w skali laboratoryjnej z ziemniaków odmiany Irga. Procedura pozyskiwania wody sokowej była podobna do tej stosowanej w zakładach produkujących skrobię ziemniaczaną. Ziemniaki były mechanicznie rozdrabniane, w wyniku czego wydzielał się sok, który następnie oddzielano od wycierki. Tak uzyskany sok ziemniaczany wirowano w celu usunięcia skrobi (3200xg/20 min, Eppendorf Centrifuge 5810, Niemcy), a następnie poddawano procesowi kwasowo-termicznej koagulacji (pH 5,0, 117°C,

10 minut). Wytrącone białko oddzielano poprzez sączenie przez watę, a przesącz, czyli odbiałczoną ziemniaczaną wodę sokową, wykorzystywano do przygotowania podłoży hodowlanych [Bzducha-Wróbel i in., 2014]. W tak otrzymanej wodzie sokowej stwierdzono zawartość suchej substancji na poziomie 3,55% ($g_{s.s.}/100\text{ cm}^3$ wody sokowej). W jej skład wchodziło około 1,34% substancji bezpośrednio redukujących stanowiących źródło węgla dla drożdży oraz 1,29% białka ogółem będącego źródłem azotu.

Inokulum drożdży przygotowano w 100 cm^3 płynnego podłoża YPD o pH 5,0, prowadząc hodowlę przez 24 godziny w temperaturze 28°C na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej (Edmund Bühler SM-30 Control, Niemcy) przy amplitudzie drgań 200 cykli/min. Po okresie inkubacji zawiesinę drożdży wirowano ($2500\times g/10\text{ min}$, Mini Spin Plus, Eppendorf, Niemcy), przemywano jałowym roztworem soli fizjologicznej (0,85% NaCl), a następnie zawieszano w odpowiednim podłożu tak, aby liczba komórek w każdej hodowli wynosiła ok. $1\times 10^5\text{ jtk}/\text{cm}^3$. Następnie pobierano po 300 μl tak zaszczipionych podłoży i wprowadzano do mikrostudzienek kasety aparatu Bioscreen C.

Mikrohodowle prowadzono w temperaturze 28°C przez 120 godzin z ciągłym wytrząsaniem na poziomie średnim. Wzrost badanych drożdży podczas hodowli oceniano poprzez pomiar zmian gęstości optycznej (OD), który wykonywany był automatycznie co 2 godziny przy długości fali 420-580 nm (filtr szerokopasmowy). Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono krzywe wzrostu drożdży *Candida utilis* ATCC 9950, czas trwania fazy adaptacyjnej (t_{lag}) i logarytmicznej (t_{log}) oraz wartości minimalne i maksymalne OD w fazie wzrostu logarytmicznego ($OD_{\text{min log}}$ i $OD_{\text{max log}}$) oraz podczas całkowitego trwania hodowli (OD_{min} i OD_{max}). Ponadto określono również maksymalną szybkość właściwą wzrostu drożdży w fazie logarytmicznej na podstawie wzoru: $\mu_{\text{max}} = (\ln OD_{\text{max log}} - \ln OD_{\text{min log}})/t_{\text{log}}$, czas generacji ($g = \ln 2/\mu_{\text{max}}$) oraz całkowity przyrost gęstości optycznej ($\Delta OD = OD_{\text{max}} - OD_{\text{min}}$) [Bzducha-Wróbel i in., 2014].

Wyniki i dyskusja

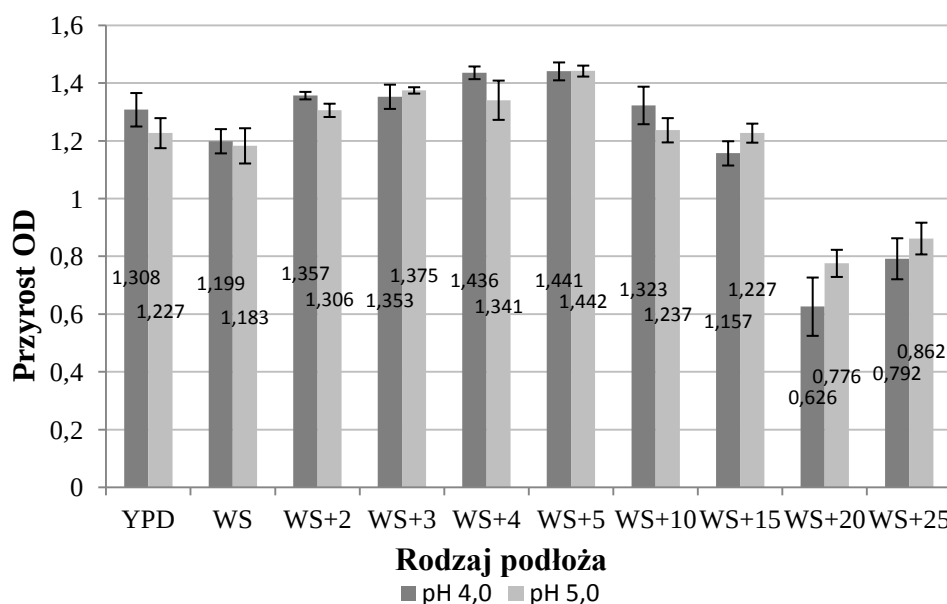
Analizę zmian gęstości optycznej (OD) w mikrohodowlach aparatu Bioscreen C przeprowadzono w celu szybkiego porównania wzrostu badanego szczepu drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 w podłożach ze różnicowanym dodatkiem glicerolu i pH środowiska. Uzyskane wyniki pozwoliły wykreślić krzywe wzrostu w poszczególnych podłożach, a następnie umożliwiły wyznaczenie takich parametrów charakteryzujących wzrost drobnoustrojów jak długość fazy adaptacyjnej i logarytmicznej, maksymalna szybkość właściwa wzrostu oraz czas generacji komórek. Uzyskane wyniki zamieszczono w Tabeli 1. Z kolei na Rysunku 1 przedstawiono wykresy słupkowe obrazujące całkowity przyrost gęstości optycznej w podłożach po 120-godzinnej hodowli w aparacie Bioscreen C.

Tab. 1. Parametry charakteryzujące wzrost drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 w mikrohodowlach aparatu Bioscreen C (WS - woda sokowa; 2-25% - stężenia glicerolu)

Podłoże	pH	t_{lag} [h]	t_{log} [h]	μ_{max} [h ⁻¹]	Czas generacji [h]
YPD	4,0	12	12	0,069	10,07
	5,0	10	20	0,039	17,58
WS	4,0	22	30	0,025	27,86
	5,0	20	18	0,034	20,22
WS + 2%	4,0	24	36	0,022	31,49
	5,0	18	36	0,021	33,62
WS + 3%	4,0	24	40	0,020	34,79
	5,0	24	16	0,029	24,28
WS + 4%	4,0	22	42	0,013	51,93
	5,0	22	36	0,014	51,24
WS + 5%	4,0	28	36	0,017	39,85
	5,0	28	24	0,022	31,11
WS + 10%	4,0	30	32	0,014	47,90
	5,0	44	22	0,025	28,17
WS + 15%	4,0	46	30	0,017	41,02
	5,0	26	60	0,012	58,87
WS + 20%	4,0	42	-	-	-
	5,0	38	-	-	-
WS + 25%	4,0	26	-	-	-
	5,0	22	-	-	-

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że badany szczep drożdży wykazywał wzrost we wszystkich wariantach podłoży hodowlanych. Najwyższe wartości przyrostu OD uzyskano w podłożach z 4% (1,436 przy pH 4,0 i 1,341 przy pH 5,0) i 5% (1,441 i 1,442) dodatkiem glicerolu. Nieznacznie mniejszy przyrost można zaobserwować w podłożach z 2% (1,357 i 1,306) i 3% (1,353 i 1,375) stężeniem tego związku, a także w przypadku 10% dodatku (1,323 i 1,237). Wzrost w tych podłożach był wyższy lub porównywalny do hodowli kontrolnej YPD, gdzie uzyskano przyrost gęstości optycznej wynoszący odpowiednio 1,308 (pH 4,0) oraz 1,227 (pH 5,0).

W przypadku podłoża składającego się wyłącznie z ziemniaczanej wody sokowej uzyskano przyrost gęstości optycznej na poziomie 1,199-1,183. Słabszy wzrost drożdży *C. utilis* w porównaniu do podłoża YPD mógł być spowodowany niższą zawartością cukrów redukujących (1,3%, a w YPD 2%) stanowiących jedyne źródło węgla dla badanego szczepu.



Rys. 1. Przyrost gęstości optycznej po 120 godzinach prowadzenia hodowli drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 w aparacie Bioscreen C (WS - woda sokowa; 2-25 - stężenia glicerolu)

Podobny wzrost stwierdzono w podczas hodowli w podłożu z wodą sokową i 15% dodatkiem glicerolu - 1,157 w pH 4,0 oraz 1,227 w pH 5,0. Można zatem przypuszczać, że przy wyższym stężeniu glicerolu (od 15%) w pożywce drożdże nie były zdolne do jego asymilacji i wykorzystywały wyłącznie składniki odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej. Jednocześnie w podłożach z 20 i 25% glicerolem stwierdzono znacznie słabszy wzrost badanych drożdży. Przyrost gęstości optycznej po 120-godzinnej hodowli wyniósł odpowiednio 0,626 i 0,776 w podłożu z 20% dodatkiem oraz 0,792 i 0,862 w 25%. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że glicerol w stężeniach 20 i 25% nie tylko nie był wykorzystywany przez drożdże, ale również znacząco zahamował ich wzrost. Przyczyną tego zjawiska było prawdopodobnie zbyt wysokie ciśnienie osmotyczne środowiska hodowlanego, powodujące zamykanie kanałów w błonie komórkowej drożdży, niezbędnych do prawidłowego pobierania składników odżywczych z podłoża [Bzducha-Wróbel i in., 2014].

Błażej i in. [2014] wykorzystywali glicerol i ziemniaczaną wodę sokową jako podłoża do hodowli olejogennych drożdży *Rhodotorula gracilis*. Najwyższy plon biomasy badanych drożdży autorzy uzyskali w podłożu z 5% dodatkiem glicerolu, a wraz ze wzrostem jego stężenia przyrost biomasy drożdży ulegał zmniejszeniu. Badania przeprowadzone przez autorów potwierdzają hamujące działanie wyższych stężeń glicerolu w podłożu hodowlanym na wzrost drożdży. Z kolei Komorowski i Błażej [2011] prowadzili mikrohodowle drożdży *Candida utilis*

ATCC 9950 w podłożach mineralnych z glicerolem. Autorzy uzyskali niższe wartości OD przy tym samym stężeniu glicerolu niż w niniejszej pracy. Można zatem stwierdzić, że zastosowanie wyłącznie nieorganicznego źródła azotu, jakim jest siarczan amonu, było niewystarczające dla intensywnego rozwoju drożdży i ograniczało ich wzrost. Związki azotowe obecne w ziemniaczanej wodzie sokowej, jak i występujące w niej substancje wzrostowe oraz składniki mineralne, stanowiły pożądane induktory wzrostu dla badanych drożdży *Candida utilis* ATCC 9950.

Należy również zwrócić uwagę, że kwasowość czynna środowiska nie miała znaczącego wpływu na wzrost badanego szczepu. W podłożu kontrolnym YPD oraz w podłożach z niższym dodatkiem glicerolu zaobserwowano nieznacznie wyższy przyrost w hodowli o pH 4,0 w porównaniu do 5,0. Z kolei w podłożach z wyższym dodatkiem glicerolu (od 15%) wyższy przyrost stwierdzono podczas hodowli o pH 5,0 niż 4,0. Juszczak i in. [2005] prowadzili hodowlę drożdży *Candida utilis* ATCC 60 558 w aparacie Bioscreen w podłożach o różnym pH zawierającym 3% glicerolu, 1% peptonu, 1% ekstraktu drożdżowego oraz sole nieorganiczne. Przeprowadzone badania wykazały nieznacznie wyższy wzrost badanego szczepu w podłożach o niższym pH (w zakresie 3,5-4,5) niż wyższym (5,0-6,0).

Oprócz przyrostu OD istotne znacznie do scharakteryzowania wzrostu drobnoustrojów w podłożach hodowlanych mają również wybrane parametry kinetyki wzrostu (Tabela 1). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najkorzystniejsze warunki do wzrostu drożdże *C. utilis* miały w podłożach kontrolnych, o czym świadczą najkrótszy czas generacji oraz najwyższa szybkość właściwa wzrostu. Dodatek glicerolu do podłoża spowodował znaczące wydłużenie czasu trwania fazy logarytmicznej, co związane było ze zmniejszeniem szybkości właściwej wzrostu drożdży w tych podłożach oraz wydłużeniem czasu generacji. Na taką sytuację mogła mieć wpływ konieczność dostosowania metabolizmu badanych drożdży do dodatkowego źródła węgla, jakim był glicerol. Jednocześnie stwierdzono wydłużanie się czasu trwania zarówno fazy adaptacyjnej jak i logarytmicznej wraz ze wzrostem stężenia glicerolu. W przypadku podłoży doświadczalnych z 20 i 25% glicerolem faza logarytmiczna w dalszym ciągu trwała, aż do końca prowadzenia hodowli (powyżej 120 godzin), co uniemożliwiło określenie czasu generacji i maksymalnej szybkości właściwej wzrostu drożdży.

Zarówno w podłożu z 4 jak i 5% dodatkiem glicerolu stwierdzono podobny wzrost pod względem całkowitego przyrostu OD. Jednocześnie były to najwyższe wartości uzyskane spośród wszystkich wariantów hodowli. Należy jednak zwrócić uwagę, że kinetyka wzrostu drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 w tym podłożach różni się pod względem pozostałych parametrów. Czas generacji w podłożu z 4% glicerolem i pH 5,0 wyniósł aż 51 godzin, z kolei w podłożu z 5% dodatkiem tego związku (przy tym samym pH) zaledwie 31 godzin. Również maksymalna szybkość właściwa wzrostu drożdży w podłożu z 5% stężeniem glicerolu była

wyższa ($0,022\text{ h}^{-1}$) niż w hodowli z 4% jego dodatkiem ($0,014\text{ h}^{-1}$). Ponadto w podłożu 5% korzystniejsze parametry uzyskano podczas hodowli przy pH 5,0 niż 4,0. Można zatem uznać, że najlepsze warunki do hodowli badanego szczepu drożdży *C. utilis* stanowiło podłoże o pH 5,0, z ziemniaczaną wodą sokową suplementowaną 5% dodatkiem glicerolu.

Wnioski

1. Odbiałczona ziemniaczana woda sokowa i glicerol mogą być wykorzystywane jako źródło węgla i azotu do produkcji biomasy drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950.
2. Najkorzystniejsze warunki do wzrostu badanych drożdży stwierdzono w przypadku podłoża składającego się z ziemniaczanej wody sokowej wzbogaconej 5% dodatkiem glicerolu o pH 5,0.
3. Badania pokazały, że wyższe stężenia glicerolu (powyżej 15%) działają hamująco na wzrost drożdży *Candida utilis*. Jednocześnie stwierdzono, że wartość pH środowiska (4,0 i 5,0) nie miała znaczącego wpływu na wzrost tego szczepu.

Literatura

- [1] Amaral P.F.F., Ferreira T.F., Fontes G.C., Coelho M.A.Z.: Glycerol valorization: New biotechnological routes. Food and Bioproducts Processing, 2009, 87, 179-186.
- [2] Błażej S.: Studia nad pozyskiwaniem biopleksów z biomasy drożdży *Candida utilis* wzbogaconych magnezem. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2006.
- [3] Błażej S., Duszkiewicz-Reinhard W.: Yeast cell biomass as a potential source of magnesium bioplexes – a review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2004, 13(54), 223-232.
- [4] Błażej S., Gientka I., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Różańska L., Maszewska M.: Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu przez drożdże *Rhodotorula gracilis* w podłożach zawierających ziemniaczaną odpadową wodę sokową wzbogaconą glicerolem. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2014, 576, 3-12.
- [5] Bzducha-Wróbel A., Kieliszek M., Błażej S.: Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. European Food Research and Technology, 2013, 237, 489–499.
- [6] Bzducha-Wróbel A., Błażej S., Molenda M., Reczek L.: Biosynthesis of $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucans of cell Wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinized potato juice

- water and glycerol. European Food Research and Technology, 2014, doi: 10.1007/s00217-014-2406-6.
- [7] Internet 1: Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm> (22 lutego 2015 roku).
 - [8] Jay J.M.: Modern food microbiology. Chapman & Hall, London 1992.
 - [9] Juszczak P., Musiał I., Rymowicz W.: Dobór szczepów drożdży do produkcji biomasy z glicerolu odpadowego. Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia, 2005, 4 (1-2), 65-76.
 - [10] Kieliszek M., Błażej S., Jędrzejczak R.: Wiązanie selenu przez drożdże paszowe *Candida utilis* ATCC 9950. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 2012, 3, 628-633.
 - [11] Komorowski K., Błażej S.: Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu przez wybrane drożdże. Przemysł Spożywczy, 2011, 65 (9), 48-51.
 - [12] Lipińska E., Błażej S., Markowski K.: Koncepcja wykorzystania gliceryny odpadowej z produkcji biodiesla jako źródła węgla dla drożdży *Candida utilis* w kulturze mieszanej z bakteriami octowymi. Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia, 2010, 9(3), 3-14.
 - [13] Liu B., Song J., Li Y., Niu J., Wang Z., Yang Q.: Towards Industrially Feasible Treatment of Potato Starch Processing Waste by Mixed Cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171, 1001-1010.
 - [14] Miedzianka J., Pęksa A., Smolarczyk E.: Zastosowanie przemysłowego soku ziemniaczanego do otrzymywania preparatów białka arylowanego. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2010, 557, 261-273.
 - [15] Munawar R.A., Irfan M., Nadeem M., Syed Q.A., Siddique Z.H.: Biosynthesis of single cel biomass of *Candida utilis* by submerged fermentation. Pakistan Journal of Science, 2010, 1(62), 1-5.
 - [16] Muniraj I.K., Xiao L., Hu Z., Zhan X., Shi J.: Microbial lipid production from potato processing wastewater using oleaginous filamentous fungi *Aspergillus oryzae*. Water Research, 2013, 47, 3477-3483.
 - [17] Musiał I., Rymowicz W., Kita A.: Produkcja biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* z tłuszczów odpadowych po smażeniu produktów przekąskowych. Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia, 2004, 3 (1-2), 75-83.
 - [18] Nowak J., Górna B., Nowak W.: Wykorzystanie grzybów strzępkowych do biodegradacji ścieków z przemysłu ziemniaczanego z jednoczesną produkcją biomasy pleśniowej na cele paszowe. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2013, 6 (91), 191-203.
 - [19] Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W.: Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. Biomass and Bioenergy, 2013, 48, 148-166.

- [20] Taccari M., Canonico L., Comitini F., Mannazzu I., Ciani M.: Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource Technology*, 2012, 110, 488-495.
- [21] Walker G.M.: *Yeast - Physiology and Biotechnology*. Wiley, New York, 1998.

WPLYW MYCIA WODĄ CHLOROWANĄ NA POZOSTAŁOŚCI ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN W ŻYWNOŚCI POCHODZENIA ROŚLINNEGO ORAZ RYZYKO NARAŻENIA ZDROWIA KONSUMENTÓW

BOŻENA ŁOZOWICKA, MAGDALENA JANKOWSKA, PIOTR KACZYŃSKI

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu mycia wodą chlorowaną na eliminację szkodliwych dla zdrowia pozostałości środków ochrony roślin (ś.o.r.) w żywności pochodzenia roślinnego oraz oszacowanie ryzyka narażenia konsumentów. Materiał do badań stanowiły: brokuły, pomidory, porzeczki czarne i truskawki, pochodzące z upraw na które zaaplikowano powszechnie stosowane chemiczne ś.o.r. w dawce podwójnej. Owoce i warzywa po osiągnięciu dojrzałości zebrano, podzielono na reprezentatywne podpróbki i oznaczono wyjściowe stężenie pozostałości ś.o.r. Materiał roślinny poddano myciu wodą chlorowaną, a następnie wyznaczono stężenie końcowe. Na podstawie różnic stężeń wyliczono współczynniki przetwarzania (PF) i zastosowano do oceny narażenia ostrego dla dwóch grup konsumentów: dorosłych i populacji najbardziej krytycznej dzieci. Badania wykazały, że oszacowane ryzyko pobrania jednorazowego pozostałości ś.o.r. w owocach i warzywach nie przekraczało "bezpiecznych" poziomów ostrej dawki referencyjnej (ARfD), z wyjątkiem boskalidu w brokułach. Mycie wodą chlorowaną obniżyło stężenia pozostałości ś.o.r., a tym samym pobrania ich z żywnością, przez co okazało się skutecznym sposobem w ograniczeniu potencjalnego zagrożenia dla zdrowia ludzi. Zastosowanie współczynników przetwarzania umożliwiło uzyskanie bardziej wiarygodnych ocen ryzyka.

Słowa kluczowe: mycie, pozostałości środków ochrony roślin, współczynnik przetwarzania, ocena ryzyka

Wprowadzenie

Żywność pochodzenia roślinnego, w tym głównie owoce i warzywa, dostarcza organizmowi wielu witamin oraz składników mineralnych potrzebnych do jego prawidłowego funkcjonowania pełniąc przy tym ważną i niepodważalną rolę w żywieniu człowieka. Jednakże, obok tych niezbędnych i cennych substancji, produkty te mogą także nieść z sobą zagrożenia mikrobiologiczne, jak i chemiczne [Czernyszewicz, 2012]. Ze względu na powszechną chemizację rolnictwa, w grupie zanieczyszczeń chemicznych istotną rolę odgrywają

pozostałości środków ochrony roślin (ś.o.r.) określane, jako krytyczne wyróżniki jakości i bezpieczeństwa żywności.

Stosowane do ochrony owoców i warzyw substancje czynne (s.cz.) środków ochrony roślin należą do różnych grup chemicznych i charakteryzują się zróżnicowaną budową chemiczną i właściwościami fizyko-chemicznymi [Amvrazi, 2011]. Ze względu na swój toksyczny charakter mogą powodować szkodliwe skutki zdrowotne dla ludzi [Keikotlhaile, 2011]. Niektóre z nich uznawane są za kancerogenne, teratogenne, mutagenne oraz alergenne, szczególnie niebezpieczne są dla małych dzieci [Kroes, 2000; EFSA, 2005; Łozowicka, 2015].

Spośród żywności pochodzenia roślinnego, owoce i warzywa ze względu na wysoką podatność na choroby i atak szkodników, są najczęściej obciążone pozostałościami ś.o.r. [Łozowicka, 2012, 2012a,]. Wyniki wieloletnich badań monitoringowych wskazują [Łozowicka, 2013, 2014], że zanieczyszczenia najczęściej występowały w owocach ziarnkowych i jagodowych, rzadziej w warzywach, spośród których w owocowych, korzeniowych i bulwiastych. Dlatego też, do niniejszych badań wytypowano powszechnie konsumowane owoce i warzywa, takie jak: brokuły, pomidory, porzeczki czarne i truskawki, które mają wysoki poziom spożycia.

Jednym ze znanych sposobów usuwania pozostałości ś.o.r. obecnych w owocach i warzywach są procesy technologiczne. Wśród nich najpowszechniej stosowanym przez konsumentów jest mycie ich pod bieżącą wodą bezpośrednio przed spożyciem. Skuteczność redukcji poziomów pozostałości ś.o.r. potwierdza wielu badaczy [Holland, 1994; Kaushik, 2009; Aktar, 2010]. Niemniej jednak, doniesienia literaturowe w tym obszarze są nie liczne i fragmentaryczne, ograniczają się do pojedynczych związków lub grupy pestycydów, konkretnego asortymentu lub procesu technologicznego [Christensen, 2003; Zabik, 2000].

Miarą efektywności danego procesu jest współczynnik przetwarzania (*ang. processing factors*, PF), i jest on charakterystyczny dla każdej kombinacji: proces technologiczny/asortyment/substancja czynna. Dodatkowo, uwzględniony w szacowaniu ryzyka narażenia zdrowia konsumentów pozwala uzyskać bardziej miarodajny wynik.

Pozostałości ś.o.r. obecne w owocach i warzywach są efektem intensywnej chemicznej ochrony, i z punktu widzenia konsumenta powinny być możliwie na najniższym poziomie. Szczególnie niebezpieczne są te produkty, gdzie występują powyżej dopuszczalnych limitów, określanych jako najwyższe dopuszczalne poziomy (NDP, *ang. MRL*), są to pozostałości niezarejestrowanych na daną uprawę ś.o.r. lub całkowicie zabronionych do stosowania. Wszelkie niezgodności stosowania ś.o.r. z przepisami prawa podlegają indywidualnej ocenie ryzyka. Dlatego też, szacowanie narażenia konsumentów w aspekcie zdrowotnym jest niezwykle ważnym zagadnieniem [Harris, 2001]. W celu określenia ryzyka konieczna jest znajomość średniej dziennej diety danej grupy konsumentów oraz

rzeczywistego poziomu pozostałości pestycydów w żywności, przed i po obróbce technologicznej.

Celem pracy jest określenie wpływu mycia wodą chlorowaną na poziom pozostałości ś.o.r. w owocach i warzywach oraz porównanie oszacowań ryzyka narażenia zdrowia dwóch subpopulacji: dorosłych i najbardziej krytycznej grupy małych dzieci, z uwzględnieniem w diecie surowych owoców i warzyw przed poddaniem ich obróbce technologicznej, i po takiej obróbce.

Założeniem niniejszej pracy jest wniesienie istotnego wkładu w problematykę pozostałości ś.o.r. obecnych w owocach i warzywach, stanowiących zagrożenie zdrowia konsumentów, poprzez wykorzystanie powszechnie stosowanych procesów technologicznych.

Materiał i metody badań

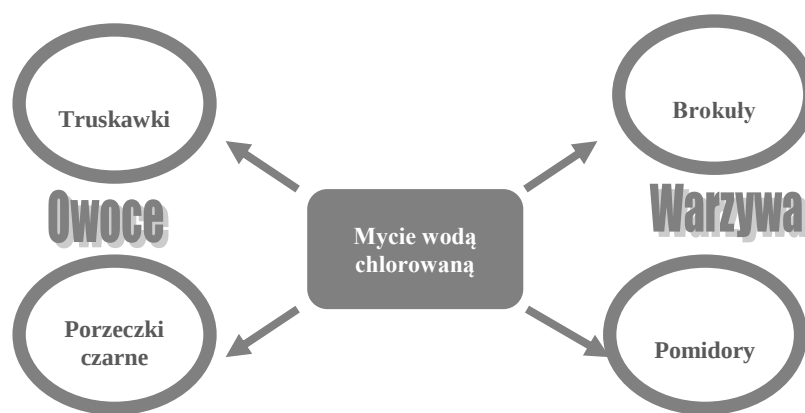
Materiał do badań stanowiły truskawki, porzeczki czarne, brokuły i pomidory pochodzące z kontrolowanych doświadczeń polowych i tunelowych, w których aplikowano środki ochrony roślin według ustalonego programu w dawce podwójnej [Etykiety ś.o.r. MRiRW]. Próbkę do badań pobrano w latach 2011-2014.

Tab. 1. Charakterystyka badanych substancji czynnych ś.o.r.

Typ pestycydu	Substancja czynna	Grupa pestycydu	Środek ochrony roślin
Akarycydy	fenazachina	Niesklasyfikowana	Magus 200 SC
	propargit	Ester kwasu siarkowego	Omite 30 WP
Fungicydy	azoksystrobina	Strobiluryny	Amistar 250 SC
	boskalid	Karboksyamidy	Signum 33 WG
	bupirymat	Pirymidyny	Nimrod 250 EC
	chlorotalonil	Chloronitryle	Amistar Opti 480 SC
	cyprodinil	Anilinopyrimidyny	Switch 62.5 WG
	difenokonazol	Triazole	Score 250 EC
	fludioksonil	Fenylpirazole	Switch 62.5 WG
	iprodion	Dikarboksyimidy	Rovral Aquaflo 500 SC
	pyraklostrobina	Strobiluryny	Signum 33 WG
	tetrakonazol	Triazole	Domark 100 EC
	tiofanat metylu	Benzimidazole	Topsin M 500 SC
Insektocydy	acetamipryd	Neonikotynoidy	Mospilan 20 SP
	alfa-cypermetryna	Pyretroidy	Fastac 100 EC
	chloropiryfos	Fosforoorganiczne	Dursban 480 EC
	deltametryna	Pyretroidy	Decis 2,5 EC
	lambda-cyhalotryna	Pyretroidy	Karate Zeon 050 CS

Badaniami objęto 18 substancji czynnych wchodzących w skład powszechnie stosowanych środków ochrony roślin: 2 akarycydy, 11 fungicydów oraz 5 insektycydów. Charakterystykę badanych substancji czynnych ś.o.r. przedstawiono w Tab. 1.

Zebrany materiał roślinny traktowany chemicznymi ś.o.r. podzielono na dwie reprezentatywne podpróbki analityczne o jednakowej masie. W pierwszej wyznaczono stężenie początkowe pozostałości ś.o.r., a drugą poddano obróbce technologicznej. Owoce i warzywa myto pod bieżącą wodą kranową przez 2 minuty (parametry wody chlorowanej: temperatura ok. 20°C, stężenie Cl₂ 1,5 mg/l) (Rys. 1).

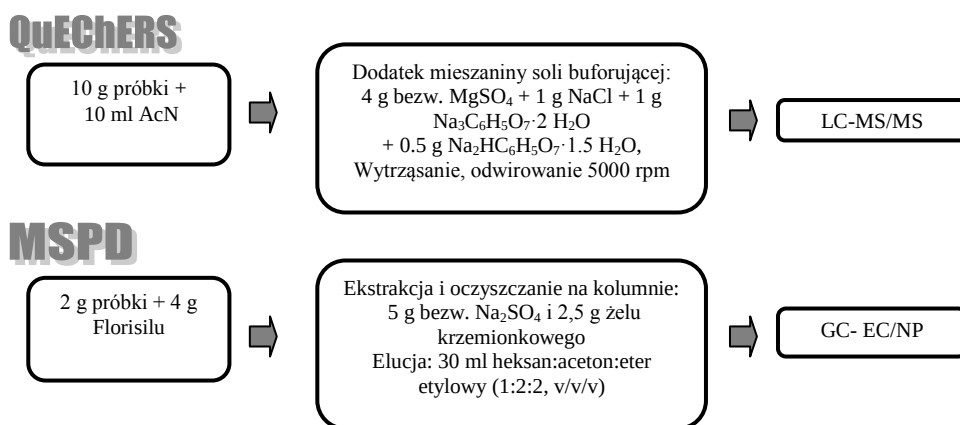


Rys. 1. Schemat obróbki wytypowanych owoców i warzyw.

Do izolacji pozostałości ś.o.r. wykorzystano akredytowane i zwalidowane metody badawcze [Łozowicka, 2013]. W przypadku owoców wykorzystano metodę badawczą bazującą na technice rozproszenia próbki na fazie stałej MSPD (ang. Matrix Solid Phase Dispersion), a próbki warzyw przygotowano według zmodyfikowanej techniki QuEChERS (ang. Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe). Końcowe ekstrakty z próbek analizowano na zawartość pozostałości ś.o.r. metodą chromatografii gazowej (GC-EC/NP) i cieczowej (LC-MS/MS) (Rys. 2).

Stężenia pozostałości środków ochrony roślin w owocach i warzywach poddanych obróbce i bez obróbki technologicznej wykorzystano do wyznaczenia współczynników przetwarzania. PF obliczono według wzoru 1 dla poszczególnych kombinacji związków/asortyment.

$$PF = \frac{\text{stężenie pozostałości pestycydu po myciu [mg/kg]}}{\text{stężenie pozostałości pestycydu przed myciem [mg/kg]}} \quad (1)$$



Rys. 2. Metody przygotowania próbek owoców i warzyw.

W przypadku, gdy wartość PF jest niższa od 1, wskazuje to na obniżenie pozostałości ś.o.r. w produkcie po obróbce i jest to współczynnik redukcji, gdy wartość przewyższa 1, oznacza to podwyższenie poziomu pozostałości i jest to współczynnik zagęszczenia.

Istnieją dwa typy akceptowalnych poziomów pobrania pozostałości ś.o.r., dopuszczalne dzienne pobranie (ang. ADI, Acceptable Daily Intake) oraz ostra dawka referencyjna (ang. ARfD, Acute Reference Dose). ADI jest to ilość substancji, którą można spożywać codziennie przez całe życie bez najmniejszej szkody dla zdrowia, zaś ARfD to ilość substancji, która może być pobrana przez człowieka z żywnością w czasie nie dłuższym niż 24 godziny bez znaczącego ryzyka dla zdrowia konsumenta, wyrażone w $\mu\text{g}/\text{kg}$ masy ciała.

W pracy zastosowano ocenę ryzyka narażenia krótkoterminowego, które oszacowano poprzez porównanie jednorazowego lub jednodniowego pobrania wykrytej najwyższej pozostałości środka ochrony roślin w produkcie do ustalonej wielkości ARfD [JMPR, 2006]. Za dopuszczalne, nie stwarzające zagrożeń dla zdrowia przyjmuje się wartości oszacowanego narażenia konsumentów na pozostałości ś.o.r. nie przekraczające 100% wartości ARfD.

Do oszacowania pobrania pozostałości przez dzieci i dorosłych wykorzystano nowy model brytyjskiego Urzędu Bezpieczeństwa Pestycydów Ministerstwa ds. Środowiska, Żywności i Rolnictwa (EFSA) (PRIMo - Pesticide Residue Intake Model, revision 2) uwzględniający spożycie na wysokim poziomie 97.5 percentyla. Obliczeń dokonano wykorzystując oprogramowanie Chronic Consumer ver1.1. z wbudowanymi bazami danych spożycia dla dwóch subpopulacji: dzieci (2-4 lata) i dorosłych (14-80 lat).

Narażenie krótkoterminowe obliczano według wzorów 2-5.

– Przypadek 1, gdy $U < 25\text{g}$

$$IESTI = \frac{LP * (HR)}{mc} \quad \text{bez korekcji} \quad (2)$$

$$IESTI^* = \frac{LP * (HR * PF)}{mc} \quad \text{z korekcją} \quad (3)$$

– Przypadek 2, gdy $U \geq 25\text{ g}$

$$IESTI = \frac{U * HR * v + (LP - U) * HR}{mc} \quad \text{bez korekcji} \quad (4)$$

$$IESTI^* = \frac{U * (HR * PF) * v + (LP - U) * (HR * PF)}{mc} \quad \text{z korekcją} \quad (5)$$

gdzie:

IESTI – międzynarodowe narażenie krótkoterminowe wyrażone w mg/kg masy ciała,

U – masa części jadalnej produktu,

HR – najwyższy wykryty poziom pozostałości,

PF – współczynnik przetwarzania,

HR*PF – najwyższy wykryty poziom pozostałości pomnożony przez współczynnik przetwarzania,

v – współczynnik niejednorodności produktu,

LP – dane spożycia pełnej porcji dla jednostki produktu,

mc – średnia masa ciała (dzieci 17 kg, dorośli 70 kg).

Ocenę ryzyka narażenia zdrowia związanego ze spożyciem owoców i warzyw zawierających pozostałości środków ochrony roślin dokonano w oparciu o dostępne badania epidemiologiczne przeprowadzone dla brytyjskich dzieci i dorosłych na wysokim stopniu spożycia (97,5 percentyla), gdyż brak jest pełnych badań dla polskich konsumentów, uwzględniają one bowiem jedynie populację generalną i spożycie na średnim poziomie.

Szacowanie narażenia krótkoterminowego bazowało na scenariuszu najgorszego przypadku, tzn. połączenie dużej porcji z najwyższym stężeniem pozostałości. Wyznaczone PFs zastosowano do oszacowania narażenia krótkoterminowego bez korekcji o PF (Wzór 2 i 4) oraz z korekcją o PF (Wzór 3 i 5).

Wyniki i dyskusja

W celu oceny zachowania się pozostałości pestycydów pozyskano materiał roślinny, na który zaaplikowano ś.o.r. w dawce podwójnej. W przypadku zastosowania takiej dawki można było się spodziewać przekroczeń najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości. W badanych owocach i warzywach unijne wartości NDP dla poszczególnych związków mieszczą się w zakresie: od 0,01 mg/kg (fenazachina i propargit w porzeczkach czarnych) do 10 mg/kg (boskalid w porzeczkach czarnych i truskawkach) [Rozporządzenie (WE) nr 396/2005]. Przekroczenia stężeń pozostałości w badanym materiale roślinnym odnotowano w kilku przypadkach (chloropiryfos i pyraklostrobina w brokułach; alfa-cypermetyryna, difenokonazol, fenazachina, propargit w porzeczkach czarnych oraz alfa-cypermetyryna w truskawkach), dla których limit graniczny był bardzo niski od 0,01 mg/kg do 0,1 mg/kg.

Oceny skuteczności mycia wodą chlorowaną na poziom pozostałości ś.o.r. dokonano poprzez porównanie stężenia wyjściowego w materiale roślinnym nie poddanym obróbce technologicznej ze stężeniem końcowym, po myciu wodą chlorowaną i wyrażono za pomocą współczynnika przetwarzania. We wszystkich analizowanych przypadkach uzyskano współczynniki redukcji 1 ($PF < 1$), które zestawiono w Tab. 2.

Narażenie krótkoterminowe zdrowia dzieci i dorosłych spożywających owoce i warzywa zawierające pozostałości ś.o.r., oszacowano bez uwzględnienia PF oraz z korekcją, i przedstawiono w Tab. 2.

Tab. 2. Narażenie krótkoterminowe dla dwóch grup: dzieci (a) i dorosłych (b) bez uwzględnienia PF (IESTI) oraz z uwzględnieniem PF (IESTI*)

a)

Lp.	Substancja czynna	Stęż. wyj.	Stęż. końc.	PF	NPD	ARfD	Dzieci (średnia m.c. 14 kg)				
							IESTI	IESTI *	% ARfD	% ARfD *	Różn. [%]
	BROKUŁY						Spożycie 60,7 (g/os./d.)				
1	Alfa-cypermetyryna (I)	0,06	0,04	0,62	1	0,04	1,26	0,78	3,1	1,9	1,2
2	Azoksystrobina (F)	0,34	0,20	0,59	5	0,2	7,12	4,2	3,6	2,1	1,5
3	Boskalid (F)	1,99	1,51	0,76	5	0,04	41,65	31,66	104,1	79,1	25,0
4	Chloropiryfos (I)	1,04	0,79	0,76	0,05	0,1	21,77	16,54	21,8	16,5	5,3
5	Lambda-cyhalotryna (I)	0,03	0,03	0,94	0,1	0,0075	0,63	0,59	8,4	7,9	0,5
6	Pyraklostrobina (F)	0,42	0,32	0,77	0,1	0,03	8,79	6,77	29,3	22,6	6,7
	POMIDORY						Spożycie 90,5 (g/os./d.)				
1	Azoksystrobina (F)	0,14	0,02	0,15	3	0,2	5,8	0,87	2,9	0,4	2,5
2	Boskalid (F)	0,19	0,08	0,43	3	0,04	7,87	3,38	19,7	8,5	11,2
3	Chlorotalonil (F)	0,11	0,02	0,15	2	0,6	4,56	0,68	0,8	0,1	0,7

4	Cyprodinil (F)	0,23	0,15	0,65	1	0,03	9,53	6,19	31,8	20,6	11,2
5	Fludioskonil (F)	0,1	0,06	0,57	0,9	0,37	4,14	2,36	1,1	0,6	0,5
6	Pyraklostrobina (F)	0,11	0,08	0,71	0,3	0,03	4,56	3,23	15,2	10,8	4,4
	PORZECZKA CZARNA						Spożycie 52,2 (g/os./d.)				
1	Alfa-cypermetyryna (I)	0,12	0,09	0,78	0,05	0,04	0,43	0,34	1,1	0,8	0,3
2	Boskalid (F)	4,41	2,25	0,51	10	0,04	15,88	8,1	39,7	20,2	19,5
3	Bupirymat (F)	0,77	0,69	0,89	5	0,05	2,77	2,47	5,5	4,9	0,6
4	Deltametryna (I)	0,11	0,10	0,92	0,5	0,01	0,4	0,36	4	3,6	0,4
5	Difenokonazol (F)	0,45	0,34	0,75	0,2	0,16	1,62	1,22	1	0,8	0,2
6	Fenazachina (A)	1,51	0,98	0,65	0,01	0,1	5,44	3,53	5,4	3,5	1,9
7	Lambda-cyhalotryna (I)	0,08	0,07	0,88	0,2	0,0075	0,29	0,25	3,8	3,4	0,4
8	Propargit (A)	5,55	5,11	0,92	0,01	"-"					
9	Pyraklostrobina(F)	1,23	1,01	0,82	3	0,03	4,43	3,63	14,8	12,1	2,7
10	Tiofanat metylu (F)	0,1	0,02	0,22	0,1	0,2	0,36	0,08	0,2	0,04	0,16
	TRUSKAWKI						Spożycie 71,0 (g/os./d.)				
1	Acetamipryd (I)	0,28	0,17	0,62	0,5	0,1	1,37	0,85	1,4	0,9	0,5
2	Alfa-cypermetyryna (I)	0,17	0,09	0,55	0,07	0,04	0,83	0,46	2,1	1,1	1
3	Boskalid (F)	0,35	0,22	0,64	10	0,04	1,71	1,1	4,3	2,7	1,6
4	Bupirymat (F)	0,12	0,10	0,86	1	0,05	0,59	0,51	1,2	1	0,2
5	Chloropiryfos (F)	0,1	0,05	0,46	0,2	0,1	0,49	0,23	0,5	0,2	0,3
6	Cyprodinil (F)	0,27	0,18	0,66	5	0,03	1,32	0,87	4,4	2,9	1,5
7	Deltametryna (I)	0,15	0,12	0,8	0,2	0,01	0,73	0,59	7,3	5,9	1,4
8	Fludioskonił (F)	0,1	0,07	0,66	4	0,37	0,49	0,32	0,1	0,1	0
9	Iprodion (F)	1,34	0,98	0,73	15	0,06	6,56	4,79	10,9	8	2,9
10	Lambda-cyhalothryna (I)	0,28	0,23	0,82	0,5	0,0075	1,37	1,12	18,3	15	3,3
11	Pyraklostrobina (F)	0,91	0,67	0,74	1,5	0,03	4,46	3,3	14,9	11	3,9

b)

Lp.	Substancja czynna	Stęż. wyj.	Stęż. końc.	PF	NPD	ARfD	Dorośli (średnia m.c. 70 kg)				
							IESTI	IESTI *	% ARfD	% ARfD *	Różn.[%]
	BROKUŁY						Spożycie 195,5 (g/os./d.)				
1	Alfa-cypermetyryna (I)	0,06	0,04	0,62	1	0,04	0,77	0,48	1,9	1,2	0,7
2	Azoksystrobina (F)	0,34	0,20	0,59	5	0,2	4,37	2,58	2,2	1,3	0,9
3	Boskalid (F)	1,99	1,51	0,76	5	0,04	25,6	19,45	64	48,6	15,4
4	Chloropiryfos (I)	1,04	0,79	0,76	0,05	0,1	13,38	10,17	13,4	10,2	3,2

5	Lambda-cyhalotryna (I)	0,03	0,03	0,94	0,1	0,0075	0,39	0,36	5,1	4,8	0,3
6	Pyraklostrobina (F)	0,42	0,32	0,77	0,1	0,03	5,4	4,16	18	13,9	4,1
	POMIDORY						Spożycie 283,0 (g/os./d.)				
1	Azoksystrobina (F)	0,14	0,02	0,15	3	0,2	1,46	0,22	0,7	0,1	0,6
2	Boskalid (F)	0,19	0,08	0,43	3	0,04	1,98	0,85	5	2,1	2,9
3	Chlorotalonil (F)	0,11	0,02	0,15	2	0,6	1,15	0,17	0,2	0,03	0,17
4	Cyprodinil (F)	0,23	0,15	0,65	1	0,03	2,4	1,56	8	5,2	2,8
5	Fludioskonil (F)	0,1	0,06	0,57	0,9	0,37	1,04	0,59	0,3	0,2	0,1
6	Pyraklostrobina (F)	0,11	0,08	0,71	0,3	0,03	1,15	0,81	3,8	2,7	1,1
	PORZECZKA CZARNA						Spożycie 120,0 (g/os./d.)				
1	Alfa-cypermetyryna (I)	0,12	0,09	0,78	0,05	0,04	0,19	0,15	0,5	0,4	0,1
2	Boskalid (F)	4,41	2,25	0,51	10	0,04	6,96	3,55	17,4	8,9	8,5
3	Bupirymat (F)	0,77	0,69	0,89	5	0,05	1,22	1,08	2,4	2,2	0,2
4	Deltametryna (I)	0,11	0,10	0,92	0,5	0,01	0,17	0,16	1,7	1,6	0,1
5	Difenokonazol (F)	0,45	0,34	0,75	0,2	0,16	0,71	0,53	0,4	0,3	0,1
6	Fenazachina (A)	1,51	0,98	0,65	0,01	0,1	2,38	1,55	2,4	1,5	0,9
7	Lambda-cyhalotryna (I)	0,08	0,07	0,88	0,2	0,0075	0,13	0,11	1,7	1,5	0,2
8	Propargit (A)	5,55	5,11	0,92	0,01	"-"					
9	Pyraklostrobina(F)	1,23	1,01	0,82	3	0,03	1,94	1,59	6,5	5,3	1,2
10	Tiofanat metylu (F)	0,1	0,02	0,22	0,1	0,2	0,16	0,03	0,1	0,02	0,08
	TRUSKAWKI						Spożycie 200,0 (g/os./d.)				
1	Acetamipryd (I)	0,28	0,17	0,62	0,5	0,1	0,74	0,46	0,7	0,5	0,2
2	Alfa-cypermetyryna (I)	0,17	0,09	0,55	0,07	0,04	0,45	0,25	1,1	0,6	0,5
3	Boskalid (F)	0,35	0,22	0,64	10	0,04	0,92	0,59	2,3	1,5	0,8
4	Bupirymat (F)	0,12	0,10	0,86	1	0,05	0,32	0,27	0,6	0,5	0,1
5	Chloropiryfos (F)	0,1	0,05	0,46	0,2	0,1	0,26	0,12	0,3	0,1	0,2
6	Cyprodinil (F)	0,27	0,18	0,66	5	0,03	0,71	0,47	2,4	1,6	0,8
7	Deltametryna (I)	0,15	0,12	0,8	0,2	0,01	0,39	0,32	3,9	3,2	0,7
8	Fludioksonil (F)	0,1	0,07	0,66	4	0,37	0,26	0,17	0,1	0,05	0,05
9	Iprodion (F)	1,34	0,98	0,73	15	0,06	3,53	2,57	5,9	4,3	1,6
10	Lambda-cyhalothryna (I)	0,28	0,23	0,82	0,5	0,0075	0,74	0,6	9,8	8,1	1,7
11	Pyraklostrobina (F)	0,91	0,67	0,74	1,5	0,03	2,39	1,77	8	5,9	2,1

wytłuszczone – przypadki przekroczeń NDP i ARfD; Stęż. wyj. – stężenie wyjściowe, w materiale nie poddanym myciu [mg/kg]; Stęż. końc. – stężenie końcowe, w materiale po myciu [mg/kg]; NDP – najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości s.o.r. [mg/kg]; IESTI – pobranie bez korekcji o PF [µg/kg m.c.]; IESTI* – pobranie z korekcją o PF [µg/kg m.c.]; Różn. – różnica pomiędzy %ARfD a %ARfD*

Wśród badanych owoców i warzyw, najwyższe spożycie w przeliczeniu na jedną osobę jest dla pomidorów (dzieci ok. 91 g/osobę/dzień, dorośli 283 g/osobę/dzień), a mniejsze dla truskawek (dzieci 71 g/osobę/dzień, a dorośli ok. 200 g/osobę/dzień). Oszacowane narażenie krótkoterminowe związane ze spożyciem tzw. "dużej porcji" (spożycie na wysokim poziomie 97,5 percentyla) nie przekraczało "bezpiecznych" poziomów narażenia we wszystkich przypadkach.

Oszacowane spożycie produktów zawierających pestycydy, dla których brak jest oficjalnych wartości ARfD (azoksystrobina, boskalid, bupirymat, cyprodinil, fludioksonil i iprodion) porównano z wartością ADI. W grupie oznaczanych związków propargit nie posiada również określonej wartości ADI, stąd też nie obliczono pobrania krótkoterminowego. Brak ADI dla tej substancji może oznaczać, że jej toksyczność jest tak niska, iż narażenie byłoby zawsze niższe od ADI i jego ustalenie nie miałooby sensu [Struciński, 2007]. Może to także oznaczać, że substancja jest na tyle niebezpieczna, iż nie można ustalić limitu narażenia (substancja kancerogenna) [EFSA, 2005].

Prezentowane dane potwierdzają, iż najbardziej narażoną grupą wiekową są dzieci, dla których narażenie krótkoterminowe mieściło się w granicach od 0,2% (tiofanat metylu w porzeczkach czarnych) do 39,7% (boskalid w porzeczkach czarnych) ostrej dawki referencyjnej bez korekcji o PF, a po uwzględnieniu współczynnika było w zakresie od 0,04% (tiofanat metylu w porzeczkach czarnych) do 22,6% ARfD (pyraklostrobina w brokułach). Dla dorosłych ryzyko nie przewyższało 18% ARfD (owoce i warzywa bez mycia), natomiast po zastosowaniu poprawki o współczynniki redukcji narażenie było niższe od 14% ARfD. Wyjątek stanowił boskalid w brokułach, gdzie wartości ARfD przekroczyła 100% w przypadku dzieci. Należy zaznaczyć, że substancja ta nie posiada wyznaczonej wartości ARfD, boskalid wykazuje możliwe działanie mutagenne. W związku z tym, otrzymana wartość wynika z przeszacowania ryzyka przy zastosowaniu ADI. Niemniej jednak, po przeliczeniu ryzyka i uwzględnieniu wartości współczynnika PF dla boskalidu ($PF=0,76$), narażenie nie przekraczało dopuszczalnej wartości ARfD (pobranie wyniosło 31.66 $\mu\text{g/kg m.c.}$, co stanowi 79.1% ARfD dla dzieci).

Różnice pomiędzy oszacowanym narażeniem ostrym bez PF korekcji i z korekcją, były dwu-, trzy-, a nawet czterokrotne. Mieściły się w zakresie 0,16%–25,0% w przypadku dzieci, natomiast dla dorosłych 0,05%–15,4% (Tab. 2). Najwyższe rozbieżności odnotowano dla wspomnianego boskalidu w brokułach (25% w grupie dzieci i 15,4% dorośli).

W przypadkach przekroczeń NDP, maksymalne narażenie ostre dla dorosłych i małych dzieci nie przewyższało 30% ARfD dla dzieci i 18% dla dorosłych. Po procesie mycia, ryzyko było niższe od 23% ARfD w przypadku dzieci i 14% ARfD dla dorosłych. Jak można zauważyć, ryzyko było dwukrotnie niższe dla dorosłych niż dla dzieci w większości przypadków. W głównej mierze jest to spowodowane tym, iż dzieci charakteryzują się znacznie niższą masą ciała niż

dorośli (średnia masa ciała: dzieci 14 kg, a dorośli 70 kg), a więc wyższym pobraniem w diecie. Dzieci są określane powszechnie jako populacja krytyczna, a więc najbardziej wrażliwa na skutki narażenia na pozostałości pestycydów, gdyż nie posiadają one w pełni rozwiniętego systemu odpornościowego, hormonalnego i nerwowego oraz mechanizmu detoksykacji.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że mycie wodą chlorowaną skutecznie zredukowało poziomy pozostałości ś.o.r. w badanych owocach i warzywach, a tym samym przyczyniło się do obniżenia ryzyka związanego ze spożywaniem żywności zawierających pozostałości badanych substancji aktywnych.

Przedstawione dane pokazują, że badane owoce i warzywa mogą być spożywane przez dzieci i dorosłych konsumentów po myciu wodą chlorowaną bez powodowania niekorzystnych skutków zdrowotnych.

Wnioski

1. Mycie pod bieżącą wodą kranową okazało się skutecznym sposobem redukcji poziomów pozostałości ś.o.r. w żywności pochodzenia roślinnego.
2. Oszacowane ryzyko narażenia zdrowia ludności na podstawie poziomu oznaczonych pozostałości w owocach i warzywach po obróbce wskazuje, że pobranie pestycydów z żywnością pochodzenia roślinnego nie reprezentuje zagrożenia ryzyka zdrowia konsumentów. Wyliczone dzienne pobranie po uwzględnieniu współczynników przetwarzania było niższe od ostrej dawki referencyjnej.
3. Analizy wykazały, że narażenie ostre konsumentów pozostałościami boskalidu zawartymi w brokułach traktowanych wodą chlorowaną nie przekraczało ostrej dawki referencyjnej, pomimo przeszacowania narażenia.
4. Oszacowane narażenie krótkoterminowe zarówno dorosłych, jak i małych dzieci, wynikające z pobrania w owocach i warzywach pozostałości ś.o.r. w stężeniach przekraczających najwyższe dopuszczalne poziomy było nieznaczne, a zatem nie stwierdzono w tych przypadkach ryzyka zdrowotnego.
5. Zastosowana obróbka technologiczna poprawiła jakość i bezpieczeństwo zdrowotne badanych owoców i warzyw.

Praca została opublikowana z projektu sfinansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji DEC-2012/07/N/NZ9/00043, PRELUDIUM, "Ocena ryzyka narażenia zdrowia konsumentów na pozostałości pestycydów w żywności poddanej obróbce technologicznej".

Literatura

- [1] Aktar, Md.W., Sengupta, D., Chowdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2, 1-12.
- [2] Aktar W. 2010. Decontamination of pesticide residues on fruits and vegetables, Jan 28, 2008 (<http://www.articlesbase.com/environment-articles/decontamination-of-pesticide-residues-on-fruits-and-vegetables-317329.html>).
- [3] Amvrazi, E.G. 2011. Fate of Pesticide Residues on Raw Agricultural Crops after Postharvest Storage and Food Processing to Edible Portions. *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*. <http://www.intechopen.com/books/pesticidesformulations-effects-fate/fate-of-pesticide-residues-on-raw-agricultural-crops-after-postharvest-storage-and-food-processing-t>.
- [4] Christensen H.B., Granby K., Rabolle M. 2003. Processing factors and variability of pyrimethanil, fenhexamid and tolylfluanid in strawberries. *Food Additives and Contaminants* 20, 8, 728-741.
- [5] Czernyszewicz E., Pawlak J. 2012. Uwarunkowania i kierunki zapewnienia bezpieczeństwa i jakości owoców i warzyw. *Journal of Management and Finance* 3 (3), 114-132.
- [6] Document SANCO No. 12571/2013. 2013. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (Implemented by 01.01.2014).
- [8] EFSA. 2005. Draft opinion on a harmonized approach for risk assessment of compounds which are both genotoxic and carcinogenic. *European Food Safety Authority Journal* (www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_home.htm).
- [9] Harris, C.A., Renfrew, M.J., Woolridge, M.W. 2001. Assessing the risks of pesticide residues to consumers: recent and future developments. *Food Additives and Contaminants* 18, 1124–1129.
- [10] Holland, P.T., Hamilton, D., Ohlin, B., Skidmore, M.W. 1994. Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products. *Pure and Appl. Chem.* 66, 335–356.
- [11] JMPR. 2006. Pesticide toxicological reference values. (<http://www.efsa.europa.eu/en/mrls/docs/toxicovalues.pdf>).
- [12] Kaushik, G., Satya, S., Naik, S.N. 2009. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review. *Food Research International* 42, 26-40.
- [13] Keikotlhaile, B.M., Spanoghe, P., Steurbaut, W. 2010. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1–6.
- [14] Keikotlhaile, B.M., Spanoghe, P. 2011. Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*. (<http://www.intechopen.com/books/pesticides-formulations-effects-fate/pesticide-residues-in-fruits-andvegetables>).

- [15] Kroes R., Galli C., Munro I., Schilter B., Trans, L.A., Walker R. 2000. Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: A practical tool for assessing the need for toxicity testing. *Food and Chemical Toxicology* 38: 255–312.
- [16] Łozowicka, B., Kaczyński, P., Jankowska, M., Rutkowska, E., Hrynko, I. 2012. Pesticide residues in raspberries (*Rubus idaeus* L.) and dietary risk assessment. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 5, 165–171.
- [17] Łozowicka B., Rutkowska, E., Jankowska, M., Kaczyński, P., Hrynko, I. 2012a. Health risk analysis of pesticide residues in berry fruit from north-eastern Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 20, 83–95.
- [18] Łozowicka B., Hrynko I., Rutkowska E., Jankowska M., Kaczyński P. 2013. Kontrola urzędowa pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych północno-wschodniej Polski (2012). *Progress in Plant Protection* 53 (3), 571–575.
- [19] Łozowicka B., Hrynko I., Rutkowska E., Jankowska M., Kaczyński P. 2014. Pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych wyprodukowanych w północno-wschodniej Polsce (2013). *Progress in Plant Protection* 54 (3), 319–352.
- [20] Łozowicka B., Kaczyński P., Rutkowska E., Jankowska M., Hrynko I. 2013. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Poland and health risk assessment. *Agricultural Science*, 4 (5D), 106–112.
- [21] Łozowicka B., 2015. Health risk for children and adults consuming apples with pesticide residues. *Science of the Total Environment*. 502, 184–198.
- [22] Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Etykiety środków ochrony roślin. ([%2FInformacje Branzowe%2FProdukcja-Roslinna%2FOchrona-Roslin%2FEtykiety-Instrukcji-Stosowania-Srodkow-Ochrony-Roslin](https://bip.minrol.gov.pl/Informacje-Branzowe/Produkcja-Roslinna/Ochrona-Roslin/Etykiety-Srodkow-Ochrony-Roslin)).
- [23] Rozporządzenie (WE) NR 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 lutego 2005 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów w żywności i paszy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni, zmieniające dyrektywę Rady 91/414/EWG.
- [24] Struciński P., Góralczyk K., Czaja K., Hernik A., Korcz W., Ludwicki J.K. 2007. Ocena ryzyka dla konsumenta przy przekroczeniach najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów (NDP) w żywności. *Roczniki PZH* 58, 2, 377–388.
- [25] Zabik M.J., El-Hadidi M.F.A., Cash J.N., Zabik M.E., Jones A.L. 2000. Reduction of azinphos-methyl, chlorpyrifos, esfenvalerate and methomyl residues in processed apples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4199–4203.

NIEDESTRUKCYJNE TECHNIKI W KONTROLI JAKOŚCI WYROBÓW MIĘSNYCH

MARCIN MAKSYMIEC, DARIUSZ M. STASIAK, JUSTYNA LIBERA

Streszczenie

Przedstawiono metody badawcze i ich zastosowania, oraz innowacyjne rozwiązania wykorzystywane w przemyśle mięsnym do monitorowania *on-line* i *at-line* właściwości fizykochemicznych surowców i wyrobów mięsnych. Jednym z kryteriów wyboru metod jest pomiar bez ingerencji w podstawową strukturę surowca i wyrobu. Metody badań nieniszczących wykorzystują m.in.: obrazowanie wielowidmowe, spektroskopię luminescencyjną (fluorescencyjną, wykrywanie krawędzi), spektroskopię Ramana, ultradźwiękową, rentgenowską, ich modyfikacje oraz techniki hybrydowe. Metody badań są ściśle powiązane z zaawansowaną, wspomaganą komputerowo, analizą danych wykorzystującą specjalistyczne programy, których zadaniem jest: akwizycja danych i ich eksploracja niejednokrotnie z wykorzystaniem sztucznej inteligencji (np. sieci neuronowe, zbiory rozmyte, metody ewolucyjne i samo-uczenia) do poszukiwania nieoczywistych związków przyczynowo-skutkowych w sferze technologii mięsa.

Zmienność surowca i szeroki asortyment wyrobów mięsnych stawia duże wyzwania przed inżynierią procesów w sferze optymalizacji warunków przetwarzania, uproszczenia operacji, minimalizacji kosztów, ale przede wszystkim w sferze zachowania najwyższej jakości i trwałości wyrobu. Dlatego metody badań w przemyśle mięsnym dotyczą głównie składu chemicznego, zmian oksydacyjnych składników mięsa i właściwości powiązanych z cechami organoleptycznymi. Służą zapewnieniu jakości oczekiwanej przez konsumentów.

Słowa kluczowe: żywność, sterowanie jakością, badania nieniszczące

Wprowadzenie

Zapewnienie jakości żywności jest jednym z filarów polityki UE. Realizowane jest m.in. przez: stanowienie prawa, wyznaczanie celów i wspieranie działalności B+R [Komisja Europejska, 2014]. Prace badawcze dotyczące żywności skupiają się wokół problematyki szeroko pojętej jakości produktów spożywczych, której wyznacznikami są m.in.: trwałość przechowalnicza [Liu i in., 2013, 2014], stabilność parametrów [Einarsdóttir i in., 2013], bezpieczeństwo zdrowotne [Manzano i in., 2015], walory prozdrowotne [Prieto i in., 2014], cechy organoleptyczne (barwa, konsystencja, smak i zapach) [Castro-Giráldez i in., 2011], struktura wyrobu [Chen i in., 2013]. Laboratoryjne metody badania jakości żywności zwykle wiążą się z ingerencją w próbkę, powodując nieodwracalne

zmiany jej właściwości, a w efekcie zniszczenie materiału. Zwykle niezbyt szybkie, lecz dokładne i precyzyjne metody, są wystarczające do kontroli jakości wyrobów gotowych oraz modelowania procesów technologicznych na etapie ich opracowywania i doskonalenia. Dla aktualnych potrzeb przemysłu żywnościowego tj. zmniejszenie strat produkcyjnych, monitoring procesu, zapobieganie niepożądanym skutkom przetwarzania i przechowywania, niezbędne są metody umożliwiające prowadzenie ciągłej (*on-line*) analizy rzeczywistych (*at-line*) parametrów podczas procesu produkcyjnego. Intensywność z jaką przebiegają procesy i wąski margines dopuszczalnych błędów (odchyłek) sprawiają, że nowoczesne systemy sterowania, działając ze sprzężeniem zwrotnym, potrzebują dużych ilości zróżnicowanych i ostrych sygnałów wejściowych [EPRS 2013]. Względy te uzasadniają potrzebę szerszego stosowania tzw. badań nieniszczących, których istotą jest nieinwazyjny (niedestrukcyjny) pomiar aktualnych właściwości fizykochemicznych materiałów i ich zmian. Niezbędne informacje na temat wyrobu można uzyskać z analizy danych z pomiarów widma fal świetlnych, pola akustycznego, elektromagnetycznego i innych [Liu i in., 2013]. Wyniki są otrzymywane w sposób szybki, stały, nie wywierający wpływu na badany materiał lub indukujący zmiany w sposób nieznaczny i nieistotny z punktu widzenia technologii. Umożliwia to standaryzację produkcji, z którą wiąże się uzyskanie wyrobów o wysokiej, powtarzalnej i wyrównanej jakości. Z tego względu w aplikacyjnych badaniach dla przemysłu, dąży się do stworzenia całkowicie zautomatyzowanego systemu kontroli jakości wytwarzanych produktów, co umożliwi bieżący monitoring procesów przetwórczych [Guzek i in., 2011].

Przemysł mięsny ma specyficzne wymagania w zakresie zapewnienia bezpieczeństwa i jakości. Wysoka zawartość i aktywność wody w mięsie, obecność labilnych składników, podatność na proteolizę i lipolizę ograniczają trwałość tego surowca. Zmiany fizykochemiczne i mikrobiologiczne zachodzące podczas produkcji wyrobów mięsnych, wynikające m.in. ze sposobu przygotowania, obróbki wstępnej, właściwej oraz przechowywania sprawiają, że mięso i jego przetwory wymagają specjalnego postępowania. Najważniejszymi cechami surowca mięsnego, na które zwraca się szczególną uwagę podczas badań aplikacyjnych są: stabilność oksydacyjna tłuszczów i białek, barwa, zapach, tekstura gotowego wyrobu oraz stan higieniczny [Guzek i in., 2012]. To one zwykle są wyznacznikiem trwałości mięsa i produktów mięsnych oraz ich atrakcyjności konsumenckiej.

Niniejsze opracowanie ma na celu przegląd najważniejszych metod nieniszczących, stosowanych w przemyśle mięsnym do monitorowania *on-line* i *at-line* przebiegu procesów technologicznych oraz tych których potencjał jest jeszcze niewykorzystany.

Metody badań nieniszczących

Wśród nieinwazyjnych technik, które mają zastosowanie w produkcji wyrobów mięsnych wyróżnić można badania: wizyjne, drganiowe, akustyczne, wykorzystujące promieniowanie elektromagnetyczne i inne. Często stosowane są połączenia hybrydowe wymienionych metod, w celu zwiększenia dokładności i poszerzenia spektrum działania oraz dla innych potrzeb, które mogą się pojawić podczas produkcji [Reh, 2007].

Metody wizyjne polegają na pomiarze i wstępnej analizie i/lub obróbce obrazu uzyskanego poprzez zastosowanie systemów wizyjnych. Nazywane są komputerową analizą obrazu (ang. *computer image analysis* – CIA) [Guzek i in., 2012].

W metodach akustycznych, stosowane są dźwięki o różnych częstotliwościach, głównie ultradźwięki. W analizie ultradźwiękowej wykorzystywane jest zjawisko zarówno odbicia jak i przenikania fali na granicy dwu ośrodków. W badaniach nieniszczących żywności zastosowanie mają ultradźwięki o niskiej intensywności (niskim natężeniu), które są nazywane biernymi [Nowak i in., 2015].

Wśród metod wykorzystujących promieniowanie elektromagnetyczne wyróżnić można między innymi spektroskopię impedancyjną, spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ang. *electron paramagnetic resonance* – EPR), obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging* – MRI), obrazowanie wielowidmowe (multi-, super- i hiperspektralne), spektroskopię rentgenowską (*soft X-ray imaging*), spektrometrię Ramana, czy obrazowanie w samej podczerwieni lub ultrafiolecie [Reh, 2007; Chen i in., 2013].

Obrazowanie hiperspektralne (ang. *hyperspectral imaging* – HSI) polega na rejestracji obrazu w pełnym zakresie długości fal świetlnych: w zakresie światła widzialnego (VIS), w dalekiej (FIR), średniej (MIR) i bliskiej (NIR) podczerwieni (IR) oraz ultrafioletu (UV). Integruje w sobie obrazowanie konwencjonalne i spektroskopię, dla osiągnięcia przestrzennej i spektralnej informacji z obiektu. Uzyskane obrazy, nazywane hipersześcianami, składają się z setek przylegających do siebie pasm dla każdego położenia przestrzennego badanego celu. Widmo każdego piksela może być wykorzystywane do określenia składu tej określonej pozycji [Chen i in., 2013; Xiong i in., 2015b]. Techniki wykorzystujące promieniowanie podczerwone są często nazywane obrazowaniem termicznym (ang. *thermal imaging*), gdzie pomiar promieniowania IR emitowanego przez materiał pozwala na uzyskanie jego rozkładu temperatur.

Spektroskopia ramanowska w przeciwieństwie do obrazowania podczerwonego nie bazuje na absorpcji fal świetlnych, lecz na niesprężystym rozpraszaniu fotonów [Schmidt i in., 2013; Barańska i Baran, 2014]. Zaletą tej metody również w opozycji do technik IR jest możliwość wykorzystania dla próbek z dużą zawartością wody. Spektroskopia Ramana i podczerwieni są technikami komplementarnymi [Berhe i in., 2015].

W obrazowaniu MRI wykorzystywany jest pomiar właściwości magnetycznych spinów, które wykazują powiązanie z cechami fizycznymi i chemicznymi badanych elementów. W żywności wykorzystywany jest fakt, że liczne tkanki posiadają duże ilości wody, której cząsteczki (protony – jądra atomu wodoru, nazywane jądrami rezonansowymi) zostają wyrównane w silnym polu magnetycznym (średni moment magnetyczny części protonów zostaje wyrównany zgodnie z kierunkiem pola), a następnie poddane działaniu innego pola magnetycznego w płaszczyźnie prostopadłej do pola głównego. Pojawia się zjawisko rezonansu. Na podstawie informacji przestrzennej i mapy pola, w której znajduje się próbka wykonywane jest odkodowanie (rekonstrukcja) obrazu [Chen i in., 2013].

Pośród metod badań nieniszczących można wyróżnić także metody wyżej niesklasyfikowane, jak na przykład obrazowanie zapachów (ang. *odor imaging* – OI), które jest jedną z najnowszych technik. OI oparte jest na matrycy czujników kolorymetrycznych. Polega na wykrywaniu zmiany barwy, która została wywołana przez reakcję między substancjami lotnymi a barwnikami chemoczułymi [Chen i in., 2013]. Podobną metodą, ale działającą na innej zasadzie jest sztuczny nos (elektroniczny nos), w którym wykorzystywane są między innymi detektory opto- i akustoelektroniczne. Innymi z najnowszych metod nieniszczących badań w żywności są: wykorzystanie biochipów [Manzano i in., 2015], czy przeciwciał monoklonalnych [Muroya i in., 2009].

Metody stosowane w przemyśle mięsnym

Najczęściej opisywaną w literaturze metodą badań nieniszczących wykorzystywaną w analizie produktów mięsnych jest obrazowanie wielowidmowe lub spektroskopia podczerwieni. W literaturze opisywane są dziesiątki modyfikacji metod widmowych (Tab. 1), które pozwalają na szerokie spektrum zastosowań: od wykrywania różnic pomiędzy próbkami [Xiong i in., 2015b], przez analizę składu mieszanki [Zajac i in., 2014; Ropodi i in., 2015], po ocenę cech fizykochemicznych wyrobu [Prieto i in., 2014; Rahmania i in., 2015]. Nieodłączną częścią analiz widmowych są techniki CIA. Posiadają one ogromny potencjał w zastosowaniach aplikacyjnych dla przemysłu, ze względu na stosunkowo proste wdrożenie ich do produkcji i z roku na rok zmniejszające się koszty sprzętu wizyjnego oraz aparatury komputerowej. Za ich pomocą można dokonać pomiaru licznych cech między innymi: barwy mięsa, marmurkowatości, wodochłonności, grubości okrywy tłuszczowej, pH, zmiany zawartości soli, a także można je wykorzystać do klasyfikacji i szacowania składu tusz [Guzek i in., 2011, 2012].

Tab. 2. Metody widmowe stosowane w badaniach nieniszczących wyrobów mięsnych

Materiał	Metoda	Zastosowanie	Źródło
Surowa wieprzowina i wołowina	Obrazowanie multispektralne (18 zakresów: 405-970nm)	Badanie zafałszowania	[Ropodi i in., 2015]
Świeże mięso drobiowe z wolnego wybiegu i brojlerów	Obrazowanie HSI (381 zakresów: 400-1000nm)	Badanie różnic: wyodrębniono optymalne zakresy fal świetlnych, określono 30 różnicujących cech tekstury	[Xiong i in., 2015b]
Wołowina	Spektroskopia NIR	Szacowanie składu chemicznego, cech jakościowych i kwasów tłuszczowych mięsa bydła skarmianego nasionami słonecznika i siemieniem lnianym	[Prieto i in., 2014]
Polędwice wieprzowe	Spektroskopia UV-Vis	Monitoring ATP i żywych komórek na powierzchni mięsa	[Oshita i in., 2011]
Mięso owcze	Spektroskopia Ramana	Możliwa predykcja kruchości mięsa i strat podczas gotowania	[Schmidt i in., 2013]
Wieprzowina (<i>longissimus thoracis</i>)	Spektroskopia Ramana i fluorescencyjna, chemometria	Ocena końcowej temperatury obróbki cieplnej – obarczona bardzo niskim błędem $\leq 1,77^{\circ}\text{C}$; poprawna klasyfikacja dla więcej niż 97% prób	[Berhe i in., 2015]
Konina w mieszaninach z mięsem wołowym	Spektroskopia IR i Ramana	Miarodajne wyniki oceny zawartości koniny w mieszaninach	[Zając i in., 2014]
Mięso wieprzowe (<i>longissimus dorsi</i>)	HIR (501 zakresów: 400-100nm; 256 zakresów: 1000-2500nm)	Predykcja zawartości wilgoci w czasie peklowania; analiza cech tekstury	[Liu i in., 2013, 2014]

Duże możliwości kryją się również w wykorzystaniu ultradźwięków o niskim natężeniu (Tab. 2). Jest to metoda skuteczna, ale nieco bardziej skomplikowana. Ultradźwięki wykorzystywane są głównie do pomiarów tekstury [Nowak i in., 2015], ale mogą być zastosowane także do oceny zawartości tłuszczu, soli [de Prados i in., 2015a; de Prados i in., 2015b] oraz ogólnej charakterystyki wyrobu [Corona i in., 2013].

Tab. 3. Inne metody stosowane w badaniach nieniszczących wyrobów mięsnych

Materiał	Metoda	Zastosowanie	Źródło
Szynka konserwowa i kielbasa podwawelska (mięso wieprzowe)	Technika ultradźwiękowa (TT – <i>through-transmission</i>)	Pomiary tekstury: określono korelację pomiędzy pomiarami ultradźwiękowymi, a wyznaczeniem modułu Younga i liczby Poissona	[Nowak i in., 2015]
Połędwice wieprzowe	Spektroskopia impedancyjna	Kluczowe markery biochemiczne jakości mięsa	[Castro-Giráldez i in., 2011]
Wołowina	TD-NMR	Rozróżnianie próbek	[Santos i in., 2014]
Drób	OLED-based DNA biochip	Detekcja zanieczyszczeń <i>Campylobacter</i>	[Manzano i in., 2015]
Wołowina	Przeciwciała monoklonalne	Detekcja peptydów	[Muroya i in., 2009]
Emulsja mięsna	Mikrotomografia rentgenowska	Analiza mikrostruktury emulsji surowej i poddanej obróbce cieplnej	[Einarsdóttir i in., 2013]

Techniki MRI, czy *soft X-ray imaging*, ze względu na kosztowność aparatury i skomplikowane analizy, są rzadziej wykorzystywane, natomiast coraz większą rolę w badaniach aplikacyjnych odgrywają metody kombinowane, które łączą w sobie różnorodne cechy pojedynczych technik.

Przetwarzanie i analiza wyników

Połączenie wykonanych pomiarów z zaawansowanymi metodami zbierania, przetwarzania i analizy danych, daje pełniejszy wymiar nieinwazyjnych badań. Podczas przetwarzania danych są one odpowiednio przygotowywane do analizy. Usuwane są zakłócenia (tzw. szumy), wyodrębniane obszary zainteresowania (ROI - ang. *region of interest*), a dane zostają poddane konsolidacji i transformacji.

Wśród sposobów analiz wyróżnić można trzy grupy: metody bazodanowe, metody statystyczne i metody eksploracyjne danych.

Systemy bazodanowe opierają się na przechowywaniu i zarządzaniu bazą wszelkich danych zebranych podczas całości lub fragmentu przeprowadzonych badań, np. SQL, DB2, Firebird, OLAP. Najczęściej stosowane metody statystyczne w badaniach żywności to: ANOVA, analiza kowariancji, testy nieparametryczne.

Metody eksploracyjne (ang. *data mining*) pozwalają na zautomatyzowane odkrywanie nietrywialnych, dotąd niepoznanych, a mogących mieć potencjalne zastosowanie zależności, reguł, wzorców, schematów, czy trendów.

Przewidywanie i wizualizacja cech produktu

Samo wykonanie pomiarów i analiza wyników nadal nie oddaje w pełni potencjału wykorzystania badań nieniszczących. Ich zastosowanie w produkcji żywności daje jeszcze inne możliwości. Jedną z nich jest przewidywanie (predykcja), a drugą wizualizacja cech produktu. Są one rozwinięciem metod przetwarzania i analizy danych. Duże znaczenie mają tutaj zaawansowane metody obliczeniowe wspomagane komputerowo. Są to technologie wywodzące się z badań nad sztuczną inteligencją, takie jak: sieci neuronowe, zbiory rozmyte [Kodogiannis i Alshejari, 2014], metody ewolucyjne, czy samo-uczenia [Xiong i in., 2015a].

Na podstawie otrzymanych danych z pomiarów i przy wykorzystaniu wymienionych wcześniej metod przetwarzania i analizy danych, można z określoną dozą prawdopodobieństwa prognozować przebieg procesu i właściwości produktu. Uzyskiwane na takiej podstawie informacje dają dużą przewagę technologiczną nad konkurencją i pozwalają z pewnym wyprzedzeniem reagować na potencjalne zagrożenia. Zamiast poszukiwać przyczyn niezgodności na podstawie analizy skutków (np. wad wyrobu), efekty (skutki) można przewidzieć na podstawie wychwyconych wcześniej drobnych zmian np. parametrów procesu. Bardzo często informacje takie stanowią podstawę skutecznego działania zaawansowanych systemów sterowania automatycznego i sztucznej inteligencji.

Podsumowanie

Zjawiska zachodzące w sferze przemysłu spożywczego obserwowane ostatnimi czasy są bardzo złożone. Na nierozwiązane problemy natury technologicznej i organizacyjnej nakładają się trudne do przewidzenia oddziaływania z polityki. Dlatego przedsiębiorstwa spożywcze muszą szybko, skutecznie i efektywnie reagować na zmiany i zagrożenia ich konkurencyjności, a wychodzenie naprzeciw potrzebom konsumentów uznać za wyznacznik pozycji na rynku. Szybkie, pewne i o wielkim potencjale aplikacyjnym metody badań nieniszczących są niezwykle ważnym czynnikiem mogącym być źródłem przewagi nad konkurencją. Uważa się, że przyszłość nauki związana jest z metodami badań niedestrukcyjnych. Wyznaczają one całkiem nowy kierunek i stwarzają zupełnie nowe możliwości. Czynniki, które determinują pełne wykorzystanie potencjału badań nieniszczących, są nadal duże początkowe nakłady finansowe na wdrożenie technologii oraz konieczność posiadania wykwalifikowanej kadry, czy korzystania z wsparcia technicznego firm zewnętrznych. Należy oczekiwać, że wraz z dynamicznym rozwojem technologii czujnikowych i informatycznych wyżej wymienione problemy zostaną pokonane. Przemawia za tym szybko rosnąca liczba publikacji naukowych o charakterze aplikacyjnym będąca skutkiem polityki służącej rozwojowi sfery B+R w każdym wymiarze.

Literatura

- [1] Barańska M., Baran A.: Spektroskopia ramanowska w badaniach białek – porównanie technik. W: *Proteomika i metabolomika*. Red. A. Kraj, A. Drabik, J. Silberring. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, 2014, 105–124.
- [2] Berhe D. T., Lawaetz A. J., Engelsen S. B., Hviid M. S., Lametsch R.: Accurate determination of endpoint temperature of cooked meat after storage by Raman spectroscopy and chemometrics. *Food Control*, 2015, 52, 119–125.
- [3] Castro-Giráldez M., Dols L., Toldrá F., Fito P.: Development of a dielectric spectroscopy technique for the determination of key biochemical markers of meat quality. *Food Chemistry*, 2011, 127(1), 228–233.
- [4] Chen Q., Zhang C., Zhao J., Ouyang Q.: Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 52, 261–274.
- [5] Corona E., Garcia-Perez J. V., Gomez Alvarez-Arenas T. E., Watson N., Povey M. J. W., Benedito J.: Advances in the ultrasound characterization of dry-cured meat products. *Journal of Food Engineering*, 2013, 119(3), 464–470.
- [6] De Prados M., Fulladosa E., Gou P., Muñoz I., Garcia-Perez J. V., Benedito J.: Non-destructive determination of fat content in green hams using ultrasound and X-rays. *Meat Science*, 2015a, 104, 37–43.
- [7] De Prados M., García-Pérez J. V., Benedito J.: Non-destructive salt content prediction in brined pork meat using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 2015b, 154, 39–48.
- [8] Einarsdóttir H., Nielsen M. S., Miklos R., Lametsch R., Feidenhans'l R., Larsen R., Ersbøll B. K.: Analysis of micro-structure in raw and heat treated meat emulsions from multimodal X-ray microtomography. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2013, 24, 88–96.
- [9] EPRS: Sposoby na zrównoważone przetwarzanie żywności. Rozwiązania technologiczne służące zapewnieniu wyżywienia dla 10 miliardów osób. Parlament Europejski, 2013.
- [10] Guzek D., Głabska D., Wierzbička A.: Niestrukcyjna ocena jakości mięsa i jego przetworów przy zastosowaniu komputerowej analizy obrazu. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2012, 2, 118–122.
- [11] Guzek D., Wierzbička A., Głabska D.: Potencjał oraz zastosowanie komputerowej analizy i przetwarzania obrazu w przemyśle rolno-spożywczym. *Inżynieria Rolnicza*, 2011, 4(129), 67–73.
- [12] Kodogiannis V. S., Alshejari A.: An adaptive neuro-fuzzy identification model for the detection of meat spoilage. *Applied Soft Computing Journal*, 2014, 23, 483–497.

- [13] Komisja Europejska: Zrozumieć politykę Unii Europejskiej – Badania naukowe i innowacje. Urząd Publikacji Unii Europejskiej, Luksemburg 2014.
- [14] Liu D., Qu J., Sun D. W., Pu H., Zeng X. A.: Non-destructive prediction of salt contents and water activity of porcine meat slices by hyperspectral imaging in a salting process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2013, 20, 316–323.
- [15] Liu D., Sun D. W., Qu J., Zeng X. A., Pu H., Ma J.: Feasibility of using hyperspectral imaging to predict moisture content of porcine meat during salting process. *Food Chemistry*, 2014, 152, 197–204.
- [16] Manzano M., Cecchini F., Fontanot M., Iacumin L., Comi G., Melpignano P.: OLED-based DNA biochip for *Campylobacter* spp. detection in poultry meat samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 66, 271–276.
- [17] Muroya S., Oe M., Nakajima I., Shibata M., Chikuni K.: A non-destructive method to monitor changes in a troponin T peptide in beef drip with a monoclonal antibody. *Meat Science*, 2009, 83(1), 155–160.
- [18] Nowak K. W., Markowski M., Daszkiewicz T.: Ultrasonic determination of mechanical properties of meat products. *Journal of Food Engineering*, 2015, 147, 49–55.
- [19] Oshita S., Al-Haq M. I., Kawagishi S., Makino Y., Kawagoe Y., Ye X., Shinozaki S., Hiruma N.: Monitoring of ATP and viable cells on meat surface by UV-Vis reflectance spectrum analysis. *Journal of Food Engineering*, 2011, 107(2), 262–267.
- [20] Prieto N., López-Campos Ó., Aalhus J. L., Dugan M. E. R., Juárez M., Uttaro B.: Use of near infrared spectroscopy for estimating meat chemical composition, quality traits and fatty acid content from cattle fed sunflower or flaxseed. *Meat Science*, 2014, 98(2), 279–288.
- [21] Rahmanian H., Sudjadi, Rohman A.: The employment of FTIR spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of rat meat in meatball formulation. *Meat Science*, 2015, 100, 301–305.
- [22] Reh C.: An Overview of non-destructive sensor technology in practice. W: *Non-destructive testing of food quality*. Red. J. Irudayaraj, C. Reh. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2007, 1-31.
- [23] Ropodi a. I., Pavlidis D. E., Mohareb F., Panagou E. Z., Nychas G.-J. E.: Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. *Food Research International*, 2015, 67, 12–18.
- [24] Santos P. M., Corrêa C. C., Forato L. a., Tullio R. R., Cruz G. M., Colnago L. a.: A fast and non-destructive method to discriminate beef samples using TD-NMR. *Food Control*, 2014, 38(1), 204–208.
- [25] Schmidt H., Scheier R., Hopkins D. L.: Preliminary investigation on the relationship of Raman spectra of sheep meat with shear force and cooking loss. *Meat Science*, 2013, 93(1), 138–143.

- [26] Xiong Z., Sun D.-W., Pu H., Xie A., Han Z., Luo M.: Non-destructive prediction of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) value for freshness evaluation of chicken meat using hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 2015a, 179, 175–181.
- [27] Xiong Z., Sun D.-W., Pu H., Zhu Z., Luo M.: Combination of spectra and texture data of hyperspectral imaging for differentiating between free-range and broiler chicken meats. *LWT – Food Science and Technology*, 2015b, 60(2), 649–655.
- [28] Zając A., Hanuza J., Dymińska L.: Raman spectroscopy in determination of horse meat content in the mixture with other meats. *Food Chemistry*, 2014, 156, 333–338.

**ZASTOSOWANIE PREPARATÓW HANDLOWYCH
TRANSGLUTAMINAZY POCHODZENIA
MIKROBIOLOGICZNEGO DO WYTWORZENIA
MROŻONYCH FORMOWANYCH WYROBÓW
Z ROZDROBNIONEGO MIĘSA RYB**

JOANNA MARKOWSKA, ELŻBIETA POLAK, IWONA KASPRZYK

Streszczenie

Niskie spożycie ryb wśród społeczeństwa wskazuje, na zasadne opracowanie nowych, atrakcyjnych, skierowanych do różnych grup społecznych produktów przyczyniających się do zwiększenia spożycia tego rodzaju asortymentu. W tym celu wykorzystuje się dodatki funkcjonalne, do których niewątpliwie należy transglutaminaza (TG) (EC 2.3.2.13). Mikrobiologiczną TG stosuje się przy produkcji surimi, szynek rybnych z rozdrobnionego mięsa mintaja, do otrzymywania analogów płetw rekina z żelatyny, kolagenu lub mieszaniny tych białek.

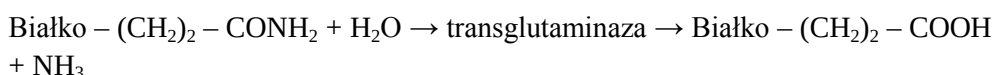
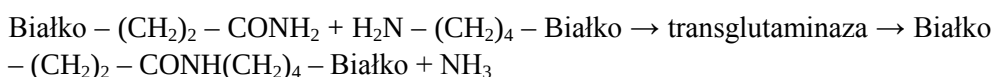
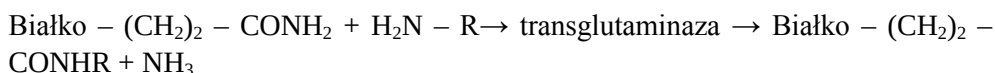
Badania prowadzono z udziałem 4 rodzajów preparatów transglutaminazy w ilości 0,1; 0,2; 0,5 i 1%. Zauważalne zmiany w strukturze wyrobów stwierdzono przy zastosowaniu 0,5% i 1% udziału preparatów enzymatycznych w produkcji. Lepsze związanie wody obserwowano w produktach rybnych z udziałem 0,5% i 1% dodatku preparatów Activa GS oraz Saprone TGF. Preparaty enzymatyczne nie różnicowały smaku i zapachu wyrobów bezpośrednio po przygotowaniu, jak i po zamrażalniczym ich przechowywaniu. Analiza teksturometryczna potwierdziła wysoką jakość produktów rybnych przechowywanych zamrażalniczo, przygotowanych przy zastosowaniu preparatów Activa GS oraz Saprone TGF w ilości 1% i 0,5%.

Wzbogacenie wyrobów z TG 0,5% preparatem multimineralnym, zawierającym 33% Ca^{2+} , korzystnie wpłynęło na jakość teksturometryczną prób przechowywanych w stanie zamrożenia. Obecność jonów wapnia w preparacie z alg dała możliwość obniżenia o połowę ilości dodawanej TG, przy osiągnięciu tej samej jakości produktu powstałego przy zastosowaniu 1% enzymu. Jony wapnia wpłynęły korzystnie na barwę, dając efekt rozjaśnienia formowanych wyrobów rybnych.

Słowa kluczowe: mrożone wyroby rybne, transglutaminaza, ryby dorszowate

Wprowadzenie

Enzymy są uznawane za bezpieczne dodatki do żywności. Do enzymów, oznaczonych statusem GRAS, czyli uznanych powszechnie przez środowiska ekspertów za bezpieczne dla zdrowia człowieka należy m.in. transglutaminaza (TG) (γ -glutamyl-transferaza, EC 2.3.2.13) [Kołakowski i Sikorski, 2001; Mariniello i in., 2008; Schäfer i in., 2011]. Uczestniczy ona w wielu procesach fizjologicznych roślin i zwierząt. Katalizuje ona reakcje przeniesienia acylu, w których donorem jest grupa γ -karboksamidowa reszty glutaminy, a akceptorami mogą być pierwszorzędowe grupy aminowe w różnych związkach:



Transglutaminazę zidentyfikowano w płynach ustrojowych wielu kręgowców, bezkręgowców, roślin i drobnoustrojów. Stężenie białka w substracie jest jednym z głównych czynników żelowania pod wpływem TG. Przy niskich stężeniach białka, enzym powoduje zwiększenie lepkości roztworu, ale nie wywołuje żelowania. Optimum jej działania mieści się w zakresie od pH 7,5 do pH 8,5 i zależy w znacznym stopniu od rodzaju substratu. TG może być wykorzystywana w szerokim zakresie temperatur. Działa już w stosunkowo niskiej temperaturze +5°C. Maksymalną aktywność osiąga przy ok. 50°C. Mrożenie prawie całkowicie inaktywuje enzym [Kołakowski i in., 2005].

Transglutaminazy pochodzenia mikrobiologicznego, na ogół niezależne od jonów wapnia. TG zwierzęce są ściśle zależne od stężenia tych jonów. Ich aktywująca rola polega na nieznacznej zmianie konformacji cząsteczki enzymu, bez sieciowania jej łańcuchów. Po związaniu jonów wapnia cząsteczka enzymu ulega częściowej dekonformacji, zwiększa swoją długość. Do czynników aktywujących enzym należą również chlorki: sodu i potasu.

Do czynników hamujących działanie TG, zależnego od jonów wapnia, należą zawiązki wiążące jony wapnia, a także chlorek amonu i chlorek metyloaminy. Aktywność mikrobiologicznej TG silnie hamowana jest przez jony cynku. Na jej aktywność nie wpływają jony: baru, wapnia, kobaltu, miedzi, żelaza (II i III), magnezu i manganu [Kołakowski i Sikorski, 2001; Kołakowski i in., 2005].

Mikrobiologiczna transglutaminaza działa w wyniku modyfikacji właściwości funkcjonalnych białek żywności poprzez przyłączanie amin, tworzenie wiązań krzyżowych i deamidację. Powinowactwo TG do różnych typów białek zależy od rozmieszczenia reszt glutaminy.

Najszerze zastosowanie w przemyśle znalazła transglutaminaza mikrobiologiczna (MTG), otrzymywana głównie ze szczepów *Streptoverticillium* sp. [Kieliszek i Misiewicz, 2014]. Jej stężenie jest jednym z podstawowych czynników wywierających wpływ na efekt działania enzymu.

Zastosowanie transglutaminazy w przemyśle spożywczym rozwiązuje wiele problemów technologicznych. Wykorzystuje się ją do sieciowania białek sojowych, kazeiny i innych białek mleka, glutenu, białek mięsa ryb, wołowiny i innych białek produktów żywnościowych [Kołakowski i in., 2005; Mariniello i in., 2008]. Znajduje także zastosowanie przy produkcji pieczywa. Badania prowadzone w IBPRS Zakład Technologii i Techniki Chłodnictwa w Łodzi wskazały, że dodatek TG poprawia właściwości ciasta pszennego i jakość chleba [Kasprzyk i in., 2013]. Potwierdziły również jej korzystny wpływ na właściwości reologiczne ciasta pierogowego, a także wyrobów kulinarnych poddanych zamrażalnictwu przechowywaniu [Choy i in., 2010]. TG może restabilizować zniszczoną sieć glutenową powstałą podczas procesów technologicznych, np. zamrażania i zamrażalniczego przechowywania [Kołakowski i Sikorski, 2001; Huang i in., 2008; Wang i in., 2011].

Dodatek enzymu wpływa również korzystnie na objętość, teksturę i wewnętrzną strukturę makaronu, herbatników, wafli, ciastek i ciast [Bosman i in., 2006; GB2474838(A)]. Transglutaminaza znajduje także zastosowanie w przemyśle mleczarskim do produkcji jogurtów [Lauber i in., 2000; Bönish, 2007; Gauche i in., 2009]. Żele uzyskiwane z dodatkiem transglutaminazy odznaczają się większą sprężystością i wytrzymałością. Dzięki zastosowaniu enzymu udało się otrzymać analog płetwy rekina, co pozwala ograniczyć odławianie zagrożonych gatunków. Enzym ten stosuje się do produkcji zamienników tłuszczu, wytwarzanych z enzymatycznie modyfikowanej żelatyny, kazeiny, białek serwatkowych i białek ryb. Preparaty handlowe TG są wykorzystywane, jako naturalny „klej” do produkcji wyrobów restrukturyzowanych. Poprawę właściwości mechanicznych i funkcjonalnych zrestrukturyzowanych produktów rybnych zaobserwowano stosując m.in. jony wapnia, białka mleka, białka sojowe, fosforany, skrobię i hydrokoloidy [Uresti i in., 2004; Ramírez i in., 2007; Cardoso i in., 2007; Min i Green, 2008; Gonçalves i Passos, 2010].

Celem podejmowanych badań było sprawdzenie przydatności handlowych preparatów transglutaminazy do wytwarzania formowanych wyrobów rybnych z mięsa ryb dorszowatych. Ponadto ocenie poddano możliwości zastosowania preparatu multimineralnego z alg czerwonych (*Lithothamnion species*), jako źródło jonów wapnia, wzmagającego aktywność enzymu.

Materiał i metody badań

W badaniach wykorzystano preparaty enzymatyczne, dostępne w obrocie handlowym, zawierające w swoim składzie transglutaminazę (TG):

- Saprona TGF, (P.M.T. Trading Sp. z o.o.), deklarowana aktywność enzymu 50-70 U/g
- Saprona TG2 (P.M.T. Trading Sp. z o.o.) deklarowana aktywność enzymu 50-70 U/g
- Saprona TG (P.M.T. Trading Sp. z o.o.) deklarowana aktywność enzymu 50-70 U/g
- ACTIVA GS (AJINOMOTO) deklarowana aktywność enzymu 47-82 U/g
(U - jednostka aktywności TGazy – ilość enzymu, która katalizuje powstanie 1 μM hydroksamianu z hydroksylaminy i N-α-CBZ-Gln-Gly w ciągu 1 minuty w temp. 37°C przy pH 6,0).

Wyroby formowane przygotowano w warunkach laboratoryjnych z zamrożonego mięsa mielonego z ryb dorszowatych, pozyskanego od jednego z producentów wyrobów rybnych. Mięso podzielono na dwie części i do jednej wprowadzono preparaty enzymatyczne w ilości 0,1; 0,2; 0,5 i 1,0 %. Druga część, mięso ryb bez dodatku enzymu, stanowiła próbę kontrolną. W przygotowaniu prób, zastosowano 1% dodatek soli kuchennej. Tak przygotowane mięso wprowadzono do osłonek barierowych Multiba (Oskuda GmbH r), poliamidowo (70%) - polietylenowych (30%), o grubości 45-55 mikronów, wykorzystywanych do produkcji kiełbas.

Batony umieszczono w temperaturze 0 – +4 °C na 24 godziny. Po porcjowaniu (plastry grubości ok. 3 cm i wysokości 5,5 cm) zamrażano i przechowywano w temperaturze od – 18°C do – 22°C przez 6 miesięcy.

W próbach, po okresie 24-godzinnej chłodniczego przechowywania, określono:

- pH, za pomocą pehametru Beckman, zgodnie z metodyką badań zalecaną przez producenta urządzenia
- aktywność wody, za pomocą aparatu AquaLab Seria 4 model TEV (zgodnie z metodyką badań zalecaną przez producenta urządzenia pomiar w temp. 25°C).

W wyrobach, po 6 miesięcznym okresie przechowania, po 2 godzinnym rozmrożeniu w temp. otoczenia (+20°C), metodą wagową, określono ilość wycieku, DL (Campañone i in., 2002):

$$DL = [(W_0 - W_F)/W_0] \times 100 (\%)$$

W_0 - waga początkowa próbki [g]

W_F - waga końcowa próbki [g]

Zadowalające wyniki badań z udziałem 0,5% dawki enzymu oraz ze względu na koszt preparatu spowodowały, że badania kontynuowano wzbogacając dodatkowo próby z TG w handlowy preparat multimineralny firmy Goldmann-HSH Sp. z o.o. Całkowita zawartość w nim wapnia wynosi 33%, co stanowi 250mg/100g (30% RDI). Preparat, w postaci białego proszku, bez smaku i zapachu, zawierał ponadto

72 pierwiastki śladowe w tym: fosfor, siarka, żelazo, bor, fluor, sód, kobalt, miedź, cynk, selen, molibden, jod, mangan i nikiel.

W próbach z udziałem preparatów enzymatycznych, jak również wzbogaconych dodatkowo preparatem mineralnym, po półrocznym okresie zamrażalniczego przechowania, przeprowadzono ocenę organoleptyczną parametrów jakościowych i teksturometrycznych wyrobów, której dokonał 5 osobowy zespół, wyspecjalizowany w ocenie produktów zamrażalniczo przechowywanych.

Ocena jakościowa zamrożonego produktu obejmowała ocenę zewnętrznych cech, takich jak: wygląd, barwa, zapach, tekstura wyrobu.

Próby, po 24 –godzinnym rozmrożeniu w temp. 0 - 4°C, smażyono na patelni bez tłuszczu przez 3 minuty z każdej strony. Następnie przeprowadzono ocenę wyglądu ogólnego i smaku wyrobów.

Próby oceniono w skali od 0 (zła) do 5 pkt. (bardzo dobra - wysoko pożądana). W publikacji przedstawiono uśrednione wyniki w/w wskaźników.

Próby przygotowane z udziałem po 6 miesięcznym okresie składowania poddano także analizie teksturometrycznej. Instrumentalna analiza profilu tekstury - test TPA (Texture Profile Analise) wyrobów rybnych przeprowadzona została metodą dwukrotnego ściskania, za pomocą analizatora tekstury typu CT3 TA firmy Brookfield. Analizę przeprowadzono przy obciążeniu 1N, z prędkością 1mm/s. Sterowanie pomiarami i obróbka danych, przeprowadzone zostały przy udziale programu komputerowego TexturePro CT V 1.2 Build 9.

Próby - plastry o grubości ok. 3 cm i wysokości 5,5 cm, bez osłonek poddano rozmrożeniu przez okres 12 godzin w temp. 0 - 4°C (temperatura produktu nie przekraczała +2°C), a następnie poddano osiowemu ściskaniu w dwóch cyklach przy 50% ich deformacji. Instrumentalną analizę profilu tekstury prób, test TPA, prowadzono w kierunku określenia ich:

- twardości 1 cyklu [N] (maksymalnej siły potrzebnej podczas ściśnięcia kostki do 50% jej wysokości w czasie I cyklu) - T_1 ,
- indeksu sprężystości (współczynnika odzwierciedlającego zdolności odzyskiwania kształtu przez próbkę) - I_s ,
- kleistości (adhezyjności) [mJ] (pracy wykonanej podczas oderwania sondy od próbki) – K ,
- żujności [mJ] (odzwierciedlającej energię wymaganą podczas żucia do uzyskania takiego rozdrobnienia, aby produkt stały nadawał się do połknięcia; stanowi iloczyn twardości, spójności i sprężystości, co przekłada się na energię potrzebną do ściśnięcia próbki) – $\dot{Z}$,
- sprężystości powrotnej (względnej sprężystości próbki) - S_p ,
- deformacji w punkcie twardości [%] (odległości na jaką zostanie ściśnięta próbka w punkcie twardości) - $D T_1$,
- siły adhezji [N] (maksymalnej siły potrzebnej do oderwania sondy od próbki) – A ,

- gumowatości [N] (energii potrzebnej do zniszczenia próbki – przewyciężenia iloczynu sił twardości i zwartości próbki) - G.

Uzyskane wyniki poddano obliczeniom statystycznym. Zastosowano analizę wariancji (ANOVA) na poziomie istotności $p < 0,05$. W przypadku występowania różnic wykonano test wielokrotnych porównań Tukeya. Badania wykonano w trzech seriach doświadczalnych, a wyróżniki tekstury w 5 powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Aby produkty spożywcze były akceptowalne przez konsumenta muszą zachowywać odpowiednie cechy sensoryczne. Sensoryczna akceptowalność żywności jest niezwykle istotna, ponieważ człowiek odczuwa zadowolenie z jedzenia produktów, które lubi. Zatem tekstura jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o jakości produktów spożywczych, szczególnie z punktu widzenia konsumenta. Jakość produktów rybnych dostępnych w obrocie handlowym jest niezadowolająca. Zdecydowana ich większość jest wytwarzana z udziałem niewielkiej ilości mięsa, nie zawsze najlepszej jakości. Wyroby rybne formowane zawierają bardzo wiele dodatków teksturotwórczych (wypełniających), smakowo-zapachowych i konserwujących. Ponadto, jakość mrożonych przetworów formowanych, nawet przy właściwych warunkach przechowywania, ulega zmianie podczas składowania zamrażalniczego, zwłaszcza gdy mięso do ich produkcji pochodziło z mrożonych ryb.

Próby przygotowane z mięsa ryb dorszowatych z dodatkiem enzymu w niższych dawkach nie dawały widocznych różnic w wyglądzie i strukturze, w porównaniu do wyrobów bez udziału preparatów enzymatycznych. Wyższe dawki enzymu spowodowały, że po obróbce termicznej wyroby były zwarte, jędrne, o pożądanym walorach smakowych i zapachowych. Przyjęte czynniki zmienności technologicznej powodowały jedynie nieznaczne zmiany w ocenie cząstkowych wyróżników jakości sensorycznej, tj. smaku, zapachu, barwy na przekroju oraz kruchości.

Niezależnie od rodzaju prób, tj. rodzaju preparatu czy jego dawki, wartości pH wynosiły od 6,74 do 6,94, w zakresie parametru optymalnego do działania enzymu (tabela 1). Uzyskane różnice w wartościach kwasowości prób nie zostały potwierdzone w ocenie organoleptycznej wyrobów. Nie stwierdzono różnic w smaku wyrobów.

Aktywność wody w próbie kontrolnej, bez udziału enzymu, określono na poziomie 0,9885. Dodatek preparatu enzymatycznego do mięsa spowodował obniżenie wartości parametru ($p < 0,05$) (Tab. 1). Badania innych autorów wskazały, iż obecność enzymu i soli w próbce korzystnie wpłynęła na „zatrzymanie” wody w produkcie [Ramírez i in., 2002, 2002a; Tellez- Luis i in., 2002, Vácha i in. 2006].

Tab.1. Kwasowość i aktywność wody wyrobów rybnych formowanych z mięsa ryb dorszowatych z dodatkiem transglutaminazy.

Próba	Parametr	
	pH	a _w
próba kontrolna	6,85 ^a ± 0,01	0,9885 ^a ± 0,0005
Saprona TGF 0,5%	6,77 ^c ± 0,01	0,9860 ^d ± 0,0008
Saprona TGF 1%	6,74 ^{cd} ± 0,01	0,9859 ^d ± 0,0007
Saprona TG2 0,5%	6,90 ^b ± 0,02	0,9809 ^b ± 0,0002
Saprona TG2 1%	6,89 ^b ± 0,01	0,9818 ^{bc} ± 0,0002
Saprona TG 0,5%	6,92b ^e ± 0,01	0,9871 ^{ed} ± 0,0003
Saprona TG 1%	6,94 ^e ± 0,02	0,9878 ^a ± 0,0002
ACTIVA GS 0,5%	6,78 ^c ± 0,01	0,9829 ^{cb} ± 0,0006
ACTIVA GS 1%	6,77 ^c ± 0,02	0,9833 ^c ± 0,0007

Wartości z różnymi literami w poszczególnych kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne (p<0,05, test Tukeya); wartość średnia ± sd

Pod względem wiązania i utrzymywania wody w surimi z ryb z rodziny nitecznikowatych (*Nemipteridae*) korzystne efekty zaobserwowano przy zastosowaniu preparatów TG: SURIMI[®] CS oraz ACTIVA[®] GS [Tokarczyk i in., 2012].

W wyrobach formowanych z mięsa ryb dorszowatych stwierdzono ograniczony wyciek (Tab. 2). W próbie kontrolnej ilość wycieku była na poziomie od 4 do 4,5%. Dodatek preparatów enzymatycznych ograniczył jego ilość (p<0,05). Najlepszą zdolnością utrzymania wody charakteryzowały się próby z udziałem ACTIVA GS. Ilość wycieku określono na poziomie około 1%. Zbliżoną wartość tego parametru oznaczono w wyrobach z mięsa ryb dorszowatych z udziałem preparatu Saprona TGF. Zastosowanie dawki niższej enzymu umożliwiło uzyskanie efektów porównywalnych do osiągniętych przy zastosowaniu 1% preparatów.

Struktura próby kontrolnej, bez TG, była zwięzła, ale porowata (Fot. 1). Podobną strukturą charakteryzowały się próby powstałe przy udziale preparatu enzymatycznego Saprona TG2. Najbardziej jednolitą strukturę wykazywały próby powstałe przy udziale preparatów: Saprona TGF i Activa GS, niezależnie od dawki. Wysoką przydatność do wytwarzania wyrobów z filetów ryb okoniokształtnych *Micropogonias furnieri* przy zastosowaniu preparatu Activa TG-B i TG-BP potwierdził Gonçalves i Passos [2010]. Poprawa struktury restrukturyzowanych wyrobów osiągnięta została wraz ze wzrostem stężenia enzymu [Uresti i in., 2003; Gonçalves i Passos, 2010]. W ocenie wizualnej próby z większą dawką preparatu enzymatycznego, niezależnie od jego rodzaju były ciemniejsze.

Tab. 2. Wyciek rozmrażalniczy wyrobów rybnych formowanych z ryb dorszowatych po 6 miesiącach przechowywania w warunkach zamrożenia.

Próba	DL [%]
próba kontrolna	4,3 ^a ± 0,2
Saprona TG2 0,5%	2,9 ^b ± 0,6
Saprona TG2 1%	2,6 ^b ± 0,5
Saprona TGF 0,5%	1,5 ^c ± 0,2
Saprona TGF 1%	1,4 ^c ± 0,1
Saprona TG 0,5%	2,3 ^d ± 0,4
Saprona TG 1%	2,1 ^e ± 0,3
ACTIVA GS 0,5%	1,3 ^c ± 0,2
ACTIVA GS 1%	1,1 ^c ± 0,1

Wartości z różnymi literami w poszczególnych kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$, test Tukeya); wartość średnia ± sd

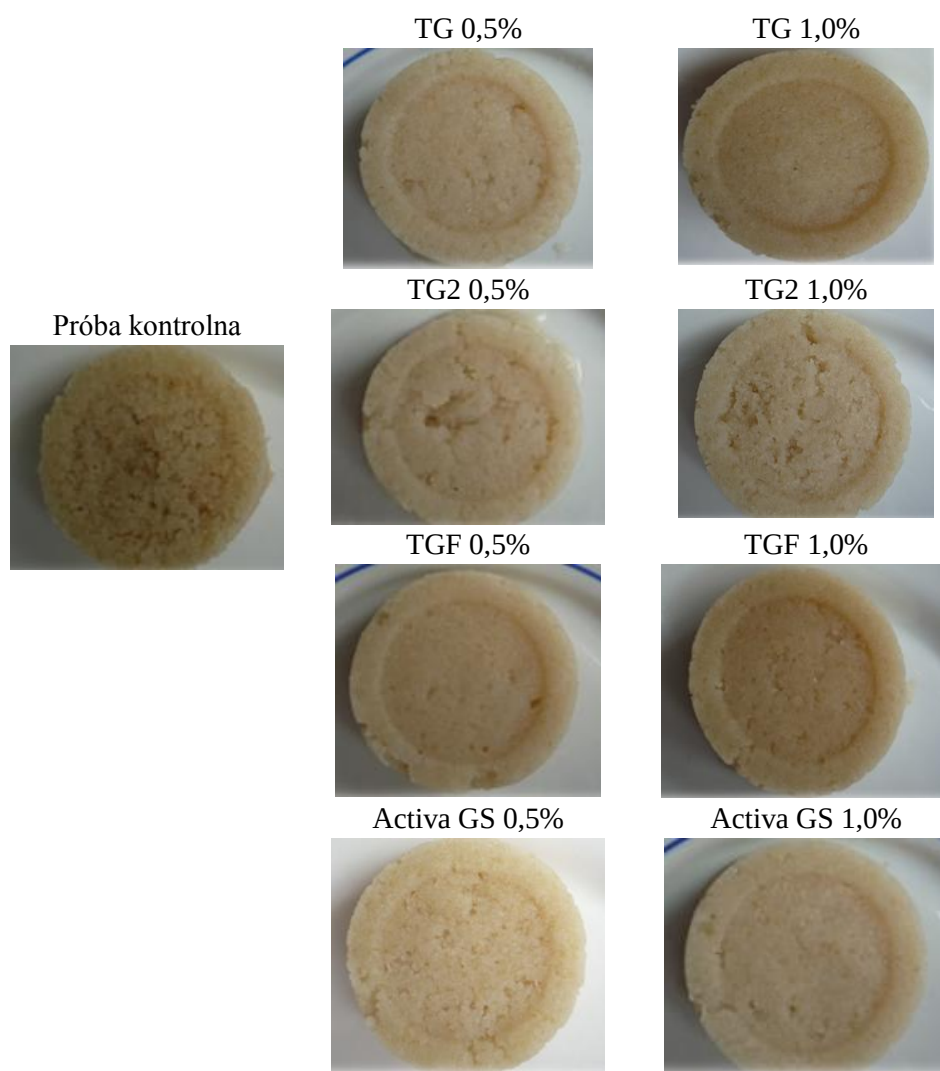
W ocenie wizualnej stwierdzono różnice w strukturze i jakości prób ($p < 0,05$) (Tab. 3).

Tab. 3. Ocena organoleptyczna wyrobów rybnych formowanych z ryb dorszowatych po 6 miesiącach przechowywania w warunkach zamrożenia.

Próba	Wygląd ogólny	Barwa	Smak i zapach	Tekstura
próba kontrolna	4,26 ^a ± 0,12	3,92 ^a ± 0,16	3,94 ^a ± 0,10	3,92 ^a ± 0,21
Saprona TG2 0,5%	4,24 ^a ± 0,15	3,95 ^a ± 0,15	4,00 ^a ± 0,25	4,00 ^a ± 0,13
Saprona TG2 1%	4,32 ^a ± 0,10	3,92 ^a ± 0,16	3,98 ^a ± 0,19	4,04 ^a ± 0,27
Saprona TGF 0,5%	4,36 ^a ± 0,14	4,14 ^a ± 0,12	4,04 ^a ± 0,08	4,16 ^a ± 0,15
Saprona TGF 1%	4,42 ^a ± 0,12	4,08 ^a ± 0,10	4,12 ^a ± 0,10	4,30 ^a ± 0,09
Saprona TG 0,5%	4,22 ^{ac} ± 0,16	4,08 ^a ± 0,10	4,04 ^a ± 0,08	3,96 ^a ± 0,08
Saprona TG 1%	4,34 ^a ± 0,21	3,96 ^a ± 0,08	4,08 ^a ± 0,10	4,04 ^a ± 0,08
ACTIVA GS 0,5%	4,54 ^b ± 0,08	4,24 ^a ± 0,15	4,16 ^a ± 0,23	4,34 ^b ± 0,17
ACTIVA GS 1%	4,54 ^b ± 0,04	4,10 ^a ± 0,2	4,16 ^a ± 0,15	4,36 ^c ± 0,23
Saprona TG2 0,5%	4,24 ^a ± 0,15	3,95 ^a ± 0,15	4,00 ^a ± 0,25	4,00 ^a ± 0,13
Saprona TG2 1%	4,32 ^a ± 0,10	3,92 ^a ± 0,16	3,98 ^a ± 0,19	4,04 ^a ± 0,27
Saprona TGF 0,5%	4,36 ^a ± 0,14	4,14 ^a ± 0,12	4,04 ^a ± 0,08	4,16 ^a ± 0,15

Wartości z różnymi literami w poszczególnych kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$, test Tukeya); wartość średnia ± sd

Po obróbce termicznej, próby, niezależnie od rodzaju zastosowanego enzymu i jego dawki zachowywały nadany kształt, były sprężyste, zwarte. Barwa ich na przekroju była jednolita.



Fot. 1. Wygląd wyrobów rybnych formowanych z mięsa ryb dorszowatych po 6-miesięcznym okresie przechowywania w stanie zamrożenia.

W dalszej części prac przeprowadzono analizę teksturuometryczną wyrobów z mięsa ryb, przechowywanych zamrażalniczo (Tab. 4). Mimo iż w ocenie organoleptycznej stwierdzono różnice w twardości prób, niezależnie od dawki i rodzaju preparatu enzymatycznego, instrumentalna analiza tekstury nie wykazała różnic w twardości wyrobów (Tab. 4). Dodatek preparatów TG spowodował zmniejszenie stopnia deformacji prób ($p < 0,05$). Największy stopień deformacji próby w punkcie twardości uzyskano przy zastosowaniu 1% dodatku Activa GS. Dodatek preparatu Saprone TG2 spowodował natomiast wzrost % deformacji

w punkcie twardości do wartości 20,63% dla dodatku 1% enzymu. Przy zastosowaniu 1% preparatu Saprone TGF zaobserwowano wzrost sprężystości prób z poziomu wyjściowego wynoszącego 0,80 do 0,85. Dla preparatu: Saprone TGF, Saprone TG oraz Activa GS zaobserwowano największy wzrost sprężystości powrotnej prób. Stwierdzono, że preparat Saprone TG2, wykazuje najmniejszy wpływ na próbę. W obrębie tego samego wariantu doświadczenia daje się zauważyć, że lepszy efekt zespolenia mięsa uzyskuje się dzięki zastosowaniu 1% preparatu Activa GS i Saprone TGF.

Parametr siły adhezji – A, dla prób bez TG wynosił 0,49 [N]. Dodatek preparatu Saprone TGF zarówno w ilości 0,5%, jak i 1% spowodował wzrost tego parametru, wskazującego na kleistość prób. W przypadku preparatu Saprone TG odnotowano spadek siły adhezji dla 0,5% dodatku enzymu, natomiast ten sam preparat dodany w ilości 1% doprowadził do jej wzrostu. Dla preparatu Saprone TG2 tylko dodatek 0,5% spowodował spadek siły adhezji. Najlepszy efekt osiągnięto dla preparatu Activa GS. Parametr siły adhezji dla obu dawek preparatu zmniejszył się o połowę. Dodatek preparatów enzymatycznych spowodował spadek wartości parametrów żujności i gumowatości ($p < 0,05$).

Poprawę właściwości teksturometrycznych w restrukturyzowanych wyrobach z karpia uzyskano przy zastosowaniu preparatu mikrobiologicznej transglutaminazy i 1% dodatku soli [Uresti i in., 2004; Vácha i in., 2006]. Dodanie TG do wyrobów z mięsa suma spowodowało wzrost parametrów teksturometrycznych: twardości, spójności, sprężystości i żujności prób [Min i Green, 2008]. Każda z tych cech tekstury rosła liniowo wraz ze wzrostem stężenia TG w zakresie zastosowanych stężeń. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi dla restrukturyzowanego mięsa morskich *Merluccius capensis* [Cardoso i in., 2007] i żelu z krewetek [Tammatinna i in., 2007]. Najbardziej sprężyste, spoiste i elastyczne były żele surimi z ryb z rodziny nitecznikowatych (*Nemipteridae*) przygotowane przy zastosowaniu preparatów transglutaminazy, firmy Ajinomoto [Tokarczyk i in., 2012].

Tab. 4. Analiza TPA wyrobów z mięsa ryb dorszowatych po 6 miesiącach przechowywania.

Próba	Stężenie preparatu TG	Parametr tekstury X ± SD							
		T ₁ [N]	DT ₁ [%]	A [N]	S _p	I _s	K [mJ]	Ż [mJ]	G [N]
próba kontrolna	0,0	4,96 ^a ±0,05	19,92 ^a ±1,61	0,49 ^a ±0,01	0,35 ^a ±0,03	0,80 ^a ±0,07	0,91 ^a ±0,06	14,20 ^a ±0,86	4,61 ^a ±0,31
Saprone TGF	0,5%	4,93 ^a ±0,03	18,93 ^f ±0,29	0,56 ^e ±0,10	0,36 ^a ±0,03	0,79 ^a ±0,05	0,88 ^{ab} ±0,06	13,83 ^a ±0,80	4,65 ^a ±0,24
	1%	4,98 ^a ±0,03	14,07 ^e ±0,45	0,76 ^f ±0,14	0,42 ^b ±0,01	0,85 ^b ±0,06	0,91 ^a ±0,05	10,80 ^f ±0,10	4,54 ^{ab} ±0,25
Saprone TG	0,5%	4,96 ^a ±0,03	15,60 ^g ±1,00	0,28 ^c ±0,11	0,35 ^a ±0,02	0,79 ^a ±0,02	0,93 ^a ±0,02	11,33 ^e ±0,49	4,59 ^a ±0,13
	1%	4,90 ^b ±0,04	15,60 ^g ±0,80	0,68 ^d ±0,14	0,41 ^b ±0,04	0,82 ^a ±0,03	0,91 ^a ±0,05	11,47 ^e ±0,64	4,35 ^{bce} ±0,04
Saprone TG2	0,5%	4,96 ^a ±0,04	20,47 ^b ±0,64	0,37 ^b ±0,03	0,33 ^a ±0,02	0,75 ^c ±0,03	0,87 ^a ±0,02	13,6 ^b ±0,60	4,31 ^b ±0,10
	1%	4,97 ^a ±0,03	20,63 ^c ±0,81	0,47 ^a ±0,04	0,32 ^a ±0,02	0,74 ^c ±0,06	0,85 ^{ab} ±0,01	12,56 ^c ±0,25	4,20 ^{bc} ±0,02
Activa GS	0,5%	4,95 ^a ±0,03	19,6 ^a ±0,50	0,24 ^c ±0,03	0,36 ^a ±0,03	0,76 ^c ±0,02	0,89 ^a ±0,04	11,53 ^e ±0,15	3,36 ^d ±0,21
	1%	4,99 ^a ±0,02	12,20 ^d ±0,26	0,23 ^c ±0,15	0,45 ^b ±0,02	0,82 ^a ±0,02	0,93 ^{ac} ±0,01	9,47 ^d ±0,65	4,66 ^a ±0,04

Wartości z różnymi literami w poszczególnych kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne (p<0,05, test Tukeya); wartość średnia ± sd
T₁– twardość 1 cyklu [N]; I_s– indeks sprężystości; K– kleistość [mJ]; Ż– żujność [mJ]; S_p– sprężystość powrotna; D T₁– deformacja w punkcie twardości [%]; A– siła adhezji [N]; G – gumowatość [N]

Zadowolające wyniki badań z udziałem 0,5% dawki Activa GS i Saprone TGF oraz ze względu na koszt preparatu spowodowały, że badania kontynuowano w kierunku przydatności technologicznej w/w preparatów do produkcji wyrobów rybnych formowanych. W tym celu do prób z TG wprowadzono dodatkowo preparat multimineralny zawierający w swoim składzie jony wapnia (33% - 250mg/100g). Dodatek preparatu, na podstawie zaleceń producenta, ustalono na poziomie 0,5% i 0,8%. Próby przygotowano w sposób analogiczny, jak we wcześniejszych doświadczeniach i przechowywano w stanie zamrożenia przez okres 6 miesięcy. Po okresie przechowywania próby rozmrożono i poddano ocenie jakościowej (Tab. 5).

Tab. 5. Ocena organoleptyczna wyrobów rybnych formowanych z mięsa ryb dorszowatych z TG i preparatem mineralnym po 6 miesiącach przechowywania.

Próba	Preparat mineralny [%]	Wygląd ogólny	Barwa	Smak i zapach	Tekstura
próba kontrolna	0,0	4,26 ^a ± 0,12	3,92 ^a ± 0,16	3,94 ^a ± 0,10	3,92 ^a ± 0,21
Saprone TGF 0,5%	0,0	4,36 ^a ± 0,14	4,14 ^a ± 0,12	4,04 ^a ± 0,08	4,16 ^a ± 0,15
	0,5	4,42 ^a ± 0,12	4,4 ^e ± 0,13	4,14 ^a ± 0,12	4,40 ^a ± 0,11
	0,8	4,44 ^a ± 0,08	4,26 ^f ± 0,08	4,24 ^a ± 0,15	4,38 ^e ± 0,16
ACTIVA GS 0,5%	0,0	4,54 ^b ± 0,08	4,24 ^b ± 0,15	4,16 ^a ± 0,23	4,34 ^b ± 0,17
	0,5	4,64 ^c ± 0,08	4,48 ^c ± 0,10	4,24 ^a ± 0,23	4,38 ^c ± 0,10
	0,8	4,56 ^d ± 0,08	4,32 ^d ± 0,10	4,24 ^a ± 0,23	4,42 ^d ± 0,04

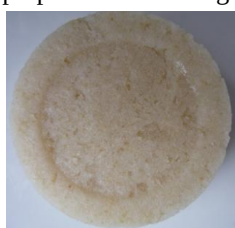
Wartości z różnymi literami w poszczególnych kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$, test Tukeya); wartość średnia ± sd

W ocenie wizualnej struktura prób była zwarta, sprężysta, nie rozpadała się (Fot. 2). Stwierdzono wyraźne rozjaśnienie barwy ($p < 0,05$). Dodatek mniejszej ilości preparatu mineralnego korzystnie wpłynął na wygląd wyrobów, niezależnie od rodzaju preparatu mineralnego (Tab. 5).

Saprone TGF 0,5%

Saprone TGF 0,5% + 0,5%
preparatu mineralnegoSaprone TGF 0,5% + 0,8%
preparatu mineralnego

Activa GS 0,5%

Activa GS 0,5% + 0,5%
preparatu mineralnegoActiva GS 0,5% + 0,8%
preparatu mineralnego

Fot. 2. Wygląd wyrobów rybnych formowanych z mięsa ryb dorszowatych z TG i preparatem mineralnym po 6 miesiącach przechowywania.

W dalszych badaniach ocenie poddano wpływ preparatu multimineralnego na właściwości teksturometryczne prób (Tab. 6). Analiza wskazała na znaczny wzrost sprężystości prób. Dla preparatu Saprone TGF uzyskano wzrost indeksu sprężystości z poziomu 0,79 do 0,95 w przypadku dodatku preparatu multimineralnego w ilości 0,5 % oraz 0,99 dla dodatku 0,8%. Dla prób z udziałem preparatu Activa GS indeks sprężystości wynoszący początkowo 0,76, osiągnął wartość 0,99 zarówno dla dodatku 0,5%, jak i 0,8% preparatu z jonami wapnia. Wyniki te wskazują, że próby osiągnęły prawie idealną sprężystość, której wartość wynosi 1. Wyroby zawierające 0,5% preparatu Activa GS z 0,8% dodatkiem preparatu z Ca^{2+} spowodował, że twardość próby znacznie spadła w stosunku do próby odniesienia, osiągając wartość 4,86 N. Dodatek preparatu mineralnego zawierającego jony wapnia spowodował również znaczny spadek deformacji wyrobów w punkcie twardości. W próbach bez dodatku preparatu mineralnego parametr ten wynosił około 19 %, a dodatek jonów wapniowych spowodował jego spadek do poziomu ok. 8 %.

Siła adhezji dla wyrobów z dodatkiem preparatu multimineralnego i preparatu Activa GS była mniejsza w stosunku do próby kontrolnej, ale większa w stosunku do próby zawierającej tylko preparat enzymatyczny. Dodatek preparatu mineralnego zawierającego jony wapnia, niezależnie od dawki spowodował znaczący spadek wartości parametrów żuźności i gumowatości wyrobów przygotowanych z rozdrobnionego mięsa ryb dorszowatych ($p < 0,05$).

Tab. 6. Analiza TPA wyrobów z mięsa ryb dorszowatych wzbogaconych 0,5% TG i preparatem mineralnym po 6 miesiącach przechowywania

Próba	Preparat mineralny [%]	T ₁ [N]	DT ₁ [%]	A [N]	S _p	I _s	K [mJ]	Ż [mJ]	G [N]
Próba kontrolna	0,0	4,96 ^a ±0,05	19,92 ^a ±1,61	0,49 ^a ±0,01	0,35 ^a ±0,03	0,80 ^a ±0,07	0,91 ^a ±0,06	14,20 ^a ±0,86	4,61 ^a ±0,31
0,5% Saprone TGF	0,0	4,93 ^a ±0,03	18,93 ^a ±0,29	0,56 ^c ±0,10	0,36 ^a ±0,03	0,79 ^a ±0,05	0,88 ^a ±0,06	13,83 ^a ±0,80	4,65 ^a ±0,24
	0,5	4,97 ^a ±0,00	11,00 ^c ±0,00	0,45 ^a ±0,08	0,37 ^a ±0,01	0,8 ^a ±0,00	0,96 ^a ±0,02	8,75 ^{cef} ±0,21	4,74 ^a ±0,11
	0,8	4,91 ^c ±0,01	10,75 ^c ±1,06	0,52 ^{ac} ±0,07	0,47 ^c ±0,03	0,86 ^a ±0,04	1,00 ^{ab} ±0,05	9,00 ^f ±0,01	4,91 ^a ±0,24
0,5% Activa GS	0,0	4,95 ^a ±0,03	19,6 ^a ±0,50	0,24 ^b ±0,03	0,36 ^a ±0,03	0,76 ^a ±0,02	0,89 ^a ±0,04	11,53 ^b ±0,15	3,36 ^b ±0,21
	0,5	4,91 ^{ac} ±0,04	8,25 ^b ±0,35	0,45 ^a ±0,02	0,44 ^{bc} ±0,03	0,92 ^b ±0,06	1,09 ^b ±0,05	8,05 ^c ±0,49	5,33 ^c ±0,28
	0,8	4,86 ^b ±0,03	8,25 ^b ±0,35	0,46 ^a ±0,02	0,47 ^c ±0,06	0,89 ^{bc} ±0,00	0,92 ^a ±0,18	6,55 ^d ±0,21	4,48 ^a ±0,48

Wartości z różnymi literami w poszczególnych kolumnach oznaczają różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$, test Tukeya); wartość średnia $\pm$ sd; T₁ – twardość 1 cyklu [N]; I_s – indeks sprężystości; K – kleistość [mJ]; Z – żujność [mJ]; A – siła adhezji [N]; G – gumowatość [N]; D T₁ – deformacja w punkcie twardości [%]; S_p – sprężystość powrotna;

Wnioski

1. Zastosowane preparaty enzymatyczne mikrobiologicznej transglutaminazy stanowią jeden z czynników kształtowania jakości wyrobów rybnych formowanych. Zauważalne zmiany w strukturze wyrobów świeżych stwierdzono przy zastosowaniu 0,5% i 1% udziału preparatów enzymatycznych w produkcji.
2. Preparaty enzymatyczne TG wpływają znacząco na ograniczenie ilości wycieku w doświadczalnych wyrobach rybnych formowanych, szczególnie przy zastosowaniu preparatów Saprone TGF i Activa GS.
3. Zastosowane preparaty enzymatyczne nie wpływają na smak i zapach gotowych wyrobów.
4. Analiza teksturometryczna wykazała największą przydatność preparatu: Activa GS oraz Saprone TGF, do wytwarzania produktów rybnych przechowywanych zamrażalniczo. Najlepsze efekty uzyskano przy zastosowaniu 1% preparatów do masy rybnej.
5. Wzbogacenie wyrobów 0,5% dodatkiem: TG i preparatu multimineralnego, zawierającego 33% Ca^{2+} , korzystnie wpłynęło na jakość teksturometryczną wyrobów.

Prace wykonano w ramach prac statutowych IBPRS

Literatura

- [1] Ashie I.N.A., Lanier T.C.: Transglutaminase in seafood processing. W: Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality. Red. N.F. Haard, B.K. Simpson. Dekker, New York, 2000, 147-166.
- [2] Basman A., Koksel H., Altı A.: Effects of increasing levels of transglutaminase on cooking quality of bran supplemented spaghetti, European Food Research and Technology, 2006, 223, 547-551.
- [3] Bönisch M. P., Huss M., Weitzl K., Kulozik U.: Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. International Dairy Journal, 2007, 17, 1360–1371.
- [4] Campañone L. A., Roche L. A., Salvadori, V. O., Mascheroni, R. H.: Monitoring of weight losses in meat products during freezing and frozen storage. Food Science and Technology International, 2002, 8, 229-238.
- [5] Cardoso C, Mendes R, Nunes ML.: Effect of transglutaminase and carrageenan on restructured fish products containing dietary fibres. International Journal of Food Science and Technology, 2007, 42, 1257-1264.
- [6] Choy A-L., Hughes J. G. Small D.M.: The effects of microbial transglutaminase, sodium stearoyl lactylate and water on the quality of instant fried noodles. Food Chemistry, 2010, 122, 957-964.

- [7] Gauche C., Tomazi T., Barreto P.L.M., Ogliari P.J., Bordignon-Luiz M.T.: Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. *LWT - Food Science and Technology*, 2009, 42, 239–243.
- [8] Gauche C., Vieira J.T.C., Ogliari P. J., Bordignon-Luiz M.T.: Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry*, 2008, 43, 788–794.
- [9] GB 2474838 (A) - Wafer and process for producing a wafer.
- [10] Gonçalves A.A., Passos M.G.: Restructured fish product from white croaker (*Micropogonias furnieri*) mince using microbial transglutaminase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2010, 53, 4, 987-995.
- [11] Huang W.N., Yuan Y.L., Kim Y.S., Chung O.K. Effects of transglutaminase on rheology, microstructure and baking properties of frozen dough. *Cereal Chemistry*, 2008, 85, 301-306.
- [12] Kasprzyk I., Markowska J., Polak E., Egierski K.: Efekt działania transglutaminazy na właściwości reologiczne ciasta pszennego podczas zamrażalniczego przechowywania. *Chłodnictwo*, 2013, 8, 44-47.
- [13] Kieliszek M, Misiewicz A. : Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 2014, 59, 241-250.
- [14] Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S.: Enzymatyczna modyfikacja składników żywności (praca zbiorowa). Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Szczecinie, Szczecin 2005.
- [15] Kołakowski E., Sikorski Z.: Transglutaminaza i jej wykorzystanie w przemyśle żywnościowym. *Żywność Nauka, Technologia, Jakość*, 2001, 2, 5-16.
- [16] Lauber S., Henle T., Klostermeyer H.: Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research Technology*, 2000, 210, 305–309.
- [17] Mariniello L., Di Pierro P., Giosafatto C. V. L., Sorrentino A., Porta R.: Transglutaminase in food biotechnology, Recent Research Developments in Food Biotechnology. *Enzymes as Additives or Processing Aids*, 2008, 185-211.
- [18] Min B., Green B.W.: Use of microbial transglutaminase and nonmeat proteins to improve functional properties of low NaCl, phosphate-free patties made from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) belly flap meat. *Food Engineering and Physical Properties*, 2008, 73, 5, 218-226.
- [19] Ramírez J., Uresti R., Téllez S., Vázquez M.: Using salt and microbial transglutaminase as binding agents in restructured fish products resembling hams. *Journal of Food Science*, 2002, 67, 1778-1784.
- [20] Ramírez, J. A., Barrera, G., Morales, O. G., Vázquez, M.: Effect of xanthan and locust bean gums on the gelling properties of myofibrillar protein. *Food Hydrocolloids*, 2002a, 16(1), 11–16.

- [21] Ramírez, J.A., Ángel, A.D., Uresti, R.M., Velásquez, G., Vázquez, M.: Low salt restructured products from striped mullet (*Mugil cephalus*) using microbial transglutaminase or whey protein concentrate as additives. *Food Chemistry*, 2007, 102, 243–249.
- [22] Schäfer C., Neidhart S., Carle R.: Application and sensory evaluation of enzymatically texturised vegetable proteins in food models. *European Food Research Technology*, 2011, 232:1043–1056.
- [23] Tammattinna A, Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M.: Gelling properties of white shrimp (*Penaeus vannamei*) meat as influenced by setting condition and microbial transglutaminase. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 40, 1489–1497.
- [24] Téllez-Luis, S. J., Uresti, R. M., Ramírez, J. A., Vázquez, M.: Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase. *Journal of Food Science and Agriculture*, 2002, 82, 953–959.
- [25] Tokarczyk G., Szymczak M., Bienkiewicz G., Felisiak K., Krzywiński T.: Zastosowanie preparatów transglutaminazy do poprawy mechanicznych właściwości surimi z ryb z rodziny nitecznikowatych (*Nemipteridae*), konferencja nt. „Współczesne trendy w technologii żywności Od żywności tradycyjnej do prozdrowotnej”, Poznań 26-27.09.2012, referat, materiały konferencyjne s. 49.
- [26] Uresti, R.M., Ramírez, J.A., López-Arias N., Vázquez, M.: Negative effect of combining microbial transglutaminase with low methoxyl pectins on the mechanical properties and colour attributes of fish gels. *Food Chemistry*, 2003, 80, 551-556.
- [27] Uresti, R.M., Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Vázquez, M.: Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 2004, 86, 257–262.
- [28] Vácha, F., Novik, I., Spicka, J., Podola, M.: Determination of the effect of microbial transglutaminase on technological properties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) meat. *Czech Academy of Agricultural Sciences*, 2006, 51, 535-542.
- [29] Wang F., Huang W., Kim Y., Liu R., Tilley M.: Effects of transglutaminase on the rheological and noodle-making characteristics of oat dough containing vital wheat gluten or egg albumin. *Journal of Cereal Science*, 2011, 54, 53-59.

OBOWIĄZEK STOSOWANIA INTEGROWANEJ OCHRONY ROŚLIN, A BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOŚCI W POLSCE

EWA MATYJASZCZYK

Streszczenie

Od stycznia 2014 roku stosowanie integrowanej ochrony roślin jest obowiązkowe na terenie całej Unii Europejskiej. Obowiązkowi nałożonemu na rolników towarzyszą działania państw członkowskich mające na celu stworzenie niezbędnych warunków dla zmniejszenia zależności od stosowania chemicznych metod ochrony, w tym między innymi kampania informacyjna skierowana do rolników i doradców.

Można przypuszczać, że działania związane z wdrażaniem integrowanej ochrony roślin, w szczególności wzrost świadomości rolników, dostępność odmian odpornych oraz wzrost możliwości technicznych spowodują popularyzację metod alternatywnych dla chemicznych, a w konsekwencji zahamowanie trendu wzrostowego w zużyciu środków ochrony roślin w Polsce, co przyczyni się do zachowania obecnego poziomu bezpieczeństwa żywności.

Słowa kluczowe:ochrona roślin, bezpieczeństwo żywności, integrowana ochrona roślin, środki ochrony roślin, pestycydy

Wprowadzenie

Od stycznia 2014 roku rolnicy w całej Unii Europejskiej, w tym rolnicy polscy, są zobowiązani do przestrzegania zasad integrowanej ochrony roślin. O dużym znaczeniu tego wymaganiam oczach ustawodawcy świadczą przedsięwzięte środki prawne. Obowiązek stosowania integrowanej ochrony roślin został nałożony jednocześnie na mocy dwóch różnych unijnych aktów prawnych: Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady 1107/2009 dotyczącego wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin oraz Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE ustanawiającej ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów.

Wprowadzenie obowiązku stosowania integrowanej ochrony roślin ma na celu zapewnienie wysokiego poziomu ochrony zdrowia ludzi i zwierząt oraz środowiska oraz zmniejszenie zależności od stosowania metod chemicznych. Wspomniane wyżej przepisy unijne nakazują państwom członkowskim działania na rzecz rolnictwa o niskim zużyciu pestycydów, stworzenie niezbędnych warunków i środków umożliwiających wdrożenie technik integrowanej ochrony roślin oraz zachęcanie do stosowania alternatywnych podejść i technik, takich jak niechemiczne alternatywy dla środków ochrony roślin (śór).

Celem niniejszego opracowania jest oszacowanie w jaki sposób wprowadzenie obowiązku stosowania integrowanej ochrony roślin wpłynie na bezpieczeństwo żywności w Polsce.

Pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych w Polsce

Problematykę związaną z pozostałościami środków, metodami ich oznaczania oraz możliwym wpływem na zdrowie ludzi, zwierząt i środowisko podjęto w Polsce stosunkowo wcześnie. Biologiczne oznaczenia pozostałości insektycydów w roślinach i glebie prowadzono już pod koniec lat pięćdziesiątych XX wieku. Regularny urzędowy monitoring pozostałości środków w żywności i płodach rolnych rozpoczęto w Polsce na początku lat siedemdziesiątych XX wieku i prowadzony jest on do chwili obecnej (Matyjaszczyk 2011a).

Badania pozostałości środków w płodach rolnych, prowadzone są przez sieć akredytowanych laboratoriów. Próbkę do badań pobierane są losowo na obszarze całej Polski przez inspektorów Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa.

Jednym z głównych zadań urzędowych badań pozostałości środków w płodach rolnych jest sprawdzenie czy nie będą one powodowały negatywnych skutków zdrowotnych dla konsumentów. Wyniki badań od lat wykazują, że narażenie przewlekłe konsumentów nie przekracza wartości bezpiecznych (zarówno w diecie dorosłych jak i małych dzieci) i nie powinno powodować żadnych skutków zdrowotnych (Dąbrowski et al. 1996, Dąbrowski et al. 2001, Nowacka i Gnusowski 2009, Gnusowski et al. 2011, Nowacka et al. 2015a, Nowacka et al. 2015b).

Konsekwencje obowiązkowego stosowania integrowanej ochrony roślin dla praktyki rolniczej w Polsce.

Na mocy cytowanej Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE ustanawiającej ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów państwa członkowskie zostały zobowiązane do opracowania krajowych planów działania mających na celu zmniejszenia zagrożenia związanego ze stosowaniem środków i zmniejszenia wpływu ich stosowania na zdrowie ludzi i na środowisko.

Polski plan działania nie koncentruje się na zmniejszeniu zużycia środków, ale wprowadza cele dotyczące świadomości rolników oraz bezpieczeństwa żywności. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że przeciętne zużycie środków jest w Polsce wyraźnie niższe od średniej unijnej (Matyjaszczyk 2014). Miernikami stopnia realizacji celów „Krajowego Planu Działania na rzecz ograniczenia ryzyka związanego ze stosowaniem środków ochrony roślin” są: odsetek rolników stosujących zasady integrowanej ochrony roślin oraz progi przekroczeń pozostałości środków w żywności pochodzenia roślinnego i zwierzęcego (Krajowy Plan Działania 2012). Cele wyznaczone przez polski plan działania wydają się realne do spełnienia i można przewidywać, że zostaną osiągnięte.

Warto podkreślić, że wymagania integrowanej ochrony roślin nie skupiają się jedynie na samym procesie zabiegu chemicznego oraz doborze środka najmniej obciążającego środowisko naturalne przy zachowaniu wymaganej skuteczności. Są to wymagania bardzo szerokie, uwzględniające płodozmian oraz cały wachlarz narzędzi agrotechnicznych. Zakładają taki sposób prowadzenia produkcji rolnej aby ograniczyć ochronę chemiczną przy zachowaniu obecnego poziomu produkcji.

W związku z wprowadzeniem integrowanej ochrony roślin w Polsce nie pojawiła się żadna nowa jednostka kontrolna. Za kontrole spełniania wymagań integrowanej ochrony roślin, podobnie jak pozostałych aspektów ochrony roślin, odpowiada, podobnie jak dotychczas Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Nie zmienił się także znacząco system dopłat do produkcji rolnej. W konsekwencji za niestosowanie się do zasad integrowanej ochrony roślin rolnik może zostać ukarany mandatem, natomiast nie zostaną mu odebrane dopłaty obszarowe.

Można jednak przewidywać, że w przyszłości unijny system dofinansowania rolnictwa (jeżeli nadal będzie funkcjonował) zostanie przebudowany tak, aby w coraz większym stopniu skłaniać rolników do prowadzenia upraw w sposób ograniczający konieczność ochrony chemicznej. Narzędziem w tym kierunku już obecnie są płatności rolnośrodowiskowe (Borkowska et al. 2013) wspierające między innymi wzrost udziału roślin motylkowych w płodozmianie.

Podsumowując tę część rozważań, można zatem stwierdzić, że w krótkim okresie trudno spodziewać się znaczących zmian w sposobie prowadzenia upraw natomiast w dłuższym okresie można takich zmian oczekiwać. Będą one wynikały w dużym stopniu z zaprojektowania systemu dopłat do produkcji rolnej, ale może na nie wpłynąć także spodziewany wzrost wiedzy i świadomości rolników. Można przewidywać, że cele Krajowego Planu Działania na rzecz ograniczenia ryzyka związanego ze stosowaniem środków ochrony roślin zostaną w Polsce osiągnięte.

Konsekwencje obowiązkowego stosowania integrowanej ochrony roślin dla wiedzy i świadomości rolników

Wprowadzenie obowiązku integrowanej ochrony roślin powiązane jest z informacją docierającą do rolników z różnych źródeł. Wydaje się, że źródła te można podzielić na dwie grupy:

1. kampania informacyjna i szkolenia inicjowane lub finansowane przez organy państwowe,

Wprowadzając obowiązek stosowania integrowanej ochrony roślin przez rolników ustawodawca nałożył także na państwa członkowskie obowiązek stworzenia rolnikom odpowiedniego zaplecza i dostarczenia niezbędnej wiedzy. W Polsce (choć Polska nie jest tu wyjątkiem) działania te rozpoczęły się stosunkowo późno, jednak obejmują cały wachlarz narzędzi, takich jak:

- szkolenia doradców
- szkolenia rolników
- materiały informacyjne dla rolników i doradców.

Obszerne programy szkoleniowe w zakresie integrowanej ochrony roślin przeprowadzone w latach 2013/14 objęły około 650 doradców zatrudnionych w państwowych ośrodkach doradztwa rolniczego (Rzeźnicki 2014). Ponadto w 2014 roku Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie prowadziło szkolenia e-learningowe w zakresie integrowanej ochrony roślin, które ukończyła duża grupa osób z całej Polski. Łącznie w tych szkoleniach wzięło udział 1483 doradców zatrudnionych w państwowych ośrodkach doradztwa rolniczego (Karwat 2015)

Wszyscy rolnicy wykonujący zabiegi ochrony roślin środkami przeznaczonymi dla użytkowników profesjonalnych są zobowiązani przez prawo do ukończenia dwudniowego szkolenia dla operatorów opryskiwaczy i jego okresowego powtarzania co 5 lat. Obowiązek ten wprowadzono w Polsce pod koniec lat dziewięćdziesiątych. Do 2010 roku łącznie liczba przeszkolonych w Polsce przekroczyła 860 tysięcy osób i uwzględniało to fakt powtórzenia szkolenia przez część rolników (Matyjaszczyk 2011a). W związku z wprowadzeniem integrowanej ochrony roślin programy szkoleń dla profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin zostały zmienione, aby objąć zagadnienia integrowanej ochrony roślin, w tym biologiczne i inne niechemiczne metody ochrony roślin. Zmiana programów szkoleń spowoduje w efekcie, że do końca roku 2018 wszyscy rolnicy stosujący środki przeznaczone dla użytkowników profesjonalnych w Polsce, czyli kilkaset tysięcy osób, zostaną przeszkoleni w zakresie zasad integrowanej ochrony roślin.

Ponadto państwowe instytuty rolnicze zostały przez Ministerstwo Rolnictwa zobligowane do przygotowania metodyk integrowanej ochrony roślin, systemów wspierania decyzji oraz innych materiałów informacyjnych związanych z integrowaną ochroną roślin. Materiały te są wydawane w formie książek lub broszur, prezentacji oraz programów komputerowych, ponadto zazwyczaj dostępne są na stronach Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi (oczywiście nieodpłatnie). Pod koniec I kwartału 2015 roku na stronach Ministerstwa Rolnictwa było dostępnych około 90 opracowań związanych z integrowaną ochroną roślin przeznaczonych głównie dla rolników bądź doradców, a przygotowanie dalszych materiałów jest w toku.

2. kampanie promocyjne kierowane do rolników przez firmy komercyjne zajmujące się sprzedażą preparatów alternatywnych dla środków chemicznych, biologiczną ochroną oraz firm hodowlanych oferujących odmiany odporne

W ostatnich miesiącach można zauważyć, że w mediach rolniczych pojawiają się bardzo różne informacje dotyczące preparatów i metod ułatwiających uzyskanie wysokich plonów albo poprawy ich jakości bez intensyfikacji zużycia chemicznych środków ochrony roślin, albo nawet przy wyraźnej redukcji ich zużycia. Producenci biostymulatorów, organizmów żywych stosowanych w ochronie upraw, urządzeń do mechanicznego odchwaszczania albo od precyzyjnej aplikacji środków ochrony roślin, materiału siewnego, czy też różnego

rodzaju preparatów nawozowych prezentując oferowane wyroby kładą nacisk na fakt, że ich wykorzystanie prowadzi do ograniczenia zużycia agrochemikaliów. Podkreślają również ich przyjazność dla środowiska oraz fakt zgodności z wymaganiami integrowanej ochrony roślin.

Kampanie marketingowe rządzą się swoimi prawami i ich celem nie jest obiektywne przedstawienie rzeczywistości tylko nakłonienie nabywcy, w tym przypadku rolnika, do zakupu określonego produktu. Jednak nie ulega wątpliwości, że kampanie marketingowe wielu firm komercyjnych propagują określenie „integrowana ochrona roślin” i przez częstą obecność w mediach w atrakcyjnej dla rolnika postaci zachęcają do stosowania niektórych metod przyjaznych środowisku. Warto podkreślić, że firmy działających na rzecz rolnictwazazwyczaj prowadzą szkolenia dla swoich klientów - rolników, a wiele z tych szkoleń jest dobrze przygotowanych merytorycznie.

W podsumowaniu tego punktu można stwierdzić, że w Polsce trwa kampania informacyjna dotycząca integrowanej ochrony roślin prowadzona zarówno przez jednostki państwowe, jak i przez firmy komercyjne. Do końca 2018 roku wszyscy rolnicy stosujący środki ochrony roślin przeznaczone dla użytkowników profesjonalnych zostaną przeszkoleni w zakresie integrowanej ochrony roślin. Szkolenia ukończyło także wielu doradców. Mimo, że liczbę doradców przeszkolonych dotychczas w zakresie praktycznym można ocenić jako niewystarczającą, to należy mieć nadzieję, że szkolenia doradców będą trwały.

Konsekwencje obowiązkowego stosowania integrowanej ochrony roślin dla zużycia środków ochrony roślin

Stosunkowo niskie (w odniesieniu do innych państw Unii Europejskiej) przeciętne zużycie środków w Polsce jest faktem (Matyjaszczyk 2014). Warto jednak podkreślić, że od przystąpienia do Unii Europejskiej obserwujemy w Polsce wzrost zużycia agrochemikaliów (Matyjaszczyk 2011b). Ponadto intensywność ochrony chemicznej zależy od uprawy. Warto podkreślić, że wiele upraw chronionych jest w Polsce intensywnie (Surawska i Kołodziejczyk 2006). Należą do nich między innymi plantacje niektórych owoców i warzyw. Na podkreślenie zasługuje fakt że intensywna ochrona chemiczna dotyczy także płodów rolnych przeznaczonych do spożycia w postaci nieprzetworzonej jak np. jabłko, wiśnia, truskawka, porzeczka, ogórek czy pomidor gruntowy.

Od lat prowadzone są prace nad licznymi metodami alternatywnymi dla chemicznej ochrony roślin (Dobrzański i Adamczewski 2006, Kochut i inni 2013). Można tu wymienić typowe metody niechemiczne w tym między innymi metody hodowlane (Burczyk i in. 2010), zasiewy mieszane (Tratwal i Rosiak 2010, Tratwal et al 2014) oraz różne środki mechanicznego odchwaszczania (Wachowiak i Kierzek 2010, Piwowar 2012). Prowadzi się również badania nad bardziej efektywną aplikacją i ograniczaniem dawek chemicznych środków (Paradowski et al. 2010, Kaczmarek et al. 2013). Metody te są skuteczne i prawidłowo stosowane

przynoszą dobre efekty. Można mieć nadzieję, że w związku z promocją integrowanej ochrony roślin nastąpi ich upowszechnienie oraz wzrost popularności.

W opinii autorki, w świetle faktu, że polscy rolnicy konkurują na rynku Wspólnotowym z rolnikami z innych państw członkowskich, gdzie zużycie środków ochrony roślin i związana z nim intensywność produkcji w tym między innymi przeciętny plon z hektara są wyższe, w najbliższych latach mało prawdopodobny jest istotny spadek zużycia środków ochrony roślin w Polsce.

Można jednak wyrazić nadzieję, że wzrost świadomości rolników oraz wzrost możliwości technicznych spowoduje popularyzację metod alternatywnych dla chemicznych a w konsekwencji bardziej efektywne wykorzystanie agrochemikaliów, które spowoduje zahamowanie trendu wzrostowego w zużyciu środków ochrony roślin, przy jednoczesnej produkcji plonów dobrej jakości. Przyczyni się to do zachowania obecnego poziomu bezpieczeństwa polskiej żywności.

Wnioski

1. Wyniki badań od lat wykazują, że narażenie przewlekłe konsumentów pozostałościami środków ochrony roślin nie przekracza w Polsce wartości bezpiecznych (zarówno w diecie dorosłych jak i małych dzieci) i nie powinno powodować żadnych skutków zdrowotnych.
2. Można przewidywać, że cele Krajowego Planu Działania na rzecz ograniczenia ryzyka związanego ze stosowaniem środków ochrony roślin zostaną w Polsce osiągnięte.
3. W związku z wprowadzeniem obowiązku stosowania integrowanej ochrony roślin w krótkim okresie trudno spodziewać się znaczących zmian w sposobie prowadzenia upraw natomiast w dłuższym okresie można takich zmian oczekiwać. Będą one wynikały ze zmian zasad przyznawania dopłat oraz spodziewanego wzrostu wiedzy i świadomości rolników.
4. W Polsce trwa kampania informacyjna dotycząca integrowanej ochrony roślin prowadzona zarówno przez jednostki państwowe, jak i przez firmy komercyjne. Do końca 2018 roku wszyscy rolnicy stosujący środki ochrony roślin przeznaczone dla użytkowników profesjonalnych zostaną przeszkoleni w zakresie integrowanej ochrony roślin. Szkolenia ukończyła także część doradców. Należy dążyć do przeszkolenia większej liczby doradców.
5. Można wyrazić nadzieję, że dostępność odmian odpornych, wzrost świadomości rolników oraz wzrost możliwości technicznych spowoduje popularyzację metod alternatywnych dla chemicznych, a w konsekwencji zahamowanie trendu wzrostowego w zużyciu środków ochrony roślin w Polsce, co przyczyni się do zachowania obecnego poziomu bezpieczeństwa żywności.

Literatura

- [1] Borkowska M., Golinowska M., Kruszyński M.: Program rolnośrodowiskowy - doświadczenia i opinie rolników. W: Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, Poznań 2013, Vol. 58(3), str. 46-49.
- [2] Burczyk H., Andruszewska A., Praczyk M., Byczyńska M., Kozak J., Rajewicz M.: Hodowla odpornościowa jako metoda ograniczająca stosowanie fungicydów na przykładzie lnu (*linum usitatissimum* L.). W: Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin, Poznań 2010, 50(4), str. 1575–1582.
- [3] Dąbrowski J., Gąsior J., Janda T., Krause A., Morzycka B., Murawska M., Sadło S., Barylska E., Gierschendorf Z., Giza I., Langowska B., Martinek B., Michel M., Rupar J.: Obraz skażeń pozostałościami pestycydów upraw rolnych i gleb w Polsce w latach 1991–1995, W: Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin, Poznań, Poznań 1996, 36 (1), str. 57–66.
- [4] Dąbrowski J., Nowacka A., Martinek B., Walorczyk S., Drożdżyński D., Chwarz K., Kudła M., Gierschendorf Z., Chmielewska E., Barylska E., Ziółkowski A., Giza I., Murawska M., Sztwiertnia U., Morzycka B., Sadło S., Rupar J., Langowska B., Michel M.: Obraz skażeń pozostałościami pestycydów upraw rolnych w Polsce w latach 1996–2000. W: Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin, Poznań 2001, 41 (1), str. 95–109.
- [5] Dobrzański A., Adamczewski K.: Perspektywy wykorzystania nowych narzędzi i maszyn do regulacji zachwaszczenia w integrowanej i ekologicznej produkcji roślinnej. W: Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin, Poznań 2006, 46(1), str. 11-18.
- [6] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE ustanawiającej ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów
- [7] Gnusowski B., Nowacka A., Łozowicka B., Szpyrka E., Walorczyk S.: Pozostałości środków chemicznej ochrony roślin w roślinnej produkcji ekologicznej. W: Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, Poznań 2011, Vol. 56(3), str. 102-107.
- [8] Kaczmarek S., Matysiak K., Sekutowski T.: Stosowanie obniżonych dawek substancji diflufenikan i izoproturonu w uprawie pszenżyta ozimego odmiany Grenado i Pizarro. W: Fragma. Agron., Poznań 2013, 30(3), str. 85–96.
- [9] Karwat A. 2015. Wiadomość przesłana autorce e-mailem.
- [10] Kohut M., Anyszka Z., Golian J.: Zmiany w zachwaszczeniu i plonowanie wybranych gatunków warzyw w zależności od metody ochrony przed chwastami, Journal of Research and Application in Agricultural Engineering, Poznań 2013, Vol. 58(3), str. 255-260.
- [11] KRAJOWY PLAN DZIAŁANIA na rzecz ograniczenia ryzyka związanego ze stosowaniem środków ochrony roślinna lata 2013 - 2017. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Warszawa 2012, ss. 85.

- [12] Matyjaszczyk E.: Analiza zmian ustawodawstwa z zakresu ochrony roślin pod kątem bezpieczeństwa żywności, ludzi i środowiska. Wyd. Instytutu Ochrony Roślin – PIB, Poznań 2011a, 130 ss.
- [13] Matyjaszczyk E.: Rynek środków ochrony roślin w Polsce w roku 2012 w ujęciu ilościowym i wartościowym. W: Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu Tom XVI (3), 2014, str. 177-182.
- [14] Matyjaszczyk E.: Selected aspects of plant protection in Poland, five years on from EU accession. W: Outlook on Agriculture, 2011b, vol. 40, No 2, str. 119-123.
- [15] Nowacka A., Gnusowski B., Raczkowski M.: Bezpieczeństwo zdrowotne polskich płodów rolnych w roku 2014 związane z pozostałościami środków ochrony roślin. W: Streszczenia 55. Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego, Poznań 12-13 lutego 2015. Wyd. Instytutu Ochrony Roślin – PIB, Poznań 2015, str. 40.
- [16] Nowacka A., Gnusowski B., Walorczyk S., Drożdżyński D., Raczkowski M., Frąckowiak D., Zdziechowska M., Ziółkowski A., Przewoźniak M., Rzeszutko U., Domańska I., Pszczolińska K., Łozowicka B., Kaczyński P., Rutkowska E., Jankowska M., Hrynko I., Szpyrka E., Kurdziel A., Matyaszek A., Rupar J., Podbielska M., Słowik-Borowiec M., Michel M.: Kontrola pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych w roku 2014. W: Streszczenia 55. Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego, Poznań 12-13 lutego 2015. Wyd. Instytutu Ochrony Roślin – PIB, Poznań 2015, str. 41.
- [17] Nowacka A., Gnusowski B.: Bezpieczeństwo zdrowotne polskich płodów rolnych w aspekcie pozostałości środków ochrony roślin stosowanych do ich ochrony. W: Progr. Plant Protection / Post. Ochr. Roślin, Poznań 2009, 49 (4), str. 1895-1902.
- [18] Paradowski A., Pietryga J., Matysiak K.: Optymalizacja dawek herbicydów w pszenicy jarej i jęczmieniu jarym. W: Prog. Plant Protection / Post. Ochr. Roślin, Poznań 2010, 50(4): 1859–1868.
- [19] Piwowar A.: Postęp w dziedzinie chemicznej ochrony roślin w Polsce i jego determinanty. W: Problemy Rolnictwa Światowego, 2012, Tom 12 (XXVII), Zeszyt 1, str. 138-148.
- [20] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady 1107/2009 dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin.
- [21] Rzeźnicki B. 2014. Wiadomość przesłana autorce e-mailem.
- [22] Surawska M., Kołodziejczyk R.: Zużycie środków ochrony roślin w Polsce. W: Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Roślin, Poznań 2006, 46(1), str. 470–483.
- [23] Tratwal A., Roik K., Bocianowski J.: The effect of growing mixtures of spring barley cultivars on pest occurrence and yields. W: Polish Journal of Entomology, Bydgoszcz 2014, DOI: 10.2478/pjen-2014-0023 VOL. 83, str. 295–311.

- [24] Tratwal A., Rosiak K.: Redukcja występowania mączniaka prawdziwego w zasiewach mieszanych i czystych pszenicy ozimej. W: Prog. Plant Protection / Post. Ochr. Roślin, Poznań 2010, Vol. 50 (2), str. 963-968.
- [25] Wachowiak M., Kierzek R.: Tendencje w rozwoju techniki ochrony roślin - wybrane zagadnienia. W: Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Roślin, Poznań 2010; 50(4), str. 1661–1670.

ZASTOSOWANIE TECHNIKI SPEKTROFOTOMETRYCZNEJ ORAZ IMPULSOWEJ POLAROGRAFII RÓŻNICOWEJ DO OZNACZANIA ZAWARTOŚCI KWASU ASKORBINOWEGO

ARTUR MAZUREK, MARZENA WŁODARCZYK-STASIAK, MONIKA SUJKA, URSZULA PANKIEWICZ, RADOSŁAW KOWALSKI, JERZY JAMROZ

Streszczenie

W pracy porównano wyniki oznaczania kwasu askorbinowego otrzymane metodą impulsowej polarografii różnicowej oraz spektrofotometryczną zgodnie z normą PN-A-04019:1998 z zaproponowaną metodą odniesienia, wykorzystującą wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych z detekcją spektrofotometryczną. Porównanie przeprowadzono wykorzystując metodę obliczenia stosunku średnich wyników i niepewności jego wyznaczenia. Wyniki oznaczeń zawartości kwasu askorbinowego metodą spektrofotometryczną w nektarze z czarnej porzeczki, soku jabłkowym, wielowarzywnym i multiwitaminowym wykazują statystycznie istotne różnice, a jedynie w przypadku soku pomarańczowego uzyskano zgodne wyniki. Spowodowane jest to niewystarczającą selektywnością spektrofotometrycznej metody oznaczania kwasu askorbinowego gdyż inne substancje redukujące, obecne w próbce, mogą redukować 2,6-dichlorofenolindofenol i zawyżać otrzymane wyniki analiz. W przypadku wyników analiz, wszystkich badanych prób metodą impulsowej polarografii różnicowej nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Metoda ta pozwala uzyskać wiarygodne wyniki, charakteryzujące się wysoką zgodnością z chromatograficzną metodą odniesienia. Metoda wykorzystująca impulsową polarografię różnicową jest bardziej selektywna niż metoda spektrofotometryczna, dlatego też może być rekomendowana do rutynowych oznaczeń zawartości kwasu askorbinowego.

Słowa kluczowe: kwas askorbinowy, witamina C, impulsowa polarografia różnicowa, HPLC

Wprowadzenie

Kwas askorbinowy (witamina C) w organizmie człowieka spełnia cały szereg różnorodnych funkcji, a jedną z najważniejszych jest możliwość zatrzymania łańcuchowej reakcji rodnikowej [Chan, 1993]. Istotną rolę ochronną przed toksycznością reaktywnych form tlenu, witamina C odgrywa w oku i tkance płucnej, która nie zawiera enzymów przeciwdziałających procesom oksydacyjnym.

Najlepiej poznaną rolą witaminy C w organizmie człowieka jest synteza kolagenu [Catani i in., 2005], który stanowi 30-40% wszystkich białek organizmu. Wielokierunkowe działanie witaminy C przyczynia się do wzrostu odporności organizmu na niektóre choroby bakteryjne i wirusowe, ponadto działa ona prewencyjnie w powstawaniu nowotworów [Block, 1992] i wpływa korzystnie na przyswajanie żelaza [Smirnoff, 2000]. Organizm człowieka nie jest w stanie jej wytworzyć, ponieważ nie posiada odpowiednich enzymów. Jedynym źródłem witaminy C dla człowieka jest dieta, a około 90% całego spożycia tej witaminy pochodzi z produktów roślinnych [Tomás-Barberán i Gil, 2008]. Wielu ekspertów uważa, że zalecane spożycie witaminy C, które wynosi od 45 do 120 mg/dzień (w zależności od grupy ludności) jest zbyt niskie do jej optymalnego działania [Schlueter i Johnston, 2011]. Witamina C jest najbardziej podatna na straty podczas procesów przetwórczych. Jej stabilność w żywności zależy m.in. od składu produktu, zawartości tlenu, wartości pH i sposobu przetwarzania. Jednak pomimo zachowania optymalnych warunków, jej zawartość zmniejsza się w czasie przetwarzania i przechowywania żywności [Mazurek i Pankiewicz, 2012]. Kwas askorbinowy jest szeroko wykorzystywany w przemyśle spożywczym również z powodu poprawy jakości produktu. Dozwolone jest dodawanie witamin i składników mineralnych w celu uzupełnienia strat, które wystąpiły w czasie przetwarzania lub w wyniku zmian zachodzących podczas przechowywania żywności. Spośród wszystkich witamin, witamina C jest najczęściej dodawanym składnikiem do żywności. Kwas askorbinowy odgrywa ważną rolę jako czynnik chroniący inne składniki żywności, które w trakcie procesu technologicznego czy przechowywania mogą ulegać niekorzystnym zmianom, głównie procesom utleniania. Witamina C działając jako przeciwutleniacz może poprawiać barwę i smakowitość wielu rodzajów produktów żywnościowych [Newsome, 1987]. W czasie produkcji soków owocowych lub przecierów z takich owoców jak jabłka i brzoskwinie kwas askorbinowy jest dodawany w celu zminimalizowania enzymatycznego brązowienia surowych owoców. Kwas askorbinowy może inhibować brązowienie enzymatyczne poprzez redukcję chinonów do związków fenolowych, chelatowanie jonów metali i obniżanie zawartości tlenu [Garzarella i Pilizota, 1990]. Kwas askorbinowy dodawany jest do napojów w celu zapobiegnięcia niepożądanym reakcjom prowadzącym do zmian smaku, zapachu, klarowności [Lattanzio i in., 1989]. Opracowano szereg metod analitycznych oznaczania witaminy C dla różnorodnych matryc żywnościowych np.: spektrofotometryczna [Arya i in., 2001], miareczkowa [Willie i Ekop, 2007], enzymatyczna [Danielczuk i in., 2004], fluorymetryczna [Wu i in., 2003], woltamperometryczna [Wawrzyniak i in., 2005], elektroforetyczna [Cancalon, 2001], chromatograficzna [Fenoll i in., 2011]. Obecnie jedyną obowiązującą w Polsce normą oznaczania witaminy C jest PN-A-04019:1998. W procedurze wykonania podano dwie metody oznaczania zawartości kwasu askorbinowego, miareczkową z wykorzystaniem 2,6-dichlorofenoloindofenolu: stosowaną

do produktów bezbarwnych i słabo zabarwionych oraz spektrofotometryczną w przypadku produktów silnie zabarwionych. Najbardziej preferowaną techniką analityczną wykorzystywaną w badaniach witaminy C jest wysokosprawna chromatografia cieczowa ponieważ zapewnia ona większą selektywność niż techniki spektrofotometryczne, miareczkowe czy metody enzymatyczne, a stopień czułości w dużej mierze zależy od doboru odpowiednich detektorów [Novakova i in., 2008]. Techniki polarograficzne, są stosowane w oznaczaniu witaminy C ze względu na dużą dokładność i łatwość wykonania. Opracowane w ostatnich dziesięcioleciach techniki polarograficzne między innymi impulsowa polarografia różnicowa, miały na celu eliminację niedogodności, jakimi cechuje się klasyczna polarografia stałoprądowa oraz zwiększenie czułości oznaczeń i automatyzację pomiaru. Duża liczba dostępnych metod oznaczania witaminy C powoduje otrzymywanie rozbieżnych wyników głównie z powodu użycia różnych metod [Bates, 1994].

Celem badań było porównanie wyników oznaczeń kwasu askorbinowego metodą impulsowej polarografii różnicowej (DPP) oraz spektrofotometryczną zgodnie z PN-A-04019:1998, z wynikami otrzymanymi metodą odniesienia z wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-DAD).

Materiał i metody badań

Materiał

W badaniach wykorzystano sok pomarańczowy, wielowarzywny, multiwitaminowy i jabłkowy (mętny) oraz nektar porzeczkowy. Wszystkie soki i nektar zakupiono w lokalnym sklepie, na etykiecie soku jabłkowego, wielowarzywnego i multiwitaminowego producent zawarł informację o fortyfikacji witaminą C. Kwas askorbinowy, 2,6-dichlorofenolindofenol zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (USA), kwas metafosforowy w Merck (Niemcy), ortofosforowy, szczawiovowy i ksylen w POCH S.A (Polska).

Wszystkie analizy wykonywano w sześciu powtórzeniach a w trakcie wykonywania wszystkich etapów analiz w laboratorium utrzymywano temperaturę ok. $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Wyniki wyrażono w mg analitu na 100g produktu.

Metoda spektrofotometryczna oznaczenia zawartości kwasu askorbinowego

Oznaczenie prowadzono wg znormalizowanej metody PN-A-04019:1998 „Produkty spożywcze - Oznaczanie zawartości witaminy C”, polegającej na ilościowym utlenieniu w środowisku kwaśnym kwasu askorbinowego do dehydroaskorbinowego za pomocą nadmiaru 2,6-dichlorofenolindofenolu, następnie na ekstrakcji nadmiaru barwnika za pomocą ksylenu i spektrofotometrycznym oznaczeniu nadmiaru barwnika przy długości fali 500 nm na spektrofotometrze V-630 (Jasco).

Metoda chromatograficzna oznaczania zawartości kwasu askorbinowego

Przygotowanie próbki do analizy

Próbkę odważano z dokładnością do 1 mg (m_p), następnie dodawano 2% roztwór kwasu metafosforowego i ponownie wyznaczano masę próbki z kwasem metafosforowym (m_{p+k}). Obliczano współczynnik rozcieńczenia (F), który następnie wykorzystywano w określeniu zawartości analitu w próbce. Próbkę filtrowano z użyciem filtra strzykawkowego o porowatości 0,45 μm .

$$F = \frac{m_{p+k}}{m_p} \quad (1)$$

Analiza chromatograficzna

Do analizy kwasu askorbinowego wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych. Zestaw do HPLC wyprodukowany przez firmę Varian (USA), wyposażony był w detektor z matrycą diodową (DAD, model 335), pompę izokratyczną (model 210) zawór dozujący 7725 i (Rheodyne, USA) i termostat kolumn. Sterowanie i akwizycja danych odbywała się przy użyciu Galaxie Chromatography Data System wersja 1.9.302 (Varian, USA). Do przeprowadzenia rozdziału chromatograficznego zastosowano kolumnę chromatograficzną Gemini (150 x 4,6 mm, 3 μm , C18) połączoną z prekolumną Gemini (C18 4x3 mm) firmy Phenomenex (USA). Do układu chromatograficznego dozowano 20 μL ekstraktu. Fazę ruchomą stanowił roztwór kwasu ortofosforowego o pH=2,8 i natężeniu przepływu 0,6 mL/min. Chromatogramy rejestrowano przy 244 nm i temperaturze kolumny 30°C. Stężenie kwasu askorbinowego w analizowanym ekstrakcie wyznaczono z równania krzywej kalibracyjnej sporządzonej na podstawie wyników analizy roztworów wzorcowych. Identyfikację kwasu askorbinowego przeprowadzono na podstawie czasu retencji oraz widma UV substancji wzorcowej. Zawartość kwasu askorbinowego w próbce wyznaczano na podstawie wzoru (2)

$$AA_p = \frac{C_{AA} \cdot F}{10} \quad (2)$$

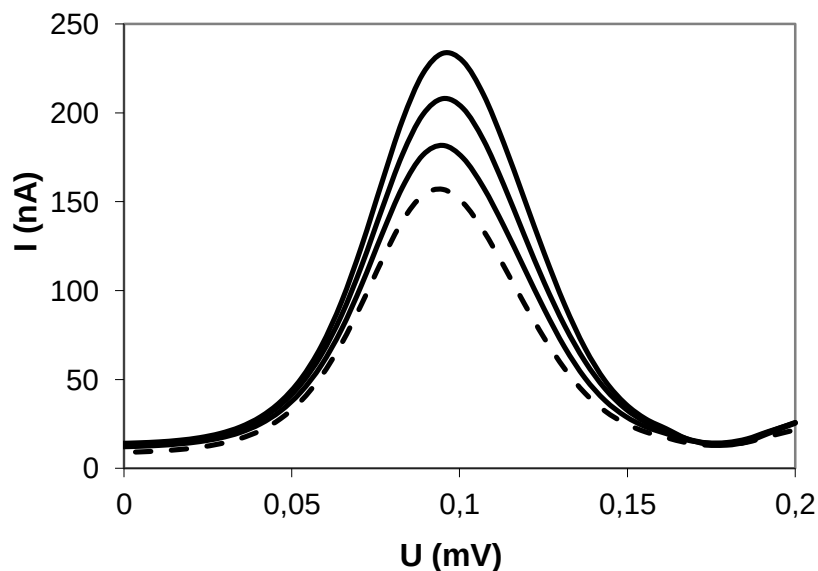
gdzie: C_{AA} – stężenie kwasu askorbinowego w ekstrakcie ($\mu\text{g/mL}$)

Przeprowadzono walidację chromatograficznej metody odniesienia, którą szczegółowo opisano w artykule Mazurek i Jamroz [2015]. Wykazano, że metoda jest liniowa, w zakresie stężeń 2,5 – 100 $\mu\text{g/mL}$ i precyzyjna. Granica wykrywalności kwasu askorbinowego wyznaczona na podstawie parametrów krzywej wzorcowej wynosi 0,163 mg/100g a granica oznaczalności 0,49 mg/100g. Poprawność metody chromatograficznej wyznaczono, poprzez przeprowadzenie analizy próbki certyfikowanego materiału odniesienia (BCR 431, IRMM, Belgia). Porównanie otrzymanej wartości średniej (500,3 $\pm$ 10,2 mg/100g) z wartością

certyfikowaną ($483 \pm 9,8$ mg/100g) wskazuje na brak istotnych statystycznie różnic co świadczy o poprawności metody.

Metoda oznaczania zawartości kwasu askorbinowego techniką impulsowej polarografii różnicowej (DPP).

Przygotowanie próbki do analizy kwasu askorbinowego oraz wyznaczenie współczynnika rozcieńczenia (F), było analogiczne jak w analizie chromatograficznej. W badaniach wykorzystano woltamperometryczny analizator śladów 746 VA firmy Metrohm ze stanowiskiem pomiarowym VA 747 Stand. Zastosowano układ trójelektrodowy, w którym elektrodą pracującą jest kroplowa elektroda rtęciowa a pomocniczą platynowa. Potencjał elektrody pracującej mierzono w stosunku do elektrody odniesienia Ag/AgCl/KCl. Oznaczenie ilościowe prowadzono metodą trzykrotnego dodatku standardu za pomocą automatycznego dozownika standardu Dosino 700 (Metrohm). Zawartość kwasu askorbinowego w próbce wyznaczono na podstawie wzoru (2). Oznaczenie jakościowe kwasu askorbinowego prowadzono w oparciu o porównanie potencjału jego pików (otrzymanego z analizy próby) z potencjałem pików otrzymanych po trzykrotnym dodaniu do próby roztworu wzorcowego (Rys. 1). Bezpośrednio do naczynka polarograficznego dodawano 10 mL buforu octanowego o pH 4,6 oraz 0,5 mL ekstraktu analizowanej próby. Przed pomiarem polarograficznym roztwór przepłukiwano przez 5 minut argonem celem usunięcia tlenu. Podczas analizy polarograficznej zastosowano następujące warunki: potencjał początkowy: -50 mV, potencjał końcowy: 200 mV, czas trwania impulsu: 40 ms, amplituda impulsu: 50 mV.



Rys. 1. Polarogramy kwasu askorbinowego z ekstraktu próby (linia przerywana) i trzykrotnego dodatku roztworu wzorcowego (linie ciągłe)

Porównanie wyników, otrzymanych z wykorzystaniem polarograficznej i spektrofotometrycznej metody z wynikami z chromatograficznej metody odniesienia przeprowadzono wykorzystując metodę obliczania stosunku średnich wyników i niepewności jego wyznaczenia [Konieczka i Namieśnik, 2009].

Polega ona na obliczeniu stosunku P wartości średnich wyników oznaczeń oraz niepewności U dla tak wyznaczonej wartości P . Wnioskowanie przebiega w następujący sposób: jeżeli w przedziale wyznaczonej wartości obliczonego stosunku $P \pm$ niepewność U jego wyznaczenia ($P - U$, $P + U$) zawiera się wartość 1, należy wnioskować, iż porównywane wartości średnie nie różnią się między sobą w sposób statystycznie istotny. Obliczenia wartości P i U wykonywano korzystając ze wzorów:

$$P = \frac{X}{X_{HPLC}} \quad (3)$$

$$U = k \frac{\sqrt{s^2 + s_{HPLC}^2}}{\left(\frac{X + X_{HPLC}}{2} \right)} \quad (4)$$

gdzie:

X – średnie stężenie wyznaczone metodą spektrofotometryczną lub polarograficzną

X_{HPLC} – średnie stężenie wyznaczone metodą chromatograficzną

k – współczynnik rozszerzenia wynoszący 2 (dla przedziału ufności 95%)

s – odchylenie standardowe wyników uzyskanych metodą spektrofotometryczną lub polarograficzną

s_{HPLC} – odchylenie standardowe wyników uzyskanych metodą chromatograficzną

Wyniki i dyskusja

W związku z brakiem opracowanej, uznanej międzynarodowo metody oznaczania witaminy C w przeprowadzonych badaniach, jako metodę odniesienia wybrano metodę wykorzystującą technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z detektorem z matrycą diodową, gdyż w wyniku połączenia rozdziału chromatograficznego i jednoczesnej rejestracji widma w zakresie UV oznaczanych substancji umożliwia ona uzyskanie wysokiej selektywności. Tabela 1 zawiera porównanie wyników analiz kwasu askorbinowego uzyskanych metodą spektrofotometryczną i chromatograficzną. Otrzymane wyniki wykazują statystycznie istotne różnice w przypadku nektaru z czarnej porzeczki oraz soków jabłkowego wielowarzywnego i multiwitaminowego. Jedynie w przypadku analizy kwasu askorbinowego w soku pomarańczowym uzyskano zgodne wyniki. Spowodowane jest to występowaniem w różnym stopniu, w analizowanych produktach, związków interferujących w spektrofotometrycznym oznaczeniu kwasu askorbinowego, inne substancje redukujące obecne w próbce mogą redukować 2,6-dichlorofenolindofenol i zawyżać otrzymane wyniki analiz.

Największą różnicę zaobserwowano w przypadku analizy próbki nektaru z czarnej porzeczki. W badaniach przeprowadzonych przez Danielczuk i wsp. [2004] spektrofotometryczna metoda zgodna z ISO 6557/2, a więc i z Polską Normą PN-A-04019:1998 została użyta jako metoda odniesienia, w porównaniu z metodą enzymatyczną. Porównanie przeprowadzono metodą analizy funkcji regresji wyników uzyskiwanych w próbach równoległych. Wyniki tych badań wskazują na otrzymywanie niezgodnych wyników analiz zawartości kwasu askorbinowego w soku porzeczkowym. Metody spektrofotometryczne dzięki dostępności i łatwości wprowadzenia do analiz rutynowych, są szeroko wykorzystywane, jednak żadna z nich nie jest wystarczająco specyficzna [Arya i in., 1998]. Hernández i wsp. [2006] przeprowadzili badania analizy zawartości witaminy C w owocach tropikalnych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, które porównali z wynikami uzyskanymi znormalizowaną metodą miareczkową z użyciem 2,6-dichlorofenolindofenolu [AOAC, 1990], która jest równoważna z metodą miareczkową opisaną w Polskiej Normie PN-A-04019. W wyniku tych badań stwierdzono równoważność wyników otrzymanych obiema metodami analitycznymi, co mogło być spowodowane mniejszą zawartością substancji interferujących w oznaczanej matrycy prób, podczas oznaczenia witaminy C metodą miareczkową.

Tab. 1. Porównanie wyników analiz uzyskanych metodą spektrofotometryczną (PN-A-04019) z chromatograficzną metodą odniesienia (HPLC-DAD).

Próba	PN-A-04019		HPLC-DAD		P	U	Zgodność
	średnia (mg/100g)	s (mg/100g)	średnia (mg/100g)	s (mg/100g)			
sok jabłkowy	41,06	1,96	34,89	1,14	1,18	0,12	nie
nektar z czarnej porzeczki	24,96	1,32	16,52	0,60	1,51	0,14	nie
sok pomarańczowy	26,23	0,76	24,27	0,94	1,08	0,10	tak
sok wielowarzywny	11,63	0,62	9,89	0,32	1,18	0,13	nie
sok multiwitaminowy	14,35	0,67	11,49	0,42	1,25	0,12	nie

W Tabeli 2 przedstawiono porównanie wyników analiz zawartości kwasu askorbinowego uzyskanych metodą impulsowej polarografii różnicowej z chromatograficzną metodą odniesienia. W przypadku analiz wszystkich badanych prób nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Metoda impulsowej polarografii różnicowej pozwala uzyskać wiarygodne i precyzyjne wyniki

charakteryzujące się wysoką zgodnością z chromatograficzną metodą odniesienia. Podobne wnioski przedstawili Esteve i wsp. [1995], którzy porównali polarograficzną i chromatograficzną metodę oznaczania kwasu askorbinowego w preparatach dla niemowląt.

Tab. 2. Porównanie wyników analiz uzyskanych metodą impulsowej polarografii różnicowej (DPP) z chromatograficzną metodą odniesienia (HPLC-DAD).

Próba	DPP		HPLC-DAD		P	U	Zgodność
	średnia (mg/100g)	s (mg/100g)	średnia (mg/100g)	s (mg/100g)			
sok jabłkowy	35,99	0,94	34,89	1,14	1,03	0,08	tak
nektar z czarnej porzeczki	15,26	0,50	16,52	0,60	0,92	0,10	tak
sok pomarańczowy	22,61	0,81	24,27	0,94	0,93	0,11	tak
sok wielowarzywny	10,55	0,45	9,89	0,32	1,07	0,11	tak
sok multiwitaminowy	10,46	0,75	11,49	0,42	0,91	0,16	tak

W pracy tej wykazano, że obie metody prowadzą do uzyskania statystycznie jednakowych wyników. Metoda impulsowej polarografii różnicowej jest równorzędna w stosunku do chromatograficznej metody odniesienia a jej główną zaletą jest duża czułość i selektywność. Metoda polarograficzna może być rekomendowana do rutynowych analiz, w związku z krótkim czasem wykonania i prostotą analizy.

Wnioski

1. Metoda spektrofotometryczna analizy kwasu askorbinowego wykorzystująca 2,6-dichlorofenoloindofenol charakteryzuje się niską selektywnością i powinna być stosowana ze szczególną ostrożnością gdyż w wielu przypadkach prowadzi do otrzymania zawyżonych wyników.
2. Metoda analizy kwasu askorbinowego wykorzystująca impulsową polarografię różnicową prowadzi do otrzymania wyników zgodnych z chromatograficzną metodą odniesienia.
3. W związku z krótkim czasem wykonania i prostotą analizy metoda polarograficzna może być rekomendowana do rutynowych analiz.

Praca została sfinansowana w ramach działalności statutowej z dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Literatura

- [1] AOAC: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Arlington VA: Association of Official Analytical Chemists; 1990, 1058-1059.
- [2] Arya S.P., Meenakshi M., Preeti J.: Photometric Methods for the Determination of Vitamin C. *Analytical Sciences*, 1998, 14, 889-895.
- [3] Arya S.P., Mahajan M., Jain P.: Spectrophotometric determination of vitamin C with iron(II)-4-(2-pyridylazo)resorcinol complex. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 427(2), 245–251.
- [4] Bates C.J.: Plasma vitamin C assays: a European experience. EC FLAIR Concerted Action No. 10: Micronutrient Measurement, Absorption and Status. *International Journal for Vitamin and Nutrition*, 1994, 64, 283-287.
- [5] Block G.: Human data on vitamin C in cancer prevention. In: *Vitamin and cancer prevention*. Bray G.A., Ryan D.H. Pennington Center Nutrition Series, LSU Press, Baton Rouge, LA, 1992, 3, 247–255.
- [6] Cancalon, P.: Routine analysis of ascorbic acid in citrus juice using capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International*, 2001, 84, 987-991.
- [7] Catani MV., Saviani I., Rossi A., Melino G., Avigliano L.: Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutrition Reviews*; 2005, 63(3), 81-90.
- [8] Chan A.C.: Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1993, 71(9), 725-731.
- [9] Danielczuk J., Pietrzykowski R., Zieliński W.: Comparative study of the enzymatic method for determination of vitamin C with routine methods according to ISO. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2004, 13/54, 1, 41.
- [10] Esteve M.J., Farré R., Frígola A., López J.C., Romera J.M., Ramírez M., Gil A.: Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chemistry*, 1995, 52(1), 99-102.
- [11] Fenoll J., Martínez A., Hellín P., Flores. P.: Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2011, 127, 340.
- [12] Garzarella L., Pilizota V.: Application of browning inhibitors to cut apple and potato by vacuum and pressure infiltration. *Journal of Food Science*, 1990, 55, 1049-1053.
- [13] Hernández Y., Gloria Lobo M., González M.: Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 2006, 96, 4, 654-664.
- [14] Konieczka P., Namiesnik J.: *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory. A Practical Approach*. CRC Press 2009, 180.

- [15] Lattanzio V., Linsalata V., Palmieri S., Van Sumere C.: The beneficial effect of citric and ascorbic acid on the phenolic browning reaction in stored artichoke heads. *Food Chemistry*, 1989, 33, 93-106.
- [16] Mazurek A., Pankiewicz U.: Changes of dehydroascorbic acid content in relation to total content of vitamin C in selected fruits and vegetables. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 2012, 11(6), 169-177.
- [17] Mazurek A., Jamroz J.: Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method – Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food. *Food Chemistry*, 2015, 173, 543–550.
- [18] Newsome R.L.: Use of vitamins as additives in processed foods. *Food Technology*, 1987, 41(9), 163-168.
- [19] Novakova L., Solich P., Solichova D.: HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(10), 942-957.
- [20] Schlueter A.K., Johnston C.S.: Vitamin C: Overview and Update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* January, 2011, 16, 49-57.
- [21] Smirnoff N.: Ascorbic acid metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Physiology*, 2000, 3, 229–235.
- [22] Tomás-Barberán F.A., Gil M.I.: *Improving Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products*. Woodhead Publishing Limited, 2008.
- [23] Wawrzyniak J., Ryniecki A., Zemkowski W.: Application of voltametry to determine vitamin C in apple juices. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 2005, 4(2), 5-16.
- [24] Willie F.U., Ekop A.S.: Titrimetric determination of vitamin C in natural and commercial fruit juice samples using a locally extracted dye. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 2007, 4(2), 429–436.
- [25] Wu X., Diao Y., Sun C., Yang J., Wang Y., Sun S.: Fluorimetric determination of ascorbic acid with o-phenylenediamine. *Talanta*, 2003, 59(1), 95–99.

ZDOLNOŚĆ RÓŻNYCH ZAKWASÓW PIEKARSKICH DO DEGRADACJI TRICHOTECENÓW Z GRUPY B W CIEŚCIE ŻYTNIM

JAROSŁAW MAZURKIEWICZ, STANISŁAW MLEKO, MARTA
TOMCZYŃSKA-MLEKO, ANNA STÓJ, ALDONA SOBOTA, EWA
SOLARSKA

Streszczenie

W pracy przebadano pięć różnych zakwasów piekarskich pochodzących z piekarni z okolic Lublina pod kątem ich efektywności w degradacji mikotoksyn fuzaryjnych: deoksyniwalenolu (DON), 3 i 15-acetylodeoksyniwalenolu (3 i 15AcDON) i niwalenolu (NIV) podczas fermentacji w cieście żytnim. Jako dodatkową opcję do porównania z zakwasami wykorzystano do fermentacji ciasta bakterie szczepu *Lactobacillus fermentum*. Zastosowano w tym celu sztucznie skażoną tymi mikotoksynami mąkę do poziomu 1mg/kg i przeprowadzono fermentację trwającą 12 i 24 godziny. Zawartość pozostałych po fermentacji mikotoksyn analizowano metodą chromatografii gazowej GC/MS.

Z pięciu przebadanych zakwasów najlepszym stopniem degradacji mikotoksyn okazał się zakwas nr 2, ze średnią redukcją 47%. Jednak maksymalny wynik ograniczania zawartości mikotoksyny uzyskał zakwas 3 podczas dekontaminacji deoksyniwalenolu, który został zredukowany aż o 88,05%. Średni zakres degradacji mikotoksyn przez badane zakwasy mieścił się w granicach od 34% do 47%. Jednak bardziej widoczne były różnice w degradacji pojedynczych mikotoksyn. Maksymalny wynik ograniczania zawartości mikotoksyny uzyskano przy dekontaminacji deoksyniwalenolu, który został zredukowany przez jeden z zakwasów aż o 88%, Natomiast przez inny zakwas ta sama mikotoksyna została zredukowana tylko o 12%. Wydłużony czas fermentacji w większości przypadków nie miał znaczenia na obniżenie poziomu mikotoksyn, ale w kilku przypadkach spowodował jeszcze wyższą redukcję mikotoksyn.

Słowa kluczowe: zakwasy piekarskie, deoksyniwalenol, niwalenol, degradacja, chromatografia gazowa, GC/MS

Wprowadzenie

Mikotoksyny są grupą związków zaliczanych do wtórnych metabolitów grzybów pleśniowych, głównie z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Występują w wielu produktach pochodzenia roślinnego, najczęściej wykrywane są w zbożach i ich przetworach. Te wtórne produkty przemiany materii nie mają

bezpośredniej roli w procesach wzrostu grzybni, jednak są produkowane głównie w warunkach deficytu składników pokarmowych, wymaganych do wzrostu grzyba [Grajewski 2006]. W Polsce zatrucia mikotoksynami nie są często spotykane, mimo to trzeba uważać na jakość pożywienia, gdyż nawet bardzo małe ilości mikotoksyn w spożytym pokarmie mogą doprowadzić do poważnych dolegliwości żołądkowych, zatrucia i zmiany w organizmie ludzkim [Stępień i in. 2007].

Spożywanie żywności lub podawanie paszy skażonej mikotoksynami wywołuje różne choroby u ludzi i zwierząt określane jako mikotoksykozy (np. nowotwory, krwotoki). Stanowią one bezpośrednie zagrożenie dla człowieka i zwierząt stałocieplnych. Dlatego też istnieje konieczność monitorowania występowania tych związków w artykułach spożywczych oraz ich dekontaminacja [Pokrzywa i inni 2007]. W różnych badaniach naukowych, których celem była eliminacja mikotoksyn wykorzystano takie organizmy jak: bakterie *Acinetobacter calcoaceticus*, grzyby pleśniowe *Aspergillus Niger*, bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* oraz drożdże z rodzaju *Saccharomyces* [Śliżewska 2008].

Szczególną uwagę należy zwrócić na bakterie fermentacji mlekowej ze względu na ich korzystne oddziaływanie na organizm człowieka oraz szerokie zastosowanie w produkcji żywności fermentowanej. Wiele badań potwierdza, ich zdolność do rozkładania różnych mikotoksyn takich jak: aflatoksyny B1, ochratoksyny A, DON, NIV, ZEA, fumonizyny FB1 i FB2, tak więc wykorzystanie niektórych szczepów LAB może stać się alternatywą dla innych metod rozkładu mikotoksyn [Mazurkiewicz i in. 2012; Mazurkiewicz 2011]. Bakterie te hamują wzrost pleśni oraz tworzenie przez nie mikotoksyn. Probiotyki zwiększają wykorzystanie paszy poprzez produkcję i działanie enzymów hydrolitycznych [Śliżewska 2008].

Wśród różnych mikroorganizmów mających zdolność do degradacji mikotoksyn bakterie fermentacji mlekowej stanowią unikalną grupę, mającą szerokie zastosowanie w fermentacji i konserwowaniu żywności [Shetty i Jespersen 2006]. Wielu badaczy sugeruje, że bakterie fermentacji mlekowej hamują rozwój pleśni, bakterii patogennych, ponieważ syntetyzują kwas mlekowy i inne metabolity, które mogą również powodować degradację mikotoksyn. Do tych mikroorganizmów należą: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis* [Fusch i in. 2008].

Kultury starterowe, o określonym składzie mikroflory, po zaszczerpieniu nimi ciasta warunkują prawidłowy i powtarzalny przebieg fermentacji i wpływają na poprawę jakości pieczywa [Ostasiewicz i in. 2008]. Spośród bakterii homofermentacyjnych najczęściej spotykanym gatunkiem w kulturach starterowych jest *L. plantarum*, natomiast wśród heterofermentacyjnych *L. brevis* i *L. sanfranciscensis* [Piasecka-Jóźwiak i Rozmierska 2012].

Celem przeprowadzonej pracy było określenie zdolności dostępnych na rynku zakwasów piekarskich do degradacji nivalenolu, deoksyniwelanolu oraz jego pochodnych podczas fermentacji ciasta żytniego i wybranie najlepszego z przeznaczeniem do zastosowania jako kultury starterowej do produkcji pieczywa.

Material i metody badań

Do badań użyto wzorców mikotoksyn deoksyniwalenol, niwalenol, 3-acetyloodeksyniwalenol, 15- acetyloodeksyniwalenol. o stężeniu 200ug/ml, (SIGMA-ALDRICH).

Zakwasy pochodziły z piekarń z okolic Lublina. Zostały one oznaczone symbolami jako zakwas 1, zakwas 2, zakwas 3, zakwas 4, zakwas 5.

Jako dodatkową opcję do porównania z zakwasami wykorzystano do fermentacji ciasta bakterie szczepu *Lactobacillus fermentum* i próbę oznaczono jako bakterie. Bakterie pochodziły z kolekcji Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie i hodowane były na bulionie MRS, pochodzącym z Zakładów Enzymów i Peptonów w Łodzi. Do przygotowania ciasta wykorzystano mąkę żytnią typ 750 pochodzącą z młyna Szczepanki Sp. z o.o.

Przygotowanie bakterii

Do szklanej kolby zawierającej 250 cm³ sterylnego bulionu MRS zaszczerpiono 6 cm³ inokulum po 24 godzinnej hodowli. Następnie próbówki inkubowano w cieplarni TYP-CEE-2 firmy TERMOMETA przez 24 godziny w temperaturze 37°C (optymalnej temperaturze wzrostu). Po inkubacji oszacowano stężenie komórek bakterii za pomocą pomiaru OD przy długości fali 600 nm na spektrofotometrze PLUS firmy Biorad. Przed pomiarem próbówki wstrząsano na wortexie TTS firmy IKA WORKS INC w celu równomiernego rozmieszczenia komórek na całej objętości MRS. Do badań użyto hodowli płynnej o stężeniu OD równym 1,7. Następnie MRS z bakteriami przelewano do próbek wirówkowych i wirowano w wirówce CENTRIFUGE typ MPW 310 przy 12 000 g przez 15 min. po odwirowaniu supernatant usuwano, a do próbek z odwirowanymi komórkami bakterii dodawano 5 cm³ wody destylowanej i wortexowano.

Przygotowanie ciasta

Do zlewki o pojemności 100 cm³ odważano po 10 g mąki żytniej typ- 750 , następnie dodano 10 cm³ wody. Do każdej zlewki dozowano 15 µl wcześniej przygotowanego roztworu odpowiedniej toksyny. Następnie dodawano 2,5 g zakwasu. Mieszano do uzyskania konsystencji ciasta, a następnie dzielono na pół i poddawano 12-godzinnej i 24- godzinnej fermentacji. W przypadku próbek z bakteriami *Lactobacillus fermentum*, do zlewki dodawano 6 cm³ wody, 11 g mąki oraz odpowiednie mikotoksyny, a następnie . 5 g wortexowanych bakterii. Mieszano do uzyskania konsystencji ciasta. Tak przygotowane próbki wstawiano do cieplarki Termometa Typ CWE-2, gdzie zachodziła fermentacja w temperaturze 32°C przez 12 i 24 godziny. Po zakończeniu fermentacji próbki mrożono do temperatury -80°C, a następnie liofilizowano w liofilizatorze LABCONCO REEZONE. Wykonano także próby zerowe, do których nie dodawano mikotoksyn oraz takie do których nie dodawano zakwasu i nie poddawano fermentacji.

Analiza chromatograficzna GC/MS

Liofilizowane próbki zmielono w młynku elektrycznym (typ- WŻ), odważono 5 g i umieszczono w kolbie stożkowej. Następnie dolano do nich 20 cm³ mieszaniny acetonitryl - woda (w stosunku 84:16) i umieszczono w wytrząsarce firmy ELPIN+ water Bath shaker typ 357 na 10 minut. Po tym czasie przesączono mieszaninę przez sącze do kolb stożkowych. Otrzymany ekstrakt przepuszczono przez złożę w kolumnkach chromatograficznych do probówek. Następnie z probówek pobrano 2 cm³ filtratu do fiolek. Tak przygotowane próbki umieszczono na 24 godziny w komorze próżniowej firmy VARIAN do całkowitego wysuszenia.

Po wysuszeniu próbek dokonano ich derywatyzacji, czyli przeprowadzenia trudno lotnej toksyn w jej lotne i trwałe pochodne. W tym celu do każdej fioleki dodano 0,1 cm³ roztworu DMAP w mieszaninie toluen:acetonitryl (w stosunku 80:20) i 0,05 cm³ PFPA (bezwodnik pentafluoropropionowy 99%) jako odczynnik derywatyzacyjny.

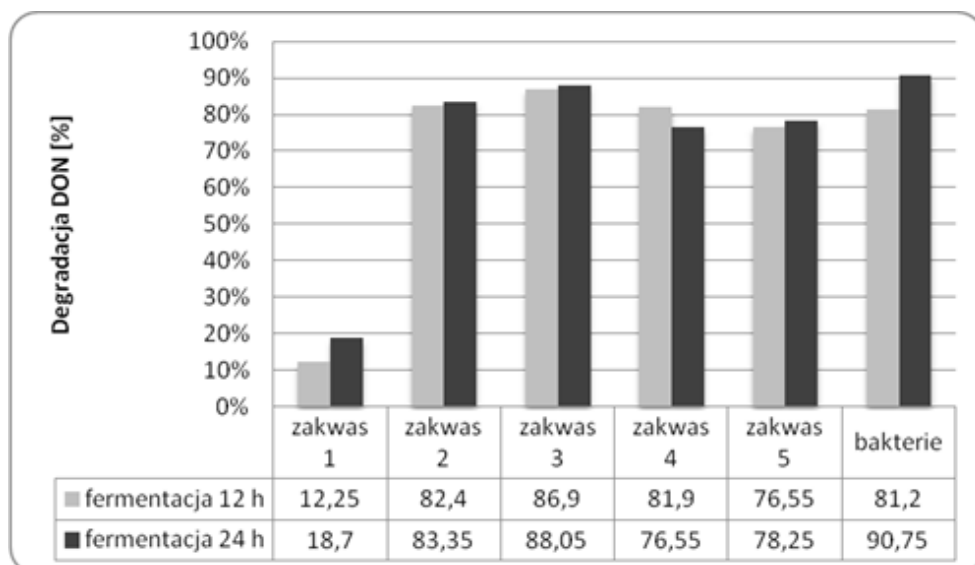
Zamknięte fioleki ogrzewano w cieplarni Zetemet SML32/250 w temperaturze 60°C przez 60 minut. Po ochłodzeniu próbek dodano 1 cm³ 3% roztworu NaHCO₃, i dobrze wymieszano. Po utworzeniu się dwóch frakcji pobierano 60µl frakcji toluenowej do analizy chromatograficznej

Analiza mikotoksyn została wykonana na chromatografii gazowej ze spektrofotometrem mas GC- MS QP 2010 PLUS firmy SHIMADZU z kolumną kapilarną Factor Four: VF-1 ms, wymiary: 30m; 0,32 mm; IDDF= 0,25 µm firmy VARIAN.

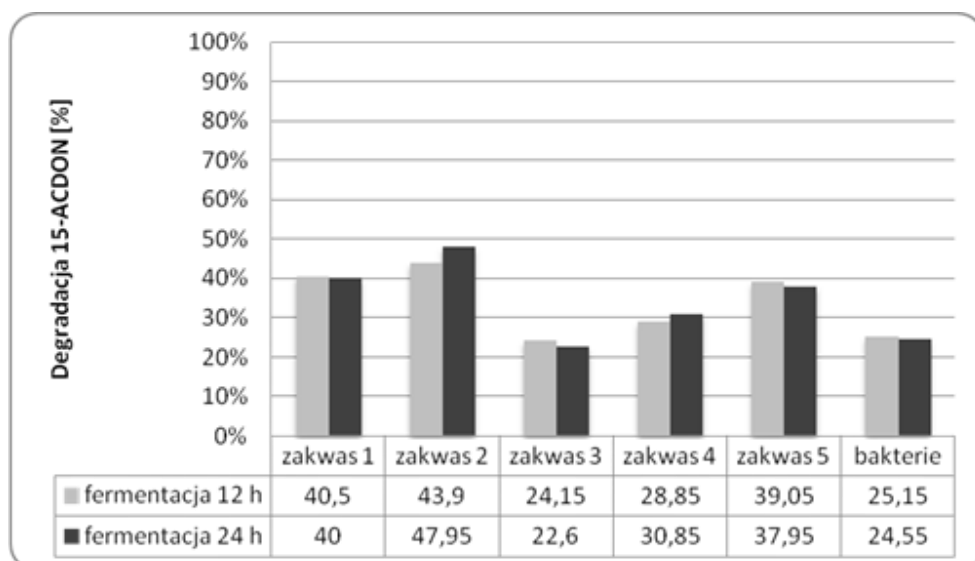
Temperatura dozownika wynosiła 250°C, program iniekcji „Splitless”. Gazem nośnym był hel o stałym przepływie kolumnowym 0,88 cm³/min. Detektor pracował w temperaturze 220°C. Energia jonizacji wynosiła 90 V. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Najlepsze wyniki degradacji toksyny DON w czasie 24- godzinnej fermentacji ciasta z mąki żytniej wykazały bakterie *Lactobacillus fermentum*, które zdegradowały aż 90,75% toksyny (Rys. 1). W tym przypadku na degradację DON miał również wpływ czas, gdyż w ciągu 12- godzinnej fermentacji ciasta, mniejsza ilość toksyny została zredukowana niż w ciągu 24 godzin. Równie dobre rezultaty uzyskał zakwas numer 3, jednak w tym przypadku długość fermentacji ciasta miała mniejsze znaczenie niż w przypadku bakterii. Zdecydowanie gorsze wyniki uzyskał zakwas numer 1, który zdegradował toksynę tylko o 12,25% w ciągu 12 godzin oraz o 18,7% w czasie 24-godzinnej fermentacji. Zakwasy 2, 3 oraz 4 i 5 wykazały podobną aktywność w redukcji mikotoksyny. Czas fermentacji w przypadku tych zakwasów (2, 3, 5) nie miał większego znaczenia.



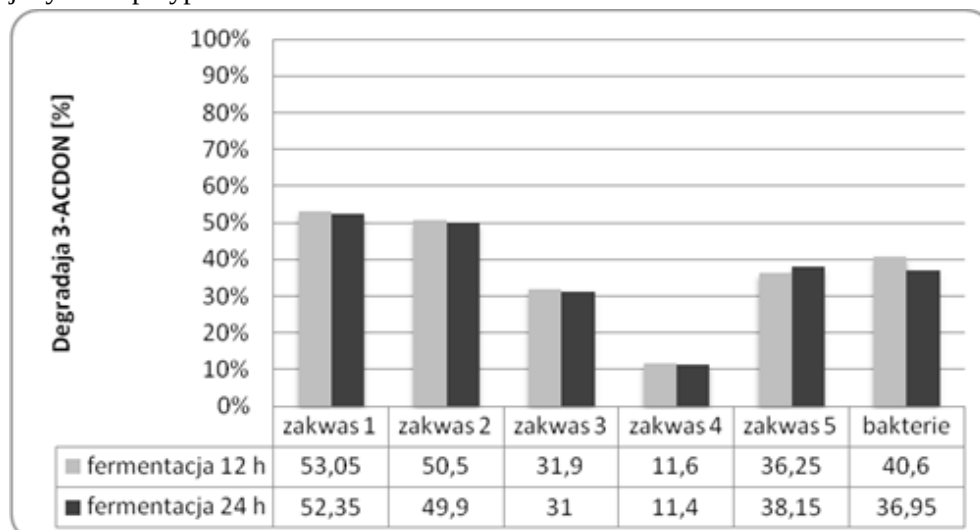
Rys. 1. Degradacja deoksyniwalenolu podczas 12 i 24- godzinnej fermentacji ciasta z mąki żytniej przez zakwasy i bakterie *Lactobacillus fermentum*.



Rys. 2. Degradacja 15-ACDON podczas 12 i 24- godzinnej fermentacji ciasta z mąki żytniej przez zakwasy i bakterie *Lactobacillus fermentum*.

W przypadku degradacji 15- acetylodeoksyniwalenolu najlepsze wyniki uzyskał zakwas 2, który podczas 24- godzinnej fermentacji, zredukował 47,95% toksyny, natomiast w czasie 12 godzin zawartość spadła o 43,9% (Rys. 2). Równie dobre rezultaty uzyskały zakwasy 1 oraz 5 które zmniejszyły poziom toksyny, kolejno o 40,5% (12 godzin) oraz 30,85% (24 godziny). Zakwas 4 oraz bakterie o 28,85% i 24,55%.

odznaczyły się podobnym stopniem redukcji toksyny 15- AcDON, degradując kolejno 30,85% (24 godziny) oraz 25,15% (12 godzin). Najgorsze rezultaty, jednak nie odbiegające bardzo od pozostałych wyników, uzyskał zakwas numer 3 obniżając poziom toksyny o 22,6% w ciągu 24 godzin oraz 24,15% (12 godzin). W tym przypadku, dłuższy czas fermentacji ciasta, okazał się bardziej efektywny jedynie w przypadku zakwasu numer 2.

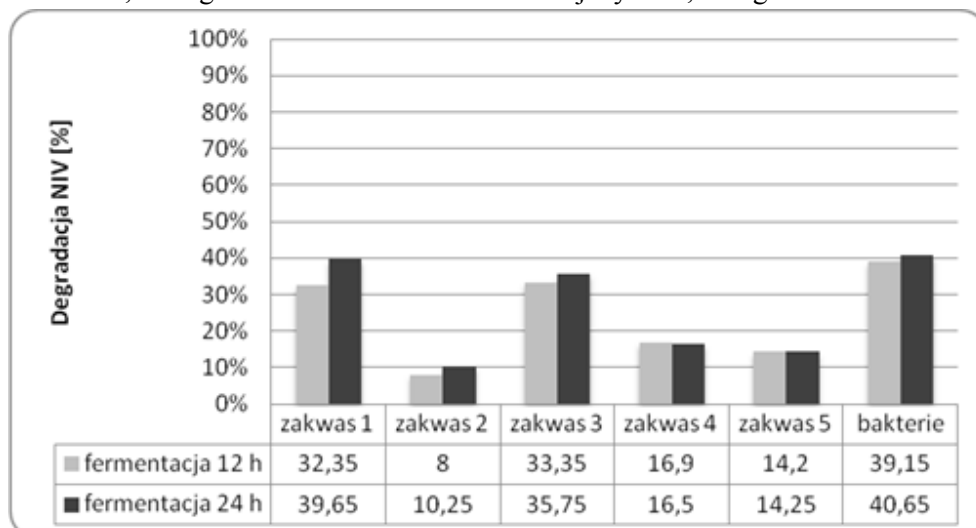


Rys. 3. Degradacja 3-ACDON podczas 12 i 24- godzinnej fermentacji ciasta z mąki żytniej przez zakwasy i bakterie *Lactobacillus fermentum*.

Najlepsze wyniki degradacji toksyny 3- acetyloodeksyniwaleonolu uzyskał zakwas numer 1, który zredukował aż 53,05% (12 godzin) tej mikotoksyny (Rys. 3). Podobne rezultaty zostały osiągnięte przez zakwas numer 2, który zredukował średnio 50,2% toksyny. Zakwasy 3 i 5 oraz bakterie odznaczyły się podobnym stopniem redukcji toksyny 3-AcDON, degradując odpowiednio 31,9%, 38,15% oraz 40,6%. Natomiast zakwas 4 najgorzej zredukował 15-AcDON zmniejszając poziom toksyny o 11,6%. Dłuższy czas fermentacji ciasta, podobnie jak w przypadku toksyny 3-AcDON nie miał większego znaczenia. Wyniki uzyskane podczas 12 godzinnej fermentacji okazały się bardzo podobne, a w kilku przypadkach nieznacznie lepsze.

Niwalenol najlepiej został zredukowany przez bakterie, które obniżyły jego poziom o 40,65% w ciągu 24- godzinnej fermentacji (Rys. 4). Około 39,65% zostało zdegradowane podczas 24- godzinnej fermentacji przez zakwas numer 1. Równie dobre wyniki uzyskał zakwas numer 3, który zdegradował 35,75% (po 24 godz.). Znacznie gorsze wyniki otrzymano z zakwasów 4 i 5, które zdegradowały kolejno 16,5% oraz 14,25% toksyny. Najmniejszą redukcję wykazał zakwas 2, który zdegradował średnio 9,12%. Jedynie w przypadku zakwasów numer 1 oraz 3 dłuższy czas fermentacji okazał się być skuteczniejszy.

Wyniki zawarte w Tabeli 1 wykazują, iż zakwasy, jak również bakterie najlepiej degradowały deoksyniwalenol, którego w wyniku degradacji z początkowej wartości 1mg/kg przed fermentacją średnio pozostało 0,27 mg, natomiast bakterie *Lactobacillus fermentum*, w ciągu 24 godzin zdegradowały aż 0,91 mg tej mikotoksyny. Najgorzej degradowaną mikotoksyną okazał się niwalenol, którego zakwas numer 2 zredukował jedynie 0,08 mg.



Rys. 4. Degradacja niwalenolu podczas 12 i 24- godzinnej fermentacji ciasta z mąki żytniej przez zakwasy i bakterie *Lactobacillus fermentum*.

Najlepszym zakwasem, który średnio najlepiej rozkładał wszystkie mikotoksyny okazał się zakwas numer 2. Jednak najlepiej degradowane były mikotoksyny przez bakterie *Lactobacillus fermentum*, które redukowały toksyny średnio o 48%. Najmniejszą redukcję wykazał zakwas numer 4, który degradował średnio 34%. Wydłużony czas fermentacji praktycznie nie miał znaczenia przy obniżaniu poziomu mikotoksyn. Wyniki redukcji toksyn po 12 godz. fermentacji, w niewielkim stopniu różniły się od wyników osiągniętych podczas 24 godzin.

Tab. 1. Pozostałości mikotoksyn po 12 i 24- godzinnej fermentacji ciasta z mąki żytniej z dodatkiem odpowiednich zakwasów i bakterii *Lactobacillus fermentum*.

Użyte zakwasy	Pozostałości mikotoksyn [mg/kg]							
	Deoksyniwalenol		3-AcDON		15-AcDON		Niwalenol	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Zakwas 1	0,88	0,81	0,47	0,48	0,60	0,60	0,68	0,60
Zakwas 2	0,18	0,17	0,50	0,50	0,56	0,52	0,92	0,90
Zakwas 3	0,13	0,12	0,68	0,69	0,76	0,77	0,67	0,64
Zakwas 4	0,18	0,23	0,88	0,89	0,71	0,69	0,83	0,84
Zakwas 5	0,23	0,22	0,64	0,62	0,61	0,62	0,86	0,86
Bakterie	0,19	0,09	0,59	0,63	0,75	0,75	0,61	0,59

Stwierdzono, że jednym z lepszych sposobów eliminacji mikotoksyn z pieczywa jest wprowadzenie technologii produkcji pieczywa na zakwasach. Wraz z rozwojem bakterii mlekowych w zakwasie efektywnie zmniejsza się zawartość tych toksyn. Zakwaszenie ciasta skutecznie zapobiega rozwojowi pleśni na wyrobie końcowym zwiększając tym samym jego trwałość mikrobiologiczną [Diowski 2006].

W niniejszej pracy zbadano zdolność degradacji mikotoksyn: deoksyniwalenolu, 3-acetylodeoksyniwalenolu, 15-acetylodeoksyniwalenolu oraz niwalenolu przez zakwasy oraz bakterie *Lactobacillus fermentum*. Określono także wpływ czasu fermentacji na stopień ograniczenia zawartości powyższych toksyn w cieście żytnim.

Wyniki przeprowadzonych w tej pracy badań wykazują, iż użyte zakwasy posiadają zdolność do degradacji deoksyniwalenolu oraz jego pochodnych. Podobne właściwości wykazały bakterie *Lactobacillus fermentum*.

Jak się okazuje wydłużony czas fermentacji miał nieznaczny wpływ na stopień degradacji mikotoksyn. W niniejszej pracy otrzymano porównywalne wyniki degradacji mikotoksyn podczas dwunasto- i dwudziestoczerogodzinnej fermentacji ciasta z mąki żytniej. Potwierdzają to prace badawcze naukowców, których wyniki wskazują, iż degradacja toksyn przez ścianę komórkową *Saccharomyces cerevisiae* jest procesem szybkim. W badaniach Beajoui i in. [2004] redukcja ochratoksyny A po 5 minutach inkubacji wynosiła 90% i pozostawała niezmienną po 72 godzinach inkubacji. W badaniach Santos i in. [2000] adsorpcja toksyn okazała się również gwałtownym procesem zachodzącym w ciągu 2 minut. Shetty i in. [2007] wykazali, iż 75% redukcji aflatoksyny B₁ nastąpiło w pierwszych 30 minutach. Inne wyniki w swojej pracy otrzymały Piotrowska i Żakowska [2000], w której degradacja ochratoksyny A wynosiła 23% po 10 godzinach inkubacji oraz 41% po 24 godzinach.

W pracy, do badań zostały użyte, również bakterie *Lactobacillus fermentum*, które jak się okazało, najlepiej degradowały mikotoksyny z ciasta. Bakterie fermentacji mlekowej stanowią grupę, która jest szeroko stosowana w fermentacji i konserwowaniu żywności. Wykazują one zdolność do detoksyfikacji mikotoksyn fuzaryjnych takich jak deoksyniwalenol, toksyna T-2, HT-2 i zearalenon oraz aflatoksyn, ochratoksyn i patuliny [Fusch i in. 2008]. Bakterie fermentacji mlekowej produkują liczne związki o aktywności bakteriobójczej oraz hamujące wzrost m.in. grzybów. Istnieją trzy mechanizmy, które tłumaczą przeciwdrobnoustrojową aktywność szczepów LAB: produkcja kwasów organicznych, współzawodnictwo o substancje odżywcze oraz synteza antagonistycznych związków [Kapturowska 2010]. El- Nezami [2002] twierdzi, że za wiązanie mikotoksyn przez bakterie mlekowe odpowiadają polisacharydy oraz peptydoglikany zawarte w ścianie komórkowej bakterii. Nikoderm [2006] również uważa, że mechanizmem degradacji mikotoksyn jest ich wiązanie do ściany komórkowej bakterii.

Na stopień degradacji mikotoksyn fuzaryjnych wpływa wartość pH. Najwyższy poziom redukcji fumonizyny następuje w pH równym 4 i spada drastycznie w miarę zwiększania tej wartości. Zearalenon reaguje w niewielkim stopniu na zmianę pH. Natomiast skuteczność redukcji DON i NIV nie jest zależna od wartości pH.

Niewiele jest informacji na temat stabilności i toksyczności tworzonych podczas fermentacji kompleksu mikotoksyn z bakteriami kwasu mlekowego. Dlatego ważne są kolejne badania, by móc w pełni wykorzystać zdolności bakterii mlekowych do degradacji mikotoksyn w skali przemysłowej.

Wnioski

1. Z pięciu przebadanych zakwasów najlepszym stopniem degradacji mikotoksyn okazał się zakwas nr 2, ze średnią redukcją 47%. Jednak maksymalny wynik ograniczania zawartości mikotoksyny uzyskał zakwas 3 podczas dekontaminacji deoksyniwalenolu, który został zredukowany aż o 88,05%.
2. Najmniej efektywnie redukującym zakwasem był zakwas 4, ze średnią degradacją wynoszącą 34%. Jednak podczas redukcji niwalenolu zakwas 2 uzyskał najgorszy wynik degradując jedynie 8% toksyny.
3. Bakterie *Lactobacillus fermentum* uzyskały średnią degradację wynoszącą 48%. Wynik ten okazał się być najlepszym spośród wszystkich uzyskanych podczas degradacji mikotoksyn. Bakterie te uzyskały również najlepszy wynik, podczas redukcji deoksyniwalenolu, redukując aż 90,75% tej toksyny.
4. Wydłużony czas fermentacji w większości przypadków nie miał znaczenia na obniżenie poziomu mikotoksyn. Jedynie przy degradacji deoksyniwalenolu przez zakwas 1, 2 i bakterie *Lactobacillus fermentum* oraz niwalenolu przez zakwas 2 otrzymano lepsze wyniki podczas 24- godzinnej fermentacji.
5. Najmniej podatną na degradację mikotoksyną był niwalenol, której zakres degradacji wynosił od 8 do 40%.

Literatura

- [1] Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebihi A.: Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains, *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97, 1038-1044.
- [2] Diowski A., Pieczywo na zakwasie kluczem do zdrowia, *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, 2006, 1, 2-6.
- [3] El-Nezami H., Chrevatidis A., Auriola S., Salminen S., Mykkanen H.: Removal of Combom fuzarium toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*, *Food additives and contaminants*, 2002, 7(19), 680-686.
- [4] Fusch S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Kansmuller S.: Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxin, by lactic acid bacteria, *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46, 1398-1407.

- [5] Grajewski J.: Mikotoksyny i mikotoksykozy zagrożeniem dla człowieka i zwierząt. s. 117–147. w: „Mikotoksyny i Grzyby Pleśniowe Zagrożenia dla Człowieka i Zwierząt. Wydawnictwo UKW, Bydgoszcz, 2006.
- [6] Kapturowska A.U., Zielińska K.J., Stecka K., Kupryś M.P.: Evaluation of fodder contamination with ochratoxin A and methods of its decontamination, Journal of Research and Applications In Agricultural Engineering, 2010, 55(3), 156-163.
- [7] Mazurkiewicz J. 2011.: Degradation of ochratoxin A by *Lactobacillus acidophilus* K1. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities , 2011, (14)2, #16.
- [8] Mazurkiewicz J., Kuzdrański A., Solarz E.: Wpływ parametrów fermentacji ciasta i wypieku na zawartość deoksyniwalenolu i toksyny T – 2 w pieczywie żytnim. Acta Agrophysica, 2012, 19(4), 761-772.
- [9] Nikodern V., Boudra H., Morgavi D.P.: Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*, Journal of Applied Microbiology, 2006; 101, 849-856.
- [10] Ostasiewicz A., Ceglińska A., Skowronek S. 2008.: Wpływ warunków prowadzenia zakwasu na jakość pieczywa żytniego. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2008, 5 (60), 34 – 42.
- [11] Piasecka-Jóźwiak K., Rozmierska J. 2012.: Wyselekcjonowane kultury starterowe jako uniwersalna metoda wpływania na jakość pieczywa. Przegląd Piekarski i Cukierniczy 2012, 7, 26-29.
- [12] Piotrowska M., Żakowska Z.: The biodegradation of Ochatoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast w: Bielecki S., Tramper J., Polak J.: Food Biotechnology. Progerss In biotechnology, Elsevier, 2000, 17, 307-310.
- [13] Pokrzywa P., Cieślík E, Topolska K.: Ocena Zawartości Mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych, Żywność Nauka Technologia Jakość, 2007, 3 (52), 139-146.
- [14] Santos A., Marquina D., Leal J.A., Peinado J.M.: (1—6)-β-D-Glucan as Wall receptor for Pichia membranefaciens killer toxin, Applied and Enviromental microbiology, 2000; 66, 1809-1813.
- [15] Shetty P.H., Jespersen L.: Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents, Trends in Food Science and Technology, 2006; 17, 48-55.
- [16] Stępień M., Sokół-Leszczynska B., Łuczak M.: Mikotoksyny, produkty spożywcze a zdrowie człowieka., Postępy mikrobiologii, 2007; 46, 167-177
- [17] Śliżewska K.: Mykotoksyny w paszy, Hodowla Drobiu, 2008; 8, 6-13.

OCENA JAKOŚCI DŻEMÓW POMARAŃCZOWYCH

JOANNA NIEĆ, APOLO니아 STEFANIAK, BEATA STANUCH,
MAŁGORZATA SŁOMA, AGNIESZKA BIELASZKA

Streszczenie

Na polskim rynku słodkich przetworów owocowych obserwuje się duże zainteresowanie konsumentów dżemami owocowymi, które jednocześnie są najczęściej wybieranymi produktami z tej grupy. W porównaniu do marmolad i powideł, dżemy charakteryzują się najlepszym utrwaleniem składników surowca oraz jego cech sensorycznych. W światowym rankingu spożycia pomarańczy kraje Unii Europejskiej plasują się na trzeciej pozycji, co świadczy o dużej popularności tych owoców.

Celem pracy była ocena wybranych cech jakości dżemów pomarańczowych. Materiał badawczy stanowiło osiem dżemów dostępnych w sprzedaży detalicznej na terenie Górnego Śląska (reprezentujące różne segmenty cenowe) oraz dwa dżemy wyprodukowane w pracowni technologicznej. W badanym materiale oznaczono zawartość: witaminy C, suchej masy oraz kwasowość czynną. Wybrane dżemy poddano analizie sensorycznej metodą szeregowania. Ocenie poddano następujące cechy: smak, zapach, barwę. Do analizy uzyskanych wyników wykorzystano program komputerowy MS Office Excel 2010 oraz Statistica 10.0, dla wszystkich analiz statystycznych przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Badane dżemy różniły się pod względem zawartości kwasu askorbinowego. Najniższa zawartość witaminy C wynosiła 0,43 mg/100g, a najwyższa - 23,08 mg/100g. Zawartość suchej masy mieściła się w przedziale od 23,48% do 68,55%. Średnia wartość pH badanych dżemów wynosiła 3,4 ($\pm$ SD 0,16). Wyniki analizy sensorycznej wykazały, iż cechy organoleptyczne takie jak: barwa, smak i zapach, istotnie różnicują badane dżemy. Jakość dżemów produkcji własnej jest wyższa niż dżemów komercyjnych.

Słowa kluczowe: dżemy pomarańczowe, analiza sensoryczna, ocena jakości

Wprowadzenie

Dżemy definiuje się jako przetwory otrzymane przez gotowanie oczyszczonych owoców świeżych, mrożonych lub pulp z cukrem, z dodatkiem substancji żelujących i ewentualnym dodatkiem kwasów spożywczych [PN-A-75100:1994P]. W produkcji dopuszcza się również stosowanie syropu skrobiowego, środków przeciwpiennych, konserwujących, kwasu askorbinowego pełniącego funkcję przeciwutleniacza oraz składników uszlachetniających. W porównaniu do marmolad i powideł dżemy odznaczają się wyższym stopniem żelowania

i najwyższym dodatkiem cukru [Oszmiański i Sożyński, 2001]. Ze względu na ilość dodanego cukru dżemy dzieli się na: nisko- i wysokosłodzone. Produkty wysokosłodzone powinny zawierać nie mniej niż 60% ekstraktu [PN-A-75100:1994P], natomiast niskosłodzone od 28 do 50% ekstraktu. Kwasowość dżemów wysokosłodzonych powinna wynosić 0,7%, natomiast dżemy niskosłodzone powinny posiadać kwasowość na poziomie 0,5% [Lachowicz i in., 2014]. Na polskim rynku słodkich przetworów owocowych udział dżemów wynosi 67% [Kadzińska i in., 2014], ich spożycie deklaruje ponad 60% Polaków w wieku 15 - 75 lat [Mirończuk-Chodakowska i in., 2011]. Do najchętniej wybieranych dżemów w Polsce należą: truskawkowy, brzoskwiniowy, wiśniowy oraz z czarnej porzeczki. Natomiast celem niniejszej pracy była ocena wybranych cech jakości dżemów pomarańczowych.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły dżemy pomarańczowe, dostępne na polskim rynku spożywczym oraz dżemy przygotowane w pracowni technologicznej Zakładu Technologii i Oceny Jakości Żywności Katedry Dietetyki Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Analizie poddano 8 dżemów różnych marek, pochodzących z sieci sklepów: Biedronka, Tesco oraz delikatesów Alma, zakupionych na terenie Górnego Śląska. Dżemy przypisano do trzech przedziałów cenowych: „marki własne” (2 dżemy), „marki ogólnodostępne” (3 dżemy), „marki ekskluzywne” (3 dżemy) oraz zakodowano kolejnymi literami alfabetu: „marki własne” - A, B, „marki ogólnodostępne” - C, D, E, „marki ekskluzywne” - F, G, H, oraz „dżemy własne” - I, J. Dżemy produkcji własnej zostały przygotowane w pracowni technologicznej w proporcji owoców do cukru 2:1. Jeden z dżemów (dżem J) został wzbogacony dodatkiem soku z cytryny. Skład dżemów zakupionych w sklepach przyjęto na podstawie informacji zawartych na opakowaniu produktu.

W badanym materiale oznaczono zawartość: suchej masy wg PN-90/A-75101/03 i za pomocą wagosuszarki OHAUS MB23, witaminy C metodą miareczkową wg PN-A-04019:1998 oraz kwasowość czynną wg PN-90/A-75101/06. Dżemy kupne (A, B, D, E, F, G) poddano analizie sensorycznej wykonanej przez przeszkolony 12 osobowy panel sensoryczny w pracowni analizy sensorycznej (zaprojektowanej i wykonanej zgodnie z normą PN-EN ISO 8589:2010) przy Zakładzie Technologii i Oceny Jakości Żywności. Do powyższej analizy wybrano po 2 dżemy z każdego przedziału cenowego – z tego też względu nie oceniano dżemu H (3-cia marka ekskluzywna). W analizie pominięte zostały także dżemy produkcji własnej (I i J) oraz dżem C, które wyraźnie różniły się od pozostałych barwą, zapachem, smakiem i konsystencją, co uniemożliwiłoby dokonanie obiektywnego porównania z innymi dżemami. Analiza sensoryczna przeprowadzona została metodą szeregowania, w której badano barwę, smak i zapach. Oceniający szeregowali podane w losowej kolejności dżemy, w rosnącym

porządku (od próbki o najjaśniejszej barwie, smaku i zapachu najmniej charakterystycznym dla pomarańczy (I), do próbki o barwie najciemniejszej, smaku i zapachu najbardziej charakterystycznym dla użytego surowca (VI).

Uzyskane wyniki poddano analizie przy użyciu programu komputerowego MS Office Excel 2010 oraz Statistica 10.0. Istotność różnic między wartościami średnimi oceniano za pomocą testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa, oraz testu dwustronnego z poprawką Bonferroniego. Dane uzyskane w analizie sensorycznej opracowano za pomocą testu Friedmana z zastosowaniem wielokrotnych porównań testem Dunna. Dla wszystkich analiz za istotny statystycznie przyjęto poziom $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Zawartość witaminy C, suchej masy oraz kwasowość czynną badanych dżemów pomarańczowych przedstawiono w Tabeli 1.

W dostępnej literaturze z ostatniej dekady brakuje danych dotyczących analizy sensorycznej oraz fizykochemicznej dżemów pomarańczowych. Pomarańcze są bogatym źródłem witaminy C, 100 g świeżego owocu dostarcza 49,0 mg, natomiast dżem pomarańczowy niskosłodzony - 7,3 mg tej witaminy [Kunachowicz i in., 2009]. W badanych dżemach zawartość witaminy C wahała się od 0,43 do 23,08 mg/100g, a średnia zawartość wynosiła 8,33 mg/100g. Zbliżone wyniki uzyskano w badaniu dżemów przygotowanych w skali laboratoryjnej z borówki wysokiej odmiany Sierra, w których zawartość witaminy C wynosiła 8,9 mg/100g [Cendrowski i in., 2011]. Najwyższą zawartością witaminy C odznaczały się dżemy własne przygotowane w pracowni technologicznej, gdzie średnia zawartość witaminy C wynosiła 21,41 mg/100g ($\pm$ SD 2,36 mg/100g). Niższe wartości oznaczono w badaniu dżemów dyniowych przygotowanych w skali laboratoryjnej. Dżemy z dyni wzbogacone w 30% pigwowcem zawierały 10,39 mg/100g witaminy C i była to najwyższa zawartość w porównaniu do dżemów z dyni wzbogacanych dereniem i truskawkami [Nawirska-Olszańska i in., 2010]. W badaniu prowadzonym na owocach w żelu pozyskanych bezpośrednio z przetwórci owoców i warzyw, najwięcej witaminy C posiadała brzoskwinia w żelu (28,6 mg/100g). Badacze przypuszczają, że jest to wynikiem dodatku do produktu kwasu askorbinowego [Pająk i Fortuna, 2010]. Badania własne dostarczają podobnych danych, w dżemie własnym z dodatkiem soku z cytryny również oznaczono wyższą zawartość witaminy C, w porównaniu z dżemem własnym nie zawierającym takiego dodatku. Dżemy należące do kategorii marek ekskluzywnych, które zawierały w swym składzie dodatek różnych soków owocowych, również odznaczały się najwyższą zawartością witaminy C wśród trzech kategorii dżemów dostępnych na polskim rynku. Średnia zawartość witaminy C dla tej grupy wynosiła 7,09 mg/100g ($\pm$ SD 4,60 mg/100g). Warto zwrócić uwagę na fakt, że dżem o najniższej zawartości witaminy C (dżem C - 0,43 mg/100g,) należy do kategorii marek ogólnodostępnych i jako jedyny został

zakupiony w opakowaniu aluminiowym, co mogło wpłynąć na zawartość witaminy C. W grupie marek własnych, będących ich tańszym odpowiednikiem, najniższa zawartość tej witaminy wynosiła - 1,54 mg/100g (dżem A).

Tab. 1. Charakterystyka dżemów pomarańczowych pod względem zawartości witaminy C, suchej masy oraz kwasowości czynnej (pH)

Kategoria dżemu	Rodzaj dżemu	Witamina C [mg/100g]	Sucha masa I [%]	Sucha masa II [%]	$\bar{x}$ Sucha masa [%]	pH
Marka własna	A	1,54	46,18	45,70	46,02	3,30
Marka własna	B	4,10	39,04	26,90	34,99	3,20
Marka ogólnodostępna	C	0,43	50,53	44,20	48,42	3,60
Marka ogólnodostępna	D	2,14	40,33	37,50	39,38	3,30
Marka ogólnodostępna	E	11,03	42,74	46,10	43,86	3,30
Marka ekskluzywna	F	5,38	68,71	61,00	66,14	3,50
Marka ekskluzywna	G	12,31	22,88	24,70	23,48	3,40
Marka ekskluzywna	H	3,59	58,92	55,90	57,92	3,40
Dżem własny	I	19,74	70,38	64,90	68,55	3,70
Dżem własny	J	23,08	63,43	61,60	62,82	3,30

Objaśnienia: rodzaj dżemu - oznaczenie literowe zgodnie z podziałem opisanym w rozdziale: materiał i metody badań, sucha masa I - sucha masa oznaczona metodą wagową wg PN-90/A-75101/03, sucha masa II - sucha masa oznaczona za pomocą wagi suszarki, pH - wartość uśredniona uzyskana z pomiarów metodą potencjometryczną wg PN-90/A-75101/06.

Proces produkcji dżemów, podczas którego niezbędna jest termiczna obróbka owoców, powoduje znaczne straty witaminy C w porównaniu do jej zawartości w wyjściowym surowcu [Różańska i in., 2014]. W badaniu zawartości witaminy C w dżemie z borówki czarnej, również zaobserwowano ubytek witaminy C. W przeliczeniu na 100g owoców użytych do produkcji dżemów straty te wynosiły 53 - 58% [Poiana i in., 2012]. Odnosząc wyniki badań własnych do danych literaturowych dotyczących zawartości witaminy C w świeżych owocach pomarańczy [Kunachowicz i in., 2009], oszacowane straty witaminy C w dżemach plasowały się na podobnym poziomie, dla dżemów własnej produkcji I oraz J wynosiły odpowiednio: 62% i 52%.

Zawartość suchej masy jest istotnym elementem oceny jakości dżemów, gdyż odsetek suchej masy koreluje z zawartością składników odżywczych

[Kazimierczak i in., 2009]. W badaniu dżemów przygotowanych z przecieru dyniowego wzbogaconych dodatkiem przecieru z owoców truskawki, pigwowca i derenia, zawartość suchej masy mieściła się w wąskim przedziale: 41,07 - 45,42% [Nawirska-Olszańska i in., 2010]. Wyniki badań własnych dostarczają nieco odmiennych danych, zawartość suchej masy w dżemach pomarańczowych mieści się w szerszym przedziale: 23,48 - 68,55%. Najwyższą zawartość suchej masy oznaczono w dżemie I, kolejno w dżemie F i J odpowiednio: 68,55%, 66,14% i 62,82%. Dżem F, który należy do kategorii marek ekskluzywnych, a w swoim składzie zawiera pomarańcze pochodzące z certyfikowanych upraw ekologicznych, wyróżnia się dużą zawartością suchej masy, w porównaniu do dżemów własnych. Najniższą wartość tego parametru oznaczono dla dżemu G (23,48%) i jest ona najbardziej zbliżona do wyniku otrzymanego w badaniu przecieru dereniowego z 20% dodatkiem aronii, który zawierał 22,23% suchej masy [Kucharska i in., 2010]. Może to wynikać z faktu, że dżem G wyprodukowany jest w 100% z owoców nie zawierając jednocześnie w swoim składzie dodatku cukru.

Średnia zawartość suchej masy w dżemach należących do poszczególnych kategorii cenowych różni się istotnie ($p = 0,005$; ANOVA rang Kruskala-Wallisa), dla dżemów własnych przygotowanych w pracowni technologicznej wynosi 65,69% ($\pm$ SD 3,81%) i różni się istotnie od średniej zawartości suchej masy dżemów należących do kategorii marek własnych oraz ogólnodostępnych ($p = 0,009$ oraz $p = 0,011$; test dwustronny z poprawką Bonferroniego). Średnia zawartość suchej masy dla kategorii marek własnych wynosi 40,51% ($\pm$ SD 7,50%), a dla marek ogólnodostępnych - 43,89% ($\pm$ SD 4,52%).

Dżemy przygotowane różnymi metodami z grejpfrutów zawierały w swym składzie od 47,6 do 55,7% wody. Wśród nich dżem przygotowany metodą konwencjonalną zawierał 49,3% wody [Igual i in., 2010]. Podobny odsetek tego składnika oznaczono w dżemie C (51,58%), natomiast dżemy produkcji własnej charakteryzują się niższą zawartością wody (I - 31,45%, J - 37,18%). Tendencję zaobserwowaną w pracy własnej potwierdzają badania przeprowadzone na dżemach z owoców kiwi. Dżem z kiwi przygotowany metodą tradycyjną zawierał 28,8%, natomiast dżem z kiwi zakupiony w sklepie zawierał 64,6% wody [Lespinaud i in., 2012].

Podczas produkcji dżemów pomarańczowych straty surowca sięgają 55,25%, z czego 34,72%, a więc ponad połowa, to skórka owocu [Singh i in., 2009]. Dodatek skórek owoców do dżemów pomarańczowych jest więc sposobem na zmniejszenie kosztów produkcji. Badane dżemy pomarańczowe dostępne na polskim rynku w swoim składzie zawierały zróżnicowaną ilość skórek. Inni badacze podejmując próbę wyprodukowania dżemów ze skórek owoców ananasa, pomarańczy, granatu i banana określili zawartość wody dla dżemu ze skórek pomarańczowych na poziomie 32,25% [Chacko i Estherlydia, 2013]. Natomiast w badaniach własnych najbardziej zbliżoną zawartość wody zawierał dżem F (33,86%).

Kwasowość czynna jest bardzo ważnym parametrem, ponieważ ma bezpośredni wpływ na proces żelowania, a więc tym samym na konsystencję dżemu. Wartość pH zapewniająca prawidłową konsystencję żelu tworzonego przez pektyny wysokometylowane powinna wynosić 2,9 - 3,1. Pektyny niskometylowane wykorzystywane do produkcji dżemów niskosłodzonych tworzą galarety w zakresie pH 3 - 6 [Oszmiański i Sożyński, 2001]. W badaniu własnym pH dżemów pomarańczowych mieściło się w wąskim przedziale 3,2 - 3,7. Podobne wartości otrzymano w badaniu dżemów wiśniowych, oraz w badaniu dżemów grejpfrutowych, dla których pH wynosiło odpowiednio 3,38 oraz 3,26 [Iguál i in., 2010; Rababah i in., 2014].

Wyniki analizy sensorycznej przedstawia Tabela 2. Za pomocą metody szeregowania zespół oceniający stwierdził, że spośród badanych dżemów najjaśniejszą barwę posiadał dżem B, natomiast najciemniejszą barwę odznaczał się dżem A. Według Polskiej Normy dotyczącej przetworów owocowych: dżemów, w przypadku produktów należących do klasy II akceptowalne jest lekkie osłabienie lub zbrunatnienie barwy, jak zaobserwowano w przypadku dżemów A i B, które należą do najtańszego przedziału cenowego – marek własnych. Pod względem barwy II miejsce w rankingu zajęły zarówno dżem D oraz E, co potwierdza przynależność do wspólnej kategorii marek ogólnodostępnych. Wyniki analizy statystycznej potwierdzają znaczenie barwy jako wyróżnika jakości, cecha ta okazała się czynnikiem istotnie różnicującym badane dżemy ($p < 10^{-5}$; ANOVA Friedmana).

Tab. 2. Wyniki oceny sensorycznej dżemów pomarańczowych. Ranking wg barwy, smaku i zapachu

Cecha	Dżem					
	A	B	D	E	F	G
Barwa	V	I	II	II	IV	III
Smak	I	III	V	VI	II	IV
Zapach	III	IV	II	I	V	VI

W badaniach innych autorów analiza sensoryczna dżemów na bazie dyni z dodatkiem: ananasa, jabłka, brzoskwini, pomarańczy, cytryny oraz przypraw wykazała, że pod względem barwy, najwyższe miejsce w rankingu zajął dżem dyniowo-brzoskwiniowo-pomarańczowy. Natomiast dżem z dodatkiem cynamonu zajął najniższe miejsce w rankingu. Dodatek owocu pomarańczy wzmocnił naturalną barwę pochodzącą z owoców dyni i brzoskwini, z kolei dodatek cynamonu spowodował brązowienie produktu, co zostało uznane za wadę i wpłynęło na gorszą ocenę produktu [Kadzińska i in., 2014].

Dżemem o zapachu najbardziej charakterystycznym dla owoców pomarańczy, wytypowanym przez panel sensoryczny został dżem G, który wyróżniał się

spośród badanych dżemów 100%-ową zawartością owoców. Natomiast dżem E został wskazany jako dżem o najmniej charakterystycznym zapachu. Jednocześnie dżem ten, podobnie jak D, cechował się najniższą zawartością owoców przypadającą na 100g produktu. Zapach, podobnie jak barwa, różnicuje badane dżemy pomarańczowe ($p = 0,004$; ANOVA Friedmana). Wykonanie testu wielokrotnych porównań pozwala stwierdzić, że dżem G pod względem zapachu różni się istotnie od dżemów A, D oraz E, poziom istotności dla testu wynosi odpowiednio $p = 0,048$, $p = 0,023$ i $p = 0,004$. Swoistość zapachu pozostałych dżemów nie różni się istotnie.

Analiza sensoryczna badanych dżemów pomarańczowych wykazała, że najwyżej oceniane pod względem smaku charakterystycznego dla użytych owoców okazały się dżemy marek ogólnodostępnych D i E. Jednocześnie dżemy należące do kategorii marek ekskluzywnych (F, G) zajęły niższe miejsce w rankingu. Najgorzej oceniony został dżem A, reprezentujący marki własne, będące tańszymi odpowiednikami marek ogólnodostępnych. Smak okazał się czynnikiem różnicującym jedynie dżemy A i E ($p = 0,048$; test Dunna).

Badanie dżemów wykonanych z pulp owoców: ananasa, pomarańczy, papai oraz banana wykazało, że dżem pomarańczowo-ananasowy został najwyżej oceniony pod względem smaku. Natomiast dżem pomarańczowy zajął w tym rankingu miejsce drugie, na równi z dżemami: pomarańcza-papaja, papaja-ananas i ananas-pomarańcza-banan-papaja [Singh i in., 2009].

Reasumując, uzyskane wyniki badanych cech fizykochemicznych w większości pokrywają się z dostępnymi danymi literaturowymi. Jednakże zaobserwowana rozbieżność w zawartości suchej masy oraz niewielka liczba publikacji dotyczących dżemów pomarańczowych skłania do dalszych badań tych produktów.

Wnioski

1. Dżemy produkcji własnej charakteryzują się wyższą zawartością witaminy C oraz suchej masy w porównaniu do dżemów komercyjnych.
2. Badane dżemy charakteryzowały się małym zróżnicowaniem wartości pH.
3. Smak, barwa i zapach są cechami istotnie różnicującymi badane dżemy.
4. Nie można jednocześnie stwierdzić, że dżemy marek ekskluzywnych cechują się lepszymi właściwościami fizykochemicznymi oraz organoleptycznymi od dżemów marek własnych i ogólnodostępnych.

Literatura

- [1] Cendrowski A., Ścibisz I., Mitek M.: Wpływ warunków przechowywania na zawartość hydroksymetylofurfuralu, furfuralu i kwasu askorbinowego w dżemach z owoców jagodowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 6 (79), 155-166.

- [2] Chacko C.M., Estherlydia D.: Sensory, physicochemical and antimicrobial evaluation of jams made from indigenous fruit peels. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 2013, 5 (1-2), 69-75.
- [3] Foreign Agricultural Service: Citrus: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture, 2015.
- [4] Igual M., Contreras C., Martínez-Navarrete N.: Non-conventional techniques to obtain grapefruit jam. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2010, 11, 335-341.
- [5] Kadzińska J., Jasiczek A., Niemczuk D., Kalisz S., Galus S.: Dżemy warzywno-owocowe jako nowa oferta dla konsumentów. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2014, 5, 33-35.
- [6] Kazimierzczak R., Hallmann E., Brodzka A., Rembiałkowska E.: Porównanie zawartości związków polifenolowych i witaminy C w dżemach z owoców wybranych odmian porzeczki czarnej *Ribes Nigrum L.* z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 2009, 54(3), 123-130.
- [7] Kucharska A.Z., Kowalczyk K., Nawirska-Olszańska A., Sokół-Lętowska A.: Wpływ dodatku aronii, truskawek i malin na skład fizykochemiczny przecieru dereniowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 4(71), 95-106.
- [8] Kunachowicz H., Nadolna I., Iwanow K., Przygoda B.: Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. Wyd. V. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.
- [9] Lachowicz S., Wiśniewski R., Kaszuba J., Kapusta I.: Próba oszacowania zawartości związków polifenolowych w grejpfrutach i dżemach grejpfrutowych. *Materiały Monografii nt.: Właściwości produktów i surowców żywnościowych. Wybrane zagadnienia*, Kraków 2014, 193-204.
- [10] Lespignard A.R., Bambicha R.R., Mascheroni R.H.: Quality parameters assessment in kiwi jam during pasteurization. *Modelling and optimization of the thermal process. Food and Bioproducts Processing*, 2012, 90, 799-808.
- [11] Mironczuk-Chodakowska I., Zujko M.E., Witkowska A.: Zawartość polifenoli oraz aktywność antyoksydacyjna niektórych przetworów owocowych o znacznym stopniu przetworzenia. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2011, 3, 905-910.
- [12] Nawirska-Olszańska A., Kucharska A. Z., Sokół-Lętowska A., Biesiada A.: Ocena jakości dżemów z dyni wzbogaconych pigwowcem, dereniem i truskawkami. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 1(68), 40-48.
- [13] Oszmiański J., Sożyński J.: Przewodnik do ćwiczeń z technologii przetwórstwa owoców i warzyw. Wyd. III. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław 2001.
- [14] Pająk P., Fortuna T.: Ocena właściwości fizykochemicznych i jakości sensorycznej wybranych żeli z owocami. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 2(69), 85-94.

- [15] PN-90/A-75101/03:1990P. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości suchej masy metodą wagową.
- [16] PN-90/A75101/06:1990P. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczenie pH metodą potencjometryczną.
- [17] PN-A-04019:1998P. Produkty spożywcze. Oznaczanie zawartości witaminy C.
- [18] PN-A-75100:1994P. Przetwory owocowe. Dżemy.
- [19] PN-EN ISO 8589:2010. Analiza sensoryczna - Ogólne wytyczne dotyczące projektowania pracowni analizy sensorycznej.
- [20] Poiana M.A., Alexa E., Mateescu C.: Tracking antioxidant properties and color changes in low-sugar bilberry jam as effect of processing, storage and pectin concentration. *Chemistry Central Journal*, 2012, 6(4).
- [21] Rababah T.M., Al-U'Datt M., Al-Mahasneh M., Yang W., Feng H., Ereifej K., Kilani I., Ishmais M. A.: Effect of jam processing and storage on phytochemicals and physiochemical properties of cherry at different temperatures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2014, 38, 247-254.
- [22] Różańska D., Regulska-Ilow B., Ilow R.: Wpływ wybranych procesów kulinarnych na potencjał antyoksydacyjny i zawartość polifenoli w żywności. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2014, 95(2), 215-222.
- [23] Singh S., Jain S., Singh S.P., Singh D.: Quality changes in fruit jams from combinations of different fruit pulps. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2009, 33, 41-57.

ANALIZA FUNKCJONOWANIA SYSTEMU ŚLEDZENIA RUCHU I POCHODZENIA ŻYWNOŚCI (TRACEABILITY) NA PRZYKŁADZIE WYBRANEGO PRODUKTU SPOŻYWCZEGO

DOROTA NOWAK, AGNIESZKA CIEĆWIERZ

Streszczenie

Celem pracy była analiza funkcjonowania systemu śledzenia ruchu i pochodzenia żywności na przykładzie wybranego produktu spożywczego - bułek przeznaczonych do gastronomii systemowej. Analiza ta została przeprowadzona w Piekarni produkującej bułki hamburgerowe, współpracującej z Korporacją działającą na rynku gastronomicznym.

W pracy scharakteryzowano sposoby gromadzenia danych oraz sposób identyfikacji poszczególnych partii w łańcuchu żywnościowym, jak również sposób zarządzania kryzysowego w przypadku wystąpienia zagrożenia. Na podstawie przedstawionej analizy wyodrębniono czynniki istotnie wpływające na skuteczność działania systemu identyfikowalności w analizowanym zakładzie, do których można zaliczyć, między innymi, jasno określone zasady funkcjonowania systemu śledzenia w korporacji; systematyczność zapisów punktów kontrolnych przez pracowników; przepływ informacji między działami.

Słowa kluczowe: jakość żywności, produkt niezgodny, zagrożenie, wycofywanie produktu

Wprowadzenie

Ryzyka i zagrożenia związane z jakością żywności stale rosną [Gellynck i Verbeke, 2001]. Powody tego zjawiska są różne - rosnąca globalizacja w łańcuchu dostaw, wydłużanie się drogi od pola do stołu, rozprzestrzenianie się zanieczyszczeń żywności czy chorób trzody chlewnej [Śliwczyński, 2008]. Jednym ze sposobów zapewnienia wysokiej jakości produktów spożywczych, ich bezpieczeństwa, ale przede wszystkim ochrony konsumenta, jest system identyfikowalności (traceability), który, wobec coraz to nowych zagrożeń staje się dziś koniecznością [Caswell, 2006; Zadernowski i Obiedziński, 2005].

Identyfikowalność (z ang. *traceability*), to proces, który odpowiada za możliwość odtworzenia i śledzenia drogi żywności, pasz, zwierząt przeznaczonych na żywność lub substancji przeznaczonych do wprowadzenia do żywności lub pasz, poprzez wszystkie etapy produkcji, przetwórstwa i dystrybucji. Proces traceability wiąże się przede wszystkim z usługami logistycznymi w zakresie przesyłania żywności, produktów spożywczych. Proces identyfikowalności, polega

na śledzeniu, kontroli jakości towarów, które nieczęsto przebywają bardzo odległą drogę od producenta do odbiorcy [Morrissey i wsp., 2005; Czarniecka-Skubina i Nowak, 2012].

Samo pojęcie w różnych dokumentach jest różnie definiowane, np: *Jest to możliwość kontrolowania przemieszczania się żywności, paszy, zwierzęcia hodowlanego lub substancji przeznaczonej do dodania lub, która może być dodana do żywności lub paszy na wszystkich etapach produkcji, przetwarzania i dystrybucji*” [Rozporządzenie (WE) nr 178/2002; Sarig, 2003]. W praktyce, jest to system, który umożliwia wycofanie produktu z rynku w przypadku stwierdzenia skażenia żywności [Olszewski, 2005] lub innych niezgodności mogących stanowić zagrożenie dla konsumenta [Regattieri i wsp; 2007; Bogusz 2005].

Identyfikowalność w branży jest regulowana prawnie na całym świecie [Ziółkowska, 2009]. Jest to zdolność do odtworzenia informacji o historii produktu, łącznie z informacjami o pochodzeniu surowców czy elementów wykorzystywanych do jego produkcji. W logistyce identyfikowalność odnosi się do możliwości śledzenia produktów na każdym etapie łańcucha dostaw w oparciu o numer partii i serii [Smith i Fruness, 2006, Kijowski i Nowak, 2006].

Prawnym gwarantem zapewnienia bezpieczeństwa konsumentów jest Rozporządzenie Komisji (WE) NR 178/2002, określane jak Prawo Żywnościowe. Wskazuje ono, w jaki sposób żywność powinna być oznakowana w celu ułatwienia śledzenia jej ruchu, a także wskazania pochodzenia na wszystkich etapach produkcji, przetwarzania i dystrybucji [DK Korporacji]. Właściwe lokalizowanie i śledzenie produktów jest możliwe dzięki właściwemu oznakowaniu produktów [DK Korporacji; Sokołowski, 2005].

Standard traceability opiera się na zasadzie „jeden krok do przodu i jeden krok do tyłu”. Oznacza to, że dostawca powinien być w stanie udokumentować, skąd produkty spożywcze pochodzą i gdzie zostały one rozdzielone [Czarniecka – Skubina i Nowak, 2012, Anonim, 2006].

Funkcjonujące systemy zarządzania jakością w branży spożywczej, w tym normy ISO serii 22000 oraz serii 9000, standardy BRC, IFS, EUREPGAP czy wymagania normatywne poszczególnych państw uwzględniają system identyfikowalności [Cybulski, 2005].

Kluczowymi operatorami korzystającymi ze standardu są najczęściej działy: magazynu oraz transportu [Smith i Fruness, 2006]. W tych działach śledzenie odbywa się na poziomie palety, dzięki, na przykład, zastosowaniu kodu SSCC [Caswell, 2006].

Niezbędnym wymaganiem do prawidłowego funkcjonowania systemu jest przekazanie przez każdego z kontrahentów unikalnych numerów:

- GTIN (Global Trade Item Number) – Globalny Numer Jednostki Handlowej (dla każdego produktu),
- GLN (Global Location Number) – Globalny Numer Lokalizacyjny.

Aby system identyfikowalności faktycznie funkcjonował i przynosił założone korzyści, musi spełniać następujące warunki [IFC, 2010]:

- „musi być regularnie testowany zarówno zgodnie z kierunkiem produkcji i dystrybucji, jak i wstecz, a wyniki muszą być rejestrowane” [4.18.2, IFS],
- „w przypadku przerobu wtórnego musi być zapewniona możliwość śledzenia procesu produkcji [4.18.3, IFS, 2010],
- „dane umożliwiające identyfikowalność muszą być przechowywane przez okres potencjalnych reklamacji i zwrotów, zgodny z wymaganiami klienta i prawnymi, przynajmniej przez cały okres trwałości produktu” [4.18.4, IFS, 2010],
- „identyfikowalne próbki produktu reprezentatywnego dla produkcji, dotyczące każdej partii (jeśli to możliwe), należy przechowywać do końca terminu przydatności lub daty minimalnej trwałości- biblioteka próbek” [4.18.5, IFS, 2010].

Do uczestników (partnerów) systemu identyfikowalności należą [Śliwczyński, 2008]:

- Producent jako podmiot, który zajmuje się przetworzeniem otrzymanych uprzednio surowców lub półfabrykatów. Łańcuch dostaw może, ale nie musi, składać się z więcej niż z jednego producenta czy przetwórcy;
- Przewoźnik/usługi logistyczne jako podmiot odpowiedzialny za transport jednostek śledzonych;
- Detalista jako podmiot, którego zadaniem jest kontaktowanie się bezpośrednio z konsumentem;
- Centrum dystrybucji - strona zajmująca się przechowywaniem, komplementacją jednostek śledzonych;
- Zewnętrzna instytucja - podmiot zajmujący się ochroną prawną bezpieczeństwa oraz interesu społecznego.

Przedmiot i metody badań

W pracy poddano analizie przepływ produktów w łańcuchu dostawczym od producenta bułek hamburgerowych Piekarni, przez Centrum Dystrybucyjne do sieci restauracji. Piekarnia jest zakładem współpracującym z Korporacją gastronomiczną, która powstała w 1955 r. i obecnie jest największym przedsiębiorstwem w branży restauracji szybkiej obsługi. Piekarnia ta jest jednym z największych światowych dostawców pieczywa do gastronomii i na rynkach detalicznych. Powstała w Warszawie w 1994 roku.

Jednostką zajmującą się koordynacją badań surowców, a także produktów oferowanych w restauracjach, jest Dział Zapewniania Jakości. Do głównych zadań działu należy:

- Kontrola stałego poziomu jakości produktów,
- Zapewnienie zgodności produktów ze specyfikacjami,

- Prowadzenie systemu kontroli jakości u dostawców.

Podstawą przeglądu i analizy systemu była wizyta w zakładzie i prześledzenie etapów produkcji wybranych półproduktów w celu oceny procesu i określenia ewentualnych zagrożeń występujących podczas wytwarzania. Określone zostały działania podejmowane przez zakład produkcyjny w celu przedłużenia trwałości półproduktów i uzyskania jak najwyższej wartości odżywczej, a także w celu uzyskania bezpiecznego produktu. Wykorzystano również wewnętrzne dokumenty Piekarni i Korporacji dotyczące wdrożenia systemu śledzenia. Na tej podstawie przeprowadzono analizę działań podejmowanych w razie konieczności wycofania produktu z rynku i opracowano zalecenia dla zakładu w celu usprawnienia systemu identyfikowalności.

Opis funkcjonowania systemu w korporacji

Pierwszym krokiem systemu nadzoru dostawy do Centrum Dystrybucyjnego jest sprawdzenie dowodu dostawy bądź listu przewozowego CMR, który zawiera ważne informacje, takie jak: dane nadawcy, dane odbiorcy, dołączone dokumenty, rodzaj i ilość transportowanego towaru, numer rejestracyjny pojazdu, nazwę przewoźnika.

Jeśli Centrum przyjmuje towary nie objęte systemem traceability, wtedy etykiety generowane są przez Centrum Dystrybucji, towary takie muszą być uzgodnione z korporacją.

Jeśli któryś z dostawców nie stosuje się do wymagań czyli dostawca nie stosuje etykiety lub jest ona błędna, wtedy zostają podjęte następujące środki:

- Dostawca zostaje powiadomiony o łamaniu procedur oraz o skutkach wynikających z nie stosowania się do nich, którymi są kary umowne,
- jeśli od kolejnej dostawy dostawca nie dostosuje się do zasad, zostanie ukarany kwotą 10 EURO za etykietę.

Restauracje Korporacji nie posiadają dużych magazynów na produkty dostarczane przez Centra Dystrybucyjne. Dlatego też podczas dostawy na jednej palecie przyjeżdża kilka rodzajów bułek hamburgerowych. Produkty do danej restauracji są kompletowane przez pracowników w Centrum Dystrybucyjnym. Podczas kompletowania produktów od różnych dostawców i z różnych palet, bierze się pod uwagę oryginalne kody SSCC, a także ilość pobranych artykułów i tworzony jest nowy kod SSCC dla palety, która została skompletowana z różnych produktów. W skład informacji wchodzi dane pierwotne, dotyczące palet źródłowych. Jeśli do wysyłki jest przeznaczona cała paleta, wtedy kod nie zmienia się, pozostaje ten, nadany przez dostawcę.

System traceability wymusza zasady procesu rejestracji danych, które dotyczą dostawców oraz dystrybutora. Na każdym etapie łańcucha logistycznego zostają zarejestrowane dane, które są wykorzystywane podczas wycofania produktu z rynku.

Dane o produkcie są rejestrowane na każdym etapie przekazywania produktu.

W systemie rejestrowane są unikalne kody SSCC, GTIN produktu, data produkcji, data przydatności do spożycia, numer partii. Z kolei, podczas przyjęcia produktu do Centrum Dystrybucyjnego w systemie rejestrowane są: SSCC - dostawcy, GTIN, WRIN produktu oraz data minimalnej trwałości. Dodatkowo Centrum Dystrybucyjne rejestruje GLN restauracji (miejsce dostawy), datę dostawy oraz SSCC dostarczonej palety.

W razie stwierdzenia niezgodności wyrobu wycofanie produktu z rynku nie może być dokonane przez pojedynczą restaurację. Menager restauracji zgłasza reklamację do biura Korporacji. Musi ona zostać przesłana za pomocą maila lub przekazana telefonicznie. Podczas zgłoszenia reklamacji muszą zostać podane informacje, dzięki którym łatwo i szybko będzie można zlokalizować produkt: nazwę produktu, WRIN i dodatkowo datę przydatności, pełną datę produkcji lub numer serii.

W wycofaniu produktu z rynku biorą udział również dostawca i dystrybutor. Wycofanie produktu z rynku może nastąpić, jeśli dostarczono produkt (ogólne zasady) np. [Bogusz, 2005]: z błędnym znakowaniem, z błędnym kodem EAN, ze złą gramaturą, w uszkodzonym opakowaniu, w nieodpowiedniej temperaturze, o złej atrakcyjności sensorycznej.

Jeśli reklamacji podlega kilka koszy bułek, to w takim przypadku reklamację wysyła już dana restauracja, np. jeśli trafi do niej produkt pognieciony, źle przekrojony czy też w paczce będzie nieodpowiednia ilość bułek hamburgerowych.

Jeśli następuje zgłoszenie o defekcie produkt, który występuje w całej partii, to o jego wycofaniu decyduje Centrum Dystrybucyjne jak również Korporacja. O fakcie wdrożenia planu zablokowania produktu zostają poinformowane osoby odpowiedzialne w Piekarni za procedurą wycofania, przez osobę z Korporacji odpowiedzialną za jakość produktu.

Jeśli ma miejsce wycofanie produktu, w piekarni następuje rozdział zakresu zadań pomiędzy osoby, które są odpowiedzialne za zrealizowanie planu. Osoby odpowiedzialne za wycofanie produktu mają za zadanie ustalić, do ilu Centrów Dystrybucyjnych został skierowany produkt z defektem, następnie, razem z Centrum Dystrybucyjnym, są podejmowane decyzje o usunięciu produktu z rynku.

Ponad to, w dokumentacji w Piekarni, w procedurze mówiącej o wycofaniu produktu z rynku, musi widnieć lista kontaktów odbiorcy, która mówi o tym, kogo Piekarnia informuje o wycofaniu produktu z rynku (dział jakości, zaopatrzenia, PR).

Dostawca ma za zadanie sprawdzenie numerów palet SSCC, dzięki informacjom otrzymanym od Centrum Dystrybucji i sprawdza również, gdzie zostały dostarczone. Następnie Centrum Dystrybucji sprawdza numery SSCC i weryfikuje, do kogo zostały wysłane i czy również znajdują się w magazynie Centrum Dystrybucyjnego. Po tych czynnościach zareklamowane produkty są

blokowane w Centrum Dystrybucyjnym. Kolejnym krokiem jest kontakt z restauracjami, które otrzymały zareklamowane produkty.

Aby wysledzić zareklamowany produkt, muszą być zebrane odpowiednie informacje na temat tego produktu, takie jak:

- dlaczego produkt ma zostać wycofany z rynku,
- gdzie znajduje się produkt,
- rodzaj produktu,
- data produkcji,
- ilość np. zanieczyszczonego produktu
- dane osoby, która składa reklamacje (dane restauracji).

Po ustaleniu wyżej wymienionych informacji, osoby zajmujące się planem wycofania produktu mają za zadanie ustalenie, czy np. zanieczyszczenie miało miejsce w Piekarni podczas procesu produkcyjnego czy też poza piekarnią. Jeśli jest możliwość, należy pobrać próbki do analizy do laboratorium, aby móc ustalić rodzaj zanieczyszczenia. Osoby odpowiedzialne za wdrożenie planu mają za zadanie sformułowanie wskazówek, jak w przyszłości należy uniknąć podobnych sytuacji.

Jeśli wszystkie informacje potrzebne do namierzenia zareklamowanego produktu są gotowe, sporządzane jest sprawozdanie. Formularze są wypełniane przez dostawcę- Centrum Dystrybucyjne oraz Centrum Dystrybucyjne - restauracja. Takie sprawozdanie jest wysyłane do działu zakupów Centrum Dystrybucyjnego i dalej, do Kierownictwa Korporacji. Jeśli zostanie podjęta decyzja o zablokowaniu produktu, wtedy dział Obsługi Klienta informuje restauracje o podjętej decyzji.

Przebieg symulowanego planu wycofania produktu niezgodnego

W Piekarni istnieje procedura, która ma na celu sprawdzenie skuteczności planu wycofania produktu [DK Korporacji]. Ćwiczenia odbywają się w nieokreślonych terminach. Wyznaczony termin znany jest tylko osobie przeprowadzającej symulację. Osoba taka ma za zadanie poinformować o symulacji osoby zainteresowane, następnie procedura przeprowadzania ćwiczeń jest taka sama jak plan wycofania produktu. Dzięki takiej symulacji, Piekarnia jest w stanie sprawdzić możliwość poinformowania osób, które są odpowiedzialne za realizację planu, określić, jak dużo czasu potrzeba i czy w ogóle jest możliwe skompletowanie informacji niezbędnych do określenia drogi produktu, a także czy jest możliwość namierzenia wadliwego produktu. Po zakończeniu symulacji sprawdzane są wszelkie niedociągnięcia, które się pojawiły podczas ćwiczeń, a także opracowywane są działania w celu poprawy sytuacji. Z symulacji sporządzany jest raport, w którym znajduje się opis działań, jakie zostały podjęte podczas symulacji oraz czas, jaki był potrzebny na zgromadzenie informacji w celu określenia drogi produktu.

Celem jednego z przeprowadzanych testów było sprawdzenie, czy podczas

nadania złego kodu SSCC dział jakości jest w stanie wymienić, jakie surowce były wykorzystane podczas produkcji danej bułki hamburgerowej i z jakich partii surowców korzystano. Do symulacji wykorzystano czas, datę produkcji oraz numery SSCC [DK Korporacji].

Dnia 22 października o godzinie 13.00 z Korporacji przekazana została informacja drogą mailową i telefoniczną, iż do Centrum Dystrybucyjnego dostarczone zostały źle oznakowane bułki.

Do Piekarni, do Działu Jakości, drogą mailową wpłynął formularz reklamacyjny. W formularzu znajdowały się informacje wymienione poniżej:

- data reklamacji,
- nazwisko osoby zgłaszającej reklamację,
- rodzaj bułki,
- ilość reklamowanych bułek,
- data produkcji,
- data przydatności do spożycia,
- przyczyna reklamacji.

Osoba, która otrzymała informację – Kierownik Działu Jakości, powiadomiła osoby, które są odpowiedzialne za przeprowadzenie symulowanego planu zamiany produktu.

Osoby odpowiedzialne za symulację zostały poinformowane w ciągu 2 minut.

Na podstawie komputerowego systemu traceability oraz produkcyjnej dokumentacji skompletowano niezbędne informacje potrzebne do określenia drogi zareklamowanego produktu. W czasie 5 minut ustalono, że 16 października wyprodukowano 1000 koszy bułki hamburgerowej ze złym nadrukiem. Kosze te trafiły tylko do jednego Centrum Dystrybucyjnego.

Kolejnym krokiem było skomplementowanie dokumentacji dotyczącej surowców użytych do produkcji bułki hamburgerowej w dniach 15-16 października od godziny 20.00 do 24.00. Zebrano formularze niezbędne do ustalenia, jakich surowców użyto do wyprodukowania zareklamowanych bułek:

- dostawę mąki,
- dostawę innych surowców,
- ewidencję surowców pobranych z magazynu,
- kontrolę sita mąki,
- kontrolę sita cukru,
- kontrolę sita oleju,
- kontrolę przesiewanych surowców sypkich,
- formularze kontroli procesu produkcyjnego.

Na podstawie dokumentacji ustalono, jakie surowce i z jakim kodem zostały użyte do produkcji bułki hamburgerowej, a także jaki był stan surowców podczas produkcji. O godzinie 13:50 było już ustalone, jakie surowce zostały wykorzystane do produkcji bułki hamburgerowej.

Po powtórным sprawdzeniu zgromadzonych informacji, o godzinie 14.10 został przygotowany i wysłany raport drogą mailową do biura Korporacji z informacją o ilości zareklamowanych bułek, które trafiły do CD Warszawa.

Przeprowadzono również symulowane wycofanie produktu w jednej z restauracji należącej do Korporacji. Celem przeprowadzanego testu było sprawdzenie, jak dużo czasu zajmie podmiana produktu o złym krojeniu, który trafił do restauracji. Do symulacji wykorzystano czas i datę produkcji podaną przez koordynatora ćwiczenia. Produktem wycofanym miały być bułki hamburgerowe z sezamem, data produkcji 14.08.2012 [DK Korporacji].

Osoby odpowiedzialne za symulowany plan zamiany produktu zostały poinformowane w ciągu 15 minut. Niezbędne dane skompletowano, określając drogę reklamowanego produktu na podstawie dokumentacji produkcyjnej i komputerowego systemu traceability. Ustalono, że wyprodukowano 500 koszy bułek hamburgerowych z sezamem z datą produkcji 14.08.2012, które trafiły do jednego Centrum Dystrybucyjnego. Stwierdzono, że 150 koszy dostarczono do 5 restauracji, pozostałe nadal znajdowały się w Centrum Dystrybucyjnym. Ustalenia te zajęły 7 minut.

Na postawie dokumentacji technicznej ustalono, kiedy ostatnio nastąpiła wymiana noży. Czas uzyskania tej informacji wynosił 3 minuty. Ustalono, kto był odpowiedzialny za wymianę noży, jak również, w jakich odstępach czasu sprawdzano krojenie bułek. Czynności te zajęły 10 minut.

Ocena przebiegu wycofania produktu niezgodnego

Wnioski z funkcjonowania procedur wycofania produktu z rynku można sformułować w sposób następujący:

Podczas przeprowadzania symulowanych zamian produktu, wynikających ze źle wprowadzonych kodów SSCC, a także ze źle przekrojonych bułek nie wszystkie działania przebiegały zadowalająco. Na podstawie tych doświadczeń stwierdzono, że konieczne jest wprowadzenie zmian w celu poprawy wprowadzania zamiany produktu.

- Brak było wpisanych dat dostaw cukru i oleju (brak naklejek na paletach z datami dostaw produktów); daty zidentyfikowano dopiero po sprawdzeniu atestów jakościowych, na których widniały daty dostawy do Piekarni,
- Pobrany cukier został wpisany na nieodpowiednim formularzu,
- Brak było zapisu pobranych worków sezamu; identyfikacji partii dokonano po datach dostaw, a także po zużyciu poprzednich partii,
- Nieprzesiewane surowce wpisywane były nieregularnie do formularza.

Po przeprowadzeniu symulowanych zamian produktów na rynku i stwierdzeniu przy tej okazji nieścisłości stwierdzono, że konieczne jest ponowne przeszkolenie stanowiskowe magazynierów oraz ciastowych odnośnie wypełniania formularzy produkcyjnych.

Podsumowanie i wnioski

System traceability jest wykorzystywany do zlokalizowania wadliwej partii produktu, bądź niebezpiecznych dla konsumentów produktów znajdujących się w obrocie. Wdrożenie systemu w łańcuchu dostaw wymaga zaangażowania wszystkich stron, które są zintegrowane za pomocą systemów informatycznych.

Przeprowadzona analiza funkcjonowania systemu śledzenia ruchu i pochodzenia żywności, dowodzi tego, że na skuteczność działania systemu traceability mają wpływ takie czynniki jak:

1. Prawidłowo oznakowana partia produkcyjna;
2. Jasno określone zasady funkcjonowania systemu śledzenia w korporacji;
3. Świadomość kierownictwa i świadomość pracowników;
4. Systematyczność zapisu punktów kontrolnych przez pracowników;
5. Sprawdzanie zapisów punktów kontrolnych przez kierownictwo;
6. Przepływ informacji między działami.

Na podstawie przedstawionej analizy, można stwierdzić, że wyodrębnione czynniki istotnie wpływają na skuteczność działania systemu identyfikowalności w analizowanym zakładzie.

Skuteczność działania systemu powinno zapewnić odpowiednie zaprojektowanie systemu identyfikowalności, szkolenie pracowników, szerzenie wśród nich świadomości o tym, jak ważne są zapisy kontrolne, stosowanie przez pracowników, przyjętych zasad identyfikowalności oraz identyfikacji, co w efekcie, zapewni, że w systemie nie występują luki, np. spowodowane brakiem danych wynikających z nieprzestrzegania wymagań przez pracowników.

Literatura

- [1] Anonim: The Global Traceability Standard. GS1, Brussels, 2006.
- [2] Bogusz C.: Produkty zwrócone i wycofane. Przemysł Spożywczy, 2005, 7, 10-12.
- [3] Caswell J. A.: Quality assurance, information, tracking, and consumer labeling. Marine Pollution Bulletin, 2006, 53, 650-656.
- [4] Czarniecka- Skubina E., Nowak D.(): System śledzenia ruchu i pochodzenia żywności jako narzędzie zapewnienia bezpieczeństwa konsumentów. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2012, 5, 20-36.
- [5] DK Korporacji: dokumenty wewnętrzne Korporacji,
- [6] Gellynck X., Verbeke W.: Consumer perception of traceability in the meat chain. Agrarwirtschaft, 2001, 50 , 368-374.
- [7] IFS, International Food Standard, wersja 6, sierpień 2010.
- [8] Kijowski J., Nowak E.: Identyfikowalność w łańcuchu pasz i żywności- nowy międzynarodowy standard. Mięso i Wędliny, 2006, 6, 30-33.
- [9] Morrissey M. T., Sylvia G., Thompson M.: Seafood Traceability in the United States: Current Trends, System Design, and Potential Applications,

- Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol.1, Institute of Food Technologists, 2005.
- [10] Olszewski J.: Projekt Traceability, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2005, 4, 34.
 - [11] PN-EN ISO 22005:2007.: Identyfikowalność w łańcuchu pasz i żywności. Ogólne zasady i podstawowe wymagania przy projektowaniu i wdrażaniu systemu.
 - [12] Regattieri, A., Gamberi, M., Manzini, R.: Traceability of Food Products: general framework and experimental evidence. *Journal of Food Engineering*, 2007, 81(2), 347–356.
 - [13] Sarig Y.: Traceability of food products. *CIGR. Journal of Scientific Research and Development*, 2003, 12, 54-65.
 - [14] Smith I., Fruness A.: Improving traceability in food processing and distribution, Woodhead Publishing, England, 2006, 50-60.
 - [15] Sokołowski G.: „Traceability”- nowe wymagania prawa unijnego. *Przemysł Spożywczy*, 2005, 7, 8-9.
 - [16] Śliwczyński B.: Gwarancja bezpieczeństwa w łańcuchu dostaw żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2008, 7, 2-8.
 - [17] Thompson M., Sylvia G., Morrissy M.T.: Seafood traceability in the United States: Current trends, system design, and potential applications. Comprehensive Review. In *Food Science Food Safety*, 2005, 1, 1-7.
 - [18] Traceability, zasady, wymagania. Materiały wewnętrzne Korporacji.
 - [19] Zadernowski M., Obiedziński M.: Traceability - identyfikowalność obowiązków i wyzwania. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2005, 11, 3-7.
 - [20] Ziółkowska A.: Obligatoryjny system identyfikowalności w zakładach przemysłu spożywczego. *Inżynieria Żywności*, 2009, 2, 75-77.

JAKOŚĆ I PRZYDATNOŚĆ TECHNOLOGICZNA ŚLEDZI (*CLUPEA HARENGUS*) POŁAWIANYCH NA BAŁTYKU POŁUDNIOWYM

BOGUSŁAW PAWLIKOWSKI, OLGA SZULECKA

Streszczenie

Celem badań było określenie jakości i przydatności technologicznej śledzi (*Clupea harengus*) poławianych przez polskie jednostki rybackie na Bałtyku południowym, w zależności od sezonu i rejonu połowowego. Jakość i przydatność technologiczną śledzi określono na podstawie ocen jakości sensorycznej ryb metodą QIM, pomiarów podstawowych parametrów morfometrycznych, wielkości wycieku termicznego, oznaczeń podstawowego składu chemicznego, a także wydajności operacji obróbki wstępnej ryb. Z badań wynika, że śledzie poławiane na Bałtyku południowym charakteryzowały się zróżnicowaną, w zależności od rejonu i sezonu połowowego, jakością i przydatnością technologiczną. Różnice dotyczyły m.in. podstawowych wyróżników sensorycznych, długości i masy całkowitej ryb, wielkości wycieku termicznego, podstawowego składu chemicznego oraz wydajności obróbki wstępnej. Na przykład, zawartości wody, białka i tłuszczu w badanych próbach śledzi mieściły się w przedziałach, odpowiednio: $69,5 \div 83,0\%$; $15,2 \div 33,1\%$ oraz $1,2 \div 13,1\%$. Wielkości wycieku termicznego z tkanki rybnej wskutek obróbki cieplnej (parowania) zależały m.in. od postaci surowca; dla ryb całych, tusz i filetów, mieściły się w przedziałach, odpowiednio: $6,5 \div 21,8\%$; $8,3 \div 23,7\%$ i $13,3 \div 26,8\%$. Na wydajność operacji jednostkowych ręcznej obróbki wstępnej śledzi (odgławianie, patroszenie, filetowanie) decydujący wpływ miała jakość tych ryb.

Słowa kluczowe: śledzie, Bałtyk południowy, połowy, jakość, przydatność technologiczna

Wprowadzenie

Śledź (*Clupea harengus*) jest stadną rybą strefy pelagicznej, tworzącą wiele lokalnych podgatunków, np.: śledzie atlantyckie, norweskie, bałtyckie. W porównaniu z innymi podgatunkami, śledzie bałtyckie są zazwyczaj uznawane za surowce mniej wartościowe pod względem wartości odżywczych i przydatności technologicznej. W krajowym przetwórstwie śledzie bałtyckie jako surowce żywnościowe pochodzenia morskiego mają szerokie zastosowanie. Są one wykorzystywane do produkcji wielu asortymentów przetworów, jak konserwy, ryby wędzone, solone, marynowane i in. Prowadzona obecnie polityka połowowa

oraz ograniczone zasoby ryb pelagicznych (śledzi, szprotów) wymagają podjęcia działań w kierunku racjonalizacji i optymalizacji przetwórstwa tych surowców na cele żywnościowe.

Pod względem wartości odżywczych, mięso śledzi zawiera łatwo przyswajalne białko, tłuszcz, a także witaminy: A, D, E, niacynę, B₁, B₂, B₆, B₁₂, oraz substancje mineralne, w tym: potas, wapń, fosfor i magnez [Kunachowicz i in., 2005]. Tłuszcz śledzi stanowi źródło naturalnych, niezbędnych w diecie ludzi, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 (PUFA-n3) [Sikorski, 2004]. Przydatność technologiczna śledzi bałtyckich w dużym stopniu zależy od zawartości tłuszczu w mięsie, która ulega sezonowym zmianom w rocznym cyklu życiowym tych ryb [Anon., 2005]. Z kompleksowej analizy segmentu pelagicznego polskiego rybołówstwa bałtyckiego, opracowanej przez Morski Instytut Rybacki w Gdyni [2009], wynika, że w ostatnim dwudziestolecu odnotowuje się drastyczny spadek zawartości tłuszczu w mięsie śledzi. W latach 90. XX wieku, w okresie połowowym wrzesień-grudzień, zawartość tłuszczu w tych rybach często dochodziła do 15%, podczas gdy obecnie rzadko przekracza 10%. Pod względem budowy ciała i cech morfometrycznych śledzie bałtyckie należą do ryb o niewielkich rozmiarach i masie osobniczej, charakteryzujących się specyficzną, uwodnioną strukturą tkanki mięśniowej. Cechą charakterystyczną tych ryb są duże ubytki masy wskutek wycieku tkankowego, związanego z ciepłą denaturacją białek mięśniowych [Pawlikowski, 2010a]. Wielkość ubytku masy ryb zależy głównie od ich specyficznych cech gatunkowych oraz metody i temperatury obróbki cieplnej. Wodny wyciek termiczny z tkanki rybnej zawiera pewne ilości cennych substancji odżywczych, jak: białka, tłuszcze, węglowodany, a także makro- i mikroelementy [Kołakowski, 2007].

Do podstawowych czynników ograniczających możliwości wykorzystywania śledzi bałtyckich na cele przetwórcze należą: niska zawartość tłuszczu, duże zróżnicowanie wymiarów i masy osobniczej ryb, uwodniona, luźna tekstura mięsa, oraz znaczny udział ryb mechanicznie uszkodzonych, wskutek niewłaściwych metod połowu, przechowywania i transportu. Stosowane obecnie metody przetwarzania śledzi bałtyckich o niskiej przydatności technologicznej są często nieefektywne ze względu na niską wydajność produkcyjną oraz nieodpowiednią jakość uzyskiwanych z nich wyrobów [Pawlikowski, 2010b; Pawlikowski i Dowgiałło, 2010]. Jednym z perspektywicznych kierunków efektywnego wykorzystania ryb małowartościowych, w tym śledzi bałtyckich, może być np. produkcja wyrobów formowanych z rozdrobnionego mięsa ryb, w których naturalna, fizyczna integralność tkanki nie odgrywa istotnej roli [Pawlikowski i Szulecka, 2011; Pawlikowski i Szulecka, 2012]. Systematyczne badania jakości i wartości użytkowej śledzi poławianych przez polskie jednostki rybackie w Bałtyku Południowym, mogą wpłynąć na racjonalizację połowów oraz określić optymalne kierunki przetwarzania tych surowców na cele żywnościowe.

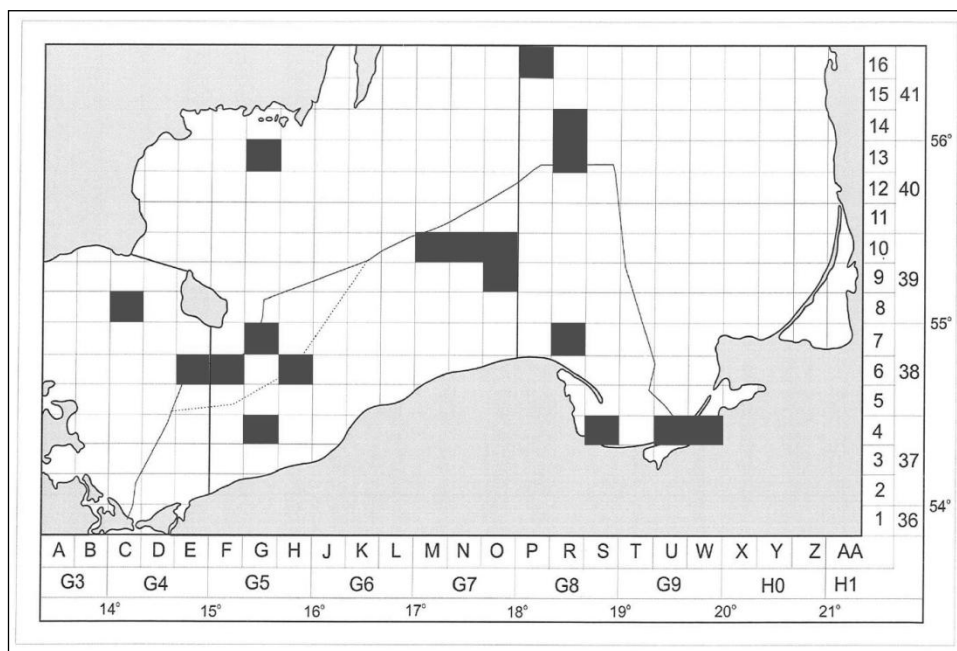
Celem pracy była ocena jakości i przydatności technologicznej śledzi (*Clupea harengus*) poławianych przez polskie jednostki rybackie w określonych rejonach połowowych na Bałtyku Południowym.

Material i metody badań

Materiałem do badań były 23 próby śledzi, złowionych w latach 2013÷2014 przez polskie jednostki rybackie w 18 rejonach połowowych, zawartych między zachodnim rejonem 39G4/C8 a wschodnim rejonem 37G9/U4, znajdujących się na Bałtyku południowym (Tab. 1, Rys.1).

Tabela 1. Daty oraz rejony połowu śledzi bałtyckich

Nr próby	Data połowu	Rejon połowu
1.	2013-04-09	40G5/G13
2.	2013-04-17	37G8/S4
3.	2013-05-15	39G7/M10
4.	2013-06-06	39G4/C8
5.	2013-06-08	39G7/O10
6.	2013-06-11	38G8/R7
7.	2013-08-22	38G8/R7
8.	2013-11-07	38G4/E6
9.	2014-01-15	40G8/R13
10.	2014-02-12	38G4/E6
11.	2014-03-28	38G4/E6
12.	2014-03-31	37G5/G4
13.	2014-04-05	37G9/U4
14.	2014-04-06	37G9/U4
15.	2014-05-05	39G7/N10
16.	2014-05-21	39G7/O9
17.	2014-06-02	38G5/H6
18.	2014-06-24	38G5/F6
19.	2014-08-06	38G7/G7
20.	2014-08-07	38G8/R7
21.	2014-09-03	39G7/N10
22.	2014-10-06	41G8/R14
23.	2014-11-06	41G8/P16



Rys. 1. Wybrane rejony połowu śledzi na Bałtyku południowym. [Opracowanie własne MIR-PIB]

Próby śledzi z danego rejonu połowowego, o masie 3÷4 kg, były losowo pobierane bezpośrednio po ich połowie, z ładowni jednostki rybackiej, do izotermicznego pojemnika, chłodzonego rozdrobnionym lodem. Przechowywane w warunkach chłodniczych próby śledzi dostarczane były do Morskiego Instytutu Rybackiego – Państwowego Instytutu Badawczego i poddane badaniom w ciągu 24 godz., licząc od czasu ich połowu.

Jakość i przydatność technologiczną prób śledzi określana była na podstawie ocen jakości sensorycznej, wskaźników fizycznych i chemicznych i wybranych parametrów technologicznych.

Jakość sensoryczną śledzi określono za pomocą metody QIM (ang. Quality Index Method) [Eurofish, 2015]. Metoda ta polega na ocenie istotnych wyróżników jakości sensorycznej surowych ryb, w tym stan i wygląd skóry, zapach, tekstura części grzbietowej i brzusznej ciała ryb, kształt i barwa oczu, barwa i zapach pokryw skrzelowych. Poszczególne wyróżniki sensoryczne ocenione były metodą punktową, w skali od 0 do 3 pkt., przy czym najwyższy poziom ich jakości odpowiadał 0 pkt, a najniższy 3 pkt. Sumaryczna ocena punktowa wszystkich wyróżników sensorycznych zawarta była w przedziale od 0 do 20 pkt.; im niższa była wartość tej sumy, tym jakość sensoryczna ryb była wyższa.

Pomiary parametrów morfometrycznych obejmowały długość i masę całkowitą ryb ($n=50$ w każdej próbie), liczby ryb przypadającej na 1 kg oraz współczynnik

kondycji ryb (K), tzw. wskaźnik Fultona, $K = (W \cdot 100) \cdot L^{-3}$, gdzie W – masa całkowita ryby [g], L – długość całkowita [cm].

W mięsie śledzi oznaczono podstawowy skład chemiczny: zawartość wody/suchej masy metodą suszenia [PN-ISO 1442:2000], zawartość białka metodą Kjeldahla w analizatorze Kjeltec [PN-A-04018:1975/Az3:2002P], zawartość tłuszczu metodą ekstrakcyjno-wagową Soxhleta w aparacie SOXTEC [PN-ISO 1444:2000, PN-67/A-86734], zawartość popiołu całkowitego metodą spalania [PN-ISO 936:2000].

Względny wyciek termiczny (% masowy) ze śledzi przedstawiono jako stosunek różnicy pomiędzy masą surowych ryb przed obróbką cieplną (parowanie w 100°C, przez 15 min) a masą ryb po obróbce cieplnej, po usunięciu wycieku termicznego, do masy surowych ryb.

Wydajność operacji ręcznej obróbki wstępnej śledzi (% masowy) wyrażono jako iloraz masy ryb po operacji do masy ryb przed operacją. Wydajność produktu określała sumaryczną wydajność poszczególnych operacji, tj. odgławiania, patroszenia i filetowania ryb.

Wyniki oznaczeń wskaźników fizycznych i chemicznych przedstawiano jako średnie arytmetyczne z pomiarów n próbek wraz z odchyleniem standardowym, obliczonym z rozstępu uzyskanych wyników. Analizę statystyczną uzyskanych wyników badań przeprowadzono wykorzystując program statystyczny STATISTICA ver. 9.0.

Wyniki i dyskusja

Badania wykazały, że średnie długości ryb oraz ich masa w poszczególnych próbach były zróżnicowane (Tab. 2). W marcu 2014 r., największą średnią długością całkowitą (27,1 cm) i masą (155,9 g) charakteryzowały się śledzie z rejonu połowowego 37G5/G4 (zachodnia część analizowanego obszaru morskiego), a z kolei najmniejsza średnia długość (18,7 cm) i masa (46,3 g) odnosiła się do śledzi z rejonu połowowego 39G7/N10 (środkowa część analizowanego obszaru). Stwierdzono statystycznie istotną współzależność korelacyjną pomiędzy długością całkowitą śledzi a ich masą; współczynnik korelacji wyniósł $r=0,96$ ($p \leq 0,05$).

Związany z parametrami morfometrycznymi, wskaźnik liczby ryb w 1 kg ich masy, był zróżnicowany i zawarty w przedziale od 7 do 22. Kondycja śledzi została określona za pomocą wskaźnika Fultona (K). Najwyższą kondycją ($K=0,8$ g/cm³) charakteryzowały się śledzie złowione w marcu w rejonie połowowym 38G4/E6 (zachodnia część analizowanego obszaru morskiego), natomiast najniższą kondycję ($K=0,6$ g/cm³) miały śledzie złowione w czerwcu w rejonie połowowym 38G7/O10 (centralna część analizowanego obszaru).

Tabela 2. Parametry morfometryczne i jakość śledzi bałtyckich

Nr próby	Średnia długość całkowita [cm]	Średnia masa [g]	Współczynnik Fultona [g/cm ³]	Liczba ryb [szt./kg]	Jakość [pkt]
1.	21,5 ± 1,3	64,4 ± 13,0	0,6 ± 0,1	16	3,3 ± 0,6
2.	22,3 ± 0,9	75,5 ± 11,0	0,7 ± 0,1	13	1,7 ± 1,2
3.	19,8 ± 1,6	45,8 ± 12,2	0,6 ± 0,1	22	0,7 ± 1,2
4.	22,0 ± 1,3	66,7 ± 12,2	0,6 ± 0,1	15	0,7 ± 1,2
5.	21,4 ± 1,8	57,1 ± 15,8	0,6 ± 0,1	18	13,3 ± 0,0
6.	22,3 ± 1,4	67,3 ± 12,6	0,6 ± 0,1	15	0,0 ± 0,0
7.	20,0 ± 1,6	50,3 ± 12,5	0,7 ± 0,1	20	10,3 ± 2,1
8.	21,3 ± 1,3	64,1 ± 13,6	0,7 ± 0,1	16	1,3 ± 0,6
9.	20,0 ± 1,7	51,0 ± 13,3	0,7 ± 0,1	20	10,0 ± 1,7
10.	21,4 ± 1,7	66,6 ± 15,5	0,7 ± 0,1	15	10,3 ± 2,3
11.	26,3 ± 1,0	147,5 ± 16,6	0,8 ± 0,1	7	9,3 ± 3,1
12.	27,1 ± 0,8	155,9 ± 20,8	0,8 ± 0,1	7	14,7 ± 4,7
13.	25,4 ± 0,6	121,0 ± 12,8	0,7 ± 0,1	8	10,7 ± 4,7
14.	20,3 ± 1,5	56,6 ± 14,3	0,7 ± 0,1	7	13,3 ± 1,5
15.	20,2 ± 0,9	52,1 ± 7,3	0,6 ± 0,1	97	6,3 ± 0,6
16.	20,1 ± 1,6	52,2 ± 1,8	0,6 ± 0,1	20	7,3 ± 1,0
17.	22,4 ± 1,5	78,1 ± 14,7	0,7 ± 0,1	12	2,0 ± 0,0
18.	19,8 ± 1,3	51,4 ± 9,7	0,7 ± 0,1	20	10,0 ± 1,0
19.	18,7 ± 1,4	46,8 ± 9,0	0,7 ± 0,1	20	12,3 ± 3,8
20.	19,3 ± 1,0	52,8 ± 8,1	0,7 ± 0,1	19	6,0 ± 2,6
21.	18,7 ± 1,0	46,3 ± 7,4	0,7 ± 0,1	22	11,0 ± 2,0
22.	21,6 ± 0,5	77,51 ± 6,6	0,7 ± 0,1	13	12,0 ± 2,0
23.	19,3 ± 1,4	50,6 ± 10,5	0,7 ± 0,1	22	5,7 ± 2,9

Jakość sensoryczna badanych śledzi, określona metodą punktową (QIM), była zawarta w przedziale między 0,0 pkt. (najwyższa jakość) a 14,7 pkt. (najniższa jakość). Na tak duże zróżnicowanie poziomu jakości śledzi wpływ może mieć wiele czynników technicznych i technologicznych, związanych z warunkami ich połowu, metodami transportu i przechowywania ryb na statku, np. w chłodzonej wodzie morskiej lub lodzie [Sikorski, 1980].

Podstawowy skład chemicznego mięsa śledzi ulegał okresowym zmianom, związanym z rocznym cyklem życiowym tych ryb (Tab. 3). Zawartość białka w mięsie śledzi mieściła się w przedziale od 15,2% (kwiecień, rejon połowowy 37G9/U4 – wschodnia część analizowanego obszaru) do 33,1% (sierpień, rejon połowowy 38G8/R7 – wschodnia część analizowanego obszaru). Ważnym wskaźnikiem określającym przydatność technologiczną śledzi jest zawartość w nich tłuszczu; im jest ona wyższa, tym większa jest przydatność technologiczna śledzi w przetwórstwie [Anon., 2005]. Zawartość tłuszczu w mięsie śledzi jest

ujemnie skorelowana z zawartością wody, im wyższa była zawartość tłuszczu tym niższa była zawartość wody w mięsie [Sikorski, 1980]. W badanych próbach śledzi, zawartości tłuszczu i wody mieściły się w przedziałach, odpowiednio: od 1,2% i 83,0% (maj, rejon połowowy 39G7/M10 – środkowa część analizowanego obszaru) do 13,1% i 69,5% (październik, rejon połowowy 41G8/R14 - środkowa część analizowanego obszaru). Stwierdzono statystycznie istotną współzależność korelacyjną pomiędzy zawartością wody a zawartością tłuszczu w mięsie śledzi; współczynnik korelacji wyniósł $r=0,92$ ($p \leq 0,05$). Średnie wartości wydajności ręcznej obróbki wstępnej śledzi zostały przyporządkowane trzem poziomom ich jakości: $0,0 \div 0,7$; $0,8 \div 5,7$ i $5,8 \div 14,7$ pkt.

Tabela 3. Podstawowy skład chemiczny śledzi bałtyckich

Nr próby	Białko (N·6,25) [%]	Tłuszcz [%]	Sucha masa [%]	Woda [%]	Popiół całkowity [%]
1.	$16,8 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,1$	$22,7 \pm 0,0$	$77,3 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,1$
2.	$16,6 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$20,5 \pm 0,1$	$79,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
3.	$15,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,0$	$17,0 \pm 0,1$	$83,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
4.	$17,1 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,2$	$25,0 \pm 0,1$	$75,0 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
5.	$15,8 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,1$	$19,7 \pm 0,1$	$80,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
6.	$15,8 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,2$	$76,9 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$
7.	$33,1 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,2$	$23,2 \pm 0,1$	$76,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
8.	$16,9 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,0$	$26,1 \pm 0,2$	$73,9 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$
9.	$16,8 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,1$	$25,3 \pm 0,1$	$74,7 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,0$
10.	$17,8 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,0$	$25,6 \pm 0,1$	$74,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
11.	$14,3 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,0$	$22,1 \pm 0,1$	$77,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
12.	$15,3 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,1$	$26,2 \pm 0,1$	$73,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$
13.	$15,6 \pm 0,0$	$4,8 \pm 0,1$	$21,6 \pm 0,2$	$78,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$
14.	$15,2 \pm 0,0$	$1,6 \pm 0,2$	$17,9 \pm 0,1$	$82,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
15.	$17,1 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$21,5 \pm 0,1$	$78,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
16.	$16,8 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$	$20,8 \pm 0,1$	$79,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,0$
17.	$16,4 \pm 0,0$	$9,5 \pm 0,3$	$27,4 \pm 0,2$	$72,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,0$
18.	$17,3 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$	$24,8 \pm 0,2$	$75,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,0$
19.	$16,9 \pm 0,3$	$9,7 \pm 0,2$	$27,6 \pm 0,2$	$72,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$
20.	$16,9 \pm 0,1$	$10,6 \pm 0,1$	$28,5 \pm 0,2$	$71,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$
21.	$16,8 \pm 0,3$	$10,5 \pm 0,1$	$28,7 \pm 0,2$	$71,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$
22.	$16,9 \pm 0,3$	$13,1 \pm 0,0$	$30,5 \pm 0,2$	$69,5 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
23.	$17,1 \pm 0,2$	$11,0 \pm 0,1$	$28,9 \pm 0,1$	$71,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$

Badania wykazały duży wpływ poziomu jakości śledzi na wydajność operacji obróbki wstępnej (Tab. 4). W odniesieniu do odgławiania, patroszenia i filetowania śledzi o najwyższym poziomie jakości ($0 \div 0,7$ pkt.) wydajności tych operacji były największe i wynosiły, odpowiednio: 82,5; 74,7, 90,2%, przy wydajności produktu

59,1%. Wraz z obniżaniem się poziomu jakości śledzi zmniejszała się także wydajność operacji obróbki wstępnej. W odniesieniu do śledzi o najniższym poziomie jakości (5,8÷14,7 pkt.) wydajności odgławiania, patroszenia i filetowania wyniosły, odpowiednio: 78,2; 72,1; 82,4%, przy wydajności produktu 53,6% (Tab. 4).

Badania wykazały, że wyciek termiczny ze śledzi zależał od ich postaci asortymentowej (cała ryba, tusza lub filet). We wszystkich badanych próbach, najmniejszy wyciek termiczny wystąpił w rybach całych, większy w tuszach a największy – w filetach.

Stwierdzono wpływ poziomu jakości śledzi na wielkość wycieku termicznego. W przypadku śledzi o wysokiej jakości (0÷0,7 pkt.) wyciek termiczny z ryb całych, tusz i filetów wyniósł, odpowiednio: 12,3; 14,9; 16,1%, podczas gdy w przypadku śledzi o niskiej jakości (5,8÷14,7 pkt.) wielkości wycieku termicznego były większe i wyniosły, odpowiednio: 21,6; 23,7 i 26,8%.

Tabela 4. Wydajności ręcznej obróbki wstępnej oraz wielkości wycieku termicznego ze śledzi

Poziom jakości [pkt]	Wydajność obróbki wstępnej* [%]				Wyciek termiczny** [%]		
	O	P	F	W	R	T	F
0÷0,7	82,5 ± 1,4	74,7 ± 2,3	90,2 ± 1,6	59,1 ± 0,4	12,3 ± 3,2	14,9 ± 3,6	16,1 ± 2,7
0,8÷5,7	79,6 ± 0,9	73,2 ± 3,0	86,7 ± 0,7	56,1 ± 0,5	12,7 ± 2,9	16,2 ± 2,7	18,8 ± 3,0
5,8÷14,7	78,2 ± 2,1	72,1 ± 2,9	82,4 ± 2,8	53,6 ± 1,1	21,6 ± 1,2	23,7 ± 0,2	26,8 ± 2,1

* O – odgławianie, P – patroszenie, F – filetowanie, W – produkt

** R – ryba cała, T – tuszka, F – filet

Wielkości wycieku termicznego ze śledzi bałtyckich mają istotny wpływ na jakość oraz wydajność produktów z nich wytwarzanych, które poddawane są w procesie produkcyjnym obróbce cieplnej.

Wnioski

1. Pod względem parametrów morfometrycznych, największą średnią długością (27,1 cm) i masą całkowitą (155,9 g) charakteryzowały się śledzie poławiane w marcu, w zachodniej analizowanej części Bałtyku południowego (rejon połowowy 37G5/G4), zaś najmniejsza średnia długość (18,7 cm) i masa (46,3 g) odnosiła się do śledzi poławianych w marcu w środkowym obszarze Bałtyku południowego (rejon połowowy 39G7/N10).

2. Najwyższy poziom jakości sensorycznej posiadały śledzie poławiane w czerwcu, na wschodnim analizowanym obszarze Bałtyku południowego (rejon połowowy 38G8/R7), natomiast najniższą jakością sensoryczną charakteryzowały się śledzie poławiane w marcu, na zachodnim obszarze Bałtyku południowego (rejon połowowy 37G5/G4).
3. W mięsie śledzi, pochodzących z analizowanych rejonów połowowych, zawartości wody, białka i tłuszczu charakteryzowały się cykliczną, roczną zmiennością i mieściły się w przedziałach, odpowiednio: $69,5 \div 83,0\%$; $15,2 \div 33,1\%$ oraz $1,2 \div 13,1\%$.
4. Wydajności ręcznego odgławiania, patroszenia i filetowania śledzi o wysokim poziomie jakości były, w zależności od rodzaju półproduktu, wyższe o $2,6 \div 7,8\%$ w porównaniu z wydajnościami tych operacji uzyskanymi dla śledzi o niskim poziomie jakości.
5. Wielkości wycieku termicznego z ryb całych, tusz i filetów po obróbce cieplnej śledzi o wysokim poziomie jakości były, w zależności od rodzaju półproduktu, niższe o $8,8 \div 10,7\%$ w porównaniu z wielkością wycieku termicznego dla śledzi o niskim poziomie jakości.

Literatura

- [1] Anon.: Wykorzystanie bałtyckiego śledzia i szprota na cele konsumpcyjne. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Departament Rybołówstwa, Warszawa, 2005.
- [2] Anon.: Kompleksowa ocena segmentu pelagicznego polskiego rybołówstwa bałtyckiego celem wskazania możliwości podniesienia jego efektywności poprzez wdrażanie Programu Operacyjnego „Zrównoważony rozwój sektora rybołówstwa i nadbrzeżnych obszarów rybackich 2007- 2013”. Opracowanie przygotowane na zlecenie Departamentu Rybołówstwa MRiRW (praca zbiorowa). Morski Instytut Rybacki w Gdyni, Gdynia, 2009.
- [3] EUROFISH: QIM, [<http://www.qim-eurofish.com/>], 2015.
- [4] Kołakowski E.: Postępy w technologii konserw rybnych. Materiały konferencyjne. Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa. Akademia Rolnicza. Szczecin, 2007, 7-30.
- [5] Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K.: Tabele składu i wartości odżywczej żywności. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa, 2005.
- [6] Pawlikowski B.: Influence of heat sterilization on the content of selected physicochemical indicators of canned sprat. New trends of research in agricultural engineering [in:] Technique and technologies in agricultural engineering (monograph). Published by Editorial House Wieś Jutra. Warsaw, 2010a. 32-40.

- [7] Pawlikowski B.: Trends and possibilities within Baltic sprat processing. Eurofish Magazine, 2010b, 4, 50-52.
- [8] Pawlikowski B., Dowgiałło A.: Technologiczne uwarunkowania wzrostu przetwórstwa szprotów bałtyckich na cele konsumpcyjne. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2010, 2, 33-36.
- [9] Pawlikowski B., Szulecka O.: Kształtowanie jakości i wartości odżywczej produktów ze śledzi bałtyckich o obniżonej przydatności technologicznej. [w:] Żywność projektowana. Designed food (monografia). Wydawca: Oddział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności. Kraków, 2011, 46-59.
- [10] Pawlikowski B., Szulecka O.: Wpływ składu surowcowego na kształtowanie właściwości reologicznych farszów ze śledzi bałtyckich. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2012, 2, t. 22, 41, 79-83.
- [11] PN-A-04018:1975/Az3:2002P Produkty rolniczo-żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
- [12] PN-67/A-86734 Ryby, przetwory rybne i produkty uboczne z ryb. Oznaczenia zawartości tłuszczu.
- [13] PN-ISO 936:2000 Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie popiołu całkowitego.
- [14] PN-ISO 1444:2000 Mięso i przetwory mięsne. Oznaczenia zawartości tłuszczu wolnego.
- [15] PN-ISO 1442:2000 Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości wody (metoda odwoławcza).
- [16] Sikorski Z. E.: Technologia żywności pochodzenia morskiego. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1980.
- [17] Sikorski Z. E.: Ryby i bezkręgowce morskie. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2004.

IZOLACJA I IDENTYFIKACJA SZCZEPÓW BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ POCHODZĄCYCH Z WĘDLIN SUROWO DOJRZEWAJĄCYCH

ANNA RZEPKOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA, ALEKSANDRA OŁDAK,
PAWEŁ KRAJMAS, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

Streszczenie

Bakterie fermentacji mlekowej stanowią naturalną i dominującą mikroflorę wędlin surowo dojrzewających. Szczepy LAB izolowane z żywności spontanicznie fermentowanej mogą wykazywać przydatność technologiczną jako kultury startowe żywności oraz wykazywać właściwości potencjalnie probiotyczne.

Celem pracy była izolacja i wstępna identyfikacja szczepów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z wędlin surowo dojrzewających, konserwowanych z dodatkiem ekologicznej serwatki. W wyniku przeprowadzonych badań wyizolowano 32 szczepy z polędwicy, baleronu oraz kielbasy. Obserwacja hodowli pod mikroskopem, barwienie Grama i test na obecność katalazy pozwoliły na przyporządkowanie 23 szczepów do rodzaju *Lactobacillus*, które były mikroflorą dominującą i stanowiły 72% wszystkich izolatów. Ponadto, wyizolowano 6 szczepów zakwalifikowanych do bakterii-ziarniaków (odpowiednio 19% izolatów) oraz 3 szczepy zakwalifikowane do drożdży (9% izolatów). Szczepy z rodzaju *Lactobacillus* (23) zidentyfikowano gatunkowo za pomocą testów biochemicznych API 50 CH, wyróżniając następujące gatunki: *Lb. paracasei* (SCH1, SCH3, SCH5, BAL3, KŁ5, KŁ7), *Lb. pentosus* (SCH2, SCH4, SCH6, BAL7, BAL9, KŁ3, KŁ6, KŁ10, KŁ12), *Lb. plantarum* (KŁ9, KŁ14), *Lb. brevis* (BAL5, BAL10, KŁ11, KŁ13) i *Lb. acidophilus* (BAL1, BAL6). Wyizolowane szczepy mogły pochodzić z surowca użytego do produkcji wędlin (mikroflora dominująca – LAB) lub z serwatki, dodanej w czasie produkcji, w celu utrwalenia produktów.

Zgodnie z zaleceniami Grupy Ekspertckiej FAO/WHO powyższe szczepy powinny zostać zidentyfikowane za pomocą metod genotypowych, w celu potwierdzenia rodzaju i gatunku danego szczepu, co umożliwia zdeponowanie bakterii w międzynarodowej kolekcji mikroorganizmów.

Słowa kluczowe: izolacja, identyfikacja, bakterie fermentacji mlekowej, *Lactobacillus*, wędliny surowo dojrzewające

Wprowadzenie

Bakterie fermentacji mlekowej (ang. *lactic acid bacteria* - LAB) to zróżnicowana grupa mikroorganizmów, prowadząca beztlenową fermentację, której głównym produktem jest kwas mlekowy. Dodatkowymi produktami fermentacji mlekowej mogą być również kwas octowy, aldehyd octowy, etanol, dwutlenek węgla, acetoina, diacetyl czy butandiol. LAB są beztlenowymi, Gram-dodatnimi, katalazo-ujemnymi pałeczkami bądź też ziarniakami.

Według nomenklatury Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [2009], bakterie fermentacji mlekowej sklasyfikowano w rzędzie *Lactobacillaceae* i przyporządkowano kolejno do następujących rodzin i rodzajów:

- *Lactobacillaceae*: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*;
 - *Aerococcaceae*: *Aerococcus*, *Abiotrophia*, *Facklamia*, *Dolosicoccus*, *Ignavigranum*, *Eremococcus*, *Globicatella*;
 - *Carnobacteriaceae*: *Carnobacterium*, *Alloiococcus*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Atopobacter*, *Dolosigranum*, *Atopostipes*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinolactibacillus*, *Trichococcus*;
 - *Enterococcaceae*: *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*;
 - *Leuconostocaceae*: *Leuconostoc*, *Weisella*, *Oecococcus*;
 - *Streptococcaceae*: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactovum*;
- oraz w rzędzie *Bacillales*:
- *Sporolactobacillaceae*: *Sporolactobacillus* [Jurkowski i Błaszczyk, 2012].

Mikroorganizmy te występują powszechnie w środowisku. Cechują się dużym zapotrzebowaniem pokarmowym, dlatego najczęściej odnajduje się w środowiskach bogatych w węglowodany, aminokwasy i pochodne nukleotydów, o małym stężeniu tlenu. Jednocześnie mają duże zdolności adaptacyjne i potrafią przystosować się do trudnych warunków środowiskowych, np. dobrze tolerują podłoża kwaśne, poprzez regulację wewnątrzkomórkowego pH.

Naturalnie występują w błonach śluzowych człowieka i zwierząt oraz zasiedlają ich układ pokarmowy i drogi rodne. Ponadto, stanowią rodzimą mikroflorę mleka i fermentowanych produktów mlecznych, owoców i warzyw, ziaren zbóż i pieczywa, napojów alkoholowych oraz mięsa i wędlin [Libudysz, 2008; Gajewska i Błaszczyk, 2012].

Najliczniejszy i najbardziej zróżnicowany gatunkowo rodzaj LAB to *Lactobacillus*. Są to wydłużone, nieruchliwe, nieurzęsione pałeczki, o wymiarach 0,5-1,2x1,0-10,0 μm , często układające się w krótkie łańcuszki. Nie wytwarzają przetrwalników. Należą do grupy mezofili (optimum wzrostu w temperaturze 20-28°C) lub termofili (optimum wzrostu w temperaturze 40-45°C). Komórki *Lactobacillus* zawierają od 32 do 56% molowych zasad azotowych G+C. Genom bakterii mlekowych jest stosunkowo mały i zależnie od gatunku wynosi 1,8-3,3 MPz. W zależności od szlaku przemian cukrów i gatunku, *Lactobacillus*

klasyfikowane są jako hetero-fermentatywne (np. *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*), obligatoryjnie heterofermentatywne (np. *Lb. reuteri*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*) bądź fakultatywnie heterofermentatywne (np. *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus*) [Hammes i Vogel, 1995; Libudzisz, 2008].

Bakterie kwasu mlekowego są powszechnie wykorzystywane w technologii żywności jako kultury startowe oraz do produkcji żywności na drodze spontanicznej fermentacji. Pierwotnym i podstawowym celem stosowania tych mikroorganizmów było utrwalanie żywności. Obecnie zainteresowanie tymi drobnoustrojami rośnie, ze względu na poszukiwanie nowych, wyselekcjonowanych szczepów o przydatności biotechnologicznej oraz medycznej (probiotyki), czego wyrazem jest izolacja bakterii z żywności fermentowanej naturalnie [Złotkowska i in., 2005; Gajewska i Błaszczuk, 2012].

Obecnie w mikrobiologii obserwuje się trend, w którym bakterie o cechach probiotycznych, izoluje się nie tylko z układu pokarmowego człowieka, ale również z żywności spontanicznie fermentowanej. Liczne badania naukowe potwierdzają, że LAB, a w szczególności bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, pochodzące z żywności, zasiedlają jelito grube człowieka oraz mogą odgrywać istotną rolę w jego prawidłowym funkcjonowaniu. Co więcej, według Holzapfela [2002] rośnie potrzeba selekcji nowych szczepów bakterii, o właściwościach funkcjonalnych, w celu poprawy jakości żywności i rozszerzenia oferty produktów fermentowanych, w tym probiotycznych.

Zgodnie z wytycznymi zaproponowanymi przez FAO/WHO [2002], każdy szczep bakterii, który potencjalnie mógłby zostać zastosowany jako kultura startowa w żywności i mógłby być uznany jako potencjalnie probiotyczny, musi zostać dokładnie przebadany. Etapem pierwszym, w badaniach kultur probiotycznych, jest dokładna identyfikacja szczepu za pomocą metod fenotypowych oraz genotypowych, z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej, które pozwalają na zidentyfikowanie rodzaju, gatunku i szczepu mikroorganizmu oraz zdeponowanie go w między narodowej kolekcji hodowli [FAO/WHO, 2002].

Celem pracy była izolacja i wstępna identyfikacja szczepów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z wędlin surowo dojrzewających - polędwicy, baleronu i kielbasy.

Materiał i metody badań

Materiał

Materiał do badań stanowiły 3 partie wędlin surowo dojrzewających (polędwica, baleron, kielbasa), wyprodukowane metodą tradycyjną, z zastosowaniem konserwowania ekologiczną serwatką kwasową, przez dodatek do farszu bądź moczenie, w celu przedłużenia trwałości produktów. Wędliny zostały wyprodukowane przez Zakład Mięсны „Jasiołka” w Dukli, który pozyskuje mięso z lokalnych gospodarstw ekologicznych.

Izolacja szczepów z wędlin surowo dojrzewających

W celu izolacji szczepów, 10 g każdej wędliny (połędwica, baleron lub kiełbasa) homogenizowano w stomacherze (IUL Instruments, Hiszpania) z dodatkiem wody peptonowej (BioMaxima, Polska) przez 2 minuty. Kolejno wykonywano szeregi rozcieńczeń i posiewano 100 µl na przygotowany wcześniej agar MRS (BioMaxima, Polska), metodą powierzchniową. Płytki Petriego inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Po inkubacji izolowano pojedyncze, różniące się od siebie, kolonie mikroorganizmów za pomocą sterylnej ezy i posiewano ponownie na agar MRS. Po kolejnej 48-godzinnej inkubacji (37°C), wykonywano posiew redukcyjny, w celu sprawdzenia czystości wyizolowanego szczepu. Hodowle mikroorganizmów zamrożono w -80°C w bulionie MRS (BioMaxima, Polska) z dodatkiem 20% glicerolu.

Identyfikacja rodzaju mikroorganizmów za pomocą metod fenotypowych - obserwacja pod mikroskopem, barwienie Grama, test na obecność katalazy

Pojedyncze kolonie mikroorganizmów identyfikowano fenotypowo, wykonując barwienie Grama. Przemyte wodą destylowaną preparaty obserwowano pod mikroskopem z dodatkiem olejku immersyjnego. Gram-dodatnie bakterie barwią się na kolor fioletowy, w wyniku tworzenia się trwałego kompleksu barwnego, którego nie można wypłukać mieszaniną etanolu i acetonu.

Test na obecność katalazy wykonywano z dodatkiem nadtlenu wodoru, każdorazowo nakrapiając 3% roztwór nadtlenu wodoru na pojedyncze kolonie mikroorganizmów, znajdujących się na płytkach z agarem MRS. Mikroorganizmy katalazo-ujemne nie wydzielają pęcherzyków gazu.

Identyfikacja gatunku mikroorganizmów za pomocą testów API 50 CH

Identyfikację gatunków mikroorganizmów, zakwalifikowanych uprzednio za pomocą obserwacji pod mikroskopem do rodzaju *Lactobacillus*, prowadzono za pomocą testów biochemicznych API 50 CH (bioMérieux), zgodnie z instrukcją producenta.

Wyniki i dyskusja

W tradycyjnej technologii fermentacji mięsa, dominującą mikroflorę stanowią bakterie fermentacji mlekowej. Zadaniem LAB jest przedłużenie trwałości oraz nadanie wędlinom korzystnego zapachu, smaku i tekstury. W pierwszym etapie dojrzewania wędlin rozwijają się głównie ziarniaki, pałeczki *Achromobacter* i enterokoki. W drugim etapie rozwijają się bakterie mlekowe, szczególnie z rodzaju *Lactobacillus* oraz paciorkowce mlekowe. Oprócz mikroflory dominującej surowo dojrzewających wędlin, jaką są bakterie fermentacji mlekowej, znajdują się tam również drożdże oraz gronkowce koagulazo-ujemne [Duszkiewicz-Reinhard i in., 2003; Węsierska i in., 2012]. Według Neffe-Skocińskiej i in. [2011] w surowo dojrzewających połędwicach liczba bakterii fermentacji mlekowej wynosi ponad 4 log jtk/g produktu, natomiast w kiełbasach fermentowanych [Trzaskowska i in., 2014] ponad 8 log jtk/g produktu.

W wyniku przeprowadzonych badań, z wędlin wyizolowano 32 pojedyncze szczepy mikroorganizmów - 8 szczepów z polędwicy, 10 szczepów z baleronu i 14 szczepów z kielbasy. Poszczególne szczepy oznaczono symbolami SCH, BAL i KŁ oraz kolejnymi numerami (Tab. 1).

Tab. 1. Identyfikacja fenotypowa 32 szczepów wyizolowanych z wędlin surowo dojrzewających

Symbol szczepu	Morfologia	Test Grama	Test na obecność katalazy	Rodzaj	Gatunek (API 50 CH)
SCH1	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
SCH2	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
SCH3	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
SCH4	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
SCH5	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
SCH6	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
SCH7	bakterie - ziarniaki	G(+)	(-)	-	-
SCH8	bakterie - ziarniaki	G(+)	(-)	-	-
BAL1	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
BAL2	drożdże	G(+)	(+)	-	-
BAL3	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
BAL4	drożdże	G(+)	(+)	-	-
BAL5	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i>
BAL6	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
BAL7	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
BAL8	drożdże	G(+)	(+)	-	-
BAL9	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
BAL10	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i>
KŁ1	bakterie - ziarniaki	G(+)	(-)	-	-
KŁ2	bakterie - ziarniaki	G(+)	(-)	-	-
KŁ3	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
KŁ4	bakterie - ziarniaki	G(+)	(-)	-	-
KŁ5	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
KŁ6	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
KŁ7	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
KŁ8	bakterie - ziarniaki	G(+)	(-)	-	-
KŁ9	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. plantarum</i>
KŁ10	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
KŁ11	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i>
KŁ12	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>
KŁ13	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i>
KŁ14	bakterie - pałeczki	G(+)	(-)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. plantarum</i>

Obserwacja kolonii pod mikroskopem, barwienie Grama oraz test na obecność katalazy pozwoliły na wstępną identyfikację i przyporządkowanie do rodzaju *Lactobacillus* następujących 23 szczepów: SCH1, SCH2, SCH3, SCH4, SCH5,

SCH6, BAL1, BAL3, BAL5, BAL6, BAL7, BAL9, BAL10, KŁ3, KŁ5, KŁ6, KŁ7, KŁ9, KŁ10, KŁ11, KŁ12, KŁ13 i KŁ14. Wszystkie wskazane wyżej szczepy były Gram-dodatnimi pałeczkami, katalazo-ujemnymi. Pozostałe szczepy zakwalifikowano do Gram-dodatnich, katalazo-ujemnych ziarniaków (SCH7, SCH8, KŁ1, KŁ2, KŁ4, KŁ8) bądź też do Gram-dodatnich, katalazo-dodatnich drożdży (BAL2, BAL4, BAL8). Spośród wszystkich wyizolowanych szczepów, 72% z nich stanowiły pałeczki, 19% ziarniaki i 9% drożdże.

Wyizolowane szczepy mogą pochodzić z surowca użytego do produkcji wędlin (mikroflora dominująca – LAB) lub z serwatki, dodanej w czasie produkcji, w celu utrwalenia produktów wędliniarskich.

Szczepy, przyporządkowane do rodzaju *Lactobacillus*, zostały zidentyfikowane na poziomie gatunku za pomocą testów biochemicznych API 50 CH (Tab.1). Wyróżniono następujące gatunki *Lactobacillus*: *Lb. paracasei* (SCH1, SCH3, SCH5, BAL3, KŁ5, KŁ7), *Lb. pentosus* (SCH2, SCH4, SCH6, BAL7, BAL9, KŁ3, KŁ6, KŁ10, KŁ12), *Lb. plantarum* (KŁ9, KŁ14), *Lb. brevis* (BAL5, BAL10, KŁ11, KŁ13) i *Lb. acidophilus* (BAL1, BAL6).

Według Grupy Eksperckiej FAO/WHO [2002] identyfikacja fenotypowa szczepów jest niewystarczająca, dlatego w celu potwierdzenia rodzaju i gatunku danego szczepu konieczna jest identyfikacja na poziomie genetycznym, z wykorzystaniem nowoczesnych technik biologii molekularnej (np. PCR, sekwencjonowanie 16S rDNA).

W przeszłości podejmowano próby izolacji szczepów bakterii fermentacji mlekowej z żywności pochodzenia zwierzęcego. Już w roku 1987 Schillinger i Lücke podjęli się identyfikacji LAB, pochodzących ze świeżego mięsa (wołowiny i wieprzowiny) oraz produktów mięsnych (kielbasa surowo dojrzewająca, kielbasa mortadela). Hodowlę szczepów prowadzili na agarze Rogosa oraz agarze MRS, w temperaturze 25°C, w warunkach beztlenowych. W wyniku przeprowadzonych badań wyizolowano 229 szczepów z rodzaju *Lactobacillus*. Wśród nich odnaleźć można takie gatunki jak: *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. hilgardii*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake* czy *Lb. viridescens* [Schillinger i Lücke, 1987]. W badaniach własnych również wyizolowano szczepy z gatunku *Lactobacillus plantarum* oraz *Lactobacillus brevis*. Inkubację hodowli na agarze MRS prowadzono jednak w wyższej temperaturze, bliższej temperaturze fermentacji mlekowej, tj. 37°C.

Ruiz-Moyano i in. [2008] wyizolowali 363 szczepy z tradycyjnych, suchych kielbas fermentowanych. Hodowle bakterii prowadzono na agarze LAMVAB i agarze M17. Wśród wyizolowanych mikroorganizmów, mikroflorę dominującą stanowiły LAB z gatunku *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus curvatus*. W badaniach własnych również stwierdzono, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są drobnoustrojami, które występują w wyrobach mięsnych w największej liczbie. Środowisko mięsne jest dla rozwoju LAB środowiskiem niekorzystnym. W przypadku produktów mięsnych proces fermentacji mlekowej i dojrzewania wyrobów jest utrudniony, ze względu na niską zawartość glukozy, niskie pH

środowiska, niską aktywność wody i wysoką zawartość NaCl [De Vuyst i in., 2008; Sionek i in., 2014]. Jednak Ruiz-Moyano i in. [2008] podkreślają, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* bardzo dobrze adaptują się do trudnych warunków środowiskowych.

Z kolei Bromberg i in. [2004] wyizolowali 813 szczepów bakterii fermentacji mlekowej z 174 próbek mięsnych. Hodowlę bakterii mlekowych prowadzono na standardowym agarze MRS z dodatkiem azydku sodu, w celu zahamowania wzrostu bakterii Gram-ujemnych. Wśród wyizolowanych szczepów zidentyfikowano LAB produkujące bakteriocyny, które hamowały wzrost najpopularniejszych patogenów żywności. Szczepy izolowane z żywności, oprócz przydatności technologicznej, mogą wykazywać właściwości antagonistyczne w stosunku do mikroflory patogennej, co jest korzystne przy produkcji żywności, niepodlegającej obróbce termicznej, takiej jak mięso i wędliny surowo dojrzewające.

Jak pokazują wskazane wyżej wyniki badań, żywność fermentowana spontanicznie, jest dobrym źródłem bakterii fermentacji mlekowej. Wśród nich odnaleźć można mikroorganizmy z rodzaju *Lactobacillus*, szczególnie cenne ze względu na swoją przydatność technologiczną i właściwości prozdrowotne.

Zgodnie z wytycznymi przewodnika FAO/WHO, identyfikacja to pierwszy i niezbędny etap przy określaniu przydatności szczepu jako kultury startowej oraz w celu udowodnienia właściwości probiotycznych, dlatego rekomenduje się zidentyfikowanie szczepów za pomocą nowoczesnych metod biologii molekularnej, które są najbardziej precyzyjne.

Wnioski

1. Wędliny surowo dojrzewające, wyprodukowane z surowca ekologicznego z dodatkiem serwatki, są naturalnym źródłem bakterii fermentacji mlekowej, głównie pałeczek mlekowych z gatunków *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus acidophilus*.
2. Wśród badanej mikroflory surowo dojrzewających wędlin dominowały Gram-dodatnie, katalazo-ujemne pałeczki bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus*, które stanowiły 72% wszystkich wyizolowanych szczepów. Ponadto wyizolowano ziarniaki (stanowiące 19% izolatów) oraz drożdże (stanowiące 9% izolatów).
3. Kolejnym etapem, po wstępnej identyfikacji fenotypowej bakterii, zgodnie z wytycznymi przewodnika FAO/WHO, jest identyfikacja genotypowa szczepów, z użyciem nowoczesnych metod biologii molekularnej, co pozwoli na wstępne zakwalifikowanie ich do mikroflory potencjalnie probiotycznej.

Literatura

- [1] Bromberg R., Moreno I., Zaganini C. L., Delboni R. R., de Oliveira J.: Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004, 35, 137-144.
- [2] De Vuyst L. G., Falony G., Leroy F.: Probiotic in fermented sausages. *Meat Science*, 2008, 1(80), 75-78.
- [3] Duszkievicz-Reinhard W., Grzybowski R., Sobczak E.: Teoria i ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i technicznej. Wydawnictwo SGGW, 2003, 148-152.
- [4] FAO/WHO: Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. 2002, 1-59.
- [5] Gajewska J., Błaszczyk M.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Postępy Mikrobiologii*, 2012, 1(51), 55-65.
- [6] Hammes W., Vogel R.: The genus *Lactobacillus*. W: The genera of lactic acid bacteria. Eds. B. Wood, W. Holzapfel. Chapman & Hall, Glasgow, 1995, 19-54.
- [7] Holzapfel W. H.: Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 3(75), 197-212.
- [8] Jurkowski M., Błaszczyk M.: Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2012, 3(61), 493-504.
- [9] Libudzisz Z. Bakterie fermentacji mlekowej. W: *Mikrobiologia techniczna. Tom 2. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*. Red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008, 25-58.
- [10] Neffe-Skocińska K., Gierjekiewicz M., Kołożyn-Krajewska D.: Optymalizacja warunków procesu fermentacji polędwic surowo dojrzewających z dodatkiem bakterii probiotycznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 6(79), 36-46.
- [11] Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M. J., Nevado F. P., de Guia Cordoba M.: Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 2008, 80, 715-721.
- [12] Schillinger U., Lücke F. K.: Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, 1987, 4, 199-208.
- [13] Sionek B., Kołożyn-Krajewska D., Pasternok I.: Przeżywalność bakterii o właściwościach probiotycznych w kiełbasach surowo dojrzewających w czasie chłodniczego przechowywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 1(92), 103-113.
- [14] Trzaskowska M., Kołożyn-Krajewska D., Wójciak K., Dolatowski D.: Microbiological quality of raw-fermented sausages with *Lactobacillus casei* LOCK 0900 probiotic strain. *Food Control*, 2014, 35, 184-191.

- [15] Węsierska E., Szoltyś M., Bączkiewicz M., Parys A., Wróblewska A.: Porównanie właściwości wybranych surowych wędlin dojrzewających. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012 6(85), 152-166.
- [16] Złotkowska H., Juszcakiewicz D., Misiewicz A.: Charakterystyka właściwości probiotycznych bakterii kwasu mlekowego izolowanych z przewodu pokarmowego kurczaków. *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, 2005, 60, 37-50.

WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNE I TEKSTURALNE MAJONEZÓW PEŁNOTŁUSTYCH I O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU DOSTĘPNYCH NA RYNKU LUBELSKIM

KATARZYNA SKRZYPCZAK, EWA JABŁOŃSKA-RYŚ, MARTA
ZALEWSKA-KORONA, MONIKA MICHALAK-MAJEWSKA,
ALEKSANDRA CIOŁKOWSKA, ANETA SŁAWIŃSKA, WOJCIECH
RADZKI, WALDEMAR GUSTAW

Streszczenie

Majonezy zajmują dominującą pozycję na rynku sosów majonezowych. Wzrastające wymagania konsumentów i konieczność konkurowania producentów żywności sprawiają, iż obecnie dostępna jest bardzo szeroka gama różnorodnych majonezów stale powiększająca się o nowe produkty. Popularność zyskują sosy majonezowe o zmniejszonej zawartości tłuszczu, jednak zmniejszenie zawartości tego składnika pociąga za sobą konieczność stosowania substancji stabilizujących emulsję i pozwalających na zachowanie cech reologicznych produktów pełnotłustych.

W pracy porównano właściwości poszczególnych parametrów reologicznych majonezów o zróżnicowanej zawartości tłuszczu dostępnych na rynku lubelskim. Analizowano właściwości lepkością oraz teksturę. Badania przeprowadzono przy użyciu analizy profilowej tekstury (TPA), jak również reometrii oscylacyjnej. Wyznaczono pętle histerezy oraz spektra mechaniczne badanych produktów.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, iż współczynnik konsystencji (K) w majonezach zależał od zawartości tłuszczu. Wartość tego indeksu malała wraz ze zmniejszaniem się zawartości tłuszczu. Zawartość tłuszczu w analizowanych sosach nie miała jednak wpływu na sprężystość i spoistość majonezów. Obserwowano, iż wraz ze wzrostem zawartości tłuszczu w produkcie, przy tej samej prędkości ścinania następował wzrost wartości naprężenia stycznego. Odnotowano większe wartości naprężenia stycznego dla prób majonezów o zawartości tłuszczu powyżej 70%. Badania spektrum mechanicznego wykazały, iż analizowane produkty są płynami o strukturze wykazującej słaby charakter żelowy.

Słowa kluczowe: majonez, tekstura, właściwości reologiczne, spektrum mechaniczne

Wprowadzenie

Majonez to najbardziej znany przykład emulsji typu olej w wodzie (o/w), w której w fazie wodnej rozproszone są nierozpuszczalne jak i rozpuszczalne składniki tj.: sól, cukier, musztarda i inne przyprawy [Pijanowski i in., 2004; Mitek i Słowiński, 2006]. Emulsja sosu jest stabilizowana przez lipoproteinowe składniki żółtka jaja [Stauffer, 2001].

Rynek sosów majonezowych to segment stale rozwijający się. Jest rynkiem skoncentrowanym, gdzie 10 głównych producentów odpowiada za ponad 93% sprzedaży wolumenowej. Łączny udział trzech największych producentów majonezów wynosi ponad 50% w ujęciu ilościowym i ok. 60% pod względem wartości sprzedaży. Trzy dominujące na rynku firmy to: Nestlé Polska (majonez Winiary), Społem Kielce (majonez Kielecki) oraz Unilever Polska (majonez Hellmann's). Znaczącą pozycję mają także takie firmy, jak Roleski i Motyl. Majonez jest produktem bardzo regionalnym i poza wspomnianymi producentami w większości regionów występuje przynajmniej jeden silny lokalny wytwórca. Dość silną pozycję mają marki własne sieci handlowych [Ochmańska, 2006]

Aktualnie obserwuje się wzrost zainteresowania konsumentów produktami o obniżonej kaloryczności. Coraz bardziej popularne stają się majonezy typu „light”- jednak zmniejszenie zawartości tłuszczu pociąga za sobą konieczność stosowania substancji stabilizujących emulsję. Przy produkcji majonezów niskotłuszczowych szczególnie istotne jest nadanie tradycyjnego smaku przy jednoczesnym zachowaniu odpowiedniej tekstury charakterystycznej dla ich pełnotłustych odpowiedników.

Celem niniejszej pracy było porównanie wybranych parametrów tekstualnych i reologicznych majonezów dostępnych na rynku lubelskim. Analizowano krzywe płynięcia, właściwości lepkosprężyste i teksturę majonezów o normalnej i obniżonej zawartości tłuszczu. Wyznaczono także spektra mechaniczne badanych produktów.

Materiał i metody badań

Do badań użyto majonezy różnych producentów dostępnych na rynku lubelskim (Tab.1) o zróżnicowanej zawartości tłuszczu. 22 majonezy zostały podzielone ze względu na zawartość tłuszczu na: niskotłuszczowe – do 65% tłuszczu oraz wysokotłuszczowe – powyżej 65% tłuszczu. Wszystkie analizowane produkty do chwili wykonania oznaczeń przechowywano w tej samej temperaturze chłodniczej (5°C) w oryginalnych opakowaniach handlowych. Przed bezpośrednim wykonaniem oznaczeń materiał badawczy po wyjęciu z lodówki pozostawiano przez czas ok. 10 - 15 min. w temp. ok. 25°C w celu wyrównania jego temperatury z temperaturą otoczenia.

Tab.1. Podział majonezów wykorzystanych jako materiał badawczy (skład wg deklaracji producentów)

Oznaczenie produktu	Zagęstniki			Przeciwutleniacze	Regulatory kwasowości	Konserwanty	Zawartość tłuszczu [%]
	guma guar	guma ksantanowa	skrobia modyfikowana				
Wysokotłuszczowe							
A				+	+		82
B					+		81,1
C				+	+		80,5
D	+	+		+			76,3
E				+	+		76,1
F	+	+		+	+		75,8
G*				+			75
H		+		+	+		70
I	+	+		+			70
J	+	+			+	+	70
K							67,9
L					+		65
Niskotłuszczowe							
Ł	+	+	+	+		+	51,9
M	+	+	+	+		+	51
N		+	+	+	+	+	49,5
O		+	+	+		+	40
P	+	+	+	+		+	33
R	+	+	+	+	+	+	27
S	+	+	+	+	+	+	20
T	+	+		+	+	+	20
U	+	+	+			+	15
W	+	+	+	+		+	10,6

* zawiera błonnik

Analiza profilowa tekstury (TPA)

Do przeprowadzenia analizy wykorzystano teksturometr TA-XT2i (Stable Micro System, Wielka Brytania). Próbkę majonezu badano przy użyciu zestawu do ekstruzji wstecznej (głowica cylindryczna o średnicy 45 mm, pojemnik cylindryczny o średnicy 60 mm i wysokości 70 mm), przy prędkości przesuwu głowicy 5 mm/s, do głębokości próbki 40 mm. Czas trwania jednego pomiaru próbki wynosił 20 s. Uzyskane wyniki (z dwóch powtórzeń) zarejestrowano przez program Texture Expert version 1.22. Za pomocą analizy profilowej tekstury badano parametry: twardość, przylegalność, gumistość, sprężystość i spoistość.

Wyznaczenie krzywej płynięcia

Pomiary zostały wykonane przy użyciu reometru dynamicznego RS 300 (ThermoHaake, Karlsruhe, Niemcy) w układzie stożek - płytka, przy użyciu rotora C 60/2 °Ti. Badania wykonano w stałej temperaturze 20 °C, przy prędkości ścinania w zakresie 0-150 1/s. Czas trwania pomiaru wynosił 270 s. Objętość każdej z badanych próbek wynosiła 2 ml. Wyniki (uzyskane z dwóch powtórzeń) rejestrowano komputerowo wykorzystując program RheoWin Pro (ThermoHaake, Karlsruhe, Niemcy).

Określenie spektrum mechanicznego

Oznaczenia dokonane zostały przy zastosowaniu reometru dynamicznego RS 300 (ThermoHaake, Karlsruhe, Niemcy) w układzie stożek-płytki, przy użyciu rotora C 60/2 °Ti. Badania prowadzono w stałej temperaturze 20 °C. Objętość próbki wynosiła 2 ml. Spektrum mechaniczne badano w zakresie częstotliwości 0,1 - 60 Hz i odkształceniu 0,01. Wyniki (uzyskane z dwóch powtórzeń) rejestrowano komputerowo wykorzystując program RheoWin Pro (ThermoHaake, Karlsruhe, Niemcy).

Wyniki i dyskusja

Majonez jest półpłynną emulsją typu olej w wodzie (o/w), zawierającą żółtka jaj, olej roślinny, ocet, sól, przyprawy oraz różne substancje dodatkowe – kwaszące, zagęszczające, konserwujące. Produkcja majonezu wymaga dobrania surowców odpowiedniej jakości oraz opracowania właściwych parametrów procesu produkcji. Majonez jako emulsja jest wrażliwy na rozwarstwianie i wymaga stałej temperatury wszystkich stosowanych surowców [Mitek i Słowiński, 2006]. W procesie jego produkcji dodawane są m.in. substancje kształtujące i utrwalające strukturę.

W produkcji majonezu typu „light”, stosowane są substancje zagęszczające, zwykle hydrokoloidy – gumy (głównie guar i ksantanowa), których zadaniem jest stabilizacja emulsji, poprawa cech teksturalnych i reologicznych oraz zawieszenia cząstek stałych lub przyprawowych w produktach majonezowych [Ma i Barbosa-Cánovas, 1995b].

Właściwości reologiczne sosów sałatkowych, w tym majonezów, są w większości określane przez zawartość tłuszczu i obecność stabilizatorów, emulgatorów i zagęstników [Juszczak i in., 2003]. Analiza cech reologicznych majonezu jest niezbędna w trakcie procesów technologicznych, magazynowania oraz transportu i ważnym elementem kontroli jakości, gdyż właściwości reologiczne wpływają także na funkcjonalne i sensoryczne właściwości produktu.

W badanych produktach o zróżnicowanej zawartości tłuszczu dokonano analiz tekstury ze szczególnym uwzględnieniem takich parametrów jak: twardość, przylegalność, gumistość, sprężystość i spoistość (Tab. 2 i 3). Spośród majonezów wysokotłuszczowych najniższą wartość uzyskano dla majonezu K (6,73 N), co ma

bezpośredni związek z niską zawartością tłuszczu (< 70%), jak również z brakiem dodatków i substancji poprawiających strukturę produktu. Najwyższą wartość mierzonego parametru odnotowano dla majonezu E (16,61 N). Wśród przebadanych produktów niskotłuszczowych najniższą twardością (6,11 N) cechował się majonez L, zaś najwyższą majonez N (15,06 N) oraz R (14,94 N).

Tab. 2. Średnie wartości poszczególnych cech tekstury badanych majonezów pełnotłustych $\pm$ SD

Produkt	Twardość [N]	Przylegalność [mJ]	Gumistość [N]	Sprężystość	Spoistość
A	15,45 $\pm$ 1,39	-77,14 $\pm$ 5,93	9,97 $\pm$ 0,84	1,00 $\pm$ 0,00	0,65 $\pm$ 0,00
B	9,28 $\pm$ 0,52	-35,08 $\pm$ 3,80	5,42 $\pm$ 0,78	0,94 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,05
C	14,84 $\pm$ 0,56	-52,63 $\pm$ 1,83	8,19 $\pm$ 1,07	0,98 $\pm$ 0,00	0,56 $\pm$ 0,09
D	13,24 $\pm$ 0,76	-62,14 $\pm$ 3,52	8,46 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,00	0,64 $\pm$ 0,05
E	16,61 $\pm$ 1,03	-73,97 $\pm$ 0,65	10,59 $\pm$ 0,41	0,99 $\pm$ 0,00	0,64 $\pm$ 0,02
F	13,98 $\pm$ 0,72	-55,06 $\pm$ 7,64	7,32 $\pm$ 0,52	0,98 $\pm$ 0,00	0,53 $\pm$ 0,06
G	11,8 $\pm$ 0,96	-58,13 $\pm$ 5,75	7,92 $\pm$ 0,65	0,99 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,00
H	7,61 $\pm$ 0,81	-32,81 $\pm$ 0,65	4,12 $\pm$ 0,33	0,86 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,10
I	8,58 $\pm$ 0,29	-41,41 $\pm$ 3,48	5,35 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,03
J	11,42 $\pm$ 0,78	-47,43 $\pm$ 4,24	6,81 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,05
K	6,73 $\pm$ 0,26	-33,16 $\pm$ 1,54	3,80 $\pm$ 0,11	0,96 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01
L	10,94 $\pm$ 0,15	-45,88 $\pm$ 2,93	5,93 $\pm$ 0,56	0,98 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,04

Analizując wyniki uzyskane dla wszystkich prób majonezów wysokotłuszczowych zaobserwowano, iż wraz ze spadkiem zawartości tłuszczu zmniejsza się twardość tych emulsji. W majonezach niskotłuszczowych (Tab. 3) zależność pomiędzy obniżeniem zawartości tłuszczu i zmianami wartości twardości jest mniej widoczna niż w przypadku produktów pełnotłustych. Jest to związane z obecnością substancji zagęszczających w produktach „light”, które będąc także zamiennikami tłuszczu, utrzymują stabilną strukturę tych wyrobów.

Spośród majonezów wysokotłuszczowych najwyższą wartość przylegalności (Tab. 2) uzyskano dla majonezu A (77,14 mJ), sosu o największej zawartości tłuszczu w swym składzie, natomiast wartość najniższą odnotowano dla majonezu H. Analiza porównawcza wszystkich prób majonezów wysokotłuszczowych wykazała, iż wraz ze wzrostem zawartości tłuszczu wzrastała przylegalność badanych sosów. Z kolei, w przypadku majonezów niskotłuszczowych wraz ze wzrostem zawartości tłuszczu w produkcie obserwowano spadek wartości przylegalności. Majonez R (61,30 mJ) charakteryzował się najwyższą

przylegalnością wśród wszystkich produktów o obniżonej zawartości tłuszczu (Tab. 3), natomiast najniższą wartość (29,00 mJ) odnotowano dla próby Ł. Gumiastość była kolejną cechą tekstury zależną od udziału tłuszczu w składzie badanych emulsji. W sosach pełnotłustych zwiększenie zawartości oleju wpływało na uzyskanie wyższej wartości gumiastości, podczas gdy w majonezach „light” miała ona tendencję spadkową (Tab. 3).

Tab. 3. Średnie wartości poszczególnych cech tekstury badanych majonezów o obniżonej zawartości tłuszczu $\pm$ SD

Produkt	Twardość [N]	Przylegalność [mJ]	Gumiastość [N]	Sprężystość	Spoistość
Ł	6,11 $\pm$ 0,53	-29,00 $\pm$ 2,04	3,56 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,05
M	10,36 $\pm$ 0,01	-42,79 $\pm$ 1,33	5,55 $\pm$ 0,49	0,99 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,05
N	15,06 $\pm$ 0,07	-52,85 $\pm$ 11,23	7,68 $\pm$ 1,23	0,95 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,09
O	9,87 $\pm$ 0,27	-42,34 $\pm$ 3,28	5,61 $\pm$ 0,51	0,91 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,04
P	9,87 $\pm$ 0,11	-31,47 $\pm$ 1,87	4,54 $\pm$ 0,52	0,89 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,06
R	14,94 $\pm$ 0,81	-61,30 $\pm$ 12,51	8,94 $\pm$ 0,26	0,95 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,02
S	7,23 $\pm$ 0,26	-37,28 $\pm$ 0,47	4,56 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,02
T	8,68 $\pm$ 0,36	-44,33 $\pm$ 0,77	5,28 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,02
U	9,41 $\pm$ 0,91	-50,22 $\pm$ 1,14	6,17 $\pm$ 0,22	0,99 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,04
W	9,73 $\pm$ 0,18	-46,07 $\pm$ 4,13	6,11 $\pm$ 0,73	0,90 $\pm$ 0,09	0,63 $\pm$ 0,06

W majonezach wysokotłuszczowych najmniejszą wartość tego parametru odnotowano dla majonezu K (3,80 N), natomiast najwyższą wartość uzyskano dla majonezu E (10,59 N) oraz A (9,97 N) (Tab. 2). Analiza majonezów pełnotłustych wykazała, iż podobnie jak w przypadku przylegalności obniżenie zawartości tłuszczu powoduje zmniejszenie gumiastości tych produktów.

Zmniejszenie zawartości oleju w sosach niskotłuszczowych skutkowało wzrostem gumiastości tych emulsji. Wśród zbadanych majonezów typu „light” najmniejszą wartość mierzonego parametru posiadał majonez Ł (3,56 N), zaś najwyższą R (8,94 N) (Tab. 3).

Zaobserwowano, iż zawartość tłuszczu w badanych produktach nie miała wpływu na zmiany wartości sprężystości oraz spoistość. Wartości tych parametrów we wszystkich badanych sosach kształtowały się na podobnym poziomie, odpowiednio do skali wartości danej cechy. Jedynie w stosunku do majonezów niskotłuszczowych wartości sprężystości wykazywały niewielki wzrost wraz z obniżaniem zawartości tłuszczu (Tab. 2 i 3). Uzyskane wyniki najprawdopodobniej wynikały z obecności stabilizatorów w tych produktach.

Stabilna struktura oraz wyrównane wartości cech teksturalnych w majonezach o zmniejszonej zawartości tłuszczu uzyskano dzięki substancjom zagęszczającym i stabilizującym. Większość tych produktów zawierała w swoim składzie kombinację skrobi modyfikowanych i gum – guar oraz ksantanowej, co ma bardzo istotny wpływ na ich konsystencję. Według Ma i Barbosa-Cánovas [1995a] spoistość majonezów zależy od zawartości oleju, na co wpływa kompaktowe upakowanie kropeł przy wyższych stężeniach tłuszczu. Mniejsza procentowa zawartość oleju w majonezach o obniżonej kaloryczności powoduje, że średnie odległości między kroplami są większe, i z tego powodu spoistość może być niższa od oczekiwanej. Ponadto autorzy stwierdzają, iż wyższe stężenie gumy ksantanowej wywołuje powstawanie większych agregatów w emulsji, co również sprzyja wzrostowi spoistości majonezów. W związku z tym do deformacji wymagana jest wyższa siła naprężenia ścinającego.

Wartość granicy płynięcia jest istotna dla właściwego zaprojektowania procesów technologicznych (mieszanie, pompowanie), transportu oraz przechowywania majonezów [Ma i Barbosa-Cánovas, 1995b]. Udowodniono, iż wartości naprężenia stycznego odgrywają ważną rolę w akceptacji produktów wśród konsumentów [Juszczak i in., 2003].

Tab. 4. Wartości parametrów reologicznych badanych majonezów pełnotłustych $\pm$ SD

Nazwa majonezu	Współczynnik konsystencji K [Pa·s ⁿ]	Indeks płynięcia n	Pole tiksotropii
A	422,25 $\pm$ 114,06	0,08 $\pm$ 0,02	4700,00 $\pm$ 43,84
B	62,95 $\pm$ 2,47	0,32 $\pm$ 0,01	– 4653,00 $\pm$ 18,38
C	136,80 $\pm$ 3,54	0,21 $\pm$ 0,00	3230,50 $\pm$ 38,89
D	113,30 $\pm$ 2,26	0,25 $\pm$ 0,00	2248,50 $\pm$ 21,92
E	178,50 $\pm$ 7,92	0,20 $\pm$ 0,00	5259,00 $\pm$ 164,05
F	125,35 $\pm$ 5,16	0,25 $\pm$ 0,01	4198,50 $\pm$ 14,85
G	119,60 $\pm$ 2,69	0,19 $\pm$ 0,00	2126,50 $\pm$ 169,00
H	44,82 $\pm$ 3,08	0,34 $\pm$ 0,01	989,60 $\pm$ 95,32
I	71,57 $\pm$ 2,74	0,26 $\pm$ 0,01	1188,45 $\pm$ 362,82
J	138,50 $\pm$ 16,55	0,18 $\pm$ 0,01	2374,50 $\pm$ 139,30
K	40,59 $\pm$ 2,84	0,31 $\pm$ 0,01	1675,50 $\pm$ 14,85
L	97,84 $\pm$ 5,61	0,22 $\pm$ 0,01	3622,00 $\pm$ 55,15

Współczynnik konsystencji (K) związany jest z lepkością pozorną produktów. Jego wartość określa wielkość naprężenia stycznego, przy małej prędkości ścinania [Domagała 2005]. Wartości współczynnika K w majonezach wysokotłuszczowych zmniejszały się wraz ze zmniejszaniem się zawartości oleju (Tab. 4), przy czym zmiany te były bardziej widoczne w pełnotłustych produktach niż w majonezach

typu „light” (Tab. 5) Zjawisko to można tłumaczyć brakiem substancji zagęszczających i stabilizujących (lub niewielkim ich dodatkiem), w przeciwieństwie do majonezów niskotłuszczowych, które często zawierają kombinację skrobia modyfikowana – guma ksantanowa – guma guar, co wpływa na właściwości strukturalne, stabilność oraz lepkość tych emulsji.

Tab. 5. Wartości parametrów reologicznych badanych majonezów o obniżonej zawartości tłuszczu $\pm$ SD

Nazwa majonezu	Współczynnik konsystencji K [Pa·s ⁿ]	Indeks płynięcia n	Pole tiksotropii
Ł	85,16 $\pm$ 1,83	0,21 $\pm$ 0,00	1231,50 $\pm$ 263,75
M	96,82 $\pm$ 4,26	0,20 $\pm$ 0,00	1897,00 $\pm$ 213,55
N	113,35 $\pm$ 2,19	0,22 $\pm$ 0,01	3459,00 $\pm$ 212,13
O	59,43 $\pm$ 8,13	0,32 $\pm$ 0,02	1256,50 $\pm$ 111,02
P	162,60 $\pm$ 40,02	0,12 $\pm$ 0,02	1417,00 $\pm$ 196,58
R	175,35 $\pm$ 9,69	0,15 $\pm$ 0,01	4901,50 $\pm$ 252,44
S	72,72 $\pm$ 10,14	0,25 $\pm$ 0,01	975,80 $\pm$ 235,04
T	77,50 $\pm$ 7,03	0,24 $\pm$ 0,01	1226,50 $\pm$ 105,36
U	92,44 $\pm$ 22,43	0,25 $\pm$ 0,03	2356,50 $\pm$ 225,57
W	78,06 $\pm$ 10,78	0,26 $\pm$ 0,02	1330,00 $\pm$ 291,33

Ma i Barbosa-Cánovas [1995b] zaobserwowali, iż wraz ze wzrostem zawartości tłuszczu w majonezach, następował istotny wzrost wartości współczynnika konsystencji oraz spadek indeksu płynięcia. Natomiast, wraz ze zwiększaniem dodatku gumy ksantanowej obserwowano wzrost wartości obu parametrów reologicznych.

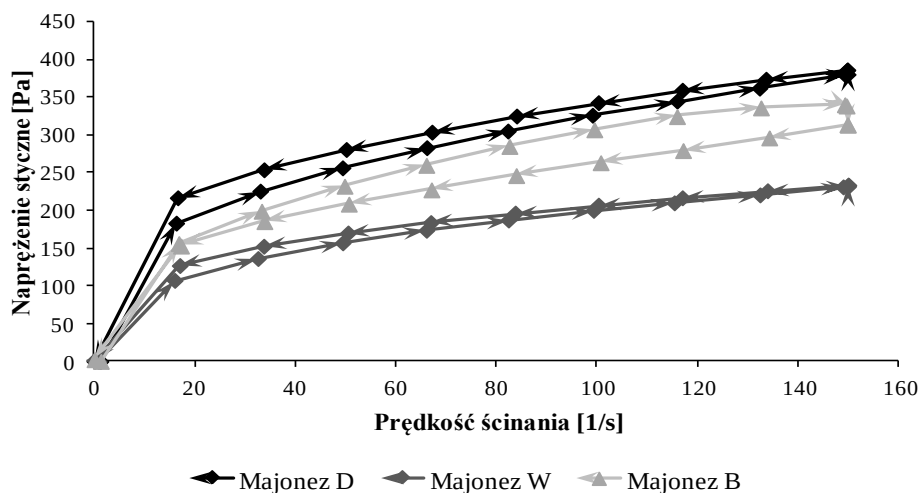
Według Figoni i Shoemaker’a [1983] pseudoplastyczne właściwości majonezu mogą być wynikiem flokulacji i deflokulacji kropeł oleju. Wraz ze wzrostem prędkości ścinania podczas przepływu zjawisko deflokulacji nasila się, tym samym zmniejszając lepkość systemu. Flokulacja i deflokulacja w systemie polidispersyjnym, takim jak majonez, może prowadzić do utworzenia dwóch grup agregatów różniących się wielkością, które mają również wpływ na przepływ majonezów.

Indeks płynięcia (n) jest miarą odstępstwa od przepływu newtonowskiego w zachowaniu się danej cieczy podczas płynięcia [Domagała, 2005]. Im mniejsza wartość n tym płyn jest bardziej dylatacyjny, płyny reostabilne posiadające granicę płynięcia to płyny plastycznolepkie [Sibillo i in, 2004].

Wyniki badań nie potwierdzają zależności między zawartością tłuszczu w majonezach, a indeksem płynięcia (Tab. 4). Uzyskane wyniki analiz wskazują, iż badane majonezy są cieczami nienewtonowskimi lepkoplastycznymi z granicą płynięcia. Majonezy o różnej zawartości tłuszczu przy stałym ścinaniu w różnym stopniu wykazywały spadek lepkości pozornej, co koresponduje z wynikami analiz

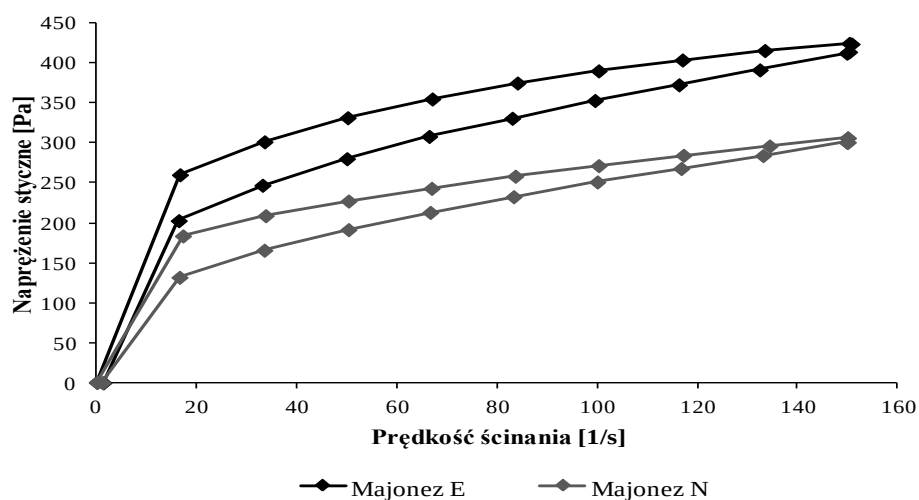
przeprowadzonymi przez Juszcza i in. [2003]. Badane majonezy są cieczami nienewtonowskimi lepkoplastycznymi z granicą płynięcia (Tab. 4 i 5).

Dla analizowanych produktów wykreślano także pętle tiksotropii. Na Rys 1 i 2 przedstawiono charakterystyczne przebiegi krzywych płynięcia uzyskane dla większości przebadanych majonezów oraz produkt, który odbiegał właściwościami od pozostałych analizowanych prób.



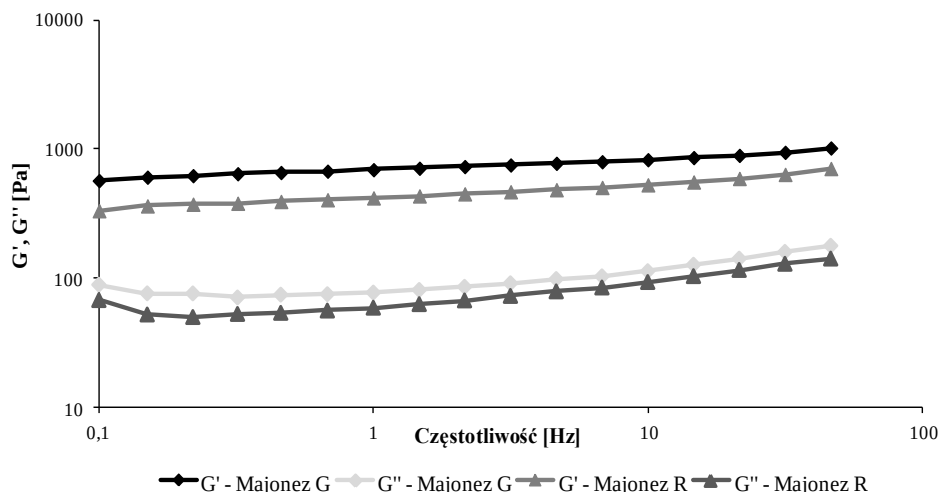
Rys. 1. Porównanie przebiegu pętli histerezy majonezów D, W oraz B

Zdecydowana większość majonezów wykazywała właściwości tiksotropowe (Rys. 2). Majonez „B” jako jedyny spośród przebadanych produktów, wykazywał przebieg krzywej płynięcia wskazujący na właściwości antytiksotropowe (Rys.1).



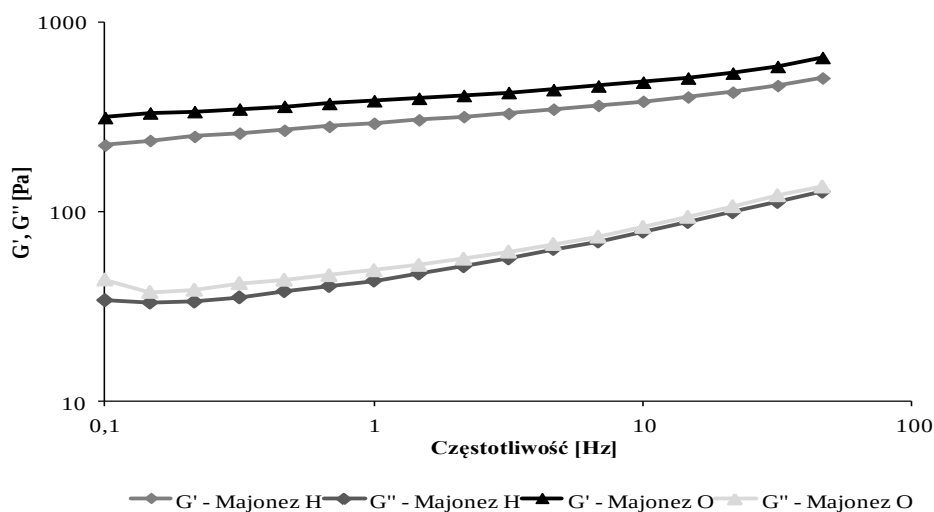
Rys. 2. Porównanie pętli histerezy majonezów pełnotłustych (E) i o obniżonej zawartości tłuszczu (N)

W cieczach tego typu podczas zmniejszania prędkości ścinania obserwuje się wyższe wartości naprężenia stycznego. Przebieg krzywych majonezów E i N (Rys. 2) jest podobny do przebiegu krzywych płynięcia dla produktu T. Przy szybkości ścinania 150 [1/s] wartość naprężenia stycznego majonezu E wyniosła 423,8 Pa, natomiast dla majonezu N była równa 306,25 Pa. Majonezy te tak jak zdecydowana większość przebadanych produktów, były cieczami o właściwościach tiksotropowych. Na Rys. 3 porównano spektra mechaniczne majonezu pełnotłustego i o obniżonej zawartości tłuszczu wyprodukowanego przez jedną firmę, uzyskane krzywe były typowe dla tego typu produktów i uzyskane dla większości analizowanych prób. Zarówno w wysoko- jak i niskotłuszczowym produkcie odnotowano wyższe wartości modułu G' niż G'' . Oba moduły były niezależne od analizowanego zakresu częstotliwości, badane sosy są substancjami bardzo lepkimi bądź słabymi żelami, których cząsteczki są silnie ze sobą powiązane.



Rys. 3. Spektrum mechaniczne majonezów pełnotłustych (G) i o obniżonej zawartości tłuszczu (R)

W tego typu układach istnieje małe prawdopodobieństwo wystąpienia zjawiska sedymentacji. Jednakże, przebieg linii modułów G' oraz G'' majonezów H i O (Rys. 4) wskazuje, iż próby te charakteryzowały się mniejszą lepkością i elastycznością w porównaniu z analizowanymi produktami pozostałych producentów. Miały bardziej płynną konsystencję oraz charakteryzowało je większe ryzyko wystąpienia zjawiska sedymentacji. Na uwagę zasługuje również fakt, iż dla majonezu O odnotowano wyższe wartości obu modułów niż dla produktu pełnotłustego. Jest to prawdopodobnie związane z większym udziałem substancji zagęszczających w tym produkcie.



Rys. 4. Spektrum mechaniczne majonezów H i O

Moduł zachowawczy (G') wszystkich badanych emulsji wykazywał wyższe wartości niż moduł stratności (G'') w całym analizowanym zakresie częstotliwości, co świadczy o słabej żelowej strukturze sosów. Uzyskane wyniki są zgodne z rezultatami badań Mancini i in. [2002] oraz Liu i in. [2007]. Badania przeprowadzone przez Ma i Barbosa-Cánovas [1995b] wskazują, iż sosy o wyższym udziale tłuszczu w swym składzie wykazują bardziej żelowy charakter niż majonezy o mniejszej zawartości tłuszczu. Jest to związane z większym upakowaniem kropeł oleju w majonezach o większej koncentracji oleju niż w sosach niskotłuszczowych. Ponadto, wartości modułu zachowawczego G' i modułu stratności G'' są zależne także od dodatku gumy ksantanowej. Moduł elastyczności wzrasta, gdy poziom tłuszczu i ksantanu rośnie [Ma i Barbosa-Cánovas, 1995b].

Wnioski

1. Tekstura badanych majonezów zależała od zawartości tłuszczu w produkcie. Wartości twardości w sosach pełnotłustych i o obniżonej zawartości tłuszczu zwiększały się wraz z zawartością tłuszczu.
2. Sprężystość i spoistość majonezów nie była zależna od zawartości tłuszczu w produkcie.
3. Naprężenie styczne, przy tej samej prędkości ścinania wzrastało wraz z zawartością tłuszczu w produktach.
4. Obecność substancji zagęszczających i stabilizujących w majonezach miała wpływ na zmiany naprężenia stycznego.
5. Współczynnik konsystencji (K) majonezów zależał od zawartości tłuszczu. Wartość tego indeksu malała wraz ze zmniejszaniem się zawartości oleju w produkcie.

Literatura

- [1] Domagała J.: Zmiany tekstury i mikrostruktury jogurtu z mleka koziego pod wpływem wybranych czynników. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie, 2005, 309, 1-137.
- [2] Figoni P. I., Shoemaker Ch. F.: Characterization of time-dependent flow properties of mayonnaise under steady shear. Journal Texture Studies, 1983, 14 (4), 431-442.
- [3] Juszcak L., Fortuna T., Kośła A.: Sensory and rheological properties of Polish commercial mayonnaise. Die Nahrung, 2003, 47 (4), 232-235.
- [4] Liu H., Xu X. M., Guo Sh. D.: Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics”. LWT Food Science, 2007, 40 (6), 946-954.
- [5] Ma L., Barbosa-Cánovas G. V. „Rheological Characterization of Mayonnaise. Part I: Slippage at Different Oil and Xanthan Gum Concentrations”. Journal of Food Engineering, 1995a, 25 (3), 397-408
- [6] Ma L., Barbosa-Cánovas G. V.: Rheological Characterization of Mayonnaise. Part II: Flow and Viscoelastic Properties at Different Oil and Xanthan Gum Concentrations. Journal of Food Engineering, 1995b, 25 (3), 409-425.
- [7] Mitek M., Słowiński M. (red.): Wybrane zagadnienia z technologii żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2006, 198-209.
- [8] Ochmańska E.: Raport: Mokre przyprawy. Trendy Food, 2006, 15 (2), 30-40.
- [9] Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A.: Ogólna technologia żywności. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2004, 235-238.
- [10] Sibillo V., Simeone M., Guido S.: Break-up of a Newtonian drop in a viscoelastic matrix under simple shear flow. Rheologica Acta, 2004, 43 (5), 449-456.
- [11] Stauffer C. E.: Emulgatory. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001, 20-24; 68; 70-72; 78, 148-154.

ZDOLNOŚĆ TOKSYNOTWÓRCZA WYBRANYCH IZOLATÓW *FUSARIUM* SPP. OTRZYMANYCH Z ZIARNA JĘCZMIENIA

EWA SOLARSKA, MARZENA MARZEC

Streszczenie

Fuzarioza kłosów jest jedną z najgroźniejszych chorób zbóż w Polsce i powodowana jest przez grzyby z rodzaju *Fusarium* prowadzące do strat w plonie oraz pogorszenia jego jakości. Celem pracy była identyfikacja oraz ocena występowania gatunków *Fusarium* spp. izolowanych z ziarniaków wybranych odmian ekologicznego jęczmienia jarego oraz określenie spektrum produkowanych przez nie mikotoksyn po zastosowaniu sztucznej infekcji kłosów zawiesiną mikro- oraz makrokonidialnych izolatów *F. poae*. Na podstawie przeprowadzonej konwencjonalnej analizy mikologicznej wytypowano 10 izolatów *F. poae* i *F. sporotrichioides* do analizy techniką PCR. Zawartość mikotoksyn oznaczono metodą ELISA używając komercyjnych testów RIDASCREEN R-Biopharm.

F. poae był najliczniej reprezentowanym gatunkiem wśród wyosobnionych z ziarna tego zboża grzybów z rodzaju *Fusarium*, a ponadto izolowano: *F. sporotrichioides*, *F. nivale*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* i *F. avenaceum*. Największe zróżnicowanie w obrębie *Fusarium* spp. obserwowano dla odmiany Frontier. Z 7 izolatów zidentyfikowanych jako *F. poae* tylko dla 3 została potwierdzona identyfikacja z użyciem techniki PCR, 1 zaklasyfikowano jako *F. sporotrichioides*, a 3 nie zostały określone. Z 3 izolatów *F. sporotrichioides* 1 został określony jako *F. poae* przy użyciu techniki PCR, a 2 nie sklasyfikowano do gatunku. Wszystkie izolaty *F. poae* produkowały deoksyniwalenol (DON) w zakresie od 29,89 do 373,37 µg/kg, toksynę T-2 od 135,10 do 297,39 µg/kg oraz zearalenon (ZEA) od 29,23 do 726,08 µg/kg. *F. sporotrichioides* produkował DON, toksynę T-2 oraz ZEA w ilości odpowiednio 81,23 µg/kg, 259,01 µg/kg oraz 1259,07 µg/kg.

Słowa kluczowe: mikotoksyny, jęczmień, ELISA

Wprowadzenie

Grzyby z rodzaju *Fusarium* stanowią liczną grupę gatunków, które jako pasożyty fakultatywne, są sprawcami chorób roślin uprawnych tzw. fuzarioz, prowadzących do znacznego obniżenia ilości oraz jakości plonu roślin uprawnych [Suchorzyńska i Misiewicz, 2009]. Zmiany klimatyczne, zwiększenie areалу podatnych upraw oraz niedostateczna ilość odmian odpornych na te choroby sprzyjają rozwojowi *Fusarium* spp. [Płaskowska, 2010]. Fuzariozy należą do najgroźniejszych chorób m.in. kukurydzy, pomidora, lnu oraz zbóż

drobnoziarnistych takich jak pszenica, jęczmień, żyto. Grzyby z rodzaju *Fusarium* są też producentami mikotoksyn, metabolitów wtórnych, powodujących groźne choroby ludzi i zwierząt [Suchorzyńska i Misiewicz, 2009]. Do najbardziej toksynotwórczych grzybów z tego rodzaju należą *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* oraz *F. oxysporum* [Płaskowska, 2010]. Mikotoksyny mają działanie nefro- i hepatotoksyczne oraz wykazują właściwości mutagenne, kancerogenne, teratogenne, ponadto ZEA i jego pochodne również estrogenne. Najczęstszą drogą wnikania mikotoksyn do organizmu jest układ pokarmowy na skutek spożycia zanieczyszczonych produktów roślinnych oraz mięsa i mleka zwierząt skarmianych zanieczyszczoną paszą. Mikotoksyny mogą powstawać na wszystkich etapach produkcji i obrotu artykułów rolno-spożywczych tj. na polu podczas wzrostu i rozwoju roślin, transportu i przechowywania płodów oraz obróbki technologicznej [Chelkowski, 1985]. Powszechne występowanie tych grzybów wiąże się z ich zdolnością do wzrostu w szerokim zakresie temperatury, na różnych podłożach i ich efektywnymi mechanizmami rozprzestrzeniania [Nelson i in., 1994].

Duża zmienność grzybów *Fusarium* spp. znacznie utrudnia ich identyfikację za pomocą metod konwencjonalnych, takich jak ocena makro- i mikroskopowa. Cechy fenotypowe niektórych gatunków na pożywkach mogą być bardzo zbliżone. W przypadku infekcji mieszanych, izolacja gatunków o wolniejszym wzroście często kończy się niepowodzeniem, gdyż szybko rozwijające się na pożywkach gatunki maskują te wolno rosnące. Znacznie szybciej i dokładniej można dokonać ich identyfikacji technikami molekularnymi, które pozwalają również na wczesne wykrycie patogenu w sezonie wegetacji [Chelkowski i Witkowska, 1999; Demeke i in., 2005; Suchorzyńska i Misiewicz, 2009]. Główną wadą technik klasycznych jest ich złożoność i czasochłonność. Dodatkowo wymagają doświadczenia, by poprawnie zidentyfikować grzyby o podobnych cechach morfologicznych [Demeke i in., 2005]. Warto jednak podkreślić, że punktem wyjściowym dla metod molekularnych jest poprawna identyfikacja kultur grzybów, co pokazuje że obie metody wzajemnie uzupełniają się [Chelkowski i Witkowska, 1999; Golińska i in. 2002]. Metody molekularne są cenione za szybkość, prostotę, powtarzalność analiz, niezawodności możliwość wykonania nawet w przypadku ograniczonej ilości dostępnej tkanki patogenu. Stosując metodę PCR można wykryć kilka patogenów równocześnie również przed pojawieniem się objawów chorobowych na roślinie.

Celem pracy była identyfikacja oraz ocena występowania wybranych izolatów *Fusarium* spp. otrzymanych z ziarniaków wybranych odmian ekologicznego jęczmienia jarego oraz określenie spektrum produkowanych przez nie mikotoksyn po zastosowaniu sztucznej infekcji kłosów zawieszoną mikro- oraz makrokonidialnych izolatów *F. poae* przy użyciu testu ELISA.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły ziarniaki 3 odmian jęczmienia jarego: Frontier, Conchita oraz Blask, których kłosa sztucznie infekowano zawiesiną mikro- oraz makrokonidiów *F. poae*, zebrane w Pokazowym Gospodarstwie Ekologicznym w Chwałowicach należącym do CDR w Brwinowie, oddział Radom. Inokulacji kłosów dokonano podczas kwitnienia zboża wodną zawiesiną zarodników o stężeniu około 1 mln zarodników w 1 ml wody stosując 100 ml zawiesiny na 1 m² poletka. Użyto zawiesiny zarodników z pojedynczych izolatów grzyba lub stosując ich mieszaninę. Kontrolę stanowiły poletka, na których zastosowano jako inokulum wodę destylowaną. Inokulacji dokonywano na mikropoletkach z zachowaniem izolacji przestrzennej. Ocenę porażenia kłosów przeprowadzono w fazie rozwojowej BBCH 75–83, analizując po 25 kłosów z każdego powtórzenia.

a) Konwencjonalna analiza mikologiczna (KAM)

W celu wyosobnienia grzybów występujących w analizowanym materiale zastosowano metodę szalkową. Ziarniaki jęczmienia w celu usunięcia zanieczyszczeń odkażono w 0,3% podchlorynie sodu, po czym płukano w sterylnej wodzie destylowanej. Gotowy materiał wykładano na pożywkę mineralną w 3 powtórzeniach dla każdej odmiany i inkubowano w 25 °C przez 7 dni. Po tym czasie przeprowadzono ocenę makro- i mikroskopową wyrosłych izolatów grzybów.

b) Izolacja materiału genetycznego

Do hodowli *F. poae* i *F. sporotrichioides* wykorzystano pożywkę glukozowo-peptonową wg Martina (1950). Hodowlę prowadzono przez 7 dni w cieplarni w 25°C. Pobrane fragmenty grzybni z hodowli płukano w sterylnej wodzie destylowanej przenoszono do probówek typu Eppendorf po czym zamrażano w 80°C. Tak przygotowane fragmenty grzybni rozcierano w wysterylizowanych moździerzach. Około 0,01 g każdej z roztartych tkanek przenoszono do probówek zawierających 0,15 ml DNAzolu i mieszano przez inwersję. Następnie próbki inkubowano 5 min. w 25°C w termomikserze, po czym dodawano 0,15 ml chloroformu i ponownie inkubowano. Po czym próbki wirowano przez 10 min. przy 12000 rpm i górną fazę przenoszono do nowych probówek dodając 125 µl 100% etanolu. Próbkę mieszano przez inwersję i po 5 min. inkubacji ponownie wirowano (5000 rpm przez 4 min). Następnie usuwano supernatant i dodawano roztwór z 85,6 µl DNAzolu i 64,3 µl etanolu i worteksowano, po czym próbki inkubowano przez 5 min. w temp. pokojowej. Po upływie tego czasu próbki wirowano (5000 rpm przez 4 min) i usuwano supernatant. W dalszym etapie dodano do każdej próbki 150 µl 75% etanolu i próbki ponownie wirowano (5000 rpm przez 4 min). Po usunięciu supernatantu oraz osuszeniu pelet rozpuszczono w 35 µl wody wolnej od nukleaz. Tak przygotowane próbki przechowywano do dalszych badań w -20°C. Ocenę czystości próbek oraz stężenia wyizolowanego DNA przeprowadzono za pomocą NanoDrop2000.

c) Analiza PCR

Do analizy techniką PCR wybrano 7 izolatów *F.poae* i 3 izolaty *F.sporotrichioides* określone do gatunku za pomocą KAM. Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów specyficznych dla tych gatunków. Sekwencje użytych starterów przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Startery użyte do identyfikacji grzybów z rodzaju *Fusarium*.

Gatunek	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Dł. produktu	Literatura
<i>F. poae</i>	FpoaeF FpoaeR	CAAGCAAACAGGCTCTT CACC TGTTCCACCTCAGTGACA GGTT	220 pz	Demeke i in. 2005
<i>F. sporotrichioides</i>	FsporF1 LangsporR 1	CGCACAACGCAAACCTCA TC TACAAGAAGACGTGGCG ATAT	332 pz	Wilson i in. 2004

DNA amplifikowano wg poniższych schematów:

1. *F. poae* [Demeke i in., 2005]: 95°C - 3 min., 38x (95°C - 30 s., 62°C - 20 s., 72°C - 45 s.), 72°C- 5 min.
2. *F. sporotrichioides* [Wilson i in. 2004]: 95°C - 3 min., 35x (94°C - 30 s., 55°C- 20 s., 74°C- 60 s.), 72°C- 5 min.

Identyfikacji fragmentów DNA dokonano prowadząc rozdziel elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w buforze TBE.

d) Test ELISA

Do analizy zawartości mikotoksyn użyte zostały tylko te izolaty, których przynależność gatunkowa została potwierdzona w reakcji PCR. Jako podłoże do wzrostu grzybów wykorzystano ziarno jęczmienia, pochodzącego z systemu uprawy ekologicznej. Odważano po 50g ziarna, a następnie dodawano wody destylowanej tak, aby zapewnić wilgotność ziarna na poziomie 35-40%. Przygotowane kolby z ziarnem sterylizowano przez 15 min w temperaturze 121°C, a następnie inokulowano wybranymi izolatami grzybów *Fusarium* spp. poprzez równomierne umieszczenie fragmentów grzybni na powierzchni podłoża, po czym kolby umieszczono w cieplarni w 25°C na 10 dni. Do dalszej analizy odważano po 5g próbki wysuszonego wcześniej ziarna całkowicie przerośniętego grzybnią. Badania na obecność deoksyniwalenolu, toksyny T-2 i zearalenonu przeprowadzono z wykorzystaniem bezpośrednich kompetycyjnych testów ELISA RIDASCREEN firmy R-biopharm zgodnie z instrukcją producenta. Wyniki zebrano przy użyciu czytnika Sunrise firmy Tecan przy długości fali $\lambda = 450$ nm i opracowano za pomocą oprogramowania Magellan.

Wyniki i dyskusja

Analiza mikologiczna ziarniaków jęczmienia wykazała, że skład gatunkowy wyizolowanych grzybów *Fusarium* spp. był podobny w badanych odmianach. *Fusarium poae* stanowił 2% ogólnej liczby izolatów wyosobnionych z odmiany Frontier. Sporadycznie również występowały inne gatunki z rodzaju *Fusarium* takie jak: *F. sporotrichioides* (ok.1%), *F. equiseti* (1%), *F. oxysporum* (poniżej 1%), *F. nivale* (1%). KAM wykazała, że na ziarniakach jęczmienia odmiany Blask najczęściej występował *F. poae* (2%), a rzadziej *F. avenaceum* (1%) i *F. sporotrichioides* (1%). Wśród grzybów z rodzaju *Fusarium* najczęściej wyosobnianym z ziarniaków jęczmienia odmiany Conchita był *F. poae* stanowiący 2% ogólnej liczby izolatów. Uwzględniając wszystkie odmiany, grzyby z rodzaju *Fusarium* były w tym zbożu reprezentowane przez *F. poae*, ponadto sporadycznie przez *F. sporotrichioides*, *F. nivale*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* oraz *F. avenaceum*. Największe zróżnicowanie gatunkowe grzybów z rodzaju *Fusarium* występowało na jęczmieniu odmiany Frontier.

F. poae i *F. sporotrichioides* zaliczane są do jednych z najczęściej występujących patogenów zbóż i najważniejszych producentów mikotoksyn z grupy trichotecenów [Kiecana i in., 2005; Glenn, 2007; Yli-Mattila, 2010]. Identyfikacja gatunków z rodzaju *Fusarium* bazująca na cechach morfologicznych tych grzybów jest często skomplikowana i myląca. Dlatego też szerokie zastosowanie w diagnostyce *Fusarium* spp. znalazły metody oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) [Kulik i in., 2005].

Ocena spektrofotometryczna materiału genetycznego wyizolowanego z grzybni badanych izolatów *Fusarium* spp. wykazała, że koncentracja DNA wynosiła dla *F. poae* od 38,79 µg/ml do 294,5 µg/ml, a dla *F. sporotrichioides* od 41,14 do 125,36 µg/ml, przy odpowiednim stopniu czystości.

Z 7 izolatów zidentyfikowanych metodą klasyczną jako *F. poae* tylko dla 3 została potwierdzona identyfikacja z użyciem techniki PCR, 1 zaklasyfikowano jako *F. sporotrichioides*, a 3 nie zostały określone do gatunku. Z 3 izolatów *F. sporotrichioides* 1 został określony jako *F. poae*, a 2 nie sklasyfikowano do gatunku przy użyciu techniki PCR. Niemożność identyfikacji gatunkowej izolatów grzybów z rodzaju *Fusarium* za pomocą metody PCR może wynikać z dużej liczby znanych gatunków *Fusarium* spp. jak również ze znacznej zmienności genetycznej tych grzybów powodowanej przez takie czynniki jak: stres wywołany działaniem skrajnej temperatury, brak dostępności do składników pokarmowych, obecność w podłożu szkodliwych substancji czy występowanie organizmów konkurencyjnych [Daviere, 2001]. Dla 3 izolatów określonych do gatunku *Fusarium* za pomocą KAM, została potwierdzona prawidłowość identyfikacji z wykorzystaniem techniki PCR. W przypadku 7 izolatów analiza PCR wykazała nieprawidłową identyfikację gatunku przy pomocy KAM. Kulik i in. (2005) oraz Demeke i in. (2005) potwierdzają niejednoznaczność i trudności klasycznej

identyfikacji taksonomicznej wynikającej z podobnych cech morfologicznych grzybów blisko spokrewnionych gatunków.

Tabela 2. Charakterystyka morfologiczna wybranych izolatów *F. poae* i *F. sporotrichioides*.

Nr izolatu	Odmiana jęczmienia	Izolaty użyte do sztucznej infekcji	Identyfikacja gatunkowa na podstawie KAM	Morfologia zarodników
1	Conchita	<i>F. poae</i> mikro- i makrozarodnikowe	<i>F. poae</i>	Mikrokonidia małe, w kształcie cytryny
2	Frontier	<i>F. poae</i> mikro- i makrozarodnikowe	<i>F. poae</i>	Mikrokonidia małe, w kształcie cytryny
3	Frontier	KONTROLA	<i>F. poae</i>	Mikrokonidia małe, w kształcie cytryny
4	Frontier	<i>F. poae</i> mikrozarodnikowe	<i>F. poae</i>	Mikrokonidia małe, w kształcie cytryny
5	Frontier	<i>F. poae</i> mikrozarodnikowe	<i>F. sporotrichioides</i>	Sierpowate makrokonidia
6	Blask	<i>F. poae</i> mikrozarodnikowe	<i>F. poae</i>	Mikrokonidia małe, w kształcie cytryny
7	Blask	KONTROLA	<i>F. poae</i>	Mikrokonidia duże, okrągłe
8	Blask	<i>F. poae</i> mikro- i makrozarodnikowe	<i>F. sporotrichioides</i>	Sierpowate makrokonidia
9	Blask	<i>F. poae</i> mikrozarodnikowe	<i>F. sporotrichioides</i>	Sierpowate makrokonidia
10	Blask	<i>F. poae</i> mikrozarodnikowe	<i>F. poae</i>	Grzybnia niezarodnikująca

Wszystkie izolaty *F. poae* produkowały DON w zakresie od 29,89 do 373,37 µg/kg, toksynę T-2 od 135,10 do 297,39 µg/kg oraz ZEA od 29,23 do 726,08 µg/kg. *F. sporotrichioides* produkował DON, toksynę T-2 oraz ZEA w ilości odpowiednio 81,23 µg/kg, 259,01 µg/kg oraz 1259,07 µg/kg. Grzyb *F. poae* określany jest jako patogen posiadający zdolność syntetyzowania trichotecenów typu A i B, a także beauwericyny i eniatin [Rataj-Guranowska, 2009]. *F. poae* może również produkować NIV [Yli-Mattila, 2010] i ZEA [Langseth i in., 1999]. W piśmiennictwie podawane są sprzeczne dane dotyczące produkcji DON. Większość autorów nie przypisuje produkowania tej mikotoksyny *F. poae* [Stenglein, 2009; Yli-Mattila, 2010], natomiast inni wykazali, że jest on producentem DON [Kiecana i in., 2005; Jestoi i in., 2008]. W badaniach własnych na ziarnie jęczmienia sztucznie inokulowanego *F. poae* wszystkie izolaty grzyba produkowały toksynę T-2, DON oraz ZEA. Wyniki własne dotyczące produkcji DON są zgodne z doświadczeniami polowymi ze sztuczną infekcją kłosów

jęczmienia szczepami *F. poae* prowadzonych przez Jestoi i in. (2008), w których wykazano produkcję DON przez ponad połowę izolatów tego grzyba. Zarówno wyniki własne, jak również innych autorów pozwalają na stwierdzenie, że *F. poae* ma zdolność syntetyzowania DON.

Tabela 3. Porównanie identyfikacji izolatów *F. poae* i *F. sporotrichioides* metodą klasyczną i molekularną.

Nr izolatu	Gatunek zidentyfikowany metodą klasyczną	Gatunek zidentyfikowany metodą PCR
1.	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium poae</i>
2.	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium poae</i>
3.	<i>Fusarium poae</i>	Nie określono
4.	<i>Fusarium poae</i>	Nie określono
5.	<i>F. sporotrichioides</i>	Nie określono
6.	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium poae</i>
7.	<i>Fusarium poae</i>	Nie określono
8.	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>Fusarium poae</i>
9.	<i>F. sporotrichioides</i>	Nie określono
10.	<i>Fusarium poae</i>	Nie określono

Toksyna T-2 w niniejszych badaniach była produkowana przez wszystkie izolaty *F. poae*. W literaturze informacje na ten temat są niejednoznaczne. W doświadczeniu Kiecany i in. (2005) analiza próbek owsa po inokulacji *F. poae* wykazała występowanie toksyny T-2 w każdej z nich. Thrane i in. (2004) potwierdzili jej obecność jedynie w części badanych prób. Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Jestoi i in. (2008) nie stwierdzono toksyny T-2 w ziarnie pszenicy i jęczmienia, które były sztucznie zainfekowane *F. poae*. Powyższe dane pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, iż toksyna T-2 jest produkowana przez niektóre szczepy *F. poae*.

W przeprowadzonych badaniach własnych wszystkie izolaty *F. poae* były producentami ZEA. Kiecana i in. (2005) nie stwierdzili tej mikotoksyny w zbożach. Natomiast badania Langsetha i in. (1999) wykazały, że w próbkach ziarna zbóż silnie porażonych przez *F. poae* obecny był ZEA, co jest zbieżne z wynikami badań własnych. *F. sporotrichioides* w piśmiennictwie określany jest jako producent toksyny T-2 oraz HT-2, DAS, NEO [Kwaśna i in., 1991; Nicolaisen i in., 2009]. Chełkowski (1985) i Thrane (1989) stwierdzili ponadto, że patogen ten posiada także zdolność syntetyzowania ZEA, a Mossa i Thrane (2004) przypisali temu gatunkowi możliwość syntetyzowania także DON i NIV oprócz toksyny T-2. W niniejszych badaniach izolat *F. sporotrichioides* wytwarzał DON, toksynę T-2 i ZEA. Wytwarzanie przez *F. sporotrichioides* DON potwierdziły badania Salasa i in. (1999), którzy wykonali badania na ziarnie jęczmienia.

Wnioski

1. Identyfikacja *F. poae* oraz *F. sporotrichioides* za pomocą konwencjonalnej analizy mikologicznej nie została potwierdzona dla większości badanych izolatów z użyciem techniki PCR co wskazuje na zawodność metody klasycznej.
2. Technika PCR okazała się bardzo przydatna w diagnostyce grzybów z rodzaju *Fusarium* występujących na jęczmieniu, na którym często brak widocznych objawów chorobowych.
3. Badane izolaty *F. poae* i *F. sporotrichioides* produkowały wszystkie 3 badane mikotoksyny tj. DON, toksynę T-2 i ZEA.

Literatura

- [1] Chełkowski J.: Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy, Wyd. SGGW-AR Warszawa, 1985, s. 38-47.
- [2] Chełkowski J., Witkowska I.: Identyfikacja patogenów grzybów zbóż i badanie ich różnorodności genetycznej za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Postęp Nauk Rolniczych, 1999, 04: 49-60.
- [3] Daviere J. M., Langin T., Daboussi M. J.: Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. Fungal Genetics and Biology, 2001, 34: 177-192.
- [4] Demeke T., Clear RM., Patrick SK., Gaba D.: Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103: 271-284.
- [5] Glenn A.E.: Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. Animal Feed Science and Technology, 2007, 137: 213-240.
- [6] Golińska B., Narożna D., Mądrzak C.J.: Zastosowanie metod molekularnych do wykrywania, identyfikacji i charakterystyki grzybów z rodzaju *Fusarium*. Biotechnologia, 2002, 3: 165-177.
- [7] Jestoi M.: Emerging *Fusarium* – mycotoxins: fusaproliferin, beauvercin, enniatins and moniliformin – a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48: 21-49.
- [8] Kiecana I., Mieleńczuk E., Perkowski J., Goliński P.: Porażenie wiech przez *Fusarium poae* oraz zawartość miko toksyn w ziarnie owsa, Acta Agrobotanica, 2005, Vol 58, 2: 91-102.
- [9] Kulik T., Fordoński G., Pszczółkowska A., Płodzień K., Olszewski J.: Identyfikacja wybranych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* z nasion niektórych gatunków roślin uprawnych metodą tradycyjną i Bio-PCR. Acta Agrobotanica, 2005, 58: 33-54.
- [10] Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P.: Flora Polska. Grzyby (Mycota) 22: Sierpik (*Fusarium*). PWN. Warszawa-Kraków, 1991.

- [11] Langseth W., Bernhof A., Rundberget T., Kosiak B., Gareis M.: Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 1999, 144: 103-113.
- [12] Mossa M.O., Thrane U.: *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*, 2004, 153: 23–28.
- [13] Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie E.J.: Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 1994, 11: 479-504.
- [14] Nicolaisen M., Suproniene S., Nielsen L.K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justesen A.F.: Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76: 234-240.
- [15] Płaskowska E.: Charakterystyka i taksonomia grzybów z rodzaju *Fusarium*. *Mikologia Lekarska*, 2010, 17 (3): 172-176.
- [16] Rataj- Guranowska M. 2009. Kompendium symptomów chorób roślin oraz morfologii ich sprawców. Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy. Bank Patogenów Roślin i Badania Ich Bioróżnorodności, 2009, z.7: 3-5.
- [17] Salas B., Steffenson B.J., Casper H.H., Prom L. K., Tacke B., Fetch T.G., Schwarz P.B.: *Fusarium* species pathogenic to barley and associated mycotoxins. *Plant Disease*, 1999, 97, 7: 667-674.
- [18] Stenglein S.A.: *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology*, 2009, 91 (1): 25-36.
- [19] Suchorzyńska M., Misiewicz A.: Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Postępy Mikrobiologii*, 2009, 48: 221-230.
- [20] Thrane U.: *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. In: *Fusarium. Toxins, Taxonomy and Pathogenicity*, Edited by J. Chełkowski, 1989: 199-226.
- [21] Thrane, U.: Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 95: 257-266.
- [22] Wilson A., Simpson D., Chandler E., Jennings P., Nicholson P.: Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters* 2004, 233: 69–76.
- [23] Yli-Mattila T.: Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 2010, 92 (1): 7-18.

WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE KEFIRÓW DOSTĘPNYCH NA RYNKU LUBELSKIM

BARTOSZ SOŁOWIEJ, MACIEJ NASTAJ, PAWEŁ GLIBOWSKI,
STANISŁAW MLEKO, EWELINA OŹGA, DARIUSZ KOWALCZYK

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było porównanie właściwości reologicznych (lepkość, krzywa płynięcia, tiksotropia) oraz kwasowości kefirów dostępnych na rynku lubelskim. Badania lepkości pozornej kefirów dokonywano przy użyciu wiskozymetru Brookfield DV II+, stosując wrzeciono S29, przy prędkości obrotowej 0,5-5 obr./min, wykonując pomiar co 1 min. Krzywe płynięcia kefirów wyznaczano przy użyciu reometru oscylacyjnego RS 300 w układzie cylindrów współosiowych (rotor Z 41, cylinder Z 43). Pomiarów granicy płynięcia kefirów dokonywano przy szybkości ścinania wynoszącej 0,1-200 s⁻¹, w temperaturze 21 °C. Pomiar tiksotropii wykonywano w temperaturze 21 °C przy wzrastającej do 200 s⁻¹ szybkości ścinania. Oznaczenia stężenia jonów wodorowych w kefirze dokonywano za pomocą pH-metru z dokładnością do 0,05 w temperaturze 21 °C, określano również kwasowość miareczkową kefiru. Lepkość wszystkich kefirów zmniejszała się w miarę zwiększania prędkości obrotów wrzeciona. Spośród badanych kefirów największą lepkością odznaczał się kefir firmy B (50 Pa·s przy 0,5 obr./min), co mogło mieć związek ze zwiększoną zawartością białka (4%) w produkcie. Wszystkie przebadane kefiry wykazywały cechy płynów nieniutonowskich, rozrzedzanych ścinaniem, tzw. płynów pseudoplastycznych, o czym świadczy przebieg ich krzywych płynięcia. Największa spośród badanych kefirów zawartość białka w wyrobie firmy B mogła spowodować jego największe wartości naprężeń ścinających. Badane kefiry w różnym stopniu wykazywały zjawisko tiksotropii widoczne na wykresie jako niepokrywanie się krzywych płynięcia, uzyskanych przy wzrastającej i malejącej szybkości ścinania. Kefiry o większej zawartości białka cechowały się większą odpornością na warunki ścinania w zadanym zakresie szybkości ścinania niż kefiry o mniejszej zawartości białka. Ponadto, wszystkie przebadane kefiry cechowały się prawidłową kwasowością.

Słowa kluczowe: kefir, lepkość, krzywa płynięcia, tiksotropia, kwasowość

Wprowadzenie

Właściwości prozdrowotne napojów fermentowanych wiążą się z ich wartością odżywczą i fizjologiczną, a także z właściwościami profilaktycznymi

i terapeutycznymi. W porównaniu z mlekiem nieprzetworzonym, napoje fermentowane charakteryzują się większą zawartością witamin oraz lepszą przyswajalnością białek i tłuszczu [Kudęłka, 2005].

Jednym z najpopularniejszych napojów fermentowanych jest kefir, pochodzący z Bliskiego Wschodu, z Kaukazu [Honson i in., 1990]. Nazwa kefir pochodzi od słowa „kefi”, co u górali kaukaskich oznaczało „najlepszego gatunku”, „wyborowy” [Trojanowska, 2006]. Początkowo kefir produkowany był z mleka owczego, natomiast później otrzymywany był z mleka bawolego, wielbłądziego oraz koziego. W krajach europejskich kefir produkowany jest przede wszystkim z mleka krowiego [Baranowska, 2009].

Według Polskiej Normy kefir to napój otrzymany z mleka pasteryzowanego o określonej zawartości tłuszczu, poddany mieszanej fermentacji alkoholowo-mlekowej, która zachodzi dzięki grzybkom kefirowym [PN-A-86061:2002]. Według Cais-Sokolińskiej i in. [2008], grzybki kefirowe powinny zawierać drożdże fermentujące laktozę (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*) oraz drożdże, które nie fermentują laktozy (*Saccharomyces cerevisiae*). Jak podaje Korolewa [1991], Varnam i Sutherland [1994] oraz Wielgosz [1998], stosowane mikroorganizmy do produkcji kefiru to bakterie: *Lac. lactis ssp. lactis*, *Lac. lactis ssp. cremoris*, *Str. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Leu. mesenteroides*, *Lbc. brevis*, *Lbc. kefir*, *Lbc. casei*, *Acetobacter aceti*; oraz drożdże: *Klu. marxianus var. marxianus*, *Can. kefir*, *Torulaspora delbrueckii*, *Sac. cerevisiae*, *Sac. omnisporus*, *Sac. exiguus*. Według Fesnaka [1998] rzeczywisty skład ziaren kefirowych zależy od klimatu i może zawierać szersze grono mikroorganizmów - bakterie kwaszące: *Lac. lactis ssp. lactis*, *Lac. lactis var. diacetylactis*, *Lac. lactis ssp. cremoris*, *Leu. mesenteroides ssp. cremoris*, *Leu. mesenteroides ssp. dextrancium*, *Lbc. brevis*, *Lbc. casei ssp. casei*, *Lbc. kefir*, *Lbc. acidophilus*, *Lbc. caucasicus*, *Lbc. casei ssp. alactosus*, *Lbc. casei ssp. rhamnosus*, *Lbc. cellobiosus*, *Lbc. helveticus ssp. jogurti*, *Lbc. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lbc. confusus*, *Lbc. kefiranofaciens*; bakterie octowe: *Ace. aceti*, *Ace. rancens*; drożdże: *Sac. cerevisiae*, *Sac. exiguus*, *Sac. omnisporus*, *Sac. delbrueckii*, *Sac. florentinus*, *Sac. lactis*, *Sac. kefir*, *Sac. carlsbergensis*, *Can. kefir*, *Can. valida*, *Can. tenuis*, *Can. pseudotropicalis*, *Can. holmii*, *Klu. marxianus*, *Klu. lactis*, *Torula kefir*, *Torulopsis holmii*, *Brettanomyces anomalus*, *Debaryomyces Hansenii*, *Can. etchellsii*, *Klu. wickerhamii*, jak również inne bakterie: *Bacillus caucasicus*, *Bacterium caucasicum*, *Betabacterium caucasicum*.

Podczas fermentacji mlekowej część cukru przerabiana jest na kwas mlekowy, a pozostały cukier w wyniku fermentacji alkoholowej zamienia się w alkohol i dwutlenek węgla, nadając kefirowi charakterystyczny orzeźwiający smak [Jędrzejczak i Hoffmann, 1999]. Ponadto, gotowy produkt powinien charakteryzować się płynnym skrzepem, konsystencją jednolitą bez rozwarstwień, białą lub lekko kremową barwą [Kudęłka, 2005].

Kefir bogaty jest w witaminę K, D, biotynę, witaminy z grupy B (B1, B2, B6,

B12), kwas foliowy, aminokwasy, wapń oraz fosfor. Charakteryzuje się zawartością 2,8% białka, 1-1,5% tłuszczu, 0,8% kwasu mlekowego oraz alkoholu około 1% [Mojka, 2013]. Ponadto, posiada on wiele prozdrowotnych właściwości, przede wszystkim pozytywnie wpływa na perystaltykę jelit oraz na wydzielanie żółci i soków trawiennych, jak również stymuluje układ odpornościowy. Dzięki zawartości kwasu foliowego ma korzystny wpływ na kondycję skóry [Fesnak i Fetliński, 1999]. W krajach Europy Wschodniej i Południowo-Wschodniej Azji, a szczególnie w Rosji, kefir znacznie częściej niż inne mleczne produkty fermentowane jest polecany w codziennej diecie pacjentom z zaburzeniami przewodnictwa pokarmowego, wywołanymi infekcją bakteryjną lub podawaniem antybiotyku. Kefir jest również rekomendowany dla kobiet w ciąży, karmiących matek, a nawet w celu łagodzenia skutków nadużywania alkoholu, stymulując pracę wątroby i nerek [Kołakowski i in., 2001].

Jakość kefiru zależy przede wszystkim od jakości i składu chemicznego mleka oraz przebiegu procesu produkcji. Proces dojrzewania ma istotny wpływ na uzyskanie cech charakterystycznych dla kefiru. Powinien być prowadzony w temperaturze 12 °C przez 12-14 godzin. Takie parametry pozwalają na powstawanie produktów, wynikających z aktywności metabolicznej drożdży [Baranowska, 2009]. Ponadto, na kształtowanie cech jakościowych kefiru wpływają właściwości fizykochemiczne tj. reologiczne, kwasowość, jak również zróżnicowane składniki zastosowane podczas jego produkcji [Ertekin i Guzel-Seydim, 2010; Glibowski i Kowalska, 2012].

Celem niniejszej pracy było porównanie właściwości reologicznych (lepkość, krzywa płynięcia, tiksotropia) oraz kwasowości kefirów dostępnych na rynku lubelskim.

Materiał i metody badań

Badania wykonano na kefirach różnych producentów zaopatrujących rynek lubelski, co przedstawiono w Tabeli 1.

Tab. 1. Wartość odżywcza kefirów na 100 g (na podstawie deklaracji producenta)

Kefir	Wartość energetyczna [kJ / kcal]			
	Wartość energetyczna [kJ / kcal]	Białko [g]	Węglowodany [g]	Tłuszcz [g]
A	188 / 45	3,2	4,8	1,4
B	239 / 57	4,0	5,7	2,0
C	220 / 52	3,6	5,0	2,0
D	212 / 51	3,4	4,7	2,0
E	230 / 55	3,0	4,0	3,0
F	211,7 / 50,4	3,4	4,7	2,0

Metody badań

Wiskozymetria

Badania lepkości pozornej kefirów dokonywano przy użyciu wiskozymetru Brookfield DV II+ (Brookfield Engineering, Stoughton, MA, USA), stosując wrzeciono S29, przy prędkości obrotowej 0,5-5 obr./min, wykonując pomiar co 1 min. Badania przeprowadzano w 3 powtórzeniach w temp. 21 °C. Wyniki rejestrowano za pomocą programu Wingather version 1.0.

Reometria oscylacyjna

Krzywe płynięcia kefirów wyznaczano przy użyciu reometru oscylacyjnego RS 300 (ThermoHaake, Niemcy) w układzie cylindrów współosiowych (rotor Z 41, cylinder Z 43). Pomiarów granicy płynięcia kefirów dokonywano przy szybkości ścinania wynoszącej 0,1-200 s⁻¹, w temp. 21 °C. Przy użyciu reometru oscylacyjnego wyznaczano także pętle histerezy tiksotropii badanych produktów. Pomiaru tiksotropii dokonywano w temp. 21 °C przy wzrastającej do 200 s⁻¹ szybkości ścinania. Badania przeprowadzano w 2 powtórzeniach.

Oznaczanie pH

Zasada oznaczenia polega na oznaczaniu stężenia jonów wodorowych w kefirze za pomocą pH-metru (CP-315, Elmetron, Zabrze, Polska) z dokładnością do 0,05 przy temp. 21 °C. Za wynik przyjęto średnią arytmetyczną odczytów 2 równoległych oznaczeń nie różniących się między sobą więcej niż 0,1.

Oznaczanie kwasowości miareczkowej

Kefir miareczkowano za pomocą roztworu wodorotlenku sodowego wobec fenoloftaleiny do momentu uzyskania różowego zabarwienia. Pomiarów dokonywano w 2 powtórzeniach. Wynik w stopniach Soxhleta-Henkla obliczano ze wzoru:

$$X_1 = a \cdot 100 / m [\text{°SH}];$$

a - wynik w gramach kwasu mlekowego na 100 cm³ produktu obliczano według wzoru:

$$X_2 = a \cdot 0,25 \cdot 100 \cdot 90 / m \cdot 1000 = a \cdot 0,225 / m;$$

gdzie:

X₁ - kwasowość kefiru

X₂ - kwasowość kefiru w przeliczeniu na kwas mlekowy

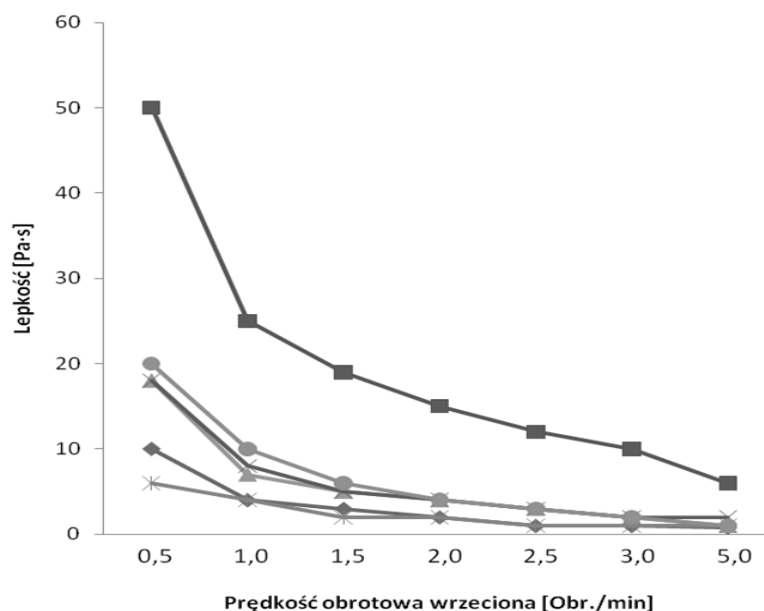
a - objętość 0,25 N roztworu NaOH zużytego do miareczkowania, cm³;

m - masa napoju = 25 g.

Wyniki i dyskusja

Na Rysunku 1 przedstawiono zależność lepkości kefirów od prędkości obrotowej wrzeciona w zakresie od 0,5 do 5 obr./min. Lepkość wszystkich kefirów zmniejszała się w miarę zwiększania prędkości obrotów wrzeciona. Najniższą

lepkością wśród badanych kefirów charakteryzował się wyrób firmy D (przy 0,5 obr./min wykazywał 6 Pa·s, zaś przy 5 obr./min 1 Pa·s), natomiast najwyższą lepkością charakteryzował się kefir firmy B (przy 0,5 obr./min wykazywał 50 Pa·s).



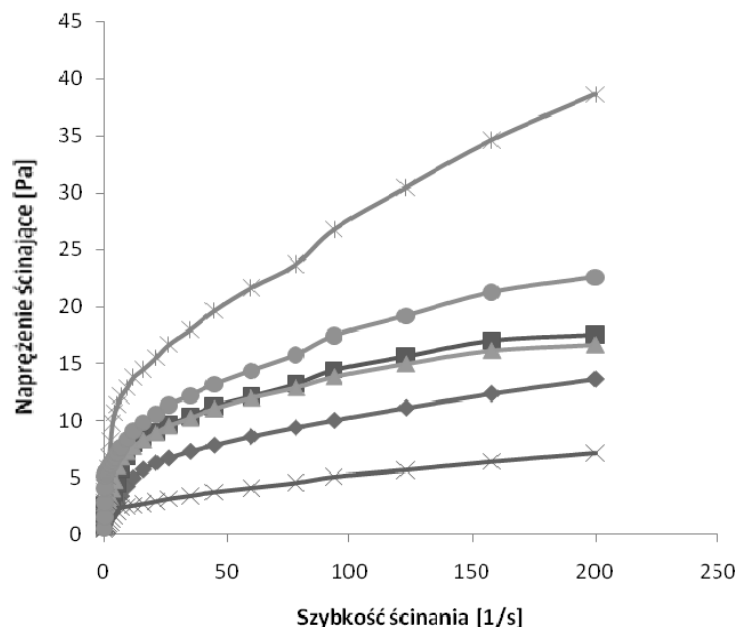
Rys. 1. Lepkość kefirów (♦ - A, ■ - B, × - C, * - D, ▲ - E, ● - F)

Lepkość to opór stawiany przez ciecz wymuszonej miejscowej zmianie położenia jej elementu objętościowego [Szlezyngier, 1994], a więc określa ona płynność produktu pod wpływem przyłożonej siły [Surówka, 2002]. Jest ona zależna od temperatury pomiaru oraz składu substancji, ponadto zależy od szybkości ścinania lub naprężenia ścinającego, a także czasu trwania ścinania [Rao, 1977].

W przypadku kefiru firmy B zanotowane największe wartości lepkości mogły być spowodowane najwyższą zawartością białka spośród wszystkich badanych kefirów. Gustaw i Mleko [2001], badając desery mleczne z dodatkiem izolatu białek serwatkowych (WPI), koncentratu białek serwatkowych (WPC) i odtłuszczonego mleka w proszku (OMP) wykazali, że desery sporządzone z dodatkiem OMP cechowała wyższa lepkość niż desery z WPC, zaś najwyższą lepkość zaobserwowano w przypadku deserów z dodatkiem WPI. Gustaw i Nastaj [2007], określając właściwości reologiczne jogurtów stałych z dodatkiem wybranych koncentratów białek serwatkowych zaobserwowali wzrost lepkości wraz ze zwiększeniem zawartości suchej masy w jogurcie.

Na Rysunku 2 przedstawiono krzywe płynięcia kefirów. Największe wartości naprężeń ścinających, przy takiej samej szybkości ścinania wykazywał kefir firmy B, natomiast najmniejsze wartości kefir firmy D. Ponadto, kefir firmy B, przy

maksymalnej szybkości ścinania osiągnął największą wartość naprężenia ścinającego na poziomie 38,6 Pa, zaś najmniejszą wartość osiągnął kefir firmy D - 7,2 Pa.

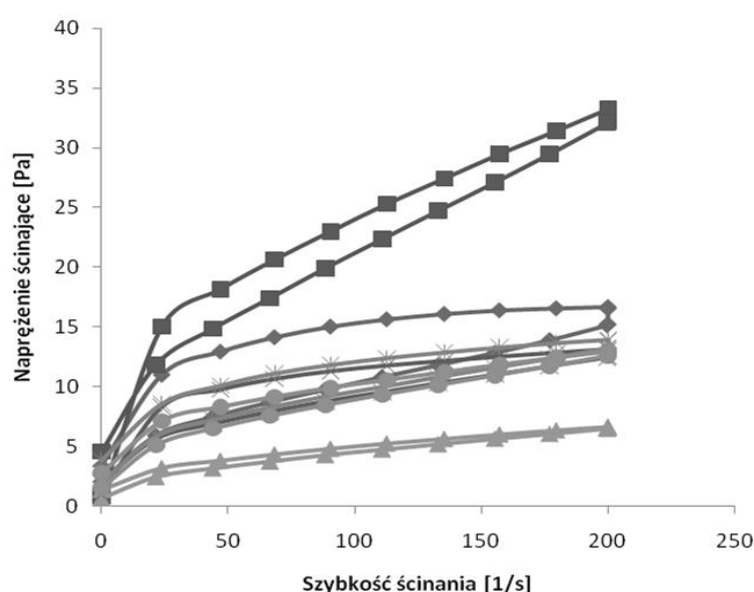


Rys. 2. Krzywe płynięcia kefirów (♦ - A, * - B, ▲ - C, × - D, ■ - E, ● - F)

Wszystkie badane kefiry w różnym stopniu wykazywały zjawisko tiksotropii (Rys. 3), widoczne na wykresie jako niepokrywanie się krzywych płynięcia, uzyskanych przy wzrastającej i malejącej szybkości ścinania. Największym polem powierzchni pętli histerezy wśród kefirów odznaczał się kefir firmy B i F, natomiast najmniejszym kefir firmy D i E.

Krzywa płynięcia jest to przedstawiona na wykresie zależność naprężenia stycznego (τ) odłożonego na osi rzędnych od szybkości ścinania (γ) na osi odciętych. W zależności od przebiegu tych krzywych klasyfikuje się płyny do grupy cieczy niutonowskich lub nieniuonowskich [Balejko, 2007]. Podobnymi właściwościami reologicznymi do kefirów charakteryzują się jogurty, które należą do grupy cieczy reologicznie niestabilnych, zachowujących się jak płyny tiksotropowe o charakterystycznym obrazie pętli histerezy krzywych płynięcia [Benezech i Maingonnat, 1994]. Rohm i Schmid [1993], a także Hassan i in. [1996] stwierdzili, że pole powierzchni pętli histerezy tiksotropii odzwierciedla wielkość zmian struktury jogurtu pod wpływem sił ścinających. Ponadto Rohm i Schmid [1993] wykazał, że pola powierzchni pętli histerezy są tym większe, im więcej białka zawiera jogurt, oraz że na wielkość tiksotropii wpływają zastosowane kultury starterowe. Największa spośród badanych kefirów zawartość białka w wyrobie firmy B mogła spowodować jego największe wartości naprężeń

ścinających oraz największe pole powierzchni pętli histerezy. Według Hassana i in. [1996] użycie śluzotwórczych kultur bakteryjnych zwiększa wartość naprężeń ścinających. Ponadto Jaros i in. [2002] stwierdzili, że stopień nachylenia krzywej płynięcia określa miarę odporności żelu na działanie sił ścinających. Przeprowadzone badania dowiodły, że wszystkie przebadane kefiry charakteryzowały się przepływem nieniutonowskim o charakterze pseudoplastycznym, rozrzedzanym ścinaniem. Potwierdzają to obserwacje innych naukowców badających właściwości reologiczne produktów żywnościowych [Missaire i in., 1990; Gujral i in., 2002; Sahin i Ozdemir, 2004; Ertekin i Guzel-Seydim, 2010; Glibowski i Kowalska, 2012].



Rys. 3. Wpływ szybkości ścinania na przebieg krzywych płynięcia kefirów (tikсотropia) (● - A, ■ - B, × - C, ▲ - D, * - E, ◆ - F)

W Tabeli 2 przedstawiono wyniki pomiaru aktywności jonów hydroniowych w kefirze. Największym stężeniem jonów hydroniowych charakteryzował się kefir firmy D ($\text{pH} = 4,43$), B i E ($\text{pH} = 4,42$), najmniejszym natomiast kefir firmy F ($\text{pH} = 4,22$). Na podstawie niniejszych badań stwierdzono, że wszystkie badane kefiry charakteryzowały się prawidłową kwasowością. Według Odeta [1995] oraz Glibowskiego i Kowalskiej [2012] pH kefiru powinno wynosić od 4,2 do 4,6.

Tab. 2. Wartość pH kefirów

Kefir	Wartość pH
F	4,22
C	4,37
A	4,40
B	4,42
E	4,42
D	4,43

W Tabeli 3 przedstawiono wyniki pomiaru kwasowości kefirów w stopniach Soxhleta-Henkla oraz wyniki pomiaru kwasowości wyrażone w gramach kwasu mlekowego na 100 cm³ kefiru.

Tab. 3. Kwasowość kefirów [°SH]

Kefir	Kwasowość w stopniach Soxhleta-Henkla [°SH]	Kwasowość w gramach kwasu mlekowego na 100 cm ³ kefiru
F	39,6	0,0891
C	42,4	0,0954
E	42,4	0,0954
A	42,8	0,0963
B	43,2	0,0972
D	44,0	0,0990

Najwyższą kwasowością w stopniach Soxhleta-Henkla oraz kwasowością wyrażoną w gramach kwasu mlekowego na 100 cm³ produktu charakteryzował się kefir firmy D (44,0 °SH, 0,0990), zaś najniższą kefir producenta F (39,6 °SH, 0,0891).

Kwasowość mleka jest podstawą oceny jego świeżości i przydatności do spożycia. Dla mleka surowego jej wartość powinna mieścić się w granicach 6,0-7,5 °SH [Pełczyńska i Paszkiewicz, 2007], natomiast kwasowość kefirów winna wahać się w przedziale 35-45 °SH [PN-A-86061:2002].

Produkty mleczne fermentowane powstają na skutek fermentacji mlekowej, w wyniku której pod wpływem działania bakterii występujących w mleku lub celowo do niego wprowadzonych, powstaje pewna ilość kwasu mlekowego (0,6-2%). Wzrasta tym samym kwasowość (pH ok. 4,0) produktu, co równocześnie uniemożliwia rozwój bakterii gnilnych i psucie się mleka. Uzyskane wynik

wskazują zatem, że we wszystkich badanych kefirach zanotowano środowisko kwaśne, co stanowi prawidłowy odczyt, wynikający z charakterystyki produkcji kefiru.

Wnioski

1. Lepkość wszystkich kefirów zmniejszała się w miarę zwiększania prędkości obrotów wrzeciona. Spośród badanych kefirów największą lepkością odznaczał się kefir firmy B (50 Pa·s przy 0,5 obr./min), co mogło mieć związek ze zwiększoną zawartością białka (4%) w produkcji.
2. Wszystkie przebadane kefiry wykazywały cechy płynów nieniu-tonowskich, rozrzedzanych ścinaniem, tzw. płynów pseudoplastycznych, o czym świadczy przebieg ich krzywych płynięcia. Największa spośród badanych kefirów zawartość białka w wyrobie firmy B mogła spowodować jego największe wartości naprężeń ścinających.
3. Badane kefiry w różnym stopniu wykazywały zjawisko tiksotropii widoczne na wykresie jako niepokrywanie się krzywych płynięcia, uzyskanych przy wzrastającej i malejącej szybkości ścinania. Kefiry o większej zawartości białka cechowały się większą odpornością na warunki ścinania w zadanym zakresie szybkości ścinania niż kefiry o mniejszej zawartości białka.
4. Wszystkie przebadane kefiry cechowały się prawidłową kwasowością.

Literatura

- [1] Balejko J.: Reologia żywności. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Szczecin 2007.
- [2] Baranowska M.: Właściwości fizykochemiczne kefiru i biokefiru. Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 2009, 48(2), 18-20.
- [3] Benezech T., Maingonnat J.F.: Characterization of the rheological properties of yoghurt – a review. Journal of Food Engineering, 1994, 21, 447-472.
- [4] Cais-Sokolinska D., Danków R., Pikul J.: Physicochemical and sensory characteristics of sheep kefir during storage. Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 2008, 7(2), 63-73.
- [5] Ertekin B., Guzel-Seydim Z.B.: Effect of fat replacers on kefir quality. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90, 543-548.
- [6] Fesnak D.: Kultury kefirowe Biolacta - Texel w świetle wymagań prawnych. Biuletyn Informacyjny Biolacta - Texel, 1998, 2(13), 4-5.
- [7] Fesnak D., Fetliński A.: Kefir - to zdrowie. Przemysł Spożywczy, 1999, 1, 24-25.
- [8] Glibowski P., Kowalska A.: Rheological, texture and sensory properties of kefir with high performance and native inulin. Journal of Food Engineering, 2012, 111, 299-304.

- [9] Gujral H. S., Sharma A., Singh N.: Effect of hydrocolloids, storage temperature and duration on the consistency of tomato ketchup. *International Journal of Food Properties*, 2002, 5, 179-191.
- [10] Gustaw W., Mleko S.: Otrzymywanie deserów z wykorzystaniem białek serwatkowych, skrobi i κ -karagenu. In.: *Technologia żywności a oczekiwania konsumenta*. Eds. Haber T., Porzucek H. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2001.
- [11] Gustaw W., Nastaj M.: Wpływ dodatku wybranych koncentratów białek serwatkowych (WPC) na właściwości reologiczne jogurtów otrzymanych metodą termostatową. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, 1(50), 56-63.
- [12] Hassan A.N., Frank J.F., Schmidt K.A., Shalabi S.I.: Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic culture. *Journal of Dairy Science*, 1996, 79(12), 2098-2103.
- [13] Honsono A., Tanare, T., Otani, H.: Binding properties of lactic acid bacteria isolated from Kefir milk mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, 1990, 45, 647-657.
- [14] Jędrzejczak H., Hoffmann M.: Mleko na zdrowie. *Przegląd Gastronomiczny*, 1999, 5, 4-5.
- [15] Kołakowski P., Fetliński A., Fesnak D., Stepianiak L.: Właściwości kefiru. *Przegląd Mleczarski*, 2001, 7, 326-327.
- [16] Korolewa N.S.: Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts: In: *Therapeutic properties of fermented milk*. Ed. Robinson R.K. Elsevier Applied Science, London and New York 1991, 159-179.
- [17] Kudelka W.: Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych w Unii Europejskiej oraz w Polsce. *Zeszyty Naukowe Akademii Ekonomicznej w Krakowie*, 2005, 678, 149-160.
- [18] Missaire F., Qiu C.G., Rao M.A.: Yield stress of structured and unstructured food suspensions. *Journal of Texture Studies*, 1990, 21, 470-490.
- [19] Mojka K.: Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2013, 94 (4), 722-729.
- [20] Odet G.: Fermented milks. *International Diabetes Federation Bulletin*, 1995, 300, 98-100.
- [21] Pełczyńska E., Paszkiewicz W.: Jakość higieniczna mleka surowego z terenu wschodniej Polski w tzw. okresie przejściowym. *Medycyna Weterynaryjna*, 2007, 63(12), 1572-1575.
- [22] PN-A-86061:2002. Mleko i przetwory mleczne. Mleko fermentowane.
- [23] Rao M.A.: Rheology of liquid foods – a review. *Journal of Texture Studies*, 1997, 8, 135-168.
- [24] Rohm H., Schmid W.: Influence of dry matter fortification on flow properties of yoghurt. 1. Evaluation of flow curves. *Milchwissenschaft*, 1993, 48(10), 556-559.

- [25] Sahin H., Ozdemir F.: Effect of some hydrocolloids on the rheological properties of different formulated ketchups. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18, 1015-1022.
- [26] Surówka K.: Tekstura żywności i metody jej badania. *Przemysł Spożywczy*, 2002, 56(10), 4-10.
- [27] Szlezyngier W.: Podstawy reologii polimerów. Wydawnictwo Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów 1994.
- [28] Trojanowska A.: Kumys i kefir jako środki odżywcze i lecznicze. Rozważania na łamach polskich czasopism medycznych drugiej połowy XIX w. *Analecta*, 2006, 15/1-2(29-30), 293-308.
- [29] Varnam A.H., Sutherland J.P.: *Milk and milk Products. Technology, chemistry and microbiology*. Chapman and Hall. London - Glasgow - New York - Tokyo, Melbourne - Madras 1994.
- [30] Wielgosz M.: Napoje mleczne fermentowane a normy. *Przegląd Mleczarski*, 1998, 11, 13 i 54.

ANALIZA ZAPRAW DO NAPOJÓW O SMAKU MALINOWYM DOSTĘPNYCH NA RYNKU LUBELSKIM

BOŻENA SOSNOWSKA

Streszczenie

Celem pracy była ocena towaroznawcza zapraw malinowych dostępnych na rynku lubelskim w handlu detalicznym oraz sprawdzenie, jak konsumenci oceniają te produkty i ich opakowania. Oceniono 11 produktów zakupionych w handlu detalicznym, pochodzących od 7 producentów. Oceniono zgodność oznakowania opakowań z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 lipca 2007 r. w sprawie znakowania środków spożywczych oraz z Polską Normą. Badania mikrobiologiczne objęły oznaczenia: ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych i psychrofilnych oraz liczby komórek drożdży i kolonii pleśni. Sprawdzone także obecność syntetycznych barwników organicznych. Przeprowadzono ocenę organoleptyczną zapraw oraz napojów przygotowanych z tych syropów według zaleceń producenta. Poddano także ocenie wygląd zewnętrzny opakowań. Oceniono takie cechy, jak: pierwsze wrażenie wywołane indywidualnością opakowania, barwę, grafikę, informacyjność oraz czytelność. Oznakowanie większości opakowań było zgodne z obowiązującym prawem, choć stwierdzono kilka błędów. Stwierdzone uchybienia to brak podania ilości soku malinowego w składzie, przy zastosowaniu maliny w grafice. Poważniejszym naruszeniem było użycie maliny w grafice (rysunek i wyeksponowany napis) w przypadku produktu, który w swoim składzie w ogóle nie zawierał tego owocu. Większość producentów nie stosuje się do wymogów Polskiej Normy odnośnie znakowania. Pod względem mikrobiologicznym jakość syropów była bardzo dobra, tylko w jednym produkcie stwierdzono przekroczoną liczbę bakterii psychrofilnych. Jeden produkt został zafałszowany poprzez dodatek syntetycznych barwników organicznych. Ocena organoleptyczna syropów i napojów z nich przygotowanych nie zawsze była skorelowana. Opakowania produktów najtańszych – butelki wykonane z PET – nie zyskały aprobaty osób oceniających.

Słowa kluczowe: zaprawy do napojów, syropy, malina, napoje bezalkoholowe

Wprowadzenie

Zaprawy do napojów, częściej nazywane syropami, to wg Polskiej Normy: „wyroby z dodatkiem lub bez soków owocowych surowych i przetworzonych (...), substancji słodzących, takich jak: cukry, syropy skrobiowe i cukrowe, miód pszczeli oraz dodatkami i substancjami dodatkowymi dozwolonymi”. Wyróżnia się

dwa typy zapraw (słodzone i niesłodzone) oraz pięć rodzajów, w zależności od stosowanych dodatków [PN-A 79036:1997].

Na polskim rynku znajduje się szeroka gama wyrobów tego rodzaju. Dostępne są zarówno smaki podstawowe (malinowy, wiśniowy czy pomarańczowy), ale też bardziej wyszukane, jak: żurawinowy, aroniowy czy różany. Produkty te wykorzystywane są jako dodatek do deserów (lody, budynie), drinków lub jako baza do przyrządzenia napoju o danym smaku. Zdecydowanie najczęściej producentów ma w swojej ofercie syropy malinowe lub o smaku malinowym. Drużyńska i Plewka [2013] badały zarówno syropy malinowe, jak i syropy o smaku malinowym i stwierdziły, że są one cennym źródłem składników odżywczych.

Konsumenci często nie zwracają uwagi na różnicę pomiędzy syropem malinowym a syropem o smaku malinowym, choć różnica między nimi jest zasadnicza. W drugim przypadku w składzie produktu maliny mogą nie występować w ogóle lub być w niewielkiej ilości [Jak kupować..., 2013]. Syropy owocowe powszechnie kojarzą się z tym, że w składzie powinny zawierać w dużej ilości składniki owocowe. Może w tym utwierdzać również stosowana przez producentów grafika, w której owoce zajmują bardzo ważne miejsce. Tymczasem informacje z etykiet zapraw do napojów wskazują na to, że owoce rzadko są w nich głównym składnikiem.

Celem pracy była ocena towaroznawcza zapraw malinowych dostępnych na rynku lubelskim w handlu detalicznym oraz sprawdzenie, jak konsumenci oceniają te produkty i ich opakowania.

Material i metody badań

Analizie poddano zaprawy do napojów o smaku malinowym. Oceniono 11 produktów zakupionych w handlu detalicznym na terenie Lublina, pochodzących od 7 producentów. Jednego producenta miały odpowiednio marki A i B; C i D; F i G oraz H i I, pozostałe miały różnych wytwórców (marki E, J i K), w tym cztery produkty były marki własnej (marka B, C, D i I). Ze względu na ochronę interesów producentów nie podano nazw marek, pod którymi były sprzedawane analizowane produkty. Masy netto były w zakresie od 0,42 dm³ do 1 dm³, zaś ceny w przeliczeniu na 1 dm³ produktu wynosiły odpowiednio od 1,29 zł do 10,45 zł (Tab.1). Produkty zawierały w swoim składzie od 0% do 19% soku malinowego (Tab.1). Według informacji na opakowaniach zaprawy powinny być rozcieńczane wodą w stosunku od 1:8 do 1:10 (Tab.1). Zgodnie z oznakowaniem wszystkie syropy były w okresie przydatności do spożycia.

Tab. 1. Podstawowe informacje o zaprawach do napojów, podane na opakowaniach

Symbol produktu	Nazwa produktu	Pojemność opakowania [dm ³]	Cena [zł/dm ³]	Zalecane rozcieńczenie	Zawartość soku malinowego [%]
A	Zaprawa do napojów o smaku malinowym	1	1,29	1:8	0,1
B	Syrop o smaku malinowym	0,5	5,98	1:10	0,5
C	Syrop o smaku malinowym	0,5	6,98	1:9	0,025
D	Syrop o smaku malinowym	1	1,99	1:9	0,25
E	Syrop owocowy o smaku malinowym	0,42	10,45	1:9	Brak informacji
F	Syrop owocowy o smaku malinowym	0,44	10,21	1:9	0,3
G	Syrop malinowy	0,44	7,81	1:9	19
H	Syrop malinowy	0,5	7,84	1:9	19
I	Zaprawa do napojów o smaku malinowym	0,5	3,38	1:9	0,025
J	Syrop do napojów – smak malinowy	0,43	10,12	1:10	0,1
K	Zaprawa do napojów o smaku malinowym	0,5	6,58	1:10	0

Analizę rozpoczęto od sprawdzenia szczelności opakowań. Oceniono też zgodność oznakowania opakowań z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 lipca 2007 r. w sprawie znakowania środków spożywczych oraz z Polską Normą [PN-A 79036:1997]. Badania mikrobiologiczne

objęły następujące oznaczenia: ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych i psychrofilnych oraz liczby komórek drożdży i kolonii pleśni [PN-A 79033:1985]. Sprawdzono także obecność syntetycznych barwników organicznych [PN-A 75101/29:1990].

Na preferencje konsumenckie ma wpływ kilka czynników, takich jak: właściwości produktu, producent, opakowanie czy przyzwyczajenia konsumenta. Przeprowadzono więc ocenę organoleptyczną zapraw oraz napojów przygotowanych z tych syropów według zaleceń producenta. Ocena była wykonana na podstawie karty wzorcowej opracowanej przez autora. Oceniano klarowność, barwę, zapach i smak, przy różnych współczynnikach ważkości, odpowiednio: 0,2; 0,2; 0,2 i 0,4. W badaniu wzięło udział 30 studentów w wieku 20-22 lata.

Poddano także ocenie wygląd zewnętrzny opakowań. Oceniono takie cechy, jak: pierwsze wrażenie wywołane indywidualnością opakowania, barwę, grafikę, informacyjność oraz czytelność [Cichoń i Ucherek, 1997]. Do oceny opakowań zastosowano skalę nieparzystą o współczynnikach od 1 do 3, gdzie współczynnik 1 oznaczał zdecydowanie negatywny stosunek oceniającego; 2 – obojętny; 3 – zdecydowanie pozytywny [Bazarnik i in., 1992]. Badania zostały przeprowadzone w grupie 100 osób (wiek 20-22 lata).

Uzyskane wyniki opracowano metodami statystycznymi, przy użyciu programu Statistica wersja 8.0. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji z testem Tuckey'a przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Badane zaprawy zapakowane były szczelnie w butelki szklane z nakrętką metalową (81,8 % prób) lub butelki PET z nakrętką plastikową - próby A i D (Tab.1). Opakowania 90,9 % badanych produktów zawierały informacje wymagane w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 lipca 2007 r. w sprawie znakowania środków spożywczych na temat nazwy produktu, składu, trwałości, zawartości netto, producenta lub dystrybutora oraz numeru partii produkcyjnej. W jednym z opakowań (próba E) w składzie nie podano ilościowej zawartości malin, chociaż były one użyte w grafice etykiety. Wszystkie napisy były w języku polskim, czytelne i trwałe. Spełniony był także wymóg umieszczenia w jednym polu widzenia informacji na temat nazwy produktu, jego trwałości i zawartości netto. Nazwa produktu była dostosowana do jego składu – zaprawy zawierające znaczne ilości soku malinowego w nazwie miały „syrop malinowy” (próby G i H), pozostałe produkty nazywały się „zaprawa/syrop (...) o smaku malinowym” (Tab. 1). W przypadku produktów zawierających substancje słodzące, w tym aspartam, podano informację: „Zawiera substancje słodzące” i „Zawiera źródło fenyloalaniny” (próby A, B, D i I).

Według Polskiej Normy [PN-A 79036:1997] badane produkty powinny mieć nazwę „zaprawa do napojów”. Wśród badanych prób tylko 27,3 % miało taką

nazwę. Wspomniane normy zalecają także podanie przy nazwie symbolu typu i numeru rodzaju. Analizowane zaprawy należały do typu A (słodzone) i rodzaju nr 1 (z dodatkiem soków surowych i przetworzonych). Jednak na żadnym z opakowań nie była zawarta taka informacja. W przypadku zapraw słodzonych powinno się także podać zawartość ekstraktu i ten warunek został spełniony tylko przez 27,3 % produktów (próby E, J i K). Stosowanie się do wskazań Polskich Norm nie jest obowiązkowe, jednak dzieje się to ze szkodą dla konsumenta, gdyż niejednolite znakowanie utrudnia mu świadomy wybór spośród szerokiej gamy produktów.

Podstawową zasadą dotyczącą oznakowania żywności, wyrażoną w wielu aktach prawa, jest zakaz wprowadzania konsumenta w błąd. Stosowanie sugestywnej szaty graficznej opakowań z wizerunkami składników i wyeksponowanymi napisami wskazującymi rodzaj użytych surowców, których w produkcie nie zastosowano, bądź występują w znikomej ilości, co nie upoważnia do podkreślania ich w oznakowaniu, jest poważnym nadużyciem [Oznakowanie produktów..., 2013]. W grafice opakowań wszystkich analizowanych syropów występowały owoce malin, które mogły sugerować konsumentowi znaczną zawartość tego składnika w produkcie, a tylko składzie w 18,2 % prób stwierdzono więcej niż 1 % soku malinowego (Tab. 1). W przeważającej liczbie syropów (72,7 %) podstawowym składnikiem owocowym był sok aroniowy. W próbach B, C, E i F, poza graficznym przedstawieniem malin, we frontowej części etykiety wyeksponowano jeszcze napis „malina” lub „raspberry sirup (syrop malinowy)”, mogące sugerować znaczną zawartość tego owocu w syropach, choć według informacji o składzie zawierały one od 0,025 % do 0,3 % soku malinowego (Tab. 1). Na jednym z opakowań z tej grupy nie podano informacji o ilościowej zawartości soku malinowego, chociaż wyeksponowano słowo „malina” i grafikę tego owocu, co jest niezgodne z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 lipca 2007 r. w sprawie znakowania środków spożywczych. Poważne nadużycie stwierdzono w przypadku próby K, gdyż w składzie tego produktu jako jedyny składnik owocowy występował sok aroniowy, zaś na etykiecie wykorzystano rysunek malin.

Jakość mikrobiologiczna większości badanych syropów była bardzo dobra. Stwierdzono obecność drożdży w 18,2 % prób (syropy D i H – odpowiednio $1,41 \times 10^2$ i $1,1 \times 10$ jtk/cm³), ale Polskie Normy dopuszczają 200 komórek drożdży w 1 cm³ zaprawy do napojów. W żadnej z prób nie stwierdzono obecności kolonii pleśni oraz komórek bakterii mezofilnych. Bakterie psychrofilne odnotowano w jednej z prób (D) w ilości $3,32 \times 10^3$ jtk/cm³, podczas gdy według Polskich Norm nie powinno być ich więcej, niż 100 komórek w 1 cm³ zaprawy [PN-A 79036:1997].

W zaprawach malinowych nie dopuszcza się obecności syntetycznych barwników organicznych [PN-A 79036:1997]. Taki składnik wykryto w jednej z prób (A), produkt ten można więc uznać za sfałszowany, gdyż w składzie nie wymieniono takich substancji barwiących.

W ocenie organoleptycznej syropów oraz napojów tylko klarowność syropów nie zależała w stopniu istotnym statystycznie od rodzaju produktu ($p>0,05$). W pozostałych przypadkach rodzaj próby miał istotny statystycznie wpływ na różnice w ocenach poszczególnych wyróżników jakości (Tab. 2 i 3). Najwyższe średnie oceny (powyżej 4) uzyskały syropy A, F, I, J oraz K. Najslabiej oceniona została zaprawa B - ocena 3,15 (Tab. 2). Oceny napojów nie były zupełnie skorelowane z ocenami syropów. W tej grupie najwyższe noty (powyżej 4) uzyskały napoje sporządzone z syropów E, G i H. Zdecydowanie najslabiej został oceniony napój K – ocena 2,07 (Tab. 3). Napój ten, pomimo przygotowania zgodnie z zaleceniem na etykiecie, był zbyt mocno rozcieńczony.

Tab. 2. Ocena organoleptyczna zapraw do napojów

Symbol produktu	Wyróżnik jakości				
	Klarowność $X \pm sd$	Barwa $X \pm sd$	Zapach $X \pm sd$	Smak $X \pm sd$	Ocena łączna punktowa $X \pm sd$
A	4,13±0,26 ^a	4,44±0,18 ^{abcd}	3,88±0,27 ^a	4,19±0,23 ^{ab}	4,16±0,17 ^a
B	4,13±0,29 ^a	2,88±0,30 ^{3e}	2,75±0,30 ^{ab}	3,00±0,38 ^{ab}	3,15±0,26 ^b
C	4,13±0,24 ^a	3,44±0,35 ^{de}	3,25±0,28 ^{ab}	2,87±0,34 ^b	3,31±0,24 ^{ab}
D	4,13±0,24 ^a	4,25±0,17 ^{abcd}	2,94±0,34 ^{ab}	3,00±0,29 ^{ab}	3,46±0,12 ^{ab}
E	4,44±0,24 ^a	3,56±0,29 ^{cde}	3,69±0,35 ^{ab}	3,13±0,36 ^{ab}	3,59±0,25 ^{ab}
F	4,19±0,28 ^a	4,88±0,09 ^a	3,00±0,32 ^{ab}	4,06±0,19 ^{ab}	4,04±0,14 ^{ab}
G	4,13±0,32 ^a	4,63±0,18 ^{ab}	2,44±0,30 ^b	3,50±0,32 ^{ab}	3,64±0,21 ^{ab}
H	4,38±0,22 ^a	3,81±0,28 ^{bcd}	3,38±0,35 ^{ab}	3,44±0,27 ^{ab}	3,68±0,15 ^{ab}
I	4,13±0,30 ^a	4,31±0,18 ^{abcd}	3,88±0,27 ^a	3,94±0,38 ^{ab}	4,04±0,24 ^{ab}
J	4,00±0,32 ^a	4,50±0,13 ^{abc}	3,06±0,31 ^{ab}	4,31±0,20 ^a	3,04±0,17 ^{ab}
K	4,50±0,16 ^a	3,63±0,20 ^{bcd}	3,94±0,21 ^a	4,13±0,20 ^{ab}	4,06±0,12 ^a

Objaśnienia:

$X \pm sd$ - średnia $\pm$ błąd standardowy

a, b, c, d, e - grupy jednorodne wyznaczone testem Tuckey'a ($p = 0,05$)

Oceny poszczególnych cech opakowań w istotny sposób zależały od rodzaju zaprawy ($p<0,05$). Najkorzystniejsze pierwsze wrażenie wywarły opakowania syropów E i F. Najslabiej pod tym względem oceniono opakowania zapraw A, D i I, przy czym dwa z tych opakowań były butelkami wykonanymi z PET (Tab. 1, 4). Podobne wyniki osiągnęły opakowania tych syropów w przypadku oceny kompozycji graficznej, zaś najkorzystniej w przypadku tej cechy oceniono opakowanie syropu J (Tab. 4). Pod względem barwy pozytywnie wyróżniały się opakowania prób E i F, zaś zdecydowanie najgorzej zostało ocenione opakowanie zaprawy D, które było najuboższe kolorystycznie (Tab. 4).

Tab. 3. Ocena organoleptyczna napojów

Symbol produktu	Wyróżnik jakości				
	Klarowność X±sd	Barwa X±sd	Zapach X±sd	Smak X±sd	Ocena łączna punktowa X±sd
A	4,57±0,13 ^{ab}	3,96±0,12 ^{bc}	2,87±0,25 ^{bc}	3,26±0,26 ^{ab}	3,58±0,18 ^{bcd}
B	4,17±0,15 ^{ab}	2,65±0,16 ^e	2,43±0,26 ^{cd}	3,48±0,19 ^{ab}	3,24±0,12 ^{cd}
C	4,04±0,16 ^b	3,00±0,17 ^{de}	2,83±0,19 ^{bc}	2,61±0,18 ^b	3,02±0,10 ^d
D	3,87±0,16 ^b	2,43±0,16 ^e	2,78±0,13 ^{bc}	3,22±0,15 ^{ab}	3,10±0,09 ^d
E	4,39±0,14 ^{ab}	3,52±0,17 ^{cd}	2,91±0,24 ^{bc}	3,56±0,22 ^a	3,59±0,15 ^{bcd}
F	4,48±0,18 ^{ab}	4,74±0,09 ^a	3,35±0,24 ^{abc}	3,17±0,26 ^{ab}	3,78±0,17 ^{abc}
G	4,83±0,08 ^a	4,65±0,16 ^a	3,65±0,21 ^{ab}	4,04±0,13 ^a	4,24±0,11 ^a
H	4,48±0,12 ^{ab}	4,26±0,13 ^{ab}	4,00±0,21 ^a	3,91±0,21 ^a	4,11±0,13 ^{ab}
I	3,96±0,15 ^b	2,48±0,15 ^e	2,70±0,16 ^{bcd}	3,26±0,17 ^{ab}	3,13±0,11 ^d
J	4,05±0,18 ^b	3,09±0,13 ^{de}	3,36±0,26 ^{abc}	3,18±0,14 ^{ab}	3,37±0,11 ^{cd}
K	3,96±0,31 ^b	1,52±0,19 ^f	1,74±0,20 ^d	1,57±0,19 ^c	2,07±0,15 ^e

Objaśnienia:

X±sd - średnia ± błąd standardowy

a, b, c, d, e - grupy jednorodnie wyznaczone testem Tuckey'a (p = 0,05)

Tab. 4. Ocena wyglądu zewnętrznego opakowania

Symbol produktu	Oceniana cecha					
	Pierwsze wrażenie X±sd	Barwa X±sd	Grafika X±sd	Informacyjność X±sd	Czytelność X±sd	Ocena ogólna X±sd
A	1,30±0,13 ^{fg}	1,70±0,15 ^d	1,40±0,13 ^c	1,55±0,14 ^d	1,35±0,11 ^d	1,46±0,08 ^d
B	2,20±0,16 ^{cd}	2,15±0,20 ^{bcd}	2,20±0,14 ^{ab}	2,00±0,19 ^{abcd}	1,55±0,15 ^{cd}	2,02±0,10 ^b
C	1,90±0,12 ^{de}	2,05±0,14 ^{bcd}	1,70±0,15 ^{cb}	1,95±0,17 ^{bcd}	2,05±0,17 ^{abc}	1,93±0,10 ^b
D	1,15±0,08 ^{fg}	1,05±0,05 ^e	1,20±0,09 ^c	1,65±0,17 ^{cd}	1,75±0,20 ^{bcd}	1,36±0,09 ^d
E	2,85±0,08 ^{ab}	2,80±0,09 ^a	2,60±0,11 ^a	2,30±0,15 ^{abc}	2,25±0,18 ^{ab}	2,56±0,08 ^a
F	2,95±0,05 ^a	2,75±0,10 ^a	2,65±0,15 ^a	2,65±0,11 ^a	2,35±0,11 ^{ab}	2,67±0,07 ^a
G	2,35±0,13 ^{cd}	2,60±0,11 ^{ab}	2,15±0,13 ^{ab}	2,45±0,14 ^{ab}	1,95±0,15 ^{abcd}	2,30±0,08 ^{ab}
H	2,55±0,11 ^{abc}	2,50±0,14 ^{abc}	2,40±0,15 ^a	2,60±0,13 ^{ab}	2,40±0,17 ^{ab}	2,49±0,10 ^a
I	1,10±0,07 ^g	1,80±0,12 ^d	1,20±0,09 ^c	1,95±0,18 ^{bcd}	1,85±0,20 ^{abcd}	1,58±0,10 ^{cd}
J	2,55±0,14 ^{abc}	2,40±0,13 ^{abc}	2,65±0,11 ^a	2,45±0,11 ^{ab}	2,45±0,11 ^a	2,50±0,07 ^a
K	1,65±0,17 ^{ef}	2,00±0,13 ^{cd}	1,65±0,15 ^{bc}	2,55±0,11 ^{ab}	2,50±0,14 ^a	2,07±0,10 ^b

Objaśnienia:

X±sd - średnia ± błąd standardowy

a, b, c, d, e, f, g - grupy jednorodnie wyznaczone testem Tuckey'a (p = 0,05)

Syrop F należał do jednych z najdroższych w badanej grupie produktów. Ocena organoleptyczna tego soku była bardzo wysoka. Jego opakowanie uzyskało bardzo wysokie notowania dla wszystkich ocenianych cech. Napój przygotowany z tego syropu oceniony został trochę słabiej, ale i tak w ocenie ogólnej uzyskał trzecie miejsce (Tab. 2-4). Najtańszym syropem był produkt A, który uzyskała najlepszą ocenę ogólną. Napój z tego syropu oceniono jako dość dobry. Jednak jego opakowanie było bardzo negatywnie ocenione i nie uzyskało aprobaty badanych osób (Tab. 2-4).

Wnioski

1. Etykiety większości opakowań zawierały wszystkie wymagane prawem elementy oznakowania. Stwierdzone uchybienia to brak podania ilości soku malinowego w składzie, przy zastosowaniu maliny w grafice. Poważniejszym naruszeniem było użycie maliny w grafice (rysunek i wyeksponowany napis) w przypadku produktu, który w swoim składzie w ogóle nie zawierał tego owocu.
2. Producenci nie stosują się do Polskich Norm w kwestii nazewnictwa produktu (72,7 %) oraz oznakowania etykiet produktu (100 % w przypadku klasyfikacji, 72,7 % odnośnie obowiązku podawania zawartości ekstraktu).
3. Stosowanie wyrazistej grafiki z użyciem owoców malin może wprowadzać konsumenta w błąd, sugerując, że składnik ten występuje w dużej ilości w produkcie, podczas gdy w 81,8 % analizowanych produktów zawartość soku malinowego nie przekraczała 0,5 %.
4. Wszystkie badane produkty spełniały wymagania Polskiej Normy odnośnie obecności komórek bakterii mezofilnych, komórek drożdży i kolonii pleśni. W jednej z prób stwierdzono przekroczoną liczbę bakterii psychrofilnych.
5. Wśród badanych prób w jednej (9,09 % wszystkich prób) stwierdzono obecność niedozwolonych syntetycznych barwników organicznych, a informacja o ich obecności nie została ujawniona na etykiecie.
6. Ocena organoleptyczna syropów nie zawsze była skorelowana z oceną napojów z nich przygotowanych.
7. Zarówno syropy najtańszy jak i jeden z najdroższych uzyskały bardzo wysokie oceny ogólne w analizie organoleptycznej, więc cena nie zawsze świadczy o jakości produktu.
8. Opakowania produktów najtańszych – butelki wykonane z PET – nie zyskały aprobaty osób oceniających.

Literatura

- [1] Bazarnik I., Grabiński T., Kąciak E., Mynarski S., Sagan A.: Badania marketingowe. Canadian Consortium of Management Schools, AE, Warszawa-Kraków 1992.
- [2] Drużyńska B., Plewka K.: Ocena towaroznawcza syropów malinowych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2012, 3, 634-638.
- [3] Jak kupować produkty żywnościowe - poradnik. Urząd Ochrony Konkurencji i Konsumentów, Warszawa 2013; on line: http://www.ih.katowice.pl/pliki/poradnik_20130326_jak_kupowac_produkty.pdf?PHPSESSID=85b67fd6382ad22e7905d4991af08a6e; dostęp w dniu 20.03.2015.
- [4] Oznakowanie produktów żywnościowych w świetle kontroli przeprowadzonych przez Inspekcję Handlową. Urząd Ochrony Konkurencji i Konsumentów, Warszawa 2013; on line: <http://www.uokik.gov.pl/download.php?plik=13080>; dostęp w dniu 20.03.2015.

- [5] PN-A 75101/29:1990. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody oznaczeń fizykochemicznych. Wykrywanie sztucznego zabarwienia.
- [6] PN-A 79033:1985. Napoje bezalkoholowe. Pobieranie próbek i metody badań.
- [7] PN-A 79036:1997. Zaprawy do napojów.
- [8] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 lipca 2007 r. w sprawie znakowania środków spożywczych (Dz.U. Nr 137, poz. 966, z późn. zm.).

BEZPIECZEŃSTWO ZDROWOTNE PRODUKTÓW WĘDZONYCH

JOANNA STADNIK, MAŁGORZATA KARWOWSKA, DARIUSZ M. STASIAK

Streszczenie

Wędzenie należy do najstarszych metod utrwalania żywności, a obecnie jest szczególnie cenione z uwagi na nadawanie jej swoistych cech organoleptycznych. W trakcie tego procesu do produktu wprowadzanych jest wiele substancji o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, przeciwutleniających, kształtujących smak oraz barwę stanowiących składniki dymu. Szczególne znaczenie odgrywają tu fenole, które oprócz działania przeciwdrobnoustrojowego wykazują wyraźne właściwości przeciwutleniające. W dymie wędzarniczym oprócz związków odpowiedzialnych za utrwalanie oraz kształtowanie cech organoleptycznych wędzonych produktów, zawarte są również substancje niepożądane z punktu widzenia bezpieczeństwa zdrowotnego tej grupy wyrobów. Należą do nich m.in. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA; ang. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, *PAHs*). Wyniki badań Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem potwierdzają właściwości kancerogenne, teratogenne oraz mutagenne wielu przebadanych WWA. Wiele związków należących do tej grupy wykazuje również właściwości geno- i embriotoksyczne. Dzięki lepszej kontroli parametrów procesu, osiągnięcie wymaganego prawem bezpieczeństwa zdrowotnego wyrobów wędzonych przestaje być problemem. Wysiłki biur konstrukcyjnych działających na rzecz producentów aparatury technologicznej przynoszą wymierne efekty w postaci obniżenia zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w gotowych wyrobach do poziomu poniżej określonego w rozporządzeniu Komisji (UE) nr 835/2011.

Słowa kluczowe: wędzenie tradycyjne, WWA, aparatura wędzarnicza

Wprowadzenie

Tradycyjne wędzenie, w szczególności mięsa i ryb, należy do najstarszych metod utrwalania żywności oraz nadawania jej charakterystycznego smaku, zapachu i barwy [Lingbeck i in., 2014]. Obecnie, do najbardziej cenionych przez konsumenta celów wędzenia, zalicza się nadanie żywności charakterystycznych cech organoleptycznych dzięki wysyceniu składnikami dymu wędzarniczego otrzymanego w wyniku kontrolowanego spalania materiału drzewnego przy ograniczonym dostępie tlenu atmosferycznego. Istotnym efektem wędzenia jest również przedłużenie trwałości żywności poprzez przerwanie funkcji życiowych drobnoustrojów wskutek bakteriobójczego i bakteriostatycznego oddziaływania

składników dymu. Obsuszanie powierzchni produktu towarzyszące procesowi wędzenia, a tym samym zmniejszenie aktywności wody zwiększa trwałość produktu, gdyż uniemożliwia rozwój bakterii i unieczynnia enzymy. Niektóre składniki dymu wędzarniczego wpływają również na spowolnienie procesów utleniania zachodzących podczas przechowywania [Tkacz i Więk, 2012].

W celu otrzymania dymu wędzarniczego o optymalnym składzie, proces spalania drewna musi zachodzić w ściśle określonych i kontrolowanych warunkach termicznych oraz przy ograniczonym dostępie powietrza. Efektem nieprawidłowo prowadzonego procesu tradycyjnego wędzenia jest zanieczyszczanie żywności związkami szkodliwymi dla zdrowia człowieka, do których należą wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA, PAH ang. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) [Kilianek i Niewiadowska, 2014]. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) powstają w wyniku niepełnego spalania lub pirolizy materii organicznej i stanowią stałe zanieczyszczenie środowiskowe [Szymański i Borys, 2012]. Tworzą się one również w procesie wytwarzania dymu wędzarniczego przede wszystkim wówczas, gdy temperatura żarzenia drewna przekracza 400°C i degradacji ulega lignina [Kolakowski, 2012].

Kontrolując proces wędzenia oraz ulepszając technologię spalania drewna i konstrukcję maszyn można zdecydowanie obniżyć zawartość policyklicznych węglowodorów aromatycznych.

Funkcje technologiczne procesu wędzenia

Dominującym czynnikiem odpowiedzialnym za cechy organoleptyczne oraz trwałość wędzonej żywności jest jakość dymu zależna m.in. od rodzaju i wilgotności drewna, temperatury spalania oraz ilości dostarczonego powietrza [Kolakowski, 2012]. Główne grupy związków chemicznych powstających z poszczególnych składników drewna przedstawione zostały w tabeli 1. Proces pirolizy hemiceluloz i celulozy zachodzi w temperaturze 180-350°C i skutkuje powstawaniem związków karbonylowych oraz kwasów karboksylowych. Rozkład lignin w kolejnej fazie pirolizy generuje związki z grupą fenolową i przebiega w 300-500°C [Simon, 2005]. Różne rodzaje drewna, z uwagi na zróżnicowaną zawartość celulozy, hemiceluloz i ligniny generują różne ilości związków chemicznych, a wytworzony z nich dym charakteryzuje się odmiennymi właściwościami [Lingbeck i in., 2014].

Produkty rozkładu ligniny są najbardziej odpowiedzialne za smak i zapach oraz przeciwutleniające oddziaływanie dymu wędzarniczego [Tkacz i Więk, 2012]. Najsilniejszymi przeciwutleniaczami z grupy fenoli są 3-metylopirokatechina, 4 - metylopirokatechina, pirogallol, hydrochinon i jego homologi, gwajakol oraz fenole jednowodorotlenowe. Właściwości przeciwutleniające posiadają także kwas mrówkowy, benzoesowy, salicylowy, wanilina i aldehydy syringowy.

Tab. 1. Końcowe produkty pirolizy poszczególnych składników drewna [Kołakowski, 2012]

Związki chemiczne obecne w dymie wędzarniczym			
Produkty pirolizy hemiceluloz (pentozańskie):	Produkty pirolizy hemiceluloz (heksosańskie):	Produkty rozkładu celulozy:	Produkty rozkładu ligniny:
<i>furan i jego pochodne, alifatyczne kwasy karboksylowe, związki huminowe</i>	<i>kwasy octowe, mrówkowe, lewulinowe, winowe i inne kwasy organiczne, aldehydy (hydrooctowe)</i>	<i>kwasy octowe, mrówkowe, lewulinowe, winowe i inne kwasy organiczne, aldehydy (hydrooctowe)</i>	<i>fenole, etery fenolowe, ich homologi i pochodne (wanilina, gwajakol, syryngol, kwas wanilinowy i inne)</i>

Związki karbonylowe zawarte w dymie hamują rozwój drobnoustrojów poprzez penetrację ścian komórkowej oraz inaktywację enzymów obecnych w cytoplazmie i błonie cytoplazmatycznej. Zaobserwowano skuteczność składników dymu wędzarniczego w hamowaniu rozwoju *m.in. Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* i *enteritidis*. Związki karbonylowe zawarte w dymie uczestniczą również w procesie tworzenia charakterystycznej barwy wędzonej żywności. Żółcistożółta, żółcistobrązowa barwa wędzonych produktów jest skutkiem interakcji karbonylo-aminowej warunkującej reakcję brunatnienia (reakcja Maillarda) pomiędzy wysokocząsteczkowymi fenolami i białkami żywności [Kołakowski, 2012; Lingbeck i in., 2014].

Bezpieczeństwo zdrowotnego żywności wędzonej w aspekcie występowania WWA

Obecne wymagania UE dotyczące najwyższych dopuszczalnych poziomów WWA w mięsie wędzonym i produktach mięsnych wędzonych, ujęte w rozporządzeniu Komisji (UE) nr 835/2011, obowiązujące od 1 września 2014 roku, wprowadziły dwie zmiany istotne z punktu widzenia przemysłu mięsnego. Najwyższy dopuszczalny poziom zawartości benzo(a)pirenu w produktach mięsnych wędzonych obecnie wynosi 2,0 µg/kg, a sumy czterech WWA (benzo(a)piranu, benz(a)antracenu, benzo(b)fluorantenu i chryzenu) - 12,0 µg/kg.

Dane na temat poziomu skażenia żywności wędzonej WWA dostępne w literaturze znacznie się różnią. Badania przeprowadzone przez Ciemniaka i Protasowickiego [2002], dotyczące zawartości benzo(a)pirenu w różnych grupach wędlin krajowych wskazują, że głównie kabanosy i kiełbasa myśliwska charakteryzują się stosunkowo wysoką zawartością tego związku.

Wyniki urzędowej kontroli żywności prowadzonej w Polsce w latach 2010 - 2012 wskazały na konieczność wdrożenia programu mającego na celu

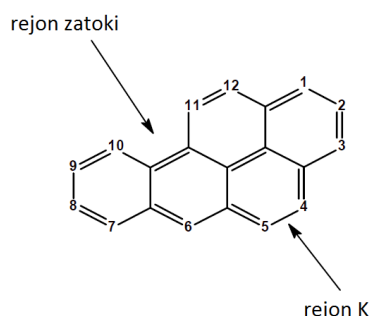
zbadanie aktualnych poziomów WWA w wędzonym mięsie i produktach mięsnych oraz w rybach i produktach rybołówstwa. W 2014 roku, z inicjatywy Głównego Lekarza Weterynarii, zorganizowano pilotażowy programu monitoringu WWA w produktach pochodzenia zwierzęcego wędzonych tradycyjnie, którego celem było zebranie danych umożliwiających ocenę występowania WWA w wędzonych tradycyjnie mięsie i produktach mięsnych oraz rybach. Wyniki badań przeprowadzonych na 200 próbkach produktów wędzonych (170 próbek mięsa i wyrobów mięsnych i 30 próbek ryb wędzonych tradycyjnie) pobranych z terenu całego kraju pozwoliły na sformułowanie wniosków wskazujących krytyczne elementy wpływające na podwyższanie zawartości WWA w żywności wędzonej tradycyjnie. Za dominujące czynniki odpowiedzialne za bezpieczeństwo produktów wędzonych w aspekcie zawartości WWA uznano: rodzaj żywności (np. kiełbasy), metody wędzenia (zastosowanie dymogeneratora z paleniskiem tradycyjnym), rodzaj drewna (buczyna i mieszane) i temperaturę [Kiljanek i Niewiadowska, 2014].

Aspekty zdrowotne procesu wędzenia

WWA stanowią bardzo liczną grupę związków organicznych charakteryzujących się obecnością dwóch lub więcej skondensowanych pierścieni aromatycznych w ułożeniu liniowym, kątowym lub klaserowym. W zależności od formy strukturalnej, WWA wykazują zróżnicowane właściwości toksyczne i fizyko-chemiczne [Moździerz i in., 2010]. W niektórych cząstkach WWA występują charakterystyczne obszary, którym przypisywana jest aktywność biologiczna. Należy do nich rejon zatoki (ang. *bay region*) - obszar o zwiększonej gęstości elektronowej, co skutkuje zwiększoną reaktywnością chemiczną i biologiczną WWA umożliwiając tworzenie np. adduktów z DNA. Również rejon K (ang. *K-region*) zwiększa ich cytotoksyczność i aktywność mutagenną [Guillen, 1997].

Najlepiej przebadanym związkiem z grupy WWA jest benzo(a)piren, który ze względu na siłę oddziaływania rakotwórczego oraz powszechność występowania w środowisku był uznawany za wskaźnik całej grupy WWA [EC, 2002]. W roku 2008 Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności wydał opinię, że sam benzo(a)piren nie jest wystarczającym wskaźnikiem obecności WWA w żywności a najbardziej odpowiednia do tego celu będzie suma 4 WWA tj. benzo(a)pirenu, chryzenu, benzo(a)antracenu i benzo(b)fluorantenu [EFSA, 2008].

Spośród wielu dróg narażenia człowieka na obecność WWA najistotniejszymi są: palenie tytoniu oraz żywność. Skażenie żywności może być spowodowane zanieczyszczeniem środowiska i migracją WWA z powietrza, gleby i wody oraz następować w wyniku przemysłowych i domowych metod przygotowywania żywności związanych z obróbką termiczną tj. wędzeniem, grillowaniem, smażeniem i suszeniem [Kiljanek i Niewiadowska, 2014].



Rys. 1. Wzór strukturalny benzo(a)pirenu z zaznaczonymi rejonami o aktywności biologicznej

Wyniki badań Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem potwierdzają właściwości kancerogenne, teratogenne oraz mutagenne wielu przebadanych WWA (Tabela 2). Wiele związków należących do tej grupy wykazuje również właściwości geno- i embriotoksyczne [IARC, 1983].

Tab. 2. Klasyfikacja WWA ze względu na prawdopodobieństwo działania rakotwórczego [IARC, 1983]

Prawdopodobnie kancerogeny	Możliwie kancerogeny
Benzo[a]antracen	Benzo[b]fluoranten
Benzo[a]piren	Benzo[j]fluoranten
Dibenzo[a,h]antracen	Benzo[k]fluoranten
	Dibenzo[a,e]piren
	Dibenzo[a,h]piren
	Dibenzo[a,i]piren
	Dibenzo[a,l]piren
	Indeno[1,2,3-cd]piren
	5-metylochryzen
	Dibenzo[a,h]antracen
	Dibenzo[a,j]antracen

WWA należą do grupy kancerogenów pośrednich (prekancerogenów), które aby wywołać skutek muszą ulec metabolizmowi do formy aktywnej o właściwościach elektrofilnych, mającej zdolność do tworzenia wiązań kowalencyjnych z DNA. WWA po проникnięciu do organizmu kumulują się głównie w tkance tłuszczowej, a w mniejszym stopniu w wątrobie i nerkach, nadnerczach, jajnikach i śledzionie. W wątrobie WWA ulegają przemianom metabolicznym w dwóch fazach. Reakcje zachodzące w fazie pierwszej prowadzą do powstania związków biologicznie bardziej aktywnych niż wyjściowa substancja. W tej fazie zachodzi m.in. utlenianie przy udziale monooksygenaz cytochromu P-450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) i hydroksylacja z udziałem hydrolazy

epoksydowej. Powstałe epoksydiolate są hydrofilowe i łatwiej rozpuszczalne w wodzie. Biorą one udział w reakcjach fazy drugiej, tj. sprzęganiu ze związkami endogennymi (kwasem siarkowym, glukuronowym lub glutationem). Następnie w postaci rozpuszczalnych w wodzie związków wydalone są z organizmu głównie z moczem [Zasadowski i Wysocki, 2002; Gawlik i Brandys, 2008].

Tab. 3. Względna siła działania rakotwórczego i mutagennego wybranych WWA [IARC, 1983]

Nazwa związku	Aktywność kancerogenna	Aktywność mutagenna
Dibenzo[a,h]antracen	1,110	0,47
Benzo[a]piren	1,000	1,00
Indeno[1,2,3-cd]piren	0,232	0,14
Benzo[a]antracen	0,145	0,62
Benzo[a]fluoranten	0,141	0,20
Benzo[k]fluoranten	0,066	-
Benzo[j]fluoranten	0,061	-
Piren	0,081	0,20
Benzo[ghi]perylene	0,022	0,08
Benzo[e]piren	0,004	0,42
Chryzen	0,004	0,37

Proces mikrosomalnej oksydacji WWA zwiększa ich hydrofilność i reaktywność. Powstałe aktywne metabolity mogą łączyć się z makrocząsteczkami komórkowymi (DNA, białka, lipidy) lub generować reaktywne formy tlenu (ROS z *ang. reactive oxygen species*). Wiązanie się pośrednich metabolitów WWA z kwasem deoksyrybonukleinowym i powstawanie adduktów DNA-WWA może mieć charakter uszkodzeń promutagennych, które w wyniku nieprawidłowego przebiegu procesów naprawczych lub błędnej replikacji ulegają utrwaleniu w postaci mutacji i mogą stać się przyczyną inicjacji i progresji procesu nowotworowego [Moździerz i in. 2010]. Względna siła działania mutagennego poszczególnych WWA jest zróżnicowana (Tabela 3).

Za procesy mutagenezy i indukowanie procesu nowotworzenia odpowiedzialne są również produkty peroksydacji lipidów. Przemianom metabolicznym WWA może towarzyszyć powstawanie ROS, np. anionu nadtlennokowego i nadtlennoków wodoru, prowadzące do wytworzenia wysoce toksycznych rodników hydroksylowych. Produkty utleniania WWA indukujące peroksydację lipidów mogą działać cytotoksycznie [Zasadowski i Wysocki, 2002].

Aparatura wędzarnicza

Postęp w dziedzinie aparatury wędzarniczej jest ściśle powiązany z rozwojem przemysłu mięsnego. Jakkolwiek metoda wędzenia jest niezmienna od zarania

dziejów, to aparatura wędzarnicza systematycznie ewoluowała w kierunku zapewnienia kontroli parametrów procesu i powtarzalności cech wyrobów, wzrostu wydajności. Ostatnimi czasy działania technologów koncentrują się na zapewnieniu wymaganego prawnie poziomu bezpieczeństwa zdrowotnego wyrobów wędzonych. Wysiłki biur konstrukcyjnych działających na rzecz producentów aparatury technologicznej przynoszą wymierne efekty w postaci obniżenia zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w gotowych wyrobach do poziomu poniżej określonego w rozporządzeniu Komisji (UE) nr 835/2011 [Kiljanek i Niewiadowska, 2014]. Budowa aparatury wędzarniczej jest ściśle powiązana z metodą wędzenia (np. zimne, gorące), rodzajem wyrobów (np. mięsa, ryby) i jej pożądaną wydajnością.

Wędzarnie o tradycyjnym charakterze, w których najczęściej przygotowuje się wyroby na własny użytek wykonywane są sposobem gospodarskim przez połączenie ogólnie dostępnych materiałów takich jak: drewno, cegły, blacha. Przyjmują postać szafy (komory) z drzwiczkami do załadunku i poprzeczkami do zawieszenia wyrobu, od dołu połączonej z paleniskiem, a od góry – z kominem. Lepsze możliwości sterowania dopływem dymu i ciepła, a zatem lepsze warunki wędzenia zapewniają wędzarnie, w których dym dopływa kanałem dymowym z paleniska znajdującego się obok komory. Takie rozwiązanie chroni wyrób przed zabrudzeniem sadzą i zapewnia równomierne wędzenie [Kołąkowski, 2012]. Wędzarnie o charakterze tradycyjnym bywają wyposażone w termometr, lecz sterowanie procesem i jego efekty zależą niemal wyłącznie od wiedzy i doświadczenia wędzacza. Nieco lepsze warunki kontroli procesu zapewniają aparaty do wędzenia gorącego z podgrzewaniem elektrycznym. Niektórzy producenci maszyn oferują komory tradycyjnego wędzenia, w których wytwarzanie dymu i ciepła odbywa się w sposób tradycyjny (palenisko), ale wyposażone w systemy sterowania mikroprocesorowego z pełną kontrolą procesu i rejestracją parametrów [www.pekmont.pl].

W zakładach mięsnych do wytwarzania dymu wędzarniczego wykorzystuje się wytwornice: żarowe, cierne, parowe i fluidyzacyjne. W metodzie żarowej drewniane wióry (zrębki) zżarzają się na ruszcie przy naturalnym lub wymuszonym kontrolowanym dopływie powietrza. Wióry z zasobnika podawane są do paleniska, a ich żarzenie inicjuje zwykle grzałka elektryczna [www.pekmont.pl]. Wytwornice żarowe mogą być zintegrowane (np. zamontowane na ścianie komory) z komorą wędzarniczą. Wentylator pobiera dym z wytwornicy, przetłacza przez filtr (oczyszczacz dymu) i podaje do komory wędzarniczej. Oczyszczanie najczęściej odbywa się przez zraszanie dymu kurtyną wodną [www.bastra.de; www.nowicki.pl]. Temperatura strefy żaru i składu dymu zależy ściśle od ilości dopływającego powietrza. Dlatego wysiłki konstruktorów wytwornic żarowych koncentrują się na zapewnieniu skutecznego kontrolowania strumienia powietrza i wiórów dopływających do komory spalania. Nowoczesne wytwornice wyposażone są w automatyczny system regulacji ilości powietrza

do spalania i system gaszenia w przypadku niekontrolowanego wzrostu temperatury. Mają także zintegrowany system mycia [www.mauting.com; www.fessmann.com; www.bastra.de].

Dym wędzarniczy wytwarzany przy użyciu przegrzanej pary wodnej o temperaturze ok. 400°C zalecany jest przy produkcji wyrobów parzonych lub pieczonych. Wytwornice parowe oferują możliwość regulacji automatycznej procesu, a zatem i parametrów dymu, krótki czas wędzenia i intensywny zapach dymu. Znajdują się w ofercie handlowej większości producentów maszyn [www.fessmann.com; www.nowicki.pl; www.mauting.com; www.rexpol.pl; www.sorgo.ar].

Piroliza drewna w ciernych wytwornicach dymu przebiega w nieco niższej (ok. 390°C) temperaturze niż w urządzeniach żarowych, jednak wystarczającej do pełnego rozkładu hemiceluloz i celulozy. Intensywność dymienia i temperaturę pirolizy reguluje się wielkością siły docisku klocka i prędkością ruchu powierzchni trącej sterowaną przez system mikroprocesorowy [www.bastra.de; www.mauting.com]. W efekcie tego otrzymuje się duże ilości gęstego, zimnego dymu wolnego od WWA. Dzięki staraniom konstruktorów nowoczesne wytwornice cierne automatycznie ładują klocek z zasobnika, mają trwałe elementy trące, pracują cicho i nie powodują drgań, a także spełniają wymagania środowiskowe [www.fessmann.com; www.sorgo.at].

Bardzo dobre warunki kontroli wytwarzania dymu wędzarniczego zapewniają wytwornice fluidalne. Częstki drewna w stanie fluidalnym wywołanym przez strumień gorących gazów ulegają termicznemu rozkładowi. Dzięki mieszaniu cząstek złoża piroliza przebiega w kontrolowanej temperaturze przepływającego gazu. Na skutek zmiany gęstości zwęglone cząstki wywiewane są z komory fluidyzacyjnej i oddzielane od dymu w separatorze cyklonowym. Jeśli szybkość przepływu gazów przez złoża będzie utrzymywana na stałym poziomie, wówczas wydajność lotnych produktów rozkładu drewna także nie będzie zmieniać się. W takich warunkach uzyskiwany jest dym o jakości pożądanej ze względu na technologię i bezpieczeństwo zdrowotne żywności [Kołakowski, 2012].

Dzięki systemowi zamkniętego obiegu dymu w instalacji wędzarniczej możliwe jest radykalne ograniczenie emisji gazów do atmosfery [ness-smoke.de]. Najczęściej jednak zużyty dym z komory wędzarniczej zanim trafi do atmosfery poddawany jest zabiegom mającym na celu obniżenie emisji substancji szkodliwych. Dopalenie zachodzi na platynowych elementach ogrzewanych elektrycznie [www.nowicki.pl] lub w dopalaczach termicznych zasilanych np. gazem lub olejem opałowym [www.rexpol.pl]. Ciepło z dopalaczy może zostać odzyskane w systemie rekuperacji np. do podgrzewania wody [www.mauting.com].

Proces wędzenia w tradycyjnych szafach wędzarniczych, w których ruch dymu odbywa się na zasadzie konwekcji naturalnej cechuje: niewielka szybkość przepływu dymu, nierównomierna gęstość dymu, nierównomierny rozkład

temperatury i wilgotności, niewielkie możliwości sterowania, niska efektywność wykorzystania składników dymu i ciepła, okresowy charakter pracy. Dlatego te najprostsze urządzenia są wykorzystywane głównie przy produkcji o charakterze tradycyjnym i/lub na niewielką skalę.

Dzięki recyrkulacji wymuszanej wentylatorami, w nowoczesnych komorach wędzarniczych uzyskuje się turbulentny przepływ dymu sprzyjający procesom przenoszenia ciepła i masy. Cyrkulację gazów wspomagają rozwiązania w zakresie usytuowania systemu dysz i większej prędkości przepływu dymu. Dzięki nagrzewnicy i systemowi iniekcji pary wodnej zapewniona jest kontrola temperatury i wilgotności względnej gazów w komorze w zakresie wymaganym technologią. Nowoczesne komory wędzarnicze mają wykonanie w całości kwasoodporne i budowę modułową w układzie jedno lub wielorzędowym. Każdy moduł może mieć indywidualny system cyrkulacji powietrza, ogrzewania i nawilżania. Prędkość przepływu powietrza może być regulowana bezstopniowo [www.fessmann.com; www.sorgo.at]. W wykonaniu specjalnym cyrkulacja gazów może odbywać się horyzontalnie, co usprawnia wędzenie wyrobów ułożonych na sitach lub tacach [www.dakstar.com.pl; www.rexpol.com.pl]. Sterowanie urządzeniami wykonawczymi dymogeneratora i komory odbywa się zwykle elektrycznie i/lub pneumatycznie [www.pekmont.pl]. Niezależnie od wielkości wędzarnie są standardowo wyposażane w instalację CIP mycia powierzchni wewnętrznych [www.fessmann.com; www.stawiany.pl]. Mikroprocesorowe układy sterowania umożliwiają panowanie nad wszystkimi parametrami wędzenia, programowanie wieloetapowych cykli roboczych, rejestrację parametrów i sporządzanie raportów. Charakter pracy komór jest okresowy. Umożliwiają osadzanie, suszenie, wędzenie, wędzenie dymem z parą, parzenie, gotowanie, chłodzenie, suszenie, dojrzewanie i in. W wykonaniu specjalnym umożliwiają pieczenie (do 180°C), a wyposażone w system chłodzenia pozwalają prowadzić procesy wędzenia zimnego [www.metalbud.com; www.rexpol.pl; zfm-online.com]. W przypadku konfiguracji przelotowej (tunelowej) lub zespolonej, niezależnego sterowania modułami i zamontowania systemu przesuwania wózków wewnątrz tunelu praca wędzarni może nabrać charakteru ciągłego, bezobsługowego [www.sorgo.at]. Przemieszczanie wyrobu podczas wędzenia może odbywać się w sposób ciągły także na przenośniku taśmowym [jugema.com.pl]. Instalacje wędzarnicze o pracy ciągłej w pełni automatycznie realizujące wszystkie etapy wędzenia i studzenia cechuje zwykle bardzo duża wydajność [www.fessmann.com], a przeciwwagą dla niewątpliwych zalet takich linii są wysokie koszty inwestycyjne. Znane są rozwiązania techniczne wędzarni, w których w celu przyśpieszenia osiadania cząstek dymu na powierzchni wyrobu stosuje się jonizację dymu, jednak metoda wędzenia elektrostatycznego jest stosowana sporadycznie.

Cechy organoleptyczne wyrobu podobne do wędzonego można uzyskać z pomocą płynnego preparatu dymu wędzarniczego. Najczęściej jest on dodawany

do farszu lub nanoszony immersyjnie na powierzchnię wyrobu. Nowoczesne instalacje wędzarnicze można stosunkowo łatwo przestawić na prowadzenie wędzenia z zastosowaniem płynnego dymu [www.bastra.de; www.mauting.com]. Wówczas w miejsce lub obok dymogeneratora montowany jest atomizer płynnego dymu [www.dakstar.com.pl]. Instalacje takie nie wytwarzają zanieczyszczeń typowych dla wędzenia [www.fessmann.com].

Producenci aparatury technologicznej dla przemysłu spożywczego w swej ofercie także mają wędzarnie o pojemności kilkudziesięciu kilogramów przeznaczone np. dla zakładów gastronomicznych lub prowadzących działalność o charakterze MLO. Wędzarnie takie często realizują wszystkie funkcje właściwe dla urządzeń przemysłowych [www.fessmann.com; jugema.com.pl; www.stawiany.pl; www.mauting.com].

Podsumowanie

W rozwoju technologii wędzenia bardzo ważna stała się troska o jakość zdrowotną produktów wędzonych, szczególnie pod względem obniżenia zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). Dlatego obecnie dużo uwagi poświęca się doborowi i przygotowaniu materiału drzewnego do wędzenia oraz aparaturze wędzarniczej. Kontrolując proces wędzenia oraz ulepszając technologię spalania drewna i konstrukcję aparatury można zdecydowanie obniżyć zawartość policyklicznych węglowodorów aromatycznych.

Literatura

- [1] Aaslyng, M.D., Duedahl-Olesen, L., Jensen, K., & Meinert, L.: Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork, beef and chicken barbecued at home by Danish consumers. *Meat Science*, 2013, 93(1), 85-91.
- [2] Behnlian D., Butz P., Greiner R., Lautenschlaeger R.: Process-induced undesirable compounds: Chances of non-thermal approaches. *Meat Science*, 2014, 98, 392-403.
- [3] Ciemniak A., Protasowicki M.: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) w mięsnych i drobiowych artykułach spożywczych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2002, 35(2), 121-125.
- [4] EC (European Commission): Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. 2002. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf.
- [5] EFSA (European Food Safety Authority): Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 2008, 724, 1-114. www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/724.pdf.

- [6] Gawlik M., Brandys J.: Benzo(a) piren a procesy jednoelektronowego utleniania w organizmie. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2008, 41(4), 1016-1022.
- [7] Guillen M.D., Sopelana P., Partearroyo M.A.: Food as a source of polycyclic aromatic carcinogens. *Reviews on Environmental Health*, 1997, 12, 133-146.
- [8] IARC (International Agency for Research on Cancer): Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Polynuclear aromatic compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data, 1983. Lyon, France, 32.
- [9] jugema.com.pl/komory.
- [10] Kijanek T., Niewiadowska A.: Ocena ryzyka występowania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w żywności pochodzenia zwierzęcego poddanej procesowi wędzenia. Materiały szkoleniowe w ramach projektu "Wpływ procesu wędzenia na bezpieczeństwo żywności" opracowanego przez MRiRW 2014.
- [11] Kołakowski E. (red.): *Technologia wędzenia żywności*. PWRiL, Warszawa 2012.
- [12] Lingbeck J.M., Cordero P., O'Bryan C.A., Johnson M.G., Ricke S.C., Crandall PG.: Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Science*, 2014, 97, 197-206.
- [13] Moździerz A., Juszko-Piekut M., Stojko J.: Zanieczyszczenie powietrza atmosferycznego wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi a stan zdrowia populacji. *Annales Academiae Silesiensis*, 2010, 64, 1-2, 60-65.
- [14] ness-smoke.de/.
- [15] Simko P.: Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, 49, 637-647.
- [16] Szymański P., Borys A.: Skażenie WWA mięsa i wędlin, nowe regulacje prawne. *Przemysł Spożywczy*, 2012, 66, 32-35.
- [17] Tkacz K., Więk A.: Proces wędzenia. *Gospodarka Mięsna*, 2012, 10, 14-17.
- [18] www.bastra.de/en/products/index.html.
- [19] www.dakstar.com.pl/144.
- [20] www.fessmann.com/en/plants/smoking/.
- [21] www.mauting.com/pl/produkty/.
- [22] www.metalbud.com/pl/komory.
- [23] www.pekmont.pl/pl/offer/5-obrobka-termiczna.html.
- [24] www.rexpol.pl/pl/produkty.html.
- [25] www.sorgo.at/cms/pl/.
- [26] www.stawiany.pl/wedzarnie.html,mc,10,0.
- [27] Zasadowski A., Wysocki A.: Niektóre aspekty toksycznego działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). *Roczniki PZH*, 2002, 53(1), 26-35.
- [28] zfm-online.com/oferta/komory-wedzarniczo-parzelnicze/.

BARWA I TEKSTURA SERA TWAROGOWEGO KWASOWEGO PRZECHOWYWANEGO W RÓŻNYCH OPAKOWANIACH

DARIUSZ M. STASIAK, AGNIESZKA LATOCH, STANISŁAW MLEKO,
MARTA TOMCZYŃSKA-MLEKO

Streszczenie

Przedmiotem badań była barwa i tekstura sera twarogowego kwasowego z mleka krowiego podczas chłodniczego przechowywania w różnych opakowaniach przez okres przekraczający trwałość deklarowaną przez producenta. Stwierdzono, że kwasowość czynna sera twarogowego w opakowaniu foliowym przechowywanego przez 29 dni w atmosferze ditlenku węgla wzrosła o 0,08, przy obniżonym ciśnieniu wzrosła o 0,10, a w pergaminie o 0,26 jedn. Barwa twarogów na powierzchni i na przekroju nie zależała od rodzaju opakowania i okresu przechowywania, jakkolwiek ogólna jasność (L^*) barwy przekroju była nieco mniejsza, a powierzchnia była bardziej żółta. Twardość i gumistość twarogu początkowo malała a następnie wzrastała podczas przechowywania. Największe zmiany twardości (o 11,85 N) i gumistości (o 3,21 N) wykazał ser w opakowaniu pergaminowym. Twarogi w opakowaniach foliowych wykazały istotnie niższe wartości twardości i gumistości, a zmiany podczas przechowywania były mniejsze niż odpowiednio 4,06 N i 1,04 N. Pakowanie serów twarogowych w folię pod obniżonym ciśnieniem lub w atmosferze ditlenku węgla skutecznie zabezpiecza wyrób przed istotnymi zmianami pH, barwy i tekstury podczas 29 dob nieprzerwanego przechowywania chłodniczego.

Słowa kluczowe: twaróg, trwałość, barwa, tekstura, opakowanie

Wprowadzenie

Ser twarogowy jest produktem powstającym przez obróbkę skrzepu w postaci tłuszczu i białka wytrąconego z mleka pasteryzowanego i ukwaszonego przez bakterie kwasu mlekowego lub niewielką ilością podpuszczki. Ser taki nadaje się do bezpośredniego spożycia lub jako składnik potraw, ciast, deserów. Swą popularność zawdzięcza walorom żywieniowym, nieskomplikowanemu procesowi i tradycji wytwarzania [PN-A-86300]. Produkcja serów świeżych (niedojrzewających i niekonserwowanych) według GUS w 2013 r. wyniosła 400 tys. ton. Rynek producentów serów twarogowych cechuje znaczne rozdrobnienie, a część sieci handlowych oferuje sery twarogowe pod marką własną. Konsument dokonując wyboru z bardzo szerokiej oferty serów kieruje się zwykle znajomością marki, przekonaniem o jakości i/lub ceną. Tradycyjny wizerunek twarogu sprawia,

że w opinii konsumentów uznawany jest za produkt naturalny o cennych wartościach odżywczych [Siemianowski i Szpendowski, 2014; minrol.gov.pl 2015]. Przyczynia się to do mocnej pozycji twarogu na rynku mleczarskim [GUS, 2014].

Asortyment twarogu jest różnicowany głównie sposobem produkcji (np. twarogi formowane, krajanki) i zawartością tłuszczu (twarogi: chude, półtłuste, tłuste, śmietankowe) [PN-A-86300]. Najczęściej formowany jest w kostkę lub klinek i pakowany w pergamin lub zamykany w opakowanie foliowe, zwykle o określonej, niewielkiej gramaturze umożliwiające łatwe otwieranie i/lub zamykanie. Ostatnimi czasy rośnie popularność twarogów pakowanych w pojemniki z tworzywa sztucznego w szerokim zakresie pojemności. Opakowanie sera ma nie tylko funkcję ochronną i technologiczną, ale również marketingową i jest nośnikiem informacji. Dlatego nowoczesne materiały opakowaniowe (np. folie), atrakcyjna szata graficzna i funkcjonalność opakowań (np. łatwość otwierania i/lub zamykania) uznawane są za najważniejsze czynniki przyciągające klientów [Śmietana i in., 1998; Dmytrów i in., 2007; Żywica i in., 2008; Siemianowski i in., 2012].

Ser twarogowy zwykle cechuje krótki, kilkudniowy okres trwałości, który wynika głównie ze specyficznego składu chemicznego, obecności aktywnej mikroflory kwaszającej i wysokiej aktywności wody. Trwałość, a zarazem jakość w ni mniejszym stopniu kształtowana jest przez higienę produkcji, rodzaju opakowania i jego barierowość. Zwłaszcza brak tlenu w opakowaniach próżniowych i modyfikowanie atmosfery ogranicza rozwój drobnoustrojów tlenowych [Singh i Waungana, 2001; Śmietana i in., 2003; Panfil-Kunczewicz i in., 2014]. Szczególny wpływ na wydłużenie trwałości twarogów wywarła zamiana papieru na opakowania z tworzywa sztucznego typu open-close, a także podnoszenie standardów higieny produkcji. Opakowanie papierowe często utożsamiane jest z tradycją i jest wciąż używane do owijania krajanki twarogowej. Badania miały na celu porównanie jakości handlowej serów twarogowych podczas ich chłodniczego przechowywania w różnych opakowaniach przez okres przekraczający trwałość deklarowaną przez producenta.

Materiał i metody badań

Sery twarogowe były produkowane z mleka krowiego pasteryzowanego, normalizowanego i zaprawionego czystymi kulturami bakterii. Powstawały na linii technologicznej jednej z mleczarni w województwie lubelskim. W produkcji stosowano zmechanizowaną lub ręczną metodę przygotowania twarogu. W przypadku metody zmechanizowanej, po odpompowaniu serwatki skrzep był zagęszczany w formach i pakowany maszynowo w folie przy obniżonym ciśnieniu powietrza (próba V) lub w atmosferze ditlenku węgla (próba M). W metodzie tradycyjnej gęstwa ociekała na wózku, skrzep był zagęszczany w woreczkach

ociekowych, gdzie ulegał samoprasowaniu, a następnie był pakowany ręcznie w pergamin (próba P).

Twarogi przewożono z zachowaniem łańcucha chłodniczego do laboratorium, gdzie dobę po produkcji wykonywano oznaczenie kwasowości czynnej, barwy i tekstury. Następnie pomiary tych parametrów prowadzono w odstępach 7-dniowych. Doświadczenie wykonano trzykrotnie. W czasie trwania eksperymentu twarogi w oryginalnie zamkniętych opakowania były przechowywane w temperaturze 6°C. Twaróg w pergaminie był dodatkowo umieszczony w pojemniku z tworzywa sztucznego z pokrywą. Na skutek znacznych zmian jakości twarogu w pergaminie (próba P) eksperyment ten został przerwany w 22 dobie. Wartość pH twarogu określono na podstawie PN-A-86232.

Pomiar barwy wykonano na powierzchni wyrobu i na świeżo odsłoniętym jego przekroju przy pomocy spektrofotometru sferycznego X-Rite model 8200. Parametry wyznaczono w świetle odbitym przy użyciu oświetlacza D65/10° bez filtra i z włączoną składową połysku (SPIN) stosując przysłonę z otworem o średnicy 8 mm. Przed pomiarem spektrofotometr był kalibrowany przy użyciu fabrycznych wzorców bieli i czerni. Parametry barwy w systemie CIE, tj. jasność barwy L^* , składową czerwono-zieloną a^* i składową żółto-niebieską b^* , były rejestrowane przez program komputerowy X-RiteColor Master współpracujący ze spektrofotometrem.

Pomiar parametrów tekstury wykonano na sześciennych (20 mm) próbkach wycinanych z wnętrza klinka przy pomocy noża strunowego i szablonu. Próbkę niezwłocznie poddawano pomiarowi wytrzymałości mechanicznej przy pomocy teksturometru TA.XT.plus firmy Stable Micro Systems Ltd. ustawiając je pomiędzy stolikiem przedmiotowym HDP i przystawką P/75. Deformację prowadzono z prędkością $2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ do uzyskania 50% początkowej wysokości próbki. Podczas pomiarów temperatura próbek wynosiła ok. 18°C. Parametry tekstury wyznaczono na podstawie zarejestrowanych krzywych wytrzymałościowych przy użyciu programu komputerowego Texture Exponent 32 [Bourne, 2002; Stable Micro Systems, 2014].

W celu porównania wyników eksperymentu przeprowadzono analizę wariancji, która wskazała czynniki modyfikujące parametry barwy i tekstury twarogu. Wyznaczono także podstawowe statystyki w próbach ($\bar{X}$ – średnia, SD – odchylenie standardowe). Różnice między średnimi badano testem HSD Tukey'a na poziomie istotności $p=0,05$.

Wyniki i dyskusja

Właściwości fizykochemiczne twarogu zależą od składu chemicznego surowca, przebiegu koagulacji białka i metod oddzielania masy twarogowej [Chmura i in., 2002; Szpendowski i in., 2004]. Zwykle w przemysłowej technologii twarogu koagulację kwasową prowadzi się przy wykorzystaniu mezofilnych kultur paciorkowców bakterii fermentacji mlekowej wytwarzających kwas mlekowy.

Ale możliwa jest także przez bezpośredni dodatek kwasu i osiągnięcie kwasowości właściwej dla punktu izoelektrycznego kazeiny [Ziarno i Zaręba, 2007; Bohdziewicz 2009]. W zrealizowanym eksperymencie wartość pH twarogu dobę po produkcji była w zakresie od 4,49 do 4,52 (Tab. 1) i była niższa od wartości odpowiadającej punktowi izoelektrycznemu kazeiny.

Tab. 1. Wartość pH twarogów podczas przechowywania ($X \pm SD$)

Próba	Doba 1	Doba 8	Doba 15	Doba 22	Doba 29
V	4,50 $\pm$ 0,02	4,48 ^a $\pm$ 0,03	4,44 ^a $\pm$ 0,03	4,40 ^a $\pm$ 0,04	4,40 $\pm$ 0,05
M	4,52 $\pm$ 0,02	4,49 ^a $\pm$ 0,03	4,47 ^a $\pm$ 0,04	4,43 ^a $\pm$ 0,04	4,44 $\pm$ 0,04
P	4,49 $\pm$ 0,02	4,35 ^b $\pm$ 0,04	4,28 ^b $\pm$ 0,05	4,23 ^b $\pm$ 0,07	-

Objaśnienie: a,b – różne małe litery oznaczają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) różnice wartości średnich w danym dniu.

Wartość pH podczas przechowywania serów obniżyła się osiągając w 22 dobie pH 4,23 w przypadku produktu w opakowaniu pergaminowym (próba P). Próba tak wykazała największy rozstęp wartości wynoszący 0,26. Twaróg w opakowaniach foliowych (próby V i M) wykazywał dość stabilną kwasowość czynną, a obniżenie pH w czasie trwania eksperymentu nie przekroczyło 0,1 jednostki. Wartość pH twarogu w pergaminie była istotnie niższa od pH twarogu opakowanego w folię (Tab. 1). Dmytrów i in. [2010] uzyskali podobny wzrost kwasowości czynnej twarogu z mleka krowiego. Stwierdzili obniżeniu wartości pH od ok. 4,51 do ok. 4,42 w okresie 21 dni. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Steinkę i Kukułowicz [2006] kwasowość twarogów przechowywanych w opakowaniach próżniowych w warunkach chłodniczych wzrastała wykazując pH poniżej 4,2 po 14 dobach. Przyczyną zmian kwasowości czynnej twarogu w pergaminie (próba P) jest zapewne rozwój mikroflory zakwaszającej związany z dostępem tlenu atmosferycznego. Wskazują na to między innymi wyniki opublikowane przez Steinkę i Kukułowicz [2006]. W ich eksperymencie wzrostowi liczby bakterii fermentacji mlekowej towarzyszyło obniżenie wartości pH przechowywanych chłodniczo twarogów. Badania Ziółkowskiego i in. [2004], a także Panfil-Kunczewicz i in. [2014] wykazały, że modyfikacja atmosfery przechowywania, a zwłaszcza ditlenek węgla dzięki swemu bakteriostatycznemu i grzybobójczemu działaniu sprzyja zachowywaniu jakości przez sery twarogowe.

Barwa badanych wyrobów nie była zależna od okresu ich przechowywania, rodzaju opakowania i miejsca pomiaru. Jakkolwiek wstępne wyniki analizy danych mogą wskazywać (Tab. 2) na istotność niektórych efektów, to porównanie post-hoc (Tab. 3) ich nie potwierdza. Jasność barwy powierzchni twarogu zawierała się w przedziale od 96,10 do 96,79, a na przekroju od 95,63 do 97,32. Obliczona dla wszystkich prób różnica ogólnej jasności powierzchni i jasności przekroju osiągnęła wartość 0,19. Większy rozstęp wartości jasności przekroju niż

powierzchni twarogów mógł zostać spowodowany różnicami w przebiegu samoprasowania i formowania struktury fizycznej twarogu.

Tab. 2. Wpływ sposobu pakowania (O), okresu przechowywania (T) i miejsca pomiaru (S) na parametry barwy twarogu

Czynnik	df	Średni kwadrat odchylenia parametru barwy		
		jasność	czerwoność	żółtość
Okres przechowywania (T)	3	1,0***	0,258***	1,40*
Rodzaj opakowania (O)	2	0,7**	0,004	1,01
Miejsce pomiaru (S)	1	1,0**	0,114**	8,83***
Interakcja TxO	6	0,7**	0,048**	1,62**
Interakcja TxS	3	0,4*	0,086***	1,61**
Interakcja OxS	2	0,9**	0,033	1,35*
Interakcja TxOxS	6	0,5**	0,036*	0,98*

Objaśnienie: różnice między wartościami średnimi statystycznie istotne na poziomie: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$.

Zakres zmian składowej czerwono-zielonej (a^*) barwy twarogów nie przekraczał 0,47. Na powierzchni był w przedziale od -0,91 do -1,34, zaś na przekroju w przedziale od -0,82 do -1,29. Składowa żółto-niebieska (b^*) barwy powierzchni i przekroju twarogu zmieniała się w nieco szerszym przedziale w zakresie od 9,76 do 11,67 na powierzchni i w zakresie od 9,08 do 11,37 na przekroju. Dane wskazują, że barwa przekroju była mniej żółta od powierzchni twarogu, jakkolwiek różnice te nie zostały potwierdzone w analizie statystycznej.

Siemianowski i in. [2013] wykazali, że barwa twarogu zależy od koncentracji suchej masy. Wraz ze wzrostem koncentracji barwa stawała się bardziej żółta. Z badań Dmytrów i in. [2007, 2009] oraz Śmietany i in. [2003] wynika, że wygląd zewnętrzny twarogu przechowywanego w warunkach chłodniczych nie ulega zmianie. Także Panfil-Kuncewicz i in. [2014] w ocenie sensorycznej twarogów nie stwierdzili wpływu metody pakowania i czasu przechowywania na ich barwę – była biała z odcieniem kremowym i jednolita w całej masie przez cały czas składowania. Jednocześnie stwierdzili, że czas przechowywania wpływał na wygląd twarogu oraz strukturę i konsystencję produktów w ocenie organoleptycznej, co częściowo potwierdza różnice jasności barwy występujące w ocenie instrumentalnej.

Tab. 3. Parametry barwy twarogu ($X \pm SD$)

Doba	Rodzaj opakow.	L*	a*	b*
Powierzchnia wyrobu				
1	M	96,56 $\pm$ 0,33	-1,34 $\pm$ 0,09	11,14 $\pm$ 0,3
	P	96,34 $\pm$ 0,73	-1,31 $\pm$ 0,02	10,47 $\pm$ 0,27
	V	96,53 $\pm$ 0,33	-1,33 $\pm$ 0,05	10,73 $\pm$ 0,23
8	M	96,47 $\pm$ 0,41	-1,01 $\pm$ 0,09	10,13 $\pm$ 0,67
	P	96,52 $\pm$ 0,34	-1,02 $\pm$ 0,15	9,95 $\pm$ 0,40
	V	96,62 $\pm$ 0,26	-1,14 $\pm$ 0,16	10,46 $\pm$ 0,70
15	M	96,52 $\pm$ 0,15	-0,96 $\pm$ 0,04	10,27 ^a $\pm$ 0,55
	P	96,52 $\pm$ 0,11	-0,95 ^A $\pm$ 0,11	10,29 ^a $\pm$ 0,38
	V	96,79 $\pm$ 0,05	-0,91 $\pm$ 0,02	9,76 ^b $\pm$ 0,61
22	M	96,10 $\pm$ 0,31	-1,22 $\pm$ 0,12	11,31 $\pm$ 0,32
	P	96,21 $\pm$ 0,12	-1,05 $\pm$ 0,08	11,42 $\pm$ 0,84
	V	96,35 $\pm$ 0,36	-1,19 $\pm$ 0,09	10,93 $\pm$ 0,43
29	M	96,30 $\pm$ 0,35	-1,32 $\pm$ 0,11	11,67 $\pm$ 0,47
	V	96,29 $\pm$ 0,32	-1,29 $\pm$ 0,08	11,10 $\pm$ 0,25
Przekrój wyrobu				
1	M	97,23 $\pm$ 0,11	-1,15 $\pm$ 0,03	9,52 $\pm$ 0,28
	P	96,85 $\pm$ 0,09	-1,03 $\pm$ 0,08	9,49 $\pm$ 0,30
	V	96,12 $\pm$ 0,82	-1,29 $\pm$ 0,18	10,73 $\pm$ 1,21
8	M	97,02 $\pm$ 0,18	-1,03 $\pm$ 0,09	9,78 $\pm$ 0,38
	P	97,32 $\pm$ 0,17	-1,12 $\pm$ 0,05	10,04 $\pm$ 0,41
	V	96,87 $\pm$ 0,27	-0,96 $\pm$ 0,11	9,47 $\pm$ 0,51
15	M	97,03 ^a $\pm$ 0,24	-1,06 $\pm$ 0,01	9,99 $\pm$ 0,11
	P	95,75 ^b $\pm$ 0,60	-1,21 ^{aB} $\pm$ 0,20	11,37 $\pm$ 1,41
	V	96,93 ^a $\pm$ 0,04	-0,82 ^b $\pm$ 0,09	9,08 $\pm$ 0,13
22	M	96,89 $\pm$ 0,13	-1,00 $\pm$ 0,09	9,43 $\pm$ 0,28
	P	95,63 $\pm$ 0,33	-0,93 $\pm$ 0,08	10,64 $\pm$ 0,25
	V	96,51 $\pm$ 0,40	-0,94 $\pm$ 0,06	9,54 $\pm$ 0,33
29	M	96,92 $\pm$ 0,13	-1,12 $\pm$ 0,11	10,34 $\pm$ 0,41
	V	96,03 $\pm$ 0,41	-1,08 $\pm$ 0,07	10,24 $\pm$ 0,50

Objaśnienie: a,b,c – różne małe litery oznaczają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) różnice wartości średnich dotyczących danego okresu przechowywania; A,B,C – wielkie litery oznaczają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) różnice wartości średnich dotyczących danego okresu przechowywania i miejsca pomiaru.

Okres przechowywania twarogu i rodzaj opakowania istotnie modyfikowały jego twardość i gumistość, lecz nie wpływały znacząco na spoistość twarogu (Tab. 4). Największą twardość podczas eksperymentu wykazywał twaróg pakowany w pergamin (próba P). Zakres zmian (rozstęp 11,85 N) zawierał się w przedziale od 8,09 do 17,57 N (Tab. 5). Twarogi przechowywane przy obniżonym ciśnieniu powietrza (próba V) i w atmosferze ditlenku węgla (próba M)

wykazywały mniejszą twardość. W początkowym okresie przechowywania twardość malała, aby wzrosnąć w ostatniej fazie eksperymentu. Zmiany twardości zachodziły w wąskich przedziałach o szerokości 4,54 N – próba V i 4,06 N – próba M.

Tab. 4. Wpływ sposobu pakowania (O) i okresu przechowywania (T) na parametry tekstury twarogu

Czynnik	df	Średni kwadrat odchylenia parametru barwy		
		Twardość	Spoistość	Gumiastość
Okres przechowywania (T)	3	89,3***	0,000963	5,55***
Rodzaj opakowania (O)	2	19,8***	0,000219	1,40**
Interakcja TxO	6	86,1***	0,001886*	5,61***

Objaśnienie: różnice między wartościami średnimi statystycznie istotne na poziomie: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$.

Podobną zmienność stwierdzono w przypadku gumiastości twarogu. Twaróg przechowywany w pergaminie (P) wykazywał największą średnią wartość (2,86 N) i rozstęp (3,21 N) tej cechy. Próby przechowywanie w folii (M i V) wykazywały mniejszą gumiastość, odpowiednio w próżni (V) – 2,58 N i w atmosferze modyfikowanej (M) – 2,47 N. Także rozstęp wartości gumiastości był mniejszy i wynosił odpowiednio 1,04 N i 0,72 N.

Spoistość twarogów nie zależała od rodzaju opakowania i od okresu przechowywania. Średnia wartość spoistości w całym okresie przechowywania twarogu była największa w przypadku opakowania pergaminowego (0,239), a najmniejsza (0,227) – w przypadku pakowania w atmosferze ditlenku węgla.

Podobne wyniki badań tekstury twarogu uzyskał Mazur [2009], który nie stwierdził istotnych zmian jego twardości i spoistości podczas 7-dniowego przechowywania w naturalnej atmosferze. Po początkowym wzroście twardości (w 3 dobie) zaobserwował tendencję spadkową parametrów tekstury, a przyczyn tego dopatrywał się w obniżonej zawartości wody w twarogach przechowywanych w zredukowanym ciśnieniu. Podobnie Dmytrów i in. [2007, 2009, 2010] stwierdzili, że tekstura twarogu zależy od zawartości wody i białka w materiale. Wraz ze wzrostem zawartości białka twardość rośnie, lecz maleje wraz ze wzrostem zawartości wody w serze. Kilkuprocentowe wycieki serwatki niezależnie od użytego materiału opakowaniowego stwierdzili Karczewska i in. [2005] podczas magazynowania i obrotu twarogiem. Śmietana i in. [2003] wycieki serwatki w czasie przechowywania twarogu upatrywali w zbyt wysokiej wartości podciśnienia podczas pakowania. Przyczynami wycieku są także zmiany w układzie koloidalnym i samoprasowanie się masy. Stosując odpowiednie metody, np. „soft air”, wyciek serwatki może zostać ograniczony. Badania Cais i Wojciechowskiego [1996] wykazały, że wyciek jest zmniejszony na skutek

pęcznienia białek i wchłaniania wolnej wody w serach twarogowych przechowywanych w temperaturze poniżej 8 °C. Daje to podstawy do przypuszczenia, że zmiany tekstury badanych serów twarogowych (Tab. 5) zostały spowodowane przez kilkuprocentowe różnice zawartości wody związane z przechowywaniem w opakowaniu pergaminowym (próba P), a także przez obniżone ciśnienie w opakowaniu (próba V).

Tab. 5. Parametry tekstury twarogu ($X \pm SD$)

Doba	Rodzaj opakow.	Twardość, N	Spoistość	Gumiastość, N
1	M	12,06 ^a ±1,59	0,237±0,027	2,86 ^a ±0,54
	P	8,09 ^b ±2,19	0,230±0,021	1,83 ^b ±0,34
	V	11,58 ^a ±1,04	0,268±0,027	3,11 ^a ±0,50
8	M	10,45 ^a ±2,17	0,228±0,019	2,38 ^a ±0,52
	P	5,72 ^b ±1,18	0,245±0,026	1,42 ^b ±0,39
	V	8,99 ^a ±1,12	0,228±0,033	2,07 ^a ±0,55
15	M	9,25 ^a ±0,60	0,231±0,017	2,14 ^a ±0,29
	P	17,57 ^b ±0,88	0,263±0,033	4,63 ^b ±0,72
	V	10,90 ^a ±0,83	0,225±0,026	2,45 ^a ±0,26
22	M	9,54 ^a ±1,16	0,237±0,023	2,26 ^a ±0,32
	P	16,43 ^b ±3,16	0,219±0,024	3,57 ^b ±0,66
	V	10,24 ^a ±1,21	0,226±0,013	2,31 ^a ±0,24
29	M	13,31±1,44	0,203±0,025	2,68±0,29
	V	13,53±1,71	0,217±0,039	2,95±0,77

Objaśnienie: a,b,c – różne małe litery oznaczają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) różnice wartości średnich dotyczących danego okresu przechowywania.

Wnioski

1. Kwasowość czynna sera twarogowego wyprodukowanego z mleka krowiego w warunkach przemysłowych i przechowywanego chłodniczo przez 29 dni w opakowaniu foliowym w atmosferze ditlenku węgla lub przy obniżonym ciśnieniu wzrosła odpowiednio o 0,08 lub 0,10 jedn. Opakowanie pergaminowe jest najmniej skutecznym sposobem ochrony twarogu przez zmianami kwasowości i jako takie może być stosowane przede wszystkim w odniesieniu do wyrobów o charakterze tradycyjnym o gwarantowanym kilkudniowym okresie zachowania swej jakości.
2. Barwa powierzchni i przekroju przechowywanych twarogów nie ulega istotnym zmianom, jakkolwiek zakres zmian jasności barwy przekroju był szerszy o 1,00 jednostki, a barwa powierzchni była bardziej żółta (o 0,72 jedn.).
3. Twardość i gumiastość twarogu podczas 29-dniowego przechowywania początkowo maleje, a następnie wzrasta. Największe zmiany tekstury wykazywał ser w opakowaniu pergaminowym – twardość zmieniała się w zakresie 8,09 do 17,57 N, a gumiastość w przedziale 1,42-4,63 N.

Twarogi w opakowaniach foliowych cechowała mniejszą zmienność i istotnie mniejsza twardość (8,99-13,53 N) i gumistość (2,07-3,11 N).

4. Pakowanie serów twarogowych w folię pod obniżonym ciśnieniem lub w atmosferze ditlenku węgla skutecznie zabezpiecza wyrób przed istotnymi zmianami pH, barwy i tekstury podczas nieprzerwanego 29-dniowego okresu chłodniczego przechowywania. Jest on dwukrotnie dłuższy od okresu trwałości deklarowanego przez producenta.

Literatura

- [1] Bohdziewicz K.: Twaróg – pierwszy świeży ser świata. Przegląd Mleczarski, 2009, 2, 4-8.
- [2] Bourne M.: Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. Academic Press, London 2002.
- [3] Cais D., Wojciechowski J.: Zmiany wybranych cech jakościowych serów twarogowych w trakcie ich przechowywania. Przegląd Mleczarski, 1996, 6, 177-178.
- [4] Chmura S., Śmietana Z., Żulewska J.: The effect of the production method on selected physicalchemical properties of cottage cheeses. Polish Journal of Natural Sciences, 2002, 11, 189-197.
- [5] Dmytrów I., Kryża K., Dmytrów K., Lisiecki S.: Wpływ opakowania na wybrane cechy jakościowe sera twarogowego kwasowego przechowywanego w warunkach chłodniczych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2007, 1(50), 71-74.
- [6] Dmytrów I., Mituniewicz-Małek A., Dmytrów K.: Fizykochemiczne i sensoryczne cechy sera twarogowego kwasowego wyprodukowanego z mleka koziego oraz mieszaniny mleka koziego i krowiego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2010, 2 (69) 46-61.
- [7] Dmytrów I., Mituniewicz-Małek A., Dmytrów K., Antonowicz J.: Evaluation of selected physicochemical properties of tvarog produced from extended shelf milk (ESL). Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 2009, 12(3).
- [8] GUS. Mały Rocznik Statystyczny Polski. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa 2014.
- [9] <http://www.minrol.gov.pl/Jakosc-zywnosci/Produkty-regionalne-i-tradycyjne/List-produktow-tradycyjnych/woj.-lubelskie/Twarog-z-Bychawy>, dostęp: 28 III 2015 r.
- [10] Karczewska D., Pikul J., Płuszka H., Chudy S.: Zmiany wybranych cech fizykochemicznych tradycyjnie pakowanego twarogu w zależności od rodzaju użytego materiału opakowaniowego. Chłodnictwo, 2005, 10, 46-51.
- [11] Mazur J.: Zmiany tekstury w trakcie przechowywania w różnych warunkach serów twarogowych kwasowych otrzymanych metodą tradycyjną. Inżynieria Rolnicza, 2009, 2(111), 99-106.

- [12] Panfil-Kuncewicz H., Lis A., Majewska M.: Wpływ opakowań aktywnych na trwałość mikrobiologiczną i cechy sensoryczne twarogów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 2 (93) 190-203.
- [13] PN-A-86232:1973. Mleko i przetwory mleczne. Sery. Metody badań.
- [14] PN-A-86300:1991. Mleko i przetwory mleczarskie. Sery twarogowe niedojrzewające.
- [15] Siemianowski K., Szpendowski J.: Znaczenie twarogu w żywieniu człowieka. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2014, 95(1), 115-119.
- [16] Siemianowski K., Szpendowski J., Bohdziewicz K., Kołakowski P., Pawlikowska K., Bardowski J., Chmielewska M., Żylińska J.: Wpływ zawartości suchej masy w mleku na dynamikę ukwaszania oraz cechy jakościowe skrzepu twarogowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, 1(86), 151-165.
- [17] Siemianowski K., Szpendowski J., Bohdziewicz K.: Znaczenie pakowania oraz warunków przechowywania i dystrybucji w przedłużaniu trwałości twarogów kwasowych. *Chłodnictwo*, 2012, 9, 38-41.
- [18] Singh H., Waungana A.: Influence of heat treatment of milk on cheese-making properties. *International Dairy Journal*, 2011, 11, 543-551.
- [19] Śmietana Z., Derengiewicz W., Jankowski A., Wojdyński T.: Nowa technika i technologia produkcji twarogów. *Przegląd Mleczarski*, 1998, 9, 288-292.
- [20] Śmietana Z., Szpendowski J., Bohdziewicz K.: Charakterystyka tradycyjnego „polskiego twarogu” otrzymywanego według własnej nowoczesnej techniki i technologii. *Przegląd Mleczarski*, 2003, 4, 126-129.
- [21] Stable Micro Systems. Texture Exponent 32. Stable Micro Systems Ltd. Godalming 2014.
- [22] Steinka I., Kukułowicz A.: Ocena możliwości regulacji kwasowości twarogów za pomocą wyciągu aloesowego. *Acta Agrophysica*, 2006, 8(1), 229-237.
- [23] Szpendowski J., Kłobukowski J., Bohdziewicz K., Kujawski M.: Characteristics of the chemical composition of the nutritive value of protein in selected curd cheeses. *Polish Journal of Natural Sciences*, 2004, 2, 143-150.
- [24] Ziarno M., Zaręba D.: Substancje dodatkowe stosowane w serowarstwie. *Przemysł Spożywczy*, 2007, 10, 34-38..
- [25] Ziółkowski T., Panfil-Kuncewicz H., Staniewska K., Szpendowski J.: Durability of tvarogs produced with modified technology and packed with different methods. *Polish Journal of Natural Sciences*, 2004, 2, 163-170.
- [26] Żywica R., Szpendowski J., Banach J.K., Jamiołkowski P.: Wpływ zmian sezonowych składu chemicznego mleka na wydatek serów twarogowych. *Przegląd Mleczarski*, 2008, 11, 12-16.

WIEDZA KONSUMENTÓW NA TEMAT ZAFALSZOWAŃ ŻYWNOŚCI

ANNA STÓJ, KATARZYNA KWIECIEŃ, JAROSŁAW MAZURKIEWICZ

Streszczenie

Żywność zafałszowana jest zwykle mniej wartościowa pod względem składu chemicznego i wartości odżywczej. Skutki wynikające z jej spożywania odczuwają głównie konsumenci. Celem pracy była ocena wiedzy konsumentów na temat zafałszowań żywności.

W ankiecie wzięło udział 200 respondentów posiadających wykształcenie podstawowe, zawodowe, średnie i wyższe. Większość odpowiedzi na pytania ankiety nie zależało od poziomu wykształcenia. Istotnie więcej respondentów z wyższym wykształceniem wie o istnieniu przepisów prawnych dotyczących produktów zafałszowanych, deklarujących wykształcenie średnie słyszało o metodach wykrywania zafałszowań produktów żywnościowych oraz posiadających wykształcenie zawodowe uważa, że oleje, tłuszcze i masło są fałszowane.

Słowa kluczowe: zafałszowania, żywność, wiedza, konsumenci, wykształcenie

Wprowadzenie

Fałszowanie żywności może polegać, m.in. na całkowitym lub częściowym zastąpieniu pełnowartościowych składników składnikami podobnymi, ale tańszymi, np. białko zwierzęce białkiem roślinnym, dodatkiem cukru, rozcieńczeniem wodą. Notowane są także przypadki błędnej deklaracji pochodzenia surowca lub produktu, jego składu ilościowego, zamieszczania niezgodnej z prawdą nazwy produktu, daty produkcji, daty minimalnej trwałości, czy innego nieprawidłowego oznakowania, jak również braku deklaracji sposobu produkcji, istotnego dla żywności utrwalonej metodami radiacyjnymi oraz żywności genetycznie modyfikowanej [Targoński i Stój, 2005; Sawicki, 2009b; Przetaczek – Rożnowska i Rosiak, 2011].

Produkty spożywcze mogą być fałszowane głównie z chęci osiągnięcia maksymalnych zysków i zwiększenia konkurencyjności cenowej produktów [Targoński 2000; Fortuna i Przetaczek, 2005; Targoński i Stój, 2005; Tuszyński i Czernicka, 2008]. Żywność fałszowana jest zwykle mniej wartościowa pod względem składu chemicznego i wartości odżywczej, a skutki wynikające z jej spożywania odczuwają głównie konsumenci, którzy kupują takie produkty. Ponadto zafałszowane produkty mogą być szkodliwe dla zdrowia [Targoński i Stój, 2005; Tuszyński i Czernicka, 2008].

Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia zawiera definicję środka spożywczego zafałszowanego w odniesieniu do jakości zdrowotnej [Dz. U. 2006 r. Nr 171, poz. 1225]. Z kolei definicję artykułu rolno – spożywczego zafałszowanego w odniesieniu do jakości handlowej wprowadzono w Ustawie z dnia 24 października 2008 r. o zmianie ustawy o jakości handlowej artykułów rolno – spożywczych oraz niektórych innych ustaw [Dz. U. 2008 r. Nr 214, poz. 1346]. W znowelizowanej ustawie zastrzono sankcje za naruszenie prawa przez przedsiębiorców. Za wprowadzenie do obrotu wyrobów zafałszowanych, organy Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych mogą nałożyć na przedsiębiorców wysokie kary finansowe [Dz. U. 2008 r. Nr 214, poz. 1346; Gasparska, 2009; Sawicki 2009a]. Mimo to w mediach pojawiają się informacje o nowych przypadkach wykrycia złej jakości żywności i niehigienicznych warunkach panujących w czasie jej wytwarzania [Sawicki 2009b; Zdrojewska, 2010].

W ostatnich latach w literaturze ukazało się wiele publikacji poruszających problem zafałszowań żywności i metod ich wykrywania [Dmowski i Śmiechowska, 2008; Kowalska i in., 2008; Nogala – Kałucka i in., 2008; Tomaszewska – Gras i Kijowski, 2010; Ferrari i in., 2011; Monfreda i in., 2011; Zachar, 2011; Ali i in., 2012;]. Jednak brak jest wyników badań dotyczących wiedzy konsumentów na temat fałszowania żywności.

Celem pracy była ocena wiedzy konsumentów na temat zafałszowań żywności z uwzględnieniem posiadanego wykształcenia respondentów.

Materiał i metody badań

W anonimowym badaniu ankietowym wzięło udział 200 respondentów posiadających wykształcenie podstawowe, zawodowe, średnie i wyższe.

Badanie przeprowadzono stosując ankietę składającą się z trzech części i zawierającą 35 pytań, z których 34 było w formie zamkniętej, natomiast 1 pytanie było w formie otwartej. Pierwsza część ankiety dotyczyła ogólnej charakterystyki respondentów, druga część – znajomości m.in. definicji artykułu rolno – spożywczego zafałszowanego, kar nakładanych na nieuczciwych przedsiębiorców, instytucji zajmujących się kontrolą żywności, metod pozwalających wykryć manipulacje autentycznością oraz celów i skutków fałszowania. Trzecia część ankiety składała się z pytań odnośnie poglądów konsumentów na temat występowania procederu fałszowania w poszczególnych grupach produktów żywnościowych oraz wiedzy na temat metod wykorzystywanych do manipulacji ich autentycznością.

Otrzymane wyniki przeanalizowano z wykorzystaniem programu Statistica 10. Analizę danych testem χ^2 przeprowadzono w odniesieniu do 16 pytań ankiety, w których respondenci wybierali jedną odpowiedź. Wartości krytyczne χ_a^2 zostały odczytane z tabeli rozkładu chi – kwadrat przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$ i przy $(r - 1) (k - 1)$ stopniach swobody. Sprawdzano hipotezę: nie istnieje zależność

pomiędzy odpowiedziami udzielonymi na pytania znajdujące się w ankiecie a wykształceniem osób uczestniczących w badaniu ($\chi^2 < \chi_a^2$).

Wyniki i dyskusja

W pierwszej części ankiety zapytano respondentów o dane osobowe. Osoby z wykształceniem podstawowym stanowiły 14,0%, a wykształcenie zasadnicze zawodowe deklarowało 22,5% badanych. Najliczniejszą grupę, 43,5%, reprezentowali konsumenci z wykształceniem średnim, natomiast 20,0% ankietowanych posiadało wykształcenie wyższe.

Na początku drugiej części ankiety poproszono respondentów o wskazanie informacji, na które zwracają uwagę dokonując zakupów produktów żywnościowych. Osoby uczestniczące w badaniu typowały więcej niż jedną odpowiedź. Przeprowadzone badanie wykazało, że Polacy kupując żywność głównie zwracają uwagę na cenę – 79,0% odpowiedzi, datę minimalnej trwałości lub termin przydatności do spożycia – 64,0% odpowiedzi, markę – 49,0% odpowiedzi, skład produktu – 46,0% odpowiedzi, zawartość netto – 20,5% odpowiedzi oraz wygląd opakowania – 17,0% odpowiedzi. Podobne wyniki uzyskały również Krasnowska i Salejda [2011], które badały wiedzę konsumentów na temat znakowania żywności i stwierdziły, że konsumenci głównie zwracają uwagę na cenę – 37,0%, datę minimalnej trwałości lub termin przydatności do spożycia – 26,0%, markę – 25,6%, zawartość netto – 8,2%, jak również jakość produktu, jego smak, zapach, czystość, wygląd opakowania i informacje umieszczone na etykiecie – 3,2%.

Następne pytanie dotyczyło częstości czytania informacji zamieszczonych na opakowaniach produktów. Jak wynika z przeprowadzonych badań, 38,0% konsumentów deklaruje, że czasami zwraca na nie uwagę, zaś 30,0% ankietowanych interesuje się tymi danymi, ale tylko w przypadku wybranych produktów. Jedynie 23,5% pytanych zawsze czyta informacje podawane przez producentów, natomiast 8,5% badanych deklaruje brak zainteresowania zamieszczanymi informacjami.

Kolejne pytanie ankiety dotyczyło źródeł wiedzy konsumentów na temat jakości kupowanych produktów. Wykazano, że konsumenci przede wszystkim cenią sobie informacje zamieszczone na etykietach i opakowaniach żywności, ponieważ znaczna część ankietowanych – 66,5%, właśnie z tych danych uzyskuje informacje o jakości produktów. Dla osób uczestniczących w badaniu bardzo ważna jest również opinia rodziny i znajomych na temat jakości produktów – 47,0% odpowiedzi. Dla respondentów istotną rolę mają informacje przekazywane w telewizji – 47,0% odpowiedzi, natomiast z Internetu informacje o jakości uzyskuje mniej liczna grupa konsumentów – 23,0%. Jako inne źródła informacji ankietowani wskazali wiedzę uzyskaną na uczelni – 1,5% odpowiedzi. Badania prowadzone przez Krasnowską i Salejdę [2011] wykazały, że respondenci czerpią wiedzę na temat jakości kupowanych produktów z informacji umieszczonych

na etykietach i opakowaniach żywności – 43,9%, od rodziny i znajomych – 23,7%, z informacji przekazywanych w telewizji – 21,1% oraz z Internetu – 5,8%. Anketowani wskazywali również na informacje uzyskane na uczelniach i z książek oraz własne doświadczenie i własną ocenę jakości kupowanych produktów – 5,5%.

Kolejne pytanie dotyczyło znajomości definicji artykułu rolno – spożywczego zafałszowanego. Większość ankietowanych, tj. 71,0% stwierdziła, że nie zna definicji artykułu rolno – spożywczego zafałszowanego.

Respondentów, którzy deklarowali znajomość definicji artykułu rolno – spożywczego zafałszowanego poproszono o wskazanie prawidłowego określenia opisującego ten artykuł. Najwięcej respondentów uważa, że artykuł rolno – spożywczy zafałszowany to „produkt, w którym dokonano zabiegów, które zmieniły lub ukryły jego rzeczywisty skład lub nadały mu wygląd produktu zgodnego z przepisami dotyczącymi jakości handlowej” – 73,9% odpowiedzi. Spośród pięciu wymienionych definicji, dwie nie opisywały artykułu rolno – spożywczego zafałszowanego. Brzmiały one następująco: „produkt, który prawidłowo oznakowano” oraz „produkt, którego skład jest zgodny z przepisami dotyczącymi jakości handlowej poszczególnych artykułów rolno – spożywczych”. Odpowiedzi te wybrało najmniej konsumentów – odpowiednio 3,4% i 1,7% odpowiedzi i byli to jedynie konsumenci posiadający wykształcenie zawodowe.

Kolejne pytanie związane było z wiedzą konsumentów na temat przepisów prawnych dotyczących produktów zafałszowanych. Stwierdzono istotne statystyczne różnice w wiedzy na temat istnienia przepisów prawnych dotyczących produktów zafałszowanych wśród konsumentów reprezentujących wszystkie poziomy wykształcenia. Zdecydowana większość respondentów posiadających wykształcenie podstawowe uważa, że nie istnieją takie przepisy – 78,6%. Respondenci deklarujący posiadanie wykształcenia wyższego, najliczniej spośród wszystkich grup wskazali odpowiedź „tak, od dawna” – 32,5% oraz „tak, niedawno w nowelizacji ustawy o jakości handlowej artykułów rolno – spożywczych pojawiła się definicja artykułu rolno – spożywczego zafałszowanego” – 15,0% (Tab. 1).

Następnie poproszono respondentów o wskazanie kar, jakie mogą być nakładane na nieuczciwych producentów. Respondenci głównie wskazywali, że według nich producentom fałszującym swoje produkty można zakazać wprowadzania do obrotu artykułu nie spełniającego wymagań jakości handlowej – 76,0% odpowiedzi, jak również, że producentom manipulującym autentycznością grożą kary pieniężne – 74,5% odpowiedzi. Zdanie to podzielali w podobnym stopniu respondenci reprezentujący wszystkie poziomy wykształcenia.

Tabela 1. Wiedza respondentów o przepisach prawnych dotyczących produktów żywnościowych zafałszowanych

Pytanie	Wykształcenie [%]				
	Podstawowe	Zawodowe	Średnie	Wyższe	Ogółem
Czy według Pana/Pani istnieją przepisy prawne dotyczące produktów zafałszowanych?	$\chi^2 = 108,627$ $\chi_a^2 = 16,919$				
Tak, od dawna	21,4	17,8	25,3	32,5	24,5
Tak, niedawno w nowelizacji ustawy o jakości handlowej artykułów rolno - spożywczych pojawiła się definicja artykułu rolno - spożywczego zafałszowanego	0	8,9	10,3	15	9,5
Nie	78,6	4,4	4,6	7,5	15,5
Nie wiem	0	68,9	59,8	45	50,5

Kolejne pytanie dotyczyło instytucji zajmujących się kontrolą zafałszowań żywności. Większość konsumentów uważa, że autentyczność żywności jest kontrolowana przez Inspekcję Jakości Handlowej Artykułów Rolno – Spożywczych – 68,0% odpowiedzi. Nieliczna grupa badanych wskazywała na Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa jako instytucję zajmującą się badaniem jakości żywności – 5,5% odpowiedzi.

Następnie respondenci mieli odpowiedzieć na pytanie, czy słyszeli w mediach informacje o produktach zafałszowanych. Aż 85,0% badanych zgodnie stwierdziło, że nie słyszało takich informacji.

Respondenci, którzy odpowiedzieli twierdząco zostali zapytani (w jedynym otwartym pytaniu w całym kwestionariuszu), o jakich produktach zafałszowanych słyszeli. Wskazali oni następujące grupy produktów: produkty mięsne – 80,0 % odpowiedzi, soki owocowe – 60,0% odpowiedzi, produkty mleczarskie – 43,3% odpowiedzi, alkohole – 23,3% odpowiedzi, sery – 16,7% odpowiedzi, czekolada – 10,0% odpowiedzi i masło – 3,3% odpowiedzi.

W następnym pytaniu poproszono respondentów o wskazanie, jaką według nich żywność spożywano dawniej. Według uzyskanych danych 60,0% respondentów odpowiedziało, że dawniej jedzenie było smaczne, zdrowe, niezafałszowane. Kilkanaście procent ogółu badanych – 16,0% nie miało zdania na ten temat, zaś 13,5% konsumentów uważało, że dawniej jedzenie było smaczne, zdrowe mimo, iż wiele produktów było zafałszowanych. Niewielki procent badanych - 10,5% wybierał odpowiedź: „nie widzę różnicy między żywnością spożywaną dawniej a tą, którą spożywam dzisiaj – ona była i jest zafałszowana tylko sposoby się zmieniły”.

Kolejne pytanie było następujące: „Czy według Pana/Pani we wszystkich produktach żywnościowych można wykryć wszystkie manipulacje autentycznością?”

Z zaznaczonych odpowiedzi wynika, że 38,0% respondentów twierdzi, że można wykryć wszystkie zafałszowania żywności niezależnie od badanego produktu. Spośród ankietowanych 29,0% nie ma zdania na ten temat. Jedynie 20,0% konsumentów uważało, że nie można wykryć wszystkich manipulacji autentycznością, ponieważ pomimo rozwoju metod, które umożliwiają wykrycie zafałszowań, pojawiają się nowe sposoby fałszowania. Najmniej liczna grupa pytanych – 13,0% wybrała odpowiedź „można wykryć wszystkie zafałszowania, ale tylko w niektórych produktach”.

Następnie zapytano respondentów o znajomość metod, które są wykorzystywane do wykrywania zafałszowań produktów żywnościowych. Stwierdzono, że 75,0% ankietowanych nie słyszało o takich metodach. Wyniki analizy statystycznej wykazały, że poziom wykształcenia respondentów miał w tym przypadku istotny związek z wiedzą badanych na temat metod, które są wykorzystywane do wykrywania zafałszowań produktów żywnościowych (tab. 2). Znacząca większość respondentów w każdej grupie reprezentującej poszczególne poziomy wykształcenia wskazywała, że nie słyszeli oni o metodach wykorzystywanych do wykrywania zafałszowań żywności, przy czym typowało tak aż 84,4% konsumentów posiadających wykształcenie zawodowe. Najwięcej badanych deklarujących wykształcenie średnie słyszało o metodach pozwalających kontrolować autentyczność żywności - 35,6%.

Respondentom, którzy odpowiedzieli twierdząco na pytanie o metody wykrywania zafałszowań znane są metody: chromatograficzne – 56,0% odpowiedzi, izotopowe – 40,0% odpowiedzi, immunologiczne – 34,0 % odpowiedzi, biologiczne – 28,0% odpowiedzi, biologii molekularnej – 18,0% odpowiedzi, spektralne – 16,0% odpowiedzi oraz elektroforetyczne – 8,0% odpowiedzi (tab.2).

Następnie zapytano respondentów o ich pogląd na temat celu fałszowania żywności przez producentów. Ankietowani głównie wskazywali na chęć osiągnięcia zysku przez nieuczciwych producentów – 50,0% odpowiedzi. Ponadto konsumenci twierdzili, że nieuczciwi producenci fałszują swoje produkty nie tylko w celu osiągnięcia zysku, ale również ukrycia prawdziwego pochodzenia produktu oraz jego niewłaściwej jakości i składu – 41,5% odpowiedzi.

Kolejne pytanie dotyczyło poglądu respondentów na temat grup ludzi ponoszących skutki fałszowania żywności. Według uzyskanych danych, 49,0% pytanych twierdzi, że skutki fałszowania żywności ponoszą zarówno konsumenci kupujący zwykle mniej wartościowe, zafałszowane produkty, jak również producenci, którzy produkują wartościową żywność, ale przegrywają z nieuczciwymi konkurentami. Niewiele mniejsza grupa badanych – 44,5% uważa, że konsekwencje fałszowania odczuwają tylko konsumenci, natomiast 6,0%

respondentów twierdzi, że tylko producenci ponoszą skutki fałszerstw. Dla 0,5% badanych nikt nie ponosi skutków fałszowania żywności. Taką odpowiedź wybrały osoby posiadające wykształcenie średnie, którzy jako jedyni wskazali tę odpowiedź.

Tabela 2. Wiedza respondentów o metodach wykorzystywanych do wykrywania zafałszowań produktów żywnościowych

Pytanie	Wykształcenie				
	Podstawowe	Zawodowe	Średnie	Wyższe	Ogółem
Czy słyszał Pan/Pani o metodach wykorzystywanych do wykrywania zafałszowań produktów żywnościowych?	$\chi^2 = 9,348$ $\chi_a^2 = 7,815$				
	[%]				
Tak	17,9	15,6	35,6	17,5	25
Nie	82,1	84,4	64,4	82,5	75
Jakie Pan/Pani zna metody?	[% odpowiedź]				
Izotopowe	40	42,9	35,5	57,1	40
Chromatograficzne	40	14,3	64,5	71,4	56
Spektralne	20	0	19,4	14,3	16
Elektroforetyczne	20	0	3,2	28,6	8
Immunologiczne	40	71,4	22,6	42,9	34
Biologii molekularnej	20	14,3	16,1	28,6	18
Biologiczne	40	42,9	22,6	28,6	28

W trzeciej części ankiety respondenci odpowiadali na pytanie o ich pogląd na temat fałszowania różnych produktów żywnościowych. Następnie ci respondenci, którzy twierdzili, że dane produkty są fałszowane, mieli wskazać najczęściej praktykowane sposoby fałszowania tych produktów, a w przypadku napojów alkoholowych – również rodzaje fałszowanych alkoholi.

Ankietowani udzielając odpowiedzi na pytanie: „Jak Pan/Pani uważa – czy soki owocowe są fałszowane?” w większości zaznaczali odpowiedź „tak, są fałszowane” – 93,0%. Jako najczęściej praktykowane sposoby fałszowania tej grupy produktów zaznaczali: dodawanie cukru – 75,3% odpowiedzi i dodawanie wody – 69,9% odpowiedzi. Ponadto konsumenci twierdzą, że zamiast soku świeżego, wyciśniętego z owoców, sok powstaje poprzez rozcieńczenie koncentratów soków owocowych, o czym producent nie zawsze informuje – 63,4% odpowiedzi.

Dalej respondenci mieli wyrazić swoją opinię na temat fałszowania napojów alkoholowych. Na to pytanie 74,0% badanych odpowiedziało twierdząco. Przeprowadzone badania wykazały, że według ankietowanych najczęściej fałszowanymi alkoholami są: wina – 64,6% odpowiedzi, napoje winopodobne – 57,1% odpowiedzi, piwa – 52,4% odpowiedzi, wódki gatunkowe – 40,1% odpowiedzi, spirytus – 34,0% odpowiedzi, likiery – 21,8% odpowiedzi oraz szampan – 19,7% odpowiedzi. Wszystkie grupy respondentów podobnie wskazywały, że producenci fałszują napoje alkoholowe głównie poprzez: dodawanie barwników – 67,6% odpowiedzi, dodatek wody – 58,1% odpowiedzi, mieszanie drogich gatunków alkoholi z tańszymi, mniej znanymi markami – 49,3% odpowiedzi, dodatek cukru – 43,2% odpowiedzi, dodawanie mikroorganizmów przyspieszających dojrzewanie, np. do wina – 42,6% odpowiedzi, dodatek etanolu – 35,8% odpowiedzi, jak również podawanie nieprawdziwych informacji na temat odmiany i pochodzenia surowców wykorzystywanych do produkcji – 35,1% odpowiedzi.

W następnym pytaniu respondenci mieli wskazać, czy według nich miody należą do grupy produktów fałszowanych. Wśród ogółu badanych zdecydowana większość – 76,0% udzieliła odpowiedzi twierdzącej. Z zaznaczanych odpowiedzi wynika, że do najczęściej wykorzystywanych sposobów fałszowania miodów według ankietowanych należą: podawanie nieprawdziwej informacji na temat pochodzenia botanicznego miodu – 62,1% odpowiedzi, dodawanie syropu cukrowego, melasy, skrobi, syropu ziemniaczanego – 54,2% odpowiedzi oraz dodawanie cukru trzcinowego, kukurydzianego, buraczanego – 51,0% odpowiedzi.

Następnie ankietowani udzielali odpowiedzi na pytanie: „Czy według Pana/Pani oleje, tłuszcze i masło są fałszowane?” Generalnie respondenci wskazywali na odpowiedź: „tak”- 81,5%. Przeprowadzone badania wykazały istotne statystyczne różnice w poglądach ankietowanych reprezentujących wszystkie poziomy wykształcenia na temat fałszowania wymienionych produktów (tab. 3). Spośród ankietowanych posiadających wykształcenie zawodowe 91,1% uważa, że oleje, tłuszcze i masło są fałszowane, podczas gdy 27,6% respondentów deklarujących posiadanie wykształcenia średniego twierdzi, że te produkty nie są fałszowane. Respondenci uważali, że nieuczciwi producenci najczęściej dodają tańsze oleje lub tłuszcze zwierzęce do olejów roślinnych – 72,4% odpowiedzi. Według ankietowanych do innych metod fałszowania wymienionych produktów należą: dodatek tańszych olejów roślinnych do oliwy z oliwek – 54,6% odpowiedzi, dodatek oleju słonecznikowego lub tłuszczu palmowego do tłuszczu mlecznego, wykorzystywanego do produkcji masła – 47,9% odpowiedzi, dodatek wody do masła – 37,4% odpowiedzi, czy też dodatek łoju lub smalcu do tłuszczu mlecznego, z którego produkuje się masło – 34,4% odpowiedzi (Tab. 3).

Kolejne pytanie dotyczyło występowania zafałszowań wśród produktów mlecznych i serowarskich oraz najczęściej stosowanych metod fałszowania tych produktów. Według uzyskanych danych 87,0% respondentów na pytanie o pogląd

na temat występowania zafałszowań wśród produktów mlecznych i serowarskich odpowiedziało twierdząco. Zdanie to podzielali w podobnym stopniu respondenci reprezentujący wszystkie poziomy wykształcenia. Jak wynikało z zaznaczonych odpowiedzi, według respondentów do najczęściej stosowanych sposobów fałszowania produktów mlecznych i serowarskich należą: dodatek wody do mleka – 69,5% odpowiedzi oraz dodawanie do serów substancji przyspieszających ich dojrzewanie – 64,4% odpowiedzi.

Tabela 3. Wiedza respondentów o zafałszowaniach olejów, tłuszczów i masła

Pytanie	Wykształcenie				
	Podstawowe	Zawodowe	Średnie	Wyższe	Ogółem
Czy według Pana/Pani oleje, tłuszcze i masło są fałszowane?	$\chi^2 = 8,806$ $\chi_a^2 = 7,815$				
	[%]				
Tak	85,7	91,1	72,4	87,5	81,5
Nie	14,3	8,9	27,6	12,5	18,5
Które sposoby fałszowania występują najczęściej?	[% odpowiedzi]				
Dodatek tańszych olejów lub tłuszczów zwierzęcych do olejów roślinnych	70,8	61	79,4	74,3	72,4
Otrzymywanie olejów poprzez ekstrakcję makuchów	4,2	12,2	15,9	11,4	12,3
Dodatek tańszych olejów roślinnych (sojowego, słonecznikowego) do oliwy z oliwek	66,7	48,8	52,4	57,1	54,6
Dodatek wody do masła	37,5	26,8	39,7	45,7	37,4
Dodatek oleju słonecznikowego lub tłuszczu palmowego do tłuszczu mlecznego, wykorzystywanego do produkcji masła	37,5	46,3	47,6	57,1	47,9
Dodatek łoju lub smalcu do tłuszczu mlecznego, wykorzystywanego do produkcji masła	20,8	43,9	44,4	14,3	34,4

Następnie zapytano respondentów o ich opinię, czy produkty mięsne należą do grupy fałszowanych produktów. Większość konsumentów – 92,5% uważa,

że produkty te są fałszowane. Respondenci z poszczególnych grup w podobnym stopniu podzielali to zdanie. Ankietowani twierdzą, że dodatek mięsa innego gatunku to najczęściej praktykowany sposób fałszowania – 76,8% odpowiedzi. Według nich równie często wykorzystywane metody to: niedeklarowany dodatek podrobów do produktów mięsnych – 62,2% odpowiedzi oraz zastępowanie w produkcji mięsnym białka zwierzęcego białkiem roślinnym – 50,3% odpowiedzi.

Wśród respondentów 75% osób uważa, że proceder fałszowania dotyczy również herbaty. Kolejne pytanie było następujące: „Jeśli uważa Pan/Pani, że proceder fałszowania dotyczy również herbaty proszę zaznaczyć, jakie metody fałszowania są według Pana/Pani często stosowane?” Spośród możliwych odpowiedzi respondenci najczęściej typowali takie sposoby jak: dodawanie liści pochodzących z innych roślin oraz łądyg – 82,0% odpowiedzi, dodatek obcych barwników – 54,0% odpowiedzi oraz dodatek wyekstrahowanej herbaty – 31,3% odpowiedzi.

W końcowej części badania poproszono respondentów o odpowiedź na pytanie: „Czy według Pana/Pani na półkach sklepowych można spotkać zafałszowane ryby, produkty zbożowe, kawę czy czekoladę?”. Większość badanych – 60,0% uważa, że proceder fałszowania nie omija wszystkich wymienionych grup produktów. Mniej liczna grupa ankietowanych – 30,5% twierdzi, że można spotkać zafałszowania, ale nie we wszystkich wymienionych produktach. Według tych konsumentów najczęściej fałszowanymi produktami są: czekolada – 75,4% odpowiedzi i kawa – 68,9% odpowiedzi. Niewielki procent badanych – 9,5% twierdzi, że ryby, produkty zbożowe, kawa i czekolada nie są fałszowane.

Wnioski

1. Większość odpowiedzi na pytania ankiety dotyczące zafałszowań żywności nie zależało od poziomu wykształcenia respondentów.
2. Istotnie więcej respondentów z wyższym wykształceniem wie o istnieniu przepisów prawnych dotyczących produktów zafałszowanych, deklarujących wykształcenie średnie słyszało o metodach wykrywania zafałszowań produktów żywnościowych oraz posiadających wykształcenie zawodowe uważa, że oleje, tłuszcze i masło są fałszowane.
3. Wiedza konsumentów na temat zafałszowań żywności jest niewystarczająca. Konieczne jest zapewnienie wszystkim konsumentom, niezależnie od poziomu wykształcenia, dostępu do rzetelnych informacji na temat jakości artykułów rolno – spożywczych. Istnieje potrzeba organizowania kampanii oraz promowania publikacji i programów poruszających kwestię zafałszowań żywności. Ważna jest również edukacja w zakresie umiejętności czytania etykiet zamieszczonych na opakowaniach produktów, aby konsument mógł świadomie dokonywać wyboru produktów żywnościowych.

Literatura

- [1] Ali M.E., Hashim U., Mustafa S., Che Man Y.B., Dhahi Th.S., Kashif M., Kamal Uddin Md., Abd Hamid S.B.: Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. *Meat Sci.*, 2012, 91, 454-459.
- [2] Dmowski P., Śmiechowska M.: Wykorzystanie włókna surowego do wykrywania zafałszowań w herbacie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 3 (58), 116-122.
- [3] Ferrari E., Focab G., Vignalic M., Tassia L., Ulrici A.: Adulteration of the anthocyanin content of red wines: Perspectives for authentication by Fourier Transform-Near InfraRed and ^1H NMR spectroscopies. *Anal. Chim. Acta*, 2011, 701, 139-151.
- [4] Fortuna T., Przetaczek I.: Metody wykrywania zafałszowań żywności. *Laboratorium*, 2005, 3, 38-40.
- [5] Gasparska R.: Zafałszowania artykułów spożywczych. *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, 2009, 1, 22-23.
- [6] Kowalska J., Bzducha A., Derewiaka D., Kopańska K., Nitek A.: Ocena autentyczności wybranych czekolad. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 4 (59), 74-79.
- [7] Krasnowska G., Salejda A.M.: Ocena wiedzy konsumentów na temat znakowania żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 1 (74), 173-189.
- [8] Monfreda M., Gobbi L., Grippa A.: Blends of olive oil and sunflower oil: Characterisation and olive oil quantification using fatty acid composition and chemometric tools. *Food Chem.*, 2012, 134, 2283-2290.
- [9] Nogala – Kałucka M., Pikul J., Siger A.: Zastosowanie chromatografii cieczowej w badaniach autentyczności masła. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 3 (58), 47-56.
- [10] Przetaczek – Rożnowska I., Rosiak M.: Wykrywanie zafałszowań żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2011, 2 (65), 20-24.
- [11] Sawicki W.: Nowelizacja ustawy o jakości handlowej artykułów rolno – spożywczych. *Przemysł Spożywczy*, 2009a, 2 (63), 6-11.
- [12] Sawicki W.: Fałszowanie żywności od czasów starożytnych do dziś. *Przemysł Spożywczy*, 2009b, 12 (63), 2-6.
- [13] Targoński Z.: Zafałszowania żywności i metody ich wykrywania. *Przemysł Spożywczy*, 2000, 6 (54), 9-11.
- [14] Targoński Z., Stój A.: Zafałszowania żywności i metody ich wykrywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, 4 (45) Supl., 30-40.
- [15] Tomaszewska – Gras J., Kijowski J.: Zastosowanie różnicowej kolorymetrii skaningowej DSC do oceny właściwości termodynamicznych miodu

- pszczelęgo i substancji stosowanych do jego fałszowania. *Nauka Przyroda Technologie*, 2010, 2 (4), 1-9.
- [16] Tuszyński T., Czernicka M.: Zafałszowanie żywności i napojów oraz metody ich wykrywania. *Laboratorium*, 2008, 7-8, 38-43.
- [17] Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Dz. U. 2006 r. Nr 171, poz. 1225
- [18] Ustawa z dnia 24 października 2008 r. o zmianie ustawy o jakości handlowej artykułów rolno – spożywczych oraz niektórych innych ustaw. Dz. U. 2008 r. Nr 214, poz. 1346.
- [19] Zachar P., Šoltés M., Kasarda R., Novotný J., Novikmecová M., Marcinčáková D.: Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mljekarstvo*, 2011, 61 (3), 199-207.
- [20] Zdrojewska I. (red.) Sprawozdanie roczne 2010 [on line], Agencja Reklamowo-Wydawnicza A. Grzegorzcyk, Warszawa, 2011 [dostęp: 2.07.2012.], <http://www.ijhars.gov.pl/pliki/biuletyn/2012/Sprawozdanie%20roczne%20IJHARS%202010.pdf>

OCENA TOWAROZNAWCZA PIWA JASNEGO Z PRODUKCJI WŁASNEJ I BROWARÓW REGIONALNYCH

KAMIL TOCZEK, PAWEŁ GLIBOWSKI, MARTA WESOŁOWSKA-
TROJANOWSKA, MATEUSZ MADYCZ

Streszczenie

Celem pracy było porównanie cech jakościowych wybranych piw jasnych pełnych z browarów regionalnych z piwami produkcji domowej. Przeprowadzone badania miały na celu ukazanie możliwości uzyskania w warunkach domowych piwa o takiej samej lub wyższej jakości niż piwo wytwarzane w browarach regionalnych. Ocenie towaroznawczej zostało poddane siedem piw, z których pięć pochodziło z browarów regionalnych a dwa zostały wyprodukowane w warunkach domowych. Wszystkie piwa poddano ocenie organoleptycznej i analizie fizykochemicznej. Głównym czynnikiem decydującym podczas selekcji piw z browarów regionalnych była staranność, aby każdy produkt pochodził z innego browaru i z innej części kraju. W badaniach dowiedziono, że w warunkach domowych możliwe jest otrzymanie piwa o bardzo dobrej jakości.

Słowa kluczowe: piwo domowe, piwo regionalne, jakość piwa

Wprowadzenie

Piwo jest jednym z najstarszych i najczęściej spożywanych napojów alkoholowych na świecie. Wielu autorów [Hornsey, 2003; Wiśniewski, 1993] podaje, że piwo istniało już 10 tysięcy lat temu. Według Polskich Norm piwem nazywamy napój otrzymywany w wyniku fermentacji alkoholowej brzeczki piwnej pod wpływem drożdży piwowarskich dolnej lub górnej fermentacji. Brzeczka jest produkowana ze słodu browarnego, chmielu i jego przetworów oraz wody, bez dodatków lub z dodatkiem surowców niesłodowanych, takich jak: jęczmień, pszenica, ryż, odtłuszczona kukurydza, cukier i syrop skrobiowy oraz dozwolonych substancji dodatkowych, takich jak: preparaty enzymatyczne i stabilizujące, karmel spożywczy, ekstrakty i kwasy [PN-A-79098:1995].

W ostatnich latach wśród społeczeństwa polskiego ujawnił się trend do poszukiwania nowych typów, smaków piwa oraz powrót do piw produkowanych według tradycyjnych metod i receptur. Zainteresowanie piwnymi nowościami wzrasta, natomiast stale powiększająca się wiedza konsumentów wywiera coraz większy wpływ na producentów piwa i stawia im wyższe wymagania. W Polsce obecnie istnieje pięć największych grup piwowarskich. Kompania Piwowarska, Grupa Żywiec, Carlsberg Polska, Royal Unibrew Poland oraz Van Pur. Oprócz grup piwowarskich funkcjonuje kilkadziesiąt browarów regionalnych a ich liczba

rośnie bardzo szybko [Strojny, 2009]. Obecnie niezmiennie ważnym segmentem na rynku polskim są browary restauracyjne oraz kontraktowe, które dzięki różnorodności gatunków, smaków i zapachów dają możliwość konsumentowi poznania piw, których dotychczas mogli tylko spróbować za granicą [Olkowski, 2013]. Z roku na rok browary urozmaicają swoją ofertę poprzez wprowadzanie nowych odmian i typów piw, co najbardziej było widoczne w roku 2012, który został uznany jako rekordowy pod tym względem [Gut, 2013].

Celem pracy było porównanie cech jakościowych wybranych piw jasnych pełnych z browarów regionalnych z piwami produkcji domowej. Praca została poświęcona tematyce piwa ze względu na to, że jest to najczęściej spożywany napój alkoholowy charakteryzujący się dużą rozpiętością typów, gatunków oraz smaków. Przeprowadzone badania miały na celu ukazanie możliwości uzyskania w warunkach domowych piwa o porównywalnej lub wyższej jakości niż piwo wytwarzane w browarach regionalnych. W niniejszej pracy zdecydowano się na przebadanie produktów z browarów regionalnych zamiast piw z dużych koncernów piwowarskich, gdzie proces produkcji jest bardziej skomplikowany i niemożliwy do powtórzenia w warunkach domowych.

Materiał i metody badań

Ocenie towaroznawczej zostało poddane siedem piw, z których pięć pochodziło z browarów regionalnych a dwa zostały wyprodukowane w warunkach domowych. Głównym czynnikiem decydującym podczas selekcji piw z browarów regionalnych była staranność, aby każdy produkt pochodził z innego browaru i z innej części kraju.

Piwa wyprodukowane w warunkach domowych:

Piwo domowe numer 1, które zostało wyprodukowane w miesiącu grudniu 2013 roku. Do produkcji 20 dm³ piwa użyto 3,5 kg słodu pilzneńskiego i 0,5 kg monachijskiego. Piwo domowe numer 2 zostało wyprodukowane w styczniu 2014 roku. Do wyprodukowania 20 dm³ piwa wykorzystano 4,0 kg słodu pilzneńskiego oraz 0,5 kg słodu karmelowego. Założeniem było, by poszczególne etapy produkcji piwa domowego numer 1 i 2 były jak najbardziej zbliżone i w możliwie higienicznych warunkach. Dlatego zdecydowano się na jednolitą metodykę i aparaturę. Poza innym zestawem słodów, zmieniono sposób chmielenia i rodzaje użytych chmielów.

Do dezynfekcji aparatury wykorzystano alkoholowy środek dezynfekcyjny (Desprej) oraz 2% roztwór pirosiarczynu sodu. Aparaturę wykorzystaną do produkcji tych piw dobrano z powszechnie dostępnych źródeł i specjalistycznych sklepów piwowarskich. Prawidłowość poszczególnych procesów warzenia piwa sprawdzano przy użyciu termometru piwowarskiego ze szkła hartowanego, płynu Lugola oraz areometru wyskalowanego w stopniach Ballinga. Miało to na celu

pokazanie, że możliwe jest wyprodukowanie dobrej jakości piwa bez dużych nakładów finansowych.

Etap zacierania przeprowadzono w garze zaciernym ze stali nierdzewnej o pojemności 40 dm³ z pokrywą, przy pomocy taboretu gazowego. Przy produkcji piw zdecydowano się na kilka przerw temperaturowo-czasowych. Pomiar temperatury wykonywano zawsze na dokładnie wymieszanym zacierze, w 5 minutowych odstępach z pomocą termometru piwowarskiego. Ześrutowany słód wymieszano w 12 dm³ wody o temperaturze 53°C. Następnie po ustabilizowaniu temperatury do 50°C zacierano przez 20 min. Dolewając 3 dm³ wody o temperaturze 80°C i podgrzewając podniesiono temperaturę zacieru do 64°C i utrzymywano ją przez 30 minut. Ostatecznie podgrzano produkt do 70°C i kontynuowano zacieranie przez kolejne 30 min. Po pobraniu próbki w celu przeprowadzenia próby jodowej za pomocą płynu Lugola, podgrzano zacier do 77°C i przeniesiono do kolejnego pojemnika.

Etap wysładzania przeprowadzono przy użyciu fermentora o pojemności 31,5 dm³ wraz z wkładem filtracyjnym z tworzywa sztucznego. Do wysładzania użyto wodę utrzymywaną w stałej temperaturze 78 °C, w efekcie uzyskano 23 dm³ brzeczki. Zacier nie był dogrzewany w czasie wysładzania.

Brzeczki dwóch wyprodukowanych piw gotowano przez 80 min, jednak proces chmielenia był różny. W przypadku piwa domowego numer 1 zastosowano granulaty chmielowe w ilości 30 g Chmielu Lubelskiego (3,5 % a-kwasów) i 50 g Chmielu Marynka (10,5% a-kwasów). Dodano 40 g Chmielu Marynka po 10 minutach od rozpoczęcia gotowania. Następnie po 40 minutach gotowania dodano 10 g Chmielu Marynka i 10 g Chmielu Lubelskiego. 10 minut przed końcem gotowania użyto 20 g Chmielu Lubelskiego. Piwo domowe numer 2 chmielono granulatem chmielowym w ilości 100g Chmielu Lubelskiego (3,5% a-kwasów), gdzie pierwszą dawkę chmielu 50 g dodano po 10 minutach od rozpoczęcia gotowania, drugą 25 g po 65 minutach. Ostatnie 25 g dodano 5 minut przed końcem gotowania. Następnie brzeczki chmieloną schłodzono do 23°C, przy pomocy miedzianej chłodnicy zanurzeniowej.

Fermentację poszczególnych piw przeprowadzono z użyciem 11,5 g suchych drożdży dolnej fermentacji Fermentis W-34/70 w fermentorach z pokrywą o pojemności 31,5 dm³ o kształcie cylindra z płaskim dnem, wykonanych z tworzywa sztucznego. Fermentory z rurką fermentacyjną zostawiono w niespecjalistycznych komorach, ze stałą temperaturą 10 °C. W komorę wbudowany był sterownik cyfrowy i termometr do pomiaru temperatury. Łączny czas fermentacji wyniósł 28 dni w fermentorze. W celu nagazowania piwa, przed przelaniem do butelek dodano glukozę w ilości 7 g/dm³ produktu. Piwo zabutelkowano w butelki szklane o pojemności 0,5 l z zamknięciem na kapsel. Dodatek glukozy w tej ilości pozwolił na wytworzenie bogatej piany i oczekiwanego przez konsumentów nagazowania produktu gotowego. Wyroby gotowe przechowywano przez okres dwóch miesięcy, aż do rozpoczęcia badań.

Do momentu rozpoczęcia badań. Piwo domowe numer 1 było leżakowane w butelkach, w temperaturze od 10 do 12 °C przez okres 36 dni. Natomiast piwo domowe numer 2 przechowywano w temperaturze od 8 do 12 °C przez okres 32 dni.

Ocena towaroznawcza piw jasnych pełnych składała się z oceny organoleptycznej oraz oceny fizykochemicznej. Podczas oceny organoleptycznej oceniany został smak, zapach, smakowość, nasycenie i goryczka. Ocena organoleptyczną oparto na metodzie punktowej gdzie każdy parametr jakości piwa oceniano w sześciopunktowej skali a następnie określono ogólną jakość każdego z piw. W badaniu wzięło udział 20 osób płci męskiej jak i żeńskiej w wieku od 18 do 25 lat. Każda z tych osób siedziała przy osobnym stoliku aby zapobiec jakiegokolwiek komunikacji między osobami oceniającymi.

Analiza fizykochemiczna została przeprowadzona w oparciu o Polską PN-A-79093:2000 gdzie zamieszczono szczegółowy opis wykonywania poniższych oznaczeń wraz ze wzorami. Wszystkie piwa przygotowane do analizy zostały odgazowane. W tym celu przeniesiono je do kolby o pojemności 500 cm³ i wymieszano w mieszadło magnetycznym przez 10 minut, w temperaturze pokojowej. Badane próbki piwa zostały przesączone przez bibułę filtracyjną do kolby o takiej samej pojemności.

Oznaczanie wartości pH

Zasada metody polegała na pomiarze różnicy potencjałów pomiędzy elektrodami zanurzonymi w badanej próbce. Do oznaczenia użyto zlewki o pojemności 50 cm³, pehametr oraz roztwór buforowy o pH równym 4. Na początku analizy pehametr został skalibrowany wobec roztworu buforowego w temperaturze 20 °C. Po zakończonej kalibracji końcówkę elektrody dokładnie opłukano wodą destylowaną i osuszono. Następnie napełniono zlewkę badaną próbką piwa o temperaturze 20 °C,

Oznaczanie kwasowości ogólnej

Zasada metody polega na miareczkowaniu próbki piwa o określonej objętości mianowanym roztworem wodorotlenku sodu do wartości pH równej 8. Do oznaczenia został użyty roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 mol/dm³, pehametr, zlewka o pojemności 50 cm³, pipeta o pojemności 25 cm³, mieszadło magnetyczne oraz biureta o pojemności 25 cm³.

Oznaczanie zawartości alkoholu, ekstraktu rzeczywistego i ekstraktu brzeczki podstawowej

Zasada metody polegała na oddestylowaniu alkoholu ze 100 cm³ odgazowanego piwa i oznaczeniu za pomocą piknometru gęstości destylatu oraz roztworu, który

pozostał w kolbie destylacyjnej, uzupełnionych wodą do objętości wyjściowych. Do oznaczenia użyto łaźni wodnej, kolbę destylacyjną o pojemności 500 cm³, zestaw destylacyjny, piknometr próżniowy, kolbę miarową o pojemności 100 cm³, wagę laboratoryjną oraz wagę analityczną. Zawartość ekstraktu rzeczywistego i alkoholu w badanej próbce odczytano na podstawie tablic, które są zawarte w Polskiej Normie, następnie obliczono ze wzoru zawartość ekstraktu brzeczki podstawowej.

Oznaczenia wskaźnika stabilności koloidalnej

Zasada metody polegała na obserwowaniu zmian w klarowności piwa w próbówce gdzie dodano 10 cm³ piwa. Następnie obserwowano zmiany zachodzące po dodaniu odpowiednich ilości nasyconego roztworu siarczanu amonowego. Za wynik przyjęto najmniejszą liczbę ml siarczanu amonowego, która spowodowała wyraźne zmętnienie piwa.

Oznaczenie barwy metodą spektrofotometryczną

Zasada oznaczenia polegała na pomiarze barwy badanej próbki za pomocą spektrofotometru przy długości fali $\lambda = 430$ nm. Do analizy użyto spektrofotometr z zakresem fal widzialnych, kuwety szklane 10 mm oraz pipetę o pojemności 5 cm³. Za wynik przyjęto średnią arytmetyczną z trzech oznaczeń dla tej samej próbki piwa, barwę w jednostkach EBC wyliczono ze wzoru zawartego w Polskich Normach.

Oznaczenie stopnia odfermentowania

Odfermentowanie wyliczono na podstawie zależności pomiędzy zawartością alkoholu i ekstraktu wyrażonych w procentach wagowych.

Analiza statystyczna

Cechy organoleptyczne i fizykochemiczne badanych piw regionalnych zostały porównane z piwem produkcji domowej stosując procedurę ANOVA. Zastosowano test rozstępu Studenta-Newmana-Keulsa. Analiz dokonano przy użyciu programu SAS Enterprise Guide 3.0.3.414.

Wyniki i dyskusja

Podczas oceny organoleptycznej uwzględniono pięć najważniejszych parametrów, które wpływają na ogólną jakość ocenianego piwa. Wyniki oceny badanych piw były bardzo zróżnicowane (Tab. 1). Najwyżej ocenianymi parametrami według skali były smak oraz smakowitość natomiast najmniej punktów w skali przypisano nasyceniu piwa dwutlenkiem węgla. Warto nadmienić, że żadne z wartości ocenianych piw nie spadły w skali poniżej poziomu dobrego. Porównując wartości badanych parametrów wykazano, że piwa produkcji domowej cechowały się istotnie ($p \leq 0,05$) wyższymi wartościami wszystkich badanych

parametrów oceny sensorycznej piwa niż piwa z browarów regionalnych. Wszystkie piwa z browarów regionalnych otrzymały ocenę dobrą a piwa produkcji domowej ocenę bardzo dobrą. Generalnie piwa wyprodukowane w warunkach domowych otrzymały wyższą ocenę od piw pochodzących z browarów regionalnych. W odniesieniu do oceny organoleptycznej można stwierdzić, że surowce użyte do produkcji badanych piw były wysokiej jakości. Głównym powodem występowania wad w piwie jest niska jakość surowców oraz błędy popełniane podczas produkcji. Do najczęstszych wad spowodowanych niską jakością surowców należą wady barwy, smaku, zapachu, pienistości i klarowności piwa [Kunze, 1996].

Tab. 1 Ocena sensoryczna badanych piw (jednostki przypisano punktom w skali 1 - 6 gdzie 1 to ocena zła a 6 bardzo dobra)

	Zapach	Smak	Smakowitość	Nasycenie	Goryczka	Ocena ogólna
Piwo regionalne nr 1	5,1	5,0	4,9	4,7	5,2	4,98
Piwo regionalne nr 2	5,2	5,1	5,0	4,9	5,0	5,05
Piwo regionalne nr 3	4,9	4,8	4,9	5,1	5,2	4,92
Piwo regionalne nr 4	4,9	4,9	4,7	4,8	5,1	4,84
Piwo regionalne nr 5	4,8	5,2	5,1	5,2	4,7	5,04
Piwo domowe nr 1	5,8*	5,7*	5,7*	5,4*	5,5*	5,66*
Piwo domowe nr 2	5,7*	5,7*	5,6*	5,5*	5,4*	5,62*

* Statystycznie istotne różnice dla danej cechy w stosunku do piw regionalnych przy $p \leq 0,05$

Zawartość alkoholu oznaczona w poszczególnych piwach (Tab. 2) była bardzo zróżnicowana ponieważ wahała się od 4,1 % do 5,7 % objętościowych. W przypadku piw z browarów regionalnych uzyskano istotnie wyższe wyniki ($p \leq 0,05$) niż w piwach wyprodukowanych w warunkach domowych. Najwięcej

alkoholu w analizowanych piwach zawierało piwo regionalne numer 1 natomiast najmniej alkoholu piwo domowe numer 2. Większa ilość alkoholu łączy się bezpośrednio z ilością surowca użytego podczas produkcji. Ekstrakt rzeczywisty piwa mieścił się w granicach od 2,3 % do 4,1 % wagowo. Najwyższy poziom ekstraktu rzeczywistego oznaczono w piwie domowym numer 1 natomiast najniższy wskaźnik odnotowano w piwie regionalnym numer 3. Wartość pH analizowanych próbek była bardzo zbliżona do siebie i pomiędzy piwami domowymi i regionalnymi nie wykryto istotnych różnic. Zawierały się w granicach od 4,32 do 4,75. Wyniki badań kwasowości ogólnej kształtowały się na bardzo niskim poziomie. Zakres odnotowanych wyników dla każdego piwa był bardzo wąski i wynosił od 0,40 do 0,48. Natomiast barwa piw jasnych pełnych ocenianych za pomocą spektrofotometru wahała się od 7,1 do 9,4 jednostek w skali EBC (European Brewery Convention). W przypadku piw handlowych jak i z produkcji domowej barwa nie odbiegała istotnie ($p \leq 0,05$) od ogólnie przyjętych norm dla piwa jasnego [Kunze, 1996]. Najmniej stabilnym koloidalnie piwem okazało się piwo regionalne numer 4 natomiast piwa produkcji domowej charakteryzowały się istotnie wyższą stabilnością. Wszystkie piwa z browarów regionalnych były mało stabilne koloidalnie. Prawidłowy proces produkcji i dobór odpowiednich surowców ma bardzo duży wpływ na jego stabilność. Piwo mętne w oczach konsumentów jest oznaką pogorszenia jakości [Kunze, 1996, Pasztaleniec, 2014]. Ostatnim parametrem ocenianym był stopień odfermentowania piwa. Piwa z browarów regionalnych wykazywały stopień odfermentowania w zakresie 73 - 82 % natomiast piwa wyprodukowane w warunkach domowych charakteryzowały się istotnie niższym ($p \leq 0,05$) stopniem odfermentowania, piwo domowe numer jeden uzyskało 64 % a piwo domowe numer dwa 61%. Prawdopodobnie wpływ na to miała wyższa temperatura zacierania, która przekłada się bezpośrednio na późniejszy stopień odfermentowania przez drożdże [Tse i in. 2003; Pazera i Rzemieniuk, 1998]. Odnosząc się do wyników uzyskanych w badaniu stopnia odfermentowania można stwierdzić, że potwierdzają one prawidłowość dotyczącą zawartości alkoholu, ponieważ w bardziej odfermentowanym piwie poziom alkoholu jest wyższy. W przypadku piw produkcji domowej stopień odfermentowania był niski czego konsekwencją jest niska zawartość alkoholu [Espinosa-Ramírez i in., 2014; Kunze, 1996]. Piwa produkowane przez browary regionalne mają wyższą ($p \leq 0,05$) zawartość alkoholu co wskazuje na wyższy stopień odfermentowania.

W pracy zdecydowano się na porównanie piw oferowanych przez browary regionalne, w których coraz częściej można zauważyć powrót do tradycji dawnego warzenia piwa z piwami domowymi. Wyniki badań są wyraźnym dowodem na to, że w warunkach domowych przy minimalnym nakładzie kosztów i podstawowego sprzętu można osiągnąć produkt bardzo wysokiej jakości czasem przewyższający produkty pochodzące z browarów regionalnych. Staranność i dokładność przy każdym z etapów pozwala na uzyskanie właśnie takiego produktu a gusta

obecnych konsumentów coraz częściej zmieniają się na korzyść właśnie piw domowych i piw regionalnych.

Tab. 2 Wyniki analizy fizykochemicznej dla piw z browarów regionalnych i produkcji domowej przeprowadzonej w oparciu o Polskie Normy.

	Piwo nr 1	Piwo nr 2	Piwo nr 3	Piwo nr 4	Piwo nr 5	Piwo domowe nr 1	Piwo domowe nr 2
Alkohol [% vol.]	5,7	5,2	5,5	5,3	5,4	4,7*	4,1*
Ekstrakt rzeczywisty [% vol.]	3,4	3,1	2,3	3,5	3,9	4,2	4,1
Brzeczka podstawowa [m/m]	11,7	11,4	10,9	11,9	11,1	12,6*	12,9*
pH	4,44	4,32	4,50	4,40	4,64	4,75	4,58
Kwasowość ogólna	0,42	0,40	0,45	0,47	0,46	0,45	0,48
Barwa [EBC]	8,9	8,2	7,5	8,3	9,4	7,6	7,1
Stabilność koloidalna	2,5	3,0	2,5	2,0	2,5	4,0*	4,0*
Stopień odfermentowania [%]	78	77	79	82	73	64*	61*

* Statystycznie istotne różnice dla danej cechy w stosunku do piw regionalnych przy $p \leq 0,05$

Wnioski

1. Wszystkie przebadane piwa spełniały wymagania zawarte Polskich Normach oraz zbiorze zasad European Brewery Convention.
2. Piwa produkowane w warunkach domowych charakteryzowały się wyższą jakością ogólną niż piwa produkowane przez browary regionalne.
3. Piwa produkowane przez browary regionalne miały znacząco wyższą zawartość alkoholu niż piwa domowe.
4. Zawartość alkoholu oraz ekstraktu brzeczki podstawowej deklarowanych na etykiecie przez producenta różniły się w granicach tolerancji od wartości otrzymanych podczas analizy fizykochemicznej.
5. Najbardziej stabilnymi koloidalnie piwami okazały się piwa z produkcji domowej.
6. W warunkach domowych możliwe jest otrzymanie piwa lepszego jakościowo od piwa regionalnego.

Literatura

- [1] Espinosa-Ramírez J., Perez-Carrillo E., O. Serna-Saldívar S.: Maltose and glucose utilization during fermentation of barley and sorghum lager beers as affected by b-amylase or amyloglucosidase addition, Journal of Cereal Science, 2014, 602–609.

- [2] Gut D.: Podsumowanie roku 2012 w branży piwowarskiej, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo – Warzywny*, 2013, 2, 10.
- [3] Hornsey I. S.: *A history of beer and brewing*, Royal Society of Chemistry, 2003, 742
- [4] Kunze W.: *Technology of Brewing and Malting*. VLB Berlin. 1996.
- [5] Olkowski A.: Piwa regionalne budują kulturę piwa w Polsce, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo – Warzywny*, 2013, 12, 2.
- [6] PN-A-79093:2000. Piwo; Metody Badań.
- [7] PN-A-79098:1995. Piwo.
- [8] Pasztaleniec G.: Stabilność fizykochemiczna piwa – wybrane aspekty praktyczne, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo – Warzywny*, 2014, 2, 20-24.
- [9] Pazera T., Rzemieniuk T.: *Browarnictwo*. WS i P, Warszawa. 1998.
- [10] Strojny A.: *Browary w Polsce*, Wydawnictwo Hachette Polska, Warszawa 2009.
- [11] Tse K.L., Boswell C.D., Nienow A.W., Fryer P.J.: Assessment of the effects of agitation on mashing for beer production in a small scale vessel. *Food and Bioproducts Processing*, 2003, 81, 3–12.
- [12] Wiśniewski P.: *Piwa historie niezwykle*. Warszawa: Print Shops PREGO, 1993, 38.

ANALIZA PRZEŻYWALNOŚCI BAKTERII *L. MONOCYTOGENES* W EKOLOGICZNYCH WĘDLINACH DOJRZEWAJĄCYCH W CZASIE PRZECHOWYWANIA

MONIKA TRZĄSKOWSKA, KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA, DANUTA
KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, MAŁGORZATA KURC, PAWEŁ KRAJMAS

Streszczenie

Celem pracy była analiza przeżywalności *L. monocytogenes* w ekologicznej, dojrzewającej kielbasie i wędzonce w czasie przechowywania w różnych temperaturach. W badaniu określono wpływ bakterii fermentacji mlekowej, temperatury i czasu przechowywania na przeżywalność patogenu, oraz zmiany pH badanych produktów. Materiał do badań stanowiły 3 rodzaje wędlin dojrzewających wyprodukowanych z dodatkiem serwatki kwasowej, a następnie zaszczepionych 3 różnymi szczepami *L. monocytogenes*. Kielbasa wieprzowa, wołowa i wędzonka wołowa były przechowywane w temperaturze: 3, 15 i 25°C. Oznaczono liczbę *L. monocytogenes*, bakterii fermentacji mlekowej i pH.

W badaniu stwierdzono obniżenie liczby *L. monocytogenes* we wszystkich wędlinach, w każdej z temperatur przechowywania, z wyjątkiem wędzonki wołowej przechowywanej w 15°C. Liczba bakterii fermentacji mlekowej była zróżnicowana i mieściła się w zakresie 6-8 log jtk/g. We wszystkich badanych wędlinach zaobserwowano istotny wzrost pH. Stopień przeżywalności *L. monocytogenes* nie zależał od rodzaju mięsa użytego do wytworzenia produktu fermentowanego. Stosowanie serwatki kwasowej z innymi naturalnymi konserwantami, może być skutecznym sposobem zapobiegania rozwojowi bakterii patogennych w ekologicznych fermentowanych produktach mięsnych.

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, bakterie fermentacji mlekowej, ekologiczne fermentowane wędliny dojrzewające

Wprowadzenie

Listeria monocytogenes jest jedną z najgroźniejszych bakterii patogennych występujących w żywności. Pałeczki *L. monocytogenes* wywołują infekcję, zwyczajowo nazywaną listeriozą. Jest to choroba charakteryzująca się wysokim odsetkiem przypadków śmiertelnych szczególnie wśród osób z grup ryzyka (m.in. noworodków i kobiet w ciąży). Z tego powodu kładzie się duży nacisk na kontrolę i zapobieganie jej występowaniu w żywności [Kołakowska i Madajczak, 2011; Gahan i Hill, 2014].

L. monocytogenes wykazuje wysoką oporność na wiele niekorzystnych warunków środowiska, takich jak niska temperatura, pH, czy wysokie stężenie soli. Ponadto charakteryzuje się zdolnością do formacji biofilmów. Ze względu na wysoką tolerancję w stosunku do kwasowych warunków środowiska, a także zdolność do wzrostu przy niskich wartościach aktywności wody, *L. monocytogenes* może rozwijać się w surowo dojrzewających produktach mięsnych. Tradycyjna produkcja polega na fermentacji węglowodanów przez bakterie fermentacji mlekowej (LAB), z wytworzeniem charakterystycznych związków: alkoholi, aldehydów, kwasu mlekowego i pirogronowego, ketonów czy kwasów karboksylowych. Ilość i rodzaj związków decyduje o jakości produktu i jego trwałości w trakcie przechowywania [Kołóżyn-Krajewska i Dolatowski, 2009; Kołóżyn-Krajewska i Dolatowski, 2012]. LAB charakteryzują się bardzo dobrą aktywnością przeciwdrobnoustrojową, m.in. dzięki zdolności do syntezy i wydzielania bakteriocyn, kwasu mlekowego, octowego i nadtlenu wodoru. W produkcji ekologicznych produktów mięsnych istnieje konieczność eliminacji stosowania chemicznych środków utrwalających, w tym azotanów. Z badań przeprowadzonych przez Dolatowskiego i in. [2013] wynika, że dodatek serwatki kwasowej, zawierającej LAB, do surowych dojrzewających produktów mięsnych, pozwala na uzyskanie wysokiej jakości mikrobiologicznej i akceptowalności sensorycznej omawianych produktów.

Celem przeprowadzonych badań była analiza przeżywalności bakterii patogennych *L. monocytogenes* w ekologicznej, surowej kielbasie i wędzonce dojrzewającej z dodatkiem serwatki w czasie przechowywania w różnych temperaturach.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiła surowa kielbasa dojrzewająca wieprzowa, wołowa i wędzonka wołowa. W technologii wszystkich badanych produktów zamiast tradycyjnej metody peklowania, zastosowano dodatek serwatki kwasowej. Mięso i serwatka do produkcji badanych wędlin pochodziły z gospodarstwa ekologicznego i zostały przetworzone w Katedrze Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Materiał do badań stanowiła mieszanina 3 szczepów *L. monocytogenes*, którą zakażane były analizowane produkty: ATCC 15313, 7644 i 19112.

Modelowa kielbasa surowo dojrzewająca charakteryzowała się następującym składem surowcowym: 80% chudej szynki, 20% twardej słoniny grzbietowej. Kielbasy poddawano osadzaniu, a następnie 21-dniowemu dojrzewaniu w 16°C i wilgotności względnej 65-85%. Podobny proces wytwarzania zastosowano w przypadku kielbasy wołowej. Wędzonka została wykonana z udźca wołowego. Po wydzieleniu kawałków mięśnia, surowiec włożono do naczynia z serwatką i moczo przez 24 h. Po wyjęciu z serwatki i ocieknięciu surowiec nacierano solą

i poddano procesowi naturalnej fermentacji mlekowej w 16°C i wilgotności względnej 65-85% przez 21 dni.

Wszystkie szczepy *L. monocytogenes* zostały poddane pasażowaniu. Kielbasy i wędzonka pokrojono w plastry i umieszczono w plastikowych workach z filtrem. Badane produkty zostały zaszczipione 0,1 ml zawiesiny *L. monocytogenes* (10^3 jtk/g). Zakażone produkty przechowywano w 3, 15 i 25°C. Wykonano 5 oznaczeń liczby *L. monocytogenes*: w próbach przechowywanych w 3°C wykonywano co 7 dni przez 30 dni, w 15°C – co 3 dni przez 12 dni, natomiast w 25°C – codziennie przez 4 dni. Wykonano trzy powtórzenia oznaczeń. Posiew mikrobiologiczny wykonywany był metodą powierzchniową, płytkową, na podłoże agarowe ALOA (Merck). Odczyt przeprowadzano po inkubacji płytek w 37°C przez 48 h.

Oznaczanie liczby LAB odbywało się pierwszego i ostatniego dnia badania w aparacie TEMPO® (bioMérieux). Inkubacja przebiegała w 37°C przez 48 h.

Pomiar kwasowości prób był wykonywany przy użyciu pH-metru SHOTT. Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykonano w programie Statistica 10.

Wyniki i dyskusja

Analiza przeżywalności bakterii *Listeria monocytogenes*

W przypadku kielbasy wieprzowej uzyskane wyniki, pozwalają stwierdzić, że w każdej z temperatur przechowywania liczebność *L. monocytogenes* zmniejszyła się, bądź uległa całkowitej redukcji w stosunku do dnia rozpoczęcia badania. Podczas badań mikrobiologicznych kielbasy wołowej uzyskane wyniki pokazują, że w każdej z temperatur przechowywania liczebność *L. monocytogenes* uległa całkowitej redukcji w stosunku do dnia rozpoczęcia badania, nawet przed jego ostatnim dniem. Natomiast przeżywalność *L. monocytogenes* w wędzonce wołowej nie charakteryzowała się jednoznacznym trendem. W przypadku temperatur 3°C i 25°C uległa ona zmniejszeniu, natomiast w 15°C była ona znacznie wyższa w stosunku do początkowej wartości (Tab. 1).

Analiza statystyczna wykazała, że liczba patogenu w przebadanych produktach mięsnych nie różni się znacząco od siebie, w zależności od rodzaju mięsa wykorzystanego do wytworzenia produktu fermentowanego ($p > 0,05$). Ponadto wykazano, że liczba bakterii *L. monocytogenes* uległa znaczącej zmianie po każdym z okresów przechowywania ($p < 0,05$).

Badane wędliny zostały wytworzone z surowców ekologicznych bez dodatku chemicznych środków utrwalających. Można przypuszczać, że w niektórych przypadkach jedynie obniżenie liczby bakterii *L. monocytogenes*, lub jej wzrost mogły być spowodowane niedostatecznym działaniem naturalnych konserwantów, w tym bakterii fermentacji mlekowej, które prawdopodobnie z powodu niekorzystnych warunków do ich prawidłowego rozwoju, nie zdołały całkowicie zahamować wzrostu patogenu. W związku z tym, do całkowitej inaktywacji

L. monocytogenes, przy ciągłym zachowaniu zasad produkcji wędlin ekologicznych można stosować serwatkę zawierającą bakterie LAB wspólnie z innymi naturalnymi składnikami wykazującymi działanie antagonistyczne względem patogenu, takimi jak lizozym, czy ekstrakty roślinne, w tym ziołowe. Ponadto, określone szczepy LAB o właściwościach bakteriobójczych w stosunku do *L. monocytogenes*, posiadają zdolność do przeżycia w warunkach panujących w fermentowanych produktach mięsnych. Są to między innymi *Lactobacillus sakei* Lb3 i *Pediococcus acidilactici* PA-2, a także *Lb. curvatus* i *Lb. reuteri* [Walczycka, 2005; Kołożyn-Krajewska i Dolatowski, 2009].

Tabela 1. Średnia liczba bakterii *L. monocytogenes* w badanych produktach mięsnych w czasie przechowywania

	Temperatura przechowywania	Numer oznaczenia / Średnia liczba bakterii [log jtk/g]				
		1	2	3	4	5
Kiełbasa wieprzowa	3°C	2,54±0,14	2,17±0,09	2,07±0,01	1,16±0,15	1,39±0,21
	15°C	2,54±0,14	2,02±0,08	1,25±0,52	0,05±0,30	0,00
	25°C	2,54±0,14	2,24±0,16	1,86±0,05	1,61±0,11	1,46±0,08
Kiełbasa wołowa	3°C	3,01±0,18	2,70±0,10	2,30±0,02	1,66±0,02	0
	15°C	3,01±0,18	2,37±0,21	1,12±0,45	0	0
	25°C	3,01±0,18	2,57±0,24	0	0	0
Wędzonka wołowa	3°C	2,22±0,30	1,32±0,15	1,25±0,10	1,09±0,13	1,16±0,31
	15°C	2,22±0,30	1,30±0,07	0,89±0,62	2,19±0,10	3,64±0,13
	25°C	2,22±0,30	1,35±0,39	0,95±0,32	1,12±0,23	0,74±0,53

Badania przeprowadzone przez Barazi i Erkmen [2008] na fermentowanej wołowej kiełbasie dojrzewającej typu sucuk z dodatkiem mieszaniny kultur *P. acidilactici*, *St. carnosus* i *Lb. plantarum* wykazały, że po 20-dniowym przechowywaniu produktu w 4°C, liczba bakterii *L. monocytogenes* obniżyła się z wartości początkowej 6,06 log jtk/g, do średnio 1,19 log jtk/g z przebadanych próbek. Jedynie w przypadku kiełbasy przechowywanej w atmosferze o 100% zawartości dwutlenku węgla, nastąpiła całkowita inaktywacja patogenu po okresie przechowywania.

Podobne badania zostały również przeprowadzone przez Työppönen i in. [2003]. Fermentowana kiełbasa dojrzewająca wykonana z mięsa wołowego i wieprzowego z dodatkiem kultur *Lb. rhamnosus* LC-705, *Lb. rhamnosus* E-97800, *Lb. plantarum* ALC01, a także *P. pentosaceus* RM2000, została

zaszczepiona *L. monocytogenes* w liczbie 3 log jtk/g. Pomiaru były wykonywane co 7 dni. Po 21 dniach przechowywania w 17°C, nastąpiła całkowita inaktywacja patogenu w badanych próbkach.

Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Hampikyan i Ugur [2007], określano wpływ LAB, a zwłaszcza rodzaju *L. lactis* posiadającej zdolność do produkowania bakteriocyny nizyny, na rozwój *L. monocytogenes* w tureckiej, wołowej kielbasie fermentowanej typu sucuk. Do badania został użyty szczep *L. monocytogenes* ATCC 7644. Początkowa liczba bakterii patogenu wahała się od 6,21 do 6,41 log jtk/g. Analizowane próbki kielbas zostały podzielone na 5 grup różniących się zawartością dodanej nizyny. Wykazano, że w dwóch ostatnich grupach zawierających najwięcej nizyny (50 i 100 µg/g), patogen uległ całkowitej inaktywacji, natomiast w pozostałych grupach liczba bakterii uległa częściowej redukcji i wyniosła w grupie kontrolnej 5,91 log jtk/g, natomiast w 3 kolejnych grupach, uszeregowanych od najmniejszej do największej zawartości nizyny, odpowiednio: 5,26, 3,84 i 3,32 log jtk/g. Dlatego stwierdzono, że LAB, dzięki swoim właściwościom bakteriobójczym (m.in. zdolności do produkcji bakteriocyn), stanowią skuteczną metodę hamowania rozwoju *L. monocytogenes*.

Analiza zmian pH w czasie przechowywania

Podsumowując wyniki zmian kwasowości w badanych produktach mięsnych stwierdzono, że w każdej próbie nastąpił wzrost pH, w różnych temperaturach i czasie przechowywania. Najbardziej znaczny wzrost odnotowano w wędzonce wołowej, w której odczyn kwasowy, wzrósł do odczynu zasadowego, natomiast najmniejszy w przypadku kielbasy wołowej (Tab. 2).

Analiza statystyczna wykazała, że pH uległo znaczącej zmianie po każdym z okresów przechowywania ($p < 0,05$). Stwierdzono, że pH pomiędzy kielbasą wieprzową i wołową, jak i kielbasą wieprzową i wędzonką wołową, jest statystycznie istotnie różne ($p < 0,05$). Jest to prawdopodobnie spowodowane różnymi typami mięsa o odmiennych wartościach pH. Z kolei w przypadku analizy produktów wykonanych z tego samego rodzaju mięsa (kielbasa wołowa i wędzonka wołowa), nie wykazano istotnych różnic ($p > 0,05$).

Wzrost pH został również zaobserwowany w badaniach Barazi i Erkmen (2008) w wołowej kielbasie dojrzewającej typu sucuk. W tym wypadku wartość pH zwiększyła się po 20 dniach przechowywania w 10-12°C. Wzrost pH, pomimo produkcji kwasu mlekowego przez LAB, mógł być spowodowany nagromadzeniem się azotu niebiałkowego oraz produktów przemian katabolicznych aminokwasów. Ponadto, wzrost pH mógł nastąpić na skutek gromadzenia się produktów reakcji proteolizy i lipolizy przeprowadzanych przez naturalnie występujące mikroorganizmy. Bardziej pożądanym zjawiskiem jest obniżenie pH, mający między innymi swój udział w hamowaniu rozwoju niekorzystnej mikroflory [Barazi i Erkmen, 2008; Fernandez-Lopez i in., 2008].

Tabela 2. Zmiany pH w badanych produktach mięsnych w czasie przechowywania

	Temperatura przechowywania	Numer oznaczenia				
		1	2	3	4	5
Kielbasa wieprzowa	3°C	5,3±0,06	5,5±0,06	5,4±0,01	5,6±0,06	6,1±0,06
	15°C	5,3±0,06	5,4±0,06	5,9±0,06	5,7±0,06	6,2±0,01
	25°C	5,3±0,06	5,4±0,06	5,6±0,06	5,5±0,06	5,6±0,06
Kielbasa wołowa	3°C	6,0±0,06	5,9±0,12	6,1±0,10	6,2±0,06	6,2±0,10
	15°C	6,0±0,06	6,0±0,01	6,3±0,17	6,6±0,06	6,7±0,12
	25°C	6,0±0,06	6,0±0,01	6,1±0,06	6,2±0,06	6,4±0,01
Wędzonka wołowa	3°C	5,7±0,12	5,6±0,01	6,1±0,06	7,1±0,06	7,7±0,10
	15°C	5,7±0,12	5,9±0,06	6,7±0,12	7,0±0,06	7,1±0,06
	25°C	5,7±0,12	5,7±0,06	6,0±0,10	6,5±0,12	6,7±0,25

Analiza przeżywalności LAB

Na podstawie przeprowadzonych badań kielbasy wieprzowej można stwierdzić, że początkowa liczba LAB wynosiła średnio 6,0 log jtk/g. W ostatnim dniu badawczym w produktach przechowywanych w 3°C i 15°C, liczba ta obniżyła się do wartości 4,0 log jtk/g. Tylko w przypadku temperatury 25°C liczba LAB w ostatnim dniu badawczym nie uległa zmianie i wyniosła 6,37 log jtk/g. W przypadku prób kielbasy wołowej również na początku okresu przechowywania liczba LAB utrzymywała się na poziomie średnio 6,0 log jtk/g produktu. W ostatnim dniu badawczym liczba ta wzrosła o jeden rząd logarytmiczny zarówno dla prób przechowywanych w 15°C i 25°C. Liczba LAB oznaczona w próbach wędzonki wołowej na początku okresu badawczego, jak i ostatniego dnia badawczego wynosiła średnio 8,0 log jtk/g produktu. Tylko w przypadku prób przechowywanych w 3°C liczba ta obniżyła się o jeden rząd logarytmiczny i wynosiła średnio 7,0 log jtk/g.

Wysoką liczbę LAB zaobserwowano również w badaniach przeprowadzonych przez Työppönen i in. [2003]. W dojrzewającej kielbasie wykonanej z mięsa wołowego i wieprzowego, liczba bakterii w ciągu 7-dniowej fermentacji w 22-24°C wzrosła z wartości 6,8-7,0 do 8,2-8,5 log jtk/g, a następnie utrzymywała się na tym poziomie przez cały okres trzytygodniowego dojrzewania.

Natomiast w innych badaniach odnotowano obniżenie się liczby LAB w wołowej kielbasie dojrzewającej typu sucuk, o 0,57-1,09 log podczas przechowywania w 4°C przez 20 dni. Początkowa liczba LAB wynosiła 5,56 log jtk/g [Barazi i Erkmen, 2008].

Utrzymywanie się na stałym poziomie lub wzrost liczby bakterii fermentacji mlekowej mógł być prawdopodobnie przyczyną skutecznej inaktywacji bakterii *L. monocytogenes* w obu badanych rodzajach kielbas, jak i wędzonce wołowej. Analiza korelacji pomiędzy liczbą bakterii *L. monocytogenes* a liczbą bakterii LAB wykazała, że w przypadku wędzonki wołowej występuje silny związek pomiędzy tymi dwiema zmiennymi. Z drugiej strony analiza wyników uzyskanych dla kielbas wykazała, że korelacja pomiędzy zmiennymi jest słaba. Z tego względu można stwierdzić, że znaczący wpływ na zależność pomiędzy tymi dwiema zmiennymi ma rodzaj analizowanego produktu mięsnego. Dlatego też, zależność pomiędzy liczbą bakterii patogenu a liczbą bakterii fermentacji mlekowej nie jest jednoznaczna. Obniżanie się liczby bakterii *L. monocytogenes* w przebadanych fermentowanych produktach mięsnych jest wynikiem działania kilku czynników (temperatura, czas, kwasowość środowiska), częściowo również bakterii fermentacji mlekowej.

Stwierdzenia i wnioski

1. Stwierdzono, obniżenie liczby bakterii *L. monocytogenes* we wszystkich badanych wędlinach w każdej z temperatur przechowywania (3, 15, 25°C), z wyjątkiem wędzonki wołowej przechowywanej w 15°C. Również w tym produkcie liczba bakterii fermentacji mlekowej utrzymywała się na najwyższym, stałym poziomie przez cały okres przechowywania (ok. 8 log jtk/g).
2. Nie stwierdzono istotnych różnic w przeżywalności *L. monocytogenes* pomiędzy analizowanymi wędlinami, stąd wniosek, że stopień przeżywalności patogenu nie zależy od rodzaju mięsa użytego do wytworzenia produktu końcowego.
3. We wszystkich badanych wędlinach zaobserwowano istotny statystycznie wzrost wartości pH.

Wniosek końcowy

Stosowanie serwatki kwasowej wspólnie z innymi naturalnymi konserwantami, jak i dobrze zoptymalizowanymi parametrami technologicznymi może być skutecznym sposobem w zapobieganiu rozwojowi bakterii *L. monocytogenes* w ekologicznych fermentowanych produktach mięsnych.

Praca została zrealizowana w ramach projektu MRiRW (PKre-029-29-29/13(688)) pod kierownictwem prof. dr hab. Zbigniewa Dolatowskiego.

Literatura

- [1] Barazi A., Erkmen O.: Survival of *Listeria monocytogenes* in Sucuk during Manufacturing and Storage Periods at Different Modified Atmosphere. Roumanian Biotechnological Letters, 2008, 13(5), 49-58.

- [2] Dolatowski Z.J., Karwowska M., Stadnik J., Stasiak D., Wójciak K., Solska E., Kołożyn-Krajewska D., Sionek B., Krajmas P., Paczkowska A.: Ekologiczne metody przetwórstwa mięsa i wyrobu produktów mięsnych bez stosowania dodatków azotanów i azotynów z uwzględnieniem wydłużania trwałości przechowalniczej tych produktów [w:] Wyniki badań z zakresu rolnictwa ekologicznego w 2012 roku, Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, 2013, 19-29.
- [3] Fernandez-Lopez J., Sendra E., Sayas-Barbera E., Navarro C., Perez-Alvarez J. A.: Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichon” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science*, 2008, 80, 410-417.
- [4] Gahan C. G. M., Hill C.: *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4(9), 1-7.
- [5] Hampikyan H., Ugur M.: The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). *Meat Science*, 2007, 76, 327-332.
- [6] Kołakowska A., Madajczak G.: Pałeczki *Listeria monocytogenes* w zakażeniach ludzi. *Przegląd Epidemiologiczny*, 2011, 65(1), 57-62.
- [7] Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z. J.: Probiotics in fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 2009, 8(2), 61-74.
- [8] Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J.: Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12), 1761-1772.
- [9] Työppönen S., Markkula A., Petaja E., Suihko M. L., Mattila-Sandholm T.: Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control*, 2003, 14, 181-185.
- [10] Walczycka M.: Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, 2(43), 61-72.

ZAWARTOŚĆ METALI CIĘŻKICH W ZBOŻACH KONSUMPCYJNYCH

JÓZEFA WIATER, PIOTR OFMAN

Streszczenie

Celem badań była ocena zawartości metali ciężkich w zbożach konsumpcyjnych pochodzących z gleb uprawnych Podlasia.

Ziarno roślin zbożowych pobrano w roku 2012 i 2013 roku z gleb bardzo lekkich i lekkich - 30 próbek oraz z średnich również 30 próbek. W próbkach roślin oznaczono zawartość cynku, miedzi, kadmu, niklu i ołowiu. Po zmieleniu ziarna odważono po 1 gramie każdej próbki i mineralizowano w obecności kwasu azotowego i nadtlenu wodoru (30%) w bloku mineralizacyjnym. Oznaczenia metali wykonano metodą absorpcyjnej spektroskopii atomowej z atomizacją elektrotermiczną aparatem Varian AA-100.

Stwierdzono, że zawartość metali w ziarnie roślin zbożowych zależała od kategorii agronomicznej gleb, gatunku zboża i roku uprawy. Wyższa zawartość większości metali wystąpiła w zbożach uprawianych na glebach średnich w porównaniu do zbóż z gleb lżejszych. W ziarnie pobranym w 2012 roku oznaczono większe ilości analizowanych metali, z wyjątkiem niklu. Większość ziarna zbóż spełniała normy zawartości metali ciężkich przewidzianych dla zbóż przeznaczonych na konsumpcję. Wysoka zawartość kadmu i niklu w części próbek ziarna zbóż ogranicza możliwość ich wykorzystania na cele konsumpcyjne, czego przyczyną jest kwaśny odczyn gleb i niska ich zasobność w fosfor. W celu ograniczenia fitoprzyswajalności metali z gleb, należy je wapnować i nawozić fosforem.

Słowa kluczowe: metale ciężkie, zboża, rośliny konsumpcyjne, gleby

Wprowadzenie

Metale ciężkie mogą przedostawać się do organizmu człowieka poprzez układ pokarmowy, oddechowy lub skórę. Skutki ich działania ujawniają się czasami po wielu latach [Järup, 2003]. Największa ilość metali śladowych dostaje się do organizmu ludzkiego wraz z pożywieniem pochodzenia roślinnego i zwierzęcego [Gambuś, 1997]. Mogą się one kumulować w organizmie, co prowadzi do ich chronicznej toksyczności [Sady, 2001]. Szczególnie wrażliwi na toksyczne działanie metali ciężkich są dzieci i ludzie chorzy [Gruca-Królikowska i Waclawek, 2006]. Głównym źródłem skażenia roślin uprawnych metalami ciężkimi (na obszarach wolnych od istotnych źródeł zanieczyszczeń atmosferycznych) jest gleba, a ich zawartość w niej zależy od koncentracji metali

w skale macierzystej, przebiegu procesów glebotwórczych [Gruca-Królikowska i Waclawek, 2006], a także od ilości i rodzaju nawożenia. Zachowanie metali ciężkich w układzie gleba - roślina jest zależne od chemicznej specjacji i dystrybucji form chemicznych metali w roztworze glebowym. To z kolei wpływa na dostępność i mobilność tych metali w glebie [Sabienė i in., 2004; Biernacka i Małuszyński, 2007].

Zboża i przetwory zbożowe są istotnym elementem diety człowieka i mogą być źródłem metali ciężkich. Najbardziej niebezpieczne dla ludzi są ołów i kadm, a nieco mniej nikiel, cynk i miedź.

Celem prowadzonych badań była ocena jakości ziarna roślin zbożowych zebranych z pól uprawnych Podlasia ze względu na zawartość w nich metali ciężkich.

Material i metody badań

Próbki ziarna roślin zbożowych pobrano w roku 2012 i 2013 z gleb lekkich i średnich, które głównie występują w woj. podlaskim. Pobrane próbki ziarna zbóż zostały zmielone i z każdej pobrano około 1 grama do analiz. Próbki mineralizowano w obecności kwasu azotowego i nadtlenu wodoru (30%) w bloku mineralizacyjnym. Oznaczenia kadmu, ołowiu, niklu, miedzi i cynku wykonano metodą absorpcyjnej spektroskopii atomowej z atomizacją elektrotermiczną aparatem Varian AA-100. Wyniki porównano do liczb proponowanych przez IUNG do oceny roślin pod względem ich przydatności [Kabata -Pendias i in., 1993]. Zawartości krytyczne metali dla roślin o przeznaczeniu konsumpcyjnym przedstawiają się następująco: kadm - 0,15, ołów - 1,0, nikiel - 10,0, miedź - 20,0, cynk - 50 mg·kg⁻¹ s.m., natomiast o przeznaczeniu paszowym: kadm - 0,5, ołów - 10,0, nikiel - 50,0, miedź - 50,0, cynk - 100,0 mg·kg⁻¹ s.m.

Omówienie badań

Zawartość analizowanych metali była zróżnicowana ze względu na gatunek uprawianych zbóż oraz kategorię agronomiczną gleb, a także rok uprawy. W 2012 roku spośród roślin uprawianych na glebach bardzo lekkich i lekkich, rośliny jare (mieszanka i owies) odznaczały się większą ilością kadmu i ołowiu niż rośliny ozime (żyto i pszenica) (tab.1). Ze względu na ilość kadmu, wśród 30 badanych roślin zbożowych pobranych w tym roku, tylko 10 można uznać za konsumpcyjne, w pozostałych zawartość tego metalu nie wykluczała ich z przeznaczenia paszowego (z wyjątkiem jednej próbki). Badane ziarno zbóż charakteryzowały niezbyt wysokie poziomy ołowiu, większość z nich spełniała wymogi określone dla roślin konsumpcyjnych, tylko 2 próbki przeznaczono do wykorzystania paszowego. Największe ilości niklu wystąpiły w ziarnie żyta i owsa, po 2 próbki każdego z tych zbóż nie spełniało kryterium przeznaczenia konsumpcyjnego.

Tab.1. Zawartość poszczególnych metali w ziarnie zbóż z gleb bardzo lekkich i lekkich

Mieszaneczka zbożowa (n-8)											
	Jednostka	I rok badań					II rok badań				
Pierwiastek	mg · kg ⁻¹ s.m.	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn
$\bar{x}$		0,31	0,59	4,57	2,56	33,88	0,09	0,71	10,31	2,18	24,96
Min		0,12	0,02	2,70	0,30	21,00	0,04	0,67	6,88	1,06	15,70
Max		0,71	1,06	6,60	5,00	41,76	0,24	1,12	12,98	4,99	32,18
Owies (n-8)											
	Jednostka	I rok badań					II rok badań				
Pierwiastek	mg · kg ⁻¹ s.m.	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn
$\bar{x}$		0,30	0,42	9,47	2,19	35,92	0,11	0,73	13,27	1,61	27,79
Min		0,11	0,04	6,23	1,33	26,78	0,02	0,47	8,53	0,91	22,84
Max		0,39	0,68	17,15	2,95	49,20	0,26	1,25	15,95	2,57	36,68
Pszenżyto ozime (n-7)											
	Jednostka	I rok badań					II rok badań				
Pierwiastek	mg · kg ⁻¹ s.m.	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn
$\bar{x}$		0,28	0,29	3,53	2,29	36,00	0,10	0,42	6,12	1,13	23,56
Min		0,13	0,21	3,45	1,33	25,64	0,10	0,09	3,65	0,96	21,84
Max		0,43	0,36	3,60	3,25	46,35	0,11	0,82	8,58	1,29	25,27
Żyto ozime (n-7)											
	Jednostka	I rok badań					II rok badań				
Pierwiastek	mg · kg ⁻¹ s.m.	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn
$\bar{x}$		0,25	0,17	11,50	3,39	28,97	0,08	0,66	12,15	1,58	27,21
Min		0,10	0,01	5,15	3,15	20,16	0,01	0,97	9,98	1,55	27,15
Max		0,35	0,29	23,80	3,53	35,17	0,15	1,22	14,05	1,60	27,27

Średnia zawartość miedzi i cynku w mieszaneczce, owsie i pszenżycie była na podobnym poziomie, natomiast ziarno żyta odznaczało się najwyższą ilością miedzi i najniższą cynku spośród badanych roślin. Zawartość tych metali w analizowanych zbożach była niska i wszystkie zboża spełniały kryteria ich przydatności do spożycia przez ludzi.

W ziarnie roślin pobranych w 2013 roku stwierdzono znacznie mniejsze ilości kadmu w porównaniu do ziarna z 2012 roku. We wszystkich gatunkach zbóż zawartość tego metalu była zbliżona, co sprawiło, że prawie w całości może być wykorzystane w celach konsumpcyjnych. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku ołowiu, w zbożach z 2013 roku ilości tego metalu były wyższe o 0,2 do 0,4 mg·kg⁻¹ s.m. w porównaniu do roku poprzedniego. Jednak w większości badanych zbóż poziomy ołowiu pozwalały zakwalifikować te rośliny do zbóż konsumpcyjnych (z wyjątkiem 4 próbek). Stwierdzono także różnice w zawartości

ołowiu pomiędzy ziarnem zbóż jarych i ozimych. Zawartość niklu w zbożach pobranych w 2013 roku była wyższa w porównaniu do ziarna pobranego w roku poprzednim, co spowodowało, że aż 12 próbek roślin może być jedynie wykorzystane na cele paszowe. Zboża z 2013 roku charakteryzowały mniejsze zawartości miedzi i cynku i spełniały normy ich przeznaczenia konsumpcyjnego.

Zawartość metali w ziarnie zbóż uprawianych na glebach średnich przedstawiono w Tabeli 2. Rośliny zbożowe pobrane w roku 2012 charakteryzowała podobna ilość kadmu jak zboża z gleb lekkich, ale mniejsze ilości tego metalu wystąpiły w roślinach jarych. Większość analizowanych zbóż spełniało normy dla roślin konsumpcyjnych, jednak 12 próbek, ze względu na podwyższoną zawartość kadmu, przeznaczono do wykorzystania paszowego. Rodzaj gleby nie różnicował znacząco poziomów ołowiu w analizowanych roślinach w pierwszym roku badań. Spośród badanych zbóż, trzy próbki o wyższej zawartości ołowiu zakwalifikowano do wykorzystania paszowego. W ziarnie pszenicy jarej zanotowano niemal dwukrotnie wyższe ilości niklu w stosunku do pozostałych zbóż, w których kształtowały się na zbliżonym poziomie. W większość roślin z gleb średnich zawartość niklu nie przekraczała $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m., co pozwala przeznaczyć je do celów konsumpcyjnych. Zawartość miedzi w badanych zbożach była niska, gatunek roślin nie różnicował znacząco tych ilości i wszystkie rośliny należy uznać jako konsumpcyjne. Analizowane ziarno zbóż z gleb średnich charakteryzowało się zróżnicowaną zawartością cynku (najmniej w pszenżycie). Tylko dwie próbki badanych roślin zawierało więcej niż $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m cynku i dlatego należy je wykorzystać na cele paszowe.

Zawartość metali w roślinach uprawianych na glebach średnich w 2013 roku była znacznie mniejsza niż w zbożach pobranych w pierwszym roku badań (z wyjątkiem niklu). Najwięcej kadmu zawierała pszenica jara, a w pozostałych zbożach jego ilość była średnio o połowę mniejsza. Ziarno zbóż zebrane w 2013 roku (z wyjątkiem 4 próbek), ze względu na zawartość tego metalu można wykorzystać w celach konsumpcyjnych. Poziom ołowiu w analizowanych zbożach pozwalał na zakwalifikowanie prawie wszystkich próbek do spożycia przez ludzi. Jedynym metalem, którego zawartość wzrosła dwukrotnie w stosunku do roku poprzedniego, był nikiel. W większości analizowanych roślin zbożowych ilość tego pierwiastka przekraczała $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m., co dyskwalifikowało je z przeznaczenia konsumpcyjnego, ale mogą być wykorzystane w celach paszowych. Zawartość miedzi w zbożach była niska i niewiele różniła się od jej poziomów w roślinach pobranych rok wcześniej. Najwięcej tego pierwiastka było w mieszance, a w pozostałych zbożach ilości były zbliżone. Nie zauważono różnic między zbożami ze względu na zawartość cynku. Wszystkie zboża pobrane w drugim roku badań z gleb średnich, ze względu na poziom miedzi i cynku, można uznać za konsumpcyjne.

Tab.2. Zawartość poszczególnych metali w ziarnie zbóż z gleb średnich

Mieszanka zbożowa											
	Jednostka	I rok badań					II rok badań				
Pierwiastek	mg·kg ⁻¹ s.m.	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn
$\bar{x}$		0,21	0,37	4,97	2,33	36,24	0,09	0,19	10,41	3,64	26,08
Min		0,05	0,07	1,15	0,05	12,96	0,06	0,07	4,88	0,66	19,02
Max		0,71	0,64	15,93	7,60	80,62	0,15	0,77	14,43	10,93	40,20
Pszenica ozima											
	Jednostka	I rok badań					II rok badań				
Pierwiastek	mg·kg ⁻¹ s.m.	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn
$\bar{x}$		0,35	0,85	4,63	2,14	40,75	0,07	0,41	9,37	1,55	22,95
Min		0,08	0,57	3,65	0,75	35,52	0,07	0,17	8,28	1,23	21,20
Max		0,43	1,12	5,60	3,53	45,97	0,08	0,65	10,45	1,86	24,70
Pszenżyto ozime											
	Jednostka	I rok badań					II rok badań				
Pierwiastek	mg·kg ⁻¹ s.m.	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn
$\bar{x}$		0,40	0,32	4,30	1,81	30,82	0,09	0,64	10,55	1,68	24,05
Min		0,12	0,01	4,20	1,18	25,89	0,03	0,08	8,53	0,74	20,53
Max		0,88	0,60	4,45	2,93	39,08	0,30	1,17	13,15	2,90	29,87
Pszenica jara											
	Jednostka	I rok badań					II rok badań				
Pierwiastek	mg·kg ⁻¹ s.m.	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Cu	Zn
$\bar{x}$		0,25	0,63	8,49	1,78	39,76	0,18	0,41	16,54	2,08	21,90
Min		0,12	0,56	3,23	1,35	36,68	0,13	0,22	10,78	1,53	20,61
Max		0,31	0,74	14,15	2,60	44,72	0,23	0,80	22,30	2,62	23,18

Dyskusja wyników

Bioprzyzwajalność pierwiastków zawartych w glebie zależy od jej odczynu, warunków oksydoredukcyjnych, składu granulometrycznego, zawartości substancji organicznej, wodorotlenków Fe, Mn, Al i mikroorganizmów, interakcji pomiędzy pierwiastkami, a także formy występowania pierwiastka oraz jego podatności do przechodzenia z fazy stałej do fazy ciekłej gleby. Pobranie pierwiastków, czy związków chemicznych przez rośliny z roztworu glebowego zależy również od pewnych czynników związanych z samą rośliną. Należą do nich: procesy fizyczne, takie jak penetracja profilu glebowego przez system korzeniowy, zmiany zawartości wody i jonów oraz związek tego procesu z kinetyką rozpuszczalności metali w glebie; parametry biologiczne, takie jak kinetyka transportu przez membrany, interakcje jonów, przeznaczenie metaboliczne pobranych jonów, czy zdolność roślin do adaptowania się do zmian narażenia na metale w środowisku [Cataldo i Wildung, 1978]. Różnice w zawartości poszczególnych metali

w analizowanych zbożach należy tłumaczyć zróżnicowanym odczynem gleb, z których pobrano próbki roślin. Większość gleb Podlasia jest kwaśna i bardzo kwaśna, co ma wpływ na zwiększoną akumulację kadmu, niklu i ołowiu przez badane zboża. Szczególnie ruchliwe w glebach są kadm, nikiel i cynk.

Kadm, pomimo że nie jest niezbędny roślinom do rozwoju, jest pobierany przez nie zarówno przez korzenie, jak i liście. Pierwiastek ten jest łatwo wchłaniany przez rośliny ze wszystkich elementów środowiska (gleba, woda, powietrze) [Węglarzy, 2007]. Wyniki zawartości metali ciężkich w ziarnie zbóż są zbliżone do rezultatów otrzymanych przez Kachenko i Singh [2006], którzy badali ziarno pszenicy i stwierdzili szeroki zakres zawartości kadmu $0,11 \div 0,73 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. Nawet w niewielkich dawkach kadm jest toksyczny dla zwierząt i ludzi, tak więc jego przenikanie do łańcucha pokarmowego jest bardzo niebezpieczne [Tomócsik i in., 2006]. Jest to metal, który łatwo ulega uruchomieniu pod wpływem zmian warunków środowiskowych [Broos i in. 2001], czego przykładem jest różnica w zawartości kadmu w zbożach zebranych w roku 2012 i 2013. Wyższe opady na terenie Podlasia w roku 2013 powodowały zwiększenie rozpuszczalności związków kadmu i tym samym wzrost jego akumulacji przez rośliny.

Czynnikami wyraźnie zwiększającymi fitoprzyswajalność ołowiu jest kwaśny odczyn gleby i wysoka temperatura otoczenia [Szatanik-Kloc, 2004]. Zwiększona zawartość ołowiu w części badanych zbóż spowodowana była przede wszystkim niskim odczynem gleb. System korzeniowy roślin pobiera Pb w sposób bierny i proporcjonalny do zawartości form rozpuszczalnych w podłożu.

Podobnie jak w przypadku innych metali ciężkich, dostępność niklu jest większa w glebach lekkich o dużej wilgotności, z niską zawartością materii organicznej i niskim pH roztworu glebowego [Seregin i Kozhevnikova 2006]. Dynamika niklu w glebie jest w dużym stopniu zdeterminowana przez reakcje wymiany jonowej [Kobierski i in. 2011; Uren, 1992, Zehetner i Wenzel, 2000] przy udziale minerałów ilastych, tlenków żelaza i manganu oraz materii organicznej. Niski odczyn gleb, na których uprawiano badane rośliny oraz niewielka zawartość próchnicy (najczęściej niższa niż 2%) jest przyczyną zwiększonej rozpuszczalności niklu oraz jego akumulacji w ziarnie zbóż. Nikiel w niskich stężeniach nie jest toksyczny dla roślin, natomiast nadmiar tego pierwiastka prowadzi do inhibicji znacznej ilości enzymów w roślinie, np. enzymów biorących udział w cyklu Calvina, biosyntezie chlorofilu [Van Assche i Clijsters 1990], metabolizmie azotu [Boussama i in., 1999] i siarczanów [Lee i Leustek, 1999]. Metal ten powoduje ponadto zaburzenia równowagi kationowo-anionowej w zielonych częściach roślin, w wyniku czego ulega zmianie metabolizm wapnia i żelaza oraz zaburzenia gospodarki wodnej w roślinie. Toksyczność niklu dla roślin objawia się w sposób typowy dla innych metali ciężkich, ale także w sposób charakterystyczny tylko dla tego metalu - następuje spowolnienie rozwoju korzeni bocznych roślin.

Dostępność cynku zawartego w glebie zależy od: pH, jego zawartości ogólnej, zawartości materii organicznej i węglanu wapnia, warunków redoks, aktywności mikrobiologicznej w ryzosferze, wilgotności gleby, zawartości w glebie innych metali śladowych i makroelementów (zwłaszcza fosforu), a także od warunków klimatycznych [Alloway, 2004]. Jest jednym z bardziej ruchliwych metali w glebie, a jego przyswajalność zależy od właściwości fizyczno-chemicznych gleb. Pobieranie cynku przez rośliny jest proporcjonalne do zawartości przyswajalnych jego form w glebie [Gambuś, 1997]. W badanych zbożach, ilość cynku nie odbiega znacząco od wyników innych autorów [Wiater, 2004; Właśniewski, 2002]. Niska zawartość fosforu w glebach Podlasia (ponad 60% gleb o bardzo niskiej i niskiej zasobności) przyczynia się do wzrostu przyswajalnych form cynku w glebach, a tym samym do jego fitoprzyswajalności przez rośliny zbożowe. Pierwiastek ten jest często pobierany przez rośliny w nadmiernych ilościach (pobranie jest z reguły proporcjonalne do stężenia w glebie), wykazując działanie toksyczne [Łukowski, 2006]. O dużej łatwości, z jaką rośliny pobierają Zn, świadczą wysokie współczynniki przenikania tego metalu w układzie gleba-roślina, np.: dla zbóż $0,53 \div 0,74$ [Maciejewska i Kwiatkowska, 2007].

Miedź jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Bierze udział w wielu procesach fizjologicznych, gdyż może istnieć na wielu stopniach utlenienia *in vivo* [Yrueła, 2005]. Jest składnikiem większości enzymów, bierze udział w powstawaniu chlorofilu, aminokwasów i białek, uczestniczy w procesie fotosyntezy, metabolizmie azotu oraz aktywuje wytwarzanie lipidów [Brazauskienė i in., 2002]. Niska zawartość miedzi w analizowanych zbożach związana jest z niską jej zawartością oraz niską mobilnością w glebach, na których uprawiano zboża. Najmniej miedzi w Polsce zawierają gleby piaszczyste bielcowe, a najwięcej ciężkie gleby gliniaste [Mocek, 2002]. Rośliny pobierają miedź w sposób aktywny, jak i pasywny.

Najważniejszym zabiegiem, który powinien być stosowany na glebach Podlasia celem ograniczenia fitoprzyswajalności szczególnie kadmu, niklu i ołowiu jest wapnowanie gleb oraz nawożenie fosforowe.

Wnioski

1. Zawartość metali w ziarnie roślin zbożowych zależała od kategorii agronomicznej gleb, gatunku zboża i roku uprawy.
2. Analizowane ziarno zbóż, w większości przypadków, spełniało normy zawartości metali ciężkich przewidziane dla roślin konsumpcyjnych.
3. Wysoka zawartość kadmu i niklu w części próbek ziarna zbóż ogranicza możliwość ich wykorzystania na cele konsumpcyjne.
4. Przyczyną wzrostu zawartości metali w ziarnie zbóż jest kwaśny odczyn gleb i niska ich zasobność w fosfor. W celu ograniczenia fitoprzyswajalności metali z gleb, należy je wapnować i nawozić fosforem.

Praca naukowa finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2010-2014 jako projekt badawczy (N N310-375539).

Literatura

- [1] Alloway B.J. 2004. Zinc in soils and crop nutrition, International Zinc Association, Brussels, Belgium.
- [2] Biernacka E., Małuszyński M.J. 2007. Formy ołowiu i kadmu w wierzchnich warstwach gleb dwóch wybranych obszarów o różnym stopniu zanieczyszczenia środowiska. *Ochr. Śr. Zasobów Nat.* 31, 101-105.
- [3] Boussama N., Quariti O., Ghorbal MH. 1999. Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. *J. Plant. Nutr.* 22, 731-752.
- [4] Brazauskienė D.M., Gražulevičienė V., Sabienė N., Rutkauskienė G. 2002. The influence of some factors on the formation of mobile copper in soil. *Ekologija* 2, 47-51.
- [5] Broos K., DeGryse F., Smolders E. 2001. Cadmium and zinc availability and toxicity to symbiotic nitrogen fixation in soils contaminated by various sources. *Proceedings of the 6th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, Guelph, Ontario, Canada.
- [6] Cataldo D.A., Wildung R.E. 1978. Soil and plant factors influencing the accumulation of heavy metals by plants. *Environ. Health Perspect.* 27, 149-159.
- [7] Gambuś F. 1997. Pobieranie metali ciężkich przez różne gatunki roślin uprawnych. Cz. I. Wrażliwość roślin na metale ciężkie. *Acta Agr. et Silv., Ser. Agr.* 35, 21-29.
- [8] Gruca – Królikowska S., Waclawek W. 2006. Metale w środowisku. Cz. II. Wpływ metali ciężkich na rośliny. *Chem. Dydakt. Ekol. Metrol.* 11, 41-56.
- [9] Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.* 68, 167-182.
- [10] Kabata -Pendias A., Motowicka-Terelak T., Piotrowska M., Terelak H., Witek T. 1993. Ocena zanieczyszczenia gleb i roślin metalami ciężkimi i siarką. *Ramowe wytyczne dla rolnictwa. IUNG Puławy, Ser. P* (53).
- [11] Kachenko A. G., Singh B. 2006. Heavy metals contamination in vegetables grown in urban and metal smelter contaminated sites in Australia. *Water Air Soil Poll.* 169, 101-123.
- [12] Kobierski M., Staszak E., Kondratowicz-Maciejewska K., Ruszkowska A. 2011. Wpływ rodzaju użytkowania gleb na zawartość metali ciężkich i ich dystrybucję w profilach gleb rdzawych. *Ochr. Śr. Zasobów Nat.* nr 49, 163-177.
- [13] Lee S, Leustek T. 1999. The effect of cadmium on sulphate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. *Plant. Sci.* 141, 201-207.

- [14] Łukowski A. 2006: The influence of mineral fertilization on heavy metal fraction contents in soil. Part I. Zinc. Polish J. Environ. Stud., Vol. 15, No 2A, P. II "HARD", Olsztyn, 410-414.
- [15] Maciejewska A., Kwiatkowska J. 2007. Migracja cynku, ołowiu i kadmu w układzie gleba-roślina. OŚ i ZN, 31, 183-187.
- [16] Mocek A. 2002. Stopnie skażenia gleb Polski metalami ciężkimi. J. Res. Appl. Agr. Eng. 47, 29-34.
- [17] Sady W. 2001. Czynniki ograniczające zawartość azotanów i metali ciężkich w warzywach. Przem. Ferment. Owoc.-Warzyw. 5, 21-23.
- [18] Sabienė N., Brazauskienė D.M., Rimmer D. 2004. Determination of heavy metal mobile forms by different extraction methods. Ekologija 1, 36-41.
- [19] Seregin I. V., Kozhevnikova A. D. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. Russ. J. Plant Physiol. 53, 257-277.
- [20] Szatanik-Kloc A. 2004. Wpływ pH i stężenie wybranych metali ciężkich w glebie na ich zawartość w roślinach. Acta Agr. 4, 177-183.
- [21] Tomócsik A., Makádi M., Bogdányi Z., Orosz V., Márton Á. 2006. Effect of composted sewage sludge on the toxic element content of the soil and plants. Proceedings of the International Symposium on Trace Elements in the Food Chain, Budapest, Hungary, May 25-27, 215-219.
- [22] Uren N.C. 1992. Forms, reactions and availability of nickel in soils. Adv. Agron. 48, 141-203.
- [23] Van Assche F., Clijsters H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ. 13, 195-206.
- [24] Węglarzy K. 2007. Metale ciężkie – źródła zanieczyszczeń i wpływ na środowisko. Wiadomości Zootechniczne 3, 31-38.
- [25] Wiater J. 2004. Następczy wpływ odpadów organicznych na zawartość mikroelementów w pszenicy ozimej. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. Z. 502, 1031-1038.
- [26] Właśniewski S. 2002. Cynk w wybranych gatunkach roślin uprawianych w warunkach glebowych Podkarpacia. Zesz. Nauk. Komitetu „Człowiek i Środowisko” PAN, 33, 351-360.
- [27] Yruea I. 2005. Copper in plants. Braz. J. Plant Physiol. 17, 145-156.
- [28] Zehetner F., Wenzel W.W. 2000. Nickel and copper sorption in acid forest soils. Soil Sci. 165, 463-472.

ANALIZA JAKOŚCIOWA CYDRÓW JABŁKOWYCH DOSTĘPNYCH NA RYNKU TRÓJMIASTA

PAULINA WITT, MARIA ŚMIECHOWSKA

Streszczenie

Cydr, to jabłkowy napój niskoalkoholowy zawierający od 1,2% do 8,5% obj. alkoholu etylowego, otrzymywany w wyniku fermentacji alkoholowej nastawu na cydr. Jest szczególnie popularny w Wielkiej Brytanii, północnej Francji, Belgii, Irlandii i na Litwie. Celem niniejszej pracy była analiza jakościowa cydrów jabłkowych dostępnych na rynku Trójmiasta.

Zbadano cydry zakupione w sklepach sieciowych Trójmiasta pochodzące od 8 polskich producentów. Oceniono wygląd opakowań. Dokonano pomiaru pojemności oraz analizy zgodności oznakowania z rozporządzeniem w sprawie znakowania środków spożywczych. Oznaczono parametry, takie jak: zawartość ekstraktu cukrowego i kwasowość czynna. Dokonano pomiaru barwy za pomocą metody CIELAB ($L^*a^*b^*$). Kwasowość czynna badanych napojów wykazywała odczyn kwaśny, wynosiła przeciętnie $pH=3,77$. Przeprowadzono analizę organoleptyczną z zastosowaniem pięciopunktowej oceny wyróżników jakościowych według Tilgnera, z uwzględnieniem współczynników ważkości. W wyniku której przyznano średnie oceny od 2,15 do 3,16 punktów. Cydry różniły się znacząco pod względem smaku i zapachu uzyskując wyniki od 1 do 5 punktów. Parametrami nieróżnicującymi była jasność (L^*) i parametr a^* wskazujący na udział barwy czerwonej. Parametrem różnicującym był parametr b^* , którego wartość pozostawała w szerokim zakresie od 5,09 do 29,21 ($\sigma=7,76$). Cydry znacząco różniły się barwą pomiędzy dwoma próbkami, o czym świadczyła wysoka wartość odległości między odpowiadającymi ich barwie punktami w przestrzeni ($\Delta E_{max} = 24,28$). Dzięki obliczeniu ΔE wykazano, że 7,1% komparacji barwy dwóch próbek było zauważalne jedynie dla doświadczonego obserwatora, zaś 75% porównań stanowiło dla obserwatora wrażenie dwóch różnych barw.

Słowa kluczowe: cydr, jakość, oznaczanie barwy, metoda CIELAB ($L^*a^*b^*$)

Wprowadzenie

W 2014 roku wyraźnie wzrosło zainteresowanie polskim cydrem, czego przyczyną było rosyjskie embargo na owoce i warzywa. Z racji tego, że Polska produkuje najwięcej jabłek spośród innych członków Unii Europejskiej, embargo bardzo zagrażało polskiemu sadownictwu [Kostrzewski i Miączyński, 2014; Kowalska, 2014]. Polska jest największym producentem jabłek w Europie

(ok. 3 mln ton rocznie w ostatnich latach) i czwartym w świecie za Chinami, USA i Turcją [Saleem, 2014]. W latach 2004–2013 w polskim handlu zagranicznym jabłkami odnotowano dynamiczny wzrost wielkości oraz wartości wywozu. Eksport jabłek wzrósł w tym czasie prawie 2,8 razy (z 434 tys. ton do 1 230 tys. ton). Jego wartość zwiększyła się z 90 mln EUR do 447 mln EUR (tj. prawie 5-krotnie) i stanowiła 40-60% wartości eksportu owoców. Po akcesji Polski do UE wywoziliśmy rocznie od 17% do 43% krajowej produkcji jabłek. Głównymi zagranicznymi rynkami zbytu polskich jabłek były kraje WNP, przede wszystkim Rosja. W 2013 r. eksport jabłek do tego kraju stanowił 55% całego wolumenu eksportu tych owoców [Rynek owoców w Polsce, 2014]. Polskie jabłka są w dużej części sprzedawane za granicę, w tym ok. 50-70% właśnie do Rosji – w ubiegłym roku było to 700 tysięcy ton tych owoców [Trajer i Dyngus, 2014]. Alogicznie embargo stanowiło bezpłatną promocję polskiego sadownictwa, gdyż przyczyniło się do nagłośnienia problemu braku rynku zbytu. Polacy zaczęli interesować się rodzimą produkcją jabłek oraz sposobami na rozwiązanie problemu nadwyżki produkcji i solidaryzując się z sadownikami kupowali jabłka, a na spotkaniach ze znajomymi piwo, coraz częściej, zastępowali cydrem z polskich jabłek [Frącek, 2012; Kostrzewski i Miączyński, 2014; Nawirska i in., 2009].

Jednym ze sposobów zagospodarowania nadwyżki jabłek było poszukanie innych rynków zbytu, drugim – zwiększenie produkcji cydrów, w czym pomogło zniesienie akcyzy [Anonim, 2014; Nawirska i in., 2009]. Od stycznia do października 2014 roku nastąpił czterokrotny wzrost konsumpcji cydrów w porównaniu do 2013 roku [Kostrzewski i Miączyński, 2014].

Surowcem do produkcji cydru jest przefermentowany sok z jabłek, zwany moszczem jabłkowym [Le Quéré i in., 2006; Majda, 2013]. Z moszczu zachowuje on charakterystyczny jabłkowy i kwaskowy posmak oraz barwę od lekkosłomkowej do ciemnożółtej. Cydr jest szczególnie popularny w Wielkiej Brytanii, północnej Francji, Belgii, Irlandii i na Litwie [Frącek, 2012]. Według polskiego prawa jest napojem niskoalkoholowym o rzeczywistej zawartości alkoholu od 1,2% do 8,5% objętościowych, otrzymanym w wyniku fermentacji alkoholowej nastawu na cydr. Dopuszczalne jest dosładzanie lub dodawanie soku jabłkowego lub zagęszczonego soku jabłkowego, niedopuszczalne jest natomiast dodawanie do cydru innego alkoholu [Frącek, 2012; Le Quéré i in., 2006; Majda, 2013; Przeglasińska, 2014]. Polska Klasyfikacja Wyrobów i Usług wskazuje, że cydr to „pozostałe wyroby winiarskie”, do których zalicza się m. in. np. cydr, perry, miód pitny, oraz napoje mieszane zawierające alkohol [Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 29 października 2008 r.]. Potocznie uważną nazwą handlową dla cydru jest „cydr jabłkowy”, jednak w oparciu o polskie ustawodawstwo należało by posługiwać się określeniem „cydr”.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wyróżników jakościowych cydrów jabłkowych dostępnych na Trójmiejskim rynku. Pobocznym celem, wspomagającym, było dokonanie przeglądu literatury z zakresu stanu rynku

cydrów polskich oraz szczegółowe zbadanie rynku cydru detalicznego w dużych sklepach sieciowych w obrębie Trójmiasta.

Materiał i metody badań

Zbadano cydry pochodzące od 8 dużych polskich producentów przemysłowych. Napoje zakupiono w sklepach wielkopowierzchniowych oraz sklepach osiedlowych. Materiał do badań stanowiły cydry popularne, masowo produkowane przez duże wytwórnie, łatwo dostępne w polskich sklepach, takich marek jak: Cydr Lubelski, Desire Cydr, Warka Cider Premium, Cydr Dobroński, Saider Cydr, Green Mill Cider, 7 Sadów cydr oraz Cider Inn. Wszystkie zbadane napoje zawierały 4,5% objętości alkoholu. Zakres cenowy zbadanych cydrów wynosił od 9,99 do 21,30 zł/ litr. Na potrzeby badania napoje zostały uszeregowane rosnąco według ceny, oznaczono je kolejnymi liczbami od 1 do 8.

Zbadano produkty tradycyjne (naturalne) – otrzymane z jabłek, bez obcych dodatków smakowych oraz jeden napój niskoalkoholowy, owocowy o smaku jabłkowym, który bezprawnie został nazwany przez producenta „cydrem”. Uwzględniono go w badaniach w celu sprawdzenia parametrów jakościowych, oraz preferencji konsumentów wobec zafałszowanego produktu. Respondenci nie zostali poinformowani o badaniu produktu niespełniającego wymagań rozporządzenia w sprawie znakowania poszczególnych znaków spożywczych.

Dokonano analizy stanu rynku cydrów oraz zbadano rynek sprzedaży detalicznej cydru i napojów tworzonych na bazie cydru i perry (fermentowany napój z soku gruszkowego) w dużych sklepach w obrębie Trójmiasta. Pod uwagę wzięto sklepy należące do sieci: Carrefour, Auchan, Real, Biedronka, Lidl, Kaufland, Inter Marche, E. Leclerc, Piotr i Paweł, Polo Market i Alma.

Oceniono zgodność oznakowania stosownie do wymagań Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie znakowania poszczególnych rodzajów środków spożywczych z dnia 23 grudnia 2014 roku oraz Ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia z dnia 25 sierpnia 2006 roku [Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia, 2006; Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi, 2014]. W badanych cydrach oznaczono zawartość ekstraktu cukrowego i kwasowość czynną. Oznaczono zawartość ekstraktu cukrowego według normy PN-A-79120, wykorzystując do tego celu areometr ze skalą Brix oraz refraktometr Abbego. Za wynik zawartości ekstraktu przyjęto średnią arytmetyczną ze wskazań obu przyrządów pomiarowych. Parametry barwy cydrów określano przy użyciu kolorymetru Konica Minolta CR-400 w systemie CIE Lab, mierząc składowe trójkromatyczne L^* , a^* i b^* [Obiedziński, 2009; Barrett i in., 2010].

Przeprowadzono analizę organoleptyczną z zastosowaniem pięciopunktowej skali oceny wyróżników jakościowych napoju. Ocenie poddano następujące parametry: smak, zapach, posmak jabłkowy oraz nasycenie CO₂ [Babic-Zielińska i in., 2008]. W celu określenia preferencji konsumenckich w ustaleniu optymalnej

barwy cydru jabłkowego ocenie poddano także parametry niewpływające bezpośrednio na smakowitość cydru, takie jak barwa i klarowność. Do zbadania jakości cydrów zastosowano metodę skalowania, która pozwoliła na liczbowe wyrażenie kontrolowanych parametrów z uwzględnieniem skali rang poszczególnych wyróżników. Analizę organoleptyczną wykonano w skali pięciopunktowej według Tilgnera (1 pkt oznacza jakość dyskwalifikującą, a 5 – bardzo dobrą). Do obliczenia oceny końcowej analizy organoleptycznej użyto arkusza kalkulacyjnego MS Excel i przyjęto następujące współczynniki ważkości: 0,3 – zapach; 0,05 – barwa; 0,05 – klarowność; 0,4 – smak; 0,1 – posmak jabłkowy; 0,1 – nasycenie CO₂ [Gawęcka i in., 2001].

Wyniki i dyskusja

W wyniku analizy rynku cydrów w polskich sklepach sieciowych w obrębie Trójmiasta, zauważono, że dostępność do tego produktu jest duża. Dwa spośród badanych sklepów sieciowych posiadały bardzo duży wybór cydrów i perry również pochodzenia zagranicznego. Analizę produktu rozpoczęto od sprawdzenia szczelności opakowań. Podczas analizy szczelności opakowań w cydrze producenta nr 3 zauważono dużą nieszczelność, po obróceniu butelki ulatniał się gaz oraz sączył cydr. Badanie powtórzono dwukrotnie na cydrze zakupionym w dwóch różnych miejscach. Jest to jedyny przypadek nieszczelności wśród przebadanych napojów, jednak tak znacząco wpływał na jakość produktu, stopień nasycenia CO₂ oraz trudności w jego transportowaniu, że można uznać, że cecha ta powinna być dyskwalifikująca ten produkt na rynku.

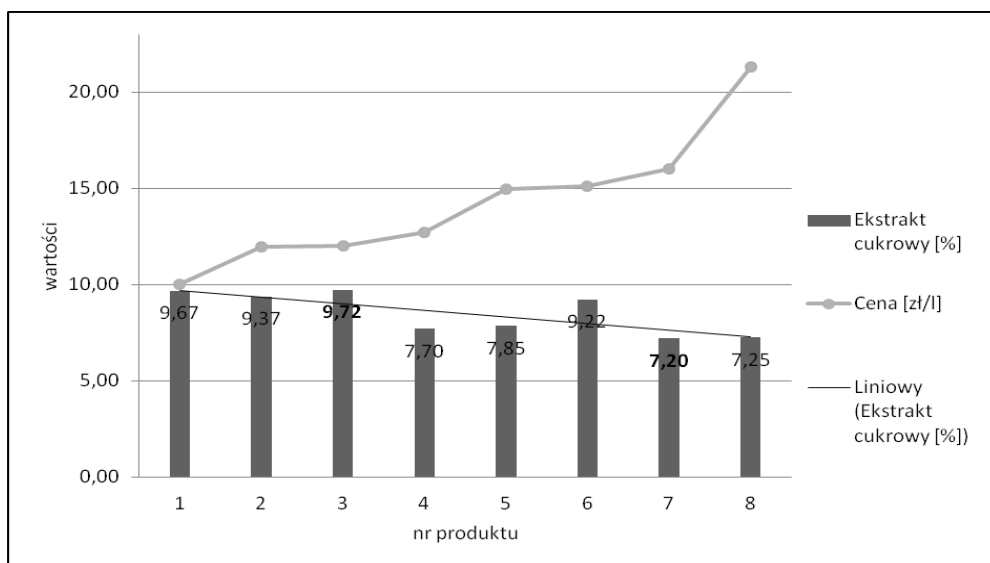
Etykiety wszystkich zbadanych napojów zawierały podstawowe informacje w postaci: nazwy produktu, zawartości netto, nazwy producenta oraz numeru partii produkcyjnej. Połowa etykiet badanych napojów zawierała datę minimalnej trwałości do spożycia, a na dwóch znajdował się skład napoju. Wszystkie napisy były w języku polskim, czytelne i trwałe. W jednym przypadku stwierdzono niezgodność z obowiązującym prawem, gdyż znakowanie wprowadzało konsumenta w błąd. Na przedniej etykiecie znajdował się bardzo duży napis „cydr”, natomiast na odwrocie etykieta informowała, iż produkt, to niskoalkoholowy napój owocowy o smaku jabłkowym. Według zapisów rozporządzenia w sprawie znakowania poszczególnych rodzajów środków spożywczych, nazwa „cydr” może być używana wyłącznie w przypadku, gdy mamy do czynienia z fermentowanym napojem winiarskim, który szczegółowo definiuje ustawa winiarska, jako napój otrzymany w wyniku fermentacji alkoholowej nastawu na cydr. Zastanawiający jest fakt, że wspomniany napój imitujący cydr został nagrodzony w roku 2014 prestiżowym wyróżnieniem na Targach Polagra [Polagra News, 2014].

Oceniane cydry były napojami lekko musującymi lub musującymi, sztucznie wysycane CO₂. Badane cydry były w większości pasteryzowane. Jedynie producent cydru nr 8 zaznaczył, że napój jest niepasteryzowany.

Wszystkie produkty były dodatkowo konserwowane, co producenci zaznaczyli przez informację „zawiera siarczyny”. Jedynie producent nr 6 wymienił substancje konserwujące i jako jedyny podał pełny skład napoju, gdzie wskazał środki użyte do konserwacji – pirosiarczany i sorbinian potasu. Oceniane napoje miały pojemność nieznacznie odbiegającą od deklarowanej przez producenta. W dwóch napojach pojemność była wyższa od deklarowanej w najwyższym stopniu – o 3% pojemności, u jednego o 3% niższa. Zaś u dwóch producentów deklarowana pojemność była równa rzeczywistej.

Podczas badania dokonano pomiaru kwasowości czynnej. Za wynik przyjęto średnią arytmetyczną dwóch pomiarów. Napoje wykazały odczyn kwaśny, a pH wahało się od 3,48 do 4,0.

Badane cydry charakteryzowały się umiarkowaną słodkością. Zawartość ekstraktu cukrowego kształtowała się w zakresie od 7,20 do 9,72%. Zauważono wysoką korelację ujemną pomiędzy ceną cydrów, a zawartością ekstraktu cukrowego. Wraz ze wzrostem ceny cydrów spada ekstrakt cukrowy (Rys. 1). Ta zależność jest zgodna z wymaganiami dla cydrów wysokiej jakości, które powinny charakteryzować się wytrawnością, w odróżnieniu od słodkich napojów imitujących prawdziwy cydr.



Rys. 1. Korelacja ekstraktu cukrowego i ceny cydru

Źródło: Badania własne

Barwa odgrywa istotną rolę w ocenie produktów spożywczych będąc wyrazem stanu produktu jak również wskazując na zmiany jakości produktu w wyniku nieprawidłowości w procesach produkcyjnych i podczas przechowywania. W analizie towaroznawczej barwa produktu spożywczego stanowi fragment analizy sensorycznej [Śmiechowska i Wawszczak, 2011].

Cydry bardzo różniły się barwą, pomimo tego, iż żaden z producentów nie umieścił na etykiecie informacji o dodatku barwników. Można jednak przypuszczać, że cydrys oznaczone numerami 5 i 6 były barwione. Producent napoju 6 wykazał dodatek karmelu, co może stanowić dowód sztucznego barwienia napoju. Pomiaru barwy cydrów dokonano wykorzystując instrumentalną metodę CIE Lab, opartą na pomiarze trzech składowych trójkromatycznych – L^* , a^* , b^* . Każdy kolor określany w przestrzeni CIE zdefiniowany jest przez trzy składowe: L^* – wyrażającą jasność, a^* – oznaczającą wartość między kolorem czerwonym a zielonym, b^* – oznaczającą wartość między kolorem żółtym a niebieskim, [Majda, 2013].

Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z trzech równoległych pomiarów. Pomiar potwierdził, że napój nr 5 najbardziej odbiegał jasnością od pozostałych cydrów ($L^*=53,28$ w stosunku do średniej $56,25$, $\sigma=1,57$). Większość cydrów charakteryzowało się niższymi wartościami parametru a^* , czyli mniejszym udziałem barwy czerwonej, a większym barwy zielonej. Największy udział barwy zielonej miał cydr nr 2. Dużą różnicę zauważono przy pomiarze b^* , gdzie $+b$ odpowiada barwie żółtej, a z kolei $-b$ barwie niebieskiej. Ponownie cydr nr 5 miał bardzo różnicujący wysoki współczynnik b^* wynoszący $29,21$, natomiast napój nr 1 barwę zbliżał się w kierunku odcieni niebieskich, gdzie współczynnik b^* wyniósł $5,09$. Różnice te mogą wskazywać na stosowanie moszczu pochodzącego z mieszanek różnorodnych odmian jabłek, które znacząco różnią się od siebie barwą miąższu oraz skórki.

Obliczono różnicę barw pomiędzy dwiema próbkami z wykorzystaniem wzoru na różnicę pomiędzy dwiema barwami w przestrzeni CIELab o postaci:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Po obliczeniu ΔE można przyjąć, że obserwator zauważył różnicę barw następująco: $0 < \Delta E < 1$ – nie zauważa różnicy; $1 < \Delta E < 2$ – zauważa różnicę jedynie doświadczony obserwator; $2 < \Delta E < 3,5$ – zauważa różnicę również niedoświadczony obserwator; $3,5 < \Delta E < 5$ – zauważa wyraźną różnicę barw; $5 < \Delta E$ – obserwator odnosi wrażenie dwóch różnych barw.

Przy porównaniu różnicy barwy pomiędzy dwiema barwami przebadanych cydrów 7,1% zbadanych porównań wykazały kolor, w którym różnicę barw może zauważyć jedynie doświadczony obserwator. Były to cydrys producenta nr 2 w porównaniu do cydru nr 6 oraz cydr nr 6 w odniesieniu do cydru nr 7. Różnicę barw zauważalną także dla niedoświadczonego obserwatora odnotowano również u 7,1% spośród wszystkich kompilacji porównań. Były to cydrys nr 1 w stosunku do cydru nr 4 oraz cydr nr 3 w porównaniu do cydru nr 8. Współczynnik ΔE mieszczący się w przedziale $3,5$ do 5 wskazujący na zauważalną różnicę pomiędzy dwiema barwami w przestrzeni CIE Lab wystąpił w przypadku 11% kombinacji porównań, natomiast u 75% porównań wskazywał, że obserwator odnosi wrażenie dwóch różnych barw (Tab.1).

Respondenci najwyżej ocenili barwę cydru nr 2, natomiast najniżej barwę cydrów nr 5 i 8. Parametry najwyżej ocenione, to $L^*=56,17$; $a^*=(-3,00)$ i $b^*=16,51$, zaś najniżej, to $L^*=53,28$; $a^*=(-2,39)$; $b^*=29,21$ oraz $L^*=57,23$; $a^*=(-2,81)$; $b^*=12,66$.

Tab. 1. Parametry barwy cydrów i różnic barw między dwiema próbkami

Lp.	*L	a*	b*	ΔE						
1	56,00	-1,65	5,09							
2	56,17	-3,00	16,51	11,50						
3	58,24	-2,82	10,68	6,14	6,18					
4	57,80	-2,04	7,25	2,84	9,45	3,55				
5	53,28	-2,39	29,21	24,28	13,04	19,18	22,42			
6	55,95	-2,38	18,26	13,19	1,87	7,93	11,17	11,27		
7	55,30	-2,52	19,97	14,92	3,60	9,74	12,97	9,46	1,83	
8	57,23	-2,81	12,66	7,76	4,00	2,22	5,49	17,02	5,76	7,56

Źródło: Badania własne

Przeprowadzono ocenę konsumencką badanych cydrów, w której udział wzięło 10 osób, pięć kobiet i pięciu mężczyzn, w wieku od 18 do 74 roku życia. Połowa zespołu oceniającego była mieszkańcami miasta, a pozostali wsi. 70 % respondentów było czynnych zawodowo. Wszyscy respondenci wskazali, że spożywają cydr rzadziej niż raz w miesiącu. Osoby badające cydr nie spożywały i nie piły niczego bezpośrednio przed degustacją oraz nie paliły papierosów, gdyż mogłoby to wpłynąć na obiektywne odczucia sensoryczne. W celu przygotowania prób do badania organoleptycznego cydru były przelewane z butelek z niedużej wysokości do przezroczystego szkła w celu zachowania wszystkich cech jakościowych. Cydru były uprzednio schłodzone do jednakowej temperatury wynoszącej 6°C.

Cydru wykazywały bardzo różne walory smakowe. W czołówce znalazły się smaczne, półwytrawne, orzeźwiające, kwaskowe cydru o przyjemnym, czystym, wyrazistym, jabłkowym aromacie, a na końcu szeregu napoje bardziej przypominające aromatyzowany napój gazowany niż cydr - bardzo słodkie, o aromacie karmelowym lub sztucznego „zielonego jabłuszka”.

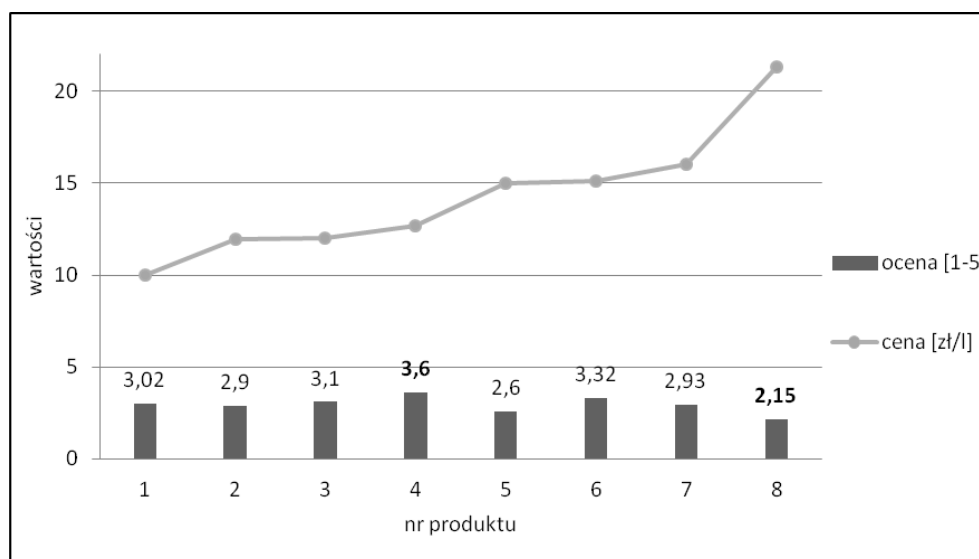
Oceniane cydru znacznie różniły się aromatem. Najwyżej oceniono zapach cydru producenta nr 2, zaś najniżej producenta 3 oraz 8. Cydr producenta nr 3 pomimo najniższej ocenionej zapachu uzyskał najwyższą ocenę smaku wynoszącą 3,6 punktu. Najniższą ocenę smaku otrzymał cydr producenta nr 6 oraz ponownie cydr numer 8, który był najdroższym przebadanym napojem. Najniższą ocenę końcową uzyskały produkty producentów nr 5 i 8. Na ostatnim miejscu znalazł się cydr, który był jednym z najdroższych – 21,30 zł/litr. Nie stwierdzono korelacji dodatniej pomiędzy ceną, a wyróżnikami jakości napojów (Rys. 2).

Tab. 2. Ocena jakości sensorycznej cydrów dostępnych na rynku Trójmiasta

Cecha	Nr producenta								Ranga
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Zapach	2,8	2,6	2,1	3,8	3,5	3,3	3,1	2,1	0,3
klarowność	5,0	4,7	4,9	5,0	4,4	5,0	4,7	4,7	0,05
Barwa	2,5	3,6	3,0	4,3	3,5	2,0	3,7	2,2	0,05
Smak	3,1	3,0	3,6	3,4	1,6	3,3	2,7	1,9	0,4
posmak jabłkowy	2,7	2,4	3,1	3,5	2,2	3,5	2,5	1,8	0,1
nasycenie CO ₂	2,9	2,6	3,2	2,8	2,9	3,1	2,5	2,3	0,1
ogólna ocena	3,02	2,9	3,1	3,6	2,6	3,32	2,93	2,15	

Źródło: Badania własne

Nie odnotowano znaczących różnic w ocenie wśród respondentów mieszkających w mieście w stosunku do mieszkających na wsi, co potwierdza wysoki współczynnik korelacji wynoszący 0,93, analogicznie nie zauważono różnic w ocenie jakości przez kobiety i mężczyzn (współczynnik korelacji = 0,84). Mimo wysokiej korelacji wyników, zauważono, że wyższe noty o 0,38 punktu przyznawali mieszkańcy wsi – średnio oceniając cydry na poziomie 3,14, oraz respondenci w wieku do 40 lat – noty wyższe o 0,29 punktu.



Rys. 2. Ocena jakości cydrów z uwzględnieniem ceny

Źródło: Badania własne

Respondenci bardzo wysoko ocenili niskoalkoholowy napój jabłkowy, który nie był autentycznym cydrem. Przyznali mu średnią ocenę w wysokości 3,32, co stanowi drugą w kolejności najwyższą ocenę napojów.

Wnioski

1. Cydrylic dostępne na trójmiejskim rynku charakteryzuje dostateczna jakość sensoryczna (średnio 2,95). Cydrylic różniły się znacząco pod względem badanych wyróżników, uzyskując wyniki od 1 do 5 punktów.
2. Respondenci mieszkający na wsi ocenili badane napoje wyżej, przyznając średnio o 0,38 punktu więcej w porównaniu do respondentów mieszkających w mieście.
3. Badane cydrylic charakteryzowały się umiarkowaną słodkością. Zawartość ekstraktu cukrowego w badanych cydrach kształtowała się w zakresie 7,20 do 9,72%.
4. Istnieje wysoka korelacja ujemna pomiędzy ceną cydrów, a zawartością ekstraktu cukrowego.
5. Kwasowość czynna badanych napojów wykazywała odczyn kwaśny i wynosiła przeciętnie $\text{pH}=3,77$.
6. Na rynku Trójmiasta pojawiają się napoje nieautentyczne, imitujące cydr naturalny. Etykiety tych napojów niskoalkoholowych poprzez nieprawidłowe oznakowane wprowadzają konsumenta w błąd.
7. Jeden z producentów miał wadliwą zamykarkę, gdyż dwukrotnie stwierdzono nieuszczelnienie opakowań w produktach rynkowych.
8. Barwa cydrów była zróżnicowana. Parametrami nieróżniącymi była jasność i barwa czerwona, różnicującym barwa żółta, parametr b^* wynosił od 5,09 do 29,21 ($\sigma=7,76$).

Literatura:

- [1] Anonim.: Cydr chce zrównania szans. Przegląd gastronomiczny, 2014, 1-2, 44.
- [2] Babicz-Zielińska E., Rybowska A., Obniska W.: Sensoryczna ocena jakości żywności, Akademia Morska w Gdyni, Gdynia 2008, 56-58.
- [3] Barrett, D. M., Beaulieu, J. C., Shewfelt, R.: Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2010, 50(5), 369-389.
- [4] Frącek G.: Dajmy szansę cydrom w Polsce. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2012, 11-12, 4-6.
- [5] Gawęcka J., Jędryka T.: Analiza sensoryczna. Wybrane metody i przykłady zastosowań. Akademia Ekonomiczna w Poznaniu, 2001, 57.
- [6] Kostrzewski L., Międzyński P.: Rekordowy wzrost spożycia cydru, ale i tak Polska tonie w jabłkach. Gazeta Wyborcza, 2014, 257, 28.
- [7] Le Quéré J.M., Husson F., Renard C.M.G.C., Primault J.: French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. LWT- Food Science and Technology, 2006, 39, 1033-1044.
- [8] Majda D.: Cydr to cydr. Przegląd Gastronomiczny, 2013, 11, 32.

- [9] Nawirska A., Figiel A., Kucharska A.Z., Sokół-Lętowska A., Biesiada A.: Drying kinetics and quality parameters of pumpkin slices dehydrated using different methods. *Journal of Food Engineering*, 2009, 94(1), 14-20.
- [10] Obiedziński M., Wybrane zagadnienia z analizy żywności, Wydaw. SGGW, Warszawa 2009, 222-227.
- [11] PN-A-79120-12:1990. Wina i miody pitne. Metody badań.
- [12] Polagra News, Złoci Medaliści targów POLAGRA, Wydanie specjalne magazynu targowego, Sierpień 2014, Poznań, 8-11.
- [13] Przegalińska M. J.: Polskie sposoby na rosyjskie embargo na owoce i warzywa. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2014, 7-8, 1.
- [14] Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 29 października 2008 r. w sprawie Polskiej Klasyfikacji Wyrobów i Usług (Dz. U. 2008 nr 207 poz. 1293).
- [15] Rynek owoców w Polsce. Agencja Rynku Rolnego, 2014, 11, 1-4.
- [16] Saleem A.: Chiński rynek jabłek. *IBRS TriC*. 2014, 3.
- [17] Śmiechowska M., Wawszczak S.: Kolor jako element ukrytej teorii wyrobów, *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego*, 2011, 662. *Ekonomiczne Problemy Usług*, 74, 471-481.
- [18] Trajer M., Dyngus M.: Krajowa produkcja, spożycie oraz promocja owoców i warzyw. Agencja Rynku Rolnego. *Biuletyn Informacyjny*, 2014, 3, 14-25.
- [19] Ustawa z dnia 12 maja 2011 r. o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina. Dz. U. 2014 poz. 1104.

BEZPIECZEŃSTWO MIKROBIOLOGICZNE MIĘSNYCH PRODUKTÓW EKOLOGICZNYCH

KAROLINA M. WÓJCIAK, KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA,
MAŁGORZATA KARWOWSKA, PAWEŁ KRAJMAS

Streszczenie

Zapewnienie konsumentom wysokiego poziomu bezpieczeństwa mikrobiologicznego w całym łańcuchu żywnościowym „od pola do stołu” stało się priorytetem w działaniach producentów oraz władz publicznych. Produkcja ekologiczna wymusza opracowanie receptury przetworu mięsnego produkowanego bez dodatku substancji peklujących. Nasuwa się pytanie, czy producenci ekologicznych produktów mięsnych mogą całkowicie zrezygnować ze stosowania azotanu (III) sodu z jednoczesnym zagwarantowaniem bezpieczeństwa mikrobiologicznego bioproduktów?

Celem badań była ocena możliwości wyprodukowania bez-azotanowych wyrobów mięsnych wzbogaconych w serwatkę kwasową poddanych lub nie obróbce termicznej. Materiał badawczy stanowiły wędzonki i kielbasy dojrzewające (n=6) oraz parzone (n=9) wyprodukowane w warunkach przemysłowych z mięsa z hodowli ekologicznej. Oznaczono wartość pH i aktywność wody oraz liczbę bakterii kwasu mlekowego (LAB), *S. aureus*, *Clostridium* spp., we wszystkich wyrobach mięsnych. Dodatkowo w wędlinach dojrzewających oznaczono liczbę bakterii *Y. enterocolitica* i *L. monocytogenes*.

Wartość pH wyrobów poddanych obróbce termicznej wynosiła od 5,47 do 5,75 jednostki, zaś aktywność wody od 0,845 do 0,883. Liczba LAB kształtowała się na poziomie od 7,83 do 8,23 log jtk/g. Nie stwierdzono obecności bakterii patogennych w badanych próbach. Wartość pH wędlin dojrzewających wynosiła odpowiednio 4,81 dla kielbas oraz 5,32 dla wędzonek. Niższa wartość pH kielbas korelowała z wyższą o ok. dwa rzędy logarytmiczne liczbą bakterii kwasu mlekowego. Nie stwierdzono obecności bakterii patogennych w wędlinach dojrzewających. Obserwowane po dojrzewaniu produkcyjnym zanieczyszczenie wędlin *L. monocytogenes* nie potwierdziło się w trakcie przechowywania prób.

Żaden z badanych produktów ekologicznych nie stwarzał bezpośredniego zagrożenia zdrowotnego. W przypadku dojrzewających wędzonek i kielbas brak dodatku azotanu (III) sodu nie wpłynął istotnie na bezpieczeństwo produktu. W przypadku parzonych wędzonek i kielbas dodatek serwatki kwasowej kompensował działanie azotanu (III) sodu na bezpieczeństwo produktu i jego trwałość.

Słowa kluczowe: patogeny, higiena, zagrożenie, mięso, serwatka kwasowa, ekologia

Wprowadzenie

Zapewnienie konsumentom wysokiego poziomu bezpieczeństwa zdrowotnego w całym łańcuchu żywnościowym „od pola do stołu” stało się priorytetem w działaniach producentów oraz władz publicznych.

Żywność narażona jest na oddziaływanie czynników biologicznych, chemicznych oraz fizycznych mogących zagrażać zdrowiu i życiu konsumenta [Nowicka i in., 2014]. Czynniki chemiczne można podzielić na: środowiskowe (solanina, amigdalina, metale ciężkie, pestycydy), technologiczne (użyte w niewłaściwej ilości dodatki do żywności) oraz techniczne (smary, pozostałości środków myjących, dezynfekujących) [Codex Alimentarius, 2003; Nowicka i in., 2014]. Do czynników fizycznych organicznych zaliczamy m.in. włosy, szypułki, liście, insekty, odchody zwierząt, zaś do nieorganicznych kawałki tworzyw sztucznych, metali, szkła, drewna. Natomiast do czynników biologicznych zalicza się: mikroorganizmy chorobotwórcze i saprofityczne, drożdże, pleśnie, glony, wirusy, pierwotniaki pasożytnicze, robaki pasożytnicze oraz ich metabolity (mykotoksyny, toksyny bakteryjne, aminy biogenne, enzymy) [Codex Alimentarius, 2003; Trafiałek i in., 2015]. Bezpieczeństwo zdrowotne w ujęciu mikrobiologicznym może być określone jako nieobecność organizmów patogennych i toksyn pochodzenia mikrobiologicznego w danej ilości produktu żywnościowego [Cegielska-Radziejewska i in. 2007; Trafiałek i in., 2015]. Istnieją dwa zagrożenia związane z obecnością mikroorganizmów w mięsnych produktach ekologicznych. Pierwszy związany jest z obecnością bakterii saprofitycznych (*Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Moraxella* sp., pleśnie: *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp.), które wytwarzają metabolity wpływające negatywnie na cechy organoleptyczne mięsa i jego przetworów [Hać-Szymańczuk, 2012]. Zmiana smaku, zapachu, barwy, konsystencji, śluzowacenie powierzchni sprawiają, że żywność staje się niezdatna do spożycia oraz bezwartościowa dla przedsiębiorcy. Z kolei organizmy chorobotwórcze (*Salmonella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Alcaligenes faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter* sp., *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*) mogą wywoływać zatrucia pokarmowe, groźne dla zdrowia lub życia [Hać-Szymańczuk, 2012].

Do najważniejszych czynników zmiennych, mających wpływ na jakość mikrobiologiczną mięsnych produktów ekologicznych, zaliczyć można: skład surowcowy, obecność i rodzaj stosowanych substancji konserwujących, aktywność wody, wartość pH, potencjał oksydacyjno-redukcyjny, temperaturę przechowywania, sposób i warunki pakowania, zastosowane operacje technologiczne, np. peklowanie, wędzenie, fermentacja, obróbka cieplna. Aby zachować jakość ekologicznych wyrobów mięsnych, a także zapewnić odpowiedni poziom higieny, stosuje się pakowanie próżniowe, które w połączeniu

z chłodniczym przechowywaniem wpływa na zahamowanie wzrostu mikroflory tlenowej, w głównej mierze odpowiedzialnej za psucie się przetworów mięsnych. Zbyt mała zawartość tlenu może jednak stwarzać korzystne warunki do rozwoju drobnoustrojów beztlenowych, m.in. *Clostridium botulinum*, wytwarzającego egzotoksynę botulinową, syntetyzowaną wewnątrz komórek, uwalnianą w momencie lizy komórki bakteryjnej w kompleksie z hemaglutyniną [Chawla i Chander, 2004; Jagielski, 2010]. Produkcja ekologiczna wymusza opracowanie receptury przetworu mięsnego produkowanego bez dodatku substancji pekłujących. W produkcji tradycyjnych wyrobów mięsnych azotan (III) sodu jest stosowany jako środek konserwujący. W środowisku słabo kwaśnym ($\text{pH} > 4,6$) z azotanu (III) sodu powstaje kwas azotawy, będący prekursorem tritlenku diazotu a w konsekwencji tlenku azotu [Lücke, 2008]. Tlenek azotu łączy się z żelazem mioglobiny prowadząc do powstania nitrozylomioglobiny (w wyrobach dojrzewających) oraz nitrozylomiochromogenu (w produktach parzonych). Dodatkowo żelazo hemowe związane z NO zostaje unieczynnione, co znacznie obniża tempo oksydacyjnych przemian lipidów mięsa [Lücke, 2008]. Wytwarzana podczas peklowania S-nitrozocysteina wykazująca antyoksydacyjne właściwości przyczynia się do hamowania procesów utleniania [Lücke, 2008]. Tlenek azotu reaguje z żelazem obecnym w komórkach bakterii. *Clostridium botulinum* jest szczególnie wrażliwa na przeciwbakteryjne działanie azotanu (III) [Chawla i Chander, 2004]. Oprócz działania antybakteryjnego, azotan (III) sodu pozytywnie oddziałuje na właściwości sensoryczne produktów mięsnych (smak i zapach pekłowniczy) [Lücke, 2008]. Kolejną bakterią, istotną z punktu bezpieczeństwa zdrowotnego ekologicznych przetworów mięsnych, w odniesieniu do wyrobów dojrzewających oraz wyrobów parzonych, jest *Staphylococcus aureus*, przy czym w wyrobach parzonych zagrożenie stanowią odporne na ogrzewanie enterotoksyny gronkowcowe. Enterotoksyna A (przyczyna ok. 75% zatruć) obecna w produkcji nie zmienia zwykle jego cech sensorycznych, powoduje zaś zatrucia pokarmowe oraz zespół wstrząsu toksycznego [Jagielski, 2010; Ścieżyńska i in., 2013]. W produktach dojrzewających dodatkowym zagrożeniem mogą być komórki vegetatywne z uwagi na brak obróbki cieplnej wyrobów.

Rodzaj *Yersinia* należy do Gram-ujemnych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Gatunkiem najczęściej występującym w mięsie i produktach mięsnych jest *Y. enterocolitica*, mogąca powodować jersiniozę – odzwierzęcą chorobę zakaźną, wywołującą ostre lub przewlekłe dolegliwości przewodu pokarmowego. *Y. enterocolitica* dobrze rozwija się w temperaturze od -2 do $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ oraz jest odporna na długotrwałe chłodnicze przechowywanie oraz pakowanie w modyfikowanej atmosferze gazów [Jagielski, 2010; Nowicka i in., 2014].

Wysoka wartość pH parzonych wyrobów mięsnych ($> 4,6$) oraz znaczna zawartość wody, a także absencja substancji konserwujących, zmusza producentów mięsnych wyrobów ekologicznych do poszukiwania nowych dodatków lub kombinowanych metod utrwalania (technologii „płatków”) [Leistner, 1994].

Umiejętnie prowadzony proces produkcji od doboru surowca aż po dystrybucję wyrobu gotowego może wyeliminować lub w znacznym stopniu ograniczyć możliwość rozwoju obecnej w mięsie mikroflory, czyniąc jednocześnie sam produkt bezpiecznym zdrowotnie oraz wydłużając jego okres przydatności do spożycia. W przypadku wyrobów dojrzewających może dodatkowo obniżyć ogólny koszt produkcji i dystrybucji np. poprzez eliminację obróbki termicznej lub przechowywania w temperaturze chłodniczej.

Nasuwa się pytanie, czy producenci ekologicznych produktów mięsnych mogą całkowicie zrezygnować ze stosowania azotanu (III) sodu z jednoczesnym zagwarantowaniem bezpieczeństwa microbiologicznego bioproduktów?

Celem badań była ocena możliwości wyprodukowania bez-azotanowych wyrobów mięsnych, wzbogaconych w serwatkę kwasową, poddanych lub nie obróbce termicznej.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły wędzonki i kielbasy dojrzewające oraz poddane obróbce termicznej wyprodukowane w Zakładzie Mięsnym „Jasiołka” w Dukli z mięsa z hodowli ekologicznej. Surowiec mięsny stanowił w przypadku wędzonek mięsień półbłoniasty (*m. semimembranosus*), zaś w przypadku kielbasy mięsień półbłoniasty i słonina grzbietowa, pozyskiwane ze świń rasy wielka biała polska o masie przyżyciowej 125-130 kg, hodowanych w systemie ekologicznym.

Produkty mięsne dojrzewające

Mięsień półbłoniasty poddawano lub nie marynowaniu w serwatce kwasowej przez 48 godzin w temperaturze 2°C, a następnie soleniu solą morską w ilości 2,8% w stosunku do masy mięśnia. W przypadku kielbas mięśnie oraz słoninę rozdrabniano (Ø 8 mm), a następnie mieszano z solą (2,8%) i serwatką kwasową (10%). Wędzonki (n=6) i kielbasy (n=6) poddawano trzy tygodniowemu dojrzewaniu w temperaturze 16±1°C i wilgotności względnej 75 - 85%. Po dojrzewaniu produkty wędzono w zimnym dymie (<25°C) a następnie pakowano w opakowania próżniowe. Wyroby poddawano badaniom w ciągu 24 h od momentu zakończenia dojrzewania produkcyjnego.

Produkty mięsne parzone

Mięsień półbłoniasty poddawano lub nie marynowaniu w serwatce kwasowej przez 48 godzin w temperaturze 2°C. Następnie próby solono solą morską w ilości 2,8% w stosunku do masy mięśnia. W przypadku kielbas mięśnie oraz słoninę rozdrabniano (Ø 8 mm), a następnie mieszano z solą (2,8%) i serwatką kwasową (10%). Wędzonki i kielbasy poddano obróbce wędzarniczo-parzelniczej do momentu osiągnięcia temperatury 70±1°C wewnątrz wyrobów. Po schłodzeniu, wyroby mięsne pakowano próżniowo i przechowywano w komorze chłodniczej w temperaturze 2 °C przez 28 dni.

Kwasowość czynną oznaczano przez pomiar wartości pH przy użyciu cyfrowego pH/konduktometru CPC 501 (Elmetron) i elektrody zespolonej typu ERH - 111 (Elmetron). Analiza wartości aktywności wody (a_w) w wyrobie została przeprowadzana w temperaturze 20 °C przy użyciu urządzenia do pomiaru aktywności wody LabMaster (Novasina). Oznaczono LAB wg PN-ISO 15214:2002 oraz wybrane bakterie patogenne. Oznaczenie ilości *S. aureus* wykonano w oparciu o normę PN-ISO 6888-2:2001/A1:2004, *L. monocytogenes* - w oparciu o metodę Rapid Lmono firmy Biorad [QMP_504_EC_27_51_1], *Clostridium* sp. - wg PN-ISO 7937:2005 oraz *Y. enterocolitica* wg Nakajima i in. [1991]. Wyniki badań podano jako logarytm dziesiętny w jednostkach tworzących kolonie w jednym gramie produktu [jtk/g].

W celu ustalenia istotności różnic pomiędzy wynikami wykonano jednoczynnikową i dwuczynnikową analizę wariancji oraz test istotności różnic T-Tuckey'a, na poziomie istotności $P < 0,05$, przy użyciu programu KyPlot wersja 2.0.

Wyniki i dyskusja

Analiza wartości pH i aktywności wody w solonych wędzonkach parzonych nie wykazała istotnych różnic między próbami po procesie produkcji oraz po upływie 28 dniowego przechowywania (Tab. 1). Wartość pH w badanych próbach wynosiła od 5,47 do 5,75 jednostki. Nie obserwowano istotnych ($P > 0,05$) różnic w kwasowości prób po 28 dniowym przechowywaniu. Aktywność wody w próbach wahała się od 0,845 do 0,887. Istotne ($P < 0,05$) obniżenie wartości aktywności wody zanotowano w wędzonce marynowanej w serwatce kwasowej (WS) w trakcie przechowywania, prawdopodobnie na skutek gromadzenia niskocząsteczkowych związków, powstałych w wyniku aktywności enzymów bakteryjnych z serwatki kwasowej.

Tab. 1. Wartość pH i aktywność wody w wędzonkach parzonych podczas 28 dniowego przechowywania ($T=2^{\circ}\text{C}$)

Próba	Czas [dni]	pH	Aktywność wody (a_w)
WK	0	5,61±0,23 ^{aA}	0,867±0,006 ^{aA}
	28	5,75±0,26 ^{aA}	0,845±0,026 ^{aA}
WS	0	5,47±0,08 ^{aA}	0,887±0,015 ^{aA}
	28	5,56±0,22 ^{aA}	0,848±0,022 ^{aB}

WK - wędzonka kontrolna, WS - wędzonka marynowana w serwatce kwasowej

Wartości średnie oznaczony tymi samymi małymi literami, pomiędzy próbami, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$); Wartości średnie oznaczony tymi samymi wielkimi literami, w obrębie próby, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$)

Analiza wartości pH i aktywności wody w kiełbasach parzonych wykazała istotny wpływ dodatku serwatki kwasowej na kwasowość kiełbas (Tab. 3).

Kielbasa z serwatką kwasową charakteryzowała się istotnie niższą wartością pH w porównaniu do kielbasy kontrolnej. Obserwowane obniżenie wartości pH mogło wynikać z niskiego pH (ok. 4,6) zastosowanego dodatku oraz rozwoju LAB, wytwarzających kwasy organiczne np. mlekowy, octowy, propionowy itp. W trakcie przechowywania obserwowano istotny ($P < 0,05$) wzrost kwasowości w obu próbach badawczych.

Tab. 2. Liczba bakterii kwasu mlekowego oraz wybranych bakterii patogennych w wędzace parzonej podczas przechowywania (28 dni)

Próba	Czas [dni]	log (jtk/g)		
		LAB	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i>
WK	0	8,04	<10	<10
	28	7,90	<10	<10
WS	0	8,23	<10	<10
	28	7,90	<10	<10

WK - wędzonka kontrolna, WS - wędzonka marynowana w serwatce kwasowej

Wartości średnie oznaczony tymi samymi małymi literami, pomiędzy próbami, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$); Wartości średnie oznaczony tymi samymi wielkimi literami, w obrębie próby, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$)

Analiza liczby bakterii z rodzaju *Clostridium* wykazała absencję drobnoustrojów w badanych próbach wędzonek i kielbas parzonych oraz dojrzewających (Tab. 2 i 4). W przypadku wyrobów parzonych kluczowa okazała się temperatura przechowywania (2 °C) oraz wartość aktywności wody poniżej 0,942. W żadnym z wyżej wymienionych produktów nie uzyskano obniżenia wartości pH poniżej 4,6 jednostek (Tab. 1, 3, 5), która stanowi wartość graniczną dla wzrostu komórek *Cl. botulinum* [Jagielski, 2010; Hać-Szymańczuk, 2012].

Tab. 3. Wartość pH i aktywność wody w kielbasach parzonych podczas 28 dniowego przechowywania (n=9)

Próba	Czas [dni]	pH	Aktywność wody (a_w)
KK	0	6,08±0,02 ^{aA}	0,888±0,001 ^{aA}
	28	5,86±0,05 ^{aB}	0,889±0,003 ^{aA}
KS	0	6,01±0,01 ^{bA}	0,885±0,001 ^{bA}
	28	5,78±0,04 ^{bB}	0,878±0,005 ^{bA}

KK - kielbasa kontrolna, KS – kielbasa z serwatką kwasową

Wartości średnie oznaczony tymi samymi małymi literami, pomiędzy próbami, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$); Wartości średnie oznaczony tymi samymi wielkimi literami, w obrębie próby, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$)

pH poniżej 5,0 jednostek, udało się uzyskać jedynie w kielbasie dojrzewającej (Tab. 5), co gwarantowało zahamowanie wzrostu proteolitycznych szczepów *Clostridium botulinum*. Istotnym elementem w zapewnieniu bezpieczeństwa zdrowotnego wyrobów dojrzewających okazała się niska aktywność wody wyrobów odpowiednio 0,853 dla wędzonek oraz 0,825 dla kielbas (Tab. 5).

Jednym z najczęściej stwierdzanych przyczyn zatruc pokarmowych u ludzi są gronkowce enterotoksyczne. Zatrucia mogą wynikać ze spożycia żywności zawierającej szczepy takich bakterii albo preformowane enterotoksyny [Jagielski, 2010; Ścierżyńska i in., 2013]. Gronkowce enterotoksyczne są Gram-dodatnimi, względnie beztlenowymi ziarniakami. Mogą fermentować węglowodany oraz wykazują aktywność proteolityczną. Wyrastają w zakresie temperatur od 7 do 48 °C. Mogą wyrastać przy niskich wartościach pH 4,0 oraz aktywności wody 0,86 (0,83), a także przy wysokich stężeniach soli i cukru w środowisku [Ścierżyńska i in., 2013]. Analiza liczby bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus* wykazała, że ich rozwój został skutecznie zahamowany w wędzonce i kielbasie dojrzewającej, prawdopodobnie na skutek niskiej wartości aktywności wody w produkcie (poniżej 0,860) oraz temperatury przechowywania na poziomie 4 °C. Zastosowana niska temperatura przechowywania (2 °C) stała się kluczowym czynnikiem zabezpieczającym wyrób przed rozwojem gronkowca złocistego w ekologicznych produktach mięsnych parzonych (Tab. 2 i 4).

Tab. 4. Liczba bakterii kwasu mlekowego oraz wybranych bakterii patogennych w kielbasie parzonej podczas przechowywania (28 dni) (n=9)

Próba	Czas [dni]	log (jtk/g)		
		LAB	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i>
KK	0	7,71	<10	<10
	28	7,28	<10	<10
KS	0	8,00	<10	<10
	28	6,95	<10	<10

KK - kielbasa kontrolna, KS – kielbasa z serwatką kwasową

Wartości średnie oznaczony tymi samymi małymi literami, pomiędzy próbami, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$); Wartości średnie oznaczony tymi samymi wielkimi literami, w obrębie próby, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$)

Listeria monocytogenes jest Gram-dodatnią, psychrotroficzną pałeczką posiadającą zdolność ruchu. Jest względnym beztlenowcem, wytwarza katalazę, rozkłada cukry z wytworzeniem kwasów, ale bez gazu [Sip i in., 2012; Nowicka i in., 2014]. Całkowitą inaktywację bakterii należących do rodzaju *L. monocytogenes* uzyskuje się w temperaturze powyżej 75 °C. Drobnoustrój może namnażać się w niskich temperaturach (bliskich 0 °C), w produktach o niskim pH (4,4 – 9,4) oraz wysokim stężeniu soli kuchennej (do 12%) i azotynu sodu. Zdolność adaptacji bakterii dotyczy również szerokiego zakresu wartości

aktywności wody do 0,92 [Walczycka, 2005; Sip i in., 2012; Nowicka i in., 2014]. Jest to minimalna wartość umożliwiającą rozwój tych bakterii. Liczba komórek *L. monocytogenes*, która może spowodować listeriozę u zdrowego dorosłego człowieka, to od 10^5 do 10^6 jtk/g. Ze względu na różny poziom odporności osobniczej organizmu, przyjmuje się liczbę 100 jtk/g za graniczną dla zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego produktu [Rozporządzenie (WE) nr 2073/2005]. Skażenie na takim poziomie nie stanowi zagrożenia zdrowotnego nawet dla kobiet w ciąży i osób o obniżonej odporności immunologicznej [Sip, 2010]. W niniejszych badaniach, prowadzonych po zakończeniu dojrzewania produkcyjnego (21 dni), liczba komórek *L. monocytogenes* nie przekroczyła bezpiecznego poziomu 100 jtk w gramie produktu. Podczas przechowywania jej poziom uległ obniżeniu poniżej granicy oznaczalności (Tab. 6).

Tab. 5. Wartość pH i aktywność wody w dojrzewającej wędzonce i kielbasie (n=6).

Próba	pH	Aktywność wody (a_w)
WD	5,32±0,32 ^a	0,853±0,024 ^a
KD	4,81±0,27 ^b	0,825±0,009 ^b

WD – wędzonka dojrzewająca, KD – kielbasa dojrzewająca

Wartości średnie oznaczony tymi samymi małymi literami, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$)

Zgodnie z badaniami niektórych autorów można uszeregować kwasy przeciwdziałające wzrostowi *L. monocytogenes* w następujący ciąg: kwas octowy > kwas mlekowy > cytrynowy > malonowy > solny [Cheroutre-Vialette i in., 1998; Walczycka, 2005]. Kwas mlekowy powoduje większą wrażliwość bakterii na podwyższoną temperaturę.

Tab. 6. Liczba bakterii kwasu mlekowego oraz wybranych bakterii patogennych w wędzonce i kielbasie dojrzewającej po dojrzewaniu produkcyjnym oraz w trakcie przechowywania (n = 6)

Próba		log (jtk/g)				
		LAB	<i>Clostridium</i> <i>m</i> sp.	<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
WD	0	6,92±0,77 ^a	<10 ^a	N.D.	0,78±0,79 ^a	<10 ^a
	60	-	-	-	N.D.	-
KD	0	8,37±0,56 ^b	<10 ^a	N.D.	0,68±0,64 ^a	<10 ^a
	60	-	-	-	N.D.	-

WD – wędzonka dojrzewająca, KD – kielbasa dojrzewająca, N.D. – nie wykryto; Wartości średnie oznaczony tymi samymi małymi literami, nie różnią się statystycznie istotnie ($P < 0.05$)

W badaniach dotyczących mięsa surowego i produktów mięsnych wykazano, że zastosowanie 1-3% kwasu mlekowego jako dodatku do kąpieli zanurzeniowej tusz wołowych i wieprzowych spowodowało obniżenie populacji *L. monocytogenes* o 2-3 rzędy logarytmiczne w trakcie chłodniczego przechowywania [Walczycka, 2005]. Cheroutre-Vialette i in. [1998] wykazali, że obniżenie pH i a_w hamuje wzrost bakterii. Autorzy podają, że zastosowanie azotanu (III) sodu w produkcji kielbas i wędzonek nie wykazuje hamującego działania na namnażanie *L. monocytogenes*. Kluczowym, w przypadku tego drobnoustroju, czynnikiem hamującym jest aktywność wody.

Dalzini i in. [2015] stwierdzili wyższą przeżywalność bakterii *L. monocytogenes* w modelowej kielbasie salami o obniżonej zawartości tłuszczu (poniżej 20%) w porównaniu do innych patogenów (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium) w trakcie procesu dojrzewania produkcyjnego kielbas. Autorzy stwierdzili, iż komórki *L. monocytogenes* są odporne na czynniki hamujące procesu fermentacji i suszenia [Nightingale i in., 2006; Dalzini i in., 2014]. Na uwagę zasługuje fakt, że w niniejszych badaniach podczas chłodniczego (4°C) przechowywania prób dojrzewających wędzonek i kielbas, liczba bakterii *L. monocytogenes* obniżyła się poniżej granicy oznaczalności (<10 jtk/g). Podobne zależności obserwowali Dalzini i in. [2015]. Informacje zawarte w literaturze jednoznacznie wskazują, iż niektóre szczepy należące do bakterii kwasu mlekowego hamują wzrost *L. monocytogenes* poprzez produkcję bakteriocyn. Szczególnie bogatym źródłem bakteriocynogennych LAB są tradycyjne produkty fermentowane. Badania Sip i in. [2012] wykazały, że w mleku surowym używanym do produkcji gołków obecne są bakterie z rodzaju *L. monocytogenes*, jednakże autorzy nie obserwowali bakterii w produkcie gotowym. Autorzy stwierdzili, że bakteriocyny klasy IIa o masie cząsteczkowej poniżej 3 kDa produkowane przez *Lc. garvieae* AS 6/4 i *Lb. casei* AS 4/4/23 silnie ograniczają liczebność *L. monocytogenes* w mleku, tym samym eliminują komórki z rodzaju *Listeria* z serów typu oscypek i gołka [Sip i in., 2012]. Nie obserwowano obecności *L. monocytogenes* w produktach mięsnych badanych w trakcie chłodniczego przechowywania.

Istotne obniżenie liczby *L. monocytogenes*, mogło być związane z wysoką liczbą bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepów bakteriocynogennych, które poprzez wytwarzanie kwasów organicznych, nadtlenu wodoru, CO₂ hamowały wzrost patogenu [Cornu i in., 2011; Sip i in., 2012]. Dalzini i in. [2015] również obserwowali spadek liczby *L. monocytogenes* do poziomu 1,0 log jtk/g w salami przechowywanej w opakowaniu próżniowym w 4°C.

Zastosowanie serwatki kwasowej w produkcji dojrzewających wyrobów mięsnych niesie ze sobą szereg korzyści związanych z wprowadzeniem do produktu bogatej mikroflory należącej do gatunków *Lb. plantarum* oraz *Lb. fermentum* [Rzepakowska i in., 2015] w porównaniu do gotowych kultur startowych poprawiającej bezpieczeństwo zdrowotne wyrobów.

Wnioski

1. Żaden z badanych produktów ekologicznych nie stwarzał bezpośredniego zagrożenia zdrowotnego.
2. W przypadku dojrzewających wędzonek i kielbas, brak dodatku azotanu (III) sodu nie wpłynął istotnie na bezpieczeństwo produktu.
3. W przypadku parzonych wędzonek i kielbas dodatek serwatki kompensował działanie azotanu (III) sodu na bezpieczeństwo produktu i jego trwałość.

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu finansowanego przez Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi numer: RR-re-029-10-3040/10

Literatura

- [1] Cegielska-Radziejewska R., Kijowska J., Nowak E., Zabielski J.: Wpływ temperatury na dynamikę zmian liczby bakterii w wybranych wędlinach przechowywanych w warunkach handlu hurtowego i detalicznego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, 4(53), 76-88.
- [2] Chawla S.P., Chander R.: Microbiological safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology. *Food Control*, 2004, 15, 559-563.
- [3] Cheroutre-Vialette M., Lebert I., Hebraud M., Labadie J.C., Lebert A.: Effects of pH or a_w stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 42, 71-77.
- [4] Codex Alimentarius. Codex Committee on Food Hygiene: HACCP system and guidelines for its application. Annexe to CAC/RCP 1-1969 Revision 4, 2003. In Codex Alimentarius Commission. Food Hygiene Basic Texts, Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Rome: World Health Organisation.
- [5] Cornu M., Billowi E., Borgis H., Beaufort A, Zuliani V.: Modeling microbial competition in food: application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiology*, 2011, 28, 639-647.
- [6] Dalzini E., Cosciani-Cunico E., Barnini V., Bertasi B., Losio M.N., Daminelli P., Varisco G.: Behaviour of *Escherichia coli* O157 (VTEC), *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and shelf life of low fat salami. *Food Control*, 2015, 47, 306-311.
- [7] Dalzini E., Cosciani-Cunico E., Pavoni E., Bertasi B., Daminelli P., Finazzi G. i in.: Study of growth potential of *Listeria monocytogenes* in low fat salami: an innovative Italian meat product. *Italian Journal of Food Safety*, 2014, 3, 40-43.
- [8] Hać-Szymańczuk E.: "Nowe patogeny" w surowcach oraz produktach mięsnych. *Gospodarka Mięsna*, 2012, 7, 22-23.

- [9] Jagielski M.: Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń przewodu pokarmowego oraz zatruc pokarmowych. Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa 2010.
- [10] Leistner L.: Further development in the utilization of hurdle technology for food preservation. *Journal of Food Engineering*, 1994, 22, 421–432.
- [11] Lücke F.K.: Nitrit und die Haltbarkeit und Sicherheit erhitzter Fleischerzeugnisse. *Fleischwirtschaft*, 2008, 88 (12), 91-94.
- [12] Nakajima H., Inoue M., Mori T., Itoh K.-I., Arakawa E., Watanabe H.: Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 30, 2484–2486.
- [13] Nightingale K.K., Thippareddi H., Phebus R.K., Marsden J.L., Nutsch A.L.: Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 2006, 69, 794-800.
- [14] Nowicka P., Wojdyło A., Oszmiański J.: Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 2(93), 5-18.
- [15] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 stopni C.
- [16] PN-ISO 6888-2:2001/A1:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). Część 2: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynogenem.
- [17] PN-ISO 7937:2005. Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda oznaczania liczby *Clostridium perfringens* - Metoda liczenia kolonii.
- [18] Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D.: Antybiotykooporność szczepów bakterii fermentacji mlekowych wyizolowanych z ekologicznej serwatki kwasowej. Materiały VI Sympozjum naukowego nt.: „Probiotyki w żywności”, Kiry pod Zakopanem 2015, 12.
- [19] Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W.: Anti-listeria activity of lactic acid bacteria isolated from gołka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*, 2012, 26, 117-124.
- [20] Sip A.: Bakterie *Listeria monocytogenes*. Cz. I. Występowanie i źródła zanieczyszczeń żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2010, 64, 40-43.
- [21] Ścieżyńska H., Maćkiw E., Mąka Ł., Modzelewska M.: Enterotoksyny gronkowcowe. *Przemysł Spożywczy*, 2013, 67, 41-43.
- [22] Trafiałek J., Lehrke M., Lücke F.K., Kołożyn-Krajewska D., Janssen J.: HACCP-based procedures in Germany and Poland. *Food Control*, 2015, 55, 66-74.

- [23] Walczycka M.: Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 2(43), 61-72.
- [24] QMP_504_EC_27_51_1. Liczba *Listeria monocytogenes*. Metoda płytkowa – posiew powierzchniowy.
- [25] Rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz. Urz. L 338 z 22.12.2005, str. 1.

ZANIECZYSZCZENIE OLEJÓW ROŚLINNYCH WIELOPIERŚCIENIOWYMI WĘGLOWODORAMI AROMATYCZNYMI

ALICJA ZACHARA

Streszczenie

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne występują powszechnie w środowisku, jednak dowiedziono, że najważniejszą drogą ekspozycji człowieka na WWA jest żywność. Poliarenny to związki o udokumentowanym działaniu mutagennym i kancerogennym. Celem pracy było przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat zagadnień związanych z powstawaniem, właściwościami oraz zanieczyszczeniem olejów roślinnych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. Szczególną uwagę zwrócono na występujące nieprawidłowości w procesie produkcyjnym olejów roślinnych takie, jak: bezpośrednie działanie gazów spalinyowych podczas suszenia ziaren tzw. suszenie bezprzeponowe, stosowanie wysokiej temperatury lub używanie zanieczyszczonych rozpuszczalników ekstrakcyjnych. Obecność WWA została odnotowana przez wielu badaczy w olejach roślinnych tłoczonych na zimno, a także poddanych procesom rafinacji. Omówiono wpływ temperatury oraz procesów technologicznych na zawartość poliarenów w tłuszczach oraz w dymach powstających podczas ich smażenia w wysokich temperaturach. Oznaczenie zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych wykonuje się w żywności zwalidowanymi metodami badawczymi, spełniającymi kryteria zawarte w Rozporządzeniu Komisji (UE) nr 836/2011. Wg oceny Komisji Europejskiej niezbędne jest ciągłe monitorowanie zawartości WWA w środkach spożywczych w celu stałej kontroli zagrożeń.

Słowa kluczowe: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, benzo(a)piren, zanieczyszczenia żywności, oleje roślinne.

Wprowadzenie

Tłuszcze roślinne zaliczane są do ważnych składników diety człowieka. Są dla naszego organizmu m.in. głównym źródłem energii, niezbędnymi nienasyconymi kwasów tłuszczowych (NNKT) oraz nośnikiem witamin rozpuszczalnych w tłuszczach A, D, E, K. Tłuszcze naturalne są wieloskładnikową mieszaniną różnych lipidów, w skład których wchodzi triacyloglicerole (97-99%) oraz substancje towarzyszące (najczęściej około 1-2%) w proporcjach zależnych od rodzaju surowca, sposobu wydobywania i oczyszczania otrzymanego produktu

[Drozdowski, 2007; Dubois i in., 2007]. W nasionach oleistych a także w olejach roślinnych i produktach tłuszczowych, oprócz nienasyconych kwasów tłuszczowych istotna jest zawartość związków o silnych właściwościach przeciwutleniających, takich jak: tokoferole, sterole, karotenoidy, skwalen i związki fenolowe. Wysoka zawartość tych związków warunkuje odpowiednią wartość odżywczą oraz trwałość wytwarzanych olejów [Krygier i in., 2011]. Oleje tłoczone na zimno ze względu na zawarte w nich duże ilości składników bioaktywnych posiadających właściwości prozdrowotne, zaliczane są do żywności funkcjonalnej [Obiedzińska i Waszkiewicz-Robak, 2012]. Niestety, oprócz składników pozytywnie wpływających na zdrowie człowieka tłuszcze roślinne mogą zawierać zanieczyszczenia chemiczne powstałe w wyniku nieprawidłowości w trakcie realizacji procesu produkcyjnego lub też będące wynikiem zanieczyszczenia atmosfery. Spośród zanieczyszczeń należy wymienić środki ochrony roślin, związki fosfo- i chloroorganiczne, metale, chlorowane węglowodory, fumonizyny, estry chloropropanoli oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. W licznych pracach badawczych wykazano, że ze względu na powszechne występowanie WWA w środowisku oraz ich lipofilny charakter, oleje jadalne mogą zawierać znaczne ilości tych związków [Tys i in., 2003; Ciecierska i Obiedziński, 2006; Starski i Jędra, 2011].

Celem pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat zagadnień związanych z powstawaniem, właściwościami oraz zanieczyszczeniem olejów roślinnych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.

Występowanie i charakterystyka wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA)

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne stanowią bardzo zróżnicowaną grupę zanieczyszczeń chemicznych. Tworzą się one w procesie niepełnego spalania węgla, podczas którego przy niewystarczającym dostępie tlenu możliwe jest formowanie i zamykanie łańcuchów węglowych w wielopierścieniowe układy aromatyczne. Zanieczyszczenie środowiska poliarenamy może być spowodowane przez katastrofy ekologiczne, spaliny samochodowe, emisję zanieczyszczeń z zakładów przemysłowych (hut, koksowni), pieców domowych lub pożary. Grupa WWA liczy kilkaset związków, które zawierają od dwóch do kilkunastu pierścieni benzenowych połączonych ze sobą, co decyduje o ich zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i toksycznych. Główną drogą narażenia człowieka na lżejsze (zawierające od dwóch do czterech skondensowanych pierścieni aromatycznych) WWA jest zanieczyszczenie powietrza, natomiast w przypadku cięższych i niektórych 4-pierścieniowych WWA główną drogę wnikania do organizmu człowieka stanowią środki spożywcze. Cięższe WWA wykazują silniejsze działanie toksyczne niż lżejsze węglowodory [Starski i Jędra, 2011]. Duża ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych posiada właściwości kancerogenne, a także może dawać silne efekty mutacji

biologicznych. Związki te wykazują stosunkowo niską toksyczność ostrą, ale bardzo dużą toksyczność przewlekłą. Międzynarodowa Agencja ds. Badań nad Rakiem zakwalifikowała benzo(a)piren do 1 grupy kancerogenów tj. związków o udowodnionym działaniu rakotwórczym na organizm człowieka, natomiast benz(a)antracen, benzo(b)fluoranten i chryzen do grupy 2B (substancji przypuszczalnie kancerogennych dla człowieka) [World Health Organization, 2010].

Żywność może być zanieczyszczona przez WWA występujące w powietrzu (poprzez osadzanie), w glebie (poprzez przenoszenie, transport), w wodzie (poprzez osadzanie, przenoszenie i transport) oraz w czasie przetwarzania żywności (wędzenie, pieczenie, smażenie, grillowanie). Na podstawie badań stwierdzono, że ponad 80 % poliarenow człowiek pobiera wraz z żywnością. Głównymi produktami wnoszącymi WWA do diety są produkty zbożowe, owoce morza, tłuszcze roślinne i zwierzęce, produkty mięsne (szczególnie wędzone metodami tradycyjnymi) i rybne, warzywa, orzechy i rośliny strączkowe, a także kakao, herbata, suplementy diety - zależnie od wielkości indywidualnego spożycia [Wieczorek i Wieczorek, 2011; Kubiak, 2013].

Występowanie WWA w olejach roślinnych

Oleje roślinne są pozyskiwane z różnych części roślin, np. nasion, owoców, pestek, a także z kielków roślinnych. Mogą być otrzymywane nie tylko z roślin tradycyjnie uważanych za oleiste - surowcem olejarskim są również bawełna, len, sezam, mak, kapusta abisyńska oraz orzech kokosowy. Żywność o wysokiej zawartości tłuszczu jest szczególnie podatna na zanieczyszczenie wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. Związki te ze względu na swój lipofilny charakter, kumulują się w komórkach tłuszczowych roślin i zwierząt. Duży udział w pobraniu WWA przez organizm człowieka mają produkty rolnicze zwłaszcza pochodzenia roślinnego, w których przeciętna zawartość WWA jest wprawdzie mała, ale ich spożycie jest bardzo duże [Teixera i in., 2007]. Według badań indywidualnego spożycia tłuszczów roślinnych i zwierzęcych przeprowadzonych przez Szponara i in. [2003] olej rzepakowy jest najbardziej popularnym tłuszczem w Polsce spożywanym przez 50% konsumentów, średnio w ilości 16,9 g/osobę/dzień (maksymalnie 140 g/osobę/dzień). Znacznie mniej osób spożywa inne rodzaje tłuszczów roślinnych: olej słonecznikowy lub sojowy ok. 4%, natomiast oliwę z oliwek ok. 1,5% konsumentów. Obecnie rzepak, po soi, zajmuje drugie miejsce na świecie w uprawie nasion oleistych. Pod względem ilości produkowanego oleju – olej rzepakowy zajmuje trzecie miejsce, po oleju palmitynowym i sojowym. Największym światowym producentem rzepaku jest Unia Europejska, gdzie wytwarza się około 19-20 mln ton rocznie co stanowi 34% globalnej produkcji. Polska, na tle innych krajów Unii Europejskiej, zajmuje trzecie miejsce, po Niemczech i Francji [Dmochowska, 2012]. Zawartość WWA w tłuszczach

roślinnych jest wyższa niż w zwierzęcych, co wynika głównie z zanieczyszczenia upraw roślin oleistych. Poziom WWA w olejach jest uzależniony od zanieczyszczenia atmosfery oraz kontaminacji podczas procesów przetwórczych i/lub transportu. Ze względu na fakt, że WWA zaliczane są do genotoksycznych kancerogenów do zanieczyszczeń tych stosuje się zasadę ALARA (*as low as reasonable achievable*), zakładającą, że wartości najwyższych dopuszczalnych poziomów powinny być tak niskie jak tylko jest to osiągalne przy zastosowaniu dobrych praktyk produkcyjnych. Regulacje w zakresie najwyższych dopuszczalnych poziomów WWA zawarte są w Rozporządzeniu Komisji (UE) nr 835/2011. Ustalony przez Unię Europejską limit zanieczyszczenia benzo(a)pirenem może wynosić maksymalnie 2 µg/kg w olejach przeznaczonych do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub do stosowania jako składnik w produktach spożywczych, natomiast suma benzo(a)pirenu, benz(a)antracenu, benzo(b)fluorantenu i chryzenu jest limitowana na poziomie 10 µg/kg. Wyjątek stanowi olej kokosowy przeznaczony do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub do stosowania jako składnik w produktach spożywczych, dla którego limit sumy czterech WWA został ustalony na poziomie maksymalnie 20 µg/kg. Spowodowane jest to proporcjonalnie większą zawartością benz(a)antracenu i chryzenu, których nie da się łatwo usunąć z oleju kokosowego w procesie rafinacji przy aktualnych możliwościach technicznych krajów producentów. UE wskazała na potrzebę wprowadzenia udoskonaleń technicznych w tych krajach, dlatego też zanieczyszczenie WWA w oleju kokosowym jest monitorowane pod kątem oceny możliwości obniżenia najwyższych dopuszczalnych poziomów [Rozporządzenie (UE) 835/2011].

Oznaczenie zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych wykonuje się w żywności głównie z wykorzystaniem chromatografii cieczowej lub gazowej. Zależnie od rodzaju wykrywanych związków stosuje się detektory uniwersalne lub selektywne. W celu ilościowego oznaczania poliarenow laboratoria europejskie stosują obecnie następujące metody: wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FLD lub HPLC-FLD/UV) oraz chromatografia gazowa w sprzężeniu ze spektrometrią mas (GC/MS, GC-MS/MS, GC-TOF-MS) lub dwuwymiarowa chromatografia gazowa z detektorem mas (GCxGC-MS). Do oznaczania WWA odpowiednie są metody, które spełniają wymogi ściśle określone w obowiązującym rozporządzeniu [Rozporządzenie (UE) 836/2011].

Powstawanie WWA podczas produkcji i zastosowania olejów roślinnych

W wielu pracach badawczych stwierdzono, że żywność o wysokiej zawartości tłuszczu jest szczególnie podatna na zanieczyszczenia poliarenam. Wykazano, że oleje tłoczone na zimno zawierają znacznie więcej WWA od olejów poddanych procesowi rafinacji. Zabiegi technologiczne takie jak np. bielenie (dodatek węgla aktywnego) oraz rafinacja zmniejszają zawartość zanieczyszczeń, w tym WWA.

Zabieg dezodoryzacji redukuje tzw. lekkie WWA, natomiast na skutek bielenia obniżeniu ulega zawartość tzw. ciężkich WWA [Ciecierska i Obiedziński, 2006; Starski i Jędra, 2011]. Natomiast Teixeira i in. [2007] stwierdzili nieznaczny wzrost zawartości WWA w oleju sojowym i oliwie z oliwek po procesie bielenia. Ciecierska i Obiedziński [2006] w wyniku przeprowadzonych badań potwierdzili, że w technologii przetwórstwa roślin oleistych proces rafinacji odgrywa kluczową rolę – znacząco zostaje zredukowana zawartość poliarenow w produktach. Poziomy zanieczyszczenia WWA w tłoczonych olejach rzepakowym i słonecznikowym były statystycznie istotnie wyższe niż w odpowiadających im olejach rafinowanych. Najwyższą ilość benzo(a)pirenu - 61 µg/kg oznaczono w oliwie z wytlóków oliwnych typu Pomace. Zawartość ta 30-krotnie przekraczała dopuszczalne limity, zaś suma 15 WWA wyniosła ponad 230 µg/kg. Według badaczy wysoka ilość tych związków w oliwie typu Pomace jest wynikiem bezprzeponowego suszenia miazgi jako zabiegu wstępnego do pozyskania pozostałej oliwy [Ciecierska i Obiedziński, 2006]. Tak więc zwiększenie zawartości WWA w produkcie finalnym może być wynikiem nieprawidłowości w procesie produkcyjnym takich, jak: bezpośrednie działanie gazów spalinowych podczas suszenia ziaren tzw. suszenie bezprzeponowe (nieodzwolone w krajach Unii Europejskiej), stosowanie wysokiej temperatury podczas suszenia ziaren i ekstrakcji oleju lub używanie zanieczyszczonych rozpuszczalników ekstrakcyjnych. [Lage Yusty i Cortizo Daviña, 2005; Tys i in., 2003; Janowicz, 2009]. Na zanieczyszczenie poliarenam finalnego produktu w mniejszym stopniu ma wpływ zanieczyszczenie atmosferyczne materiału roślinnego lub pobieranie przez rośliny zanieczyszczeń z gleby [Janowicz, 2009]. Rodríguez-Acuña i Pérez-Caminomdel [2008] na podstawie swoich badań zaobserwowali, że zawartość WWA w oliwie z oliwek oraz w oliwkach jest zależna od zanieczyszczenia środowiska, w którym znajduje się plantacja oraz od ekspozycji owoców na spaliny. Uzależniona jest również od wielkości oliwek. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne zostają zaadsorbowane na powierzchni owocu i mogą być przeniesione do oleju podczas procesu wydobycia. Starski i Jędra [2011] stwierdzili, że istnieją różnice w poziomie WWA w olejach wytwarzanych przez różnych producentów, co mogło wynikać z rejonizacji upraw rzepaku dostarczanego do zakładów przemysłu tłuszczowego. W przebadanych 182 próbkach oleju roślinnego (rzepakowego, słonecznikowego, sojowego, z siemienia lnianego oraz z kielków pszenicy) pobranych z obrotu detalicznego zawartość benzo(a)pirenu w 25 próbkach (13,7 %) była niższa od granicy wykrywalności, natomiast tylko w 2 próbkach przekroczyła najwyższy dopuszczalny dla olejów poziom 2,0 µg/kg. Zawartość pozostałych WWA również w wielu przypadkach była niższa od granicy ich wykrywalności. Stwierdzono również istnienie zależności – wraz ze wzrostem benzo(a)pirenu w próbkach olejów obserwowano wzrost zawartości sumy czterech WWA. W trzech próbkach olejów suma czterech WWA była wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom (10 µg/kg), a w dwóch

z tych próbek oleju przekroczony był również dopuszczalny poziom zanieczyszczenia benzo(a)pirenem. Oznaczone zanieczyszczenie krajowych olejów rzepakowych - benzo(a)pirenem, benz(a)antracenenem, benzo(b)fluoroantenem i chryzenem było zbliżone do średniego poziomu tych zanieczyszczeń występujących w tłuszczach i olejach badanych w krajach UE [Starski i Jędra, 2011].

WWA mogą migrować do olejów również z zanieczyszczonego materiału opakowań. Do kontaminacji ziarna może dochodzić w trakcie transportu lub przechowywania w jutowych workach impregnowanych olejem mineralnym. Mimo, że oleje mogą być zanieczyszczone WWA, stwierdzono, że nawet długotrwałe ich ogrzewanie w temperaturach stosowanych podczas smażenia nie prowadzi do istotnych zmian zawartości tych związków [Purcaro i in., 2006; Jędra i in., 2008; Jesionek i in., 2007]. W polskiej kuchni oleje roślinne wykorzystywane są najczęściej do smażenia produktów wysokobiałkowych (mięso, ryby) oraz węglowodanowych (frytki, naleśniki). Ogrzewanie olejów w warunkach dostępu powietrza, w temperaturze 240°C przez 30 minut nie wpływa na zwiększenie zawartości benzo(a)pirenu [Jędra i in. 2008]. Podobnie Purcaro i in. [2006] nie stwierdzili zwiększenia zawartości WWA w tłuszczu podczas procesu ciągłego smażenia chipsów, frytek i ryb w temperaturach od 160 do 205° C. Natomiast produkty mięsne (hamburgery i frankfurterki) smażone w temp. 170-180° C przez 10, 20 i 30 min. w oliwie, oleju słonecznikowym, sojowym lub maśle wykazywały czterokrotnie większą niż kontrola i wzrastającą z czasem smażenia aktywność mutagenną [Perez i in., 2002]. Nie stwierdzono, aby źródłem szkodliwych substancji były same tłuszcze, nawet ogrzewane w wysokich temperaturach. Błaszczuk i in. [2008] badając zawartość fluorantenu, benzo[a]antracenu, benzo[k]fluorantenu, benzo[a]pirenu oraz benzo[g,h,i]peryleny w próbkach oleju z oliwek i z pestek winogron ogrzewanych w temperaturze 180° C przez 60 minut bez dodatków lub z dodatkiem czosnku albo frytki ziemniaczanej stwierdzili niższą zawartość tych związków niż w olejach nieogrzewanych. W przypadku oleju rzepakowego zawartość ta nieznacznie wzrosła w porównaniu do stężenia WWA w oleju świeżym [Błaszczuk i in., 2008].

W dymach powstających podczas smażenia olejów jadalnych w wysokich temperaturach identyfikowane są związki o działaniu rakotwórczym lub prawdopodobnie rakotwórczym. Badania Purcaro i in. [2006] wykazują, że w głównej mierze za właściwości mutagenne dymów powstających podczas smażenia w olejach jadalnych odpowiedzialne są związki z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, są to: benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten oraz acetaldehyd, formaldehyd i naftalen. Badania epidemiologiczne dotyczące zapadalności na choroby nowotworowe kobiet w Chinach i na Tajwanie wykazują, że ryzyko powstania nowotworów płuc wzrasta w przypadku ekspozycji na zanieczyszczenia powietrza wewnątrz pomieszczeń. Wskazano, że szczególnie niebezpieczne jest

przyrządzanie potraw w naczyniach typu „wok”, w których olej podgrzewany jest do wysokich temperatur. Wielkość narażenia uzależniona jest od częstotliwości tego typu obróbki termicznej, sposobu wentylacji kuchni, zainstalowanych mechanicznych wyciągów powietrza oraz przede wszystkim od temperatury oleju. W celu zminimalizowania narażenia na substancje chemiczne powstające w czasie smażenia olejów jadalnych procesy smażenia i gotowania powinny być prowadzone w odpowiednich temperaturach, pod wyciągami, w dobrze wentylowanych pomieszczeniach kuchennych [Zaciera i in., 2012].

Ciemniak i Witczak [2008] przeprowadzili badanie zawartości dwudziestu trzech WWA w konserwach ze szprota w oleju (wędzonego lub parowanego). Określono ilość poliarenow w oleju i mięsie ryb (cała tuszka, skóra, mięso) bezpośrednio po wyprodukowaniu oraz po przechowywaniu przez cztery tygodnie w temperaturze pokojowej. Przeprowadzone analizy wykazały, że w czasie przechowywania doszło do migracji WWA ze szprota wędzonego do oleju, natomiast w przypadku konserw ze szprota parowanego zawierającego śladowe ilości WWA zaobserwowano odmienną tendencję. Zauważono również, że w zalewach olejowych pochodzących z konserwy ryby wędzonej dochodzi do wielokrotnego przekroczenia dopuszczalnych ilości benzo(a)pirenu.

W badaniach suplementów diety przeprowadzonych przez Food and Consumer Product Safety Authority w Holandii stwierdzono, że zawartość benzo(a)pirenu w ponad 30 % przebadanych próbek zawierających w swoim składzie surowe oleje przekracza obowiązujące wymagania prawne [Van Der Wielen i in., 2006].

Podsumowanie

Powszechność występowania WWA oraz ich wpływ na organizm człowieka sprawiają, że należy opracować metody ograniczania ich emisji do środowiska oraz prowadzenia procesów termicznych w sposób ograniczający ich powstawanie. Dążenie do wzrostu efektywności upraw zmusza producentów do stosowania różnorodnych środków chemicznych (nawozów, środków ochrony roślin) oraz rodzajów obróbki po zbiorze i konserwacji nasion (temperatura suszenia, warunki przechowywania), które w istotny sposób wpływają na jakość produkowanego surowca. Aby konsumenci mieli pełną wiedzę na temat oferowanego produktu, producenci powinni dbać o jak najwyższą jakość surowców, świadomie odpowiadać za bezpieczeństwo zdrowotne produkowanych wyrobów oraz zapewnić konsumenta o zgodności wytworzonego wyrobu z deklaracjami prozdrowotnymi.

Wg oceny Komisji Europejskiej niezbędne jest ciągłe monitorowanie zawartości WWA w środkach spożywczych przez instytucje prowadzące urzędową kontrolę żywności. Obowiązujące regulacje prawne określające najwyższe dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń żywności, w tym zanieczyszczenia benzo(a)pirenem, benz(a)antracenenem, benzo(b)fluoroantenem i chryzenem uwzględniają wyniki aktualnych prac Komitetu Ekspertów ds. Zanieczyszczeń

Środowiskowych i Przemysłowych oraz Stałego Komitetu ds. Roślin, Zwierząt, Żywności i Pasz, danych naukowych, a także doniesień znajdujących się w systemie RASFF. Komisja Europejska uważa, że system taki gwarantuje utrzymanie zawartości WWA w żywności na poziomie niezagrażającym zdrowiu konsumentów.

Literatura

- [1] Błaszczuk U., Zalejska-Fiolka J., Janoszka B., Birkner E., Heiduk R.: Zawartość wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w nieogrzewanych i ogrzewanych olejach jadalnych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2008, 41, 2, 143-150.
- [2] Ciecierska M., Obiedziński M.: Zanieczyszczenie olejów roślinnych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, 2 (47), 48-55.
- [3] Ciemniak A., Witczak A.: Zmiany zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) podczas przechowywania konserw ze szprota w oleju. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2010, 43(1), 86-92.
- [4] Drozdowski B.: Lipidy. W: *Chemia żywności: sacharydy, lipidy, białka*. T. 2. Red. Z. Sikorski; WNT, Warszawa 2007, 73-164.
- [5] Dubois V., Breton S., Linder M., Fanni J., Parmentier M.: Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2007, 109, 710-732.
- [6] Dmochowska H. (red): *Rocznik Statystyki Międzynarodowej 2012*. Główny Urząd Statystyczny, Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa 2012.
- [7] Janowicz L.: Magazynowanie nasion rzepaku. *Wiadomości Rolnicze Polska Sp. z o.o.*, 2009, 5(57), 28.
- [8] Jesionek M., Odzimek J., Wlazło A.: Badanie obecności wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w tłuszczach po procesie smażenia. *Proceedings of ECOpole*, 2007, 1, 1/2, 147-151.
- [9] Jędra M., Starski A., Gawarska H., Sawilska-Rautenstrauch D.: Zanieczyszczenie olejów roślinnych benzo(a)pirenem. *Roczniki PZH*, 2008, 59(2), 131-138.
- [10] Krygier K., Wroniak M., Maszewska M.: Wpływ procesów technologicznych na wartość odżywczą olejów jadalnych. W: *Jakość i bezpieczeństwo żywności: kształtowanie jakości żywieniowej w procesach technologicznych*. Red. D. Nowak, Wyd. SGGW, Warszawa 2011, 65-75.
- [11] Kubiak M.S.: Wielopierścieniowe Węglowodory Aromatyczne (WWA) – ich występowanie w środowisku i w żywności. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2013, 94(1), 31-36.
- [12] Lage Yusty M.A., Cortizo Daviña J.L.: Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for PAHs investigation in vegetable oils. *Food Control*, 2005, 16, 59-64.

- [13] Obiedzińska A., Waszkiewicz-Robak B.: Oleje tłoczone na zimno jako żywność funkcjonalna. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, 1 (80), 27-44.
- [14] Perez C., Lopez de Cerain A, Bello J.: Modulation of mutagenic activity in meat samples after deepfrying in vegetable oils. *Mutagenesis*, 2002, 17 (1), 63-66.
- [15] Purcaro G., Navas J.A., Guardiola F., Conte L.S., Moret S.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in frying oils and snacks. *Journal of Food Protection*, 2006, 69 (1), 199-204.
- [16] Rodríguez-Acuna R, Pérez-Caminomdel C et al. Sources of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in Spanish virgin olive oils. *Food Additives & Contaminants: Part A. Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008, 25, 115-122.
- [17] Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 835/2011 z dnia 19 sierpnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 odnośnie do najwyższych dopuszczalnych poziomów wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środkach spożywczych. *Dz. Urz. UE L 215, s.4*, z 20.08.2011 r.
- [18] Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 836/2011 z dnia 19 sierpnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie Nr 333/2007 z dnia 28 marca 2007 r. ustanawiające metody pobierania próbek i metody analiz do celów urzędowej kontroli poziomów ołowiu, kadmu, rtęci, cyny nieorganicznej, 3-MCPD i benzo[a]pirenu w środkach spożywczych. *Dz. Urz. UE L 215, s. 9*, z 20.08.2011 r.
- [19] Starski A., Jędra M.: Ocena zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w oleju rzepakowym produkowanym w Polsce. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna - XLIV*, 2011, 4, 1054-1060.
- [20] Szponar L., Sekuła W., Rychlik E., Ołtarzewski M., Figurska K.: Badania indywidualnego spożycia i stanu odżywienia w gospodarstwach domowych. *Wydawnictwo Prace IŻŻ nr 101, Warszawa*, 2003.
- [21] Teixeira, V.H., Casal, S., Oliveira, M.B.P.P., 2007. PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chemistry*, 104, 106–112.
- [22] Tys J., Rybacki R., Malczyk P.: Zawartość benzo(a)pirenu w nasionach rzepaku pochodzących z Polski północnej. (2003 r.) *Rośliny Oleiste. Oilseed Crops*, 2003, 34, 627-636.
- [23] Van Der Wielen J., Jansen J., Martena M., De Groot H., In't Veld P., Determination of the level of benzo[a]pyrene in fatty foods and food supplements. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23(7), 709-714.
- [24] Wieczorek J., Wieczorek Z.: Pobranie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z żywnością. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna - XLIV*, 2011, 3, 725-731.

- [25] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC Lyon, 2010, 92.
- [26] Zaciera M. , Kurek J., Dzwonek L.: Narażenie na organiczne związki chemiczne powstające w trakcie obróbki termicznej olejów jadalnych. Medycyna Środowiskowa, 2012, 15, 3, 116-120.

AUTORZY

BEATA BARTODZIEJSKA - *Zakład Jakości Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*

AGNIESZKA BIELASZKA - *Zakład Technologii i Oceny Jakości Żywności, Wydział Zdrowia Publicznego, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach*

STANISŁAW BŁAŻEJAK - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ANNA BZDUCHA-WRÓBEL - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ANETA CEGIELKA - *Katedra Technologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA - *Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

AGNIESZKA CIEĆWIERZ - *Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ALEKSANDRA CIOŁKOWSKA - *Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

ALEKSANDRA EJSMONT - *Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

MAGDALENA FILIPECKA - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

IWONA GIENTKA - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

PAWEŁ GLIBOWSKI - *Zakład Technologii Mleka i Hydrokoloidów, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.*

MARTA GORYWODA - *Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

WALDEMAR GUSTAW - *Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

ELŻBIETA HAĆ-SZYMAŃCZUK - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

EWA JABŁOŃSKA-RYŚ - *Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

JERZY JAMROZ - *Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

MAGDALENA JANKOWSKA - *Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Białymstoku*

PIOTR KACZYŃSKI - *Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Białymstoku*

MAŁGORZATA KARWOWSKA - *Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

IWONA KASPRZYK - *Zakład Technologii i Techniki Chłodnictwa w Łodzi, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*

MAREK KIELISZEK - *Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ALEKSANDRA KOCOT - *Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA - *Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

MONIKA KORDOWSKA-WIATER - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

ANNA MARIA KOT - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

DARIUSZ KOWALCZYK - *Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

RADOSŁAW KOWALSKI - *Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

PAWEŁ KRAJMAS - *Zakład Mięсны „Jasiołka” w Dukli*

JOANNA KRÓLASIK - *Zakład Jakości Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*

ALINA KUNICKA-STYCZYŃSKA - *Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka*

MAŁGORZATA KURC - *Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

AGNIESZKA KURCZ - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

KATARZYNA KWIECIEŃ - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

AGNIESZKA LATOCH - *Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

JUSTYNA LIBERA - *Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

EDYTA LIPIŃSKA - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM - *Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie*

BOŻENA ŁOZOWICKA - *Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Białymstoku*

MATEUSZ MADYCZ - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

MARCIN MAKSYMIEC - *Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

JOANNA MARKOWSKA - *Zakład Technologii i Techniki Chłodnictwa w Łodzi, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*

MARZENA MARZEC - *Pracownia Żywności Ekologicznej Pochodzenia Roślinnego, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

EWA MATYJASZCZYK - *Zakład Ekspertyz i Opinii o Środkach Ochrony Roślin, Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu*

ARTUR MAZUREK - *Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

JAROSŁAW MAZURKIEWICZ - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

MONIKA MICHALAK-MAJEWSKA - *Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

STANISŁAW MLEKO - *Zakład Technologii Mleka i Hydrokoloidów, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

MACIEJ NASTAJ - *Zakład Technologii Mleka i Hydrokoloidów, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA - *Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

JOANNA NIEĆ - *Zakład Zdrowia Środowiskowego, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach*

DOROTA NOWAK - *Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

PIOTR OFMAN - *Katedra Technologii w Inżynierii i Ochronie Środowiska, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska, Politechnika Białostocka*

MAGDALENA OLSZEWSKA - *Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

ALEKSANDRA OŁDAK - *Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

EWELINA OŹGA - *Zakład Technologii Mleka i Hydrokoloidów, Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

URSZULA PANKIEWICZ, *Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

BOGUSŁAW PAWLIKOWSKI - *Zakład Ekonomii, Technologii i Wdrożeń, Morski Instytut Rybacki - Państwowy Instytut Badawczy w Gdyni*

BEATA PAZIAK-DOMAŃSKA - *Zakład Jakości Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*

KAMIL PIWOWAREK - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ELŻBIETA POLAK - *Zakład Technologii i Techniki Chłodnictwa w Łodzi, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*

MAGDALENA POLAK-BERECKA - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

WOJCIECH RADZKI - *Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

ANNA RZEPKOWSKA - *Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

KATARZYNA SKRZYPCZAK - *Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

ANETA SŁAWIŃSKA - *Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

MAŁGORZATA SŁOMA - *Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Technologii i Oceny Jakości Żywności, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach*

ALDONA SOBOTA - *Katedra Inżynierii i Technologii Zbóż, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

EWA SOLARSKA - *Pracownia Żywności Ekologicznej Pochodzenia Roślinnego, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

BARTOSZ SOŁOWIEJ - *Zakład Technologii Mleka i Hydrokoloidów, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

BOŻENA SOSNOWSKA - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

JOANNA STADNIK - *Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

BEATA STANUCH - *Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Technologii i Oceny Jakości Żywności, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach*

DARIUSZ M. STASIAK - *Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

LIDIA STASIAK-RÓŻAŃSKA - *Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ANNA STÓJ - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

APOLONIA STEFANIAK - *Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Technologii i Oceny Jakości Żywności, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach*

MONIKA SUJKA - *Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

ANNA SZOSLAND-FAŁTYN - *Zakład Jakości Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*

OLGA SZULECKA - *Zakład Ekonomii, Technologii i Wdrożeń, Morski Instytut Rybacki - Państwowy Instytut Badawczy w Gdyni*

MARIA ŚMIECHOWSKA - *Katedra Towaroznawstwa i Zarządzania Jakością, Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa, Akademia Morska w Gdyni*

ZDZISŁAW TARGOŃSKI - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

KAMIL TOCZEK - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

MARTA TOMCZYŃSKA-MLEKO - *Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Agrobioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

MONIKA TRZĄSKOWSKA - *Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ADAM WAŚKO - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

MARTA WESOŁOWSKA-TROJANOWSKA - *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

JÓZEFA WIATER - *Katedra Technologii w Inżynierii i Ochronie Środowiska, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska, Politechnika Białostocka*

PAULINA WITT - *Katedra Towaroznawstwa i Zarządzania Jakością, Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa, Akademia Morska w Gdyni*

KAROLINA WÓJCIAK - *Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

RÓŻA WÓJCIK - *Katedra Technologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

MARZENA WŁODARCZYK-STASIAK, *Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

ALICJA ZACHARA - *Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie; Laboratorium Higieny Żywności i Żywienia, Wojewódzka Stacja Sanitarно-Epidemiologiczna w Rzeszowie*

ANNA ZADERNOWSKA - *Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie*

MARTA ZALEWSKA-KORONA - *Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

DOROTA ZIELIŃSKA - *Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*