

**POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI
ODDZIAŁ MAŁOPOLSKI**

**WYDZIAŁ TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI
UNIwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja
w Krakowie**

KOMITET NAUK O ŻYWNOŚCI PAN

**SUROWCE POCHODZENIA
ZWIERZĘCEGO JAKO ŹRÓDŁO
SKŁADNIKÓW BIOAKTYWNYCH**

Jacek Słupski, Tomasz Tarko, Iwona Drożdż (redaktorzy)

Recenzenci Naukowi

dr hab. inż. Anna Korus, dr hab. inż. Piotr Gębczyński, dr hab. inż. Tomasz Tarko, dr hab. inż. Paweł Satora prof. UR, dr hab. inż. Jacek Słupski, dr hab. inż. Stanisław Kowalski, prof. dr hab. inż. Jacek Domagała, dr inż. Marek Sady, prof. dr hab. inż. Teresa Leszczyńska, dr Iwona Drożdż, dr hab. inż. Ewelina Węsierska, prof. dr hab. inż. Władysław Migdał, dr inż. Małgorzata Tabaszewska, dr Łukasz Skoczylas, prof. dr hab. inż. Elżbieta Sikora, dr hab. inż. Mariusz Witczak, dr Małgorzata Makarewicz, prof. dr hab. Krzysztof Surówka, dr hab. inż. Magdalena Michalczyk

Redakcja

Dr hab. inż. Jacek Słupski
Dr hab. inż. Tomasz Tarko
Dr Iwona Drożdż

Projekt okładki

Dr Łukasz Byczyński

Wydawca

Oddział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności
31-149 Kraków, ul. Balicka 122

© *Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2014*

Wydawnictwo finansowane przez
Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego



XIII Konferencja Naukowa z cyklu ŻYWNOŚĆ XXI WIEKU „ŻYWNOŚĆ A SKŁADNIKI BIOAKTYWNE”, 24-25 września 2018 - zadanie finansowane w ramach umowy 774/P-DUN/2018 ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na działalność upowszechniającą naukę.

ISBN 978-83-946796-2-0

Za treść zamieszczonych materiałów odpowiadają ich autorzy

SPIS TREŚCI

<i>Agata ZNAMIROWSKA, Dorota KALICKA, Magdalena BUNIEWSKA, Małgorzata PAWŁOS, Katarzyna SZAJNAR</i>	
Zastosowanie aminokwasów egzogennych w produkcji mleka fermentowanego przez <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> oraz <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	4
<i>Danuta KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, Dorota ZIELIŃSKA</i>	
Czy bakterie fermentacji mlekowej pochodzące z żywności są probiotyczne?	14
<i>Jolanta BARAN, Małgorzata ŻRÓDŁO-LODA</i>	
Trwałość cech organoleptycznych jogurtu z dodatkiem inuliny	23
<i>Krzysztof BOHDZIEWICZ</i>	
Charakterystyka twarogów dojrzewających z <i>Brevibacterium linens</i>	33
<i>Aneta BRODZIAK, Jolanta KRÓL, Anna WOLANCIUK, Joanna BARŁOWSKA, Monika KĘDZIERSKA-MATYSEK</i>	
Ocena jakości mlecznych napojów fermentowanych produkowanych na bazie mleka krów rasy simentalskiej utrzymywanych w gospodarstwach ekologicznych	44
<i>Janusz KILAR, Maria RUDA, Magdalena KILAR, Kinga GRYCH</i>	
Dzicyzna. Szanse i bariery zwiększenia spożycia	53
<i>Katarzyna NEFFE-SKOCIŃSKA, Joanna TRAFIAŁEK, Danuta KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, Zbigniew DOLATOWSKI</i>	
Ocena ryzyka zdrowotnego ekologicznych produktów mięsnych wyprodukowanych bez użycia azotanów III i V	64
<i>Lucia BENEŠOVÁ, Jozef GOLIAN, Lubomír BELEJ</i>	
Concept of fish species analysis based on the principle of DNA profiles	75
<i>Jozef GOLIAN, Lubomír BELEJ, Marek ŠNIRC</i>	
Safety and quality of fishery and aquaculture products.	83
<i>Iwona DROŻDŻ, Justyna WOŁKOWICZ, Małgorzata MAKAREWICZ, Urszula BŁASZCZYK</i>	
Bioróżnorodność bakterii kwasu mlekowego w produktach pszczelich i zbadanie ich zdolności do produkcji bakteriocyn	97
<i>Monika TOMCZYK, Bartłomiej KOZYRA, Małgorzata DŻUGAN</i>	
Wpływ procesu kremowania na jakość miodu	111
<i>Marta BURZYŃSKA, Dorota PIASECKA-KWIATKOWSKA</i>	
Pyłki roślin wiatropylnych w odmianowych miodach nektarowych zebranych z trzech regionów polski	119
<i>Weronika PIECHOWICZ, Paweł SATORA</i>	
Zawartość amin biogennych w wybranych grupach żywności	131
<i>Marta LISZKA-SKOCZYŁAS, Daniel ŻMUDZIŃSKI, Łukasz SKOCZYŁAS</i>	
Produkty wzbogacone w kwasy omega-3 jako przykład żywności funkcjonalnej	140
<i>Dorota KLENSPORN-PAWLIK, Wojciech ŻMUDZIŃSKI, Agnieszka BĄKOWSKA</i>	
Owady jadalne źródłem bioaktywnych lipidów	155
<i>Małgorzata KARWOWSKA, Weronika SOKOŁOWSKA, Anna KONONIUK, Karolina M. WÓJCIAK</i>	
Wpływ serwatki kwasowej na wybrane cechy jakościowe wołowych produktów mięsnych	164
<i>Joanna MAJOWSKA, Ireneusz MACIEJASZEK, Barbara SURÓWKA, Krzysztof SURÓWKA</i>	
Żele żelatynowe barwione barwnikami naturalnymi.....	176

AGATA ZNAMIROWSKA¹, DOROTA KALICKA¹, MAGDALENA BUNIEWSKA¹,
MAŁGORZATA PAWŁOS¹, KATARZYNA SZAJNAR¹

¹Zakład Technologii Mleczarstwa, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski w Rzeszowie

**ZASTOSOWANIE AMINOKWASÓW EGZOGENNYCH W PRODUKCJI MLEKA
FERMENTOWANEGO PRZEZ *LACTOBACILLUS CASEI* SSP. *RHAMNOSUS* ORAZ
BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. *LACTIS***

Streszczenie

Celem pracy było określenie możliwości wzbogacania mleka fermentowanego przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 i *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* w aminokwasy egzogenne (L-walina, L-leucyna, L-izoleucyna) oraz ocena właściwości fizykochemicznych, sensorycznych i tekstury napojów wyprodukowanych metodą termostatową.

Do mleka podgrzanego mleka (40 °C) dodano aminokwasy BCAA (L-walina, L-leucyna, L-izoleucyna) w proporcjach 2:1:1 w ilości: 0,0% (próba kontrolna), 2,2% i 4,4% oraz 3% proszku pomarańczowego i zaszczepiano odpowiednio *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen, Dania) lub *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LCR (Serowar S.C., Szczecin). Inkubację prowadzono w temp. 38 °C do osiągnięcia pH ok. 4,8. W mleku fermentowanym oznaczano: pH, kwasowość ogólną (°SH), zawatość kwasu mlekowego, synerżę, teksturę i przeprowadzono ocenę sensoryczną. Posiewy *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* wykonywano z zastosowaniem metody płytkowej.

W projektowaniu receptur nowych napojów mlecznych funkcjonalnych można wykorzystać aminokwasy BCAA (L-walina, L-leucyna, L-izoleucyna), uwzględniając ich wpływ na czas fermentacji, smak i zapach. Dawka 2,2% BCAA była preferowana przez konsumentów tylko w mleku fermentowanym przez *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*. W mleku z *Bifidobacterium* należałoby zastosować niższe stężenie aminokwasów w celu poprawienia atrakcyjności sensorycznej. Mleko fermentowane przez *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* spełniało kryterium określane mianem minimum terapeutycznego, tj. zawierało ponad 6 log jtk g⁻¹ *Bifidobacterium* lub *Lactobacillus*. Dodatek aminokwasów spowodował obniżenie twardości skrzepu mleka fermentowanego zarówno przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, jak i *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*. Zastosowanie aminokwasów BCAA w produkcji mleka fermentowanego byłoby możliwe w połączeniu z wyrazistymi i intensywnymi dodatkami smakowymi nadającymi atrakcyjny zapach i smak.

Słowa kluczowe: aminokwasy, mleko fermentowane, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*

Wprowadzenie

Aminokwasy egzogenne w przeciwieństwie do endogennych nie mogą być syntezowane w organizmie człowieka i zwierząt, dlatego konieczne jest dostarczanie ich organizmowi wraz z pokarmami białkowymi w odpowiednim składzie [Cholewa i in., 2017]. Aminokwasy wykorzystywane są do budowy tkanek, a także do utrzymania układów enzymatycznych i strukturalnych organizmu. Są one również silnymi bodźcami do odbudowy mięśni, dlatego często włączane są do programu rehabilitacji fizycznej [Volpi i in., 2003]. Indukowana przez aminokwasy egzogenne synteza białek prowadzi do zwiększenia masy, funkcji mięśni i funkcjonowania fizycznego [Aquilani i in., 2008]. Niektóre aminokwasy egzogenne są prekursorami syntezy neurotransmiterów mózgu, w tym serotoniny, dopaminy, noradrenaliny, istotnych dla nastroju i zachowania człowieka [Rondanelli i in., 2011].

Starzenie się jest związane z niezdolnością mięśni szkieletowych do reagowania na niskie dawki (~7,5 g) aminokwasów egzogennych, podczas gdy wyższe dawki (10-15 g) są w stanie stymulować białko mięśni w podobnym stopniu jak u młodych osób. Podaje się, że 25-30 g białka wysokiej jakości (~10 g aminokwasów egzogennych) jest konieczne do maksymalnego stymulowania syntezy białek mięśni szkieletowych, sugeruje to, że spożycie tej ilości białka przy każdym posiłku może być pomocne w utrzymaniu masy mięśniowej u osób starszych [Paddon-Jones i Rasmussen 2009]. Niezbędne aminokwasy egzogenne zapobiegają utracie mięśni u osób starszych i z nietolerancją laktozy [Børsheim i in., 2008].

W badaniach Jones'a i in. [2015] stwierdzono, że po podaniu dawki 12 g aminokwasów egzogennych trzy razy dziennie przez trzy miesiące, osoby po 65 roku życia o zmniejszonej aktywności fizycznej, zwiększyły swoją wydolność fizyczną oraz uzyskały lepszy wynik w 6- minutowym dystansie testowym. U osób w podeszłym wieku ze zmniejszoną masą mięśniową suplement 8 g aminokwasów egzogennych przez 60 tygodni poprawiał ich beztłuszczową masę ciała i wrażliwość na insulinę [Bakalar i in., 2006; Solerte i in., 2008]. Podawanie aminokwasów egzogennych powinno być łączone z aktywnością fizyczną bądź rehabilitacją, ponieważ mobilność zwiększała korzyści stosowania suplementu [Jones i in., 2015].

Aminokwasy egzogenne pomocne okazały się również w leczeniu chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc. Choroba ta często wiąże się ze znaczną utratą masy ciała w szczególności masy mięśniowej. Ponieważ przyrost masy ciała i wyższy poziom aktywności fizycznej zmniejszają ogólnie ryzyko zgonu u tych pacjentów, ważne jest opracowanie bardziej skutecznych strategii żywieniowych, które wspomagają wzrost

mięśni i poprawę funkcji [Jonker i in., 2017]. Długoterminowa interwencja z niezbędnymi aminokwasami może wspomóc oba aspekty powrotu do zdrowia. Wyniki dotyczące pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc z wyniszczeniem mięśni wykazały, że białka serwatkowe i kazeina, zasobne w aminokwasy egzogenne, są bardzo skuteczne w stymulowaniu anabolizmu białek w całym ciele [Jonker i in., 2017; Paddon-Jones i Rasmussen, 2010].

Ostatnie postępy w nauce o żywności i żywieniu uwiarygodniły możliwość modulowania pewnych określonych funkcji fizjologicznych w organizmie poprzez przyjmowanie pokarmu. Korzystne działanie żywności funkcjonalnej wywodzi się z dietetycznych substancji czynnych, dlatego też projektowanie i rozwój tych produktów wymagają strategii zwiększania obecności związków bioaktywnych [Jiménez-Colmenero, 2013]. Przetwory mleczne można zastosować do indukowania zmian jakościowych i ilościowych w składzie diety oraz do modulowania obecności aktywnych związków dietetycznych w żywności. Enzymy proteolityczne wytwarzane przez bakterie fermentacji mlekowej odgrywają ważną rolę w rozkładaniu kazeiny i peptydów do wolnych aminokwasów. Według Irigoyen i in. [2012] głównymi aminokwasami w jogurcie były: lizyna (50%), cysteina (17%), tryptofan (4%), prolina (2%). Natomiast w napoju probiotycznym oznaczono: lizynę (50%), cysteinę (13%), tryptofan (4%), prolinę (3%). Aminokwasy rozgałęzione takie jak walina i izoleucyna były obecne w napojach fermentowanych jednak w niskich stężeniach.

Celem pracy było określenie możliwości wzbogacania mleka fermentowanego przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 i *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* w aminokwasy egzogenne (L-walina, L-leucyna, L-izoleucyna) oraz ocena właściwości fizykochemicznych, sensorycznych i tekstury mleka fermentowanego wyprodukowanego metodą termostatową.

Materiał i metody badań

Materiałem do produkcji mleka fermentowanego było mleko krowie pasteryzowane, mikrofiltrowane o zawartości tłuszczu 2% (OSM Piątnica, Polska), aminokwasy (POL-AURA Odczynniki Chemiczne, Różnowo, Polska) oraz liofilizowana i sproszkowana pomarańcza (WPPH ELENA Import – Export Franciszek Siegień, Kokanin Polska). Do podgrzanego mleka (40°C) dodano aminokwasy BCAA (branched-chain amino acid) składające się z L-waliny, L-leucyny, L-izoleucyny w proporcjach 2:1:1 w ilości: 0,0% (próba kontrolna), 2,2% i 4,4%. Do mleka z aminokwasami dodano 3% proszku pomarańczowego. Następnie mleka homogenizowano (37°C, 20 MPa), każde mleko podzielono na 2 części i zaszczepiano odpowiednio *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen, Dania) lub *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LCR (Serowar S.C.,

Szczecin). W wymieszanym mleku zmierzono pH (godz. 0) a następnie rozlewano do opakowań o pojemności 100 cm³ z pokrywką i kodowano. Podczas fermentacji kontrolowano pH. Inkubację prowadzono w temp. 38°C do osiągnięcia pH ok. 4,8. Uzyskane mleka schładzano do 5°C i przechowywano w tej temperaturze przez 7 dni. Po tym czasie w mleku oznaczano: pH przy użyciu pH-metru Toledo FiveEasy TM (Mettler Toledo, Szwajcaria), kwasowość ogólną (°SH), zawartość kwasu mlekowego [Jemaa i in., 2017], synerezę metodą wirówkową [Keogh i O'Kennedy, 1998], teksturę testem TPA (teksturometrem Brookfield CT3, Brookfield AMETEK, USA) – przy ustawieniach: siła 0,1 N, prędkość głowicy 1 mm/s, średnica próbki 35 mm, sondaTA3/100, średnica elementu pomiarowego 25,3 mm (Brookfield AMETEK, USA). Określano następujące składowe tekstury: twardość, adhezyjność, kohezyjność i sprężystość. Posiewy *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* wykonywano z zastosowaniem metody płytkowej. Inkubację posiewów w podłożu MRS Agar (Biocorp, Poland) wykonano w temperaturze 37 °C przez 72 godziny w warunkach beztlenowych [Lima i in 2009]. Do utrzymania warunków beztlenowych użyto eksykatora próżniowego oraz GENbox anaer (Biomerieux, Polska), a do kontroli warunków wskaźnika Anaer indicator (Biomerieux, Polska). Wyniki podano w log jtk g⁻¹.

Ocenę sensoryczną metodą profilowania przeprowadził przeszkolony 15-osobowy zespół. Oceniano próbki w skali 9-stopniowej ze skalą liniową ustrukturowaną i z określeniami brzegowymi: lewy koniec skali oznaczał cechę najmniej wyczuwalną, najmniej charakterystyczną, a prawy – cechę najintensywniejszą, najbardziej charakterystyczną [Baryłko-Pikielna i Matuszewska, 2014].

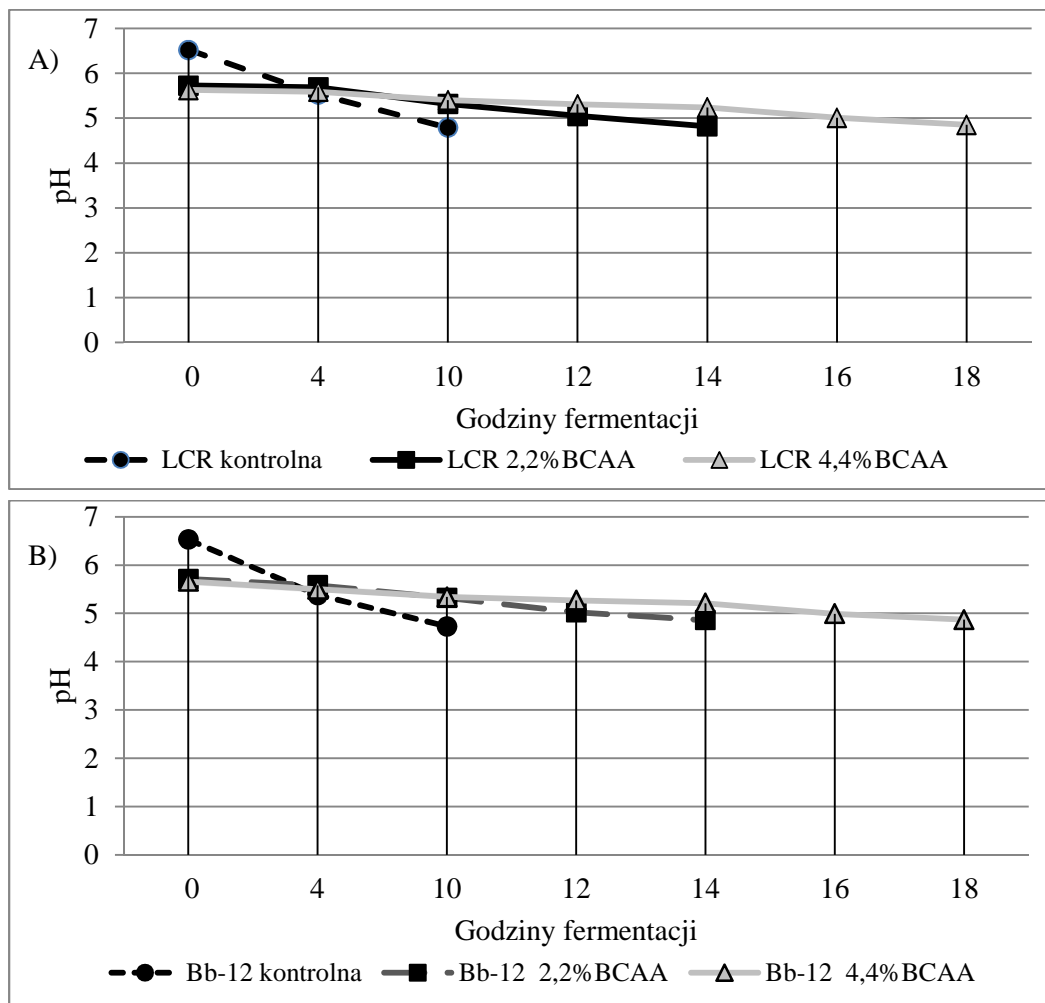
Doświadczenie wykonano w trzech terminach, po pięć powtórzeń dla każdej grupy w każdym terminie. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie w programie Statistica v.13.1 (StatSoft, USA). Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic między wartościami średnimi wszystkich grup (uwzględniając rodzaj szczepionki i dawkę aminokwasów) szacowano testem Tukey'a, przy $p \leq 0,05$. Obliczono współczynniki korelacji prostej (r).

Wyniki i dyskusja

Dodatek aminokwasów i proszku pomarańczowego do mleka przed fermentacją (wyk.1.) istotnie obniżył wartość pH w porównaniu z próbami kontrolnymi ($p \leq 0,05$). Istotny wpływ na kwasowość czynną mleka miała dawka wprowadzonych aminokwasów i wraz ze zwiększaniem dodatku BCAA pH przyjmowało coraz niższe wartości ($r = -0,9799$, $p \leq 0,05$).

Wprowadzenie do mleka aminokwasów rozgałęzionych i proszku pomarańczowego skutkowało modyfikacją procesu ukwaszania. W mleku kontrolnym fermentowanym

przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 oraz *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (LCR) zakończono fermentację po 10 godzinach. Natomiast w mleku zawierającym 2,2% BCAA fermentację wydłużono do 14 godzin, a w mleku z 4,4% BCAA aż do 18 godzin, aby osiągnąć wartość pH ok. 4,8.



Wykres 1. Kwasowość czynna (pH) mleka z różnym udziałem BCAA podczas fermentacji przez: A) - *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12, B) - *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*

Po siedmiu dniach przechowywania wartość pH w mleku fermentowanym przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 wynosiła ok. 4,7 (tabela 1), a w mleku z *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* pH przyjęło wartość 4,6. W badaniach

Skrzypczak i Gustawa [2012] dodatek izolatu białek serwatkowych w produkcji biojogurtu nie wpływał istotnie na pH napojów.

Wysokość dawki wzbogacenia w aminokwasy i dodatek proszku pomarańczowego nie miały wpływu na kwasowość ogólną mleka fermentowanego przez *Bifidobacterium* Bb-12, która kształtowała się w przedziale od 33,44 °SH do 34,12 °SH. Istotnie wyższą kwasowością ogólną cechowało się mleko z *Lactobacillus* LCR wzbogacone aminokwasami w dawce 2,2% i 4,4% ($p \leq 0,05$). Również w mleku fermentowanym przez *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* oznaczono istotnie wyższe stężenie kwasu mlekowego w porównaniu do grup z Bb-12 ($p \leq 0,05$).

Tabela 1. Kwasowość, synereza i liczba komórek bakterii w mleku fermentowanym

Właściwość	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb-12			<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> LCR		
	kontrolna	2,2% BCAA	4,4% BCAA	kontrolna	2,2 % BCAA	4,4 % BCAA
	pH	4,70 ^a ±0,18	4,72 ^a ±0,04	4,73 ^a ±0,13	4,68 ^a ±0,11	4,68 ^a ±0,20
Kwasowość ogólna [°SH]	33,88 ^a ±0,52	34,12 ^{ab} ±0,87	33,44 ^a ±1,23	34,64 ^{ab} ±0,46	35,04 ^b ±0,46	36,89 ^c ±0,31
Kwas mlekowy [g/l]	0,73 ^a ±0,10	0,75 ^a ±0,03	0,77 ^a ±0,04	0,81 ^b ±0,03	0,80 ^b ±0,05	0,82 ^b ±0,04
Synereza [%]	68,63 ^c ±1,01	69,45 ^c ±0,64	70,49 ^c ±1,71	61,35 ^a ±1,61	62,15 ^a ±0,72	63,87 ^b ±0,56
Bakterie [log jtk g ⁻¹]	7,92 ^a ±2,09	9,07 ^a ±3,67	8,28 ^a ±2,68	8,08 ^a ±1,89	8,61 ^a ±2,03	8,53 ^a ±1,88

Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

Mleko fermentowane przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 charakteryzowało się wyższą synerezą niż mleko fermentowane przez *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*. Jedyne istotny wpływ ilości dodanych aminokwasów na wielkość synerezy stwierdzono w mleku z *Lactobacillus* LCR, gdzie wraz ze zwiększaniem dawki BCAA zwiększała się ilość wydzielonej serwatki.

Wszystkie grupy spełniały kryterium minimum terapeutycznego, tj. zawierały ponad 6 log jtk g⁻¹ *Bifidobacterium* lub *Lactobacillus*. Najniższą liczbę komórek bakterii oznaczono w mleku kontrolnym, natomiast najwyższą w mleku z dodatkiem 2,2% BCAA, jednak różnice te nie były istotne. Na liczbę komórek bakterii oznaczonych w mleku wpłynął czas fermentacji, który był wydłużony z 10 godzin w mleku kontrolnym do 14 godzin w mleku z 2,2% BCAA, a w mleku z 4,4% BCAA aż do 18 godzin.

Wiele czynników środowiskowych, w tym szybkość adaptacji, skład pożywki, niedobór lub nadmiar składników odżywczych odgrywają ważną rolę w regulacji produkcji metoabolitów przez bakterie [Pérez Martínez i in., 2014]. Wprowadzenie do mleka dodatkowego źródła aminokwasów w formie hydrolizatu kazeiny stymulowało fermentację i proteolizę prowadzoną przez *Bifidobacterium* [Zaręba i in., 2008]. Udokumentowane zostało, że stropy środowiskowe indukują zmiany w aktywności metabolicznej probiotyków prowadząc do istotnych zmian właściwości biochemicznych i organoleptycznych produktów [Ruiz i in., 2011].

Tabela 2. Cechy sensoryczne mleka fermentowanego

Właściwość	<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>			<i>Lactobacillus casei ssp. rhamnosus</i>		
	kontrolna	2,2% BCAA	4,4% BCAA	kontrolna	2,2% BCAA	4,4% BCAA
Preferencje	2,13 ^a ±0,64	3,88 ^b ±0,35	5,13 ^c ±0,35	1,13 ^a ±0,35	1,88 ^a ±0,64	5,88 ^c ±0,35
Konsystencja	8,00 ^b ±0,93	5,88 ^a ±2,10	4,63 ^a ±1,51	8,00 ^b ±0,93	7,88 ^b ±0,83	5,88 ^a ±2,10
Barwa	8,13 ^a ±1,17	7,13 ^a ±1,36	7,00 ^a ±1,20	8,00 ^a ±1,51	7,13 ^a ±1,36	7,08 ^a ±1,96
Smak mleczno-kremowy	3,50 ^{ab} ±1,51	1,75 ^a ±0,89	1,63 ^a ±1,19	4,50 ^b ±1,62	4,13 ^b ±1,55	1,38 ^a ±1,06
Smak kwaśny	5,63 ^b ±1,07	3,75 ^a ±2,71	2,88 ^a ±1,89	4,50 ^{ab} ±2,45	3,00 ^a ±1,31	3,38 ^a ±2,45
Smak dodatków smakowych	5,00 ^a ±1,00	5,50 ^a ±2,78	7,50 ^a ±2,83	5,00 ^a ±0,00	5,00 ^a ±2,39	6,50 ^a ±3,55
Smak słodki	3,88 ^b ±1,55	2,38 ^b ±1,06	1,38 ^a ±0,52	5,88 ^c ±1,53	2,25 ^b ±0,71	1,25 ^a ±0,46
Smak gorzki	1,25 ^a ±0,11	4,75 ^b ±1,28	7,08 ^c ±0,35	1,21 ^a ±0,10	2,88 ^b ±1,64	7,00 ^c ±1,00
Zapach kwaśny	4,88 ^c ±1,53	3,50 ^b ±1,77	2,75 ^{ab} ±1,67	3,00 ^b ±0,56	2,13 ^a ±1,17	2,00 ^a ±1,28
Zapach dodatków	4,00 ^a ±1,00	6,00 ^b ±1,20	5,98 ^b ±1,64	4,00 ^a ±0,90	6,00 ^b ±1,20	6,13 ^b ±1,30
Zapach obcy	1,95 ^a ±0,80	2,38 ^b ±1,00	3,38 ^b ±1,07	1,50 ^a ±0,50	2,25 ^b ±0,71	3,38 ^b ±1,85

Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

Wyniki oceny preferencji metodą szeregowania umożliwiły wybór mleka najbardziej pożądanego pod względem ocenianych cech sensorycznych. Najbardziej preferowane (najmniejsza wartość średniej rangowej) okazało się mleko kontrolne oraz wzbogacone w 2,2% BCAA i proszek pomarańczowy fermentowane przez *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus*. O takim wyniku zadecydowały przede wszystkim wysokie noty za konsystencję i smak mleczno-kremowy. Trzecim w kolejności preferencji ocenianych było mleko kontrolne z *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*.

Stwierdzono istotną zależność korelacyjną pomiędzy preferencjami a dawką BCAA wprowadzonego do mleka, $r = 0,9333$ ($p \leq 0,05$)

Biorąc pod uwagę pozostałe analizowane wyróżniki atrakcyjności sensorycznej, zauważa się, że mleko wzbogacone w 4,4% BCAA uzyskało najniższe noty za smak mleczno-kremowy, jogurtowy, kwaśny oraz zapach kwaśny. Wykazano istotne zależności korelacyjne pomiędzy ilością wprowadzonego BCAA a smakiem mleczno-kremowym ($r = -0,6582$, $p \leq 0,050$) i słodkim ($r = -0,6801$, $p \leq 0,050$), wskazujące, że wraz ze zwiększaniem stężenia tych aminokwasów zmniejsza się intensywność tych wyróżników. Ponadto tak duży dodatek aminokwasów intensyfikował smak gorzki ($r = 0,9139$, $p \leq 0,050$) i zapach obcy mleka fermentowanego ($r = 0,6179$, $p \leq 0,050$). Według Miraglia Del Giudice i in. [2015] preferencja smaku słodkiego u małych dzieci i niechęć do gorzkich i kwaśnych jest podobna jak u większości dorosłych. Dlatego stężenia BCAA użyte do wzbogacania mleka nie mogą być duże, a dawka 4,4% okazała się zbyt wysoka.

W tabeli 3 zamieszczono wyniki tekstury mleka fermentowanego przez bakterie probiotyczne wzbogacone różnymi dawkami aminokwasów. Kontrolne mleko fermentowane zarówno przez *Bifidobacterium*, jak i *Lactobacillus* charakteryzowało się większą twardością niż wzbogacone aminokwasami ($p \leq 0,05$). Wyniki te potwierdzają również noty przyznane w ocenie sensorycznej oraz współczynnik korelacji obliczony pomiędzy ilością wprowadzonego BCAA a twardością ($r = -0,7834$, $p \leq 0,05$). Z kolei rodzaj użytego szczepu i dawka wzbogacania mleka aminokwasami nie różnicowały adhezji i sprężystości.

Tabela 3. Tekstura mleka fermentowanego

Tekstura	<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>			<i>Lactobacillus casei ssp. rhamnosus</i>		
	kontrolna	2,2% BCAA	4,4% BCAA	kontrolna	2,2 % BCAA	4,4 % BCAA
Twardość [N]	0,68 ^b ±0,12	0,41 ^a ±0,02	0,40 ^a ±0,09	0,54 ^b ±0,04	0,41 ^a ± 0,01	0,40 ^a ±0,01
Adhezijność [mJ]	0,38 ^a ±0,25	0,32 ^a ±0,20	0,24 ^a ±0,17	0,36 ^a ±0,22	0,30 ^a ±0,10	0,28 ^a ±0,08
Sprężystość [mm]	13,40 ^a ±0,74	13,07 ^a ±0,88	13,38 ^a ±0,59	12,99 ^a ±0,65	13,69 ^a ±0,48	13,80 ^a ±0,72

Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

Wnioski

1. W projektowaniu receptur nowych napojów mlecznych funkcjonalnych można wykorzystać aminokwasy BCAA (L-walina, L-leucyna, L-izoleucyna), uwzględniając ich wpływ na czas fermentacji, smak i zapach. Dawka 2,2% BCAA była preferowana

- przez konsumentów tylko w mleku fermentowanym przez *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*. W mleku z *Bifidobacterium* należałoby zastosować niższe stężenie aminokwasów w celu poprawienia atrakcyjności sensorycznej.
2. Dodatek aminokwasów spowodował obniżenie twardości skrzepu mleka fermentowanego zarówno przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, jak i *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*.
 3. Mleko spełniało kryterium określane mianem minimum terapeutycznego, tj. zawierało ponad 6 log jtk g⁻¹ *Bifidobacterium* lub *Lactobacillus*.
 4. Zastosowanie aminokwasów BCAA w produkcji mleka fermentowanego byłoby możliwe w połączeniu z wyrazistymi i intensywnymi dodatkami smakowymi nadającymi atrakcyjny zapach i smak.

Literatura

1. Aquilani R., Opasich C., Gualco A., Verri M., Testa A., Pasini E., Viglio S., Iadarola P., Pastoris O., Dossena M., Boschi F. (2008). Adequate energy-protein intake is not enough to improve nutritional and metabolic status in muscle-depleted patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.*, 10(11), 1127-35.
2. Bakalar B., Duska F., Pacht J. (2006). Parenterally administered dipeptide alanyl-glutamine prevents worsening of insulin sensitivity in multiple-trauma patients. *Crit Care Med.*, 34, 381-386.
3. Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I. (2014). *Sensoryczne badania żywności. Podstawy. Metody. Zastosowania. Wyd. II. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków.*
4. Børsheim E., Bui Q.U., Tissier S., Kobayashi H., Ferrando A.A., Wolfe R.R. (2008). Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly. *Clin Nutr.*, 27(2), 189-195.
5. Cholewa J.M., Dardevet D., Lima-Soares F., de Araújo Pessôa K., Oliveira P.H., Dos Santos Pinho J.R., Nicastro H., Xia Z., Cabido C.E., Zanchi N.E. (2017). Dietary proteins and amino acids in the control of the muscle mass during immobilization and aging: role of the MPS response. *Amino Acids.*, 49(5), 811-820.
6. Irigoyen A., Ortigosa M., García S., Ibáñez F.C., Torre P. (2012). Comparison of free amino acids and volatile components in three fermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 4, 578-584.
7. Jemaa M.B., Falleh H., Neves M.A., Isoda H., Nakajima M., Ksouri R. (2017). Quality preservation of deliberately contaminated milk using thyme free and Nano emulsified essential oils. *Food Chemistry*, 217, 726-734.
8. Jiménez-Colmenero F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52, 64-74.
9. Jones C., Eddleston J., McCairn A., Dowling S., McWilliams D., Coughlan E., Griffiths R.D. (2015). Improving rehabilitation after critical illness through outpatient physiotherapy classes and essential amino acid supplement: A randomized controlled trial. *J Crit Care.*, 30(5), 901-907.
10. Jonker R., Deutz N.E., Erbland M.L., Anderson P.J., Engelen M.P. (2017). Effectiveness of essential amino acid supplementation in stimulating whole body net protein anabolism is comparable between COPD patients and healthy older adults. *Metabolism.*, 69, 120-129.
11. Keogh M.K., O`Kennedy B.T. (1998). Rheology of Stirred Yogurt as Affected by Added Milk Fat, Protein and Hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 63(1), 108-112.
12. Lima K.G., Kruger M.F., Behrens J., Destro M.T., Landgraf M., Franco, B.D. (2009). Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 491-495.

13. Miraglia Del Giudice M., D`Auria E., Peroni D., Palazzo S., Radaelli G., Comberiat P., Galdo F., Maiello N., Riva E., (2015). Flavor, relative palatability and components of cow's milk hydrolysed formulas and amino acid-based formula. *Italian Journal of Pediatrics*, 41, 42-50.
14. Paddon-Jones D., Rasmussen B.B. (2009). Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 12, 86-90.
15. Pérez Martínez G., Bäuerl C., Collado M.C. (2014). Understanding gut microbiota in elderly's health will enable intervention through probiotics. *Benef Microbes.*, 5(3), 235-246.
16. Rondanelli M., Opizzi A., Antonello N., Boschi F., Iadarola P., Pasini E., Aquilani R., Dioguardi F.S., (2011). Effect of essential amino acid supplementation on quality of life, amino acid profile and strength in institutionalized elderly patients. *Clin Nutr.*, 30(5), 571-7.
17. Ruiz D., Agaras B., de Werra P., Wall L.G., Valverde C. (2011). Characterization and screening of plant probiotic traits of bacteria isolated from rice seeds cultivated in Argentina. *J Microbiol.*, 49(6), 902-12.
18. Skrzypczak K., Gustaw W. (2012). Wpływ dodatku prebiotyków i białek serwatkowych na właściwości fizykochemiczne biojogurtów. *Żywność. Nauka Technologia. Jakość*, 5, 84, 155-165.
19. Solerte S.B., Gazzaruso C., Bonacasa R., Rondanelli M., Zamboni M., Basso C., Locatelli E., Schifino N., Giustina A., Fioravanti M. (2008). Nutritional supplements with oral amino acid mixtures increases whole-body lean mass and insulin sensitivity in elderly subjects with sarcopenia. *Am J Cardiol.*, 2, 101, 69-77.
20. Volpi E., Kobayashi H., Sheffield-Moore M., Mittendorfer B., Wolfe R.R. (2003). Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *Am J Clin Nutr.*, 78(2), 250-258.
21. Zareba D., Ziarno M., Obiedzinski M. (2008). Przeżywalność bakterii jogurtowych i probiotycznych w układach modelowych mleka niefermentowanego i fermentowanego. *Medycyna Wet.*, 64(8), 1007-1011.

DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA¹, DOROTA ZIELIŃSKA¹

*¹Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności,
Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

CZY BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ POCHODZĄCE Z ŻYWNOŚCI SĄ PROBIOTYCZNE?

Wstęp

Rola żywności w kształtowaniu zdrowia i dobrostanu człowieka była znana od czasów Hipokratesa, którego powtarzane obecnie powiedzenie „niech żywność będzie twoim lekarstwem, a lekarstwo twoją żywnością”, stało się hasłem zwolenników „leczenia” żywnością. Zależność ta jest szczególnie dobrze widoczna i udokumentowana jeśli chodzi o pożyteczną mikroflorę znajdującą się w organizmie człowieka.

Sprawnie działający ekosystem jelitowy, tzw. mikrobiom (skład ilościowy i jakościowy różnych mikroorganizmów) ma duży wpływ na zachowanie zdrowia człowieka. Mikroflora jelit człowieka jest najbardziej zróżnicowanym gatunkowo ekosystemów na ziemi (100 - 1000 gatunków). Mikrobom wpływa na pracę wielu układów fizjologicznych między innymi na odporność immunologiczną czy psychiczną. Ze względu na rosnącą świadomość roli układu mikroflory jelitowej dla zachowania zdrowia człowieka, od ponad 20 lat, na całym świecie prowadzone są prace badawcze związane z możliwościami pozytywnej modyfikacji lub wzbogacenia mikrobiomu człowieka. Zauważa się bowiem, że coraz częściej skład ilościowy jak i jakościowy mikroflory jelita znacznie odbiega od normy. Zmiany te spowodowane są przez wiele czynników endogennych (związanych bezpośrednio z człowiekiem tj. infekcje wirusowe lub bakteryjne) i egzogennych (składniki spożywcze, sterydy, środki przeczyszczające, antybiotyki i chemioterapeutyki, pigułki antykoncepcyjne, itd.), które w sposób bezpośredni wpływają na liczne schorzenia związane nie tylko z układem pokarmowym człowieka. Uważa się, że zastosowanie w żywieniu odpowiednio dobranych szczepów bakterii probiotycznych może korzystnie modulować skład flory bakteryjnej jelit [Kerry i in., 2018].

Definicje i regulacje prawne dotyczące probiotyków

Sposób w jaki są definiowane probiotyki zmienia się wraz z rozwojem wiedzy na ich temat. Definicję probiotyku zaproponowali w roku 2001 Schrezenmeir i De Vrese: „probiotykem jest preparat lub produkt zawierający wystarczającą ilość żywych, zdefiniowanych mikroorganizmów, które zmieniają mikroflorę w określonych

segmentach organizmu gospodarza i w ten sposób wywierają korzystny wpływ na jego zdrowie” [Kerry i in., 2018].

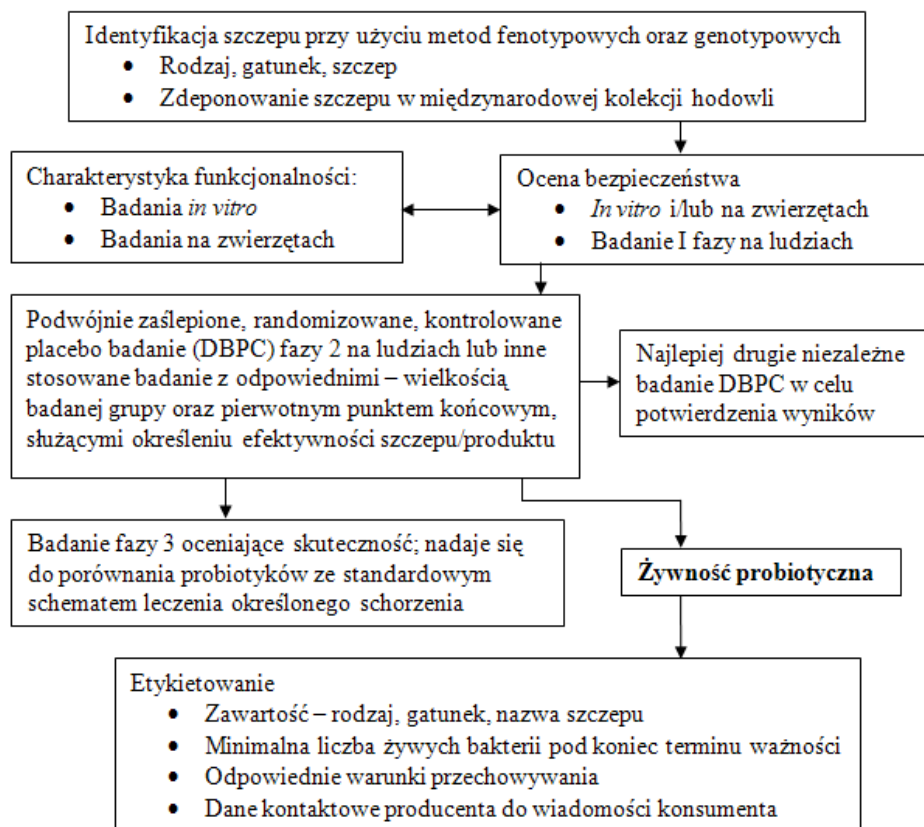
W 2002 roku eksperci FAO i WHO przyjęli definicję probiotyków, uznając, że są to: „żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej liczbie wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza”. Mikroorganizmy, aby mogły zostać zaklasyfikowane do szczepów probiotycznych, powinny zostać precyzyjnie zdefiniowane poprzez określenie odpowiednich kryteriów dotyczących bezpieczeństwa stosowania, cech funkcjonalnych oraz technologicznych. Mikroorganizmy - kandydaci do miana „probiotyku” muszą spełnić trzy kluczowe wymagania:

- 1) muszą być żywe w momencie podania i muszą być mikroorganizmami;
- 2) muszą być podane w dawce wystarczająco wysokiej, aby wywołać efekt prozdrowotny. Zalecana, skuteczna dawka jest ściśle związana z dokumentacją kliniczną, na której musi się opierać;
- 3) podane żywe drobnoustroje muszą wywierać korzystny wpływ na gospodarza [Sanders, 2014].

Probiotyki muszą być zidentyfikowane na poziomie szczepu i bezpieczne do stosowania u ludzi. Muszą wywierać korzystny wpływ na gospodarza, dlatego powinny pochodzić ze środowiska jelitowego zdrowego człowieka, wykazywać oporność na enzymy trawienne, niskie pH, wysokie stężenie soli żółciowych [Guarner i in., 2005]. Jednakże obecnie uważa się, że właśnie owa swoistość działania, a nie źródło izolacji drobnoustroju są istotne. Większość szczepów probiotycznych stosowanych u ludzi zostało wyizolowanych od człowieka, ale to zalecenie nie stanowi wymagania. Znanych jest także kilka dobrze przebadanych szczepów probiotycznych nie pochodzących od człowieka (np. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* i *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*). W rzeczywistości bardzo trudno jest potwierdzić źródło pochodzenia drobnoustroju [Sanders, 2014; Zielińska i in., 2016]. Dlatego uważa się, że probiotyki przeznaczone dla ludzi wymagają udowodnienia działania w badaniach u ludzi. Zaleca się także aby, w preparatach probiotycznych wykorzystywać szczepy izolowane z populacji, w jakiej mają mieć później zastosowanie [Nowak i in., 2010]. Eksperci FAO/WHO sformułowali procedury, które mają potwierdzić właściwości zdrowotne badanych szczepów probiotycznych (Rys. 1) [FAO/WHO, 2002].

W 2014 r. eksperci ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) zorganizowali spotkanie, którego efektem była publikacja weryfikująca wcześniejszy Raport FAO/WHO [2002]. Ogłoszono konsensus, który uwzględnił niewielkie poprawki gramatyczne do definicji, pozostawiając jej sens i znaczenie. Probiotykiem można nazywać wiele rodzajów mikroorganizmów, które wykazują korzyści zdrowotne dla gospodarza, pozostając żywe. W zaprezentowanym

dokumencie szczególnie podkreślono tę cechę i wykluczono z definicji „probiotyku” metabolity i martwe komórki mikroorganizmów. Dodatkowo uzgodniono, że „probiotykami” nie są niezdefiniowane konsorcja mikroorganizmów (jak np. transplantaty mikrobioty kałowej) oraz żywność fermentowana zawierająca niezdefiniowane mikroorganizmy (Tab. 1) [Hill i in., 2014].



Rysunek 1. Wytyczne do oceny probiotyków przeznaczonych do użytku w żywności [FAO/WHO, 2002]

W ostatnich latach pojawiła się nowa koncepcja sugerująca, że kluczowe korzyści zdrowotne związane z mikroorganizmami probiotycznymi mogą być przypisane do gatunku, a nie tylko do konkretnych szczepów drobnoustrojów. Szczególnie w przypadku niektórych gatunków bakterii fermentacji mlekowej, których pewne szczepy są od dawna stosowane jako probiotyki. Uważa się, że jeśli fermentowana żywność (np. kiszona kapusta) zawiera dużą liczbę żywych komórek należących do gatunku, dla którego wykazano korzyści zdrowotne (np. *Lb. plantarum*), można rozsądnie przypuszczać, że

żywność ta może być uważana za wykazującą podobne korzyści zdrowotne jak korzyści wynikające z probiotycznych bakterii tego samego gatunku [Marco i in., 2017].

Naukowcy oraz eksperci ISAPP podkreślają znaczenie wielu dowodów na związek spożywania fermentowanej żywności ze zdrowiem człowieka, jak np. redukcja ryzyka rozwoju cukrzycy typu drugiego u osób spożywających fermentowane produkty mleczne. Powstają jednak trudności z jednoznacznym wskazaniem udziału i roli żywych mikroorganizmów w tych mechanizmach. Prozdrowotne mikroorganizmy znajdujące się w fermentowanej żywności stanowią często konsorcja niezdefiniowane na poziomie szczepu. Zaleca się, aby tego typu żywność określać jedynie jako „zawierającą żywe i aktywne kultury mikroorganizmów” [Hill i in., 2014].

Tabela 1. Podział produktów probiotycznych

Żywe mikroorganizmy	
Probiotyki	Nie-probiotyki
<ol style="list-style-type: none"> 1. Farmaceutyki; 2. Żywność medyczna; 3. Żywność probiotyczna; 4. Podawane inną drogą niż doustnie; 5. Stosowane w żywieniu zwierząt; 6. Zdefiniowane konsorcja mikroorganizmów; 7. Suplementy diety; 8. Do początkowego żywienia niemowląt. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Żywność fermentowana zawierająca niezdefiniowane mikroorganizmy; 2. Niezdefiniowane konsorcja transplantatów mikrobioty kałowej.

Źródło: opracowanie własne na podstawie Hill i in., [2014]

Niektóre badania wykazały, że martwe komórki bakterii probiotycznych także mogą wywoływać korzystne skutki, takie jak modulowanie układu immunologicznego oraz wiązanie kancerogenów w organizmie gospodarza. Zatem wystarczające jest, aby szczepy probiotyczne odpowiednio zwiększały swoją liczbę w początkowym etapie produkcji - do otrzymania pożądanej liczby drobnoustrojów w produkcie, później natomiast, podczas procesu składowania niekoniecznie charakteryzowały się dobrą żywotnością. Tego rodzaju produkty nazywane są obecnie postbiotykami i mogą być zdefiniowane jako nie żyjące produkty bakteryjne lub metaboliczne pozostałości z probiotyków, które charakteryzują się aktywnością biologiczną w stosunku do gospodarza [Kerry i in., 2018].

W UE żywność zawierająca bakterie probiotyczne podlega ogólnym przepisom prawa wspólnotowego. Zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1924/2006 Europejski Urząd do spraw Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) może wyrazić zgodę na umieszczenie na opakowaniach produktów żywnościowych oświadczeń zdrowotnych w oparciu o zebrane dowody naukowe. Jednakże, jak dotąd EFSA nie wyraziła zgody na umieszczanie oświadczeń dotyczących probiotyków na żadnym z produktów dostępnych na rynku w UE, blokując tym samym rozwój żywności probiotycznej [Reid, 2016]. Jedynym krajem w UE, który opublikował listę probiotyków i przewodnik dotyczący ich stosowania są Włochy [Ministero della Salute, 2013].

Działająca pod egidą UE organizacja ESPGHAN (the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) wydała w 2014 r. silne rekomendacje do stosowania klinicznego dwóch probiotyków (*Lactobacillus rhamnosus* GG i *Saccharomyces boulardii*) podając dawkowanie w przypadku dzieci leczonych z powodu ostrej biegunki, ostrego zapalenia żołądka i jelit oraz biegunki poantybiotykowej. Jednocześnie w dokumencie podkreślono niską jakość dowodów naukowych (ang. *quality of evidence*) dla tych rekomendacji, podano także listę mikroorganizmów, które nie mogą być stosowane ze względu na bardzo niską jakość dowodów naukowych, a także mikroorganizm (*Enterococcus faecium* SF68), który jest odradzany do stosowania ze względu na bezpieczeństwo [Szajewska i in., 2014].

Z kolei Health Canada uznała, że można spodziewać się pozytywnego wpływu na zdrowie, bez dowodu względem szczepu dla następujących mikroorganizmów podanych w liczbie 10^9 jtk/dawkę: *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *casei*, *fermeanimalis*, *bifidum*, *breve*, *longum*) i *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus*, *salivarius*). Uznano, że jest to grupa dobrze zbadanych gatunków, wywierających ogólne korzyści zdrowotne, szczególnie na układ trawienny i odpornościowy, w związku z tym w Kanadzie stosuje się ogólne oświadczenie ang. - „*promotes a health gut flora*” [Scourboutakos i in., 2017; Health Canada, 2009].

Odmienne prawo obowiązuje w USA, gdzie dopuszcza się wiele mikroorganizmów zebranych w dokumencie Clinical Guide to Probiotic Products [<http://usprobioticguide.com/>], podając ich rekomendacje do stosowania oraz dawkę.

Nowe źródła i rodzaje probiotyków

Mikroorganizmy probiotyczne poza konwencjonalnym źródłem (przewód pokarmowy zdrowego człowieka) mogą pochodzić z niekonwencjonalnych źródeł takich jak przewód pokarmowy zwierząt, mleko kobiece, żywność (fermentowana i niefermentowana), powietrze czy gleba (Tab. 2).

Mleko i produkty mleczne są dobrym źródłem bakterii fermentacji mlekowej. Spontanicznie fermentowane produkty mleczne wytwarzane są do dziś w różnych częściach świata i są doskonałym źródłem mikroorganizmów probiotycznych, szczególnie bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus*, czy *Streptococcus*, a także drożdży. Przykładami są napoje Masai [Patrignani i in., 2006] i Koumiss [Ya i in., 2008], z których wyizolowano mikroorganizmy o właściwościach immunomodulacyjnych. Niekonwencjonalnym źródłem izolacji mikroorganizmów o cechach probiotycznych były także fermentowane mleko jaków [Sun i in., 2010] i fermentowane mleko wielbłądzie [Shori, 2017]. Wiele serów regionalnych w Europie wykorzystano do izolacji drobnoustrojów o cechach prozdrowotnych [Caggia i in., 2015; Ribeiro i in., 2017; Zoumpopoulou i in., 2017]. Również polskie sery regionalne (Oscypek, sery Korycińskie), a także ekologiczna serwatka kwasowa stały się źródłem izolacji bakterii o właściwościach probiotycznych, w tym przeciwdrobnoustrojowych [Ołdak i in., 2017; Rzepkowska i in., 2017a].

Tabela 2. Konwencjonalne i niekonwencjonalne źródła mikroorganizmów probiotycznych

Źródło izolacji	
Człowiek	Przewód pokarmowy Mleko kobiece
Zwierzęta hodowlane	Przewód pokarmowy Mleko zwierząt
Żywność fermentowana	Kiszonki warzywne Zakwasy piekarskie Wędliny surowo dojrzewające Ryby i owoce morza Sery / serwatka
Żywność nie fermentowana	Owoce Warzywa Soki Produkty zbożowe
Inne	Plaster miodu Gleba Powietrze z miejsc przygotowania żywności

Źródło: opracowanie własne na podstawie [Sornplang i Piyadeatsoontorn, 2016]

Mikroorganizmy (bakterie i grzyby) o właściwościach probiotycznych izoluje się także z innych fermentowanych i nie fermentowanych produktów pochodzenia zwierzęcego mięso i wędliny surowo dojrzewające [Rzepakowska i in., 2017b; Ruiz-Moyano i in., 2008; Vasilev i in., 2015], ryby i owoce morza [Aarti i in., 2017, Kuda i in., 2014; Senthong i in., 2012], czy miód [Tajabadi i in., 2013]. Wykazano, że równie cennym źródłem izolacji są owoce (np. ananas), warzywa, soki oraz produkty zbożowe [Zielińska i in., 2015; Amorim i in., 2018; Cao i in., 2016; Swain i in., 2014; Adesulu-Dahunsi i in., 2018], a także inne niekonwencjonalne źródła, takie jak gleba [Islam i in., 2011], czy powietrze z pomieszczeń, gdzie przygotowano zakwas do produkcji pieczywa [Scheirlinck i in., 2009] (Tab. 2).

Izolacja, identyfikacja i ocena bezpieczeństwa i właściwości probiotycznych nowych, „dzikich” szczepów mikroorganizmów z żywności tradycyjnej jest praktyką potrzebną, szczególnie w celu rozwoju technologii produkcji szczepionek dedykowanych do żywności. Nowe szczepionki oprócz właściwości ochronnych (bakteriostatycznych i bakteriobójczych) mogą wносить dodatkowe wartości związane z poprawą zdrowia konsumenta. Mikroorganizmy wyizolowane z żywności wykazują lepszą przeżywalność w środowisku żywności i gwarantują bardziej atrakcyjne cechy sensoryczne w porównaniu z drobnoustrojami pochodzenia jelitowego [Fontana i in., 2013]. Najczęściej spotykanymi rodzajami probiotyków są *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve* i *longum*) i *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* i *salivarius*). Za probiotyczne uważane są także wybrane szczepy drożdży *Saccharomyces boulardii*. Mniej powszechnie stosowane są szczepy *Escherichia coli* lub *Bacillus coagulans*. Ostatnio rośnie zainteresowanie nowo zidentyfikowanymi ludzkimi komensalami: *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp. i *Eubacterium hallii*, które określa się mianem „probiotyków przyszłości”. Możliwość zastosowania tych mikroorganizmów w produkcji żywności zależeć będzie od postępu w dalszych badaniach nad wykazaniem ich bezpieczeństwa stosowania u ludzi [Hill i in., 2014].

Podsumowanie

Pomimo szeroko prowadzonych badań i licznych dowodów naukowych wciąż brak jednoznacznych wymagań prawnych, co prowadzi do niewłaściwego stosowania, czy wręcz do nadużywania terminu „probiotyk”. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy mikroorganizmy probiotyczne powinny wykazywać efekt poprawy stanu zdrowia w ciele gospodarza. Pochodzenie mikroorganizmów z przewodu pokarmowego człowieka nie jest kryterium wskazywanym jako niezbędne. Tym bardziej, że coraz więcej dowodów naukowych wskazuje na nowe niekonwencjonalne źródła izolacji jako właściwe.

Literatura

1. Aarti C., Khusro A., Varghese R., Arasu M.V., Agastian P., Al-Dhabi N.A., Choi K.C. (2017). In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from *Hentak*, a fermented fish product of North-East India. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 438-446.
2. Adesulu-Dahunsi A.T., Jeyaram K., Sanni A.I. (2018). Probiotic and Technological Properties of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Cereal-based Nigerian Fermented Food Products. *Food Control*, 92, 225-231.
3. Amorim J.C., Piccoli R.H., Duarte W.F. (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Research International*, 107, 518-527.
4. Caggia C., De Angelis M., Pitino I., Pino A., Randazzo C.L. (2015). Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food microbiology*, 50, 109-117.
5. Cao Z., Pan H., Tong H., Gu D., Li S., Xu Y., Lin Q. (2016). *In vitro* evaluation of probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* L1 isolated from paocai—a Chinese fermented vegetable. *Annals of microbiology*, 66(3), 963-971.
6. FAO/WHO. (2002). „Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation”. FAO. Food and Nutrition Paper 85: 1-56.
7. Fontana L., Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Munoz-Quezada S., Gil A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition*, 109(S2), 35-50.
8. Guarner F., Perdigon G., Corthier G., Salminen S., Koletzko B., Morelli L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic?. *British Journal of Nutrition*, 93(6), 783-786.
9. Health Canada. (2009). Accepted Claims about the Nature of Probiotic Microorganisms in Food.
10. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., ... & Calder P.C. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506.
11. <http://usprobioticguide.com> [dostęp online, 10.05.2018]
12. Islam V.H., Babu N.P., Pandikumar P., Ignacimuthu S. (2011). Isolation and characterization of putative probiotic bacterial strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan soil based on *in vitro* and *in vivo* functional properties. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 3(3-4), 175-185.
13. Kerry R.G., Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin H-S., Das G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
14. Kuda T., Kawahara M., Nemoto M., Takahashi H., Kimura B. (2014). *In vitro* antioxidant and anti-inflammation properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku *Satoumi* region in Japan. *Food research international*, 64, 248-255.
15. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligne B., ... & Smid, E.J. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, 44, 94-102.
16. Ministero della Salute (2013). Commissione unica per la nutrizione e la dietetica. Guidelines on probiotics and prebiotics.
17. Nowak A., Slizewska K., Libudzisz Z. (2010). Probiotyki-historia i mechanizmy działania. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 17(4), 5-19.
18. Ołdak A., Ziełńska D., Rzepkowska A., Kołożyn-Krajewska D. (2017). Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: oscypek and korycinski cheese. *BioMed Research International Volume 2017, Article ID 6820369*, <https://doi.org/10.1155/2017/6820369>
19. Patrignani F., Lanciotti R., Mathara J.M., Guerzoni M.E., Holzapfel W.H. (2006). Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *International journal of food microbiology*, 107(1), 1-11.
20. Reid G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17-25.
21. Ribeiro S.C., Stanton C., Yang B., Ross R.P., Silva C.C. (2017). Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese. *LWT*, 90, 403-411.

22. Rozporządzenie (WE) nr 1924/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych dotyczących żywności.
23. Ruiz-Moyano S., Martín A., Benito M.J., Nevado F.P., de Guía Córdoba M. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80(3), 715-721.
24. Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D. (2017a). Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties, *International Journal of Food Science & Technology*, 5, 29: 1983-1994.
25. Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D. (2017b). Safety assessment and antimicrobial properties of the lactic acid bacteria strains isolated from polish raw fermented meat products, *International Journal of Food Properties*, 20, 11, 2736-2747.
26. Sanders M.E. (2014). Probiotics: the Concept, w: WGO Handbook on Gut Microbes, World Digestive Health Day, May 29, 2014, The WGO Foundation, Milwaukee, USA, 39-42.
27. Scheirlinck I., Van der Meulen R., De Vuyst L., Vandamme P., Huys G. (2009). Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. *Journal of applied microbiology*, 106(4), 1081-1092.
28. Scourboutakos M.J., Franco-Arellano B., Murphy S.A., Norsen S., Comelli E.M., L'Abbé M.R. (2017). Mismatch between probiotic benefits in trials versus food products. *Nutrients*, 9(4), 400.
29. Senthong R., Chanthachum S., Sumpavapol P. (2012). Screening and identification of probiotic lactic acid bacteria isolated from Poo-Khem, A traditional salted crab. In *International Conference on Nutrition and Food Sciences*, 39, 111-115.
30. Shori A.B. (2017). Camel milk and its fermented products as a source of potential probiotic strains and novel food cultures: A mini review. *PharmaNutrition*, 5(3), 84-88.
31. Sornplang, P., Piyadeatsoontorn, S. (2016). Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of animal science and technology*, 58(1), 26.
32. Sun Z., Liu W., Gao W., Yang M., Zhang J., Wu L., ... & Zhang H. (2010). Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut: The naturally fermented yak milk in Qinghai, China. *The Journal of general and applied microbiology*, 56(1), 1-10.
33. Swain M.R., Anandharaj M., Ray R.C., Parveen Rani R. (2014). Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. *Biotechnology research international*, Article ID 250424, 19 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/250424>
34. Szajewska H., Guarino A., Hojsak I., Indrio F., Kolacek S., Shamir R., ... & Weizman Z. (2014). Use of probiotics for management of acute gastroenteritis: a position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 58(4), 531-539.
35. Tajabadi N., Mardan M., Manap M.Y.A., Mustafa S. (2013). Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 235-241.
36. Vasilev D., Aleksic B., Tarbuk A., Dimitrijevi M., Karabasil N., Cobanovic N., Vasiljevic N. (2015). Identification of lactic acid bacteria isolated from Serbian traditional fermented sausages Sremski and Lemeski kulen. *Procedia Food Science*, 5, 300-303.
37. Ya T., Zhang Q., Chu F., Merritt J., Bilige M., Sun T., & Zhang H. (2008). Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC immunology*, 9(1), 68.
38. Zielińska D., Rzepkowska A., Ołdak A., Szydłowska A., Kołożyn-Krajewska D. (2016). Nowe szczepy bakterii o właściwościach probiotycznych. *Przemysł Spożywczy*, 70(11), 28-32.
39. Zielińska D., Rzepkowska A., Radawska A., Zieliński K. (2015). *In vitro* screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Current Microbiology* 70 (2): 183-194.
40. Zoumpopoulou G., Tzouvanou A., Mavrogonatou E., Alexandraki V., Georgalaki M., Anastasiou R., ... & Papadimitriou K. (2017). Probiotic Features of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Diverse Pool of Traditional Greek Dairy Products Regarding Specific Strain-Host Interactions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-10.

JOLANTA BARAN¹, MAŁGORZATA ŹRÓDŁO-LODA¹

¹Zakład Towaroznawstwa, Instytut Zdrowia i Gospodarki,
Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pigoń w Krośnie,
e-mail: jolanta.baran@pwsz.krosno.pl, małgorzata.zrodlo-loda@pwsz.krosno.pl

TRWAŁOŚĆ CECH ORGANOLEPTYCZNYCH JOGURTU Z DODATKIEM INULINY

Streszczenie

Dodatek inuliny o odpowiednim stężeniu do jogurtów wprawdzie poprawia ich właściwości reologiczne i redukuje wielkość synerezy, jednakże może wpłynąć niekorzystnie na inne cechy organoleptyczne. Ten niekorzystny wpływ może zaznaczyć się dopiero w trakcie przechowywania produktu, dlatego podjęto badania, których celem było określenie wielkości dodatku inuliny do jogurtu, optymalnej dla utrzymania akceptowanej jakości organoleptycznej produktu przez określony czas. Badania wykonano w dwóch etapach. W obu etapach materiałem badawczym był jogurt z mleka krowiego o zawartości tłuszczu 2%, wykonany metodą termostatową w skali mikrotechnicznej. W etapie pierwszym jogurty wzbogacone dodatkiem 1, 3 i 5% inuliny przekazano do oceny konsumenckiej. Wykonano ją metodą bezpośredniego wywiadu, połączonego z degustacją próbek. W celu stwierdzenia zmian jakości organoleptycznej w trakcie przechowywania chłodniczego (temp. 4°C) przeprowadzono drugi etap, do którego wytypowano jogurt z dodatkiem 3% inuliny, a jako grupę kontrolną oceniano jogurt naturalny (bez inuliny). Etap ten obejmował ocenę sensoryczną, prowadzoną przez zespół dziesięciu ekspertów. Wykorzystano w niej metodę 5-punktową prowadzoną w odstępach 2-3 – dniowych. Smak jogurtów z dodatkiem 1% i 3% inuliny konsumenci zaakceptowali w wyższym stopniu niż jogurtu z dodatkiem 5%. Dodatek inuliny do jogurtu wpłynął korzystnie na trwałość cech organoleptycznych podczas przechowywania, przede wszystkim konsystencji oraz smaku.

Słowa kluczowe: jogurt, inulina, akceptacja konsumencka, przechowywanie

Wprowadzenie

Jogurt jest jednym z najczęściej spożywanych mlecznych napojów fermentowanych. Jest ceniony ze względu na swoje właściwości sensoryczne oraz wartość odżywczą i prozdrowotną. Od dwudziestu lat przemysł mleczarski produkuje na rynek jogurty z dodatkiem prebiotyków [Jakubczyk i Kosikowska, 2000]. Jednym z nich jest inulina która jako prebiotyk ma zdolność do obniżania poziomu glukozy i cholesterolu we krwi, a także ma wpływ na zwiększenie biodostępności składników mineralnych, takich jak wapń, magnez i żelazo [Górecka i in., 2009]. Ze względu na swoje właściwości, inulina

używana jest w produkcji żywności specjalnego przeznaczenia np. dla diabetyków, albowiem badania wykazały, że nie jest ona hydrolizowana do monosacharydów w organizmie człowieka i nie powoduje wzrostu poziomu glukozy we krwi [Florowska i Krygier, 2007; Gramza-Michałowska i Górecka, 2009; Kozioł i Gustaw, 2013; Nadolna i Kunachowicz, 2002]. Zainteresowanie stosowaniem inuliny wynika także z jej zdolności do tworzenia żeli, dzięki czemu jest ona zaliczana do polisacharydowych zamienników tłuszczu. Dzięki absorpcji przez białka obecne w serwatce tworzy tłuszczu podobny żel umożliwiający otrzymanie niskotłuszczowych jogurtów dających odczucia pełności i tustości smaku oraz gładkiej struktury. Jest również wykorzystywana do wyrobu serów twarogowych, serów topionych, koktajli mlecznych, śmietany, produktów masłopodobnych oraz lodów [Polak, 2001; Skowronek i Fiedurek, 2003]. W produkcji jogurtu stosowany jest najczęściej dodatek inuliny w ilości 1,5-3% [Florowska i Krygier, 2007]. Inulina, ze względu na swój słodki smak zmienia nie tylko właściwości reologiczne jogurtu, ale wpływa także na smak i zapach. Z niektórych doniesień wynika, że dodatek inuliny do jogurtów wprawdzie poprawia ich właściwości reologiczne i redukuje wielkość synerezy, jednakże może wpłynąć niekorzystnie na inne cechy organoleptyczne [Modzelewska-Kapituła i in., 2008; Nastaj i Gustaw, 2008; Skrzypczak i Gustaw, 2012].

Ten niekorzystny wpływ może zaznaczyć się dopiero w trakcie przechowywania produktu, dlatego podjęto badania, których celem było określenie wielkości dodatku inuliny do jogurtu, optymalnej dla utrzymania akceptowanej jakości organoleptycznej produktu przez określony czas.

Materiał i metody

Badania wykonano w dwóch etapach. W obu etapach materiałem badawczym był jogurt z mleka krowiego o zawartości tłuszczu 2%, znormalizowanego poprzez dodatek do mleka odtłuszczonego świeżej śmietanki o zawartości tłuszczu 30%. Proces produkcji jogurtu obejmował następujące etapy:

- pasteryzacja mleka w temp. 90°C w ciągu 15 sekund i schłodzenie do temperatury +45°C;
- podział surowca na trzy partie (w etapie pierwszym badań), wzbogacone dodatkiem sproszkowanej inuliny otrzymanej z cykorii (producent: Intenson Europe sp. z o.o.) w ilości, odpowiednio, 1%, 3%, 5%. W etapie drugim surowiec podzielono na dwie partie, z których jedną wzbogacono 3%-owym dodatkiem inuliny. Druga, bez dodatku, stanowiła grupę kontrolną;

- zaszczepianie każdej z wydzielonych partii mleka zakwasem w ilości 5%, przygotowanym ze szczepionki FD-DVS YC-X11 Yo-Flex, Thermophilus Lactis Culture (producent: Chr. Hansen),
- inkubacja w temperaturze +45°C w czasie 8 godzin, w opakowaniach szklanych;
- schłodzenie do temperatury +4°C i utrzymanie jej w czasie przechowywania.

W etapie pierwszym jogurty przekazano do oceny konsumenckiej. Wykonano ją, w ciągu pierwszych trzech dni po zakończeniu produkcji, metodą bezpośredniego wywiadu, połączonego z degustacją próbek. Uczestników oceny poproszono o udzielenie odpowiedzi na pytania zawarte w kwestionariuszu ankiety. Dotyczyły one: określenia stopnia akceptacji smaku, zapachu, konsystencji i struktury (z wykorzystaniem 7-stopniowej skali hedonicznej, na której 1^o oznaczał całkowity brak akceptacji, a 7^o – skrajnie pozytywną akceptację). Ocenę wykonało 120 osób.

Etap drugi, wykonany celem stwierdzenia zmian jakości organoleptycznej w trakcie przechowywania produktów, obejmował ocenę sensoryczną, prowadzoną przez zespół dziesięciu ekspertów. Wykorzystano w niej metodę 5-punktową zgodnie z normą PN-ISO 4121: 1998. Ocenie podlegały: barwa, konsystencja, zapach i smak. Wartości współczynnika jakości całkowitej (WJC) obliczono z zastosowaniem następujących współczynników ważkości: barwa – 0,10, konsystencja – 0,25, zapach – 0,20, smak – 0,45. W trakcie oceny posługiwano się wzorcem jakości zawierającym opis stanu cech organoleptycznych przy różnym poziomie w skali od 1-5. Ocenę 5-punktową prowadzono w odstępach 2-3 - dniowych.

Materiał liczbowy uzyskany w I etapie poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu Statistica 12 [Dobosz, 2001]. Analiza obejmowała:

1. obliczenie wartości podstawowych miar statystycznych: średniej arytmetycznej (\bar{x}) i odchylenia standardowego (s_d).
2. weryfikację hipotez statystycznych za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji. Hipotezy testowano testem F Fishera-Snedecora. Analizę *post-hoc* wykonywano testem NIR. Weryfikację hipotez statystycznych prowadzono przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wyniki zawarte w tabeli 1 wskazują, że uczestnicy oceny konsumenckiej zaakceptowali cechy organoleptyczne badanych jogurtów w stopniu, który można określić jako najniższy stopień pozytywnej akceptacji (4-5^o co na skali hedonicznej oznacza „odpowiada mi”). Wartości prawdopodobieństwa testowego $p < 0,05$ wskazują na

istotne zróżnicowanie wyników oceny stopnia akceptacji smaku oraz konsystencji i struktury jogurtów w zależności od wielkości dodatku inuliny.

Wyniki testu najmniejszej istotnej różnicy pozwalają na stwierdzenie, że smak jogurtu z dodatkiem 5% inuliny został w niższym stopniu zaakceptowany niż pozostałe dwa warianty próbek jogurtów. Stopień akceptacji smaku jogurtów z dodatkiem inuliny 1% i 3% był jednakowy.

Tabela 1. Zróżnicowanie stopnia akceptacji cech organoleptycznych jogurtów z różnym dodatkiem inuliny (podstawowe miary i wyniki testu F)

Zmienna	Dodatek inuliny	Miary [°skali]		Wyniki testu	
		\bar{x}	s_d	F	p
Stopień akceptacji smaku	1%	4,50 ^b	1,39	3,88*	0,022
	3%	4,56 ^b	1,45		
	5%	4,01 ^a	1,22		
Stopień akceptacji zapachu	1%	4,71	1,17	0,83	0,626
	3%	4,85	1,19		
	5%	4,77	1,12		
Stopień akceptacji konsystencji i struktury	1%	4,96 ^a	1,07	3,99*	0,016
	3%	4,96 ^a	1,13		
	5%	5,52 ^b	1,22		

Symbol * oznacza odrzucenie hipotezy zerowej (przy poziomie $\alpha=0,05$)

Różne symbole literowe przy wartościach średniej wskazują na istotne różnice w teście NIR (przy poziomie $\alpha=0,05$)

Uzyskane wyniki są częściowo zbieżne z doniesieniami literatury. Zdaniem innych autorów dodatek inuliny nie pogarsza cech smakowo-zapachowych jogurtów. Jak wynika z badań Modzelewskiej-Kapituła i in. [2008], wyżej zostały ocenione jogurty z dodatkiem 2,5% inuliny w porównaniu z jogurtami z dodatkiem 1% inuliny, albowiem cechowały się najbardziej typowym smakiem i zapachem. Seydim i in. [2005] podkreślają, że jogurty zawierające inulinę cechują się korzystnym aromatem, a Dello Staffolo i in. [2004] nie odnotowali statystycznie istotnych różnic pomiędzy cechami smakowo-zapachowymi jogurtów wyprodukowanych z udziałem inuliny, wersją kontrolną i zawierających inne włókna pokarmowe. Hassan i in. [1999] stwierdzili, że jogurty z inuliną nie różnią się pod względem jakości sensorycznej od wyprodukowanych z udziałem komercyjnych stabilizatorów.

Jak wynika z danych zawartych w tabeli 1 konsystencja i struktura jogurtu z dodatkiem 5% inuliny została w wyższym stopniu zaakceptowana przez konsumentów niż jogurtów z dodatkiem inuliny 1% i 3%, co wskazuje na to, że obecność inuliny

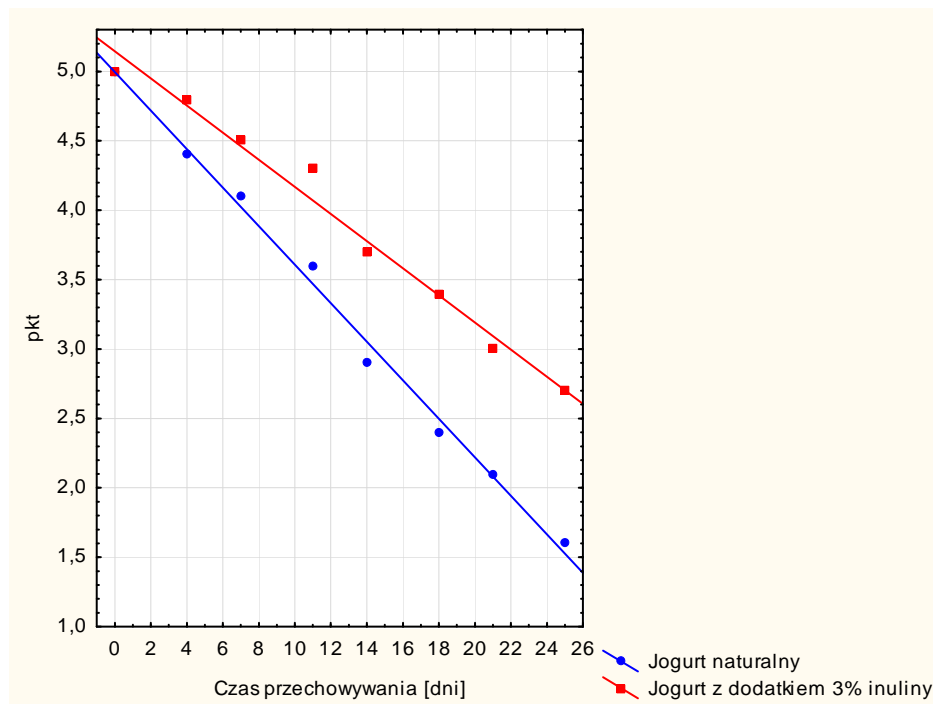
korzystnie wpływa na zwięzłość i zwartość skrzepu kazeinowego. Potwierdzają to doniesienia innych autorów. Skrzypczak i Gustaw [2012] stwierdzili że, dodatek prebiotyku ma wpływ na właściwości skrzepu jogurtowego, albowiem jogurty z dodatkiem 1% inuliny charakteryzowała mocna i zwarta struktura. Jednak dodatek prebiotyków może wiązać się z pogorszeniem właściwości reologicznych jogurtów, szczególnie, gdy są one stosowane w większych ilościach. Modzelewska-Kapituła i in. [2008] wykazali, że jogurty z dodatkiem 2,5% inuliny charakteryzują się lepszą konsystencją w porównaniu z jogurtami z dodatkiem 1% inuliny. Jogurty te charakteryzuje kremowa, gęsta i jednolita konsystencja. Seydim i in. [2005] odnotowali, że jogurty zawierające inulinę cechują się pożądaną gładką konsystencją. Według Brennan i Tudorica [2008], zastosowanie inuliny w jogurtach o standardowej i obniżonej zawartości tłuszczu powoduje wzrost ich twardości. Jak wynika z badań Nastaj i Gustawa [2008], dodatek polisacharydów w ilości 1%, nie tylko decyduje o zwartości skrzepu, ale również ma wpływ na wielkość synerezy. Potwierdzają to badania Brennan i Tudorica [2008], według których zastosowanie inuliny już w ilości 2% powoduje zwiększenie wycieku serwatki w jogurtach niskotłuszczowych. Vasiljevic i in. [2007] w swoich badaniach wykazał, że już dodatek 0,5% inuliny do jogurtu probiotycznego powoduje wzrost wielkości synerezy. Lucey i in. [1998] twierdzą, że obecność długołańcuchowych polisacharydów, takich jak inulina, może powodować rozluźnienie skrzepu kazeinowego, a w związku z tym, ma on mniejsze zdolności wiązania wody.

Do drugiego etapu badań (oceny zmian jakości w trakcie przechowywania jogurtów) wytypowano więc jogurt z dodatkiem 3% inuliny, jako zawierający większą ilość prebiotyku oraz pozytywnie oceniony przez konsumentów.

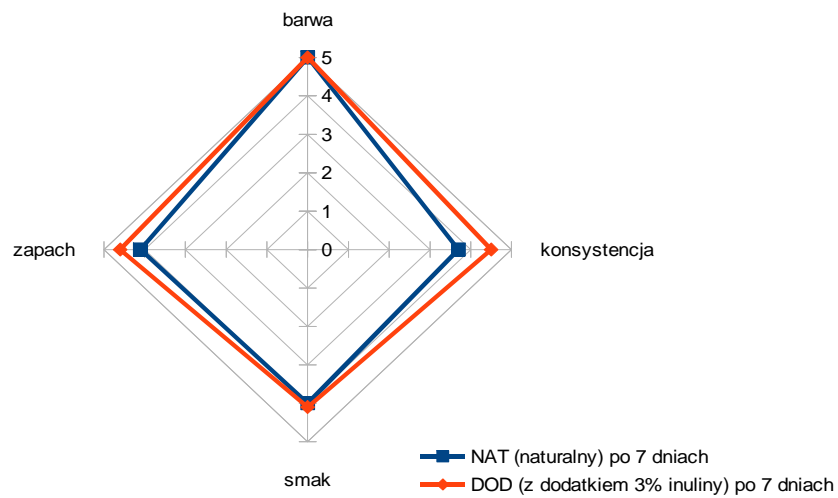
Na rysunku 1. przedstawiono zmiany wskaźnika jakości całkowitej WJC jogurtów naturalnego oraz z dodatkiem 3% inuliny w zależności od czasu ich przechowywania. Jest to podsumowanie rezultatów 5-punktowej oceny sensorycznej wykonanej przez zespół ekspertów.

W oparciu o wartości wskaźników jakości całkowitej (rys. 1.), stwierdzono, że jakość organoleptyczna badanych jogurtów bezpośrednio po wyprodukowaniu kształtowała się na poziomie bardzo dobrym. Wskaźnik jakości całkowitej jogurtu naturalnego oraz jogurtu z dodatkiem 3% inuliny wynosił 5,00 pkt.

Po jednotygodniowym przechowywaniu, jakość organoleptyczna jogurtu z dodatkiem 3% inuliny nie budziła zastrzeżeń natomiast w przypadku jogurtu naturalnego jakość organoleptyczna obniżyła się do 4 pkt. Przyczyną obniżenia jakości jogurtu naturalnego były nieznaczne wady zapachu i konsystencji (rys. 2). Jogurt ten charakteryzował się niezbyt czystym, lekko kwaśnym zapachem. Skrzep jogurtu naturalnego był mniej zwarty.

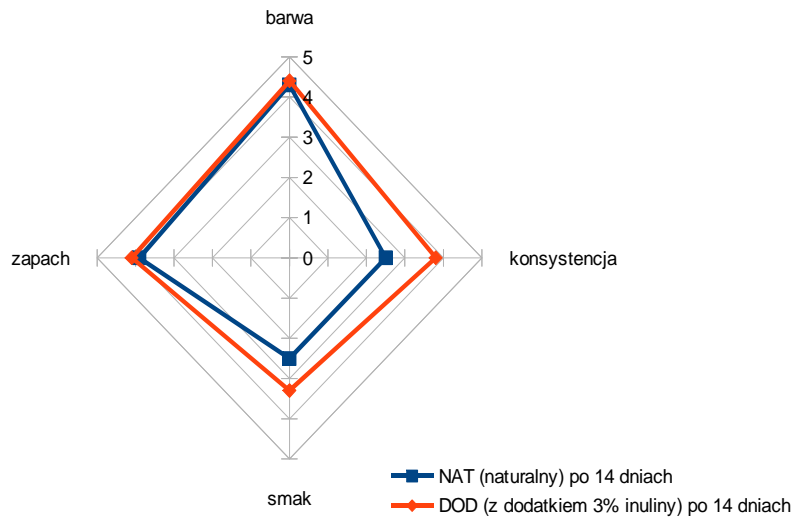


Rysunek 1 Zmiany wskaźnika jakości całkowitej WJC jogurtów w zależności od czasu ich przechowywania



Rysunek 2. Profilogram cech organoleptycznych jogurtów po 7 dniach przechowywania

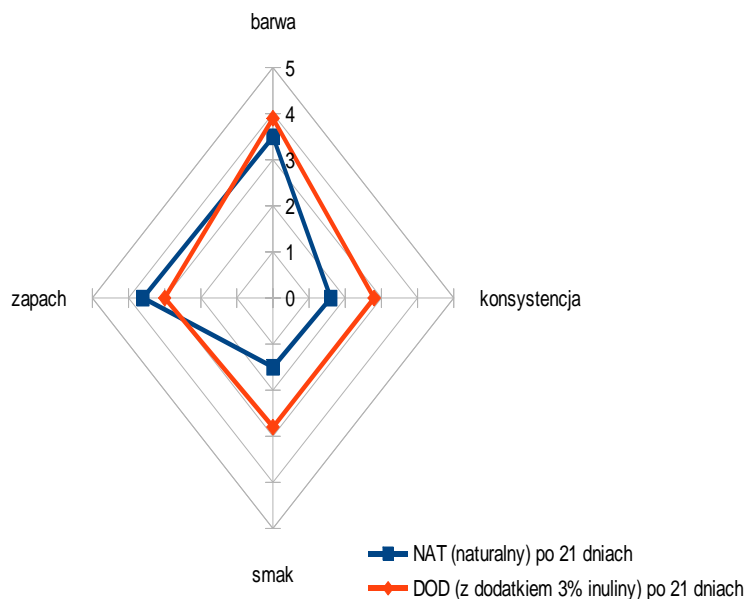
W drugim tygodniu przechowywania nastąpiły intensywniejsze zmiany jakości organoleptycznej badanych jogurtów. Szczególnie smak i konsystencja jogurtu naturalnego stały się wyraźnie zmienione. Jogurt ten cechował się niezbyt czystym, silnie kwaśnym, drożdżowym smakiem. W jogurcie naturalnym wystąpił podciek serwatki, natomiast w jogurcie z dodatkiem 3% inuliny był on słabo widoczny. Skrzep obu badanych jogurtów był nadal mniej zwarty, ale jednolity w całej masie (rys 3). Spowodowało to, że wskaźnik jakości całkowitej jogurtu naturalnego obniżył się do 3 pkt., a w przypadku jogurtu z dodatkiem 3% inuliny wskaźnik jakości całkowitej obniżył się do około 3,5 pkt. (rys 1.).



Rysunek 3 Profilogram cech organoleptycznych jogurtów po 14 dniach przechowywania

Trzeci tydzień przechowywania wpłynął wyraźnie niekorzystnie na wszystkie cechy, szczególnie na smak i konsystencję badanych jogurtów. Dlatego wskaźnik jakości całkowitej jogurtu naturalnego obniżył się do poziomu niedostatecznego, a jogurtu z prebiotykiem – do poziomu dostatecznego (rys. 1). Jogurt naturalny charakteryzował się niezbyt czystym, silnie kwaśnym, drożdżowym smakiem. Jego zapach był mało aromatyczny, nieczysty. W trzecim tygodniu przechowywania nastąpiły widoczne zmiany w konsystencji tego jogurtu. Uwidoczniły się grudki i lekkie skłaczenia, a jego konsystencja była niejednolita, zbyt rzadka i ciągliwa. Natomiast konsystencja jogurtu z dodatkiem 3% inuliny była nadal jednolita, ale mniej gęsta i lekko ciągliwa (rys. 4).

Wyniki wykonanych badań są zgodne z informacjami zawartymi w literaturze. Badania Glibowskiego i Bochyńskiej [2006] dowiodły, że inulina wchodzi w interakcję z białkami serwatkowymi. Białka mleka tj. α -, β -, κ - kazeina oraz β -laktoglobulina łączą się z inuliną. Zjawisko to przyczynia się prawdopodobnie do wytworzenia stabilnej struktury, nieulegającej zmianom podczas przechowywania jogurtu. Jak wynika z badań Modzelewskiej-Kapituła i in. [2008], jogurt z dodatkiem 2,5% inuliny po 21 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych charakteryzował się jednolitą barwą, typowym smakiem i zapachem oraz jednolitą konsystencją. Potwierdza to, że inulina korzystnie wpływa na teksturę produktów fermentowanych.



Rysunek 4 Profilogram cech organoleptycznych jogurtów po 21 dniach przechowywania

Wnioski

- Jakość organoleptyczną badanych jogurtów konsumenci ocenili na poziomie, który można określić jako najniższy stopień pozytywnej akceptacji. Smak jogurtów z dodatkiem 1% i 3% inuliny konsumenci zaakceptowali w wyższym stopniu niż jogurtu z dodatkiem 5%.
- Dodatek inuliny w ilości 3% do jogurtu wpłynął korzystnie na trwałość cech organoleptycznych, przede wszystkim konsystencji, w czasie przechowywania

produktu w temperaturze +4°C. W trzecim tygodniu przechowywania jakość organoleptyczna jogurtu z prebiotykiem nadal utrzymywała się na poziomie dostatecznym.

- Akceptowana jakość organoleptyczna jogurtu z dodatkiem 3% inuliny przechowywanego w temperaturze +4°C wynosi około 20 dni.

Literatura

1. Brennan C.S, Tudorica C.M. (2008). Carbohydrate-based fat replacers in the modification of the rheological, textural and sensory quality of yoghurt: comparative study of the utilization of barley betaglucan, guar gum and inulin, *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 824-833.
2. Dello Staffolo M., Bertola N., Martino M., Bevilacqua A. (2004). Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt, *International Dairy Journal*, 14, 263-268.
3. Dobosz M. (2001). Wspomagana komputerowo statystyczna analiza wyników badań, *Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT*, Warszawa, 77.
4. Florowska A., Krygier K. (2007). Inulina jako zamiennik tłuszczu w produktach spożywczych, *Przemysł Spożywczy*, 5, 18-21.
5. Gramza-Michałowska A., Górecka D. (2009). Wykorzystanie inuliny jako dodatku funkcjonalnego w technologii produkcji potraw. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 42, 3, 324-328.
6. Glibowski P., Bochyńska R. (2006). Wpływ inuliny na właściwości reologiczne roztworów białek serwatkowych. *Acta Agrophysica*, 8, 337-345.
7. Górecka D., Konieczny P., Gramza-Michałowska A. (2009). Inulina znaczenie żywieniowe i technologiczne. *Przemysł Spożywczy*, 63, 22-24.
8. Hassan F.A.M., Helmy W.A., Enab A.K. (1999). Utilization of some local polysaccharide in manufacturing of yoghurt, *Egyptian Journal of Dairy Science*, 27, 281-289.
9. Jakubczyk E., Kosikowska M. (2000). Nowa generacja mlecznych produktów fermentowanych z udziałem probiotyków i prebiotyków, produkty symbiotyczne, *Przegląd Mleczarski*, 12, 396-400.
10. Kozioł J., Gustaw W. (2013). Prebiotyki wykorzystywane w mleczarstwie. *Przegląd Mleczarski*, 5, 7-12.
11. Lucey J.A., Tamehana M., Singh H., Munro P.A. (1998). A comparison of formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone, *Food Research International*, 31(2), 147-155.
12. Modzelewska-Kapituła M., Kłębukowska L., Kornacki K. (2008). Wpływ inuliny TEX! I HPX na lepkość pozorną i wartość pH jogurtów produkowanych metodą termostatową, *Acta Agrophysica*, 11(3), 693-701.
13. Nadolna I., Kunachowicz H. (2002). Napoje mleczne fermentowane i ich znaczenie prozdrowotne, *Przegląd Mleczarski*, 7, 189-192.
14. Nastaj M., Gustaw W. (2008). Wpływ wybranych prebiotyków na właściwości reologiczne jogurtu stałego, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5 (60), 217-225.
15. Polak E. (2001). Zastosowanie pro- i prebiotyków w lodach. *Przemysł Spożywczy*, 3, 22-23.
16. PN-ISO 4121: 1998. Polska Norma. Analiza sensoryczna. Metodologia - ocena produktów żywnościowych przy użyciu metod skalowania.
17. Seydim Z.B.G., Sarikus G., Okur O.D.(2005). Effect of inulin and Dairy-Lo as fat replacers on the quality of set type yogurt, *Milchwissenschaft*, 60, 51-55.
18. Skowronek M., Fiedurek J. (2003). Inulina i inulinazy właściwości, zastosowania, perspektywy. *Przemysł Spożywczy*, 3, 18-20.
19. Skrzypczak K., Gustaw W. (20120) Wpływ dodatku prebiotyków i białek serwatkowych na właściwości fizykochemiczne biojogurtów, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5 (84),155-165.
20. Vasiljevic T., Kealy T., Mishra V.K. (2007). Effects of β -glucan addition to a probiotic containing yogurt, *Journal of Food Science*, 72(7), 405-411.

STABILITY OF THE ORGANOLEPTIC PROPERTIES OF YOGHURT WITH ADDITION OF INULIN

Summary

The addition of the right concentration of inulin to yoghurts improves their rheological properties and reduces the amount of syneresis, however, it can adversely affect their other organoleptic characteristics. This unfavourable effect may only be noticed when the product is stored, therefore there was a research conducted in order to determine the volume of the inulin yogurt additive that is optimal for maintaining the acceptable organoleptic quality of product during some time. The tests were carried out in two stages. In both stages, the research material was cow's milk yoghurt with 2% fat content, made by thermostat method in the micro technical scale. In the first stage, yoghurts enriched with the addition of 1, 3 and 5% of inulin were distributed to consumers for assessment. The evaluation was made with use of a direct interview method combined with sample tasting. In the second stage, yoghurt with the addition of 3% inulin were identified in order to detect changes in their organoleptic quality during storage. Natural yoghurt was the control product. This stage included sensory evaluation, conducted by a team of ten experts. The evaluation used a 5-point method carried out at 2-3 day intervals. The taste of yogurts with the addition of 1% and 3% inulin was accepted by consumers more than the yoghurt with 5% addition. The addition of inulin to yoghurt has a positive effect on the stability of its organoleptic characteristics, especially of consistency and taste,

Key words: yogurt, inulin, consumer acceptance, storage

KRZYSZTOF BOHDZIEWICZ¹

¹*Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauki o Żywności,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

CHARAKTERYSTYKA TWAROGÓW DOJRZEWAJĄCYCH Z *BREVIBACTERIUM LINENS*

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było określenie zmian wybranych wyróżników jakościowych podczas dojrzewania kwasowych serów twarogowych z udziałem *Brevibacterium linens*.

Dokonano wyrobu, w skali pilotowej, trzech partii serków. W twarogach świeżych oraz po 1, 2, i 3 tygodniu dojrzewania oznaczono: masę i wymiary serków, kwasowość czynną i ogólną, zawartość suchej masy, tłuszczu, chlorku sodu, związków azotowych ogółem, azotu rozpuszczalnego i azotu amoniakalnego oraz wolnych kwasów tłuszczowych (WKT). Przeprowadzono również profilową ocenę sensoryczną, którą połączono z instrumentalnymi pomiarami tekstury.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że największe zmiany badanych cech zaobserwowano po trzech tygodniach dojrzewania a dotyczyły one głównie zawartości wody, udziału azotu rozpuszczalnego i amoniakalnego oraz WKT, a także twardości. Stwierdzono również, że na powierzchni serków zachodziły najdalej posunięte zmiany białek i tłuszczu. Oceniając poziom przyjętych deskryptorów wykazano dużą ich zmienność. Największe różnice dotyczyły oceny pomarańczowej barwy powierzchni oraz zapachu amoniakalnego, najmniejsze natomiast oceny smaku słonego i jednolitej barwy przekroju.

Słowa kluczowe: twarogi dojrzewające, *Brevibacterium linens*, charakterystyka

Wprowadzenie

Twarogi kwasowe, podobnie jak sery podpuszczkowe, mogą być poddane procesowi dojrzewania (przebiegającego w kontrolowanych warunkach temperatury i wilgotności) prowadzącego do ukierunkowanych przemian białek, tłuszczów, cukrów i soli mineralnych z jednoczesnym kształtowaniem się określonych cech jakościowych. Kierunki, zakres i dynamika tych przemian zależą głównie od enzymów endo- i egzogennych, a determinowane są rodzajem użytych w procesie produkcyjnym drobnoustrojów [Bohdziewicz, 2008a; Fox, 1989; Obrusiewicz, 1984; Pijanowski i Gaweł, 1986].

Sery twarogowe dojrzewające to na ogół uformowane z twarogu bloki, krążki, beczułki, paluszki, wianuszki, stożki, piramidki o masie od 10 g do nawet 10 kg. Często z dodatkiem szerokiej gamy przypraw smakowych [Bielefeld, 2002; Harbutt, 1998; Licznerski, 1951; Paul-Prössler, 2004; Żeromski, 1979]. Wyodrębnić przy tym można grupę wyrobów, które dojrzewają na tzw. maź. Najczęściej początkowo na ich powierzchni zachodzi tzw. gliwienie, czyli peptonizacja kazeiny, która posuwa się w głąb serka i nadaje szklisty wygląd prawie całej jego masie. W procesie gliwienia biorą udział grzyby *Geotrichum candidum* (*Oospora lactis*, *Oidium lactis*), a także różnego rodzaju drożdże kożuchujące, m.in. z rodzajów *Candida* i *Debaryomyces*, które rozwijają się chętnie na powierzchni produktów fermentowanych, powodując ich odkwaszenie i umożliwiając tym samym rozwój innych grup drobnoustrojów [Bohdziewicz, 2008b; Brennan i in., 2001; Corsetti i in., 2001]. Następnie uaktywniają się pałeczki proteolityczne *Brevibacterium linens*, które zależnie od rodzaju syntetyzują barwnik od żółtego do czerwonego. Początkowo powodują one wystąpienie nalotu, a później warstwy czerwono-pomarańczowej mazi barwiącej serki i nadającej całej masie pożądany zapach i smak.

B. linens jest uznawany za jeden z ważniejszych mleczarskich drobnoustrojów. Jest to krótkka, nie rozgałęziona, czasem zdeformowana pałeczka, która umożliwia otrzymywanie różnorodnych dojrzewających powierzchniowo serów, takich jak Limburski, Münster, Tylżycki czy Kortowski, a także twarogów dojrzewających, do których należą m.in. ołomunieckie kwargle oraz szeroka gama serków harceńskich – Handkäse, Bauernhandkäse, Harzer, Harzer Roller, Korbkäse, Olmützer Quargel itd. [Bielefeld, 2002; Bohdziewicz, 2008b; Żeromski, 1979].

B. linens należy do typu bakterii peptonizujących, powodujących degradację białka z wydzieleniem amoniaku. Jest mikroorganizmem ściśle tlenowym, którego optymalna temperatura rozwoju wynosi 20-30°C, a optymalne pH waha się od 6,5 do 8,5. Toleruje stężenia soli nawet do 15-20%. Pozytywne rezultaty daje współżycie tych bakterii z paciorkowcami kwasu mlekowego i niektórymi ziarniakami z grupy *Micrococcus* [Bikash i in., 2000; Brennan i in., 2001; Derengiewicz, 1997; Masoud i Jakobsen, 2003; Motta i Brandelli, 2008; Pijanowski i Gaweł, 1986; Rattray i in., 1996; Sousa i in., 2001].

W Polsce twarogi dojrzewające stanowiły dawniej istotny składnik codziennego pożywienia. Cieszyły się dużą popularnością ze względu na nieskomplikowany proces technologiczny, a jednocześnie były alternatywną formą przedłużania trwałości twarogów. Na skalę przemysłową wytwarzanych było szereg kwasowych twarogów dojrzewających. I tak np. w roku 1960 serki harceńskie stanowiły ponad 50% podaży serów miękkich [Łukaszewicz, 1962]. Jednak stopniowo rezygnowano

z ich produkcji aż do jej całkowitego zaniechania. Współczesne uwarunkowania pozwalają na podjęcie wyrobu twarogów dojrzewających zarówno przy zastosowaniu rozwiązań klasycznych jak też bardzo nowoczesnych [Bohdziewicz, 2008b; Bohdziewicz i Śmietana, 2007].

Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań było określenie zmian wybranych cech jakościowych zachodzących podczas dojrzewania twarogów z udziałem *Brevibacterium linens*.

Materiały i metody badań

Mleko do produkcji twarogu pozyskano ze Stacji Dydaktyczno-Badawczej UW-M w Bałdach. Surowiec po wstępnych zabiegach technologicznych (wirowanie i normalizacja zawartości tłuszczu oraz pasteryzacja 74°C/15 sek.) ochłodzono do 28°C i dodano bakterie fermentacji mlekowej - Mesophilic Aromatic Culture DVS CHN-19 (Chr. Hansen, Polska). Po osiągnięciu kwasowości skrzepu pH=4,6 przystąpiono do jego obróbki. Uzyskany twaróg delikatnie rozcierano, dodawano 2% soli kuchennej i dokładnie mieszano. Za pomocą formy nadawano serkom kształt krążków o średnicy ok. 70 mm i wysokości ok. 30 mm. Na uformowane i osuszone (w temp. 20-22°C, przez dobę) serki nanoszono kultury *Brevibacterium linens* BL-1 (Chr. Hansen, Francja). Proces dojrzewania prowadzono w komorze dojrzewalniczej przez okres 3 tygodni, w temperaturze 12-14°C i przy wilgotności względnej 90-95%. Podczas dojrzewania serki pielęgnowano tak, jak sery harceńskie, zgodnie z Instrukcją Centralnego Zarządu Przemysłu Mleczarskiego Nr 254/74 oraz PN-62/A-86246. Wyprodukowano w ten sposób trzy serie serków.

W każdej serii w produkcie świeżym oraz po 1, 2 i 3 tygodniach dojrzewania oznaczono:

- masę i wymiary pojedynczych serków,
- kwasowość czynną (pH) – wg PN-73/A-86232,
- kwasowość potencjalną (°SH) – wg PN-73/A-86232,
- zawartość wody – wg Standard IDF 4,
- zawartość tłuszczu – wg Standard IDF 152A,
- zawartość tłuszczu w s.m.,
- zawartość soli – wg Standard IDF 88,
- zawartość związków azotowych ogółem, azotu rozpuszczalnego i azotu amoniakalnego [Standard IDF 25; PN-75/A-04018; PN-73/A-86232].

- zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) – metodą ekstrakcyjno-miareczkową Dole’a w modyfikacji Deeth’a, Fitz-Gerald’a i Wood’a [1975].
- teksturę,

W3 badaniach instrumentalnych tekstury wykorzystano analizator *TEXTURE ANALYSER TA.XT plus* (Stable Micro Systems, Sussex, U.K.) z oprogramowaniem komputerowym Texture Exponent 32. Próbkę po termostatowaniu (3h/20°C) badano testem penetracji z głowicą cylindryczną P/6 mierząc siłę penetracji (F1) i przylepności (F2), przy zadanej głębokości 20 mm i prędkości przesuwu głowicy 2 mm/sekundę.

- profilową ocenę sensoryczną,

Ocena sensoryczna została zrealizowana przez zespół oceniający w oparciu o przedmiotowe normy [Standard IDF 99C; Standard ISO 4212; Standard ISO 6658]. Analizę przeprowadzono metodą skalowania, polegającą na ocenie punktowej (0-5 pkt.) badanej cechy (deskryptora). Przyjęto następujące deskryptory: D1-pomarańczowa barwa powierzchni, D2-zroszenie powierzchni, D3-jednolitość barwy przekroju, D4-biała barwa przekroju, D5-twardość mięszu, D6-elastyczność mięszu, D7-mazistość mięszu, D8-zapach śmietankowy, D9-zapach grzybowy, D10-zapach amoniakalny, D11-smak śmietankowy, D12-smak grzybowy, D13-smak amoniakalny, D14-smak gorzki, D15-smak słony.

Dodatkowo w serkach po 1, 2 i 3 tygodniach dojrzewania wykonując analizy zawartości azotu rozpuszczalnego i amoniakalnego oraz WKT uwzględniono podział na skórkę (warstwę mazi) jak i miąższ.

Próbki do analiz pobierano zgodnie z wymogami norm przedmiotowych [PN-86/A-86041; Standard IDF 50C]. Wszystkie oznaczenia wykonano w co najmniej trzech równoległych powtórzeniach. Uzyskane dane doświadczalne poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica 13.1 (StatSoft, Tulusa, USA). Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem post hoc Tukey’a na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wyniki zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne (z uwzględnieniem odchylenia standardowego \pm SD).

Wyniki i dyskusja

W czasie produkcji twarogów dojrzewających, zgodnie z oczekiwaniami [Instrukcja Nr 254/74, PN-62/A-86246], w miarę postępu dojrzewania stwierdzono spadek masy oraz zmniejszenie wymiarów poszczególnych serków (tab. 1). Przy

czym zmiany te zachodziły najintensywniej podczas pierwszego tygodnia dojrzewania (spadek masy odpowiednio o $\Delta_m=22,05\%$, $19,20\%$ i $6,42\%$).

Zgodnie z danymi literaturowymi [Bikash i.in., 2000; Derengiewicz, 1997; Obrusiewicz, 1984; Pijanowski i Gaweł, 1986] nastąpiła stopniowa alkalizacja serków i zaobserwowano statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) spadek kwasowości czynnej z poziomu pH=4,68 (twarogi świeże) do wartości 5,91 (po 3 tygodniach). Największą zmianę pH (o 0,60) odnotowano po 2 tygodniu, a najmniejszą (o 0,28) po 3 tygodniu dojrzewania.

Tabela 1. Cechy jakościowe serków twarogowych w czasie dojrzewania

Parametr		Czas dojrzewania			
		świeże	1 tyg.	2 tyg.	3 tyg.
Masa [g]		147,74±0,97 ^a	114,89±1,21 ^b	92,72±0,87 ^c	86,76±0,83 ^d
Średnica [mm]		71,33±0,57 ^a	67,33±0,57 ^b	66,23±0,25 ^b	63,83±0,28 ^c
Wysokość [mm]		31,17±1,04 ^a	29,50±0,50 ^{ab}	27,83±0,57 ^{bc}	27,16±0,71 ^d
Kwasowość czynna [pH]		4,68±0,00 ^a	5,03±0,00 ^b	5,63±0,02 ^c	5,91±0,08 ^d
Kwasowość ogólna [°SH]		66,33±1,15 ^a	67,66±0,57 ^a	71,33±1,15 ^b	83,00±1,00 ^c
Sucha masa [%]		33,15±0,57 ^a	41,74±0,37 ^b	44,93±0,23 ^c	58,84±0,12 ^d
Tłuszcz [%]		8,32±0,06 ^a	10,50±0,50 ^b	11,30±0,26 ^b	13,25±0,25 ^c
Tłuszcz w s.m. [%]		25,09±1,99 ^a	25,15±0,81 ^a	25,15±1,99 ^a	22,51±0,57 ^b
Chlorek sodu [%]		2,10±0,17 ^a	2,21±0,09 ^{ab}	2,41±0,04 ^{ab}	2,52±0,13 ^b
Zw. azotowe ogółem [%]		2,58±0,03 ^a	2,81±0,46 ^b	3,24±1,03 ^b	3,58±0,94 ^c
Azot rozpuszczalny [%]	skórka	-	14,11±0,50 ^{aA}	14,42±0,63 ^{aA}	15,42±0,25 ^{bA}
	mięsz	0,30±0,01 ^a	2,39±0,13 ^{bB}	3,14±0,24 ^{cB}	3,49±0,28 ^{cB}
Azot amoniakalny [%]	skórka	-	1,73±0,08 ^{aC}	1,96±0,02 ^{bC}	2,45±0,03 ^{cC}
	mięsz	0,71±0,03 ^a	0,78±0,09 ^{aD}	0,81±0,02 ^{aD}	1,16±0,04 ^{bD}
WKT [μEq/100 g tw.]	skórka	-	2,54x10 ³ ±0,13 ^{aE}	4,22x10 ³ ±0,08 ^{bE}	9,81x10 ³ ±0,05 ^{cE}
	mięsz	1,32x10 ³ ±0,38 ^a	2,12x10 ³ ±0,27 ^{bcF}	3,94x10 ³ ±0,32 ^{bcF}	5,85x10 ³ ±0,47 ^{dF}
WKT [μEq/100 g tł.]	skórka	-	24,19x10 ³ ±1,84 ^{aG}	37,35x10 ³ ±0,26 ^{bG}	74,34x10 ³ ±0,17 ^{cG}
	mięsz	15,87x10 ³ ±0,63 ^a	20,19x10 ³ ±2,23 ^{bH}	34,87x10 ³ ±1,01 ^{cH}	44,15x10 ³ ±1,62 ^{dH}

a, A - wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszach (a-d) oraz kolumnach (A-H) różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Równoległe do zmian kwasowości czynnej obserwowano przyrost wartości kwasowości ogólnej. Tu również dynamika zmian nie była jednolita. Najmniejsze zmiany kwasowości stwierdzono po pierwszym tygodniu dojrzewania (wzrost o 1,33°SH), największe natomiast po trzecim tygodniu (wzrost o 11,67°SH).

Właściwe ukształtowanie kwasowości (zarówno czynnej jak i ogólnej) umożliwiło rozwój, a później dominację *Brevibacterium linens*, która była odpowiedzialna za końcowy smak, zapach, kolor i teksturę produktów [Masoud i Jakobsen, 2003; Rattray i Fox, 1999; Rattray i in., 1996].

Również zawartość suchej substancji ulegała istotnym ($p \leq 0,05$) zmianom w czasie całego okresu dojrzewania. Z poziomu 33,15% dla świeżo uformowanych serków wzrosła do wartości 58,84% po zakończeniu dojrzewania. Największy przyrost suchej masy (o 13,91%) stwierdzono po 3 tygodniu dojrzewania, a najmniejszy (3,19%) po 2 tygodniu (tab. 1).

Zawartość tłuszczu także ulegała zmianom. Wraz ze spadkiem zawartości wody wzrastał jego udział. Od początkowej wartości 8,32% w serkach świeżych do 13,25% w serkach dojrzałych. Jednak po przeliczeniu na zawartość tłuszczu w suchej masie zmiany w czasie dojrzewania były statystycznie nieistotne w pierwszych dwóch tygodniach, a kształtowały się ogółem na poziomie $\Delta_{Tws.m.}=0,10\%$ (od 25,09% do 22,51%).

Stwierdzono różnice zawartości chlorku sodu. Poziom soli kuchennej wynosił 2,10% w serkach przygotowanych do dojrzewania i osiągał wartość 2,52% w produktach dojrzałych.

Oznaczając związki azotowe ogółem stwierdzono wzrost ich zawartości w trakcie dojrzewania, od 2,58% do 3,58% (tab. 1). Po przeliczeniu azotu ogólnego na białko [PN-75/A-04018] produkty wykazywały początkowo zawartość typową dla twarogów tłustych (16,46% i 17,93%) by w dwu ostatnich tygodniach przyjmować wartości charakterystyczne dla twarogów chudych (20,67% białka po 2 tygodniu i 22,84% po 3 tygodniu dojrzewania [Bohdziewicz, 2009; PN-91/A-86300]).

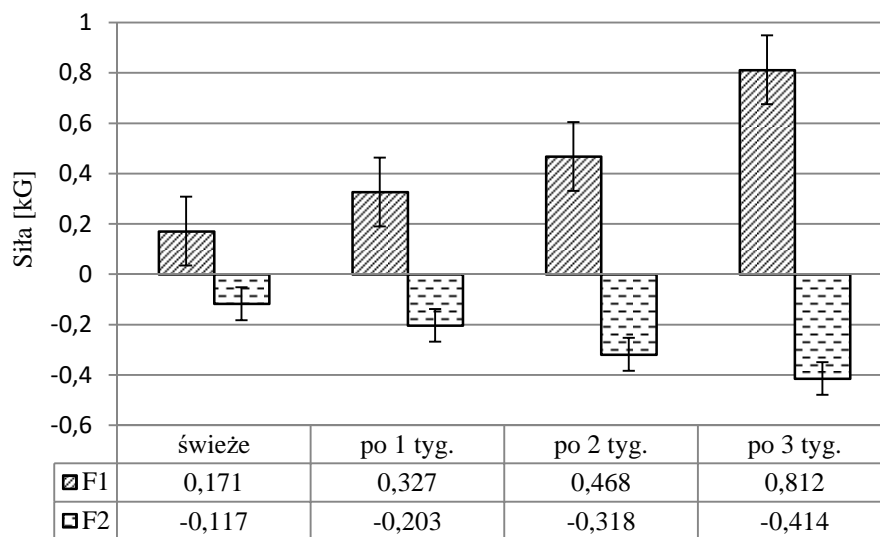
Poziom azotowych związków rozpuszczalnych niesie informacje o zakresie dojrzewania serów. Im wyższy jest stosunek azotu rozpuszczalnego do azotu ogólnego to tym bardziej zaawansowany jest stopień dojrzałości [Fox, 1989; Pijanowski i Gaweł, 1986; Sousa i in., 2001]. Adamik i Wangin [1972] opisali *B. linens* jako bakterię wykazującą aktywny rozkład kazeiny na rozpuszczalne związki azotowe. Wśród tych związków specyficzną rolę odgrywają aminokwasy oraz amoniak, prowadząc do neutralizacji środowiska od powierzchni sera w jego głąb. Również szereg innych autorów [Bikash i in., 2000; Brennan i in., 2001; Fox,

1989; Rattray in., 1996; Sousa i in., 2001] podkreśla charakterystyczne właściwości proteolityczne *B. linens*.

Wykazano statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) zróżnicowanie pomiędzy zawartością azotu rozpuszczalnego w skórce/mazi (średnia po 1, 2 i 3 tygodniu to 14,65%) a w mięszu (średnia dla wszystkich serków to 2,33%). Zarówno w mięszu jak i w mazi największe przyrosty zawartości $N_{rozp.}$ zaobserwowano po trzecim tygodniu dojrzewania.

Podobne tendencje stwierdzono oznaczając zawartość azotu amoniakalnego, gdzie średni procentowy udział w mazi wynosił 2,05, a w mięszu był ponad 2 razy niższy (0,87%).

B. linens obok silnych właściwości proteolitycznych wykazuje także właściwości lipolityczne [Bikash i in., 2000; Ganesan i in., 2004; Rattray i Fox, 1999]. W pełni potwierdziły to uzyskane wyniki przeprowadzonych badań. Podczas dojrzewania serków stopniowo wzrastała ilość wolnych kwasów tłuszczowych. W mięszu od wartości $1,32 \times 10^3 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}$ do $5,85 \times 10^3 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}$ twarogu. W miarę czasu dojrzewania przyrost WKT malał i wynosił odpowiednio: 105,60; 85,84 i 48,47%. Natomiast w warstwie zewnętrznej (mazi) wartość WKT była średnio wyższa o 1,5 raza, a przyrost po 2 i 3 tygodniu dojrzewania wynosił 66,67 i 132,47%. Po uwzględnieniu zawartości tłuszczu stwierdzono po trzech tygodniach dojrzewania w mięszu $44,15 \times 10^3 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}$, zaś w mazi $74,34 \times 10^3 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}$ tłuszczu.



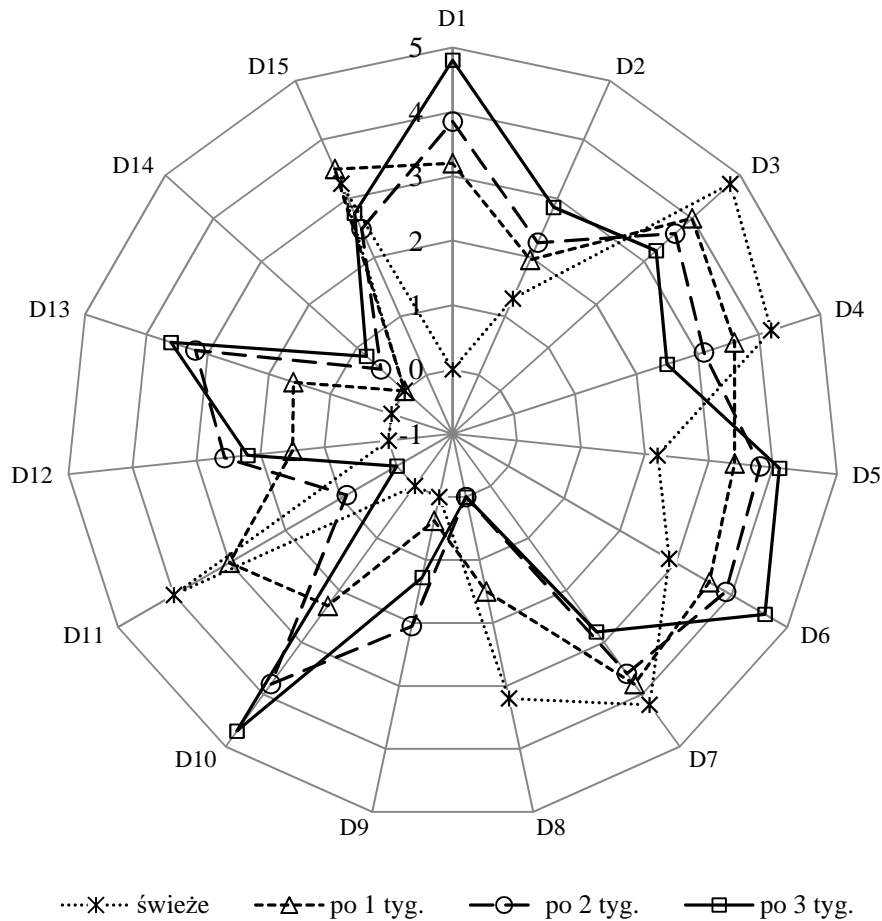
Rys. 1. Zmiany sił penetracji (F1) i sił przylepności (F2) w czasie dojrzewania serków

Uzyskane wyniki instrumentalnej oceny cech reologicznych (rys. 1) w pewnym zakresie pokrywają się z profilową oceną sensoryczną (rys. 2) oraz analizą chemiczną (tab. 1). Zmiany wartości sił penetracji i przylepności nie wynikały jedynie ze zmian zawartości wody czy tłuszczu ale niewątpliwie były determinowane również produktami przemian proteolitycznych i lipolitycznych. W czasie dojrzewania siły penetracji wzrosły 4,75 krotnie a sił przylepności 3,54 krotnie.

Oceniając poziom przyjętych deskryptorów stwierdzono dużą ich zmienność (rys. 2). Największe różnice, od 0,00 do 4,80 pkt. dotyczyły oceny pomarańczowej barwy powierzchni (D1) oraz zapachu amoniakalnego ($\Delta_{D10}=4,70$), najmniejsze natomiast oceny smaku słonego ($\Delta_{D15}=0,77$) i jednolitej barwy przekroju ($\Delta_{D3}=1,55$).

Nie zawsze elementy profilowej oceny sensorycznej pokrywały się z wynikami analiz fizykochemicznych. Posmak słony różnił się od wyników laboratoryjnego oznaczenia zawartości soli. Różnice te mogły wynikać z obecności licznych substancji towarzyszących, które na ogół w serach występują i działają jako inhibitory lub sensoryzatory smakowe.

Cechy sensoryczne serów kształtowane są w decydującym zakresie poprzez niskocząsteczkowe produkty degradacji kazeiny, powstające pod wpływem enzymów bakteryjnych. Podobnie jak produkty degradacji kazeiny, równie istotną rolę w formowaniu smaku i zapachu odgrywa tłuszcz mlekowy, będący podstawowym substratem w wytwarzaniu składników aromatu. Pomędzy produktami przemian białek oraz tłuszczu zachodzi szereg wzajemnych interakcji istotnych dla cech sensorycznych. Wolne aminokwasy i peptydy określają zakres i głębokość proteolizy, a jednocześnie wpływają na rozmieszczenie kwasów tłuszczowych pomiędzy fazą wodną i tłuszczową, co maskuje smak i zapach typowy dla WKT. Ponadto na smak i zapach peptydów wpływają w znacznym stopniu jony wapnia i magnezu, stopień hydratacji oraz masa cząsteczkowa [Collins i in., 2003; Fox, 1989; Pijanowski i Gawel, 1986; Sousa i in., 2001; Yvon i Rijnen, 2001].



Rys. 2. Profilogram sensorycznej oceny serków w trakcie dojrzewania

Na przemiany składników serków twarogowych podczas dojrzewania pod wpływem *Brevibacterium linens* wpływa wiele, wzajemnie powiązanych i uzupełniających się czynników. Począwszy od jakości (w tym składu) surowca, np. zawartość witamin (głównie B₁), soli mineralnych (w tym NaCl), pH środowiska, współwystępowanie innych drobnoustrojów, parametry dojrzewania (temperatura, wilgotność, czas ale również długość fal świetlnych) [Arfi i in., 2005; Leclercq-Perlat i in. 2004; Masoud i Jakobsen, 2003; Pijanowski i Gaweł, 1986; Reps, 1993]. Z jednej strony utrudnia to standaryzację cech jakościowych produktów gotowych, z drugiej zaś pozwala na różnorodność wyrobów uzyskanych w wykorzystaniu tej grupy drobnoustrojów.

Wnioski

Uzyskane podczas badań wyniki pozwalają na sformułowanie następujących stwierdzeń i wniosków:

1. W czasie dojrzewania kwasowych serów twarogowych stwierdzono pewne zróżnicowanie ich cech jakościowych.
2. Największe zmiany badanych cech stwierdzono po trzech tygodniach dojrzewania.
3. Na powierzchni serków zachodziły najdalej posunięte zmiany białek i tłuszczu.

Literatura

1. Adamik K., Wangin J. (1972). Produkcja serów miękkich. Zakład Wydawnictwa CRS, Warszawa.
2. Arfi K., Leclercq-Perlat M.N., Spinnler H.E., Bonarme P. (2005). Importance of curd-neutralising yeast on the aromatic potential of *Brevibacterium linens* during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 15, 883-891.
3. Bielefeld J. G. (2002). Sery – przewodnik dla smakoszy. Muza S.A., Warszawa.
4. Bikash C., Ghosh T., Sienkiewicz T., Krenkel K. (2000). *Brevibacterium linens* - a useful enzyme producer for cheese. *Milchwissenschaft – Milk Science International*, 55(11), 628-632.
5. Bohdziewicz K. (2009). Twaróg – pierwszy świeży ser świata. *Przegląd Mleczarski*, 2, 4-8.
6. Bohdziewicz K. (2008a). Twarogi kwasowe – przetwórstwo. *Przegląd Mleczarski*, 7, 12-15.
7. Bohdziewicz K. (2008b). Twarogi kwasowe dojrzewające. *Przegląd Mleczarski*, 9, 4-10.
8. Bohdziewicz K., Śmietana Z. (2007). Twarogi - teraźniejszość i przyszłość. *Mat. V Forum „Polska spółdzielczość mleczarska w Unii Europejskiej – szanse i zagrożenia”*. Augustów 27-29.09.2007; 18-16.
9. Brennan N.M., Brown R., Goodfellow M., Ward A.C., Beresford P., Vancanneyt M., Cagan T.M., Fox P.F. (2001). *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 969-1976.
10. Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese. *International Dairy Journal*, 13, 841-866.
11. Corsetti A., Rossi J., Gobetti M. (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 1-10.
12. Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., Wood A.F. (1975). A convenient method for determining the extend of lipolysis in milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 30(3), 109-111.
13. Derengiewicz W. (1997). Technologia serów miękkich. Oficyna Wydawnicza HOŻA, Warszawa.
14. Fox P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal Dairy Science*, 72, 1379-1400.
15. Ganesan B., Seefeldt K., Weimer B.C. (2004). Fatty Acid Production from Amino Acids and α -Keto Acids by *Brevibacterium linens* BL2. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6385-6393.
16. Harbutt J. (1998). *The World Encyclopedia of Cheese*. Annes Publishing Limited, London.
17. Instrukcja Centralnego Zarządu Przemysłu Mleczarskiego Nr 254/74. Ser harceński. Of. Wyd. „HOŻA” Warszawa.
18. Leclercq-Perlat M.N., Corrieu G., Spinnler H.E. (2004). The Color of *Brevibacterium linens* Depends on the Yeast Used for Cheese Deacidification. *Journal of Dairy Science*, 87(5), 1536-1544.
19. Licznarski J. (1951). *Praktyczne serowarstwo*. PWT Warszawa.
20. Łukaszewicz M. (1962). Ogólna sytuacja w produkcji serów miękkich i perspektywa na przyszłość. *Przegląd Mleczarski*, 03, 2-6.
21. Masoud W., Jakobsen M. (2003). Surface ripened cheeses: the effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavesces*. *International Dairy Journal*, 13, 231-237.
22. Motta A.S., Brandelli A. (2008). Properties and antimicrobial activity of the smear surface cheese coryneform bacterium *Brevibacterium linens*. *European Food Research and Technology*, 227, 1299-1306.

23. Obrusiewicz T. (1984). Technologia mleczarstwa. WSiP, Warszawa.
24. Paul-Prössler U. (2004). Sery – porady dla smakoszy. Wydawnictwo „Arkady” Sp. z o.o. Warszawa.
25. Pijanowski E., Gaweł J. (1986). Zarys chemii i technologii mleczarstwa. Tom III. PWRiL, Warszawa.
26. PN-62/A-86246. Sery twarogowe dojrzewające. Ser harceński.
27. PN-73/A-86232. (1973). Mleko i przetwory mleczarskie. Sery. Metody badań.
28. PN-75/A-04018. (1975). Produkty rolniczo-żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahala i przeliczanie na białko.
29. PN-86/A-86041. (1986). Mleko i przetwory mleczarskie. Pobieranie próbek.
30. PN-91/A-86300. (1991). Mleko i przetwory mleczarskie. Sery twarogowe niedojrzewające.
31. Rattray F.P., Fox P.F. (1999). Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese flavor adjunct. *Journal Dairy Science*, 84, 891-909.
32. Rattray F.P., Fox P.F., Healy A. (1996). Specificity of an Extracellular Proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174 on Bovine α_{s1} -Casein”. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb.:501-506.
33. Reys A., (1993). Bacterial surface-ripened cheeses. w: *Cheese, chemistry, physics and microbiology* (red. P.F. Fox), Vol. 2, 137-172. Chapman & Hall, London.
34. Sousa M.J., Ardo Y., McSweeney P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
35. Standard IDF 4. (2004). Cheese and processed cheese – Determination of the total solids content.
36. Standard IDF 25. (1964). Determination of the protein content of processed cheese products.
37. Standard IDF 50C. (1995). Milk and milk products. Guidance on sampling.
38. Standard IDF 88. (2004). Cheese and processed cheese products – Determination of chloride content - Potentiometric titration method.
39. Standard IDF 99C. (1997). Sensory evaluation of dairy products by scoring.
40. Standard IDF 152A. (1997). Milk and milk products. General guidance on the use of butyrometric methods.
41. Standard ISO 4212. (1987). Sensory analysis-Methodology-Evaluation of food products by methods using scales.
42. Standard ISO 6658. (1985). Sensory analysis-Methodology-General guidance.
43. Yvon M., Rijnen L. (2001). Cheese flavor formation by amino acidcatabolism. *International Dairy Journal*, 11,185-201.
44. Żeromski Z. (1979). Sery. WN-T, Warszawa.

ANETA BRODZIAK¹, JOLANTA KRÓL², ANNA WOLANCIUK²,
JOANNA BARŁOWSKA², MONIKA KĘDZIERSKA-MATYSEK²

¹*Pracownia Ekologicznej Produkcji Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Instytut Hodowli Zwierząt
i Ochrony Bioróżnorodności, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

²*Katedra Towaroznawstwa i Przetwórstwa Surowców Zwierzęcych, Wydział Biologii,
Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

OCENA JAKOŚCI MLECZNYCH NAPOJÓW FERMENTOWANYCH PRODUKOWANYCH NA BAZIE MLEKA KRÓW RASY SIMENTALSKIEJ UTRZYMYWANYCH W GOSPODARSTWACH EKOLOGICZNYCH

Streszczenie

Celem badań była ocena wartości odżywczej, w tym prozdrowotnej, i jakości konsumpcyjnej jogurtów wyprodukowanych z surowca pozyskanego od krów rasy simentalskiej utrzymywanych w certyfikowanym gospodarstwie ekologicznym. Jogurty uzyskane w sezonie wiosenno-letnim charakteryzowały się istotnie ($p \leq 0,01$) większą wartością odżywczą, zawierając średnio 12,82% suchej masy, w tym 3,92% białka ogólnego. Stanowiły również cenniejsze źródło analizowanych bioaktywnych białek serwatkowych i witamin. Odzwierciedleniem jakości żywności są cechy organoleptyczne. Jogurty z sezonu jesienno-zimowego uzyskały niższe noty za barwę, konsystencję, smak i zapach. Otrzymane jogurty stanowiły cenne źródło składników odżywczych, a zwłaszcza w sezonie wiosenno-letnim.

Abstract

The aim of the study was to assess the nutritional value, including health-promoting value, and the eating quality of yoghurts made from raw material obtained from Simmental cows kept on a certified organic farm. Yoghurts produced in the spring-summer season had significantly ($p \leq 0.01$) higher nutritional value, containing on average 12.82% of dry matter, in that 3.92% of total protein. They were also a more valuable source of analysed bioactive whey proteins and vitamins. Organoleptic characteristics reflect the food quality. Yoghurts from the autumn-winter season obtained lower scores for colour, consistency, taste and smell. The yoghurts obtained were a valuable source of nutrients, especially in the spring-summer season.

Mleko i przetwory mleczne należą do podstawowych elementów diety współczesnych konsumentów, co wpływa na prężny rozwój rynku mleczarskiego [Grębowiec i Korytkowska, 2017]. Nabywcy cenią mleczne napoje za ich walory

smakowe, a także wysoką wartość odżywczą i prozdrowotny wpływ na organizm. Wśród mlecznych napojów fermentowanych jogurt jest produktem, który cieszy się największą popularnością wśród konsumentów. Według definicji opracowanej przez FAO/WHO, jogurt to mleko ukwaszone i skoagulowane za pomocą bakterii *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* [Codex Alimentarius, 2011]. Natomiast, zgodnie Polską Normą [PN-A-86061:2002] jest to napój wyprodukowany z mleka znormalizowanego, zagęszczonego przez dodatek odtłuszczonego mleka w proszku lub odparowanie części wody, poddanego procesowi pasteryzacji, a następnie ukwaszonego zakwasami czystych kultur bakterii z grupy *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus*.

Zasadniczo jogurt powinien charakteryzować się półpłynną, gładką konsystencją, homogennym skrzepem, bez wycieku serwatki oraz brakiem pęknięć. Smak jogurtu powinien być łagodny i przyjemny, a aromat „jogurtowy”. Powierzchnia tego napoju mlecznego powinna być jednolita, błyszcząca i gładka [Ziarno i Zaręba, 2014a]. Charakterystyczny smak nadają jogurtom związki wytworzone przez bakterie podczas fermentacji. Spośród głównych należy wymienić kwas mlekowy, acetoiny, aldehyd octowy oraz dwuacetyl. Właściwości sensoryczne jogurtów naturalnych są warunkowane rodzajem stosowanej kultury bakterii, zawartością tłuszczu w produkcie czy dodatkiem białek mleka lub mleka w proszku [Wichrowska i Wojdyła, 2014; Brodziak i Król, 2016]. Coraz większego znaczenia nabiera zawartość składników bioaktywnych, do których zaliczane są m.in. związki występujące we frakcji białkowej i tłuszczowej mleka. Białka serwatkowe od lat znane są z właściwości prozdrowotnych. β -laktoglobulina, a przede wszystkim również laktoferyna wykazują działanie przeciwwirusowe. Ponadto, laktoferyna charakteryzuje się właściwościami antybakteryjnymi [Król i in., 2011]. α -laktoalbumina uczestniczy w kontroli laktacji i sekrecji mleka, a także wykazuje zdolności antybakteryjne, które prawdopodobnie są wynikają z syntezy peptydów wykazujących aktywność mikrobiologiczną podczas trawienia α -laktoalbuminy [Siemianowski i Szpendowski, 2011]. Do korzystnych oddziaływań białek można zaliczyć, także działanie antyoksydacyjne, wynikające z obecności aminokwasów siarkowych, głównie cysteiny. W grupie białek serwatkowych najlepszym antyoksydantem jest β -laktoglobulina, która blokuje powstawanie wolnych rodników. Natomiast składnikami frakcji tłuszczowej są m.in. witaminy lipofilne. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczu są ogromnie istotne w zapewnieniu zdrowia. Ochraniają najistotniejsze struktury komórek, tj. błony komórkowe, a także mózg, przed szkodliwym działaniem wolnych rodników tlenowych. Witaminy A, D₃ i E uczestniczą w: procesie widzenia, regulacji podziału, różnicowania i wzrostu

komórek, mineralizacji kości i zębów czy utrzymaniu właściwej struktury i przepuszczalności błon komórkowych. Witamina D₃ jest także niezbędna w procesie prawidłowego wchłaniania wapnia [Cichosz, 2007; Zaborska i in., 2015a, b]. Warto pamiętać, że zawartość witamin lipofilnych jest proporcjonalna do zawartości tłuszczu w produkcie.

Według szacunkowych danych IERiGŻ-PIB [2018] produkcja mlecznych napojów fermentowanych w Polsce w 2017 r. wyniosła 700 tys. ton, w tym jogurtów – 380 tys. ton. Samo przeciętne roczne spożycie jogurtów w gospodarstwach domowych od 2014 r. kształtuje się w granicach około 6 kg na osobę. Liczne badania [Baranowska i in., 2011; Ziarno i Zaręba, 2014b; Królczyk i in., 2016; Piekut, 2018] wykazały, że konsumenci najchętniej wybierają jogurty z dodatkami smakowymi, głównie owocowymi. Piekut [2018] podaje, że oprócz jogurtów pitnych smakowych konsumenci równie często preferują naturalne typu greckiego. Badania przeprowadzone przez Kowalczuk i Szymańskiego [2017] wykazały, że nabywcy stosunkowo często decydują się na zakup nowych produktów mlecznych. Jednak decyzje o zakupie są przemyślane, a powodem wyboru dla ponad 60% ankietowanych są ciekawość i chęć poznania nowości rynkowych, natomiast dla ponad 40% respondentów – przystępna cena. Kobiety podczas zakupu w większym stopniu kierują się opiniami rodziny i znajomych oraz chęcią poznawania nowych smaków, a także właściwościami prozdrowotnymi. Z kolei, dla mężczyzn istotna jest reklama, a także dostępność nowości na rynku. Jak podają Sajdakowska i Grasewicz [2016], konsumenci są skłonni zapłacić wyższą cenę za krajowe lub lokalne pochodzenie wyrobu, a także ekologiczną metodę produkcji czy obecność składników służących poprawie zdrowia.

W związku z tym celem badań była ocena wartości odżywczej, w tym prozdrowotnej, i jakości konsumpcyjnej jogurtów wyprodukowanych z mleka ekologicznego.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły jogurty wytworzone na bazie mleka pozyskanego od krów rasy simentalskiej utrzymywanych w certyfikowanym gospodarstwie ekologicznym usytuowanym w Południowej Polsce (tereny góryste). W sezonie wiosenno-letnim żywienie zwierząt oparte było głównie o pastwisko z dodatkiem siana i śruty zbożowej, natomiast w sezonie jesienno-zimowym o sianokiszonkę, uzupełnianą sianem i śrutą zbożową. W celu wytworzenia jogurtów pobrano mleko zbiorcze i w warunkach chłodniczych przewieziono do laboratorium. Jogurty zostały wyprodukowane metodą termostatową. Surowiec został poddany pasteryzacji w temp.

85°C przez 30 min. w łaźni wodnej. Mleko po pasteryzacji schłodzono do temp. 40°C i zaszczepiono bakteriami jogurtowymi FD-DVS YC-180 Yo-Flex zawierającymi *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* i *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen, Dania) w ilości 0,15 g/l [Glibowski i Rybak, 2016]. Inkubację prowadzono w temp. 40°C do momentu uzyskania pH=4,6. Następnie uzyskane produkty schłodzono do temp. 20°C w celu przerwania inkubacji. Jogurty przechowywano w temp. 4-6°C do dnia następnego (około 20 h) w celu poddania analizom. Jogurty produkowano dwukrotnie w ciągu roku, tj. w sezonie wiosenno-letnim (V-VII) i jesienno-zimowym (XII-II). Łącznie badaniami objęto 12 jogurtów. W uzyskanych produktach analizowano kwasowość oraz wartość odżywczą, w tym zawartość wybranych substancji biologicznie czynnych. W każdej próbce jogurtu oznaczono wartość pH, przy pomocy pH-metru (Elmetron CP-401, Polska). Kwasowość potencjalną ($^{\circ}\text{SH}$) oznaczono metodą miareczkową, a następnie wyrażono jako zawartość kwasu mlekowego (według PN-A-86061:2002). Uzyskane jogurty zostały poddane analizie zawartości białka ogólnego (metodą Kjeldahla, według PN-EN ISO 8968-1:2004), tłuszczu (metodą Gerbera) i suchej masy (metodą suszenia w 102°C). Ponadto, określono stężenie wybranych białek serwatkowych i witamin lipofilnych. W celu określenia stężenia wybranych niezdenaturowanych białek serwatkowych, tj. α -laktoalbuminy, β -laktoglobuliny i laktoferyny, zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz. Wszystkie próbki przygotowano w oparciu o metodę opracowaną przez Romero i in. [1996] z modyfikacjami [Brodziak i in., 2012]. W celu określenia stężenia wybranych witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, tj. A, D₃ i E, zastosowano również metodę RP-HPLC. Wszystkie próbki przygotowano w oparciu o ekstrakcję tłuszczu metodą Röse-Gottlieb zmodyfikowaną przez Hewavitharana i in. [1996]. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Oceniano również cechy organoleptyczne, tj. barwę, konsystencję, smak i zapach. Ocena organoleptyczna jogurtów została przeprowadzona przez odpowiednio przygotowany zespół pięcioosobowy. Przed oceną próbki były kodowane i umieszczone przez 1 h w temperaturze pokojowej, a następnie przedstawiane degustatorom wraz z kwestionariuszem oceny. Do oceny ww. parametrów zastosowano skalę pięciopunktową, gdzie 1 oznaczało jakość dyskwalifikującą (nieodpowiednią), a 5 – jakość bardzo dobrą (charakterystyczną dla produktu, naturalną).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy wykorzystaniu programu StatSoft Inc. Statistica ver. 13.1 (Statsoft Inc., 2016) w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji. Jako wynik podano wartość średnią i odchylenie standardowe. Istotne

różnice pomiędzy średnimi określono wykorzystując test NIR-Fishera, przy poziomie istotności p (alfa) = 0,05.

Omówienie wyników i dyskusja

Wyniki z oceny wartości odżywczej, w tym prozdrowotnej, i jakości konsumpcyjnej jogurtów wyprodukowanych z mleka ekologicznego przedstawiono w tabelach 1-3.

Jogurty uzyskane w sezonie wiosenno-letnim cechowały się większymi wartościami kwasowości czynnej (wartość pH) – 4,58 vs 4,49, jak i miareczkowej – 57,20 vs 44,40 °SH. Ilość kwasu mlekowego była zatem większa w produktach wytworzonych latem, osiągając wartość 1,29% ($p \leq 0,05$). Kwasowość jogurtów doświadczalnych mieściła się w granicach normy [PN-A-86061:2002], zgodnie z którą kwasowość miareczkowa wyrażona jako zawartość kwasu mlekowego nie powinna wynosić mniej niż 0,6% kwasu mlekowego.

Sezon pozyskania i przetwarzania surowca istotnie wpłynął na skład chemiczny otrzymanych jogurtów. Wyprodukowane w okresie wiosenno-letnim charakteryzowały się istotnie większą wartością odżywczą, zawierając średnio 12,82% suchej masy ($p \leq 0,01$), w tym 3,92% białka ogólnego ($p \leq 0,01$). Zawartość tłuszczu była istotnie ($p \leq 0,05$) większa o 0,25% w jogurtach z sezonu jesienno-zimowego, osiągając wartość 3,95%.

Tabela 1. Kwasowość i podstawowa wartość odżywcza analizowanych jogurtów z uwzględnieniem sezonu produkcji (średnia±SD)

Sezon produkcji	Kwasowość			Skład chemiczny		
	wartość pH	miareczkowa (°SH)	kwas mlekowy (%)	sucha masa (%)	tłuszcz (%)	białko ogólne (%)
Jesienno-zimowy	4,49±0,08	44,40 ^a ±2,67	1,00 ^a ±0,05	11,18 ^A ±0,64	3,95 ^b ±0,32	3,34 ^A ±0,22
Wiosenno-letni	4,58±0,06	57,20 ^b ±4,05	1,29 ^b ±0,08	12,83 ^B ±0,80	3,70 ^a ±0,26	3,92 ^B ±0,30

a, b – różnice istotne przy $p \leq 0,05$; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$

Okres wiosenno-letni korzystnie wpływał na status bioaktywny produktów ekologicznych, bowiem stanowiły również cenniejsze źródło analizowanych białek serwatkowych i witamin (tabela 2). Największe różnice sezonowe stwierdzono w przypadku laktoferyny, której w sezonie wiosenno-letnim było więcej aż o 34% –

40,11 mg/l ($p \leq 0,01$). Zawartość α -laktoalbuminy w jogurtach wytwarzanych w okresie wypasu pastwiskowego wynosiła 0,80 g/l, a β -laktoglobuliny – 0,78 g/l. Różnice między sezonami były statystycznie istotne i wyniosły odpowiednio: 16 ($p \leq 0,05$) i 20% ($p \leq 0,01$). Jak podali Brodziak i in. [2018], mleko pozyskane od krów rasy simentalskiej utrzymywanych w certyfikowanych gospodarstwach ekologicznych zawiera średnio 1,19 g/l α -laktoalbuminy, 3,32 g/l β -laktoglobuliny i 123,8 mg/l laktoferyny. Należy podkreślić, że zastosowana pasteryzacja w dużym stopniu negatywnie wpłynęła na zawartość składników biologicznie czynnych w uzyskanych produktach. Jednakże jest ona procesem niezbędnym w celu zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów. W czasie ogrzewania ilość białek serwatkowych w mleku zmniejsza się, ponieważ dochodzi do częściowej ich denaturacji – głównie dotyczy to β -laktoglobuliny i krowiej albuminy serum [Sakkas i in., 2014]. Wskazują na to także wyniki badań przeprowadzonych przez Ruprichová i in. [2012] na jogurtach komercyjnych, które wskazują, że β -laktoglobulina była najbardziej niestabilnym termicznie białkiem. Zmiany te nie wpływają jednak na wartość biologiczną produktu, ponieważ białka te tworzą kompleksy z innymi składnikami, ale nie wytrącają się z mleka [Sakkas i in., 2014]. Jest to ważne, ponieważ białka serwatkowe korzystnie oddziałują na zdrowie człowieka, w tym wykazują właściwości przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne czy przeciwwirusowe [Król i in., 2011]. Bonczar i in. [2016] w przeprowadzonych badaniach oceniali zawartość składników frakcji białkowej w mleku surowym i pasteryzowanym oraz jogurtach. Autorzy nie uzyskali statystycznie istotnych różnic. Zawartość α -laktoalbuminy, β -laktoglobuliny i laktoferyny w jogurtach była zbliżona do ich ilości w surowcu, która wynosiła: 2,45, 3,71 i 0,40 g/dm³, odpowiednio.

Tabela 2. Zawartość wybranych składników bioaktywnych w analizowanych jogurtach z uwzględnieniem sezonu produkcji (średnia \pm SD)

Sezon produkcji	Fracja białkowa			Fracja tłuszczowa		
	β -laktoglobulina (g/l)	α -laktoalbumina (g/l)	laktoferyna (mg/l)	witamina A (mg/l)	witamina D ₃ (µg/l)	witamina E (mg/l)
Jesienno-zimowy	0,65 ^A \pm 0,07	0,69 ^a \pm 0,03	30,04 ^A \pm 4,15	0,352 ^A \pm 0,016	0,576 ^A \pm 0,028	1,627 ^A \pm 0,053
Wiosenno-letni	0,78 ^B \pm 0,09	0,80 ^b \pm 0,06	40,11 ^B \pm 3,27	0,436 ^B \pm 0,021	0,704 ^B \pm 0,049	1,909 ^B \pm 0,087

a, b – różnice istotne przy $p \leq 0,05$; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$

Produkty wytworzone z surowca pozyskanego w okresie wiosenno-letnim zawierały 0,436 mg/l witaminy A, 0,704 µg/l witaminy D₃ i 1,909 mg/l witaminy E (tabela 2). Największe różnice sezonowe uzyskano dla zawartości witaminy A (24%), a najmniejsze – E (17%). Herrero-Barbudo i in. [2005] podali, że pełno tłuszczowe jogurty (3,1% tłuszczu) zawierały 1,09 µmol/l retinolu (witaminy A) oraz 1,56 µmol/l α-tokoferolu (witaminy E). Jak podaje Molska [1994], witaminy są bardziej odporne na działanie wysokich temperatur stosowanych podczas obróbki cieplnej. MacDonald i in. [2011] dokonali meta-analizy dotyczącej wpływu pasteryzacji na zawartość witamin w mleku, wskazując na niewielkie różnice.

Odzwierciedleniem jakości żywności są cechy organoleptyczne. Jogurty z sezonu jesienno-zimowego uzyskały niższe noty za barwę, konsystencję, smak i zapach. Potwierdzenie stanowi ocena ogólna wynosząca 4,3 pkt (na 5 pkt max). Jogurty wyprodukowane w okresie wiosenno-letnim uzyskały 4,7 pkt za ocenę ogólną. Ich barwa została oceniona na 5 pkt, konsystencja – 4,5 pkt, smak – 4,4 pkt, a zapach 4,3 pkt. Rój i Przybyłowski [2012] wykazali, że zawartość tłuszczu była wysoce istotnie skorelowana ze smakiem, zapachem, konsystencją, barwą, wyglądem oraz stopniem synerezy jogurtu. Im więcej tłuszczu, tym produkty były bardziej preferowane przez oceniających. Natomiast Domagała i Wszółek [2008] stwierdzili, że jogurt uzyskany przy użyciu szczepionki YC-180 charakteryzował się bardziej pożądaną teksturą i ogólną jakością sensoryczną w porównaniu do produktów wytworzonych przy użyciu innych kultur bakteryjnych.

Tabela 3. Cechy organoleptyczne analizowanych jogurtów (pkt/max 5 pkt) z uwzględnieniem sezonu produkcji (średnia±SD)

Sezon produkcji	Ocena ogólna	Barwa	Konsystencja	Smak	Zapach
Jesienno-zimowy	4,3 ^a ±0,3	4,7±0,2	4,2±0,3	4,0±0,1	3,9 ^a ±0,5
Wiosenno-letni	4,7 ^b ±0,4	5,0±0,0	4,5±0,1	4,4±0,3	4,3 ^b ±0,4

a, b – różnice istotne przy p≤0,05

Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wytwarzania jogurtów w gospodarstwach – przydomowych przetwórnich, w tym ekologicznych, stanowiących cenne źródło składników odżywczych. Wiosenno-letni sezon produkcji sprzyja pozyskaniu i przetwarzaniu surowca charakteryzującego się wysoką

zawartością składników biologicznie czynnych, co bezpośrednio wpływa na status bioaktywny produktów.

Badania wykonano w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

Literatura

1. Baranowska M., Bohdziewicz K., Staniewski B., Sygidus M. (2011). Mleczne napoje fermentowane – preferencje konsumentów. *Przegląd Mleczarski*, 10, 37–43.
2. Bonczar G., Walczycka M., Duda I. (2016). The changes of proteins fractions shares in milk and fermented milk drinks. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15, 379–389.
3. Brodziak A., Barłowska J., Król J., Litwińczuk Z. (2012). Effect of breed and feeding system on content of selected whey proteins in cow's milk in spring-summer and autumn-winter seasons. *Annals of Animal Science*, 12, 261–269.
4. Brodziak A., Król J. (2016). Mleczne napoje fermentowane właściwości prozdrowotne. *Przemysł Spożywczy*, 10, 22–28.
5. Brodziak A., Król J., Litwińczuk Z., Barłowska J. (2018). Differences in bioactive protein and vitamin status of milk from certified organic and conventional farms. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 321–332.
6. Cichosz G. (2007). Prozdrowotne właściwości tłuszczu mlekowego. *Przegląd Mleczarski*, 5, 4–8.
7. *Codex Alimentarius* (2011). Milk and Milk Products. Codex standard for fermented milk. FAO/WHO, 6-16.
8. Domagała J., Wszolek M. (2008). Wpływ sposobu zagęszczania oraz rodzaju szczepionki na teksturę i podatność na synerezę jogurtu i biojogurtów z mleka koziego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 61(6), 118–126.
9. Glibowski P., Rybak P. (2016). Rheological and sensory properties of stirred yoghurt with inulin-type fructans. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 122–128.
10. Grębowiec M., Korytkowska A. (2017). Zachowania konsumenckie na rynku wyrobów mleczarskich. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, XIX(4), 79–85.
11. Herrero-Barbudo M.C., Granado-Lorencio F., Blanco-Navarro I., Olmedilla-Alonso B. (2005). Retinol, α - and γ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A- and E-fortified dairy products commercialized in Spain. *International Dairy Journal*, 15, 521–526.
12. Hewavitharana A.K., van Brakel A.S., Harnett M. (1996). Simultaneous liquid chromatographic determination of vitamins A, E and beta-carotene in common dairy foods. *International Dairy Journal*, 6, 613–624.
13. IERiGŻ-PIB (2018). Analizy rynkowe. Rynek mleka – stan i perspektywy, maj 2018.
14. Kowalczyk I., Szymański A. (2017). Innowacyjność konsumentów na rynku jogurtów. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Katowicach*, 328, 138–146.
15. Król J., Brodziak A., Litwińczuk Z., Szwałkowska M. (2011). Wykorzystanie białek serwatkowych w promocji zdrowia. *Żywność Człowieka i Metabolizm*, XXXVIII(1), 36–45.
16. Królczak B.J., Dawidziuk T., Janiszewska-Turak E., Sołowiej B. (2016). Use of whey and whey preparations in the food industry – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(3), 157–166.
17. MacDonald L.E., Brett J., Kelton D., Majowicz S.E., Snedeker K., Sargeant J.M. (2011). A systematic review and meta-analysis of the effects of pasteurization on milk vitamins, and evidence for raw milk consumption and other health-related outcomes. *Journal of Food Protection*, 74, 1814–1832.
18. Molska I. (1994). Wpływ procesu produkcji i przechowywania mleka spożywczego na witaminy. *Przegląd Mleczarski*, 9, 224–227.

19. Piekut M. (2018). Czynniki różnicujące spożycie jogurtów i mlek fermentowanych w polskich gospodarstwach domowych. *Przegląd Mleczarski*, 4, 10–14.
20. PN-A-86061:2002. Mleko i przetwory mleczne. Mleko fermentowane.
21. PN-EN ISO 8968-1:2004. Mleko. Oznaczanie zawartości azotu. Część 1: Metoda Kjeldahla.
22. Romero C., Perez-Andujar O., Jimenes S. (1996). Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia*, 42, 181–184.
23. Rój A., Przybyłowski P. (2012). Ocena barwy jogurtów naturalnych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 45(3), 813–816.
24. Ruprichová L., Králová M., Borkovcová I., Vorlová L., Bedáňová I. (2014). Determination of whey proteins in different types of milk. *Acta Veterinaria Brno*, 83, 67–72.
25. Sajdakowska M., Grasewicz J. (2016). Wybrane walory zdrowotne jogurtów w opinii konsumentów. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego Ekonomia i Organizacja Gospodarki Żywnościowej*, 114, 121–130.
26. Sakkas L., Moutafi A., Moschopoulou E., Moatsou G. (2014). Assessment of heat treatment of various types of milk. *Food Chemistry*, 159, 293–301.
27. Siemianowski K., Szpendowski J. (2011). Właściwości biologiczne α -laktoalbuminy. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 1, 103–106.
28. Wichrowska D., Wojdyła T. (2014). Ocena sensoryczna i fizykochemiczna wybranych jogurtów naturalnych i ekologicznych. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 53(6), 421–423.
29. Zaborska A., Król J., Brodziak A. (2015a). Witamina A – funkcje i znaczenie dla człowieka. *Przemysł Spożywczy*, 69(7), 36–38.
30. Zaborska A., Król J., Brodziak A. (2015b). Witamina E – funkcje i znaczenie dla człowieka. *Przemysł Spożywczy*, 69(12), 28–31.
31. Ziarno M., Zaręba D. (2014a). Jogurty i ich konsumenci. *Przegląd Mleczarski*, 10, 39–46.
32. Ziarno M., Zaręba D. (2014b). Oczekiwania konsumentów produktów mleczarskich. *Przegląd Mleczarski*, 9, 40–47.

JANUSZ KILAR¹, MARIA RUDA², MAGDALENA KILAR¹, KINGA GRZYCH³¹Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. S. Pigonia w Krośnie, Instytut Zdrowia i Gospodarki²Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza, emerytowany profesor³Studenckie Koło Naukowe Ekonomistów, Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. S. Pigonia w Krośnie

DZICZYNA. SZANSE I BARIERY ZWIĘKSZENIA SPOŻYCIA

Wstęp

Włączenie mięsa do jadłospisu człowieka zbiega się z mającymi miejsce około 3,5-3,0 mln lat temu zmianami klimatu, ograniczającymi zasoby roślinne – dotychczas podstawowy pokarm praczłowieka [Zaraska, 2016]. Bogactwo odżywcze nowej diety uwarunkowało ewolucję, a zwłaszcza zintensyfikowało rozwój mózgu człowieka, umożliwiając tym samym jego rozwój społeczny i intelektualny [Milton, 1999]. Mięso dla człowieka to cenne i trudne do zastąpienia źródło wielu składników pokarmowych. Zapewnia ono dostarczenie wysokowartościowego białka o bardzo dobrze zbilansowanym składzie aminokwasowym, ze szczególnym uwzględnieniem leucyny, lizyny, metioniny, treoniny i tryptofanu. Zawiera dużo dobrze przyswajalnego żelaza, cynku, selenu oraz szereg witamin – głównie z grupy B [Zhang i in., 2010; Foldra i Reig, 2011; Binnie i in., 2014]. Przytoczone przez de Castro Carolo Pereira i dos Reis Baltazar Vincente [2013] wyniki badań wielu autorów potwierdzają obecność w mięsie związków o specyficznych właściwościach prozdrowotnych: kwasu linolowego (CLA), karnozyny, anseryny, α -karnityny, glutationu, tauryny, kreatyny, koenzymu Q. Do bioaktywnych substancji będących naturalnymi komponentami mięsa zaliczane są także: cholina, kwas liponowy czy kwas orotowy. Dzięki obecności cennych substancji prozdrowotnych mięso jest traktowane jako żywność funkcjonalna [Decker i Park, 2010; Olmellinda-Alonso, 2013; Jiménez-Colmenero i in., 2001; Zhang i in., 2010]. Jednak ten ważny produkt żywnościowy dzisiaj budzi najwięcej kontrowersji co do roli i znaczenia w diecie człowieka [McNeill i in., 2017; De Smect i Vossen, 2016; Mc Neill, 2014; Klurfeld, 2015; Forestell i in., 2012; Ferguson, 2010], przy odmiennym postrzeganiu w różnych regionach świata [Mathijs, 2015]. Naukowa wiedza i systematyczne dyskusje choćby pod tak znaczącym tytułem „Think meat – think healthy” (myślisz mięso – myśl zdrowie) [Międzynarodowy Kongres Nauki o Mięsie i Technologii, Francja 2015] kierują uwagę konsumentów na mięso ze zwierząt łownych [Lecocq, 1997; Poławska i in., 2013; Cawthorn i Hoffman, 2014; Mc Neill i in., 2017; Hoffman i Cawthorn, 2013]. Wykorzystując wyniki wieloaspektowych badań, dane statystyczne oraz informacje o działaniach edukacyjnych i promocyjnych podjęto próbę pokazania możliwości zwiększenia spożycia dziczyzny w naszym kraju.

Mięso zwierząt łownych

Mięso zwierząt dzikich ma najdłuższą historię w żywieniu człowieka. Początkowo było to mięso z mamutów, hipopotamów, nosorożców, niedźwiedzi, reniferów, później koni, żubrów, jeleni, saren, dzików, turów, łosi i różnego ptactwa. W Polsce aż po XX wiek dziczyzna była podstawą kuchni mięsnej, przy czym z troski o ochronę zwierząt zmniejszono jej ofertę gatunkową [Krupka, 1989; Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 marca 2005r].

Naturalność i skład chemiczny mięsa zwierząt łownych sprawia, że jest to produkt najbardziej odpowiadający zapotrzebowaniom biologicznym człowieka [Hoffman i Cawthorn, 2013; Kudrnáčová i in., 2018; Polak i in., 2008]. Mięso jest chude, o czerwonej barwie, bardziej spoiste i soczyste lecz wymaga dłuższego dojrzewania. Bogactwo żerowiska sprawia że mięso zwierząt dzikich zawiera wiele substancji biologicznie czynnych, a przede wszystkim charakteryzuje się specyficznym aromatem i smakiem dziczyzny (ang. gamey flavour) [Neethling i in., 2016]. Każdy gatunek zwierząt łownych jednak zachowuje pewną odrębność cech tuszy i szeroko pojętej jakości mięsa. Według badań wydajność rzeźna dzika waha się od 59,76 do 76,63% [Korzeniowski i in., 1991; Sales i Kotrba, 2013], u sarny wynosi 60,00 - 65,98% [Flis, 2015], a u jeleni od 52,00 do 60,10% [Drozd i in., 1996]. Wydajność rzeźna zająca waha się od 53,80 do 70,00% [Dzierżyńska-Cybulko i Fruziński, 1997], bażanta od 71,90 do 73,50% [Łukaszewicz i in., 2011] a kuropatwy wynosi około 72% [Kokoszyński i in., 2013]. Mięso dzika jest jędrne, soczyste i zawiera od 20,88 do 24,19% białka ogólnego, 1,63 - 3,45% tłuszczu oraz od 55,00 do 90,00 mg/100g cholesterolu, zaś stosunek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) n-6/n-3 wynosi od 3,69 do 4,47 [Batorska i in., 2016; Strazdina, 2014]. Mięso sarny wyróżnia się bardzo niską zawartością tłuszczu (0,48-1,63%) i cholesterolu (62,37 mg/100 g) [Dominik i in., 2013; Strazdina, 2014]. Mięso jeleni karpackich zawiera od 20,70 do 24,47% białka, przy sumie aminokwasów egzogennych od 61,56 do 71,54 g/100 g białka oraz od 0,38 do 4,10% tłuszczu i od 52 do 62 mg/100 g cholesterolu. Również w mięsie danieli z Beskidu Niskiego jest dużo aminokwasów egzogennych (55,54-73,55 g/100 g białka) i mięso to cechuje wysoki dochodzący nawet do 23,26 wskaźnik jakości żywieniowej (Index Nutritional Quality – INQ) żelaza [Kilar, 2018]. Z badań Biesiady-Drzyzgi i in. [2011] wynika, że w mięsie bażanta znajduje się od 23,30 do 25,09% białka ogólnego i od 0,84 do 1,76% tłuszczu. Kotowicz i in. [2012] podają, że w tłuszczu mięsa bażantów jest od 29,7 do 39,5% kwasów nasyconych SFA, od 30,4 do 51,6% kwasów jednonienasyconych MUFA i od 17,9 do 30,3% kwasów PUFA. Murawska i in. [2013] w tkance mięśniowej kaczki krzyżówki stwierdzili stosunkowo wysoki, wynoszący blisko 24% poziom białka, przy niskiej (0,8%) zawartości tłuszczu. Tłuszcz charakteryzował się korzystnym

profilem kwasów tłuszczowych, gdzie SFA stanowiły 39,1%, MUFA 17,3%, a PUFA 43,6%. Mięso z zająca jest chude (tłuszcz od 0,54 do 1,93%), delikatne i bardzo kruche, w którym notuje się szeroki zakres zawartości białka (21,09 - 27,54%) [Škrivanko i in., 2008]. Według Drozda i in. [2015] w tłuszczu mięsa zająca jest 14,50% kwasów MUFA i 45,50% kwasów PUFA, a stosunek PUFA n-6/n-3 wynosi 1,78. W obrębie mięsa z jeleniowatych najbardziej atrakcyjne pod względem smaku i zapachu jest mięso sarny [Daszkiewicz i in., 2012], a mięso z jeleni uzyskuje najwyższe oceny za kruchość i soczystość [Kwiatkowska i in., 2009]. Z badań Żochowskiej-Kujawskiej [2017] wynika, że najbardziej akceptowanym przez konsumentów wyrobem spośród dojrzewających wędzonek z daniela, dzika, jelenia i sarny jest wędzonka z dzika.

Zasoby i infrastruktura pozyskiwania i przetwarzania dziczyzny

Stan ilościowy zwierzyny łownej w Polsce w latach 2000-2017 zestawiono w tabeli 1. W tym okresie nastąpił znaczący wzrost liczby: jeleni, saren, muflonów, danieli, zajęcy i bażantów. Od 2014 roku notuje się spadek populacji dzików, co wiąże się z pojawieniem afrykańskiego pomoru świń w naszym kraju. W 2017 roku zinwentaryzowano też o 53600 sztuk mniej kuropatw w porównaniu ze stanem w 2000 roku. Warto zwrócić uwagę, że w marcu 2017 roku najliczniejszą grupę zwierząt łownych stanowiły sarny (945600 szt.), zające (789600 szt.) i bażanty (544000 szt.).

Tabela 1. Stan ilościowy zwierzyny łownej w Polsce w wybranych latach* (szt.)

Rok	Zwierzęta łowne							
	dziki	jelenie	sarny	muflony	daniele	zające	bażanty	kuropatwy
2000	118300	117500	597100	1725	9050	551400	263700	345600
2006	177100	147400	706500	1935	14966	506900	361000	366900
2007	178600	154200	705800	1811	15423	515800	367600	374000
2008	211800	163600	760200	2065	17830	531800	412700	408200
2009	251000	176100	827500	2595	20667	562400	462000	442300
2010	249900	180200	822000	2811	23319	558700	462900	388400
2011	267800	194700	829900	2772	26517	596700	458500	330300
2012	255800	203000	829000	2766	27225	601700	457000	292200
2013	282200	217200	875900	2748	28198	649500	483800	290400
2014	284600	217900	873500	2958	28107	574500	480800	282400
2015	264000	213500	867000	2904	17524	708800	520300	283600
2016	249600	218300	887100	3004	28282	751800	525200	276700
2017	214800	285600	945600	3345	29048	789600	544000	292000

* stan w dniu 10 III danego roku

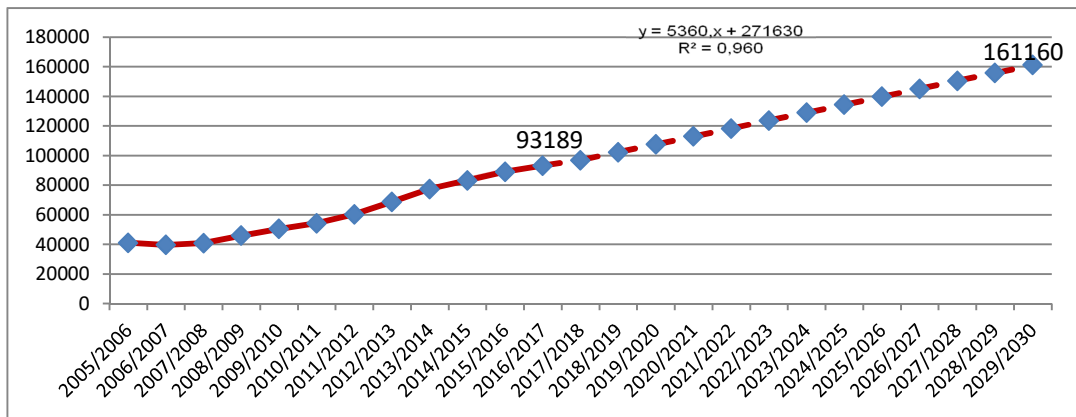
Źródło: Leśnictwo. GUS, Warszawa

Ilość pozyskiwanego surowca wyznacza wielkość odstrzałów zwierząt łownych. Dane zebrane w tabeli 2 wskazują, że w przedziale czasowym 2005/2006 – 2016/2017 ponad dwukrotnie wzrosła liczba odstrzelonych dzików, jeleni i muflonów, a prawie trzykrotnie danieli. Wzrasta też liczba odstrzelonych saren i bażantów, jednak nieco wolniej. Natomiast zdecydowanie ograniczono odstrzał zajęcy i kuropatw i w mniejszym stopniu kaczek. Z określonych prognoz pozyskiwania surowca wynika, że w roku łowieckim 2029/2030 odstrzał jeleni może przekroczyć 161 tys. szt. (wykres 1), a saren 287 tys. szt. (wykres 2). Pewien zasób surowca stanowią też hodowle fermowe jeleniowatych, których liczba systematycznie rośnie (rysunek 1). Szacuje się, że tego typu fermy utrzymują około 35000 zwierząt, najczęściej są to danieli. W tabeli 3 przedstawiono wielkość i strukturę skupu zwierzyny łownej w latach 2006-2016. Mimo odnotowanych spadków w 2009 i 2013 roku nastąpił wyraźny wzrost skupu dziczyzny (z 6536 ton w 2006 roku do 13250 ton w 2016 roku) dziczyzny. W strukturze skupu przeważają tusze jeleni i dzików. Poziom prezentowanej w tabeli 4 infrastruktury pozyskiwania i przetwórstwa dziczyzny należy określić jako dobry.

Tabela 2. Odstrzał zwierząt łownych stanowiących źródło mięsa w Polsce w wybranych łowieckich latach gospodarczych 2005/2006 – 2016/2017 (szt.)

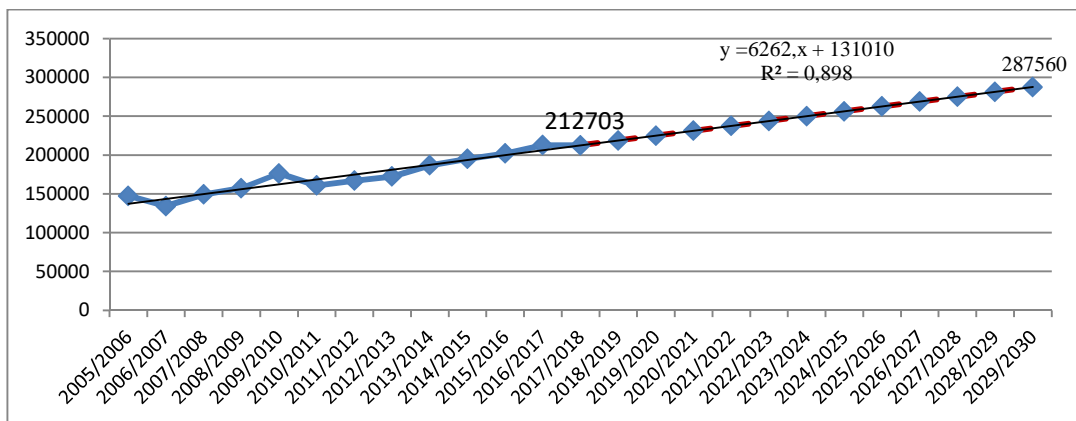
Łowieckie lata gospodarcze	Zwierzęta łowne								
	dziki	jelenie	sarny	danieli	muflony	zające	bażanty	kuropatwy	kaczki
2005/2006	137606	41045	147331	3289	319	30096	102499	17570	101888
2006/2007	117732	39651	134243	3496	187	15792	96200	12805	103732
2007/2008	149279	40825	149279	3635	184	23019	112756	13957	108331
2008/2009	226007	45891	157295	4305	243	17868	146657	14993	108516
2009/2010	217941	50513	176196	5132	336	19165	111132	11958	104896
2010/2011	232688	54292	160678	6385	438	17824	104165	3135	100388
2011/2012	195657	60307	166889	7042	442	9865	112964	1774	100627
2012/2013	239907	68704	172249	7327	484	17928	116893	1749	108471
2013/2014	241904	77332	186667	8366	455	13195	114601	2103	109705
2014/2015	291450	83262	195045	8616	518	15276	129142	2539	105859
2015/2016	340945	89054	202069	9302	566	15237	128470	2694	95832
2016/2017	310425	93189	212703	9624	678	17292	114492	2911	88132

Źródło: Leśnictwo. GUS Warszawa



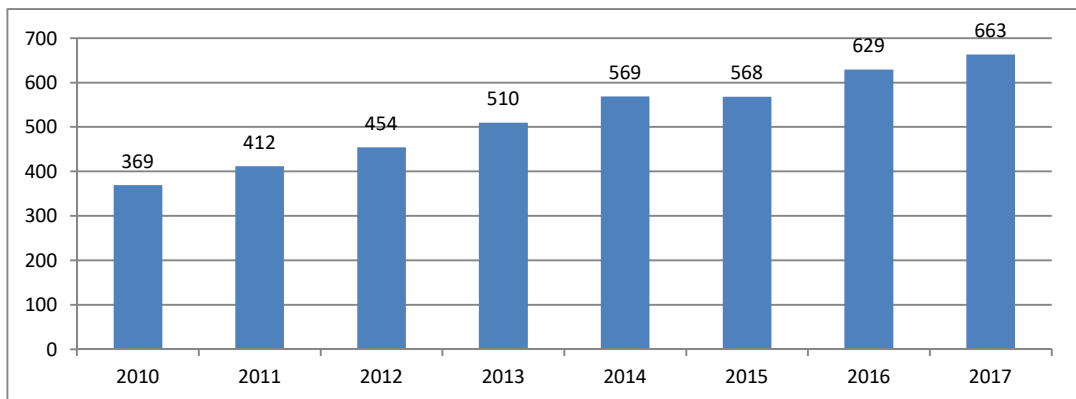
Wykres 1. Prognoza pozyskiwania surowca jeleniego w Polsce do 2030 roku

Źródło: Opracowanie własne



Wykres 2. Prognoza pozyskiwania surowca sarniego w Polsce do 2030 roku

Źródło: Opracowanie własne



Rysunek 1. Liczba hodowli fermowych jeleniowatych w Polsce w latach 2010-2017

Źródło: Weterynaryjna Sprawozdawczość Statystyczna. GIW Warszawa

Tabela 3. Skup zwierzyny łownej w Polsce w latach 2006-2016

Zwierzyna łowna		Lata										
		2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
dziki	tony	2096	3393	3964	2298	3636	3485	3660	2450	3363	5096	4958
	%	32,07	39,24	41,66	32,12	40,44	37,61	36,94	26,15	31,06	40,16	37,42
jelenie	tony	2608	3067	3307	3015	3420	3814	4097	4674	5022	5223	5199
	%	39,90	35,47	34,75	42,14	38,05	41,16	41,35	49,89	46,38	41,16	39,24
sarny	tony	1810	2157	2227	1812	1907	1945	2118	2189	2391	2296	2464
	%	27,69	24,94	23,40	25,32	18,59	20,98	21,38	23,37	22,08	18,06	18,59
pozostała	tony	22	30	18	29	25	23	32	55	51	74	629
	%	0,34	0,35	0,19	0,42	0,29	0,25	0,33	0,59	0,48	0,62	4,75
Ogółem	tony	6536	8647	9516	7154	8988	9267	9907	9368	10827	12689	13250

Źródło: Leśnictwo. GUS, Warszawa

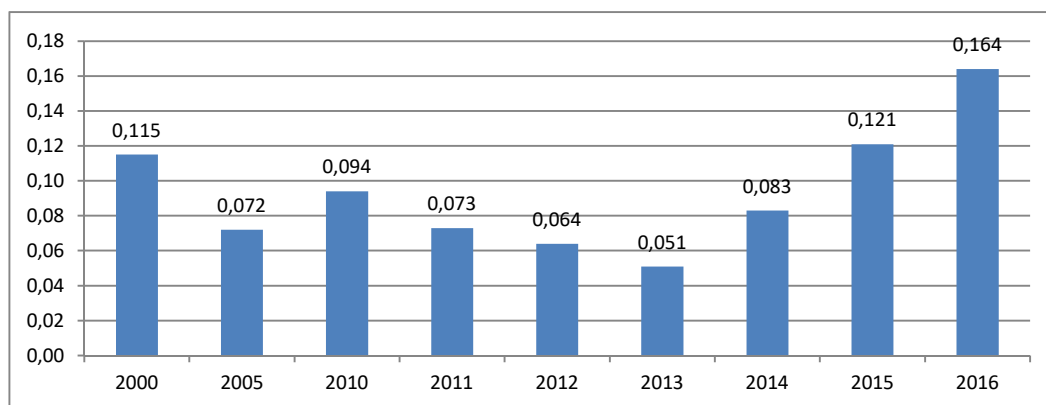
Tabela 4. Infrastruktura pozyskiwania i przetwórstwa dziczyzny w Polsce

Lp.	Wyszczególnienie	Liczba jednostek
1	Koła łowieckie	2076
2	Punkty skupu dziczyzny	1520
3	Zakłady obróbki dziczyzny	28
4	Zakłady przetwórstwa dziczyzny	81
5	Zakłady mięsa jeleniowatych fermowych	10
6	Chłodnie składowe	34

Źródło: Główny Inspektorat Weterynarii. Stan na 31.03.2018 r.

Konsumenci wobec dziczyzny

W 2016 roku statystyczny Polak spożył 73,4 kg mięsa, najwięcej wieprzowiny – 40,8 kg i mięsa drobiowego - 29,2 kg, a ponadto 2,1 kg wołowiny oraz 1,3 kg innych mięs jak: królicze, dziczyzna, jagnięcina/baranina, koźlecina i konina [Mały Rocznik Statystyczny Polski, 2017]. Szacunkowy wskaźnik spożycia dziczyzny w naszym kraju jest niewielki. Z rysunku 2 wynika, że w przedziale lat 2000-2016 wahał się od 0,051 kg (rok 2013) do 0,164 kg (rok 2016), z tendencją systematycznego wzrostu od 2013 roku.



Rysunek 2. Szacunkowy wskaźnik spożycia dziczyzny w Polsce w latach 2000 - 2016 (kg/osobę)

Źródło: Mały Rocznik Statystyczny Polski. GUS Warszawa

Wyniki badań ankietowych pokazują, że wskaźnik konsumujących dziczyznę jest bardzo zróżnicowany i zależy od wielu czynników. Z badań Balika [2010] wynika, że dziczyznę konsumowało tylko 21,2% respondentów. Przy czym jedzenie dziczyzny miało statystycznie istotny związek z płcią, wykształceniem, wiekiem, miejscem zamieszkania, grupą społeczno-zawodową, portretem psychograficznym i znajomością z myśliwym, a nie zależało od dochodu. Kilar i in. [2016b] stwierdzili, że dziczyznę co najmniej kilka razy w roku konsumowało tylko 32,8% ogółu badanych mieszkańców Podkarpacia. W 2012 roku wskaźnik polskich respondentów deklarujących spożywanie dziczyzny wynosił od 25,6% [Kwiecińska i in., 2016] do 54,89% [Nagalska i Rejman, 2014]. Kolejne badania Kwiecińskiej i in. [2017] podają, że w 2015 roku wskaźnik spożywających dziczyznę był już na poziomie 49,4%. Warto nadmienić, że wśród badanych mieszkańców Holandii dziczyznę spożywało 52% [Schlup i in., 2014], a wśród Chorwatów aż 92% [Tolušić i in., 2016]. Odnotowana w badaniach [Kilar i in., 2016b; Kwiecińska i in., 2016; Nagalska i Rejman, 2014; Opalińska i in., 2017] częstość spożywania dziczyzny pokazuje, że mięso to pojawia się na talerzu Polaków rzadko, zwykle przy wyjątkowo uroczystych okazjach. Przytoczone badania polskich autorów są zgodne, co do faktu, że najważniejsze powody spożywania dziczyzny stanowią wysoka wartość odżywcza i walory prozdrowotne oraz unikatowy bukiet smakowy. Z kolei do najpoważniejszych barier konsumpcji dziczyzny respondenci zaliczają wysoką cenę (61,85-63,00%), małą dostępność (44,10-63,30%) oraz brak tradycji spożywania i nieumiejętność przyrządzania (56,00-66,47%) [Kilar i in., 2016b; Kwiecińska i in., 2016; Opalińska i in., 2017; Nagalska i Rejman, 2014]. Na tle zaprezentowanych zachowań i postaw ankietowanych wobec dziczyzny, ciekawe wydają się też wskazane działania, które mogą się przyczynić do zwiększenia spożycia tego mięsa. Według

myśliwych, przetwórców i handlowców są to: promocja (63,00% wskazań), zmiana relacji cen skupu i sprzedaży (27,00%), edukacja (27,00%), wsparcie ze strony państwa (24,00%) oraz rozwój przedsiębiorstwa (11,00%) [Kwiecińska i in., 2016]. Również zdaniem konsumentów największe znaczenie w tym względzie może mieć promocja (54,14%), edukacja (18,82-31,95%) i rozwój przetwórci (16,59%) [Kilar i in., 2016b].

Działania edukacyjne i promocyjne

Ważna rola dziczyzny w profilaktyce zdrowotnej człowieka [Cordain i in., 2002; Saluk-Juszczak i in., 2010; Kilar i in., 2016a; Valencak i in., 2015], potwierdzony naukowo niski wskaźnik spożywających to mięso [Balik, 2010; Kilar i in., 2016b; Opalińska i in., 2017] oraz zróżnicowany o nim poziom wiedzy [Kilar i in., 2016b; Kwiecińska i in., 2015; Nagalska i Rejman, 2014] stanowią mocne argumenty do działań edukacyjnych i promocyjnych. W ostatnich latach daje się zauważyć dużą aktywność w tym zakresie Polskiego Związku Łowieckiego oraz Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe. Wśród różnych działań warto odnotować konferencję zorganizowaną przez Senacką Komisję Środowiska 30 maja 2017 roku „Gospodarka łowiecka jako element ochrony środowiska przyrodniczego i zrównoważonego rozwoju” oraz konferencję naukową „Żywność darem dla życia i zdrowia – w świetle zagrożeń GMO”, która miała miejsce 9 września 2017 roku w Warszawie. Polski Związek Łowiecki popularyzuje dziczyznę pod hasłem „Dziczyzna z polskich lasów na polskie stoły”. Z kolei Lasy Państwowe podjęły się realizacji w latach 2017-2019 projektu pt. „Zdrowa Żywność z Polskich Lasów”, który ma na celu promocję i poprawę dostępności dziczyzny. W ramach projektu zostanie utworzona sieć firmowych sklepów „Dobre z lasu”.

Podsumowanie

Dziczyznę stanowi mięso z różnych gatunków ssaków i ptaków łownych. Jest to mięso kulinarne i przetwórcze, charakteryzujące się bogactwem i wysoką zawartością substancji prozdrowotnych oraz unikatową atrakcyjnością sensoryczną pod względem smaku, zapachu i barwy. Po stronie zwiększenia spożycia dziczyzny w Polsce należy odnotować: walory prozdrowotne mięsa, duże zasoby zwierzyny łownej, wzrost pozyskania zwierzyny grubej oraz rozbudowę infrastruktury pozyskiwania i przetwarzania surowca. Obraz szans uzupełniają podejmowane działania edukacyjne i promocyjne oraz wzrastające od 2013 roku szacunkowe spożycie dziczyzny na jednego mieszkańca. Z kolei najpoważniejszymi barierami wzrostu spożycia dziczyzny pozostają: wciąż wysoka cena, mała dostępność i brak tradycji spożywania.

Literatura

1. Balik B. (2010). Społeczny odbiór łowiectwa. Praca doktorska. SGGW w Warszawie.
2. Batorska M., Więcek J., Kunowska-Słószarz M., Puppel K., Balcerak M., Słószarz J., Gołębiowski M., Budziński A., Kuczyńska B., Rekiel A., Popczyk B. (2016). Effect of sex on the quality of European wildboar (*Sus scrofa scrofa*). *Animal Science*, 55(1), 5-11.
3. Biesiada-Drzazga B., Socha S., Janocha A., Banaszkiewicz T., Koncerewicz A. (2011). Ocena wartości rzeźnej i jakości mięsa bażantów łownych (*Phasianus colchicus*). *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 1(74), 79-86.
4. Binnie M.A., Barlow K., Johanson V., Harrison C. (2014). Red meats: Time for a paradigm shift in dietary advice. *Meat Science*, 98, 445-491.
5. Cawthorn D.M., Hoffman L. (2014). The role of traditional and non-traditional meat animals in feeding a growing and evolving world. *Animal Frontiers*, 4(4), 6-12.
6. Cordain L., Watkins B.A., Florant G.L., Kelher M., Rogers L., Li Y. (2002). Fatty acid analysis of wild ruminant tissues: evolutionary implications for reducing diet-related chronic disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(3), 181-191.
7. Daszkiewicz T., Kubiak D., Winiarski R., Koba-Kowalczyk M. (2012). The effect of gender on the quality of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) meat. *Small Ruminant Research*, 103(2-3), s.169-175
8. de Castro Cardoso Pereira P.M., dos Reis Baltazar Vincente A.F. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586-592.
9. de Smet S., Vossen E. (2016). Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat Science*, 120, 145-156.
10. Decker E.A., Park Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat Science*, 86(1), 49-55.
11. Dominik P., Saláková A., Buchtová H., Steinhauser L. (2013). Quality indicators of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) venison from two different Czech regions. *Acta Veterinaria Brno*, 82(2), 75-180.
12. Ferguson L.R. (2010). Meat and cancer. *Meat Science*, 84(2), 308-313.
13. Flis M. (2015). Zmienność jakości osobniczej i wskaźników wydajności saren na Wyżynie Lubelskiej. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 11(4), 53-63.
14. Foldra F., Reig M. (2011). Innovations for healthier processed meats. *Trends in Food Science and Technology*, 22(9), 517-522.
15. Hoffman L.C., Cawthorn D. (2013). Exotic protein sources to meet all needs. *Meat Science*, 95, 764-771
16. Jiménez-Colmenero F., Carballo J., Cofrades S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59(1), 5-13.
17. Kilar J. (2018). Dzikizna w jadłospisie człowieka – walory technologiczne, kulinarne i prozdrowotne. Materiały Konferencyjne „Nowoczesna produkcja świń i stojące przed nią wyzwania. Ustroń, 24-28.
18. Kilar J., Ruda M., Kilar M. (2016a). Wskaźnik jakości żywieniowej INQ mięsa jeleniowatych. XII Konferencja Naukowa Żywność XXI wieku „Żywność a innowacje”, Kraków, s.23.
19. Kilar J., Ruda M., Kilar M. (2016b). Dzikizna. Co o niej wiedzą i czy ją jedzą mieszkańcy Podkarpacia. Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. S. Pigonia w Krośnie.
20. Klurfeld D.M. (2015). Research gaps in evaluating the relationship of meat and health. *Meat Science*, 109, s. 86-95.
21. Kokoszyński D., Bernacki Z., Korytkowska H., Wilkanowska A., Frieske A. (2013). Carcas composition and meat quality of grey partridge (*Perdix perdix* L.). *Journal of Central European Agriculture*, 14(1), 378-387.
22. Korzeniowski W., Bojarska U., Cierach M. (1991). Wartość rzeźna dzika. *Medycyna Weterynaryjna*, 47(4), 166-169.
23. Kotowicz M., Lachowicz K., Lisiecki S., Szczygielski M., Żych A. (2012). Characteristics of common pheasant (*Phasianus colchicus*) meat. *Arch. Geflügelk*, 76 (4), 270- 276.
24. Kudrnáčová E., Bartoň L., Bureša D., Hoffman L.C. (2018). Carcass and meat characteristics from farm-raised and wild fallow deer (*Dama dama*) and red deer (*Cervus elaphus*): A review. *Meat Sciences*, 141, 9-27.

25. Kwiatkowska A., Żmijewski T., Cierach M. (2009a). Utility value of carcass of European deer (*Cervus elaphus*) and its meat evaluation. Polish. Journal of Food and Nutrition Sciences, 59(2), 151-156.
26. Kwiecińska K., Kosicka-Gębska M., Gębski J., Gutkowska K. (2017). Prediction of the conditions for the consumption of game by Polish consumers. Meat Sciences, 131, 28-33.
27. Kwiecińska K., Kosicka-Gębska M., Gębski J. (2016). Ocena preferencji konsumentów związanych z wyborem dziczyzny. Handel Wewnętrzny, 1, 53-64.
28. Lecocq Y. (1997). A European perspective on wild game meat and public health. Revue Scientifique et Technique, 16(2), 579-585.
29. Leśnictwo GUS, Warszawa
30. Mały Rocznik Statystyczny Polski, GUS, Warszawa.
31. Mathijs E. (2015). Exploring future patterns of meat consumption. Meat Science, 109, 112-116.
32. McNeill S.H. (2014). Inclusion of red meat in healthful dietary patterns. Meat Science, 98, 452-460.
33. McNeill S.H., Belk K.E., Campbell W.W., Gifford C.L. (2018). Coming to terms: meat's role in a healthful diet. Animal Frontiers, 7(4), 34-42.
34. Milton K. (1999). A hypothesis to explain the role of meat eating in human evolution. Wolutionary Anthropology: News and Review, 8, 1, 11-21.
35. Murawska D., Zawacka M., Janiszewski P., Hanzal V., Michalik D. (2013). Charakterystyka kaczki krzyżówki (*Anas platyrhynchos* L.) w aspekcie jej wykorzystania konsumpcyjnego. [w:] Produkcja zwierzęca w warunkach zrównoważonego rolnictwa. LXXVIII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego, s. 369.
36. Nagalska H.M., Rejman K. (2014). Wiedza konsumentów o dziczyźnie i zachowania nabywcze na rynku tego mięsa. Marketing i Rynek, 6, 488-499.
37. Neethling J., Hoffman L.C., Muller M. (2016). Factors influencing the flavour of game meat: A review. Meat Sciences, 113, 139-153.
38. Olmedilla-Alonso B., Jiménez-Colmenero F., Sánchez-Muniz F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. Meat Science, 95(4), 919-930.
39. Opalińska P., Łukowski A., Krokowska-Paluszak M., Błasiak A., Wierzbicka A., Skorupski M., Jaszczak A. (2017). Konsumpcja dziczyzny i jej wpływ na postrzeganie myślistwa – badania pilotażowe w klubach seniora. Studia i Materiały CEPL w Rogowie, R.19,50(1), 83-90.
40. Polak T., Rajar A., Gašperlin L., Zlender B. (2008). Cholesterol concentration and fatty acid profile of red deer (*Cervus elaphus*) meat. Meat Science, 80(3), 864-869.
41. Poławska E., Cooper R.G., Józwick A., Pomianowski J. (2013). Meat from alternative species – nutritive and dietetic value, and its benefit for human health – a review. CyTa – Journal of Food, 11(1), 37-42.
42. Sales J., Kotrba R. (2013). From wildboar (*Sus scrofa* L.): a review. Meat Science, 94, 187-201.
43. Saluk-Juszczak J., Kołodziejczyk J., Babicz K., Królewska K. (2010). Żywność funkcjonalna – rola nutraceutyków w profilaktyce chorób układu krążenia. Problemy Nauk Biologicznych KOSMOS, 59(3-4), 527-538.
44. Schulp J.A., Pettinga F., Meester P. (2014). Game consumption and attitudes to hunting in the Netherlands. Research in Hospitality Management, 4(182), 91-95.
45. Škrivanko M., Hadžiosmanović M., Cvrtila Ž., Zdolec N., Filipović I., Kozačinski L., Florijančić T., Bošković I. (2008). The hygiene and quality of hare meat (*Lepus europaeus* Pallas) from Eastern Croatia. Archiv für Lebensmittel Hygiene, 59, 5, 180-184.
46. Strazdina V. (2014). Biochemical evaluation of game meat in Latvia. Summary of Doctoral Thesis for the Academic Degree in Engineering and Food Science, Latvia University of Agriculture.
47. Tolušić Z., Florijančić T., Kralik I., Sesar M., Tolušić M. (2006). Game meat market in Eastern Croatia. Poljoprivreda Journal Agriculture, 12(2), 58-63.
48. Valencak T.G., Gamsjäger L., Ohrnberger S., Culbert N.J., Ruf T. (2015). Healthy n-6/n-3 fatty acid composition from five European game meat species remains after cooking. BMC Research Notes, 8, 273.
49. Zaraska M. (2016). Meathooked: The history and science of our 2.5-million-year obsession with meat. Published by Basic Books. New York.

50. Zhang W., Xiao S., Samaraweera H., Lee E.J., Ahn D.U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86(1), 15-31.
51. Zochowska-Kujawska J. (2017). Mięso zwierząt łownych jako potencjalne źródło surowca do produkcji surowych wędzonek dojrzewających. Wydawnictwo Uczelniane ZUT w Szczecinie.

KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA¹, JOANNA TRAFIAŁEK¹,
DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA¹, ZBIGNIEW DOLATOWSKI²

¹Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie

OCENA RYZYKA ZDROWOTNEGO EKOLOGICZNYCH PRODUKTÓW MIĘSNYCH WYPRODUKOWANYCH BEZ UŻYCIA AZOTANÓW III I V

Streszczenie

Celem pracy była próba opracowania metody oceny ryzyka i korzyści zdrowotnych spożycia ekologicznych produktów mięsnych surowo dojrzewających (MPE) wyprodukowanych bez użycia związków azotowych.

Zakres pracy obejmował przegląd dostępnych metod oceny ryzyka, identyfikację zagrożeń i korzyści zdrowotnych spożycia MPE oraz zaprojektowanie matrycy ryzyka i korzyści spożycia tych produktów. Materiał do badań stanowiły dostępne dane literaturowe i epidemiologiczne dotyczące spożycia MPE. Metodę oceny ryzyka i korzyści związanych z MPE opracowano zgodnie z zaleceniami EFSA, *Codex Alimentarius* i WE178/2002. Oceny ryzyka i korzyści dokonał zespół ekspertów analizy ryzyka na podstawie danych literaturowych i epidemiologicznych. Zidentyfikowano cztery grupy czynników ryzyka i cztery grupy korzyści zdrowotnych spożycia fermentowanych wyrobów mięsnych.

Opracowano wieloetapową metodę, w tym matrycę oceny ryzyka i korzyści spożycia MPE obejmującą identyfikację i charakterystykę ryzyka oraz korzyści wynikające z ich spożycia MPE dla poszczególnych grup konsumentów.

Wstęp

Ocena ryzyka i korzyści zdrowotnych jest nowym tematem badawczym w systemie zapewnienia bezpieczeństwa żywności i ochrony zdrowia publicznego [EFSA, 2010]. Szczególne miejsce w tym obszarze zajmuje ocena ryzyka i korzyści zdrowotnych spożycia mięsnych produktów ekologicznych surowo dojrzewających (MPE).

Peklowanie mięsa jest to proces utrwalania, którego celem jest nadanie charakterystycznej różowo-czerwonej barwy przetworom mięsnym, zahamowanie rozwoju niekorzystnych drobnoustrojów, nadanie typowego dla mięsa peklowanego smaku i zapachu oraz spowolnienie procesów utleniania. Kontrowersje żywieniowe, dotyczące przede wszystkim azotanu III, związane są z możliwością powstawania toksycznych dla człowieka nitrozoamin. W produkcji MPE poszukuje się

alternatywnych metod peklowania. Przykładem jest serwatka kwasowa, która stanowi ważny surowiec ze względu na zawarte w niej składniki odżywcze i działanie utrwalające [Neffe-Skocińska i in., 2016].

Celem pracy była próba opracowania metody oceny ryzyka i korzyści zdrowotnych spożycia mięsnych produktów ekologicznych surowo dojrzewających (MPE) wyprodukowanych bez użycia związków azotowych.

Materiał i metody badań

Zakres pracy obejmował przegląd dostępnych metod oceny ryzyka, identyfikację zagrożeń i korzyści zdrowotnych spożycia MPE oraz zaprojektowanie matrycy ryzyka i korzyści spożycia tych produktów.

Materiał do badań stanowiły dostępne dane literaturowe i epidemiologiczne dotyczące spożycia MPE.

Metodę oceny ryzyka i korzyści związanych z MPE opracowano zgodnie z zaleceniami EFSA, *Codex Alimentarius* i Rozporządzenia WE 178/2002. Oceny ryzyka i korzyści dokonał zespół ekspertów analizy ryzyka na podstawie danych literaturowych i epidemiologicznych.

Wyniki i dyskusja

Zgodnie z Rozporządzeniem WE 178/2002 ocena ryzyka i korzyści powinna się opierać na istniejących dowodach naukowych i być podejmowana w sposób niezależny, obiektywny i przejrzysty. Ocena taka powinna mieć charakter ilościowy, aby odnieść potencjalne zagrożenie do potencjalnych korzyści dla zdrowia człowieka. Prowadzona analiza dla produktu żywnościowego powinna zawierać ocenę ryzyka, ocenę korzyści oraz porównania obu tych czynników. Zgodnie z propozycją Komitetu Naukowego EFSA prawidłowe prowadzenie oceny ryzyka powinno składać się z identyfikacji zagrożenia, jego charakterystyki, oceny narażenia oraz oceny korzyści zdrowotnych spożycia określonej żywności [EFSA, 2010].

Opracowanie metody oceny ryzyka i korzyści zdrowotnych spożycia MPE obejmowało trzy etapy:

1. Zdefiniowanie czynników ryzyka i korzyści zdrowotnych spożycia MPE

Wybrano cztery grupy czynników ryzyka (1. aminy biogenne, 2. DDT, 3. *Listeria monocytogenes*, 4. drobnoustroje patogenne i saprofityczne;) i cztery grupy czynników korzyści (1. mniejsze zanieczyszczenie substancjami chemicznymi w MPE; 2. wyższa wartość odżywcza MPE; 3. właściwości prozdrowotne MPE; 4. wysoka jakość sensoryczna MPE).

2. Ustalenie poziomów prawdopodobieństwa i wpływu wystąpienia zdefiniowanych czynników ryzyka i korzyści zdrowotnych spożycia MPE

W opracowanej metodzie całkowite ryzyko i korzyści po spożyciu MPE wyrażono w sposób liczbowy. Każdy czynnik ryzyka i korzyści obliczano mnożąc szacunkowe wartości prawdopodobieństwa i wpływu [Luning i in., 2002].

Wzór 1:

$$R_c = P_1 \times W_1$$

gdzie, R_c - ryzyko cząstkowe jednego czynnika, P_1 - prawdopodobieństwo wystąpienia negatywnego wpływu czynnika, W_1 - wpływ czynnika na zdrowie konsumenta.

Wzór 2:

$$K_c = P_2 \times W_2$$

gdzie, K_c - korzyść cząstkowa jednego pozytywnego efektu zdrowotnego, P_2 - prawdopodobieństwo wystąpienia pozytywnego efektu zdrowotnego, W_2 - wpływ efektu zdrowotnego na zdrowie konsumenta.

Tabela 1. Poziomy prawdopodobieństwa (P_1) wystąpienia i negatywnego wpływu (W_1) czynników ryzyka na zdrowie konsumenta po spożyciu MPE

Prawdopodobieństwo (P_1)	Poziomy	Wpływ (W_1) na zdrowie konsumenta
Bardze małe	1	Mało istotny - lekkie pogorszenie zdrowia i jakości życia konsumenta
Nieznaczące	2	Zauważalny - pogorszenie się zdrowia i jakości życia
Umiarkowane	3	Istotny - wpływ nr 2 + możliwe zachorowania; leczenie w warunkach domowych, utrata czasowego komfortu życia
Duże	4	Poważny - wpływ nr 2, 3 + ciężkie zachorowania, konieczność hospitalizacji, długotrwała utrata komfortu życia, niezdolność do pracy lub normalnej aktywności życiowej konsumenta
Bardzo duże	5	Bardzo poważny - wpływ nr 2, 3, 4 + śmierć konsumenta

Źródło: opracowanie własne

Prawdopodobieństwo (P_1) w przypadku czynników ryzyka dotyczy – możliwości wystąpienia danego czynnika w MPE, a w przypadku korzyści (W_1) – możliwości wystąpienia danego pozytywnego efektu zdrowotnego, uzależnionego od częstotliwości spożycia MPE. Jego wartość szacowano na podstawie danych dostępnych w literaturze przedmiotu.

Wpływ (W_1), w przypadku czynników ryzyka, to wskaźnik informujący, jak bardzo negatywne jest oddziaływanie danego zagrożenia na zdrowie/życie konsumenta, a w przypadku korzyści (W_2) jest to wskaźnik informujący, jak bardzo korzystne jest oddziaływanie danego efektu zdrowotnego na zdrowie/życie konsumenta.

W metodzie przyjęto, że P i W określa się w skali 1 do 5 (Tabela 1 i 2).

Tabela 2. Poziomy prawdopodobieństwa (P_1) wystąpienia i korzystnego wpływu (W_2) na zdrowie konsumenta po spożyciu MPE

Prawdopodobieństwo (P_2)	Poziomy	Wpływ (W_2) na zdrowie konsumenta
Bardzo małe - spożycie 1 raz na miesiąc	1	Mało istotny - nieznaczny wpływ na styl, jakość życia i samopoczucie konsumenta
Małe - spożycie 2 razy na miesiąc	2	Zauważalny - pozytywny wpływ na jakość życia i samopoczucie konsumenta
Umiarkowane - spożycie 1 raz na tydzień	3	Istotny - wpływ nr 2 + korzystne działanie na przewód pokarmowy i układ krążenia
Duże - spożycie 1 raz dziennie	4	Poważny - wpływ nr 2, 3 + zapobieganie chorobom układu pokarmowego, krążenia i zmianom nowotworowym w przyszłości
Bardzo duże - spożycie 2 razy dziennie	5	Bardzo poważny - wpływ nr 2, 3, 4 + uniknięcie chorób cywilizacyjnych

Źródło: opracowanie własne

3. Obliczenie całkowitego ryzyka i korzyści spożycia MPE

Całkowite ryzyko i korzyści spożycia MPE przedstawiono jako sumę pojedynczych (cząstkowych) / korzyści zgodnie ze wzorem 3 i 4.

Wzór 3:

$$R = \sum_{n=1}^{n=4} R_c$$

gdzie: R - całkowite ryzyko spożycia MPE, R_c - ryzyko cząstkowe jednego czynnika, n - liczba.

Wzór 4:

$$K = \sum_{n=1}^{n=4} Kc$$

gdzie: K - sumaryczne korzyści wynikające spożycia MPE, K_c - korzyści jednego efektu zdrowotnego, n - liczba.

W zależności od całkowitego ryzyka i sumarycznych korzyści szacowano 4 poziomy ryzyka i 4 poziomy korzyści spożycia MPE. Przy założeniu, że $R_{min} = 4$, natomiast $R_{max} = 100$ szacowano: ryzyko krytyczne: $R = 60 - 100$, ryzyko duże: $R = 30 - 60$, ryzyko niewielkie: $R = 10 - 30$, ryzyko nieistotne: $R = 4 - 10$. Przy założeniu, że $K_{min} = 4$, natomiast $K_{max} = 100$ szacowano: korzyści pożądane: $K = 60 - 100$, korzyści znaczące: $K = 30 - 60$, korzyści zauważalne: $K = 10 - 30$ i korzyści niewielkie: $K = 4 - 10$.

4. Opracowanie matrycy szacowania ryzyka i korzyści spożycia MPE

W proponowanej autorskiej metodzie oceny wykorzystano dopasowanie według metody zamka Van den Berga i Delsinga [1999]. Przyjęto, że matryca szacowania ryzyka i korzyści powinna odzwierciedlać związek pomiędzy korzyściami zdrowotnymi spożycia MPE w kontekście ryzyka negatywnego wpływu na zdrowie konsumenta. Matrycę zaprojektowano w taki sposób, aby z obliczonych wartości całkowitego ryzyka i korzyści wynikały cztery progi wskazań spożycia MPE (Rysunek 1).

Rysunek 1. Matryca szacowania ryzyka-korzyści i wskazania spożycia MPE

RYZYKO $R_{min}=4$ $R_{max}=100$	MATRYCA RYZYKO-KORZYŚCI			KORZYŚCI $K_{min}=4$ $K_{max}=100$	Wskazania spożycia
Krytyczne $R= 60-100$				Niewielkie $K= 4-15$	Niezalecane
Duże $R= 30-60$				Zauważalne $K= 15-30$	Warunkowe
Niewielkie $R= 15-30$				Znaczące $K= 30-60$	Możliwe
Nieistotne $R= 4-15$				Pożądane $K= 60-100$	Zalecane

Źródło: opracowanie własne

Zgodnie z etapem nr 1 opracowanej metody zidentyfikowano czynniki ryzyka i korzyści zdrowotne spożycia MPE. W drugim etapie metody obliczono ryzyko pojedynczych czynników i pozytywnego wpływu na zdrowie konsumenta pojedynczych czynników korzyści, szacując prawdopodobieństwo i wpływ na zdrowie konsumenta.

Tabela 3. Charakterystyka i uzasadnienie zdefiniowanych czynników ryzyka

L.p.	Czynnik ryzyka	Charakterystyka zagrożenia	Źródło
1	Aminy biogenne	<ul style="list-style-type: none"> • na ich zawartość w wyrobach mięsnych wpływają: NaCl, wielkość batonu kiełbasy, warunki higieniczne procesu produkcyjnego, rodzaj kultury startowej. • rozkład białek mięśniowych przy udziale enzymów mikrobiologicznych; może prowadzić do deaminacji i dekarboksylacji aminokwasów w czasie fermentacji, dojrzewania i przechowywania; • działają na układ naczyniowy, ośrodkowy układ nerwowy człowieka; powodują m.in. bóle głowy, zaburzenia krążenia, wrzody żołądka. 	22 23
2	DDT – pestycydy chloroorganiczne	<ul style="list-style-type: none"> • narażenie człowieka na DDT trwa przez całe życie; głównymi źródłami jest żywność i powietrze; • około 90% DDT człowiek pobiera z żywnością, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego; • największe ilości DDT obserwuje się w tłuszczu zwierzęcym, np. w smalcu; • charakteryzują się bardzo dużą trwałością w środowisku; niekorzystne działanie na organizm człowieka to: zaburzenie funkcjonowania układu hormonalnego, działanie mutagenne. 	6 15
3	<i>Listeria monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • źródła zanieczyszczeń to przede wszystkim mleko i produkty mleczne, mięsne, drób, ryby, owoce morza, warzywa, żywność typu ready-to-eat; • szczególnie narażeni na zachorowania są konsumenci o obniżonej odporności immunologicznej, kobiety w ciąży, małe dzieci. 	4 7 11
4	Drobnoustroje patogenne i saprofityczne	<ul style="list-style-type: none"> • brak stosowanych do peklowania mięsa azotanów III i V, może być przyczyną rozwoju i produkcji toksyn przez <i>C. botulinum</i> i <i>S. aureus</i>, obecności <i>E. coli</i> O157:H7. 	13 20

Objaśnienia to tabeli: MPE - mięsne produkty ekologiczne surowo dojrzewające. Źródła podane zgodnie z numeracją Literatury.

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 4. Charakterystyka i uzasadnienie zdefiniowanych czynników korzyści

L.p.	Czynnik korzyści	Charakterystyka pozytywnych efektów zdrowotnych	Źródło
1	mniejsze zanieczyszczenie substancjami chemicznymi w MPE	<ul style="list-style-type: none"> • surowce ekologiczne zawierają mniej związków dodawanych do pasz, natomiast więcej suchej masy, związków biologicznie aktywnych, witaminy C, witamin z grupy B, związków fenolowych, cukrów ogółem oraz zawierają więcej składników mineralnych; • w procesie technologicznym nie dodaje się azotanów III i V i innych chemicznych substancji dodatkowych stosowanych powszechnie w konwencjonalnych technologiach. 	[3 13 20]
2	wyższa wartość odżywcza MPE	<ul style="list-style-type: none"> • większa ilość substancji bioaktywnych, np. witamin, składników mineralnych i innych; • mięso ekologiczne charakteryzuje się korzystnymi cechami jakościowymi, większą masą mięśni, wyższą zawartością tłuszczu śródmięśniowego, większą marmurkowatością, odmiennym składem kwasów tłuszczowych i korzystnym stosunkiem kwasów tłuszczowych n-6/n-3. 	[3]
3	właściwości prozdrowotne, probiotyczne MPE	<ul style="list-style-type: none"> • bakterie fermentacji mlekowej (LAB) pochodzące z serwatki kwasowej, wykazują właściwości prozdrowotne i spełniają kryteria FAO/WHO dotyczące bakterii probiotycznych; pozytywne działanie probiotyków to: poprawa trawienia, wzmocnienie układu odpornościowego, zmniejszenie objawów nietolerancji laktozy, ograniczenie objawów alergii, wspomaganie syntezy i biodostępności witamin i składników odżywczych, itd.; • bakterie LAB biokonserwują żywność fermentowaną przez hamowanie rozwoju mikroflory chorobotwórczej i technologicznie szkodliwej. 	[8 17]
4	wysoka jakość sensoryczna MPE	<ul style="list-style-type: none"> • produkty MPE cechują się wyższą wartością odżywczą, dobrą smakowitością, pożądaną barwą i teksturą; posiadają cechy jakościowe podobne do produktów wytworzonych w sposób konwencjonalny. 	[8 9]

Objaśnienia to tabeli: MPE - mięsne produkty ekologiczne surowo dojrzewające. Źródła podane zgodnie z numeracją Literatury.

Źródło: opracowanie własne.

Pod uwagę brano siedem grup konsumentów jako scenariusze różnego stopnia narażenia. Analizowano: dzieci do 12 lat, młodzież 12-18 lat, kobiety w ciąży, dorośli konsumenci chorzy i rekonwalescenci, dzieci chore i w trakcie rekonwalescencji, zdrowi dorośli, osoby starsze. Ostatecznie do walidacji opracowanej metody szacowania ryzyka i korzyści po spożyciu MPE wykonano obliczenia dla dorosłych zdrowych konsumentów do 60 roku życia. Wybór ten uzasadniono danymi EFSA, z których wynika, że wiek konsumenta spożywającego MPE nie powinien przekraczać 60 lat. Jako powód podano wzrost liczby listerioz u konsumentów z osłabioną odpornością, czyli u osób starszych, dzieci, osob chorych, czy zagrożenia dla kobiet w ciąży [EFSA, 2007] (Tabela 5).

Tabela 5. Oszacowane wartości ryzyka (R) i korzyści (K) spożycia MPE przez dorosłych zdrowych konsumentów do 60 roku życia na podstawie dostępnych danych literaturowych

Czynniki		Dorośli zdrowi konsumenci			
Ryzyko	Źródło	Prawdopodobieństwo (P ₁)	Wpływ (W ₁)	Ryzyko cząstkowe (R _c)	Ryzyko całkowite (R)
Animy biogenne	[2, 22, 23]	1	2	2	9
DDT – pestycydy chloroorganiczne	[6, 15]	1	1	1	
<i>Listeria monocytogenes</i>	[2, 4, 7, 11]	2	2	4	
Drobnoustroje patogenne i saprofityczne	[2, 13, 20]	2	1	2	
Korzyści		Prawdopodobieństwo (P ₂)	Wpływ (W ₂)	Korzyść jednego czynnika (K _c)	Korzyść sumaryczna (K)
Mniejsze zanieczyszczenie substancjami chemicznymi w MPE	[3, 13, 20]	5	4	20	80
Wyższa wartość odżywcza	[3]	5	4	20	
Właściwości prozdrowotne, probiotyczne	[8, 17]	5	4	20	
Wysoka jakość sensoryczna	[2, 8, 9]	5	4	20	

Objaśnienia do tabeli: Źródła podane zgodnie z numeracją Literatury.

Źródło: opracowanie własne.

Na podstawie proponowanej metody oceny ryzyka spożycia wędlin surowo dojrzewających przez zdrowych dorosłych konsumentów do 60 roku życia, oszacowano ryzyko na poziomie nieistotnym ($R=9$), natomiast korzyści zdrowotne na najwyższym, pożądanym poziomie ($K=80$). Z uwagi na wysokie spodziewane korzyści i znikome ryzyko spożycia MPE przez wybraną grupę konsumentów oraz na podstawie matrycy szacowania ryzyka i korzyści zaleca się spożywanie MPE przez dorosłych konsumentów do 60 roku życia.

Z dostępnej literatury naukowej krajowej i zagranicznej wynika, że surowce ekologiczne, charakteryzują się wyższą wartością odżywczą, w tym wyższą zawartością suchej masy, związków biologicznie aktywnych, witamin z grupy B, witaminy C, związków fenolowych, cukrów ogółem i składników mineralnych [Dolatowski, 2013]. Mięso ekologiczne zawiera mniej związków chemicznych dodawanych do pasz. W procesie technologicznym nie dodaje się azotanów III i V oraz innych dodatków stosowanych powszechnie w konwencjonalnych technologiach. Azotany III są wysoce reaktywnymi składnikami w technologii przetwarzania mięsa [Sebranek i in., 2007; Neffe-Skocińska i in., 2016]. W literaturze przedmiotu kwestie ujemnego wpływu azotanów III i V dotyczą zatruc pokarmowych, powstawanie czynników rakotwórczych i szkodliwego wpływu na rozwój czy płodność [Sebranek i in., 2007]. Dlatego wyeliminowanie związków azotowych z MPE należy do istotnych korzyści wynikających ze spożycia tych produktów.

Spożycie produktów zawierających korzystnie działające bakterie LAB, w tym potencjalnie probiotyczne, to korzyść związana ze spożyciem MPE z dodatkiem serwatki kwasowej. Bakterie probiotyczne dostarczone z pożywieniem, łatwiej przystosowują się do warunków panujących w przewodzie pokarmowym i wykazują korzystniejsze efekty zdrowotne, niż probiotyki dostarczone za pośrednictwem preparatów farmaceutycznych [Kołożyn-Krajewska i Dolatowski, 2012; Neffe-Skocińska i in., 2016].

Zaproponowana metoda przedstawia jednocześnie korzyści i ryzyko spożycia MPE przez podstawową grupę konsumentów dorosłych do 60 roku życia. Ocena ryzyka i korzyści powinna służyć produkcji bezpiecznej zdrowotnie żywności i być pomocna w bieżącej działalności przedsiębiorstw. Z danych literaturowych wynika, że ocena ryzyka w przemyśle żywnościowym jest użyteczną metodą wspomagającą działanie firm i zapobiegającą chorobom odżywnościowym konsumenta. W pracach naukowych są podejmowane badania analizy ryzyka spożycia wybranych produktów lub wpływu różnych czynników na bezpieczeństwo żywności [Krause i in., 2011; Sally i in., 2013; Trafiałek i Pawłowska, 2013; Trafiałek i Przybylski, 2011].

W przypadku spożycia wędlin fermentowanych są niezbędne dodatkowe badania. Niemniej jednak zaprojektowana metoda stanowi wstępne narzędzie oceny przy wprowadzaniu na rynek nowych produktów, uwzględniając modę i preferencje konsumentów, ale również aspekty prozdrowotne i bezpieczeństwo żywności.

Stwierdzenia i wnioski

1. Opracowano metodę oceny ryzyka i korzyści spożycia MPE obejmującą identyfikację i charakterystykę ryzyka oraz korzyści wynikających ze spożycia MPE dla poszczególnych grup konsumentów.
2. Opracowana metoda, w tym matryca, jest pierwszym narzędziem pozwalającym oszacować jednocześnie ryzyko oraz potencjalne korzyści wynikające ze spożycia MPE.
3. Z walidacji zaprezentowanej metody dla grupy dorosłych i zdrowych konsumentów do 60 roku życia wynika, że korzyści zdrowotne wynikające z regularnej konsumpcji produktów MPE są o wiele wyższe niż ryzyko ich spożycia.

Literatura

1. *Codex Alimentarius* (2003). Hazard Analysis and Critical Control Point [HACCP] System and Guidelines for its application. Food Hygiene Basic Text, FAO/WHO Roma.
2. Dolatowski Z.J. (2013, 2015, 2016). Sprawozdania z badań podstawowych na rzecz rolnictwa ekologicznego w latach 2013-2016 (MRiRW), Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin.
3. EFSA (2007). Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness, The EFSA Journal, 599, 1-42.
4. EFSA (2010). Scientific Opinion, Guidance on human health risk-benefit assessment of foods, EFSA Journal, 8, 7, 1673.
5. Góralczyk K., Hernik A., Czaja K., Struciński P., Korcz W., Snopczyński T., Ludwicki J.K. (2010). Związki halogenoorganiczne – stare i nowe zagrożenia dla ludzi. Roczn. PZH, 61, 2, 109-117
6. Hong E., Doumith M., Duperrier S., Giovannacci I., Morvan A., Glaser P., Buchrieser C., Jacquet C., Martin P. (2007). Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001. International Journal of Food Microbiology, 114, 187-194.
7. Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. Process Biochemistry, 47, 1761-1772.
8. Krause B.L., Sebranek J.G., Rust R.E. (2011). Mendonca A. Incubation of curing brines for the production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-added, ground, cooked and sliced ham. Meat Science, 89, 4, 507-513.
9. Lairon D. (2010). Nutritional quality and safety of organic food. A review. Agronomy for Sustainable Development, 30, 1, 33-41.

10. Lindqvist R., Lindblad M. (2009). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Y. enterocolitica* in fermented sausage during maturation/storage. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 1, 59–67.
11. Luning P.A., Marcelis W.J., Jongen W.M.F. (2002). *Food quality management: A techno-managerial approach*. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.
12. Neffe-Skocińska K., Stadnik J., Kęska P., Kolożyn-Krajewska D. (2016). Jakość ekologicznych polędwic surowo dojrzewających w zależności od zastosowanej technologii produkcji, w: *Żywność a innowacje* (red. Drożdż I., Duda-Chodak A., Tarko T., Najgebauer-Lejko D., Byczyński Ł). Wyd. Naukowe PTTŻ, Kraków 2016, 27-40.
13. Pomianowski J.F., Wieczorek J., Mozolewski W. (2011). Ocena pozostałości związków chloroorganicznych w różnych produktach tłuszczowych. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 50, 3, 65-66.
14. Ross R.P., Morgan S., Hill C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 1-2, 3-16.
15. Rozporządzenie WE 178/2002 z dnia 28 stycznia 2002 r. (General Food Law Regulation).
16. Sally F., Bloomfield S.F., Scott E. A. (2013). A risk assessment approach to use of antimicrobials in the home to prevent spread of infection, *American Journal of Infection Control*, 41, 87-93.
17. Sebranek J.G., Bacus J.N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77, 136-147.
18. Sindelar J.J., Milkowski A.L. (2012). Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*, 26, 4, 259-266.
19. Stadnik J., Dolatowski Z.J. (2010). Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 9, 3, 251-263.
20. Suzzi G., Gardini F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54.
21. Trafiałek J., Pawłowska J. (2013). Analiza efektów szkolenia pracowników firmy cateringowej z wdrożonym systemem zarządzania bezpieczeństwem żywności, zgodnym z normą ISO serii 22000, *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 20, 1, 217-229.
22. Trafiałek J., Przybylski W. (2011). Analysis of risk exposure to carcinogenic diseases from pork meat. *Fleischwirtschaft International*, 26, 4, 73-78.
23. Van den Berg, M.G., Delsing B.M.A. (1999). *Quality of food* (2nd edition) Van den Berg, M.G. (red.) Kluwer, Deventer, The Netherlands, 360.

LUCIA BENEŠOVÁ¹, JOZEF GOLIAN¹, ĽUBOMÍR BELEJ¹

¹*Slovak University of Agriculture in Nitra*

CONCEPT OF FISH SPECIES ANALYSIS BASED ON THE PRINCIPLE OF DNA PROFILES

Abstract

Methods of detection of species substitution have become an important issue in the food and farming industries. Important need is the development of simple, reliable, reproducible and repeatable tests that would be able to detect the presence of species in fish products. One reason for counterfeiting may be increased fish consumption in the world, but also changes in demand and supply. DNA profiling is a technique by which individuals can be identified and compared by their respective DNA profiles. This article discusses the concept of new technologies in this area. It includes the use of DNA microarray chips, and other DNA based methods including Real-Time PCR, PCR-RFLP, PCR-sequencing, and NGS, which are all based on polymorphisms in the genetic codes of individual species. When we want to choose a suitable technique, it is important to consider the various factors that should be explored in advance, such as finance, laboratory equipment, time, or available expertise. In that case practical use of individual methods based on scientific articles by other authors is also included.

Introduction

The counterfeiting in the food sector is a frequent problem, not only in Slovakia, but around the world. Replacement of meat in fish products is a form of fraud that is carried out for economic gain. An important step is the development of methodology for food authentication, control of contamination and presence of ingredients that could cause damage to health. Lately, molecular biology methods have been increasingly used for this purpose. Real-time PCR is a quantitative method used for authentication. This method is appropriate for assessing fish products which contain more than one type of fish. It is able to assess the level of falsification and is also suitable for detecting possible contamination of food by fish meat residues, which may cause allergic reactions to sensitive individuals. The use of fluorescence for detection purposes eliminates the need for further steps after the PCR reaction. Fragmentation analysis is used to determine the size of DNA fragments obtained by the PCR reaction. The length of the amplified DNA fragments is compared to those whose fragments are fluorescently labelled, but with a different dye as the DNA fragments of the sample. Fluorescence of these fragments records the genetic analyser and results are evaluated by the software. Microarray DNA methods offer an analytically

powerful addition or even an alternative to identification methods. Next Generation Sequencing (NGS) is a method using microtechnology and nanotechnology to minimize number of samples and amount of chemicals which is used for the reaction. At the same time, they allow parallel sequencing of a large number of DNA sequences at once. These are actually Sanger sequencing modifications, which are gold standard for the authentication of seafood species but this method is not suitable for analysing products that may contain mixtures of other species. The aim of the study is to present the current knowledge in this field and to propose the most suitable methods for complex identification, species composition of fish meat and the presence of modifications in one detection tool. Freshwater fish, sea fish and products of them will be taking into account.

Species identification methods

For fish species, many analytical methods have been developed, which are performed by protein analyses: electrophoretic as well isoelectric techniques and SDS-PAGE [Ataman et al., 2006; Kvasnička, 2005]; chromatographic techniques [Hubalkova et al., 2007; Horstkotte and Rehbein, 2003] and immunological techniques such as immunodiffusion and ELISA [Asensio et al., 2008; Civera, et al. 2003; Moretti et al., 2003]. Although many of these methods are considered to be certain as appropriate, are not usable for routine analysis because proteins can lose biological activity immediately after the death of animal and their presence and characteristics depend from cell type. In addition, most of them are thermolabile [Asensio, 2007]. It means huge progress in molecular biology, where the possibilities of identifying all species of fish are provided, essentially from any kind of organic substrate (muscles, fins, blood) [Lockley and Bardsley, 2000; Teletchea et al., 2005].

DNA Microarray

In the study by Kochzius et al. [2008] the DNA microarray method was developed to explore its potential as a tool for identification of European sea fish species based on mitochondrial 16S rDNA sequences. A study on food fish in the United States revealed that three-quarters of fish sold as “red snapper” were mislabeled and belonged to other species [Marko et al. 2004], a situation that needs better analytical tools to be changed. The aim of Kochzius et al. [2010] study was to evaluate the applicability of the three mitochondrial genes 16S rRNA (16S), cytochrome b (cyt b), and cytochrome oxidase subunit I (COI) for the identification of 50 European marine fish species by combining techniques of “DNA barcoding” and microarrays. DNA chip-based product called the FoodExpert-ID contained the first high density DNA chip which was able to detect 33 different species including 15 species of fish, but the company did not launch the product

[Granata et al. 2011]. Kim et al. [2011] previously in the study developed web-based Molecular Identification System for Fish (MISF), including 53 Korean freshwater fish species, based on a profile hidden Markov model and sequence similarity. In a new study, they developed a DNA chip arrayed with 16 oligonucleotide probes to identify 11 selected species of Korean freshwater fish. The aim of study Pinto et al. [2015] was to use DNA barcoding to investigate the prevalence of mislabeling among fish fillet products from markets and supermarkets located in Apulia (SE Italy). The study reveals a high degree of species mislabeling in fish fillet products. In particular, this study shows that the labels of only 32/200 fish fillet samples provided comprehensive information relating to commercial designation, scientific name, geographical area, production method and whether they had been previously frozen.

Real-Time PCR

In contrast to conventional qualitative PCR, Real-Time PCR (RT-PCR) offers a quantitative approach to food authentication [López-Calleja et al., 2007]. Quantitative monitoring is appropriate for assessing fish products containing multiple species of fish, the level of falsification, and is also useful for detecting negligible amounts of food contamination by fish meal residues that can induce allergic reactions in susceptible individuals [Rapley, 2003; Holzhauser et al. 2006]. Although some RT-PCR applications use fluorescence dyes, such as, for example, SYBR Green, the fluorophore method using TaqMan probes is very promising for this purpose [Cawthorn, 2011]. The quantitative Real-Time PCR (qPCR) method is based on the use of TaqMan fluorescence probes. The engraved and quenched dye is bound to DNA bounded by primers. During PCR amplification of 5'-3' exonuclease activity Taq DNA polymerase cleaves the template hybridized template [Holland et al., 1991]. The use of fluorescence for detection purposes eliminates the need for further steps after the PCR reaction. Compared to conventional qualitative PCR, this method has several advantages. Fluorescence can be measured during the PCR reaction and provides real-time analysis, and qPCR also offers lower potential for contamination of PCR products. The accuracy and sensitivity of this method combined with high speed, reliability and automation [Heid et al., 1996] contributes to suitability of this method for quantification of fish and fish products, such as the use of the TaqMan probe to identify and quantify cod [Bajzík, 2013].

PCR-RFLP

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) is the method by which the amplified fragment is cleaved with the endonuclease that binds to the specific restriction sites of the fragment and split it into several smaller fragments of different sizes. These

fragments can be followed by visualization on agarose gel [Lockley and Bardsley, 2000]. To compare to conventional qualitative PCR, this method has several advantages. Fluorescence can be measured during the PCR reaction and provides real-time analysis, and qPCR also offers a lower potential for contamination of PCR products [Bajzík, 2013]. Lin and Hwang [2007] used this technique to identify eight species of mackerel. Two sets of primers were designed to amplify the 126 and 146 base pairs of the cytochrome b mitochondrial gene, while five restriction enzymes were determined to analyse the short fragments. This method has also been successfully used for the species identification of tuna cans. PCR - RFPL analysis of mitochondrial genes ND - 5/6 and ND - 3/4 was successfully used to detect polymorphism in European and Asian subspecies of common carp [Kohlmann et al., 2003] and to identify other fish species in processed fish products [Chakraborty et al., 2007]. The aim of study Mueller et al. [2015] was to develop a faster method with higher sample throughput using microfluidics based capillary electrophoresis and a target within the COX1 barcoding region. The resolution power of agarose gel electrophoresis was not enough to detect small-sized fragments, whereas T-RFLP capillary electrophoresis produced complete species-specific patterns. The three methods are ready now and can be employed as inexpensive, rapid and effective tools for food authentication in Egypt and other countries where seafood contributes much to local animal production economics [Khallaf et al., 2017]. A PCR-RFLP method was used to identify five species of raw and processed groupers belonging to the genus, *Epinephelus* viz. *E. areolatus*, *E. bleekeri*, *E. faveatus*, *E. longispinis* and *E. undulosus*. Chilled, frozen and cooked groupers also gave similar PCR-RFLP pattern to that of raw groupers making this method suitable even for processed products [Sumathi et al., 2015].

PCR-sequencing

PCR sequencing is the most direct way to retrieve information derived from PCR products. The information thus obtained is used to identify different fish species [Jérôme et al., 2003; Lin et al., 2001; Murgia et al., 2002]. PCR sequencing was considered time consuming and technically demanding and also required a large capacity to store the data obtained, although it is undoubtedly the method that provides the most information [Lockley and Bardsley, 2000; Asensio, 2007]. Currently, the time and technical difficulty has been greatly reduced, which explains why this method has become preferred. In recent years, phylogenetic analysis and sequencing of mtDNA have been directed mainly at the control of misidentified fish species [Marko et al., 2004]. Pepe et al. [2005] identified fish of the family *Gadidae* and *Merlucciidae* in eighteen different processed fish products, sequencing PCR products from the preserved region of the cyt b gene. This method has enabled the identification of fish species in all samples. Maretto et al. [2007]

analysed the sequence of the 430 bp mitochondrial 16S rRNA gene fragment to identify the four economically significant species of the cod. They identified three types of nucleotide polymorphisms that allow unequivocal discrimination between four different species of cod. Study by Shokralla et al. [2015] is a mini-bar coding system that can be used to identify a wide range of fish species in commercial products and can be used in high performance DNA sequencing to authenticate processed fish products.

Next Generation Sequencing method

Kappel et al. [2017] addressed the species identification of fish in the tuna conservancy by sequencing II. generation with focus on two short cytochrome b (cyt b) fragments on the Illumina MiSeq platform. It has detected an accuracy of 1%, depending on the composition of the mixture. Next generation sequencing (NGS) technologies might overcome this problem through massively parallel sequencing of different template molecules from one sample [Mardis et al., 2008], which makes NGS extremely promising for the analysis of food products containing mixtures of seafood species. Recovered sequences were compared to those of utilised specimens and read percentages were calculated for sequence clusters consisting of sequences with 100% identities, due to the high similarity of sequences within the *Thunnus genus* [Viñas and Tudela, 2009]. The same procedure was applied to three commercial tuna tin samples, followed by phylogenetic grouping of recovered sequences together with sequences from scombroid voucher species for species assignment [Kappel et al., 2017]. NGS analysis of barcode marker sequences (“metabarcoding”) is already common for environmental monitoring of microbial communities [Luo et al., 2012; Staley et al., 2013] or invertebrate species [Carew et al., 2013; Diaz-Real, 2015].

Conclusions

Adulteration of fish meat and fish meat products is a serious problem for both the food industry and the consumers. For this reason, it is necessary to use analytical tools to detect these not allowed practices. Laboratories have an option to use qualitative methods (DNA microarray chip) and quantitative methods (Real-Time PCR and Next Generation Sequencing) for this purpose, which have been described by several authors.

Thanks: This work was supported by project VEGA 1/0276/18

References

1. Asensio L., Montero A. (2008). Analysis of fresh fish labelling in Spanish fish retail shops. *Food Control*, 19, 795-799.
2. Asensio L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18, 558-566.

3. Ataman C., Celik U., Rehbein H. (2006). Identification of some Aegean fish species by native isoelectric focusing. *European Food Research and Technology*, 222, 99-104.
4. Cawthorn D.M. (2011). Establishment of a genetic database and molecular methods for the identification of fish species available on the South African market: Dissertation presented for the degree of Doctor of Philosophy (Food Science). South: Stellenbosch University, 233.
5. Civera T. (2003). Species identification and safety of fish products. *Veterinary Research Communications*, 27, 481-489.
6. Bajzík P. (2013). Optimalizácia stanovenia alergénov sladkovodných rýb metódou Real-Time PCR (Optimization of the determination allergens from freshwater fish by Real-Time PCR method. Nitra: SPU. 103.
7. Chakraborty A., Aranishi F., Iwatsuki(2007). Y. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis for species identification of hairtail fish fillets from supermarkets in Japan. *Fisheries Science*, 73, 197-201.
8. Granata L.A., Flick G.J., Martin R.E. The seafood industry: species, products, processing, and safety. 2th edition. New Jersey: Blackwell Publishing Ltd. 175.
9. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996). Real-time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.
10. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88, 7276-7280.
11. Holzhauser T., Stephan O., Vieths S. (2006). Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods. *Detecting Allergens in Foods*, 50, 125-141.
12. Horstkotte B., Rehbein H. (2003). Fish species identification by means of restriction fragment length polymorphism and high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 68, 2003, 2658-2666.
13. Hubalkova Z., Kralik P., Tremlova B. (2007). Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact in the Czech Republic: a review. *Veterinary Medicine*, 52, 273-292.
14. Jérôme M., Lemaire C., Bautista J.M., Fleurence J., Etienne M. (2003). Molecular phylogeny and species identification of sardines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2003, 43-50.
15. Kappel K., Haase I., Käppe C., Sotelo C.G., Schröder U. (2017). Species identification in mixed tuna samples with next-generation sequencing targeting two short cytochrome b gene fragments. *Food Chemistry*, 1, 234, 212-219.
16. Khallaf A.G. Geba K.M., Osman A.G.M., Abouelfadl K.Y., Borell Y.J., Vazquez E.G. (2017). SNP-based PCR-RFLP, T-RFLP and FINS methodologies for the identification of commercial fish species in Egypt. *Fisheries Research*, 185, 1, 34-42.
17. Kim S., Koo H., Kim J.H. (2011). DNA chip for species identification of Korean freshwater fish: A case study. *BioChip Journal*. 5, 1, 72-77.
18. Kohlmann K., Gross R., Murakaeva A., Kersten P.(2003). Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquaculture Living Resources*, 16, 421-431.
19. Kochzius M., Nölte M., Weber H., Silkenbaumer N., Hjörleifsdottir S., Hreggvidsson G.O., Merteinsson V., Kappel K., Planes S., Tinti F., Magoulas A., Vazquez E.G., Turan C., Hervet C., Falgueras D.C., Antoniou A., Landi M., Blohm D. (2008). DNA Microarray for Identifying Fishes. *Marine Biotechnology* 10, 2, 207-217.
20. Kochzius M., Seidel C., Antoniou A., Botla S.K., Campo D., Cariani A., Vazquez E.G., Hauschild J., Hervet C., Hjörleifsdottir S., Hreggvidsson G., Kappel K., Landi M., Magoulas A., Merteinsson V., Nölte M., Planes S., Tinti F., Turan C., Venugopal M.N., Weber H., Blohm D. (2010). Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays. *PLoS One*, 5, 9, e12620.
21. Kvasnička F. (2005). Capillary electrophoresis in food authenticity. *Journal of Separation Science*, 28, 813-825.
22. Lin W.F., Hwang D.F. (2007). Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control*, 18, 1050-1057.

23. Lin Y.S., Poh Y.P., Tzeng C.S. (2001). A phylogeny of freshwater eels inferred from mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 252-261.
24. Lockley A.K., Bardsley R.G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 67-77.
25. López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P.E., García T., Martín R. (2007). Real-Time TaqMan PC for quantitative detection of cows 'milk in ewes 'milk mixtures. *International Dairy Journal*, 17, 729-736.
26. Luo C., Tsementzi D., Kyrpides N., Read T., Konstantinidis K.T. (2012). Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS ONE*, 7, 2, e30087.
27. Mardis E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online], 9, 1, 387-402.
28. Maretto F., Reffo E., Dalvit C. (2007). Finding 16S rRNA gene-based SNPs for the genetic traceability of commercial species belonging to Gadiformes. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 161-163.
29. Marko P.B., Lee S.C., Rice A.M., Gramling J.M., Fitzhenry T.M., Mcalister J.S., Harpert G.R., Moran A.L. (2004). Mislabeling of a depleted reef fish. *Nature*, 430, 6997, 309-310.
30. Moretti V.M., Turchini G.M., Bellagamba F. (2003). Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Veterinary Research Communications*, 27, 497-505.
31. Mueller S., Handy S.M., Deeds J.R., George G.O., Broadhead W.J., Pugh S.E., Garrett S.D. (2015). Development of a COX1 based PCR-RFLP method for fish species identification. *Food Control*, 55, 1, 39-42.
32. Murgia R., Tola G., Archer S.N., Vallerga S., Hirano J. (2002). Genetic identification of grey mullet species (*Mugilidae*) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (*Bottarga*). *Marine Biotechnology*, 4, 119-126.
33. Pepe T., Trotta M., Dimarco I., Cennamo P., Anastasio A., Cortesi M.L. (2005). Mitochondrial cytochrom b DNA sequence variations: an approach to fish species identification in processed fish products. *Journal of Food Protection*, 68, 421-425.
34. Pinto A.D., Marchetti P., Mottola A., Bozzo G., Bonerba E., Ceci E., Bottaro M., Tantillo G. (2015). Species identification in fish fillet products using DNA barcoding. *Fisheries Research* 170, 1, 9-13.
35. Rapley R. (2003). *Practical Biochemistry: Principles and Techniques*, 5th edition. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 80-136.
36. Shokralla S., Hellberg R.S., Handy S.M., King I.A. (2015). DNA Mini-barcoding system for authentication of processed fish products. *Scientific Reports* [online], 1, 15894, 1-11.
37. Staley C., Unno T., Gould T.J., Jarvis B., Phillips J., Cotner J.B., Sadowsky M.J. (2013). Application of illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi river. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 5, 1147-1158.
38. Sumathi G., Jeyasekaran G., Shakila R.J., Sivaraman B., Arunkumar G., Manimaran U., Sukumar D. (2015). Molecular identification of grouper species using PCR-RFLP technique. *Food Control*, 51, 1, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.026>.
39. Teletchea T., Maudet C., Hänni C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*, 23, 359-366.
40. Viñas J., Tudela S. (2009). A validated methodology for genetic identification of tuna species (*Genus Thunnus*). *PLoS ONE*, 4, 10, 7606.
41. Carew M.E., Pettigrove V.J., Metzeling L., Hoffmann A.A. (2013). Environmental monitoring using next generation sequencing: Rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. *Frontiers in Zoology*, 10, 45, 1-15.
42. Diaz-Real J., Serrano D., Píriz A., Jovani R. (2015). NGS metabarcoding proves successful for quantitative assessment of symbiont abundance: The case of feather mites on birds. *Experimental and Applied Acarology*, [online], 67, 2, 209-218 [cit. 2018-05-29].

Contact address: prof. Ing. Jozef Golian, Dr., Department of Food Hygiene and Safety, Slovak University of Agriculture in Nitra. Str. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra.

SAFETY AND QUALITY OF FISHERY AND AQUACULTURE PRODUCTS

Abstract

The share of aquaculture in the EU by product type is as follows: molluscs and crustaceans 43.6%, freshwater fish 34.6 % and sea fish 21.8 %. The main species of farmed fish in the EU include: salmon - 21.32 % and trout 13.98 % of total value. In the terms of the percentage of volume, the blue mussels are at the first place - 33.49 %. Consumption of fishery and aquaculture products in the EU 28 is 24.9 kg in the Slovak Republic, which is 8.1 kg. The total production of fish in Slovak Republic has been gradually increasing since 2010, reaching 2 030 tonnes in 2016. Thereof is the highest production of carp – 1 728 t and rainbow trout - 1165 t. The Slovak Republic imports about 1,550 tons of fish annually, and almost 1,470 tons of fish are also annually exported. Consumption of fish meat, despite its qualitative properties and nutritional benefits, is constantly low and for fish alone, it is only around 5.1 kg per person per year. The results of official food control in the Slovak Republic for the years 2014-2017 show that the presence of parasites in fish increases, sensory indicators deteriorate and products of unsatisfactory composition are also found on the market. The presence of micro-organisms, contaminants and additives is low, and the number of cases with incorrect labeling is also getting lower.

Introduction

Fish is consumed as fresh fish or as frozen, salted, dried, smoked, or canned products. Most fish and other marine species give rise to products of great economic importance in many countries. The demand for such products has been increasing steadily during the last century and shows no sign of lessening. At the beginning of this decade captures in fisheries have shown a regular production per year of approximately 90-95 million metric tonnes. Fish products are known to provide significant amounts of important dietary factors such as nutritional and digestive proteins including high levels of essential amino acids (lysine, methionine); lipid soluble vitamins (e.g. A and D); microelements (I, F, Ca, Cu, Zn, Fe and others); and highly unsaturated fatty acids. The lipid fraction has a special interest due to its high ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) content, which has shown positive role in preveneting certain human diseases.

Total quality in the fisheries chain

The concept of total quality

The food quality concept has improved in time, from being practically limited to hygienic aspects – already in Pasteur era (1870-1920), to also considering in the 1950s chemical characteristics, then extending to health hazard residues. But the keystone in quality culture spreading dates back to 1987, when the International Organization for Standardization published the ISO 9000 family of standards, the basis of the quality management system. ISO 8402-95 standard defines general quality as: “the totality of features and characteristics of a product or service that bears its ability to satisfy stated or implied needs.” Such definition has to be considered as a dynamic concept, the purchaser needs variation in time and in space, according to his ethical and ethnical limits, also gradually evolving in time. The ISO 9000 standard quality system modified the quality concept, shifting the attention from the final product to all the processes contributing to its production. This integrated management system approach, in which planning, personnel involvement, documentation of activities and the attitude towards a continuous enhancement became the basis of the new management model. This is the background of the total quality concept. The basics of seafood quality are related to merchantable parameters, organoleptic, chemical and nutritional characteristics, and technological attitude to conservation and processing. All these quality aspects differ according to animal species and feeding, quality of water and environment where these species live, their physiological state, welfare and health, the correct technological management and environmental sustainability of fishery and aquaculture activities, the catch/ harvest and post-harvest procedures, such as sorting by species, washing, handling, processing, and modality of conservation (refrigeration, freezing, processing). Moreover, *conditio sine qua non* the large-scale organised distribution requires constancy, that product traits can exclusively be guaranteed by the application of a continuous monitoring of the critical control points over the several phases of production and distribution chain. Compulsory for the chain operators is the assurance of traceability and a correct and product exhaustive information through labelling. Nowadays the convenience of its use is also particularly awarded by purchasers. Product preparation for a simpler and quicker use, through gutting, filleting, cutting, packing in ready-to-cook or even precooked and only-to-heat portions, offers undoubted advantages to consumers with little experience of gastronomic practices and with little time available. Figure 1 sums up the several components contributing to the total quality of seafood. On the whole, the peculiar characteristics of the species derive from the interaction between the individual genetic inheritance and environmental factors exerted *in vita* and after harvest, leading to the differences found within species, according to the environment and eventual production

typology (captured or farmed). Therefore a fishery chain total quality could be defined as the complex of the characteristics able to satisfy the organoleptic, health, use/price convenience requirements of the purchaser/consumer, constantly found and obtained through a correct management of the production chain, with respect of animal welfare and environment sustainability, and made known in full transparency through traceability and labelling.

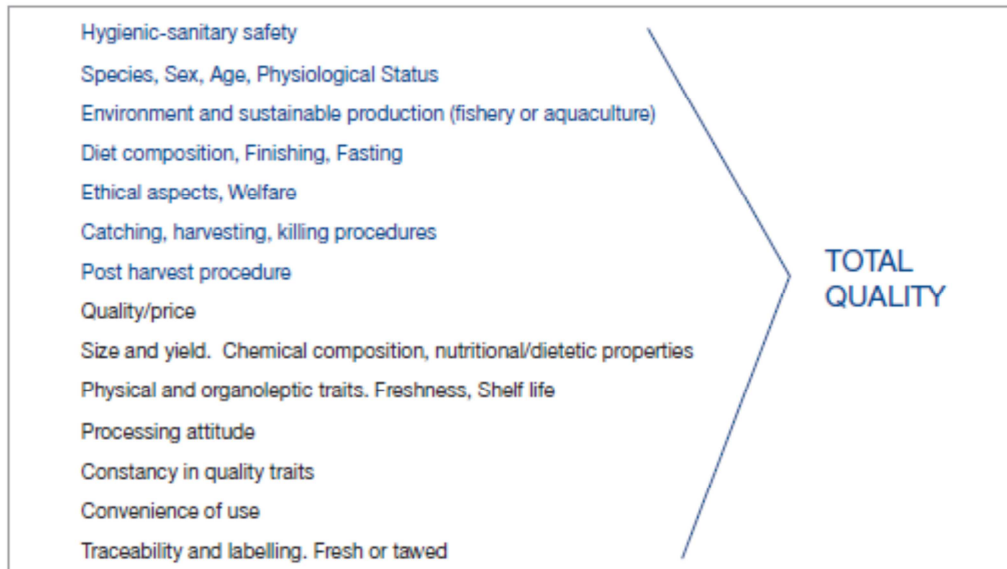


Figure 1. Seafood total quality

Parameters of seafood quality

Safety is an essential pre-requisite for quality and represents the minimum standard that guarantees food on the hygienic-sanitary point of view. A further safety tool is represented by the product traceability and labelling that supply detailed and precise information to the chain operator, only some of them reaching consumers: identification number of each lot, identification number and name of the fishing vessel or name of the aquaculture production unit, date of catches or the date of production, quantities of each species (kg or no of individuals), name and address of suppliers, scientific name and commercial designation of species, relevant geographical area, production method (farmed or captured) and whether the fisheries products have been previously frozen or not (this last four information in italics must be also given to consumers) [Reg. CE 1224/2009]. Ethical aspects too are assuming an increasing importance for consumers, when they are sensitive to the fact that seafood they will use were obtained with sustainable fishery/aquaculture systems and with respect for animal welfare. Moreover, the protection of fishery stocks and environment – in addition of being a certifiable

quality parameter itself – is at the basis of human welfare and job opportunities both in the present socio-economic systems and for future generations. Good animal welfare conditions – guaranteed during the rearing cycle thanks to the control of a set of parameters relative to water and feed quality, fish density and state of good health – is at the basis of a good meat animals growth and development, in order to turn into an excellent product for the market. Moreover, similarly to what has been verified in animal husbandry, the correct catch/harvest procedures are determinant for obtaining a final product reflecting the *in vita* animal quality. Severe stress conditions in animals affect several endocrine/physical/biochemical answers before death and physical/ biochemical changes after death able to impair the quality and conservation attitude potentially possessed by the product, giving rise to: rigor development, muscular pH decrease and compactness/firmness loss speeding up; water holding capacity lowering, dielectric properties impairing, higher meat lightness, shelf life shortening [Poli et al., 2005]. Product quality evaluation starts from a careful examination of the external aspect of the species under interest, on the basis of the distinctive features such as skin or carapace or valve colour, and morphological traits of commercial interest. Proper morphology and merchantable traits are evaluated through a series of length and weight measures. Length measures also have an important role at commercial level for the main species. A minimum size, below which fishing and marketing are not allowed, was fixed for each main species [Reg. EC 1967/2006, Annex III]. This was decided because the smaller specimens, still juveniles, must be protected to assure a sustainable exploitation of resources. For commercial size fish the measures to be pointed out are gutted weight/fillet yields, and condition factor. Condition factor (body weight/length³ ratio) indicates the fish corpulence within species, often related to body and meat adiposity. Apart from the feeding history, some quality aspects can also differ according to size because with increase in fish body weight and age, muscle and mesenteric fat incidences increase, while the one of bony tissue decreases. The fish reared in floating cages generally show less fat, both in viscera and in fillet, and better sensorial quality, in comparison to the ones reared in tanks. The different nutritional state, the higher energetic consumption/swimming activity and the streamlined flow in the cage are at the basis of the main differences, making them similar to the product captured in the wild. The chemical, nutritional and dietetic characteristics, peculiar of the species – but markedly influenced by extrinsic parameters, such as quantity, quality and feeding modality in particular – are described in the first section of chapter 19 to which readers can refer. The physical and organoleptic characteristics can be evaluated through the behaviour of *rigor mortis* phases (pre rigor, full rigor, rigor release), the changes of dielectric properties (indices of fish integrity loss), pH, colour, texture and freshness/quality state.

Freshness state – evaluated by sensorial methods through examination of the general aspect of eyes, skin, gills, odour of gills, flesh texture, resilience and colour on the raw product, and flesh texture, colour, taste, flavour and juiciness on the cooked product – is able, even alone, to be a reliable index of seafood quality. Evaluation methods more frequently used are the ones officially accepted in Europe [Reg. EU 2406/1996] distinguishing three freshness classes, very fresh (Extra), fresh (A), bad quality (B), below B fish being discarded for human consumption, or the Quality Index Method, a specific demerit index that assumes 0 value in very fresh fish, increasing value with quality worsening [Luten and Martinsdóttir, 1997]. In the case of reared product, freshness state of each species could even be estimated from the harvesting date, when a correct and uninterrupted cold chain has been assured. The time period in which seafood is marketable (shelf life) could also be evaluated both by sensorial methods, and as total viable count (TVC) or charge of individual specific spoilage organism (SSO), the latter are the ones better developing at the selected conservation conditions (for example *Pseudomonas* in refrigerated product, *Photobacterium* in Modified Atmosphere Packed, MAP product). Raw product is considered unfit for human consumption according to the sensorial parameters days before in comparison to the edibility threshold indication as TVC (10^7 cfu/g), the later resulting more fit as spoilage index in cooked product. Among the physical traits instrumentally determined, some of them are to be mentioned: skin and fillet colour, important for fish with pigmented flesh- evaluated (CIELab system) through the colorimetric parameters lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*), chroma and hue - and texture, important both as product sensorial aspect and for processing attitude. Texture increases with the muscular fibre density and diameter, and with the quantity and ageing of collagen structure. At the same weight, wild fish generally have flesh more consistent than those of cultured ones, also for their lower fat quantity and the greater muscular tissue activity for swimming. Texture decreases as fish freshness declines, and can be considered as a non-destructive index of freshness. Other useful aspects for the instrumental evaluation of quality changes in the final phases of shelf life are the levels of biogenic amine (histamine, putrescine, cadaverine) of malonaldehyde, secondary lipid oxidation compounds and odour volatile compounds.

Hygiene and safety in the fish supply chain

Principles of food safety legislation Food safety is still one of the main objectives of EC policies. This principle was established after the serious food crises that occurred in Europe from 1996 (e.g. BSE, dioxin contamination of food and avian flu) and which brought to light an inconsistent application of laws on behalf of Member States and a lack of organisation in control systems. These factors led the European Commission to

undertake an extensive revision of food safety laws through the publication of Regulation 178/2002, which lays down the general principles of food safety, as well as the obligation of traceability for all food and feed. The European Commission subsequently updated and reorganised the fragmentary EC regulations on food hygiene, with the publication of the “Hygiene Package”, a group of four Regulations [Reg. EC 852/2004; Reg. EC 853/2004, Reg. EC 854/2004 and Reg. EC 882/2004] aimed at ensuring a comprehensive and integrated approach to food safety based on risk analysis, with full involvement by primary production and full accountability on the part of industry operators. Article 5 of Regulation 852/2004 also requires food business operators downstream from primary production to put in place, implement and maintain procedures based on the HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) principles, to ensure self-regulation in health and hygiene matters.

Viruses in fish products

Food-borne viruses are the second most important cause of food-borne outbreaks in the European Union (EU) after *Salmonella* [EFSA, 2011]. In 2009 viruses were responsible for 19 % of all outbreaks in the EU, with over 1 000 occurrences that affected more than 8 700 citizens. The total number of outbreaks caused by viruses has been increasing since 2007. Food can act as a vehicle for transmitting certain viruses to humans, which in some cases are highly contagious and may lead to widespread outbreaks (OMS/FAO). EFSA’s scientific opinion looked at norovirus and hepatitis A viruses in fresh products, ready-to-eat foods and bivalve molluscs such as oysters, mussels, and scallops, as these are ranked as priority hazards by the WHO. According to the EFSA Scientific Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), effective measures to control the spread of these viruses should focus on preventing contamination at all levels of production rather than on trying to remove or inactivate these viruses from contaminated food. Thorough cooking is currently the only efficient measure to remove or inactivate norovirus or the hepatitis A virus from contaminated bivalve molluscs or contaminated fresh produce. In regard to fish products, the viruses of significance for public health (hepatitis A, calicivirus and norovirus) are isolated in fish products, particularly molluscs. Viral diseases transmitted by molluscs have always had and continue to have a large impact on public health: for example, hepatitis A, of which molluscs are the main carrier after water, and noroviruses, which are the most frequent cause of disease transmitted by molluscs at an international level. A detailed study [Guyader, 2000] has confirmed the diffusion of enteric viruses in bivalve mollusc populations, observing positivity percentages of between 17% and 50% for the viruses examined. Data from the Integrated Epidemiological System for Acute Viral Hepatitis (SEIEVA, Istituto Superiore di Sanità) allowed a risk assessment

estimating that 50-60% of hepatitis A can be correlated to the consumption of raw or partially cooked mussels. Viruses that are found to cause disease through transmission food and water can be divided into 3 main groups: 1) viruses that cause gastroenteritis: rotavirus, adenovirus type 40 and 41, and two types of human enteric caliciviruses: noroviruses (NV) and sapoviruses (SV); 2) oro-faecally transmitted hepatitis viruses: hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV); 3) viruses that replicate in the human intestine but provoke diseases in other organs, such as the central nervous system or liver (enteroviruses).

Microbial contamination of fish products

The microbial flora of fish and molluscs is closely related to the microbiological characteristics of the environment in which they live. Microorganisms in fish are mainly located on skin, on gills and in gut, whereas muscle masses are sterile. These can, however, become contaminated during gutting. Molluscs, which are mainly sessile or sedentary organisms, are capable of filtering several litres of water a day and their filtering activity varies according to size and species. For example, oysters can concentrate *Vibrio spp.* at levels 100 times greater than those found in the surrounding water.

Chemical contamination

Trace elements

Among the numerous inorganic elements found in nature, some, such as cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb) and arsenic (As), are considered potentially dangerous for human health if absorbed beyond certain limits. The amount of contamination is relevant near specific sources of emission related to extraction or industrial activities, the disposal or incineration of waste, certain agricultural and animal husbandry practices (e.g. the use of fertilisers, antiparasites and feeds containing metals) and natural causes (geochemical and volcanic features). For these reasons, acceptable limits have been established for fish products and safe consumption limits for consumers.

Table 1. Limits for metals in fish products according to Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006, which defines the maximum levels for certain contaminants in food products (OJ L 364 of 20/12/06).

Lead (Pb)

Product	Maximum levels (mg/kg wet weight)
Muscle fish flesh	0.30
Crustaceans, excluding crab brown flesh and excluding head and	0.50

thorax flesh of lobster and similar large crustaceans (<i>Nephropidae</i> and <i>Palinuridae</i>)	
Bivalve molluscs	1.5
Cephalopods (without viscera)	1.0
Cadmium (Cd)	
Product	Maximum levels (mg/kg wet weight)
Muscle fish flesh except for the species listed below:	0.05
Muscle flesh of the following fish:	0.10
anchovy (<i>Engraulis species</i>)	
bonito (<i>Sarda sarda</i>)	
common two-banded sea bream (<i>Diplodus vulgaris</i>)	
eel (<i>Anguilla anguilla</i>)	
grey mullet (<i>Mugil labrosus</i>)	
horse mackerel or scad (<i>Trachurus species</i>)	
louvar (<i>Luvarus imperialis</i>)	
sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	
sardinops (<i>Sardinops species</i>)	
tuna (<i>Thunnus spp.</i> , <i>Euthynnus spp.</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>)	
wedge sole (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	
Muscle flesh of sword fish (<i>Xiphias gladius</i>)	0.30
Crustaceans, excluding brown flesh of crab and excluding head and thorax flesh of lobster and similar large crustaceans (<i>Nephropidae</i> and <i>Palinuridae</i>)	0.50
Bivalve molluscs	1.0
Cephalopods (without viscera)	1.0

Mercury (Hg)

Product	Maximum levels (mg/kg wet weight)
Fish products and muscle fish flesh, excluding the species listed below:	0.50
Muscle flesh of the following fish:	1.0
anglerfish (<i>Lophius spp.</i>)	
atlantic catfish (<i>Anarhichas lupus</i>)	
bonito (<i>Sarda sarda</i>)	
eel (<i>Anguilla anguilla</i>)	

emperor, orange roughy, rosy soldier fish (*Hoplostethus spp.*)
 grenadier (*Coryphaenoides rupestris*)
 halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)
 marlin (*Makaira species*)
 megrim (*Lepidorhombus spp.*)
 pike (*Esox lucius*)
 plain bonito (*Orcynopsis unicolor*)
 poor cod (*Tricopterus minutus*)
 portuguese dogfish (*Centroscymnus coelolepis*)
 rays (*Raja species*)
 red mullet (*Mullus spp.*)
 redfish (*Sebastes marinus, S. mentella, S. viviparus*)
 sail fish (*Istiophorus platypterus*)
 scabbard fish (*Lepidopus caudatus, Aphanopus carbo*)
 seabream, pandora (*Pagellus spp.*)
 shark (all species)
 snake mackerel or butterfish (*Lepidocybium flavobrunneum, Ruvettus pretiosus, Gempylus serpens*)
 sturgeon (*Acipenser spp.*)
 sword fish (*Xiphias gladius*)
 tuna (*Thunnus spp., Euthynnus spp., Katsuwonus pelamis*)

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) form a large class of organic compounds all structurally characterised by the presence of two or more benzene rings fused together. A few hundred different PAHs can be formed through the incomplete combustion of carbon, crude oil and waste. They are never found as individual compounds but as part of mixtures containing dozens of different PAHs in various proportions. Precisely due to the fact that exposure is to a mixture of compounds, and in irregular proportions, it is difficult to attribute the toxic effects produced on the body to a specific hydrocarbon. These are highly lipophilic compounds, i.e. they tend to accumulate in fatty tissues. PAHs are normally divided, according to their molecular weight and number of atoms, into light PAHs (2-3 condensed rings) and heavy PAHs (4-6 rings). The name PAH refers in particular to those compounds only containing carbon and hydrogen atoms, whereas the more general name “polycyclic aromatic compounds” also refers to their functional derivatives (nitro-PAHs) and similar heterocyclics (aza-arene). In aquatic fauna, concentrations of PAH are more likely to be found in fish that live in inland waters and

are therefore more exposed to sources of anthropic pollution, as well as in medium and large-sized fatty fish species, such as salmon and eels. Another important source of contamination is food processing and treatment by grilling and smoking [Balati et al., 2015; Euvrard et al., 2014], Commission Regulation (EU); EFSA [2009], SCF [2002].

Table 2. Limits for PAHs in fish products according to Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006, which defines the maximum levels for certain contaminants in food products [OJ L 364 of 20/12/06].

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Benzo(a)pirene

Product	Maximum levels (mg/kg wet weight)
Smoked fish muscle and smoked fish products, excluding bivalve molluscs. The maximum levels are applied to smoked crustaceans, excluding brown flesh or crab and excluding head and thorax flesh of lobster and similar large crustaceans (<i>Nephropidae</i> and <i>Palinuridae</i>)	5.0
Muscle flesh of non-smoked fish	2.0
Non-smoked crustaceans and cephalopods. The maximum levels are applied to crustaceans, excluding brown flesh of crab and excluding head and thorax flesh of lobster and similar large crustaceans (<i>Nephropidae</i> and <i>Palinuridae</i>)	5.0
Bivalve molluscs	10.0

Dioxins and PCBs found in feed and food Dioxins are substances that are formed unintentionally as undesirable products of waste incineration and other industrial processes. They are compounds also found in PCBs or formed during their use. The term dioxin indicates a group of 75 polychlorinated dibenzo-para-dioxin (PCDD) congeners and 135 polychlorinated dibenzofuran (PCDF) congeners, 17 of which can have toxicological effects. Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of 209 different congeners which can be divided into two groups according to their toxicological properties: a small number exhibit toxicological properties similar to dioxins and are therefore often termed “dioxin-like PCBs”. Most of them do not exhibit dioxin-like toxicity but have a different toxicological profile. In order to be able to sum up the toxicity of these different congeners, the concept of toxic equivalency factors (TEFs) has been introduced as an aid to risk assessment and regulatory control. This means that the analytical results relating to all the individual dioxin and dioxin-like PCB congeners of toxicological concern are expressed in terms of a quantifiable unit, namely the “TCDD

toxic equivalent” (TEQ). PCBs are chemical compounds containing chlorine, which were used in the past to produce anti-parasites, herbicides, paints, solvents and in certain industrial processes for electrical components. They are poorly biodegradable, resistant to high temperatures and insoluble in water. They are, however liposoluble, and therefore tend to accumulate in the fat of animals and humans. Dioxins and PCBs are considered as highly toxic substances and have been shown to exhibit neoplastic action. Assessment of the risk to consumers. Consumption of foods contaminated by dioxins and PCBs is the main source of accumulation for humans. Meat, eggs, milk and farmed fish can be potentially polluted by dioxins and PCBs absorbed through feed. Even wild fishery products from contaminated sea areas can contain concentrations of dioxins that enter the human food cycle. Farmed fish, on the other hand, can be contaminated through fish meal or oil, which form the basis of their feed.

Table 3. Maximum levels of dioxins and dioxin-like PCBs in fish products and their derivatives [Regulation (EC) No 199/2006]

Food	Maximum levels. Sum of dioxins and furans (WHO-PCDD/F-TEQ)	Maximum levels. Sum of dioxins, furans and dioxin- like PCBs (WHO-PCDD/F- TEQ)
Muscle flesh or fish and fishery products and their derivatives	4.0 pg/g fresh weight	8.0 pg/g fresh weight
Muscle flesh of eel and derived products	4.0 pg/g fresh weight	12.0 pg/g fresh weight
Marine oil (fish body oil, fish liver oil and oils of other marine organisms intended for human consumption)	2.0 pg/g fat	10.0 pg/g fat

Parasitic zoonoses transmitted by fish products

Parasitic infections related to the consumption of fish products are a serious public health problem at a worldwide level. The WHO estimates that around 60 million people have contracted these infections. The situation is not alarming in Italy, mainly due to the dietary habits, which do not include regular consumption of large quantities of raw or lightly cooked fish products, whether from the sea or from freshwater. In addition to the problem of genuine infections acquired through consumption of fish products, mention

should also be made of the recent increase in allergies related to the consumption of fish products infected by parasites, even though these are eliminated by cooking.

Strategies for reducing the parasitic hazards in fish meat

The most important risk factor for all fishborne parasitic zoonoses is the consumption of raw or undercooked fish. It is noteworthy that the numbers of cases in outbreaks of foodborne diseases caused by consumption of fish are generally small when compared to those caused by poultry, dairy and meat products. Visual inspection and removing visible parasites are suggested to prevent this hazard. According to the EU, fish food producers must ensure that fishery products have been subjected to a visual examination for the purpose of detecting visible parasites before being placed on the market. Murrell also suggested several control measures for preventing parasite infection originating from freshwater, such as environmental control of surface water where fish are caught, hygienic aquaculture, and the control or elimination of the first intermediate hosts (snails). FDA indicated that the effective methods to kill parasites are freezing, heating, and adequate combination of salt content and storage time or hot smoking. On the other hand, brining and cold smoking may reduce the parasite hazard in fish, but they do not eliminate it or minimize it to an acceptable level. The recommendation to avoid consumption of raw or poorly cooked fish is still the best preventive procedure. Although *Eustrongylides spp.* and *Anisakis spp.* have not been confirmed as causes of disease in humans in the Republic of Serbia, further parasitic surveys in the intermediate (oligochaetes, fish), paratenic (amphibian, reptile), and final (birds) hosts are necessary, as well as continuous monitoring of imported marine fish species. The consumption forms and the preparation of fish food should be modified in such a way that hazards to human health due to these zoonotic parasites and other pathogens would be avoided. Health education is a key factor in combating fishborne zoonotic infections.

Acknowledgement

This work was supported by project VEGA 1/0276/18

References

1. Balati A., Shabbazi A., Amini M.M., Hashemi S.H. (2015). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from wastewater by using silica-based organic-inorganic nanohybrid material. *J. Water Reuse Desalin*, 5, p. 50
2. Commission Regulation (EU) No 1327/2014 of 12 December 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditionally smoked meat and meat products and traditionally smoked fish and fishery products
3. Euvrard E., Druart C., Poupeney A., Crini N., Vismara E., Lanza T., Torri G., Gavaille S., Crini G. (2014). Grafted cellulose for PAHs removal present in industrial discharge waters EGU General Assembly Conference Abstracts (vol. 16), p. 1742

4. EC. Corrigendum to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004. Laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Section VIII. L226/67.
5. EFSA (2009). EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel).
6. EFSA (2009). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, Scientific Opinion of the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, Adopted on 9 June 2008. Available at: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/contam_ej_724_PAHs_en.1.pdf?ssbinary=true
7. EFSA (2011). European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010, 9 (3): 378 p.
8. Genchi C., Pozio E. (ed) (2004). Parassitologia generale e umana. Milano: Casa Editrice Ambrosiana: 552 p.
9. Huss H.H., Ababouch L., Gram L. (2004). Assessment and management of seafood safety and quality. FAO Fisheries technical paper, 444: 1-230.
10. Lutén J.B., Martinsdóttir E. (1997). QIM – A European Tool for Fish Freshness evaluation in the Fishery Chain. In: G. Olafsdóttir et al. (eds), Methods to determine the Freshness of Fish. Proceedings of the Final meeting of the Concerted Action “Evaluation of Fish Freshness”, AIR3CT942283, Nantes, Nov. 12-14, 1997, “International Institute of Refrigeration”, 287-296.
11. OMS/FAO (2008). Viruses in food: scientific advice to support risk management, MRA Series 13.
12. Poli B.M., Parisi G., Scappini F., Zampacavallo G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13: 29-49.
13. Sándor Z., Papp Z.G., Csengeri I., Jeney Z. (2011). Fish meat quality and safety. *Tehn mesa*; 52: 97-105.
14. Ljubojevic D., Cirkovic M., Djordjevic V., Puvaca N., Trbovic D., Vukadinov J., Plavska N. (2013). Fat Quality of Marketable Fresh Water Fish Species in the Republic of Serbia. *Czech J Food Sci* 31:445-50.
15. Ljubojevic D., Cirkovic M., Novakov N., Puvaca N., Aleksic N., Lujic J., Jovanovic R. (2014). Comparison of meat quality of tench, *Tinca tinca*, reared in extensive and semi-intensive culture systems. *J Appl Ichthyol*; 30: 50-7.
16. Ljubojevic D., Radosavljevic V., Puvaca N., Balos M.Z., Djordjevic V., Jovanovic R., Cirkovic M. (2015). Interactive effects of dietary protein level and oil source on proximate composition and fatty acid composition in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Food Compos Anal*; 37: 44-50.
17. Köse S. (2010). Evaluation of Seafood Safety Health Hazards for Traditional Fish Products: Preventive Measures and Monitoring Issues. *Turk J Fish Aquat Sci* 10: 139-60. 6.
18. dos Santos C.A.L., Howgate P. (2011). Fishborne zoonotic parasites and aquaculture: a review. *Aquaculture* ;318: 253-61.
19. Chai J.Y., Murrell K.D., Lymbery A.J. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol*, 35: 1233-54.
20. Cirkovic M., Novakov N., Petrovic J., Ljubojevic D., Apic J., Babic J., Teodorovic V. (2013). Finding of parasitic nematodes of fishes present in the market. *Arch Vet Med*; 6: 3-13.
21. Newell D.G., Koopmans M., Verhoef L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Kruse H. (2010). Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol*; 139: S3-S15.
22. FDA. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance. 3rd Edition. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, DC, USA; 2001. [http://www.fda.gov/Food/Guidance/Compliance/Regulatory/Information/Guidance/Documents/Seafood/Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guide/default.htm](http://www.fda.gov/Food/Guidance/Compliance/Regulatory/Information/Guidance/Documents/Seafood/Fish%20and%20Fisheries%20Products%20Hazards%20and%20Controls%20Guide/default.htm) 22. EC. Corrigendum to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004. Laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Section VIII. L226/67. 23. Murrell KD.
23. SCF (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final. Available at: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf

Contact adress: prof. ing. Jozef Golian, Dr., Departamente of Food Hygiene and Safety, Slovak University of Agriculture in Nitra. Str. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra.

IWONA DROŹDŹ¹, JUSTYNA WOŁKOWICZ¹,
MAŁGORZATA MAKAREWICZ¹, URSZULA BŁASZCZYK¹

¹*Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

BIORÓZNORODNOŚĆ BAKTERII KWASU MLEKOWEGO W PRODUKTACH PSZCZELICH I ZBADANIE ICH ZDOLNOŚCI DO PRODUKCJI BAKTERIOCYN

Wprowadzenie

Za właściwości prozdrowotne miodu i innych produktów pszczelich, obok makro- i mikroelementów, substancji przeciwutleniających, cukrów itp. odpowiadają bakterie fermentacji mlekowej (LAB, *Lactic Acid Bacteria*) i ich metabolity. Bakterie te są odpowiedzialne za wytwarzanie substancji, które mogą działać bakteriostatycznie lub bakteriobójczo.

Interesującymi produktami pszczelimi są pyłek i pierzga. Pyłek pszczeli jest pokarmem pszczół [Bieńkowska, 2003; Feás i in., 2012; Paradowska i in., 2014]. Natomiast pierzga, to przetworzony przez pszczoły pyłek. Przyniesione do gniazda obnóża, pszczoły magazynują w komórkach plastra, zwilżają śliną, mieszają z miodem i nektarem, rozdrabniają i ubijają, a na koniec pokrywają miodem oraz woskiem. W takich beztlenowych warunkach przebiega fermentacja mlekowa, której produkty konserwują pierzgę [Bartosiuk i Borawska, 2014].

LAB w produktach pszczelich są symbiontami pochodzącymi z przewodu pokarmowego pszczół miodnych [Vásquez i in., 2012]. Szereg badań potwierdza występowanie w wólach pszczół miodnych, a tym samym później w produktach pszczelich takich gatunków jak: *Lactobacillus kunkeei*, *Lb. apinorum*, *Lb. melis*, *Lb. mellifer*, *Lb. apis*, *Lb. johnsonie*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Bifidobacterium asteroides*, *B. coryneforme* i innych [Vásquez i in., 2012; Olofsson i in., 2016; Lamei i in., 2017].

Bakterie kwasu mlekowego stanowią grupę o wspólnych właściwościach fizjologicznych. Zaliczamy do nich m. in. rodzaje: *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* i *Lactobacillus*, a także *Bifidobacterium* [Makarowa i in., 2006]. Duża różnorodność morfologiczna i biochemiczna tych bakterii sprawia, że występując w różnych produktach, produkują metabolity, które nadają charakterystyczną konsystencję, smak, zapach, ale również biokonserwują produkt, niedopuszczając do rozwoju niepożądanego czy patogennej mikroflory [Asurmendi i in., 2014].

W związku z tym, LAB oraz ich metabolity (np. bakteriocyny), mogą być stosowane w produktach żywnościowych, gdyż posiadają status GRAS (ang. *Generally Recognized*

As Safe), co oznacza, iż są ogólnie uznawane za bezpieczne [Pawlowska i in., 2012; Zacharof i Lovitt, 2012]. Metabolity LAB określane są mianem biokonserwantów. Termin ten stosuje się do drobnoustrojów i ich metabolitów, dodawanych do żywności i wpływających na stabilność, bezpieczeństwo oraz przedłużenie świeżość produktów [Schnürer i Magnusson, 2005]. Rośnie zainteresowania bakteriocynami w przemyśle paszowym i w leczeniu bakterii antybiotykoopornych [Parada i in., 2007; Tomaszewska i in., 2014].

Bakteriocyny, to związki wydzielane przez mikroorganizmy na zewnątrz komórki i wykazujące właściwości antybakteryjne. Występują w formie pojedynczej, lub w kompleksach białkowych, mogących zawierać lipidy i węglowodany. Zazwyczaj mają małą masę i są termostabilne [Parada i in., 2007; Šuškovići in., 2010; Tomaszewska i in., 2014]. Geny kodujące bakteriocyny, są powiązane z innymi genami, tworząc operon i rozmieszczone są w plazmidach, bądź chromosomach. Aktywność biologiczna bakteriocyn objawia się poprzez zaburzenie prawidłowej funkcji drobnoustrojów (dezintegracja błony komórkowej, tworzenie w niej porów, zaburzenia syntezy białek, DNA i RNA), bądź całkowite ich zniszczenie [Sip i in., 2009; Muhialdin i in., 2013; Tomaszewska i in., 2014; Swetwivathana i Visessanguan, 2015].

Największe zainteresowanie wzbudzają bakteriocyny produkowane przez LAB. Jak do tej pory, stanowią one najlepiej zbadaną grupę. Przykłady gatunków LAB to np.: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (nizyna), *Lactobacillus plantarum* (plantarycyna), *Lb. pentosus* (bakteriocyna ST151BR), *Lb. acidophilus* (acidocyna B), *Lb. brevis* (brewicycyna 37), *Lb. casei* B80 (kaseicycyna 80), *Lb. sake* 145 (laktocyna S), *Pediococcus acidilactici* H (pediocyna AcH), *P. pentosaceus* (pediocyna A) [Klaenhamer, 1993; Gwiazdowska i Trojanowska, 2005; Parada i in., 2007; Vásquez i in., 2012].

W bakteriach fermentacji mlekowej drzemie duży potencjał. Wpływają korzystnie na zdrowie ludzkie oraz przyczyniają się do usprawnienia i podniesienia jakości przemysłu żywnościowego. To wszystko sprawia, iż warto dokładniej zająć się ich analizą. Dlatego celem pracy była izolacja bakterii kwasu mlekowego z pyłku pszczelego i pierzgi pszczelej, próba identyfikacji wyizolowanych bakterii za pomocą prostych testów fizykochemicznych oraz reakcji RAPD-PCR z wykorzystaniem różnych starterów, a także sprawdzenie zdolności bakteriobójczych, bądź bakteriostatycznych wyizolowanych szczepów bakteryjnych.

Materiały i metody

Materiałami wykorzystanymi do badań były: trzy różne pyłki pszczele pochodzące z pasiek: Pasieka rodzinna św. Ambroży, Kraków, Gospodarstwo Pasieczne „Miody Beskidzkie”, Szczyrzyc oraz Hodowla Pszczół Kazimierz Sondej, Żnin, a także trzy

różne pierzgi pszczele, pochodzące z gospodarstw pasiecznych: Gospodarstwo Pasieczne Tomasz Łysoń, Sutkowice, Kazimierz Madzula, Gładyszów, Jolanta i Piotr Witkowsky, Puńsk.

W pierwszym etapie analizowano skład ilościowy drobnoustrojów występujących w produktach pszczelich. W tym celu odważano po 5 g każdego produktu i rozpuszczano w 45 cm³ 0,85% NaCl i wytrząsano przez 15 minut, uzyskując rozcieńczenie 10⁻¹. Następnie przygotowano kolejne rozcieńczenia dziesiętne: 10⁻² i 10⁻³. Z każdego rozcieńczenia wysiewano po 0,5 cm³ zawiesiny, metodą powierzchniową na agar odżywczy (Biocorp) z dodatkiem nystatyny (100 mg/l; TEVA) oraz cykloheksimidu (100 mg/l; SIGMA-ALDRICH) dla ogólnej liczby bakterii i na agar z dichloranem, czerwienią bengalską i chloramfenikolem (DRBC; Merck) do oznaczania drożdży i pleśni. Każdy posiew wykonano w dwóch powtórzeniach. Inkubowano w 32°C (bakterie) i w 28°C (grzyby i pleśnie)

W celu izolacji LAB z produktów pszczelich przygotowano ich rozcieńczenia dziesiętne 10⁻¹ i 10⁻². Po 5 g każdego produktu wytrząsano w 45 cm³ 0,85% NaCl. Z każdego rozcieńczenia wykonano posiewy metodą zalewową w podłożu MRS (deMan, Rogosa i Sharpe; Biocorp) z dodatkiem nystatyny oraz cykloheksimidu (po 100 mg/l). Każdy produkt pszczele inkubowano w 32°C i 45°C i wykonywano posiewy, w dwóch powtórzeniach każde, w czasie 0, po 24, 48, i 72 h inkubacji.

Wyizolowane czyste kultury LAB identyfikowano makroskopowo, wykonano barwienie Grama oraz test na katalazę. Gram-dodatnie i katalazoujemne ziarniki lub laseczki nieprzetrawialne, przeznaczono do dalszych badań.

Płynne, 48 h hodowle czystych kultur LAB oczyszczono, a następnie izolowano z nich genomowy DNA przy pomocy zestawu Genomic Mini AX BACTERIA + SPIN (A&A BIOTECHNOLOGY) wg procedury producenta.

Mieszanina reakcyjna do klasycznego PCR zawierała: 34,75 µl wody nuclease-free (Polpharma), 10 µl buforu reakcyjnego One Taq® Standard Reaction Buffer 5X (BioLabs), 1 µl dNTPs MIX (A&A BIOTECHNOLOGY), 1 µl startera LWP 205 5'-CTTGTTACGACTTCACCC-3' i 1 µl startera LWP 57 5'-AGTTTGATCCTGGCT CAG-3' (Genomed), 0,25 µl polimerazy DNA One Taq® DNA Polymerase 5 000 U/ml (BioLabs) oraz 2 µl badanego matrycowego DNA. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze MultiGene Mini (Labnet Inter.) przy parametrach: denaturacja wstępna w 94°C przez 1 min., 30 cykli obejmujących denaturację w 94°C, 30 s., przyłączenie starterów w 55°C, 1 min., syntezę łańcucha w 68°C, 3 min. oraz końcowe wydłużanie w 68°C przez 5 min.

Mieszanina reakcyjna do RAPD-PCR zawierała 35,75 µl wody nuclease-free, 10 µl buforu reakcyjnego One Taq® Standard Reaction Buffer 5X, 1 µl dNTPs MIX, 1 µl

jednego ze starterów tj. M13 starter 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' lub D8635 5'-GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC-3', lub Coc1 5'-AGCAGCGTGG-3' (Genomed), 0,25 µl polimerazy DNA One Taq® oraz 2 µl badanego DNA matrycowego. Parametry amplifikacji na termocyklerze: denaturacja wstępna w 95°C, 5 min., 35 cykli obejmujących denaturację nici w 95°C, 5 min., przyłączenie starterów w 36°C, 1 min., synteza łańcucha 68°C, 2 min. oraz końcowe wydłużanie w 68°C, 7 min.

Rozdział elektroforetyczny próbek po PCR i RAPD-PCR przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem 20 µl bromku etydyny (10 µl/100 ml; SIGMA-ALDRICH). Rozdział prowadzono w buforze 1xTAE w aparacie do elektroforezy poziomej (Labnet Inter.), z zasilaczem PowerPac Basic (BioRad) przez 60 minut i 100 V. Wizualizację żeli dokonano przy pomocy transiluminatora BIO View (BIOSTEP), a do jego dokumentacji wykorzystano Systemem do Archiwizacji i Dokumentacji Żeli Argus Biostep X1, oraz aparat fotograficzny Canon EOS 600D.

Wzorcem wielkości mas był marker 1Kb DNA Ladder RTU (GeneDireX) o zakresie 250-10 000 pz.

PCR oraz RAPD-PCR z wykorzystaniem ww starterów przeprowadzono również dla szczepów referencyjnych LAB (DSMZ, Berlin): *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (20481), *Lactobacillus pentosus* (20314), *Lb. paraplantarum* (10667), *Lb. brevis* (20054), *Lb. fermentum* (20052), *Lb. casei* (20011), *Leuc. mesenteroides* sp. *mesenteroides* (20343), *Lb. plantarum* (20205), *Pediococcus pentosaceus* (20336) oraz *P. damnosus* (20331).

Badanie zdolności wyizolowanych szczepów do produkcji bakteriocyn przeciwko *Micrococcus luteus* metodą dyfuzyjną rozpoczęto od namnożenia wyizolowanych szczepów bakterii mlekowych (48 h w 32°C). Po tym czasie zmierzono gęstość optyczną zawiesiny bakteryjnej przy pomocy densytometru McFarlanda Den-1B (Biosan). Test dyfuzyjny wykonano na zestalonym agarze odżywczym z glukozą. Szczepem wrażliwym był *Micrococcus luteus* (20030, DSMZ Berlin). Na każdej z szalek z agarem odżywczym wysiano murawę *M. luteus*. Następnie korkoborem wycięto studzienki. Do każdej studzienki wiano po 150 µl badanej zawiesiny bakterii LAB. Inkubowano w 32°C, przez 5 dni. Po tym czasie sprawdzano strefy zahamowania wzrostu wokół studzienek, które świadczyłyby o produkcji substancji antybakteryjnych przez bakterie mlekowe.

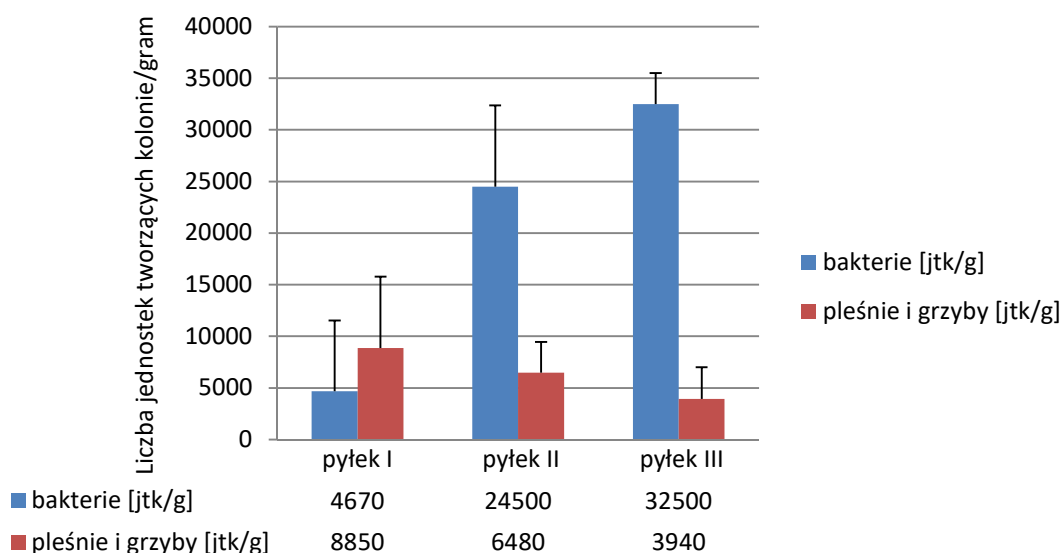
Ponieważ nie uzyskano zadawalających wyników w teście dyfuzyjnym, wykonano wstępne badania molekularne w celu identyfikacji genów odpowiedzialnych za kodowanie bakteriocyn, wykorzystując startery BCgr1NSf 5'-GGTGGTAAATACTATGGTAA-3' i BCgr1R1K 5'-CCCCAGTTAACAGAGCA-3' (Genomed). Skład mieszaniny reakcyjnej, parametry amplifikacji, rozdział elektroforetyczny oraz odczyt wyników były takie same jak dla reakcji PCR.

Wyniki

Ogólną liczbę mikroorganizmów w produktach pszczelich przedstawiono na rycinie 1 i 2. Skład ilościowy poszczególnych produktów pszczelich jest różny i zależy od wielu zmiennych. Pyłek I zawierał najmniej drobnoustrojów – $13,52 \times 10^3$ jtk/g, ale za to więcej pleśni i grzybów. Natomiast pyłek II zawierał $30,98 \times 10^3$, a pyłek III $36,44 \times 10^3$ jtk/g, przy czym w tych pierzgach było więcej bakterii. W przypadku mikroflory pierzgi dominowały bakterie od $3,52 \times 10^3$ jtk/g dla pierzgi I do $38,6 \times 10^3$ jtk/g dla pierzgi II i $10,4 \times 10^3$ jtk/g dla pierzgi III. Grzybów w tych produktach było niewiele od 40 do 630 jtk/g.

Produkty pszczele są bogatym źródłem mikroorganizmów, oprócz bakterii kwasu mlekowego, które były głównym celem izolacji i identyfikacji, dominującym rodzajem bakterii był *Bacillus* sp. Spośród ponad 120 szczepów bakterii izolowanych z pyłku i pierzgi tylko 16 spełniło kryteria wstępne dla bakterii mlekowych. Były to kolonie małe, mleczne i okrągłe, ich komórki miały kształt ziarniaków lub krótkich laseczek Gram-dodatnich i były katalazoujemne. I tylko te szczepy poddano badaniom molekularnym.

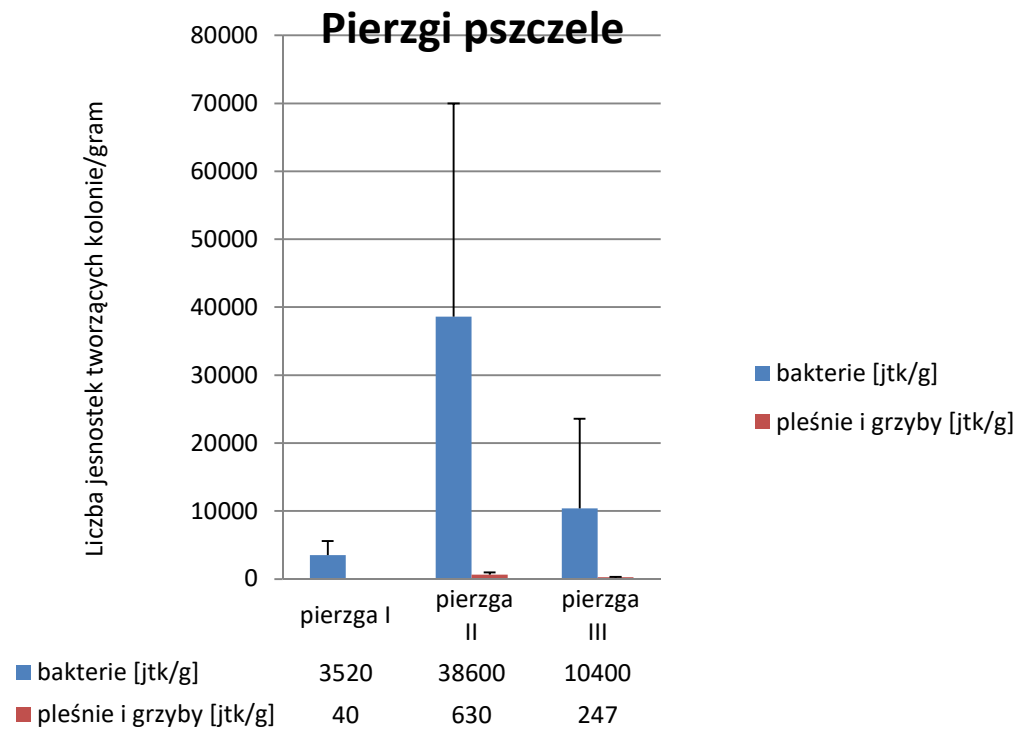
Pyłki pszczele



Ryc. 1. Ogólna liczba mikroorganizmów w badanych pyłkach pszczelich

Reakcja PCR pozwoliła sprawdzić czystość oraz potwierdzić przynależność wyizolowanych szczepów bakteryjnych, do bakterii mlekowych. Wynik rozdziału elektroforetycznego genomowego DNA badanych szczepów przedstawia rycina 3.

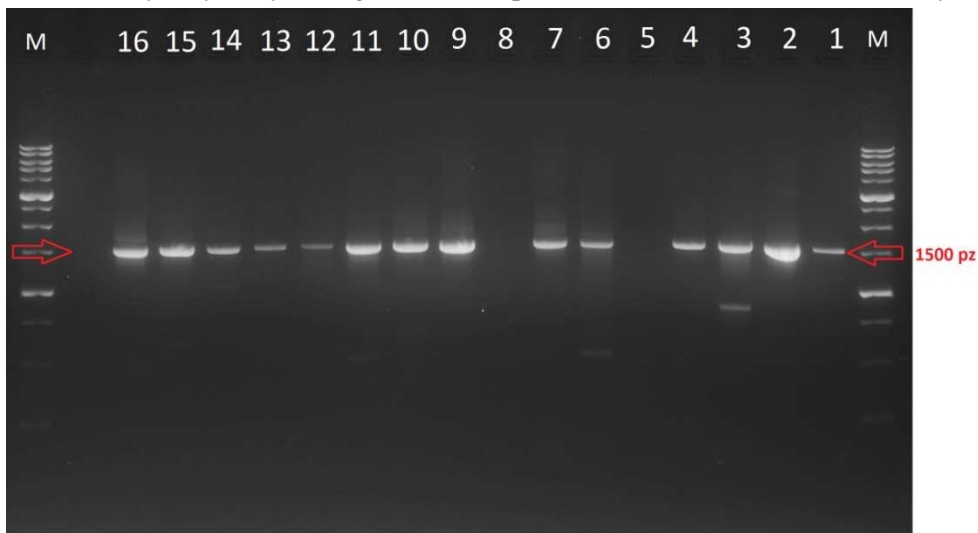
Przeanalizowano obrazy elektroforetyczne rozdziału DNA po reakcji RAPD-PCR z zastosowaniem różnych starterów (M13, D8635 oraz Coc1). Zanotowano przybliżone wielkości prążków w każdej ścieżce. Postępowano tak samo, w przypadku elektroforegramów próbek badanych (ryc. 4, 6, 7), jak i szczepów wzorcowych (przykładowa ryc. 5). Podjęto próbę porównania między sobą, wzorów prążkowych szczepów badanych. Zestawiono również wyniki dla bakterii wyizolowanych z produktów pszczelich z wynikami dla szczepów wzorcowych LAB. Sprawdzono czy nie ma między nimi istotnych podobieństw. Pokrywanie się wzorów prążkowych, dałoby możliwość identyfikacji badanych drobnoustrojów i nadanie im nazwy gatunkowej.



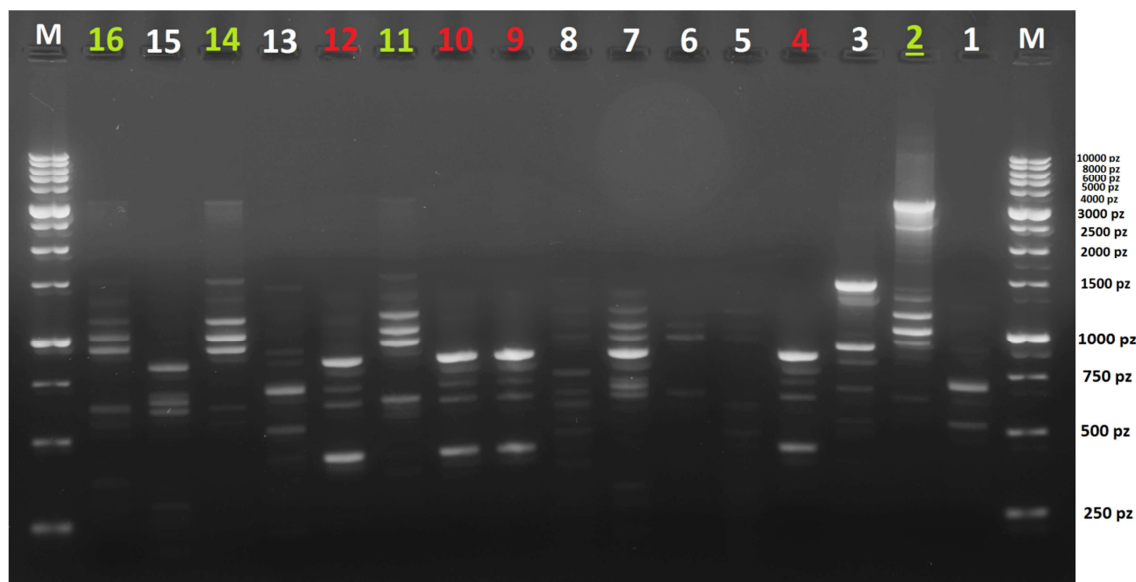
Ryc. 2. Ogólna liczba mikroorganizmów w badanych pierzgach pszczelich

Badanie zdolności wyizolowanych szczepów do produkcji bakteriocyn w teście dyfuzyjnym względem szczepu wrażliwego nie przyniosło oczekiwanych wyników. Mimo próby powtórzenia procedury, nie udało się zaobserwować stref zahamowania wzrostu bakterii *M. luteus*. Dlatego przeprowadzono wstępne badania PCR w kierunku identyfikacji genów kodujących bakteriocyny klasy II a z starterami BCgr1NSf i BCgr1R1K (ryc. 10). Obecność prążków dla szczepu 2 o wielkości 600 i 1 200 pz oraz dla szczepów 5 i 6 o wielkości 770 pz może świadczyć o obecności genów kodujących bakteriocyny klasy II a w genomie badanych LAB. Niemniej jednak wyniki te należy

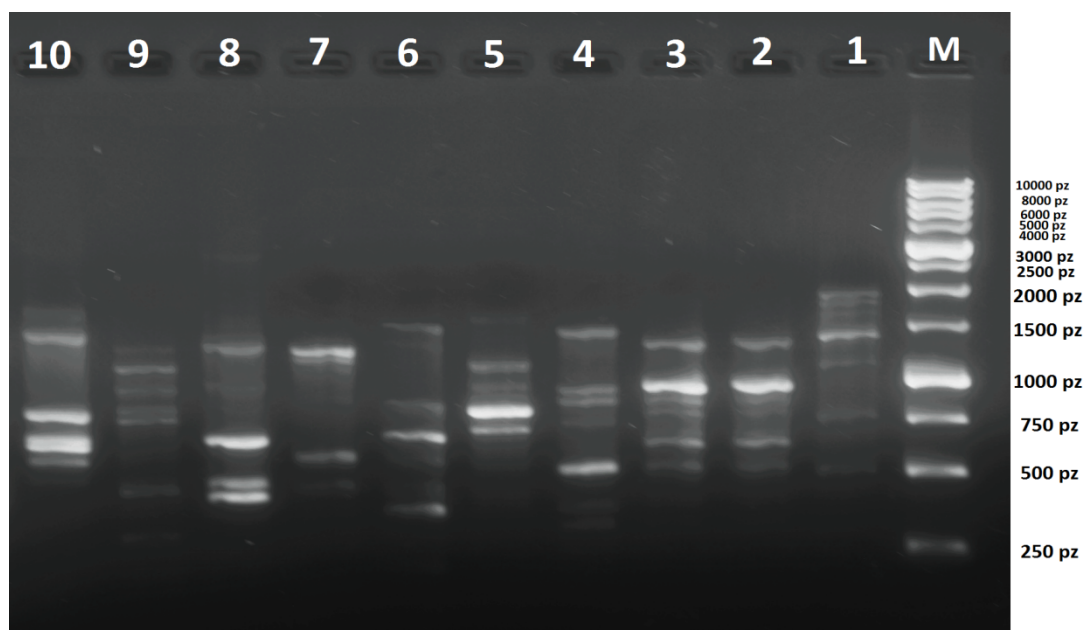
potraktować jako wstępne i w dalszej kolejności do badań genów odpowiedzialnych za kodowanie bakteiocyn wykorzystać i genomowe, i plazmidowe DNA oraz różne startery.



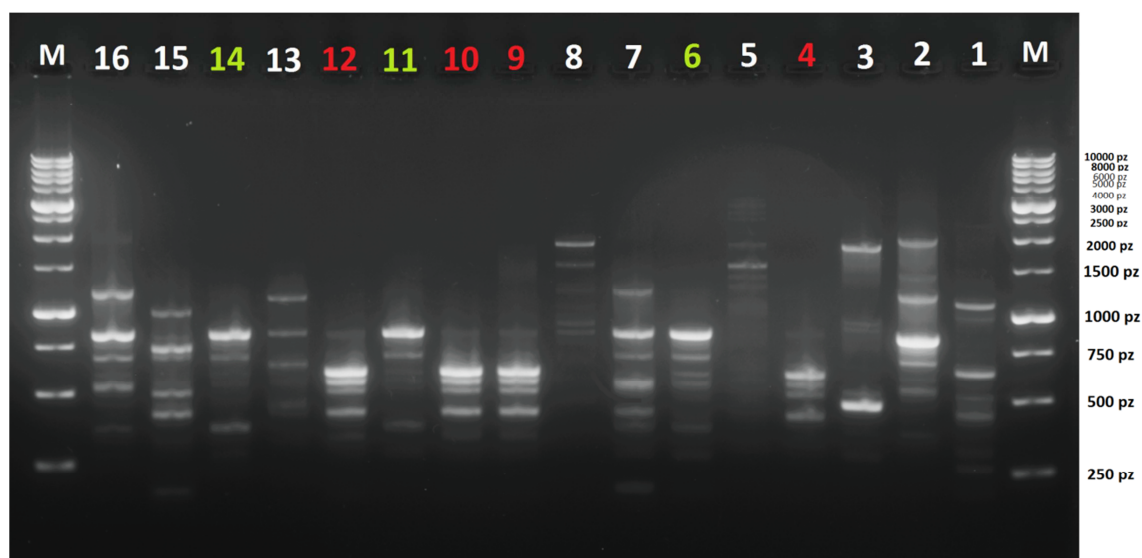
Ryc. 3. Elektroforegram rozdziału genomowego DNA analizowanych szczepów LAB po klasycznej reakcji PCR; M – marker wielkości; 1-16 – numery analizowanych szczepów; strzałką zaznaczony prążek o wielkości 1 500 pz.



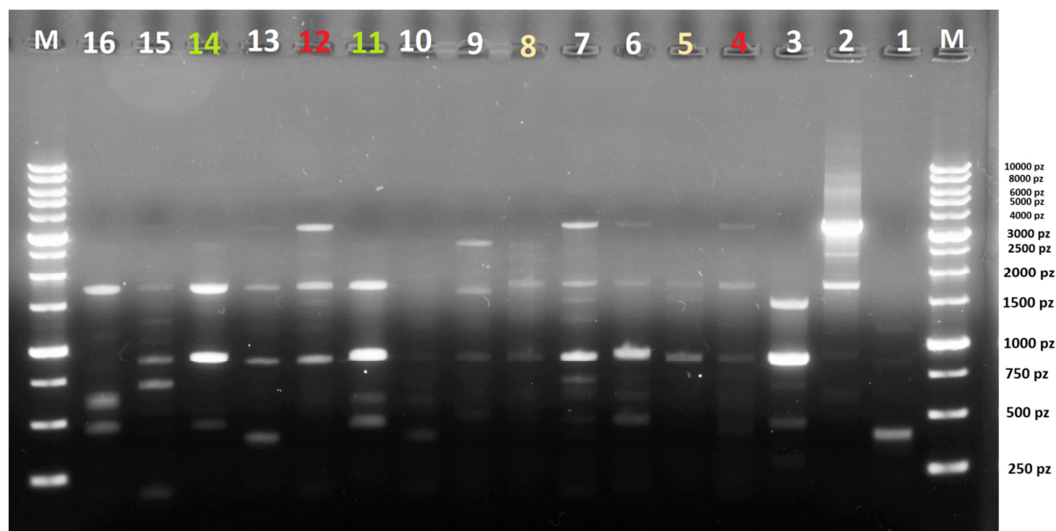
Ryc. 4. Elektroforegram rozdziału DNA badanych bakterii kwasu mlekowego po reakcji RAPD-PCR ze starterem M13, gdzie M – marker wielkości, 1-16 – numery analizowanych szczepów. Numery szczepów wykazujące podobny układ prążków zaznaczono takim samym kolorem, natomiast różniące się względem siebie oznaczono numerami o barwie białej.



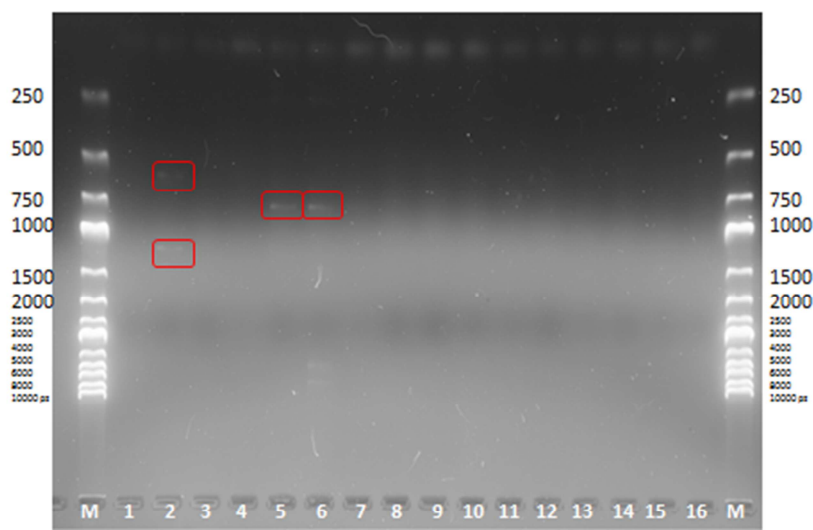
Ryc. 5. Elektroforegram rozdziału DNA szczepów wzorcowych LAB po reakcji RAPD-PCR z starterem M13 (numery ścieżek oznaczają LAB wzorcowe zgodne z opisem w Metodyce)



Ryc. 6. Elektroforegram rozdziału DNA badanych LAB po reakcji RAPD-PCR z starterem D8635 (oznaczenia jak na ryc. 4)



Ryc. 7. Elektroforegram rozdziłu DNA badanych LAB po reakcji RAPD-PCR z starterem Coc1 (oznaczenia jak na ryc. 4)



Ryc. 10. Elektroforegram rozdziłu genomowego DNA analizowanych szczepów LAB po reakcji PCR ze starterami dla bakteriocyn klasy IIa; M – marker wielkości; 1-16 – numery analizowanych szczepów; zaznaczono produkty amplifikacji

Dyskusja

Zestawiając ogólne wyniki dla pierzg i pyłków można powiedzieć, że średnia zawartość bakterii oraz OLM, była wyższa w pyłkach. W pierzgach występowało średnio mniej OLM, przede wszystkim pleśni i grzybów. Może być to związane z różnicą w składzie chemicznym obu rodzajów produktów. Powstające w trakcie wytwarzania pierzgi związki, głównie kwas mlekowy, działają antydeobnoustrojowo i hamują rozwój niektórych mikroorganizmów, chroniąc produkt przed zepsuciem. Standaryzacja produktów pszczelich nie jest możliwa, ze względu na częstą zmianę ich składu. Zależy on od warunków środowiskowych np. średnich temperatur dobowych, ilości opadów, wilgotności, stanu zdrowotnego pszczół oraz rodzaju zapyłanych przez nie roślin i może się zmieniać nawet co roku [Bartosiuk i Borawska, 2014].

Bakterie mlekowe, są mikroorganizmami trudnymi w hodowli, ze względu na wysokie wymagania pokarmowe. Poza tym, są wrażliwe na zmiany warunków środowiska bytowania. Kolonie, które raz wyrosły na podłożu MRS, po przeszczepieniu na takie samo, nowe podłoże, nie zawsze podejmują wzrost. Zdarza się, że uzyskanie dużej gęstości komórek w hodowli, przysparza nieco kłopotów [Sip i in., 2009].

Podczas badań wyizolowano 16 szczepów bakterii fermentacji mlekowej. W ich identyfikacji pomogły podstawowe testy, oraz obserwacje makroskopowe i mikroskopowe. Niemniej jednak niektóre podłoża MRS zostały zdominowane przez bakterie z rodzaju *Bacillus*. Egorov [Gilliam, 1979] badając mikroflorę pierzgi pszczelej, wykazał, iż zawiera ona ok. 17% bakterii z rodzaju *Bacillus*, stąd ich dominacja na większości hodowli LAB.

Pod względem morfologii najczęściej wyizolowano form cylindrycznych LAB. Mogły to być gatunki z rodzaju *Lactobacillus*, których komórki przyjmują kształt pałeczek lub laseczek [Jurkowski i Błaszczuk, 2012]. Aż 14 bakterii pochodziło z pyłku pszczelego, a tylko 2 szczepy z pierzgi. Pierzga była materiałem trudniejszym do analiz mikrobiologicznych LAB, większość szalek była porośnięta bakteriami *Bacillus*.

PCR pozwolił na potwierdzenie, że wszystkie wyizolowane szczepy należą do bakterii mlekowych. Na obrazie elektroforetycznym widoczny jest prążek o wielkości 1 500 pz. PCR pozwala również ocenić czy wyizolowany materiał biologiczny jest czystą kulturą. Jak wskazują wyniki, czystymi kulturami na pewno były szczepy numer: 1, 4, 7, 9, 10, 12, 13, 16, gdyż obecny jest tylko jeden produkt amplifikacji. Pozostałe zostały zanieczyszczone bakteriami przetrwalnikującymi. Problem zanieczyszczeń występuje dość ciężko. Wskazuje to, jak ważne są badania molekularne, potwierdzające jakość wyizolowanych szczepów, same testy fenotypowe są niewystarczające.

Do oceny zróżnicowania oraz próby identyfikacji wyizolowanych szczepów wybrano RAPD-PCR. Wyboru takiego dokonano z powodu wielu zalet jakie posiada ta technika.

Jest ona łatwa, szybka, a przede wszystkim nie wymaga znajomości sekwencji DNA [Basheer-Salimia i in., 2012]. W celu przeprowadzenia właściwej identyfikacji szczepów, wykonano reakcje RAPD, z różnymi starterami (M13, D8635, Coc1), co zdaniem wielu autorów zwiększa wiarygodność wyników [Cebeci i Gürakan, 2011; Lopez i in., 2008], przy zachowaniu takich samych warunków amplifikacji i rozdziału.

We wszystkich obrazach elektroforetycznych, takie same układy prążków badanych próbek zaznaczono jednakowymi kolorami. Wyróżnić można dwie grupy szczepów, które wykazują podobieństwo w profilach elektroforetycznych. Podobieństwa te powtarzają się przy zastosowaniu różnych starterów. Ścieżki oznaczone numerami 4, 9, 10, 12 to najprawdopodobniej ten sam szczep, podobnie jak 11 i 14 to ten sam gatunek. Potwierdzeniem tego jest również wygląd makro- i mikroskopowy kolonii.

Porównując profile prążkowe szczepów badanych, z profilami szczepów wzorcowych, nie zaobserwowano istotnych podobieństw. W konsekwencji nie udało się jednoznacznie zidentyfikować badanych bakterii i nadać im nazwy gatunkowe.

Jak wynika z badań Olofsson i in. [2016] gatunkami najczęściej i w największych ilościach występującymi w produktach pszczelich, są *Lb. kunkeei*, *Lb. melis*, *Lb. mellifer*, *Lb. apis*, *Lb. melliventris*, *Lb. kimbladii*, *Lb. kullabergensis*, *B. asteroides*, *Lb. helsingborgensis*, *Lb. apinorum*, *B. coryneforme*. W niniejszym badaniu, dostępne szczepy wzorcowe, tylko w niewielkim stopniu pokrywały się z przedstawionymi powyżej gatunkami. Dlatego, też należałoby przeprowadzić badania porównawcze z wykorzystaniem większej ilości szczepów wzorcowych LAB. Różnorodność LAB jest tak duża, że najprawdopodobniej w badanych produktach pszczelich znajdowały się inne gatunki niż wzorcowe LAB.

Należy wykonać dokładniejsze badania, potwierdzające przynależność gatunkową wyizolowanych szczepów LAB. Skuteczne mogło być sekwencjonowanie wyizolowanego materiału genetycznego i wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych.

Badanie zdolności LAB do produkcji bakteriocyn metodą dyfuzyjną na szczep wrażliwy nie przyniosło oczekiwanego rezultatu. Nie zaobserwowano stref zahamowania wzrostu przy żadnym z badanych szczepów. Nie oznacza to jednak, że badane LAB nie są zdolne do produkcji bakteriocyn. Najwidoczniej liczba komórek w zawiesinie bakteryjnej była zbyt niska, przez co mikroorganizmy nie zdołały wytworzyć odpowiedniej ilości związków antybakteryjnych, zdolnych całkowicie zahamować wzrost *M. luteus*. Dlatego zdecydowano się na wstępne badania molekularne wykorzystując parę starterów dla bakteriocyn klasy II a. W genomowym DNA zaobserwowano produkty amplifikacji dla szczepów 2, 5 i 6, które mogą świadczyć o zdolności do kodowania bakteriocyn. Oczywiście, badania należy kontynuować.

Więckowicz i współ. [2010] opracowali szybką metodę wykrycia genów kodujących bakteriocynę klasy II a, za pomocą reakcji PCR z zastosowaniem odpowiednich starterów. Przeanalizowano siedem par starterów, które umożliwiały zlokalizowanie genu kodującego badaną bakteriocynę. Materiałem badawczym było metagenomowe DNA LAB wyizolowanych z polskich serów. Wyniki wykazały duży potencjał mikroorganizmów obecnych w serach, do produkcji bakteriocyn klasy II a.

Mimo niepowodzenia w wykryciu zdolności bakteriobójczych badanych bakterii metodą dyfuzyjną, należy zaznaczyć, że metoda ta, wykonywana przez wielu naukowców daje zadowalające efekty i jest skuteczna. Pozwala ona bez skomplikowanej analizy chemicznej, wykryć związki o działaniu antagonistycznym wobec mikroorganizmów badanych. Gwiazdowski i in. [2013] przy pomocy testu dyfuzyjnego oceniali działanie fungistatyczne LAB wyizolowanych z kiszonek, wobec patogennych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Efekty były zróżnicowane, lecz udało się zaobserwować wyraźne strefy zahamowania wzrostu i wyróżnić szczepy o silnych właściwościach grzybobójczych. Natomiast Ünlü i współpracownicy [2015] przebadali 108 szczepów LAB, pod kątem zdolności do produkcji bakteriocyn, skierowanych przeciwko *Listeria monocytogenes*. Jako szczepu kontrolnego, wrażliwego na bakteriocyny, użyli m. in. *M. luteus*. Detekcji tworzonych przez LAB bakteriocyn, dokonano przy użyciu metody dyfuzyjnej. Z pośród wszystkich badanych gatunków, 86 wykazywało zdolności hamujące *L. monocytogenes*.

Podsumowanie i wnioski

Ogólna liczba mikroorganizmów w produktach pszczelich jest zróżnicowana i zależy od jego pochodzenia. Liczną grupą mikroorganizmów stanowiących mikroflorę pierzgi i pyłku pszczelego są bakterie *Bacillus*. W analizowanych produktach pszczelich obecne są LAB o kształcie kulistym lub wydłużonym (z rodzaju *Lactobacillus*). LAB obecne w produktach pszczelich charakteryzują się bioróżnorodnością. Wśród 16 wyizolowanych kultur bakterii, można wyróżnić 12 różnych gatunków. Pyłek pszczeli jest produktem łatwiejszym do izolacji LAB niż pierzga. Metoda RAPD-PCR jest szybka, łatwa i odpowiednia do różnicowania bakterii kwasu mlekowego w produktach żywnościowych i daje lepsze wyniki w przypadku przeprowadzenia tej samej reakcji z różnymi starterami. Wstępne wyniki molekularne wskazują, że LAB w produktach pszczelich są zdolne do produkcji bakteriocyn klasy II a. Konieczne jest jednak przeprowadzenie dalszych badań oraz odpowiednie zmodyfikowanie i ulepszenie testu dyfuzyjnego.

Projekt został sfinansowany ze środków DS-3706/KTFiMT/2017

Literatura

1. Asurmendi P., Pascual L., Dalcerro A., Barberis L. (2014). Incidence of lactic acid bacteria and *Aspergillus flavus* in brewer's grains and evaluation of potential antifungal activity of these bacteria. *Journal of Stored Products Research*, 56, 33-37.
2. Bartosiuk E., Borawska M.H. (2014). Skład chemiczny i właściwości antybakteryjne oraz przeciwnowotworowe pierzgi. *Pszczelarstwo*, 5, 2-3.
3. Basheer-Salimia R., Award M., Salama A., Alseekh S., Harb J., Hamdan Y. (2012). Molecular polymorphisms in Palestinian Figs (*Ficus carlica* L.) as revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10, 169-175.
4. Bieńkowska M. (2003). Pyłek kwiatowy. *Pasieka*, 4, 14.
5. Cebeci A., Gürakan G.C. (2011). Comparative typing of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains using multilocus sequence typing and RAPD-PCR. *European Food Research and Technology*, 233, 377-385.
6. Feás X., Pilar Vázquez-Tato M., Estevinho L., Seijas J.A., Iglesias A. (2012). Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality. *Molecules*, 17, 8359-8377.
7. Gilliam M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10, 3, 269-274.
8. Gwiazdowska D., Trojanowska K. (2005). Bakteriocynty – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, 68, 1, 114-130.
9. Gwiazdowski R., Kluczyńska K., Gwiazdowska D. (2013). Fungistatyczna aktywność bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kiszzonek. *Postępy w Ochronie Roślin*, 53, 3, 505-509.
10. Jurkowski M., Błaszczak M. (2012). Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych*, 3, 61, 493-504.
11. Klaenhamer T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 12, 39-86.
12. Lamei S., Hu Y.O.O., Olofsson T.C., Andersson A.F., Forsgren E., Vásquez A. (2017). Improvement of identification methods for honeybee specific Lactic Acid Bacteria; future approaches. *Public Library of Science ONE*, 12, 3, 1-12.
13. Libudzisz Z. (2009). Bakterie fermentacji mlekowej. [W:] *Mikrobiologia techniczna tom 2. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*. Red. K. Mostowik. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 25-37.
14. Lopez I., Torres C., Ruiz-Larrea F. (2008). Genetic typification by pulsed-fields gel electrophoresis (PFGE) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* wine strains. *European Food Research and Technology*, 227, 547-555.
15. Makarova K., Slesarev A., Wolf A., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., i in. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 42, 15611-15616.
16. Muhialdin B.J., Hassan Z., Saari N. (2013). Lactic acid bacteria in biopreservation and the enhancement of the functional quality of bread. [In:] *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Red. M. Kongo. Wydawnictwo InTech, 155-172.
17. Olofsson T.C., Butler É., Markowicz P., Lindholm C., Larsson L., Vásquez A. (2016). Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International World Journal*, 13, 668-679.
18. Parada J.L., Caron C.R., Medeiros A.B.P., Socol C.R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bact. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 3, 521-542.
19. Paradowska K., Zielińska A., Krawiec N. (2014). Skład i właściwości antyoksydacyjne barwnych frakcji wyodrębnionych z pszczelego pyłku kwiatowego. *Postęp fitoterapii*, 4, 209-215.
20. Pawłowska A. M., Zannini E., Coffey A., Arendt E. K. (2012). „Green Preservatives” Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. [In:] *Advances in Food and Nutrition Research*. Volume 66. Red. H. Jeyakumar. Elsevier, Singapur, 217-238.
21. Schnürer J., Magnusson J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 70-78.
22. Sip A., Krasowska M., Więckowicz M., Grajek W. (2009). Metody skryningu bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej. *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 62, 1, 5-26.

23. Šušková J., Kos B., Beganović B., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošič S. (2010). Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 3, 296-307.
24. Swetwathana A., Visessanguan W. (2015). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Science*, 109, 101-105.
25. Tomaszewska M., Grzebińska W., Bilka B., Trafiałek J. (2014). Charakterystyka bakteriocyn jako naturalnych konserwantów żywności. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 1, 84-89.
26. Ünlü G., Nielsen B., Ionita C. (2015). Production of Antilisterial Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Dairy-Based Media: A Comparative Study. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 7, 259-274.
27. Vásquez A., Forsgren E., Friesz I., Paxton R.J., Flaberg E., Szekely L., Olofsson T.C. (2012). Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *Public Library of Science ONE*, 7, 3, 1-9.
28. Więckowicz M., Schmidt M., Sip A., Grajek W. (2010). Development of a PCR-based assay for rapid detection of class IIa bacteriocin genes. *Applied Microbiology*, 52, 281-289.
29. Zacharof M.P., Lovitt R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. A Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.

MONIKA TOMCZYK¹, BARTŁOMIEJ KOZYRA¹, MAŁGORZATA DŻUGAN¹

¹Katedra Chemii i Toksykologii Żywności, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski

WPŁYW PROCESU KREMOWANIA NA JAKOŚĆ MIODU

Streszczenie

Podczas długotrwałego przechowywania miody naturalne ulegają procesowi krystalizacji. Sposób krystalizacji jest uzależniony od odmiany miodu, a skryształizowany miód jest trudniej rozpuszczalny i często przybiera nieatrakcyjną wizualnie formę. Przejęcie kontroli nad krystalizacją miodu (kremowanie) może doprowadzić do stworzenia produktu smarownego i łatwego w dozowaniu, bez obniżenia jego jakości. Celem pracy było zbadanie wpływu procesu kremowania na jakość miodu. Materiał badawczy stanowił świeżo odebrany miód rzepakowy (n=3), i miód skremowany w warunkach pasiecznych z wykorzystaniem profesjonalnej kremownicy do miodu. Miody (naturalnie skryształizowane-NK i kremowane-KR) poddano analizie pod względem właściwości fizykochemicznych (zawartość wody, pH, kwasowość ogólna, przewodność elektryczna), właściwości antyoksydacyjnych (test DPPH), zawartości związków fenolowych oraz aktywności enzymatycznej (diastaza, β -galaktozydaza, α -glukozydaza i α -mannozydaza). Badania wykazały, że proces kremowania nie wpływał istotnie ($p>0,05$) na zawartość wody, pH oraz przewodność elektryczną. Zastosowanie procesu kremowania nie wpływało na kwasowość ogólną miodów ($p>0,05$). Proces kremowania nie wpłynął istotnie na aktywność antyoksydacyjną i zawartość związków polifenolowych, a stwierdzony spadek aktywności analizowanych enzymów nie przekraczał 20%. Badania wykazały, że kremowanie poprawia atrakcyjność konsumencką miodu z całkowitym zachowaniem jego aktywności biologicznej.

Słowa kluczowe: miód, krystalizacja, kremowanie, jakość, aktywność biologiczna

Wprowadzenie

Miód pszczeli to wytwarzany przez pszczoły miodne (*Apis mellifera*) naturalnie słodki produkt spożywczy, który obok właściwości odżywczych posiada cenne właściwości lecznicze [Alvarez-Suarez i in., 2014]. Terapeutyczne działanie miodu jest ściśle związane z jego składem chemicznym, a ten z kolei jest uzależniony od pożytku z jakiego powstał (odmiany miodu) [Bertoncelj, 2007]. Niezależnie od odmiany miód zawiera około 70-80% cukrów prostych (fruktoza i glukoza) i 18-20% wody. Pozostałe 3-5% to substancje warunkujące bioaktywność miodu takie jak

enzymy, witaminy, składniki mineralne, aminokwasy i związki polifenolowe [Alvarez-Suarez i in., 2014; da Silva i in., 2016].

Miód świeży bezpośrednio po pobraniu z ula ma konsystencję płynną (patoka), a podczas przechowywania stopniowo zmienia swoją strukturę w formę stałą (krupiec). Proces zestalania miodu nazywany jest krystalizacją, a jej szybkość zależy przede wszystkim od składu chemicznego, ale też od lepkości, stosunku fruktozy/glukozy, wilgotności, aktywności wody (aw), obecności zarodników krystalizacji (tj. mikrokryształy i ziarna pyłku), czasu i temperatury przechowywania oraz obróbki termicznej [Bogdanov, 2008; Grégrová i in., 2015]. Prekursorem krystalizacji miodu jest glukoza [Costa i in., 2015]. Miody, które zawierają wysoką zawartość tego monosacharydu (przewaga glukozy nad fruktozą) krystalizują szybciej, np. miód rzepakowy zestala się już po kilku dniach od odebrania z ula [Amir i in., 2010]. Najwolniej zaś, krystalizuje miód akacjowy, który pozostaje w stanie płynnym nawet kilkanaście miesięcy. Struktura powstających podczas krystalizacji kryształów jest uzależniona od odmiany miodu, niektóre odmiany zestalają się w duże, twarde kryształy co utrudnia dozowanie miodu [Costa i in., 2015]. Ponadto, miody, w których tworzy się mniejsza ilość zarodków krystalicznych rozwarstwiają się, przybierając często nieatrakcyjne wizualnie formy [Gleiter i in., 2006, Bogdanov, 2008].

Pomimo, że właściwości odżywcze oraz lecznicze miodu są znane od wielu lat, jego spożycie w Polsce jest wciąż stosunkowo niskie (mniej niż 100 g/miesiąc/osobę) [Gontarz i in., 2016]. Wykazano, że konsumenci przy wyborze miódów kierują się następującymi kryteriami: odmiana - około 32% ankietowanych, konsystencja - blisko 30%, a dla pozostałych ważna jest barwa oraz przyzwyczajenie [Giemza, 2004]. Tak duży odsetek nabywców miódów preferujących miód płynny, wskazuje że należy poszukiwać metod zapobiegających krystalizacji miodu. Najszybciej stosowanym przez pszczelarzy zabiegiem opóźniającym proces krystalizacji miodu lub przywracającym go do formy płynnej jest podgrzewanie [Bakier, 2007]. Zalecane temperatury (ok. 40°C) nie powodują obniżenia jakości miodu, ale nie zabezpieczają miodu przed ponowną krystalizacją, często w krótkim czasie. Z drugiej strony zastosowanie wyższej temperatury (przegrzanie miodu), pozwoli dłużej utrzymać miód w stanie płynnym, ale równocześnie powoduje unieczynnienie termolabilnych enzymów, które są odpowiedzialne za właściwości antybakteryjne miodu [Wilczyńska, 2011]. Okazuje się jednak, że przejście kontroli nad krystalizacją miodu może doprowadzić do stworzenia produktu smarownego i łatwego w dozowaniu, bez utraty jego jakości [Grégrová i in., 2015].

Kremowanie, czyli cykliczne mieszanie miodu w momencie, gdy rozpoczyna on krystalizować jest procesem wieloetapowym [Gonnet, 1977]. Kremowanie miodu jest przeprowadzane w specjalnych zbiornikach (tzw. kremownice) z zamontowanym wewnątrz mieszadłem. Mieszanie ma na celu zahamowanie nadmiernego wzrostu kryształków, które powstały w procesie krystalizacji cukru i rozdrobnienie ich do jak najmniejszych rozmiarów [Dyce, 1931]. Początek procesu kremowania jest związany z wytworzeniem zarodków krystalizacji, samoistnie lub poprzez dodanie do patoki „startera” w postaci szczepu krystalicznego [Bakier, 2002], które szybko się powiększają, tworząc większe struktury [Fearnley, 2012]. Mieszanie powstających kryształów monohydratów glukozy, powoduje ich mechaniczne rozcieranie i nie dopuszcza do tworzenia dużych aglomeratów [Subramanian i in., 2000]. Niebywałą zaletą kremowania miodu pszczelego jest brak zmian jakości miodu, ponieważ proces nie wymaga zastosowania podwyższonej temperatury [Bakier, 2004]. Dodatkową zaletą kremowania miodu, jest możliwość jego wzbogacania w dodatki roślinne [Dżugan i in., 2007].

Celem pracy była ocena wpływu procesu kremowania miodu na aktywność biologiczną miodu rzepakowego.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowił miód rzepakowy z sezonu 2017 (n=3), pochodzący bezpośrednio od trzech pszczelarzy z terenu woj. lubelskiego. Badane miody poddano procesowi kremowania w takich samych warunkach. Bezpośrednio po odwirowaniu miód kremowano przez 24 godziny (15 min mieszanie/60 min postój) w temperaturze 21°C, wykorzystując profesjonalną kremownicę (typ W20088Z, Łysoń, Polska). Otrzymane miody kremowane (KR) przechowywano w temperaturze 20±2°C maksymalnie 2 tygodnie do czasu wykonania analiz. Jako kontrolę wykorzystano świeży miód, przechowywany w tych samych warunkach, który ulegał naturalnej krystalizacji w czasie 4-5 dni (NK).

Analiza jakości miodu została przeprowadzona zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (2015) dotyczącym metod analiz wymaganych do oceny jakości miodu i obejmowała: refraktometryczny pomiar zawartości wody (refraktometr dedykowany do miodu RHB-90ATC), pomiar pH (pH-metr Elmetron CP-401), oznaczenie kwasowości ogólnej (miareczkowanie 20% w/v wodnego roztworu miodu 0,1M roztworem NaOH w obecności fenoloftaleiny jako wskaźnika), pomiar przewodności elektrycznej (konduktometr Elmetron CPC-401) oraz pomiar aktywności amylazy na podstawie liczby diastazowej (test Phadebas® Honey Diastase, Magle AB, Szwecja).

Aktywność biologiczną miodów oceniano w oparciu o dodatkowe parametry, tj. aktywność antyoksydacyjną, zawartość związków polifenolowych i aktywność enzymów glikolitycznych. Aktywność przeciwutleniającą oznaczono testem DPPH wykorzystując syntetyczny wolny rodnik 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl według Gorjanovica i in. [2013], wyniki wyrażono jako % inhibicji wolnych rodników. Do oznaczenia całkowitej zawartości związków fenolowych zastosowano metodę Folina-Ciocalteu w modyfikacji Beretty i in. [2005], stosując do kalibracji kwas galusowy (Sigma-Aldrich, USA) w zakresie stężeń 0-30 mg/ml. Wyniki podano w równoważnikach kwasu galusowego (mg GAE/kg). Aktywność wybranych glikozydaz: β -galaktozydazy (β GAL), α -glukozydazy (α GLU), α -mannozydazy (α MAN) oznaczono zgodnie z procedurą opisaną przed Dżugan i in. [2015], z użyciem odpowiednich p-nitrofenolowych substratów i wyrażono w jednostkach mU [μ mol/g/min].

Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym SD. Istotność różnic dla poszczególnych parametrów pomiędzy miodem kontrolnym i kremowanym oceniano przy pomocy testu T Studenta, przyjmując poziom istotności $p < 0,05$. Wyznaczono współczynniki korelacji Pearsona (r) dla badanych parametrów jakości miodu.

Wyniki i dyskusja

W Tabeli 1 zaprezentowano wyniki analizy parametrów miodu stosowanych do oceny jakości, wg obowiązujących przepisów (MRiRW, 2015). Wszystkie testowane miody spełniały wymagania odnośnie zawartości wody (mniej niż 20%), pH i kwasowości ogólnej (poniżej 50 mval/kg), przewodności elektrycznej (nie więcej niż 0,8 mS/cm) oraz liczby diastazowej (nie mniej niż 8). Proces kremowania nie wpłynął istotnie ($p > 0,05$) na zawartość wody w analizowanych próbkach, największą różnicę stwierdzono dla miodu 1 (0,3%). Kwasowość czynna miodu (pH) mieściła się w granicach od 3,65 do 3,96 i ulegała niewielkim zmianom podczas obróbki. Proces kremowania nie wpłynął istotnie ($p > 0,05$) na wartość pH. Dla miodów naturalnie skryształizowanych kwasowość miareczkowa mieściła się w przedziale 13,7-20,0 mval/kg, natomiast dla miodów kremowanych 15,0-22,7 mval/kg. Uzyskane różnice wskazują, że proces kremowania nie wpływa na zwiększenie kwasowości miareczkowej badanych miodów (1-13%). Przewodność elektryczna, która jest miarą ilości związków mineralnych, kształtowała się na podobnym poziomie ok. 0,06 mS/cm, w miodach kremowanych i kontrolnych. Wartość liczby diastazowej w miodach naturalnie skryształizowanych i kremowanych był zbliżony w próbce 1 i 2 (przewyższał wymagania rozporządzenia MRiRW, 2015), podczas gdy w próbce 3 obserwowano znacznie niższą wartość tego parametru (zaledwie

8,36 jednostek DN). Proces kremowania miodu nie wpłynął na liczbę diastazową miodów ($p > 0,05$). Liczba diastazowa badanych miodów była zbliżona do wartości uzyskanych przez Godlewską i Świślocką [2015], które stwierdziły w miodach rzepakowych średnią wartość na poziomie 16 DN. Parametr ten w praktyce pszczelarskiej jest stosowany do kontroli właściwego postępowania z miodem w pasiece, a jego obniżony poziom wskazuje na obróbkę termiczną (niewłaściwe upłynianie miodu).

Tabela 1. Wyniki analizy parametrów określonych w rozporządzeniu dla miodu (MRiRW, 2015).

Podano wartość średnią \pm SD.

Próbka	Zawartość wody [%]	pH	Kwasowość ogólna [mval/kg]	Przewodność elektryczna [mS/cm ³]	Liczba diastazowa [DN]
Miód 1 ^{NK}	18,97 \pm 0,03	3,68 \pm 0,01	20,00 \pm 2,00	0,060 \pm 0,007	14,08 \pm 0,10
Miód 1 ^{KR}	18,67 \pm 0,06	3,65 \pm 0,01	22,67 \pm 2,52	0,066 \pm 0,007	15,51 \pm 1,20
Miód 2 ^{NK}	19,17 \pm 0,11	3,75 \pm 0,02	17,33 \pm 1,53	0,050 \pm 0,010	15,22 \pm 0,20
Miód 2 ^{KR}	19,17 \pm 0,06	3,66 \pm 0,01	17,67 \pm 2,31	0,046 \pm 0,002	13,22 \pm 1,52
Miód 3 ^{NK}	19,13 \pm 0,02	3,88 \pm 0,01	13,67 \pm 1,53	0,048 \pm 0,005	8,36 \pm 0,95
Miód 3 ^{KR}	19,20 \pm 0,10	3,96 \pm 0,01	15,00 \pm 1,00	0,056 \pm 0,005	10,08 \pm 0,67

NK-nie kremowane, KR-kremowane

W analizowanych miodach oznaczono poziom składników bioaktywnych, które kształtują wartość prozdrowotną miodu. Wśród parametrów nie wymaganych w standardowej ocenie, wyznaczono aktywność antyoksydacyjną, zawartość związków fenolowych oraz aktywność trzech enzymów glikolitycznych (Tab. 2). Zdolność badanych miodów do zmiatania rodnika DPPH kształtowała się na poziomie 11,4 do 24,5% inhibicji i była porównywalna do wyników uzyskanych przez Majewską i Trzaneek [2009]. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych zmian aktywności antyoksydacyjnej miodów w procesie kremowania (Tab. 2). Największy wzrost (o ok. 25%) obserwowano dla 1 próbki miodu ($p > 0,05$).

Zawartość związków fenolowych w analizowanych miodach naturalnie skrzystalizowanych była zbliżona (Tab. 2). Proces kremowania nie wpłynął istotnie ($p > 0,05$) na ich zawartość. Współczynnik korelacji Pearsona dla zawartości związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej mierzonej testem DPPH wyniósł 0,64.

Miód rzepakowy w porównaniu do innych miodów nektarowych charakteryzuje się niską aktywnością antyoksydacyjną i antybakteryjną. W tym pierwszym aspekcie

uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami innych autorów [Majewska i Trzaneek, 2009; Wilczyńska i Przybyłowski, 2009; Godlewska i Świsłocka, 2015] oraz wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi dla miodów odmianowych z Podkarpacia [Dżugan i in., 2015].

Aktywność badanych glikozydaz (β -galaktozydazy, α -glukozydazy oraz α -mannozydazy) w analizowanych miodach była zbliżona zarówno w miodach naturalnie skrzystalizowanych i kremowanych (Tab. 2). Wśród badanych enzymów najwyższą aktywność stwierdzono dla β -galaktozydazy (β GAL), następnie dla α -glukozydazy (α GLU) i α -mannozydazy (α MAN). Aktywność tych enzymów nie jest powszechnie badana w miodzie, ale uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych dla miodów podkarpackich [Dżugan i in., 2013]. Proces kremowania nie wpłynął istotnie na aktywność badanych enzymów w miodzie ($p>0,05$).

Tabela 2. Wyniki analiz składników bioaktywnych w miodach.

Podano wartość średnią \pm SD.

Próbka	Aktywność przeciwutleniająca [% inhibicji]	Całkowita zawartość związków fenolowych [mg GAE/kg]	Aktywność β GAL [μ mol/g/min]	Aktywność α GLU [μ mol/g/min]	Aktywność α MAN [μ mol/g/min]
Miód 1 ^{NK}	17,86 \pm 0,24	261,26 \pm 10,19	0,50 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02
Miód 1 ^{KR}	19,75 \pm 0,97	257,66 \pm 12,74	0,41 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01
Miód 2 ^{NK}	18,15 \pm 1,29	280,18 \pm 11,47	0,54 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
Miód 2 ^{KR}	24,49 \pm 2,34	339,64 \pm 14,01	0,44 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02
Miód 3 ^{NK}	11,36 \pm 0,25	236,04 \pm 5,10	0,46 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01
Miód 3 ^{KR}	13,98 \pm 0,57	239,64 \pm 15,29	0,50 \pm 0,03	0,18 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01

NK-nie kremowane, KR-kremowane

W dostępnej literaturze brakuje danych dotyczących porównania właściwości biologicznych miodu poddanego procesowi kremowania z miodem krystalizującym naturalnie. W tym aspekcie niniejsza praca dostarcza naukowego potwierdzenia przekonania pszczelarzy, że kremowanie miodu nie obniża jego jakości. Badania porównawcze miodów pochodzących z tego samego źródła naturalnie skrzystalizowanych i poddanych procesowi kremowania nie wykazały istotnego ($p>0,05$) wpływu procesu na parametry jakości miodu. Obserwowana zmienność

(w granicach 10-30%) może być wynikiem różnic w samym procesie kremowania, jak również wyjściowej jakości miodu. Podstawowe parametry jakości miodu tj pH, kwasowość miareczkowa, przewodność elektryczna czy zawartość wody nie ulegały istotnym zmianom podczas kremowania miodu. Ponadto, miody kremowane wykazywały zbliżoną aktywność antyoksydacyjną i zawartość związków polifenolowych oraz aktywność enzymów (diastaza, β -galaktozydaza, α -glukozydaza, α -mannozydaza) do miodów poddanych naturalnej krystalizacji.

Wnioski

Proces kremowania nie wpływa na parametry fizykochemiczne miodu. Pozwala w pełni zachować aktywność biologiczną miodu, w tym właściwości antyoksydacyjne i aktywność enzymatyczną.

Literatura

1. Alvarez-Suarez J.M., Gasparrini M., Forbes-Hernández T.Y., Mazzoni L., Giampieri F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods*, 3(3), 420-432.
2. Amir Y., Yesli A., Bengana M., Sadoudi R., Amrouche T. (2010). Physico-chemical and microbiological assessment of honey from Algeria. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(9), 1485-1494.
3. Bakier S. (2002). Charakterystyki mocy przy mieszaniu krupca miodowego mieszałem łapowym. *Zeszyty Naukowe Politechniki Białostockiej. Budowa i Eksploatacja Maszyn* 9, 19-28.
4. Bakier S. (2004). Badanie kinetyki mieszania szczepu krystalicznego z cieczą newtonowską o dużej lepkości. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 3, 9-10.
5. Bakier S. (2007). Metody upłynniania miodu. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 1, 32-35.
6. Beretta G., Granata P., Ferrero M., Faccino F.M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191. doi: 10.1016/j.aca.2004.11.010.
7. Bertonec J., Doberšek U., Jamnik M., Golob T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822-828.
8. Bogdanov S. (2008). Storage, crystallisation and liquefaction of honey, *Bee Product Science*, 1-5. <http://www.bee-hexagon.net/>
9. Costa L.C.V., Kaspchak E., Queiroz M.B., De Almeida M.M., Quast E., Quast L.B. (2015). Influence of temperature and homogenization on honey crystallization. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(2), 155-161.
10. Da Silva P.M., Gauche C., Gonzaga L.V., Costa A.C.O., Fett R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 1, 309-323.
11. Dyce E.J. (1931). Fermentation and crystallization of honey. *Cornell University Agricultural Experiment Station Bulletin* 528, CUAES, Ithaca, NY.
12. Dżugan M., Wesołowska M., Puchalski Cz., Zaguła G., Czernicka M., Kisała J., Kaczmarski M. (2015). Rola interakcji międzypierwiastkowych w ograniczeniu biodostępności metali ciężkich w łańcuchu pokarmowym człowieka. *Wydawnictwo UR, Rzeszów*, 1-123.
13. Dżugan M., Sowa P., Kwaśniewska M., Wesołowska M., Czernicka M. (2017). Physicochemical parameters and antioxidant activity of bee honey enriched with herbs. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(1), 74-81.
14. Fearnley L. (2012). Compositional analysis of manuka honeys by high-resolution mass spectrometry: Identification of manuka-enriched archetypal molecule, *Food Chemistry*, 132, 948-953.
15. Giemza M. (2004). Badanie preferencji konsumenckich cech jakościowych miodów naturalnych. *Zeszyty Naukowe Akademii Ekonomicznej w Krakowie*, 653, 13-27.
16. Gleiter R.A., Horn H., Isengard H.D. (2006). Influence of type and state of crystallization on the water activity of honey. *Food Chemistry*, 96(3), 441-445.
17. Godlewska M., Świsłocka R. (2015). Fizykochemiczne i przeciwdrobnoustrojowe właściwości miodów z rejonów podlasia, *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych*, 65, 347-352.
18. Gonnet M. (1977). Honey liquefaction, pasteurization, and induced crystallization. *Apiacta*, 3, 1-3.

19. Gontarz A., Błońska I., Socha S. (2016). Analiza preferencji konsumenckich studentów dotycząca miodów pszczelich, *Wiadomości Zootechniczne*, 65(4), 61-76.
20. Gorjanovic S.Z., Alvarez-Suarez J.M., Novakovic M.M., Pastor F.T., Pezo L., Battino M., Suznjevic D.Z. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(1), 13-18.
21. Grégrová A., Kružík V., Vrácovská E., Rajchl A., Čížková H. (2015). Evaluation of factors affecting crystallization of disparate set of multi-flower honey samples. *Agronomy Research*, 13(5), 1215-1226.
22. Majewska E., Trzanek J. (2009). Właściwości przeciwutleniające miodów wielokwiatowych i innych produktów pszczelich, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 13(4), 1089-1094.
23. MRiRW (2015). Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 maja 2015 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu (Dz.U. 2015 poz. 850).
24. Subramanian R., Hebbar H.U., Rastogi N.K. (2007). Processing of honey: a review. *International Journal of Food Properties*, New York, 10(1), 127-143.
25. Wilczyńska A. (2011). Wpływ procesów technologicznych na jakość miodów pszczelich - zmiany parametrów barwy oraz zawartości HMF pod wpływem przechowywania i ogrzewania. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu*, 196, 91-98.
26. Wilczyńska A., Przybyłowski P. (2009). Charakterystyka związków fenolowych zawartych w miodach, *Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni*, 61, 33-38.

MARTA BURZYŃSKA¹, DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA¹

¹*Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

PYŁKI ROŚLIN WIATROPYLNYCH W ODMIANOWYCH MIODACH NEKTAROWYCH ZEBRANYCH Z TRZECH REGIONÓW POLSKI

Streszczenie

W miodach nektarowych znajdują się pyłki roślin, jakimi zostaje zapraszany zbierany przez pszczoły nektar, a także pyłek roślin wiatropylnych, który przyczepia się do włosków na ciele pszczoły podczas lotów w poszukiwaniu pożytków, a także do lepkiego nektaru. To właśnie ziarna pyłku roślin anemogamicznych mogą stanowić źródło potencjalnych alergenów wziewnych w miodach. Dlatego celem niniejszych badań była analiza pyłkowa pięciu odmianowych miodów nektarowych (rzepakowy, akacjowy, lipowy, gryczany oraz wrzosowy) zebranych bezpośrednio od pszczelarzy, z trzech województw: Warmińsko-Mazurskiego, Wielkopolskiego i Małopolskiego, z sezonu 2017.

Analizę mikroskopową badanych miodów wykonano przy użyciu mikroskopu optycznego UB200i przy powiększeniu 40x i 100x. W każdym preparacie osadu miodowego identyfikowano co najmniej 300 kolejnych ziaren pyłku poszczególnych roślin. Analizę wykonano w dwóch powtórzeniach zgodnie z Rozporządzeniem MRiRW z dnia 14.01.2009r. pkt. VI (A). Na podstawie spektrum pyłkowego każdej próbki obliczano udział poszczególnych taksonów w całości materiału.

W badanym materiale wyróżniono ziarna pyłku 42 taksonów, w tym 28 z roślin nektarodajnych i 14 z nienektarodajnych wiatropylnych i owadopylnych. We wszystkich próbkach obecne były ziarna pyłku roślin innych niż nektarodajne. Z największą częstością występowały pyłki roślin wiatropylnych takich jak *Pinus*, *Artemisia*, a także *Poaceae*, która wynosiła odpowiednio: 43% i po 36%, a najmniejszą uzyskały: *Alnus*, *avellana* i *Juniperus* (7%). Natomiast największy udział pyłku roślin wiatropylnych wśród wszystkich oznaczonych taksonów w danej próbce stanowiły ziarna pyłku *Pinus* w miodzie rzepakowym z Wielkopolski (68%) oraz *Artemisia* w miodzie gryczanym z województwa Warmińsko-Mazurskiego (ponad 51%), zaś najniższą (ok. 3%) *Juniperus* w miodzie rzepakowym z Wielkopolski. Zidentyfikowane taksony roślin wiatropylnych należały do 11 rodzin botanicznych. W dziewięciu z czternastu próbek miodów obecne były nieliczne wskaźniki spadzi, z których zidentyfikowane zostały zarodniki grzybów pleśniowych z rodzaju *Alternaria* oraz *Cladosporium*.

Wstęp

Zgodnie z Dyrektywą Rady 2001/110 UE miód pszczeli to produkt naturalny, który został wytworzony przez pszczołę miodną (*Apis mellifera*) z takich surowców jak: nektar roślin lub z wydzielin owadów wysysających żywe części roślin – spadzi, albo z obu tych surowców jednocześnie, poprzez łączenie z własnymi specyficznymi wydzielinami.

W miodach nektarowych znajduje się pyłek roślin, jakimi zostaje zapraszany zbierany przez pszczoły nektar [Wang i Li, 2011]. Minimalne procentowe zawartości pyłku przewodniego dla 5 odmian polskich miodów zostały określone w już nieobowiązującej Polskiej Normie „Miód pszczeli” PN-88/A-77626:1988. Obecnie szczegółowe wymagania odnośnie jakości handlowej miodu zostały określone w Rozporządzeniu MRiRW z dnia 29 maja 2015 r. Dokument ten jednak nie precyzuje procentowego udziału pyłku przewodniego w miodach odmianowych, dlatego Polska Norma PN-88/A-77626:1988 obowiązuje wciąż w części dotyczącej klasyfikacji miodów nektarowych do danej odmiany. Zgodnie z nią miody akacjowe i lipowe, powinny zawierać do 20 tys. ziaren pyłku w 10 g miodu, a pozostałe (np. rzepakowy, gryczany i wrzosowy) 20 - 100 tys. ziaren pyłku w 10 g [PN-88/A-77626:1988; Teper, 2015]. W miodach znajdują się także pyłek roślin wiatropylnych [Ceglińska, 2008; Stawiarz, 2009], który przyczepia się do nektaru kwiatów roślin odwiedzanych przez owady zapylające oraz do włosków zlokalizowanych na ciele pszczoły podczas lotów w poszukiwaniu pożytków. Średnia zawartość pyłków tych roślin może wynosić nawet 6,5% [Kruczek i in., 2015]. Pyłki roślin wiatropylnych mogą stanowić główne źródło alergenów w miodach, najczęściej są to ziarna z rodziny astrowatych, a także trawy, brzozy czy leszczyny [Fuiano i in., 2006; Kalyoncu, 1997; Denisow i Weryszko-Chmielewska, 2015].

Ziarna pyłku różnych roślin mają określoną barwę i kształt, na podstawie mikroskopowej analizy miodu można określić jego botaniczne pochodzenie, a więc zidentyfikować gatunki roślin miododajnych, z nektaru których powstał miód, a także wyodrębnić pyłki roślin wiatropylnych, występujące na teranach pożytkowych [Teper, 2004]. Analiza pyłkowa jest powszechnie stosowaną na świecie i zalecaną przez Międzynarodową Komisję Miodową metodą odwoławczą, akredytowaną w zaledwie kilku laboratoriach analitycznych w Polsce. Wyniki analizy ocenia się w oparciu o przepisy regulujące procentowy udział pyłku przewodniego w nektarowych miodach odmianowych, które zawarte są w obowiązującym Rozporządzeniu MRiRW z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Dz. U. Nr 17, poz. 94) oraz PN-88/A-77626:1988 (tabela 1).

Tabela 1. Minimalny procentowy udział pyłku przewodniego w miodach nektarowych zgodnie z Dz.U. z 2009 r. Nr 17 poz. 94 oraz PN-88/A-77626:1988

Odmiana miodu	Minimalny udział pyłku przewodniego (%)
Rzepakowy (<i>Brassica napus</i>)	45
Akacjowy (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	30
Lipowy (<i>Tilia sp.</i>)	20
Gryczany (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	45
Wrzosowy (<i>Calluna vulgaris</i>)	45
Wielokwiatowy	Bez pyłku przewodniego

Pyłek jest częścią składową miodu, według Dyrektywy 2001/110/WE zabranione jest usuwanie komponentów specyficznych dla miodu, w tym pyłku, chyba że jest to proces nieunikniony podczas usuwania obcych substancji. Wymogi te są również zgodne z normą dotyczącą miodu w Kodeksie Żywnościowym (Codex Stan 12-1981).

Pyłki roślin wiatropylnych są przyczyną alergii pyłkowej, a wywoływany przez nie alergiczny nieżyt nosa jest uznawany za najczęstszą alergiczną chorobę populacji świata [Majkowska-Wojciechowska, 2016]. Alergia na pyłki roślin związana jest z indukowaniem wydzielania z komórek plazmatycznych limfocytów B swoistych przeciwciał IgE, które łączą się z receptorem FcεRI na powierzchni komórek tucznych prowadząc do objawów nadwrażliwości typu natychmiastowego lub komórek zapalnych, biorąc udział w późnej fazie reakcji alergicznej. Pyłki roślin odgrywają istotną rolę w patogenezie alergicznego nieżyty nosa, astmy oskrzelowej i atopowego zapalenia skóry [Asher i in., 2010; D'Amato i in., 2007]. Charakterystyczną cechą schorzeń alergicznych, wywołanych przez alergeny pyłku roślin, jest sezonowość występowania objawów. Nasilenie objawów chorobowych osób z uczuleniem na pyłek roślin jest ściśle związane ze stężeniem aeroalergenów w atmosferze [Majkowska-Wojciechowska, 2016]. Osoby uczulone na pyłek występujący w powietrzu, w sezonie pyłkowym, mogą dodatkowo reagować objawami alergii po spożyciu niektórych pokarmów, w tym także miodu [Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2006].

Z drugiej strony wydaje się, że spożywanie miodu zawierającego alergenne pyłki mogłoby stanowić naturalną szczepionkę podczas odczulania. Przeprowadzone do tej pory badania nad wykorzystaniem miodu brzoźowego w ograniczaniu symptomów alergii wziewnej zdają się potwierdzać tę tezę [Saarinen i in., 2011].

Celem niniejszej pracy była identyfikacja pyłków roślin wiatropylnych w odmianowych miodach nektarowych z całego sezonu pszczelarskiego z trzech województw w Polsce.

Materiał i metody

Materiałem przeznaczonym do badań były odmianowe miody nektarowe pozyskane z sezonu pszczelarskiego 2017 z trzech pasiek zlokalizowanych w trzech województwach w Polsce. Miody do poszczególnych odmian zostały zaklasyfikowane przez pszczelarzy. Do badań wytypowane zostały te, które charakteryzują cały sezon pszczelarski, zaczynając od pierwszego pożytku towarowego tj: miodu rzepakowego, przez kolejne pojawiające się rośliny miododajne: miód akacjowy, lipowy, gryczany, a kończąc na ostatnim pożytku dla pasiek wędrownych: miodzie wrzosowym. Z pasieki z województwa Warmińsko-Mazurskiego nie udało się pozyskać miodu akacjowego. Od pszczelarzy pozyskano dodatkowe informacje na temat terminu miodobrania oraz lokalizacji pasieki na danym pożytku (tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka materiału przeznaczonego do badań

Odmiana miodu	Region					
	Warmińsko - Mazurskie		Wielkopolska		Małopolska	
	Lokalizacja pożytku	Termin zbioru	Lokalizacja pożytku	Termin zbioru	Lokalizacja pożytku	Termin zbioru
Rzepakowy	Spręcowo (wieś)	25.05	Niemierzyce	02.06	Olszanica	15.06
Akacjowy	-	-	Niemierzyce	25.06	Kraków (Swoszowice)	29.06
Lipowy	Ługwałd	20.07	Niemierzyce	10.07	Głogoczów	13.09
Gryczany	Grunwald	20.08	Kraśnik (woj. Lubelskie)	01.08	Okolice Częstochowy	08.08
Wrzosowy	Bemowo-Piskie	10.09	Świętoszów (Dolny Śląsk)	04.09	Nowa Dęba (woj. Podkarpackie)	11.09

Próbki miodów do analizy pyłkowej przygotowano według wskazań Międzynarodowej Komisji Botaniki Pszczelarskiej [Louveaux i in., 1978], PN-88/A-77626:1988 oraz rozporządzenia MRiRW z 2009 r. [Dz.U. z 2009 r. Nr 17 poz. 94]. Mikroskopową analizę pyłkową badanych miodów wykonano za pomocą mikroskopu optycznego UB200i, przy powiększeniu 40x i 100x. W celu poznania spektrum pyłkowego w każdym preparacie liczono, zgodnie z zaleceniami Moara [1985], co najmniej 300 ziaren pyłku. Aby prawidłowo zidentyfikować analizowane pyłki, posługiwano się dostępnymi kluczami do oznaczania pyłku [Zander, 1935; 1937; Sawyer, 1981; 1988; Bucher i in., 2004; Hesse i in., 2009]. Analizowane ziarna

pyłków przyporządkowywano do możliwie najdokładniejszego taksonu (gatunku, rodzaju, typu budowy lub rodziny). Niezidentyfikowane w obrębie rodziny ziarna pyłku oznaczano jako „inne”. W preparatach z osadów miodowych określono także obecność wskaźników spadzi, tj. glonów, fragmentów grzybni i zarodników grzybów. Udziały procentowe pyłków poszczególnych gatunków roślin były obliczone dla każdej próbki oddzielnie, dla roślin miododajnych i innych niż nektarowe. Częstość występowania pyłków roślin nienektarodajnych określano na podstawie liczby próbek, w których stwierdzono obecność zidentyfikowanych taksonów, wyrażano je jako procent wszystkich analizowanych próbek miodów.

Próbki miodu zostały zaklasyfikowane do odpowiednich odmian w oparciu o przepisy regulujące procentowy udział pyłku przewodniego w nektarowych miodach odmianowych, które zawarte są w obowiązującym Rozporządzeniu MRiRW [Dz.U. z 2009 r. Nr 17 poz. 94] oraz PN-88/A-77626:1988 (tabela 1).

Wyniki i dyskusja

W analizowanych próbkach miodów wyróżniono ziarna pyłku 42 taksonów, w tym 28 z roślin nektarodajnych i 14 z nienektarodajnych wiatropylnych i owadopylnych. Spośród 14 przebadanych próbek miodu, zgodnie z Rozporządzeniem MRiRW [Dz.U. z 2009 r. Nr 17 poz. 94] oraz PN-88/A-77626:1988, połowa została zaklasyfikowana do właściwej odmiany. Wszystkie miody rzepakowe z ponad 50% udziałem *Brassica napus*, miód lipowowy z województwa Małopolskiego (*Tilia* 21%), miód gryczany z województwa Warmińsko-Mazurskiego (*Fagopyrum* 46%) oraz dwa miody wrzosowe z Warmińsko-Mazurskiego i Małopolskiego, odpowiednio zawartość pyłku *Calluna*: 64% i 46%, jako pyłki główne wobec wszystkich pozostałych pyłków roślin miododajnych oznaczonych w poszczególnych preparatach mikroskopowych. Ziarna pyłku roślin anemogamicznych, w odniesieniu do całkowitej liczby oznaczonych ziaren roślin nektarodajnych i innych, były obecne we wszystkich analizowanych próbkach miodu, które stanowiły w miodach z Wielkopolski 9%, Małopolski 7% i województwa Warmińsko-Mazurskiego 6%. W miodach wczesnych (rzepakowy, akacjowy) dominowały pyłki sosny, dębu i brzozy (tabela 3). W dziewięciu z czternastu próbek miodów obecne były nieliczne wskaźniki spadzi, z których zidentyfikowane zostały zarodniki grzybów pleśniowych z rodzaju *Alternaria* oraz *Cladosporium*. Obrazy przykładowych osadów miodowych z udziałem pyłków roślin nienektarodajnych oraz wskaźników spadzi przedstawiono na rycinie 1.

Największy udział pyłku roślin wiatropylnych wśród wszystkich oznaczonych taksonów w danej próbce stanowiły ziarna pyłku *Pinus* w miodzie rzepakowym

z Wielkopolski (68%), oraz *Artemisia* w miodzie gryczanym z województwa Warmińsko-Mazurskiego (ponad 51%), zaś najniższą (ok. 3%) *Juniperus* w miodzie rzepakowym z Wielkopolski (tabela 3). Wskaźniki spadzi wraz z zarodnikami grzybów pleśniowych stanowiły średnio ponad 1%.

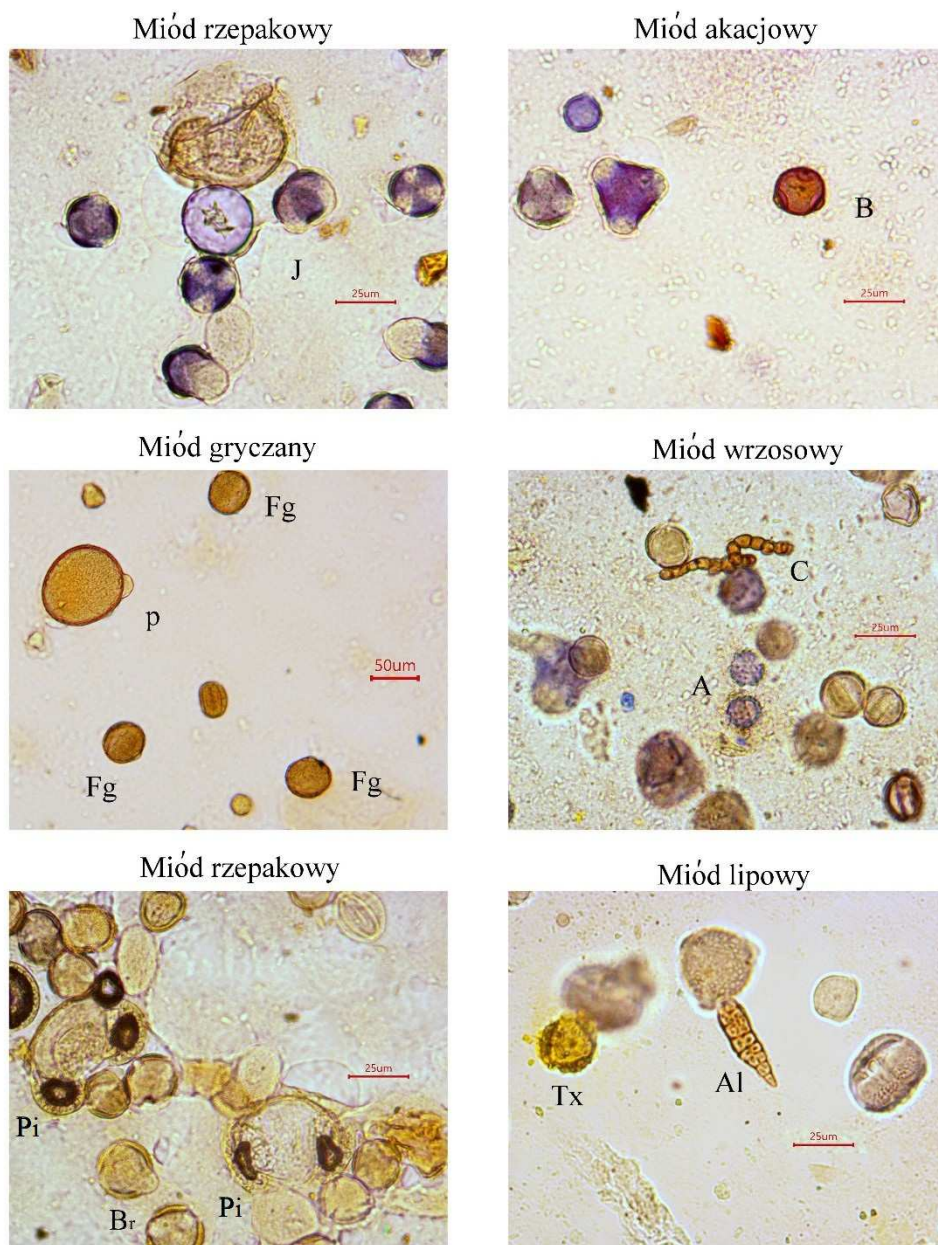
Udział pyłków roślin nienektarodajnych w stosunku do nektarodajnych wynosił od ok. 1% (miód wrzosowy z Warmińsko-Mazurskiego) do ok. 13% (miód wrzosowy z Wielkopolski) (tabela 3). Średnio pyłki roślin nienektarodajnych wraz ze wskaźnikami spadzi stanowiły 9% wszystkich ziaren pyłków i wskaźników spadzi w preparatach mikroskopowych badanych miodów (rycina 2).

Częstość występowania pyłków roślin anemogamicznych w badanych miodach przedstawiono na rycinie 3. Największą częstością charakteryzowały się pyłki *Pinus*, *Artemisia*, a także *Poaceae*, wynosiła ona odpowiednio 43% i po 36%, a najmniejszą 7% uzyskały pyłki *Alnus*, *Corylus avellana* i *Juniperus*.

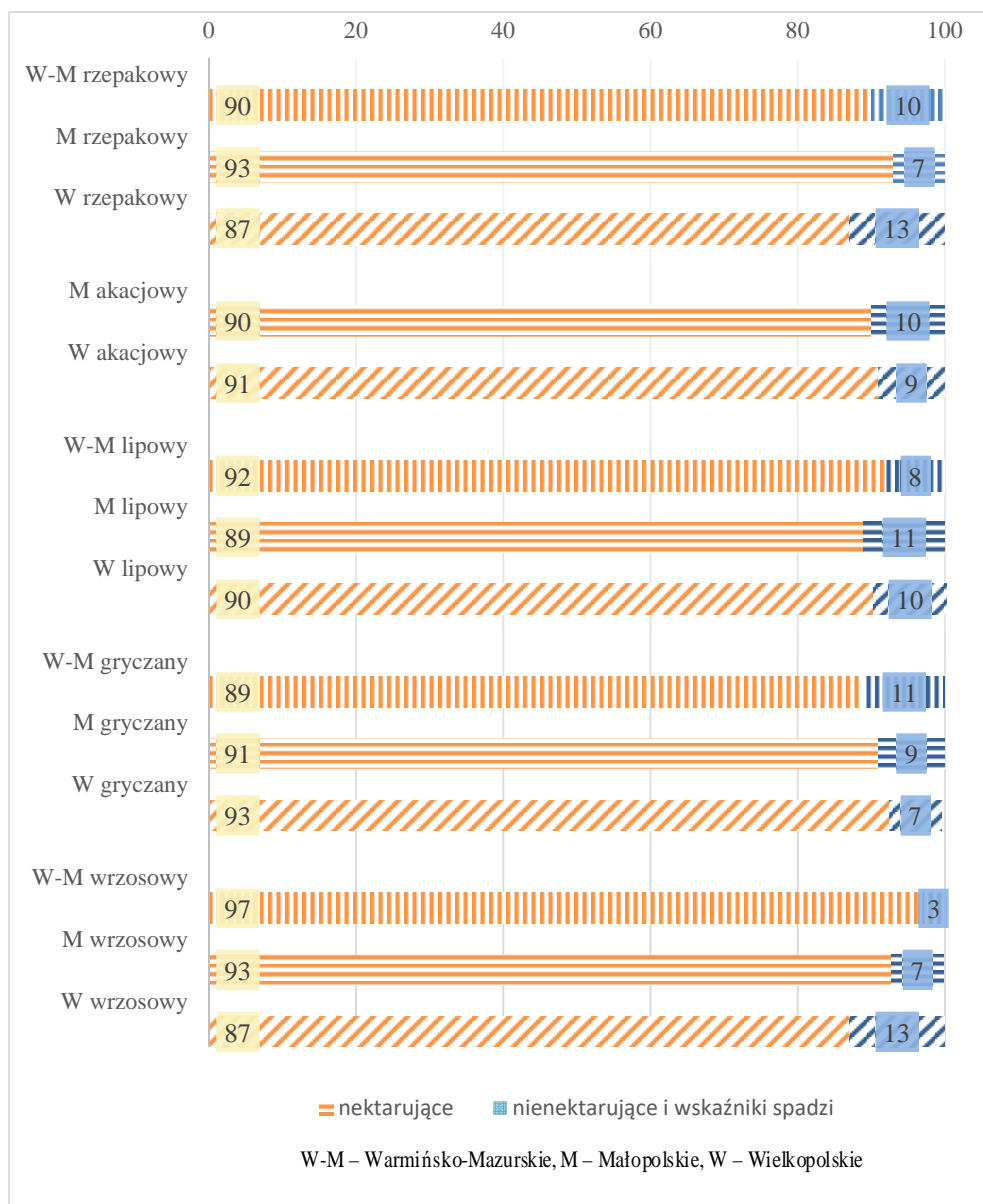
Inni autorzy również donoszą o częstym zaproszeniu polskich miodów pyłkiem roślin wiatropylnych, m.in. pyłkiem dębu, wiązu, topoli, babki, bylicy, traw, turzycy, orzecha włoskiego, a także brzozy i komosy [Teper, 2011; Warakomska, 1997; Wróblewska 2002]. Badania miodów wiosennych (rzepakowy, klonowy, malinowy, akacjowy, koniczynowy, z drzew owocowych i trybuli) z pasiek z różnych okolic Rzeszowa także wykazały obecność pyłku roślin wiatropylnych we wszystkich próbkach. Odnotowano blisko 70% częstość występowania pyłku traw, ponad 50% pyłku dębu i szczawiu, 10% pyłku zbóż, leszczyny i chmielu oraz najniższy udział procentowy (poniżej 3%) pyłku sosny i bylicy [Ceglińska, 2008]. Także w miodach z całego sezonu pszczelarskiego z województwa Świętokrzyskiego wykazano obecność pyłku 17 taksonów roślin wiatropylnych, z czego najczęściej notowano pyłek traw, dębu i szczawiu [Stawiarz, 2009]. Z badań Pracowni Aeropalinologii Uniwersytetu Szczecińskiego nad pochodzeniem botanicznym miodów województwa zachodniopomorskiego wynika, że średnia zawartość pyłku roślin wiatropylnych wynosi 6,5%. Najczęściej spotykane były ziarna pyłku traw, brzozy, wierzby i komosy [Kruczek, 2015].

Tabela 3. Procentowy udział pyłków głównych, towarzyszących wobec sumy pyłków roślin nektarodajnych oraz udział pyłków roślin nienektarodajnych wobec wszystkich pyłków występujących w miodzie

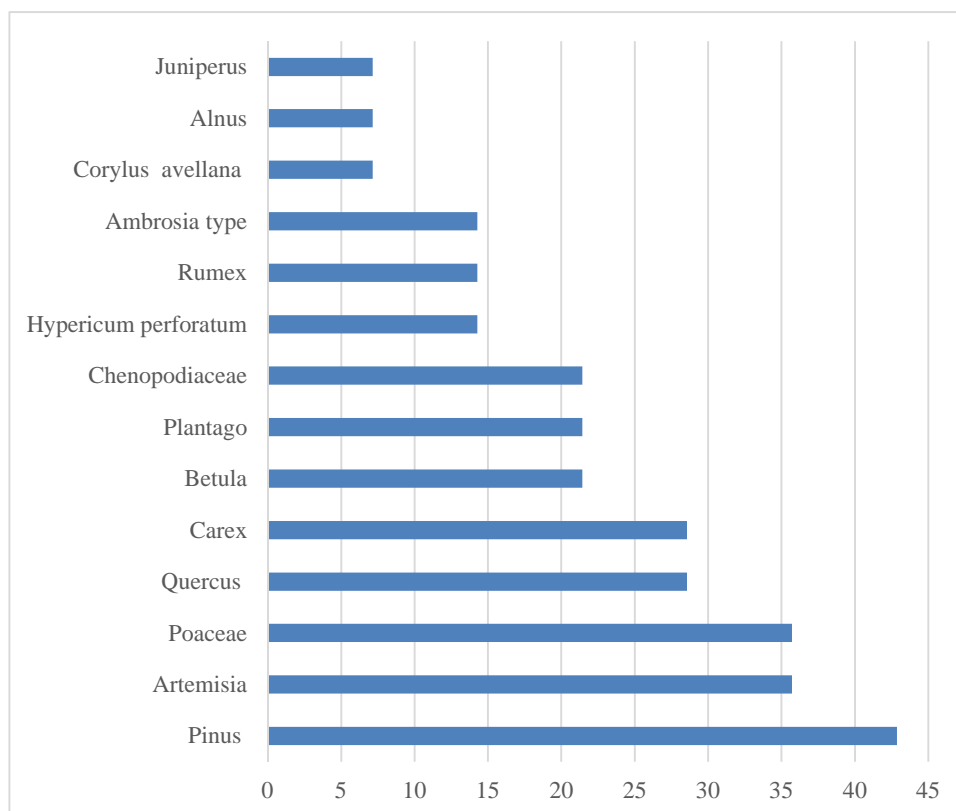
Województwo	Odmiana miodu	Główny pyłek [%]		Pyłek towarzyszący [%]		Udział pyłków roślin nienektarodajnych [%]		
Warmińsko-Mazurskie	rzepakowy	<i>Brassica napus</i>	66	-		<i>Pinus</i>	4,8	
						<i>Quercus</i>	2,2	
						<i>Corylus avellana</i>	1,9	
Wielkopolskie	rzepakowy	<i>Brassica napus</i>	56	-		<i>Pinus</i>	8,1	
						<i>Quercus</i>	3,4	
						<i>Juniperus</i>	0,4	
Małopolskie	rzepakowy	<i>Brassica napus</i>	53	-		<i>Pinus</i>	3,0	
						<i>Betula</i>	2,0	
						<i>Quercus</i>	1,0	
Wielkopolskie	akacjowy	-			<i>Robinia pseudacacia</i>	18	<i>Betula</i>	3,0
					<i>Rubus type</i>	15	<i>Artemisia</i>	2,8
								<i>Pinus</i>
Małopolskie	akacjowy	-			<i>Rubus type</i>	21	<i>Betula</i>	2,6
					<i>Robinia pseudacacia</i>	18	<i>Quercus</i>	2,5
					<i>Asteraceae type</i>	13	<i>Alnus</i>	2,4
							<i>Pinus</i>	1,7
							<i>Plantago</i>	1,3
Warmińsko-Mazurskie	lipowy	-			<i>Phacelia</i>	37	<i>Hypericum perforatum</i>	2,4
					<i>Tilia</i>	15	<i>Carex</i>	1,8
					<i>Fagopyrum</i>	11		
Wielkopolskie	lipowy	-			<i>Asteraceae type</i>	18	<i>Poaceae</i>	2,9
					<i>Anthriscus type</i>	17	<i>Carex</i>	1,7
					<i>Tilia</i>	11	<i>Chenopodiaceae</i>	1,6
							<i>Rumex</i>	1,0
Małopolskie	lipowy	<i>Tilia</i>	21		<i>Centaurea cyanus</i>	19	<i>Rumex</i>	3,6
							<i>Plantago</i>	2,1
							<i>Carex</i>	1,3
Warmińsko-Mazurskie	gryczany	<i>Fagopyrum</i>	46	-			<i>Artemisia</i>	5,2
							<i>Poaceae</i>	2,3
							<i>Carex</i>	1,5
							<i>Pinus</i>	1,1
Wielkopolskie	gryczany	-			<i>Fagopyrum</i>	25	<i>Poaceae</i>	3,9
					<i>Brassicaceae type</i>	11	<i>Artemisia</i>	1,9
							<i>Plantago</i>	1,7
Małopolskie	gryczany	-			<i>Fagopyrum</i>	27	<i>Poaceae</i>	2,6
					<i>Trifolium type</i>	16	<i>Artemisia</i>	2,3
							<i>Chenopodiaceae</i>	2,0
Warmińsko-Mazurskie	wrzosowy	<i>Calluna</i>	63	-		<i>Artemisia</i>	1,0	
Wielkopolskie	wrzosowy	-			<i>Calluna</i>	36	<i>Hypericum perforatum</i>	6,5
					<i>Brassicaceae type</i>	17	<i>Poaceae</i>	3,8
					<i>Fagopyrum</i>	16	<i>Ambrosia type</i>	2,3
							<i>Chenopodiaceae</i>	1,4
Małopolskie	wrzosowy	<i>Calluna</i>	46	<i>Fagopyrum</i>	11	<i>Ambrosia type</i>	2,4	
						<i>Chenopodiaceae</i>	1,4	



Rycina 1. Obraz mikroskopowy wybranych preparatów osadów miodowych:
J – Juniperus, B – Betula, Fg – Fagopyrum, P – Poaceae, C – Cladosporium, A – Ambrosia, Pi – Pinus, Br- Brassica napus, Al – Alternaria, Tx – Taraxacum type.



Rycina 2. Procentowy udział ziaren pyłków roślin nektarodajnych i nienektarodajnych wraz z wskaźnikami spadzi w poszczególnych miodach.



Rycina 3. Częstość występowania pyłku roślin nienektarodajnych w badanych próbkach miodów (%).

Wnioski

1. We wszystkich analizowanych próbkach miodu zostały zidentyfikowane pyłki roślin innych niż nektarodajne, których średni udział wynosił 7,4%.
2. Połowa badanych odmianowych miodów nektarowych została niewłaściwie zaklasyfikowana przez pszczelarzy, w tym dwa miody oznakowane jako akacjowe, lipowe, gryczane i jeden wrzosowy.
3. Spośród pyłków roślin nienektarodajnych, w przeanalizowanych miodach, największą częstość wykazywały pyłki sosny, bylicy oraz traw, a najmniejszą: olszy, leszczyzny i jałowca.
4. Zidentyfikowane w badanych miodach pyłki roślin nienektarodajnych, zgodnie z danymi literaturowymi, wykazują aktywność alergenną i mogą być przyczyną reakcji alergicznych u osób spożywających miód.

Literatura

1. Asher M.I., Stewart A.W., Mallol J., Montefort S., Lai C.K., Ait-Khaled N., Odhiambo J. (2010). Which population level environmental factors are associated with asthma, rhinoconjunctivitis and eczema? Review of the ecological analyses of ISAAC Phase One. *Respiratory Research*; 11: 8.
2. Blank S., Seismann H., Bockisch B., Braren I., Cifuentes L., McIntyre M., Rühl D., Ring J., Bredehorst R., Ollert M.W., Grunwald T., Spillner E. (2010). Identification, Recombinant Expression, and Characterization of the 100 kDa High Molecular Weight Hymenoptera Venom Allergens Api m 5 and Ves v 3. *The Journal of Immunology*. 184(9), 5403-5413.
3. Bucher E., Kofler V., Vorwohl G., Zieger E. (2004). Das Pollenbild der Südtiroler Honige. Herausgeber: Biologisches Labor der Landesagentur für Umwelt- und Arbeitsschutz Bozen.
4. Ceglińska K. (2008). Anemophilous Plant Pollen in Spring Specific Honey from the Rzeszów Area. *Acta Agrobotanica*. 61(1), 59-64.
5. Codex Alimentarius Commission, "Revised Codex Standard for Honey Codex Stan 12-1981, Rev. 1 (1987), Codex Standard, Vol. 12. 1981, pp. 1-7.
6. D'Amato G., Cecchi L., Bonini S., Nunes C., Annesi-Maesano I., Behrendt H., Van Cauwenberge P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 62(9), 976-990. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01393> (dostęp on-line: 15.04.2018 r.).
7. Denisow B., Weryszko-Chmielewska E. (2015). Pollen grains as airborne allergenic particles. *Acta Agrobotanica*, 68(4), 281-284. <https://doi.org/10.5586/aa.2015.045> (dostęp on-line: 15.04.2018 r.).
8. Fernández C., Martín-Esteban M., Fiandor A., Pascual C., López Serrano C., Martínez Alzamora F., Díaz Pena J.M., Ojeda Casas J.A. (1993). Analysis of cross reactivity between sunflower pollen and other pollens of the Compositae family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 92(5), 660-667.
9. Fuiano N., Incorvaia C., Riario-Sforza G.G., Casino G. (2006). Anaphylaxis to honey in pollinosis to mugwort: a case report. *European Ann Allergy Clinical Immunology*, 38(10), 364-365.
10. Kalyoncu A.F. (1997). Honey allergy and rhinitis in Ankara, Turkey. *Allergy*, 52: 876-877.
11. Kędzia B., Holderna-Kędzia E. (2006). Alergenne działanie miodu pszczelego. *Acta Agrobotanica*, 59(1): 257-263.
12. Köhler J., Blank S., Müller S., Bantleon F., Frick M., Huss-Marp J., Lidholm J., Spillner E., Jakob T. (2014). Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 133(5), 1383-9.
13. Kruczek A., Stacewicz A., Puc M. (2015). Pyłek kwiatowy w produktach pszczelich. *Alergoprofil* 11(2), 41-44.
14. Louveaux J., Maurizio A., Vorwohl G. (1978). Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59(4), 139-157.
15. Hesse M., Halbritter H., Zetter R., Weber M., Buchner R., Frosch-Radivo A., Ulrich S. (2009). Pollen terminology. An illustrated handbook. SpringerWein. New York.
16. Majkowska-Wojciechowska B. (2016). Pyłek roślin i alergeny sezonowe w Polsce Plant pollen and seasonal allergens in Poland. *Alergia Astma Immunologia*, 21(1), 5-15.
17. Moar N.T. (1985). Pollen analysis of New Zealand honey. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 28: 39-70.
18. PN-88/A-77626:1988. Miód pszczeli.
19. Rapiejko P. (1991). Alergia na pyłek kwiatowy. *Pszczelarstwo*, 6(42): 7.
20. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Dz.U. 2009, nr 17, poz. 94 z późn. zm.).
21. Saarinen K., Jantunen J., Haahtela T. (2011). Birch pollen honey for birch pollen allergy - a randomized controlled pilot study. *International Archives of Allergy and Immunology*, 155(2), 160-166. <https://doi.org/10.1159/000319821> (dostęp on-line: 15.04.2018 r.).
22. Sawyer R. (1981). Pollen identification for beekeepers. Ed. R.S. Pickard, Univ. College Cardiff Press, UK, 111.
23. Sawyer R. (1988). Honey identification. Cardiff Acad. Press, Wales, UK, 115.
24. Stawiarz E. (2009). Pollen of non-nectariferous plants in the microscopic image of honeys of some communes of the Świętokrzyskie voivodship. *Acta Agrobotanica* 62(2), 53-58.

25. Teper D. (2004). Analiza pyłkowa miodów. *Pasieka*, 2.
<https://pasieka24.pl/index.php/pasieka-czasopismo-dla-pszczelarzy/100-pasieka-2-2004/1177-analiza-pykowa-miodow>. (dostęp on-line: 20.04.2018 r.).
26. Teper D. (2010). Oferta wdrożeniowa. Ilościowa analiza pyłkowa jako metoda umożliwiająca wykrywanie zafałszowań miodów.
http://www.inhort.pl/upload/filemanager/images/pszczoły/10/4_wdroz_2010psz.pdf (dostęp on-line: 15.04.2018 r.).
27. Teper D. (2011). Analiza pyłkowa jako podstawowe badanie w ocenie nektarowych miodów odmianowych. *Materiały II Lubelskiej Konferencji Pszczelarskiej. Aktualne problemy nowoczesnego pszczelarstwa. Pszczela Wola 2011*, 151-158.
28. Wang J., Li Q.X. (2011). Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. *Advances in Food and Nutrition Research* 62, (Elsevier Inc., 2011).
29. Warakomska Z. (1997). Obraz pyłkowy wielokwiatowych miodów Lubelszczyzny. *Materiały I Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej. Biologia kwitnienia, nektarowania i zapylania roślin*. Lublin, 170-177.
30. Wróblewska A. (2002). Obraz pyłkowy miodów niektórych gmin Podlasia. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska., Sec. EEE X*: 113-121.
31. Zander E. (1935, 1937). *Beitrage zur Herkunftsbestimmung bei Honig*. I Reichsfachgruppe Imke r, Berlin, II Liedloff, Loth & Michaelis, Leipzig: 464.

WERONIKA PIECHOWICZ¹, PAWEŁ SATORA¹

¹*Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

ZAWARTOŚĆ AMIN BIOGENNYCH W WYBRANYCH GRUPACH ŻYWNOŚCI

Streszczenie

Rosnąca świadomość konsumentów wymusza monitorowanie żywności pod kątem jej bezpieczeństwa. Jednym z zagrożeń może być obecność amin biogennych, powstających poprzez dekarboksylację aminokwasów. Wysoki poziom białka w produkcie może stanowić potencjalne ryzyko podwyższonej koncentracji amin biogennych. W żywności produkowane są one przy udziale enzymów bakteryjnych – dekarboksylaz. Poddawanie surowca procesowi fermentacji, z użyciem bakterii, zwiększa poziom amin biogennych w gotowym produkcie. Praca ma na celu przybliżenie problemu obecności amin biogennych w żywności, ich toksyczności oraz zawartości w poszczególnych grupach produktów spożywczych takich jak mleko i jego przetwory, owoce, warzywa, napoje alkoholowe, ryby oraz mięso i przetwory mięsne.

Słowa kluczowe: aminy biogenne, owoce, przetwory mleczne, przetwory mięsne, warzywa

Wstęp

W dzisiejszych czasach dużą wagę przywiązuje się do zagrożeń płynących dla konsumenta ze strony żywności. Kontrolowane i wykrywane są nawet substancje w śladowych ilościach, będące potencjalnym ryzykiem dla naszego zdrowia. Przykładem takich związków są aminy biogenne. W niskich stężeniach nie wpływają one negatywnie na zdrowie człowieka [Stadnik, 2014]. Problem pojawia się w przypadku obecności wysokich koncentracji tych związków w produkcie, co niesie za sobą skutki niebezpieczne dla organizmu. Duże ilości amin biogennych mogą wystąpić w żywności poddawanej różnym procesom technologicznym, jednak największe ryzyko zwiększenia ich poziomu niesie za sobą fermentacja z wykorzystaniem bakterii mlekowych [Gawarska i in., 2012]. Najczęściej występujące w żywności aminy biogenne to histamina, kadaweryna, putrescyna, tryptamina, tyramina, spermina jak i spermidyna, a ich największe ilości odnotowuje się w produktach takich jak wino oraz fermentowane ryby i mięso, ale również poddane fermentacji warzywa i owoce czy sery długodojrzewające. Wysoką

zawartość amin biogennych należy utożsamiać z dużą ilością białek w produkcie. Im wyższa jest zawartość aminokwasów w surowcu, tym zwiększa się potencjalne zagrożenie związane ze zwiększoną zawartością amin biogennych [Suzzi i Gardini, 2003].

Niezbędne jest podejmowanie wszelkich działań mogących prowadzić do obniżania ilości szkodliwych substancji w produktach spożywczych. Aminy biogenne są produkowane, ale również utylizowane przez mikroorganizmy obecne w żywności, co może znaleźć potencjalne wykorzystanie w zwiększaniu bezpieczeństwa produktów fermentowanych.

Aminy biogenne

Aminy biogenne są niskocząsteczkowymi zasadami organicznymi, aktywnymi biologicznie, które powstają w wyniku procesu dekarboksylacji aminokwasów obojętnych i zasadowych. Wytwarzane oraz degradowane są w trakcie prawidłowego funkcjonowania zarówno organizmu ludzkiego, jak i roślin oraz mikroorganizmów, na skutek naturalnych procesów biochemicznych. W żywności produkowane są przy udziale dekarboksylaz będących enzymami bakteryjnymi, przekształcającymi aminokwasy w aminy biogenne. W niskich stężeniach nie wpływają negatywnie na zdrowie [Alvarez i Moreno-Arribas, 2014; Madejska i in., 2017]. Wysokie stężenie amin biogennych w żywności związane jest z aktywnością drobnoustrojów, jak również z różnymi zabiegami technologicznymi, którym jest ona poddawana. Znaczny wzrost zawartości tych związków obserwuje się w produktach fermentowanych. Przyjęcie z pożywieniem dużych ilości amin biogennych powoduje toksyczne efekty u konsumentów.

Aminy biogenne uczestniczą w syntezie kwasów nukleinowych, alkaloidów, białek i hormonów. Biorą udział w regulacji temperatury ciała, ciśnienia tętniczego krwi, oraz aktywności mózgu. Mogą wpływać na replikację DNA oraz przepuszczalność błon komórkowych. W przypadku roślin odpowiadają za wzrost oraz rozwój owoców, uczestniczą również w kiełkowaniu, kwitnieniu i ukorzenianiu [Antoszkiewicz i Purwin, 2010; Gawarska i in., 2012; Jastrzab i Tylkowski, 2016].

Podział amin biogennych

Ze względu na strukturę chemiczną wyróżniamy kilka grup amin biogennych. Pierwszą są aminy alifatyczne, do których zaliczamy putrescynę, spermidynę oraz kadawerynę. Kolejną grupę tworzą aminy aromatyczne: tyramina i 2-fenyletyloamina. Ostatnia grupa to aminy heterocykliczne: tryptamina i histamina. Aminy alifatyczne mogą pochodzić zarówno z diety, działania mikroorganizmów

bytujących w jelitach, jak i endogennej biosyntezy. Aminy heterocykliczne występują w skórze, błonie śluzowej żołądka i jelit. Można znaleźć je także w wątrobie, płucach czy mięśniach [Cieślik i Migdał, 2011; Mohammed i in., 2016]. Badania dowodzą, że w zwierzęcych komórkach występują głównie spermina i spermidyna, natomiast u prokariotów – putrescyna oraz spermidyna. Całkowite stężenie poliamin w żywym organizmie może sięgać wartości rzędu milimoli, jednak ilość form wolnych jest znacząco niższa [Stadnik, 2014; Jastrzab i Tytkowski, 2016].

Toksyczność amin biogennych

W niskich stężeniach aminy biogenne są obecne w organizmie każdego człowieka, nie powodując przy tym negatywnych skutków dla zdrowia. Jednak podwyższone poziomy mogą prowadzić do szeregu niekorzystnych objawów, co obserwowane jest w przypadku spożycia bogatych w białko i aminy biogenne produktów żywnościowych [Kantachote i in., 2016].

Aminy biogenne mogą przedostawać się do krwi w wyniku obecności ich inhibitorów lub poprzez przyjęcie nadmiernej dawki. Niektóre leki antydepresyjne zawierają inhibitory monoaminooksydazy i mogą powodować nieprawidłowe działanie tego enzymu, który odpowiedzialny jest za utylizację amin biogennych, powodując nadmierne nagromadzenie ich w organizmie – a co za tym idzie przenikanie do układu krwionośnego. Podobny wpływ obserwujemy w przypadku nadużywania alkoholu lub uszkodzenia genów kodujących mono i diaminooksydazy. Wykazano, że kadaweryna i putrescyna odgrywają rolę inhibitorów diaminooksydazy, zwiększając toksyczność histaminy. Zakłada się, że występowanie w żywności histaminy w stężeniu wyższym niż 400 mg/kg produktu jest niebezpieczne dla zdrowia, 75 mg czystej histaminy przyjętej doustnie wywołuje objawy nietolerancji pokarmowej, natomiast spożycie 1000 mg powoduje ostre zatrucie, a u dzieci nawet śmierć. Efekty spożycia dużej ilości amin biogennych mogą być oznaczane jako reakcja, nietolerancja, intoksykacja lub zatrucie w zależności od nasilenia objawów [McCabe-Sellers i in., 2006; Alvarez i Moreno-Arribas, 2014; Płotka-Wasyłka, 2016; Czajkowska-Mysłek i Leszczyńska, 2015].

Bóle głowy, nudności, pocenie się to objawy reakcji spowodowanej nadmiernym spożyciem amin biogennych. Natomiast do objawów nietolerancji zalicza się wymioty, biegunkę, wysypkę, pokrzywkę i arytmie. Zatrucie może prowadzić do nadciśnienia tętniczego oraz uszkodzeń serca. Przy bardzo wysokich dawkach, przyjmowanych długotrwale można zaobserwować występowanie depresji, schizofrenię, nowotwory jelit oraz chorobę Parkinsona [Cieślik i Migdał, 2011; Alvarez i Moreno-Arribas, 2014].

Występowanie w żywności

Źródłem amin biogennych w żywności może być zarówno ich naturalna biosynteza, jak i powstawanie w trakcie procesów technologicznych, przetwórczych oraz przechowywania. Wprowadzanie kultur starterowych, mających zdolność do ich wytwarzania może również prowadzić do zwiększenia ich poziomu. Różnice w zawartości amin biogennych w żywności są duże i mogą zależeć od wielu czynników, takich jak warunki produkcji, rodzaj surowca i produktu, czy przeprowadzone procesy technologiczne. Ilość i rodzaj amin biogennych wytwarzanych w żywności jest również w dużej mierze uzależniona od wewnętrznych właściwości żywności, w tym aktywności wody, flory bakteryjnej i pH, oraz parametrów zewnętrznych, takich jak temperatura i czas przechowywania, które umożliwiają wzrost bakterii podczas przetwarzania i przechowywania [Czerniejewska-Surma, 2012; Stadnik, 2014; Alvarez i Moreno-Arribas, 2014].

Obecnie w Polsce nie istnieją przepisy prawne, mówiące o maksymalnej, ogólnej zawartości amin biogennych w żywności. Podobnie Unia Europejska nie przyjęła żadnych norm ani regulacji w tym temacie, za wyjątkiem ilości histaminy w produktach rybnych. Niektóre kraje takie jak Francja czy Holandia ustanowiły zalecane, maksymalne wartości histaminy, będącej najniebezpieczniejszą z amin biogennych występującą w żywności. Nieprzekraczanie zalecanych zawartości w napojach na poziomie 10 mg/l wprowadzone jest w Australii i Szwajcarii; odpowiednio 8 mg/l w Belgii, 2 mg/l w Niemczech, 6 mg/l we Francji i 3,5 mg/l w Holandii. Pojedyncze aminy biogenne w wybranych produktach żywnościowych takich jak ryby czy wino są normowane ustawami i rozporządzeniami. Ogólna zawartość amin biogennych zależna jest od wielu czynników, mogą one oddziaływać między sobą, co powoduje dodatkowe trudności w normowaniu ich maksymalnego poziomu [Melendez i in., 2016; Płotka-Wasyłka i in., 2016].

Aby zminimalizować poziom amin biogennych stosuje się takie zabiegi jak standaryzacja procedur, wykorzystywanie do procesów fermentacji kultur starterowych niewykazujących zdolności do ich tworzenia, utrzymywanie higieny, postępowanie zgodnie z dobrą praktyką produkcyjną oraz wykorzystywanie produktów świeżych, wysokiej jakości. Poziom amin biogennych analizowany może być różnymi metodami takimi jak HPLC, metodami fluorymetrycznymi oraz PCR [Alvarez i Moreno-Arribas, 2014; Stadnik, 2014].

Mleko i przetwory mleczne

Zawartość amin biogennych w świeżym mleku i nabiale nie jest wysoka. Wyjątek stanowią produkty poddawane fermentacji i dojrzewaniu. Najczęściej występującymi

aminami biogennymi w tego typu żywności są histamina, kadaweryna, putrescyna, tyramina, tryptamina i fenyletyloamina. Duże ilości amin biogennych powstają przy wykorzystaniu do przerobu mleka nieświeżego, niskiej jakości oraz niezachowaniu higieny produkcji [Cieślik i Migdał, 2011]. Na poziom amin w produkcie ma wpływ wiele czynników. W przypadku sera koziego, dowiedziono, że istotna jest nawet pora roku ze względu na różnice w składzie surowca do jego produkcji, na co wpływ ma odżywienie zwierząt. Zawartość wszystkich amin biogennych w serze była niemal dwukrotnie wyższa zimą niż latem [Milewski i in., 2018].

Ilość histaminy w mleku kształtuje się na poziomie 0-1 mg/kg. W serach zawartość amin biogennych nie przekracza 10 mg/kg, z czego dla większości z nich są to wartości praktycznie niewykrywalne. W skrajnych przypadkach w odniesieniu do serów długodojrzewających odnotowywano jednak bardzo zawyżone zawartości wynoszące odpowiednio dla tyraminy 2210 mg/kg, tryptaminy 1390 mg/kg, histaminy 2500 mg/kg; poziomy te zdecydowanie zagrażają zdrowiu konsumenta [Cieślik i Migdał, 2011; Czerniejewska-Surma i in., 2012].

Sposobem na ich obniżenie w przetworach mlecznych jest wykorzystywanie do przerobu mleka pasteryzowanego. Przeprowadzone badania na serach z mleka pasteryzowanego i niepasteryzowanego pozwoliły na zaobserwowanie zmniejszenia w mleku po pasteryzacji ilości drobnoustrojów wytwarzających aminy biogenne, ograniczając w ten sposób ich stężenie w produkcie końcowym [Cieślik i Migdał, 2011].

Mięso i wyroby mięsne

Produkty mięsne zawierają zróżnicowane poziomy amin biogennych. Wysoka zawartość białka i wolnych aminokwasów stwarza korzystne warunki do ich powstawania. Obecność amin biogennych w przetworach mięsnych może być wskaźnikiem ich złej jakości [Ansorena i in., 2002; Cieślik i Migdał, 2011].

Świeże mięso i jego przetwory zawierają najwięcej sperminy i spermidyny, natomiast kadaweryna, putrescyna i histamina występuje w tych produktach na niskim poziomie. Rodzaj mięsa nie ma wpływu na zawartość amin biogennych – ilość tych składników w mięsie drobiowym jest taka sama jak w przypadku mięs czerwonych. Inaczej sytuacja kształtuje się w przypadku rozdrabniania, mielenia i porcjowania: im większy stopień rozdrobnienia mięsa, tym wyższych stężeń amin możemy się spodziewać. Na zawartość amin biogennych w mięsie i jego przetworach wpływa głównie temperatura oraz czas przechowywania, jakość przetwarzanego surowca i pH [Stadnik, 2014].

Powszechnie wiadomo, że proces fermentacji prowadzi do podniesienia się poziomu amin biogennych w produkcie. Zawartość histaminy w surowej kiełbasie wynosi około 2-4 mg/kg, natomiast ten sam produkt poddany procesowi fermentacji wykazuje wzrost zawartości tej substancji nawet do 300 mg/kg. Obserwuje się również ilość tyraminy na poziomie 200-600 mg/kg, putrescyny 450 mg/kg, tryptaminy i 2-fenylometyloaminy 50 mg/kg. W mięsie wieprzowym aminy biogenne występują na poziomie około 5 mg/kg dla sperminy i 20-60 mg/kg spermidyny [Cieślik i Migdał, 2011; Czerniejewska-Surma i in., 2012].

Ryby i przetwory rybne

Ryby i przetwory rybne to grupa produktów odznaczająca się wysokim poziomem amin biogennych. Najczęściej w makrelach, tuńczyku czy śledziach występuje histamina. Jej poziom jest jedynym limitowanym przez Unię Europejską spośród wszystkich amin. Ryby zawierają również wysokie ilości sperminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny [Chen i in., 2010; Czajkowska-Mysłek i Leszczyńska, 2015].

W rybach i ich przetworach zawartość tych składników warunkowana jest przez wiele czynników takich jak gatunek, świeżość surowca, warunki transportu, przechowywanie chłodnicze oraz procesy technologiczne i przygotowanie produktu do spożycia. Obserwuje się również ich wzrost w przypadku przeprowadzenia procesu fermentacji [Cieślik i Migdał, 2011].

Maksymalna dawka histaminy w rybach i produktach rybnych zapewniająca bezpieczeństwo żywności, jak wynika z Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1441/2007, wynosi 200 mg/kg produktu, natomiast w produktach rybołówstwa poddanych zabiegowi dojrzewania enzymatycznego w solance, które zostały wyprodukowane z ryb o podwyższonych zawartościach histydy – 200-400 mg/kg.

Owoce i warzywa

Produkty roślinne świeże nie zawierają w swoim składzie dużej ilości amin biogennych, często jednak na ich powierzchni znajduje się mikroflora bakteryjna odpowiedzialna za procesy fermentacji, która może zwiększać poziom tych związków. W przypadku świeżych warzyw i owoców zawartość amin biogennych jest niższa, niż w produktach roślinnych poddanych fermentacji.

Na ilość amin biogennych ma wpływ rodzaj oraz gatunek owoców i warzyw, jak i poddanie ich ewentualnym procesom obróbki. W cytrusach znajduje się więcej amin biogennych niż w truskawkach, malinach czy winogronach. W produktach roślinnych najczęściej możemy znaleźć histaminę, tyraminę,

tryptaminę, kadawerynę i putrescynę [Czerniejewska-Surma i in., 2012; Cvetkoić i in., 2015; Czajkowska-Mysłęć i Leszczyńska, 2015].

Zawartość histamin w szpinaku kształtuje się na poziomie 38 mg/kg, w pomidorach 22 mg/kg, a w kapuście kiszzonej jej ilość może dochodzić nawet do 200 mg/kg. Czas przechowywania i jego warunki wpływają znacząco na ilość amin biogennych. Nieprawidłowo przechowywana kapusta kiszona może odznaczać się nawet pięciokrotnie wyższymi poziomami tych substancji. Miąższ banana zawiera śladowe ilości histaminy, serotoniny, fenyloaminy, putrescyny i kadaweryny. W sokach i napojach owocowych dominują takie aminy jak histamina, tyramina, putrescyna, metyloamina i fenyloalanina. Soki cytrusowe w swoim składzie zawierają najczęściej histaminę w ilości 1,5 mg/l [Zarębska i Ziarno, 2011; Czerniejewska-Surma i in., 2012].

Napoje alkoholowe

Napoje alkoholowe są produktami rozpowszechnionymi na całym świecie. Do tej grupy możemy zaliczyć między innymi wina, piwa, likiery czy cydry. Piwo znajduje się na piątym miejscu najczęściej konsumowanych napojów na świecie, a jego spożycie na mieszkańca wynosi w Czechach, aż 144 l rocznie.

W napojach alkoholowych na obecność i rodzaj amin biogennych mają wpływ zarówno mikroorganizmy biorące udział w procesie fermentacji, jak i ich zawartość w surowcach wykorzystywanych do produkcji. Obecnie nowe trendy w piwowarstwie, np. produkcja piw kwaśnych z wykorzystaniem bakterii fermentacji mlekowej, dodatkowo zwiększają potencjalną obecność amin biogennych w tej grupie produktów. Częste spożywanie napojów fermentowanych w dużych ilościach może przyczynić się do wystąpienia objawów związanych z przyjęciem wysokiej dawki amin biogennych [Parandes i in., 2016].

Sugerowana zawartość histaminy w napojach alkoholowych wynosi 2 mg/l. Działanie toksyczne występuje w organizmie człowieka po spożyciu napojów fermentowanych o stężeniu amin biogennych na poziomie 8-20 mg/l histaminy, 25-40 mg/l tyraminy i tylko 3 mg/l fenyloetyloaminy. W winie białym i czerwonym zawartość amin biogennych waha się pomiędzy 55-130 mg/l [Alvarez i Moreno-Arribas, 2014; Meléndez i in., 2016; Płotka-Wasyłka, 2016].

Podsumowanie

Na zawartość amin biogennych w żywności wpływ ma wiele różnych czynników. Najistotniejszym z nich jest proces fermentacji mlekowej. Żywność świeża, nie poddana obróbce wydaje się być bezpieczniejsza od żywności przetworzonej.

Produktami odznaczającymi się najwyższą zawartością amin biogennych są ryby i ich przetwory, sery długodojrzewające, wino i kiszona kapusta. Żywność bogata w białka stwarza dla konsumenta większe zagrożenie ze względu na możliwość przekształcenia go w aminy biogenne. Istnieje wiele sposobów na zapobieganie zwiększonym ilościom tych substancji w żywności i należy ciągle poszerzać wiedzę w tym temacie oraz stosować się do obecnych wymagań, aby zapewnić możliwie wysoką jakość i bezpieczeństwo żywności.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr UMO-2014/15/B/NZ9/04527.

Literatura

1. Alvarez M.A., Moreno-Arribas M.V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amines-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, 39, 146-155.
2. Ansorena D., Montel M.C., Rokka M., Talon R., Eerola S., Rizzo A., Reamaekers M., Demeyer D. (2002). Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, 61(2), 141-147.
3. Antoszkiewicz Z., Purwin C. (2010). Aminy biogenne w kiszonkach z lucerny. *Studia Regionalne Lokalnej Polski Południowo-Wschodniej*, VI, 77-84.
4. Chen H., Huang Y., Hsu H., Lin C.S., Chen W., Lin C.M., Tsai Y. (2010). Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. *Food Control*, 21, 13-18.
5. Cieślak I., Migdał W. (2011). Aminy biogenne w żywności. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLIV, 1087-1096.
6. Cvetkovic B.R., Pezo L.L., Tasića T., Šarić L., Kevrešan Z., Mastilović J. (2015). The optimisation of traditional fermentation process of white cabbage (in relation to biogenic amines and polyamines content and microbiological profile). *Food Chemistry*, 168, 471-477.
7. Czajkowska-Mysiek A., Leszczyńska J. (2015). Zawartość histaminyw produktach spożywczych zawierających ryby przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLVIII, 289-293
8. Czerniejewska-Surma B., Surma O., Plust D., Bienkiewicz G. (2012). Zawartość histaminy w owocach. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis*, 296, 5-12.
9. Gawarska H., Sawilska-Rautenstrauch D., Ścieżyńska H., Minorczyk M., Postupolski J. (2012). Występowanie wolnych amin biogennych: histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny w owocach i warzywach oraz ich produktach. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLV, 105-110.
10. Jastrząb R., Tylkowski B. (2016). Aminy biogenne a aspekcie ich roli w organizmach żywych. *Wiadomości Chemiczne*, 70, 57-79.
11. Kantachote D., Ratanaburee A., Sukhoom A., Sumpradit T., Asavaroungpipop N. (2016). Use of γ -aminobutyric acid producing lactic acid bacteria as starters to reduce biogenic amines and cholesterol in Thai fermented pork sausage (Nham) and their distribution during fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 171-177.
12. McCabe B.J., Staggs C.G., Bogle M.L. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs. *A Crossroad Where Medicine, Nutrition, Pharmacy, and Food Industry Converge*, 19, 58-65.
13. Madejska A., Michalski M., Osek J. (2017). Aminy biogenne w serach podpuszczkowych dojrzewających jako zagrożenie zdrowia konsumentów. *Medycyna Weterynaryjna*, 73(4), 214-219.
14. Melendez M., Sarabia L., Ortiz M. (2016). Distribution free methods to model the content of biogenic amines in Spanish wines. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 155, 191-199.
15. Milewski S., Ząbek K., Antoszkiewicz Z., Tański Z., Sobczak A. (2018). Impact of production season on the chemical composition and health properties of goat milk and rennet cheese. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(2), 107-114.

16. Mohammeda G.I., Bashammak A.S., Alsibaai A.A., Alwael H., El-Shahawi M.S. (2016). A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 78, 84-94.
17. Płotka-Wasyłka J., Simeonov V., Namieśnika J. (2016). An *in situ* derivatization – dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas-chromatography – mass spectrometry for determining biogenic amines in home-made fermented alcoholic drinks. *Journal of Chromatography A*, 1453, 10-18.
18. Pradenas J., Galarce-Bustos O., Henríquez-Aedo K., Mundaca-Urbe R., Aranda M. (2016). Occurrence of biogenic amines in beers from Chilean market. *Food Control*, 70, 138-144.
19. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
20. Stadnik J. (2014). Aminy biogenne jako markery bezpieczeństwa zdrowotnego wyrobów mięsnych surowo dojrzewających, Właściwości produktów i surowców żywnościowych. Wybrane zagadnienia. *Polskie Towarzystwo Technologów Żywności*, 61-70.
21. Suzzi G., Gardini F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54.
22. Zarębska D., Ziarno M. (2011). Alternatywne probiotyczne napoje warzywne i owocowe. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLIV, 160-168.

MARTA LISZKA-SKOCZYLAS¹, DANIEL ŻMUDZIŃSKI¹, ŁUKASZ SKOCZYLAS²

¹Katedra Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego, ²Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów
Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

PRODUKTY WZBOGACONE W KWASY OMEGA-3 JAKO PRZYKŁAD ŻYWNOŚCI FUNKCJONALNEJ

Streszczenie

Nowoczesna żywność ma na celu nie tylko dostarczenie energii, ale również podtrzymanie lub wręcz poprawienie dobrego stanu zdrowia. Wzbogacenie żywności uznaje się za najtańszą i najefektywniejszą formę poprawienia jakości zdrowotnej żywności i uzupełnienia niedoborów składników odżywczych w diecie człowieka. Przykładem takiej żywności są produkty wzbogacone w długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe w grupy omega-3. Kwasy te są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania całego organizmu. Uczestniczą one w wielu procesach regulacyjnych na poziomie komórek, tkanek, narządów. Niestety wytwarzanie ich przez organizm zachodzi z bardzo małą wydajnością i z tego względu powinny być one dostarczane wraz z pożywieniem. Głównym ich źródłem są ryby i inne organizmy morskie, których spożycie w wielu krajach jest niewystarczające. Do uzupełnienia niedoborów tych składników w diecie wykorzystywana jest żywność funkcjonalna wzbogacona w kwasy omega-3.

Żywność funkcjonalna

Podstawową rolą dobrze zbilansowanej diety jest dostarczenie organizmowi wszystkich składników odżywczych, które są niezbędne do jego prawidłowego funkcjonowania. Obecnie istnieje coraz więcej dowodów na to, że żywność może mieć również pozytywny fizjologiczny i psychologiczny wpływ na organizm człowieka. W dzisiejszych czasach zainteresowanie związkiem między zdrowiem a odżywianiem jest dużo większe niż w przeszłości. Rezultatem tego jest wzrost oczekiwań konsumentów dotyczących dostarczania zdrowotnych korzyści wraz z dietą [Aggett i in., 1999].

Pod koniec XX wieku znacznie wzrosło zainteresowanie bioaktywnymi składnikami żywności. Narodowe instytuty zdrowia USA (NIH) [NIH, 2004] zdefiniowały związki bioaktywne jako składniki występujące w żywności lub suplementach diety. Podkreśliły, że są to substancje chemiczne inne niż te niezbędne do zaspokojenia podstawowych potrzeb żywieniowych (odżywczych i energetycznych), które są odpowiedzialne za zmiany stanu zdrowia. Źródłem większości bioaktywnych związków żywnościowych,

odpowiedzialnych za pozytywny wpływ na zdrowie, jest świat roślin. W świecie zwierząt związki te są bardzo rzadkie. W literaturze wymieniane są: kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6, witaminy, skwalen, cystatyna i liwetyna [Gołąb i Warwas, 2005] oraz lizozym [Gajda i Bugla-Płoskońska, 2014] występujący w mleku, jajach i miodzie.

Z pojęciem substancji bioaktywnych ściśle związek ma żywność funkcjonalna w skład której one wchodzi. Obecnie najczęściej używaną definicją tego typu żywności jest ta powstała w 1999 w ramach programu FUFOSSE (Functional Food Science in Europe): „Żywność może być uznana za funkcjonalną, jeśli udowodniono jej korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu ponad efekt odżywczy. Wpływ ten polega na poprawie stanu zdrowia oraz samopoczucia i/lub zmniejszania ryzyka chorób. Żywność funkcjonalna musi przypominać postacią żywność konwencjonalną i wykazywać korzystne działanie na organizm w ilościach, które oczekuje się, że będą normalnie spożywane z dietą – przy czym nie są to tabletki, kapsułki ani krople, ale część składowa prawidłowej diety” [Krygiel i Florowska, 2008]. W produkcji żywności funkcjonalnej nośnikami substancji bioaktywnych są zwykle grupy produktów spożywczych często kupowane i regularnie spożywane (np. przetwory mleczne, zbożowe, napoje owocowe itp.) co zapewnia dość systematyczne ich przyjmowanie [Świdorski, 2003]. Żywność funkcjonalną można podzielić na cztery grupy: żywność naturalną o składnikach prozdrowotnych, żywność, do której dodano składniki prozdrowotne, żywność z której usunięto składniki antyodżywcze, żywność, w której zmodyfikowano biodostępność składników prozdrowotnych [Aggett i in., 1999]. W celu uniemożliwienia producentom wprowadzanie w błąd konsumentów zostały sporządzone stosowne przepisy, dopuszczające jedynie naukowo potwierdzone oświadczenia żywieniowe i zdrowotne. Za sformułowanie tych przepisów odpowiedzialne są instytucje jak FAO/WHO *Codex Alimentarius*, Rada Europy, ustawodawcy poszczególnych państw [Bellise i in., 1998].

Żywność funkcjonalna jest nazywana także żywnością projektowaną do określonych potrzeb organizmu (ang. designer foods, tailored foods). Może to być zarówno żywność konwencjonalna, jak i modyfikowana technologicznie. Specjalnie zaprojektowana żywność funkcjonalna w postaci tradycyjnej jest wytwarzana przeważnie metodami ogólnie stosowanymi, jednak surowce do jej produkcji często są otrzymywane ze specjalnych hodowli lub upraw. Działania te prowadzi się w celu uzyskania optymalnej zawartości składników pożądanых lub znacznego zredukowania zawartości składników niepożądanych w surowcu. Natomiast żywność funkcjonalną modyfikowaną technologicznie otrzymuje się zazwyczaj w wyniku: wzbogacania w poszczególne substancje bioaktywne lub całe ich kompozycje, odpowiedniego zestawiania poszczególnych składników recepturowych, eliminacji lub stosowania zamienników składników niepożądanych (np. tłuszczu, cholesterolu, soli, cukru), zwiększenia

biodostępności składników odżywczych przez wprowadzenie substancji o działaniu synergistycznym lub eliminacji substancji antyodżywczych [Świderski, 2003].

Ogólna charakterystyka kwasów tłuszczowych

Tłuszcze, obok białek i węglowodanów, należą do głównych składników pokarmowych. Stanowią najbardziej skoncentrowane źródło energii. Wartość energetyczna 1 g tłuszczu wynosi 9 kcal. Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne spełniają one różnorodne funkcje w żywym organizmie poczynając od tych najbardziej podstawowych, a kończąc na tych najbardziej wyspecjalizowanych [Jarosz i Bułhak-Jachymczak, 2008]. Tłuszcze są źródłem wielonienasyconych niezbędnych kwasów tłuszczowych (WNKT). Stanowią nośnik witamin w nich rozpuszczalnych (wit. A, D i E). Są one materiałem budulcowym, z którego organizm czerpie składniki do budowy własnych komórek (składnik błon i organelli komórkowych) oraz związków biologicznie czynnych tzw. eikozanoidów. Umożliwiają gromadzenie energii oraz są jednym z czynników odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie układu krążenia [Gawęcki i Hryniewiecki, 2003].

Tłuszcze pod względem budowy chemicznej to dość różnorodna grupa związków. Wspólną cechą jest występowanie w ich budowie kwasów tłuszczowych, które to wzbudzają największe zainteresowanie. W zależności od liczby wiązań podwójnych występujących w ich łańcuchu węglowym, dzieli się je na: nasycone SFA (Saturated Fatty Acid), jednonienasycone MUFA (Monounsaturated Fatty Acid) oraz wielonienasycone PUFA (Polyunsaturated Fatty Acid).

Zasadnicze funkcje fizjologiczne pełnią związki należące do wielonienasyconych (polienowych) kwasów tłuszczowych PUFA. Położenie pierwszego wiązania podwójnego licząc od metylowego końca łańcucha węglowego tych związków klasyfikuje je na trzy rodziny (klasy): omega – 3 (n - 3), omega – 6 (n - 6) oraz omega – 9 (n - 9). Największe znaczenie biologiczne mają kwasy należące do dwóch pierwszych grup, które w swojej budowie posiadają 20 - 22 węglowy łańcuch (tzw. długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe – Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid LC PUFA) [Burdge, 2006]. Kwasy PUFA, ze względu na swoją budowę, są szczególnie narażone na procesy utleniania i z tego względu należą do najbardziej nietrwałych związków bioaktywnych. W tabeli 1 zebrano polienowe kwasy tłuszczowe. z przynależnością do klasy.

Organizm człowieka, jak i większości zwierząt, nie posiada enzymów odpowiedzialnych za wprowadzenie wiązania podwójnego w łańcuch węglowy (desaturaz) w pozycji n-3 i n-6. Z tego powodu macierzyste kwasy tłuszczowe dla rodziny omega-3 (kwas α -linolenowy ALA) i omega-6 (kwas linolowy LA) muszą zostać dostarczone wraz

z pożywieniem i dlatego określa się je mianem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych NNKT. Kwasy te, w procesach elongacji (wydłużania łańcucha węglowego) oraz desaturacji (wprowadzenie dodatkowych wiązań podwójnych), ulegają przemianie w długołańcuchowe metabolity. Kwas ALA przekształca się do kwasów eikozapentaenowego oraz dokozaheksaenowego, zaś kwas LA – do kwasów arachidowego (AA) oraz dokozapentaenowego. W przemianach tych LA i ALA konkurują o te same enzymy, dlatego przewaga LA w diecie hamuje syntezę EPA i DHA, a zwiększa AA, co może zaburzyć równowagę fizjologiczną organizmu [Gertig i Przysławski, 2006; Wcisło i Rogowski, 2006; Materac i in., 2013]

Tabela 1. Kwasy tłuszczowe nienasycone z rodziny omega-3 i omega-6

Nazwa zwyczajowa	Zapis literowo-cyfrowy
Kwasy rodziny omega-3	
α -linolenowy (ALA)	C18:3 n-3
Stearodynowy (STA)	C18:4 n-3
Eikozapentaenowy (EPA)	C20:5 n-3
Dokozaheksaenowy (DHA)	C22:6 n-3
Kwasy rodziny omega-6	
Linolowy (LA)	C18:2 n-6
γ -linolenowy (GLA)	C18:3 n-6
Dihomo- γ -linolenowy (DGLA)	C20:3 n-6
Arachidowy (AA)	C20:4 n-6
Dokozapentaenowy	C22:5 n-6

Rola i znaczenie kwasów tłuszczowych omega

Działanie kwasów tłuszczowych omega w organizmie jest wielokierunkowe, a największe zainteresowanie budzi rola metabolitów NNKT i ich pochodnych. Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe uczestniczą w wielu procesach regulacyjnych na poziomie komórek, tkanek a nawet całego organizmu. Tworzą one struktury błonowe w komórkach wchodząc w skład fosfolipidów oraz estrów cholesterolu w związku z tym regulują płynność błon, transport jonów, a w przypadku jonów wapnia jego wiązanie [Sallis i in., 2014].

W wyniku przemian enzymatycznych kwasów dwudziestowęglowych, wchodzących w skład fosfolipidów, powstają eikozanoidy, będące biologicznie aktywnymi substancjami o charakterze hormonów tkankowych. Do tej grupy substancji zaliczyć należy prostaglandyny, prostacykliny, tromboksantyny, leukotrieny i lipoksyny. Działanie PUFA w organizmie związane jest z efektami aktywności eikozanoidów

syntetyzowanych z DGLA, AA i EPA [Bartnikowska, 2008; Gerster, 1998; Gertig i Przysławski, 2006; Porter, 2010]. Eikozanoidy powstałe z kwasów omega-3 charakteryzują się znacznie słabszym lub wręcz przeciwnym działaniem niż te powstałe z kwasów omega-6. W przypadku gdy prekursor ww. substancji stanowi kwas AA charakteryzują się one wysoką aktywnością już w małych ilościach. Ich nadmiar jednak znacznie zwiększa zachodzące w organizmie człowieka zmiany miażdżycowe oraz zakrzepowe, wywołuje silne reakcje alergiczne i zapalne, a nawet powoduje rozrost niektórych nowotworów. Eikozanoidy powstałe z kwasów tłuszczowych omega-3, szczególnie EPA, wykazują znacznie łagodniejsze działanie i chronią organizm przed szkodliwymi skutkami działania tych pierwszych. Wykazują więc działanie przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, hamują rozrost niektórych nowotworów oraz nadmierną kurczliwość naczyń krwionośnych. Z tego względu ważny staje się zarówno poziom, jak i stosunek kwasów omega-6 do omega-3 w diecie [Zagrodzki, 2009; Chen, 2007; Simopoulos, 2008]

Wyniki wielu badań wskazują, że kwasy EPA i DHA wywołują różne efekty biologiczne. Pierwszy z nich pobudza głównie układ sercowo-naczyniowy poprzez wpływ na syntezę eikanozoidów, zaś DHA jest ważnym składnikiem strukturalnym tkanki nerwowej, zwłaszcza kory mózgowej i siatkówki. DHA odgrywa więc kluczową rolę w rozwoju układu nerwowego w życiu płodowym i we wczesnym dzieciństwie. Wraz z wiekiem poziom tego kwasu w organizmie spada, co przyczynia się do zaburzeń funkcjonowania układu nerwowego ludzi starszych [Wcisło i Rogowski, 2006; Kolanowski, 2007; Troxeli i in., 2005; Mazza, 2007].

Bez względu na mechanizm działania, kwasy omega hamują rozwój choroby niedokrwiennej i choroby wieńcowej serca [Bucher i in., 2002; Saravanan i in., 2010], redukują stężenie triacylogliceroli w osoczu krwi i normalizują jej ciśnienie [Dagnelie i Rietveld, 1994; Banning, 2005]. Wykazują silne działanie przeciwzakrzepowe wynikające z wydłużenia czasu krwawienia poprzez zmniejszenie podatności płytek krwi do agregacji w wyniku ograniczenia ilości substancji silnie protrombotycznych [Allman, 1995]. Kwasy omega charakteryzują się działaniem przeciwmiażdżycowym wynikającym m. in. z modyfikacji w syntezie eikozanoidów, redukcji poziomu cholesterolu w osoczu oraz hamowania zlepiania się płytek krwi [Fernandes i Verkhatraman, 1993]. Działanie przeciwzapalne i przeciwalergiczne kwasów omega-3 polega na hamowaniu nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, jak również ostrości przebiegu procesów zapalnych o pochodzeniu bakteryjnym i wirusowym [Bjerve i Brubak, 1993]. Badania wykazały, że niski poziom kwasów omega-3 i wysoki omega-6 w fosfolipidach błon komórkowych mięśni szkieletowych jest związany ze wzrostem ich odporności na insulinę, co sprzyja rozwojowi cukrzycy typu II [Kromhout, 1992]. Zachowując odpowiednie proporcje

między kwasami omega-3 i -6 można ograniczyć ryzyko wystąpienia tego rodzaju choroby. Kwasy omega-3 stanowią budulec do produkcji hormonów takich jak: serotonina i dopamina przez co wykazują działanie przeciwdepresyjne [Hibbeln, 1995]. Ponadto związki te korzystnie oddziałują na skórę i posiadają lecznicze działanie w przypadku schorzeń skórnych takich jak atopowe zapalenie skóry, przeciwdziałają otyłości i wykazują działanie przeciwnowotworowe [Bojarowicz i Woźniak, 2008; Buckley i Howe, 2010].

Zapotrzebowanie człowieka na wielonienasycone kwasy tłuszczowe

Ogół znanych korzyści zdrowotnych związanych z aktywnością kwasów omega-3 został potwierdzony poprzez dopuszczenie do stosowania oświadczeń zdrowotnych do żywności. Oświadczenia te podają, że kwasy EPA i DHA „przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania serca”, kwas dokozaheksaenowy (DHA) przyczynia się do utrzymania prawidłowego widzenia” i „prawidłowego funkcjonowania mózgu” [Rozporządzenie UE 432/2012]. Według tego samego Rozporządzenia zalecana dzienna dawka wielonienasyconych kwasów omega-3, która wykazuje korzystne działanie na organizm ludzki, to 250 mg DHA/EPA. Również Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) określiła prawidłowy poziom spożycia kwasów omega-3 w granicach 0,3-0,5 g/dzień. Europejski Urząd do spraw Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) wskazuje na rezultaty badań naukowych, które dowodzą, że również wyższe spożycie tych kwasów jest korzystne i nie wiąże się z działaniami niepożądanymi. Podwyższenie dziennej dawki spożycia EPA do 1,8 g, DHA do 1 g, a także łączne spożycie EPA i DHA w ilości 5 g nie budzi obaw o bezpieczeństwo zdrowotne ludzi dorosłych [EFSA, 2010]. Trzeba również pamiętać, że zapotrzebowanie człowieka na kwasy wielonienasycone z rodziny omega-3 zależy od ogólnej ilości spożywanego tłuszczu oraz od zawartości w nim wielonienasyconych kwasów z rodziny omega-6. Dodatkowo zalecenia dot. spożywania omega-3 uzależnione są od grupy wiekowej i stanu fizjologicznego organizmu. Zespół ekspertów EFSA opracował zalecenia dziennej dawki EPA i DHA na poziomie [EFSA, 2012]:

- 250 mg dla osób dorosłych i dzieci w wieku od 2-18 lat,
- 100 mg dla dzieci od 7-24 miesiąca życia,
- 250 mg powiększone o 100-200 mg DHA dla kobiet w ciąży i karmiących piersią.

Rekomendowane dzienne spożycie kwasu α -linolenowego (ALA) winno wynosić 2 g/dzień. ALA ulega konwersji do EPA i DHA, jednak w organizmie człowieka stopień tych przemian jest stosunkowo niewielki. Ocenia się, iż ok. 5-10% ALA zostaje przekształcone do EPA, natomiast mniej niż 1% do DHA [Burdge, 2004].

Nie ma wątpliwości co do skutecznego działania kwasów omega na organizm. Ich skuteczność zależy jednak od stosunku omega-6 do omega-3 i stanu zdrowia. Według FAO/WHO ww. stosunek kwasów omega w diecie zdrowego człowieka powinien zawierać się w granicach (5-10):1. Niektóre badania wskazują jednak, że tak wysoka dawka może mieć negatywny wpływ na metabolizm organizmu. Nie odnotowano jednak poważnych działań niepożądanych i wobec niewątpliwych korzyści, które niosą kwasy omega-3, przyjęto, że niższe proporcje między omega-6 a omega-3, zawierające się między 2,5:1 i 5:1 są korzystne. Na podstawie badań ustalono, że codzienne spożycie kwasów omega w stosunku 2,5:1 jest korzystne w przypadku chorób raka jelita grubego, (2-3):1 w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów, a 5:1 w przypadku astmy [Simopoulos, 2008]. Dla innych chorób, takich jak cukrzyca czy depresja nie zostały jeszcze ustalone dawki i tym samym stanowią ważny obszar badań.

Wzbogacanie żywności w wielonienasycone kwasy tłuszczowe

W wielu krajach ze względu na stosunkowo niskie spożycie produktów bogatych w WNKT i niedostateczny poziom wysycenia żywności kwasami z grupy omega-3 podejmowany jest temat zmiany nawyków żywieniowych ludzi. Jest to jednak trudne do wykonania, dlatego proponowane pokrycie ich niedoborów w diecie zakłada użycie suplementów lub fortyfikację żywności np.: olejem rybnym. Substratami do produkcji preparatów długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3 są głównie rafinowane oleje z ryb, które są najtańszym i najbardziej popularnym ich źródłem. Już niewielki, kilkugramowy dodatek niewodornionego oleju rybiego bogatego w EPA i DHA znacznie poprawia bilans spożycia tych kwasów tłuszczowych. Jednak nadmierny połów ryb może spowodować wyczerpanie naturalnych zasobów, a stale rosnące zanieczyszczenie środowiska, w tym mórz i oceanów, uniemożliwia wykorzystanie wszystkich gatunków ryb, ze względu na kumulowanie w ich tkance metali ciężkich, pestycydów, dioksyn. Stąd też sięgnięto po alternatywne źródła wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Skorupiaki morskie (kryl, kielże) algi, mikroalgi, czy inne jednokomórkowce pozyskiwane z naturalnych źródeł lub uzyskiwane ze specjalnych hodowli mogą stanowić opcję dla tych pozyskiwanych tradycyjnie. Algi transgeniczne zostały poddane takim modyfikacjom, aby zwiększyć zawartość oleju, a w nich kwasów omega-3. Olej taki zawiera prawie wyłącznie DHA, który jest stosowany w odżywkach dla niemowląt. Jest to dość kosztowny składnik, wykorzystywany jedynie w drogich produktach. Całe algi natomiast mogą być także stosowane jako składniki paszy dla zwierząt [Świdorski, 2003].

Olej pozyskiwany z mikroorganizmów oleistych (bakterie, grzyby, mikro-algi) jest określany jako olej jednokomórkowy (SCO – single cell oil). Aby produkować duże

ilości olejów i tłuszczów w przystępnych cenach, mikroorganizmy muszą być uprawiane na dużą skalę. Kwasy omega-3 zawierają oleje takich mikroorganizmów jak grzyby (*Mortierella elongata*) i mikro-algi (*Chlorella minutissima*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Amphidinium carterae*, *Porphyridium cruentum*). Oleje te są bardzo drogie z powodu hodowli, która musi być prowadzona w zamkniętych systemach kultur, aby nie doszło do zanieczyszczenia mikroorganizmami z powietrza. 95% produkowanego kwasu dokozaheksaenowego pochodzi z uprawy *Cryptocodinium Cohnie* (mikro-alga), która jest uprawiana w zbiornikach fermentacyjnych. DHA-SCO jest stosowany w połączeniu z ARA-SCO (olej zawierający kwas arachidonowy) w odżywkach dla niemowląt jako źródło tych niezbędnych kwasów tłuszczowych. Oba te oleje są mieszane w proporcji 2:1 (ARA:DHA) i sprzedawane pod nazwą Formulaid. Olej ten jest sprzedawany w 60 krajach i jego głównym zastosowaniem są odżywki dla niemowląt [Haraldsson, 2006]. Inny proces produkcji DHA polega na wykorzystaniu niesyntetyzujących organizmów morskich zwanych *Thraustochytrids*. Oleje te nie są jednak wykorzystywane w produktach dla niemowląt. Inne produkcje DHA wykorzystują *Ulkenia* sp. i *Schizochytrium* sp., organizmy które oprócz DHA zawierają kwas DPA – (dokozaheksaenowy). Produkcja tych olejów rozwija się w kierunku żywności i napojów wzbogaconych w kwas dokozaheksaenowy [Scheeder, 2006]. Produkty takie nie są jednak bardzo popularne ze względu na wysoki koszt produkcji oraz częsty brak akceptacji konsumentów dla produktów typu GMO [Olsen i in., 2006; Kolanowski i in., 2007c; Kolanowski, 2008; Whelan i Rust, 2006; Ward i Singh, 2005].

Innym bogatym źródłem WNKT są rośliny np.: nasiona lnu. Pozyskiwanie z nich oleju i wykorzystywanie go jako dodatku do żywności ma szczególnie istotne znaczenie dla osób ceniących sobie żywność pochodzenia nie odzwierzęcego oraz szukających alternatywy dla obecnie istniejących produktów. Jednak to surowiec rybi charakteryzuje się większą zawartością omega-3 PUFA w porównaniu do olejów pochodzenia roślinnego, które z kolei bogatsze są w kwasy omega-6. Ponadto oleje ryb morskich jak i niektórych gatunków śródłądowych, mają lepszy stosunek ilościowy kwasów omega-3 do omega-6, co wpływa na ich właściwości prozdrowotne. Skład i stężenie EPA i DHA w tłuszczu ryb uzależniony jest od gatunku ryb oraz jej stanu fizjologicznego. Nie bez znaczenia jest również okres i czas połowu [Kolanowski, 2008; Kolanowski, 2007; Rubio-Rodriguez i in., 2010].

Głównym założeniem fortyfikacji żywności kwasami tłuszczowymi z grupy omega-3 jest zwiększenie ich podaży na rynku i możliwości ich systematycznej oraz częstej konsumpcji przez potencjalnego klienta w mniej więcej stałych dawkach. Najlepszym rodzajem żywności przeznaczonej do wzbogacania jest ta, która jest często i systematycznie spożywana, nie jest długo przechowywana, ani nie jest poddawana

obróbce termicznej z powodu podatności kwasów omega-3 na utlenianie. Trwałość takich produktów jest uzależniona od temperatury i czasu przechowywania i można ją przedłużyć poprzez zastosowanie temperatur chłodniczych i/lub pakowanie w atmosferze modyfikowanej [Kolanowski i Laufenberg, 2006]. W głównej mierze dotyczy to przetworów mlecznych, masła, margaryn, olejów. Coraz częściej spotykane są również wzbogacane produkty przemysłu mięsnego typu parówki, wędzonki, jaja i produkty jajeczne, produkty typu instant czy nawet pieczywo i soki [William, 2005; Whelan i Rust, 2006; Kolanowski i in., 2006]. Ważne jest oszacowanie możliwie jak najwyższego ich dodatku bez obniżenia akceptowalności wzbogacanej żywności. W aspekcie wrażeń sensorycznych dodatek 0,5÷1% EPA i DHA do wielu produktów daje zadowalające rezultaty. Należy jednak zwrócić uwagę, że nawet niewielki ich dodatek może być szkodliwy jeśli ulegną one utlenieniu. Istotne znaczenie ma zatem zapobieganie zmianom oksydacyjnym w samym oleju oraz w żywności wzbogacanej zarówno w aspekcie zmian sensorycznych produktu jak i zmniejszenia wartości odżywczej i zwiększenia toksyczności takiego pożywienia będącego prekursorem chorób degeneracyjnych [Kolanowski i in., 2007a; Świdorski, 2003].

Czynnikiem wpływającym w znacznym stopniu na ograniczenie czasu przydatności do spożycia produktów fortyfikowanych EPA i DHA jest tlen. Ograniczenie dostępu tlenu do oleju i/lub wzbogaconego produktu podczas wszystkich etapów produkcji oraz przechowywania jest najbardziej efektywną metodą zapobiegania jęlczeniu. Osiągnąć to można na drodze dodatków antyoksydantów sztucznego lub naturalnego pochodzenia, zastosowanie opakowań próżniowych lub MAP oraz utrzymywania łańcucha chłodniczego. Użycie przeciwutleniaczy uzależnione jest od środowiska w jakim będzie się on znajdował i jego powinowactwa to tlenu w tych warunkach. Skuteczność ich działania zależy bowiem od wielu czynników typu temperatura czy pH. W niektórych warunkach β -karoten czy α -tokoferol może katalizować reakcję utleniania, podczas gdy kwas askorbinowy z witaminą E lub wyciągiem z rozmarynu będzie inhibitorem dla tego procesu. Innym rozwiązaniem zabezpieczającym wrażliwe składniki żywności jest mikrokapsułkowanie. Opiera się ono na stworzeniu bariery między wrażliwym składnikiem, a otoczeniem. Otoczenie aktywnego składnika, nazywanego rdzeniem, przez materiał okrywający określany jako osłonka, nośnik lub powłoka powoduje powstanie cząstek o średnicy od kilku nm do kilku mm. Bardziej skomplikowaną formą tej metody jest stworzenie mikrokapsułek z rdzeniem rozproszonym w matrycy lub mikrokapsułki z wielowarstwową otoczką [Zuidam i Nedovic, 2010; Madene i in., 2006]. Pomimo wielu swoich zalet w postaci w/w ochrony składników labilnych, czy poprawiających teksturę lub ułatwiających dodatek substancji przekształconych z płynnych na stałe, metoda ta jest stosunkowo droga i komplikująca proces produkcyjny.

Dużym wyzwaniem jest dobór odpowiednich materiałów do produkcji matryc, które zapewniłyby ochronę labilnemu rdzeniowi. Mogą to być powłoki wykonane z celulozy modyfikowanej [Kolanowski i in., 2006; Kolanowski i in., 2007b], kazeinianu sodu [Jonsdottir i in., 2005; Velasco i in., 2006; Patten i in., 2009; Drusch i in., 2007], skrobi modyfikowanych [Serfert i in., 2009; Tan i in., 2005; Drusch i Berg, 2008; Drusch i in., 2009; Drusch i Schwarz, 2006; Drusch i in., 2006a; Drusch i in., 2006b; Shen i in., 2010] modyfikowanej skrobi wysokoamylozowej [Patten i in., 2009], chitozanu [Klinkersorn i in., 2005; Shaw i in., 2007; Klaypradit i Huang, 2008], gumy arabskiej, pektyn z buraka cukrowego i białek mleka [Drusch i Serfert, 2007]. Niskocząsteczkowe sacharydy typu dekstryny, sacharoza, czy glukoza czy maltoza często stanowią substancje wypełniające zapewniając zwiększoną stabilność rdzenia, a lecytyna wykorzystywana jest jako emulsyfikator [Velasco i in., 2006; Jonsdottir i in., 2005; Patten i in., 2009; Drusch i in., 2009]. Składniki niestabilne mogą być zabezpieczone różnymi technikami, ale dwuetapowa metoda suszenia rozpyłowegoz wykorzystaniem złoża fluidalnego jest najbardziej ekonomiczna i najczęściej stosowana. Mikrokapsułkowanie oleju rybiego możliwe jest także w procesie ekstruzji z wykorzystaniem surowca białkowego lub ze skrobi modyfikowanych jako emulsyfikatora, a wody jako plastyfikatora. Jednym z procesów kapsułkowania jest również koacerwacja. Polega ona na oddzieleniu cząstek koloidalnych z roztworu, które tworzą osobną fazę ciekłą – koacerwat. Rdzeń powinien być kompatybilny z nośnikiem oraz nierozpuszczalny lub bardzo trudno rozpuszczalny w środowisku koacerwacji. Przy zabezpieczaniu oleju zwykle stosuje się koacerwację złożoną, używając więcej niż jeden koloid okrywający. Metodą tą można uzyskać wysoki poziom załadowania mikrokapsułek olejem, bo sięgający 90% [Zuidam i Nedovic, 2010; Janiszewska i Witrowa-Rajchert, 2006]. Mikrokapsułkowany olej rybi jest obecnie stosowany w odżywkach dla niemowląt, produktach mlecznych takich jak jogurty, płatki śniadaniowe, słodycze, a nawet gumy do żucia [Berger, 2001].

Oprócz wyżej wymienionych metod wzbogacania żywności w kwasy omega-3 PUFA wyższą zawartość kwasów tłuszczowych omega-3 w produktach pochodzenia zwierzęcego można osiągnąć poprzez karmienie zwierząt paszą bogatą w ALA (kwas α -linolenowy). Jest to jeden ze sposobów osiągnięcia korzystnego stosunku kwasów n-6/n-3 w ludzkiej diecie, bez zmian w zwyczajach żywieniowych. U przeżuwaczy biohydrogenacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest ważną przeszkodą w podniesieniu zawartości kwasów tłuszczowych omega-3 w produktach. Wydajność transferu kwasów omega-3 z diety do produktu jest wyższa, gdy źródłem kwasów n-3 jest pasza, gdzie ALA jest estryfikowane do glikolipidów mniej podatnych na lipolizę. Dieta zwierząt oparta na trawie istotnie zwiększa zawartość kwasów omega-3 w tłuszczu mleka w porównaniu z dietą zawierającą kiszonkę i koncentraty. Jednak wydajność transferu

EPA i DHA z diety do mleka jest bardzo niska (2-4%), a uzupełnienie tych kwasów tłuszczowych w diecie może znacząco ograniczyć syntezę tłuszczu mleka. Bardziej skutecznym sposobem może być dodanie preparatów EPA i DHA bezpośrednio do mleka [Pisulewski, 2000].

Zwiększenie zawartości kwasów n-3 w mięsie trzody chlewnej może być osiągnięte poprzez włączenie do paszy wyciśniętego siemienia lnianego, co dostarcza dodatkową ilość ALA (4,5 g/kg paszy). Jednak badania wykazały, że poprzez uzupełnienie diety w ALA zwiększa się zawartość EPA, ale poziom DHA nie zmienia się.

W przeciwieństwie do tego, wzrost zawartości DHA w diecie niosek znacznie zwiększa zawartość DHA w jajach [Pisulewski, 2000]. Ponadto, aby zwiększyć zawartość DHA w jajkach możliwe jest karmienie niosek olejem rybim, jednak zastosowanie biomasy *Schizochytrium* stało się atrakcyjniejszą alternatywą, z braku konieczności stosowania mikrokapsułkowania. Komórki *Schizochytrium* zapewniają DHA stabilne środowisko, w którym kwas nie jest utleniany tak długo, jak komórki bakterii pozostają nienaruszone [Scheeder, 2006].

Podsumowanie

WNKT, a szczególnie omega-3, są istotnym czynnikiem wpływającym na stan zdrowia człowieka. Ich spożycie w Polsce nie jest jednak duże. Aby zwiększyć ich konsumpcję niezbędna jest zmiana nawyków żywieniowych lub wzbogacanie nimi żywności. Ta druga opcja z punktu widzenia żywieniowego wydaje się być najlepszą, pod warunkiem zastosowania jej do produktów spożywczych codziennego użytku, aby podaż kwasów omega-3 była na stałym poziomie. Istotna jest równocześnie troska producentów o odpowiednie zabezpieczenia takiej żywności, gdyż źle chroniona przed czynnikami zewnętrznymi żywność prozdrowotna może stać się zagrożeniem dla zdrowia konsumentów. Nowoczesne technologie pozwalają obecnie na produkcję bezpiecznej żywności funkcjonalnej, niemniej jednak świadomość konsumentów dotycząca zasad i metod przechowywania żywności wzbogacanej kwasami omega-3 wydaje się być równie istotna.

Literatura

1. Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Diplock A.T., Fern E.B., Roberfroid M.B. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods In Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81 (Suppl. 1), 1-27.
2. Allman M.A. (1995). Supplementation with flaxseed oil versus sunflowerseed oil in healthy young men consuming a low fat diet: effects on platelet composition and function. *European Journal Clinical Nutrition*, 3, 252.
3. Banning M. (2005). The role of omega-3-fatty acids in the prevention of cardiac events. *British Journal of Nursing*, 25, 503-508.

4. Barrow C.J., Nolan C., Jin Y. (2007). Stabilization of highly unsaturated fatty acids and delivery into foods. *Lipid Technology*, 19, 108-111.
5. Bartnikowska E. (2008). Fizjologiczne działanie polienowych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3. *Tłuszcze Jadalne*, 1-2, 10-15.
6. Bellisle F., Diplock A.T., Hornstra G., Koletzko B., Roberfroid M., Salminen S, Saris W.H.M. (1998). *Functional Food Science in Europe*. British Journal of Nutrition, 80, 3-193.
7. Berger S., Kolanowski W., Świdorski F., Lis E. (2001). Enrichment of spreadable fats with polyunsaturated fatty acids omega-3 using fish oil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 469-476.
8. Bjerve K.S., Brubak A.M. (1993). N-3 fatty acids - essential fatty acids with important biological effects, and serum phospholipids fatty acids as markers of dietary n-3 fatty acids intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 5(S), 801-806.
9. Bojarowicz H., Woźniak B. (2008). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz ich wpływ na skórę. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 89(4), 471-475.
10. Bucher H.C., Hengstler P., Schindler C., Meier G. (2002). N-3 polyunsaturated fatty acids in coronaryheart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Medicine*, 112, 298-304.
11. Buckley J.D., Howe P.R.C. (2010). Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity. A review. *Nutrients*, 2, 1212-1230.
12. Burdge G. (2004). Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 7, 137-44.
13. Burdge G.C. (2006). Metabolism of linolenic acid in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75, 161-168.
14. Chen Y.Q., Edwards I.J., Kridel S.J., Thornburg T., Berquin M. (2007). Dietary fat-gene interactions in cancer. *Cancer Metastasis Review*, 26, 535-551.
15. Dagnelie P.C., Rietveld T. (1994). Effect of dietary fish oil on blood levels of EFA, ketone bodies and triacylglycerols in human. *Lipids*, 1, 41.
16. Drusch S. (2007). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids*, 21, 1223-1228.
17. Drusch S., Ber S. (2008). Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chemistry*, 109, 17-24.
18. Drusch S., Ratzke K., Shaikh M.Q., Serfert Y., Steckel H., Scampicchio M., Voigt I., Schwarz K., Mannino S. (2009). Differences in free volume elements of the carrier matrix affect the stability of microencapsulated lipophilic food ingredients. *Food Biophysics*, 4, 42-48.
19. Drusch S., Serfert Y., Schwarz K. (2006a). Microencapsulation of fish oil with n-octenylsuccinate-derivatised starch: Flow properties and oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 501-512.
20. Drusch S., Serfert Y., van den Heuvel A., Schwarz K. (2006b). Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International*, 39, 807-815.
21. Drusch S., Serfert Y., Scampicchio M., Schmidt-Hansberg B., Schwarz K. (2007). Impact of physicochemical characteristics on the oxidative stability of fish oil microencapsulated by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 11044-11051.
22. Drusch S., Schwarz K. (2006). Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *European Food Research and Technology*, 222, 155-164.
23. EFSA (2010). Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol, *EFSA Journal*, 8 (3), 1461.
24. EFSA (2012). Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA), *EFSA Journal*, 10 (7), 2815.
25. Fernandes G., Verkatraman J.T. (1993). Role of n-3 fatty acids in health and disease. *Nutrition Research*, 13(1), 19-45.

26. Gajda E., Bugła-Płoskońska G. (2014). Lizozym – występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 68, 1501-1515.
27. Gawęcki J., Hryniewiecki L. (2003). *Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*, Wydawnictwo PWN, Warszawa.
28. Gerster H. (1998). Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n₃) to eicosapentaenoic acid (20:5n₃) and docosahexaenoic acid (22:6n₃)? *International Journal of Vitamin and Nutrition Research.*, 68, 159.
29. Gertig H., Przysławski J. (2006). *Bromatologia. Zarys nauki o żywności i żywieniu*. PZWL, Warszawa.
30. Gołąb K., Warwas M. (2005). Białka jaja kurzego – właściwości biochemiczne i zastosowania. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 14 (5), 1001-1010.
31. Haraldsson G., Hjaltason B., (2006). *Modifying lipids: Fish oils and lipids from marine sources*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Iceland.
32. Hibbeln J.R., Salem M. (1995). Dietary PUFAs and depression. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1, 42.
33. Janiszewska E., Witrowa-Rajchert D. (2006). Mikroksuflukowanie aromatów. *Przemysł Spożywczy*, 5, 40-45.
34. Jarosz M., Bułhak-Jachymczak B. (2008). *Normy żywienia człowieka. Podstawy prewencji otyłości i chorób zakaźnych*, Wyd. PZWL, Warszawa.
35. Jonsdottir R., Bragadottir M., Arnarson G.O. (2005). Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *Journal of Food Science*, 70, C433-C440.
36. Klaypradit W., Huang Y.-W. (2008). Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1133-1139.
37. Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., McClements D.J., Decker E.A. (2005). Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8365-8371.
38. Kolanowski W. (2007). Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 – znaczenie zdrowotne w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 40, 229-237.
39. Kolanowski W. (2008). *Dodatkowe źródła kwasów tłuszczowych omega-3 w żywieniu człowieka*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
40. Kolanowski W., Jaworska D., Weissbrodt J. (2007a). Importance of instrumental and sensory analysis in the assessment of oxidative deterioration of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 181-191.
41. Kolanowski W., Jaworska D., Weissbrodt J., Kunz B. (2007b) Sensory assessment of microencapsulated fish oil powder. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 84, 37-45.
42. Kolanowski W., Laufenberg G. (2006). Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 222, 472-477.
43. Kolanowski W., Stołyhwo A., Grabowski M. (2007c). Fatty acid composition of selected fresh water Gammarids (*Amphipoda, Crustacea*): A potentially innovative source of omega-3 LC PUFA. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 84, 827-833.
44. Kolanowski W., Ziółkowski M., Weissbrodt J., Kunz B., Laufenberg G. (2006). Microencapsulation of fish oil by spray drying – impact on oxidative stability. Part 1. *European Food Research Technol.*, 222, 336-342.
45. Kris-Etherton P.M., Hill A.M. (2008). n-3 fatty acids: Food or supplements? *Journal of the American Dietetic Association*, 108, 1125-1130.
46. Kromhout D. (1992). Dietary fats: long term implication for health. *Nutrition Reviews*, 4 (2), 49.
47. Krygiel K., Florowska A. (2008). *Żywność funkcjonalna obecnie i w przyszłości*. *Przemysł Spożywczy*, 5, 2-5.
48. Madene A., Jacquot M., Scher J., Desobry S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21.
49. Materac E., Marczyński Z., Bodek K.H. (2013). Rola kwasów tłuszczowych omega-3 i omega-6 w organizmie człowieka. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2, 225-233.

50. Mazza M., Pomponi M., Janiri L., Bria P., Mazza S. (2007). Omega-3 fatty acids and anti-oxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31, 12-26.
51. NIH (2004). Office of Dietary Supplements. Federal Register, Vol. 69 No. 179 FR Dec 04–20892.
52. Olsen R.E., Suontama J., Langmyhr E., Mundheim H., Ringo E., Melle W., Malde M.K., Hemre G.-I. (2006). The replacement of fish meal with Antarctic krill, *Euphausia superba* in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, 12, 280-290.
53. Patten G.S., Augustin M.A., Sanguansri L., Head R.J., Abeywardena M.Y. (2009). Site specific delivery of microencapsulated fish oil to the gastrointestinal tract of the rat. *Digestive Diseases and Sciences*, 54, 511-521.
54. Pisulewski P.M. (2000). Żywieniowe metody modyfikowania składu kwasów tłuszczowych żywności pochodzenia zwierzęcego. *Przemysł Spożywczy*, 10, 6–8.
55. Porter J. (2010). The role of Long Chain Fatty acid (n-3 PUFA) supplementation in Rheumatoid arthritis. *The Plymouth Student Journal of Health & Social Work*, 2, 12-18.
56. Rozp. Kom. UE (2012). Rozporządzenie Komisji (UE) nr 432/2012 z dnia 16 maja 2012 r. ustanawiające wykaz dopuszczonych oświadczeń zdrowotnych dotyczących żywności, innych niż oświadczenia odnoszące się do zmniejszenia ryzyka choroby oraz rozwoju i zdrowia dzieci (Dz. Urz. UE 2012 L 136/1).
57. Rubio-Rodriguez N., Beltran S., Jaime I., de Diego S.M., Sanz M.T., Carballido J.R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 1-12.
58. Sallis H., Steer C., Paternoster L., Davey Smith G., Evans J. (2014). Perinatal depression and omega-3 fatty acids: A Mendelian randomisation study. *Journal of Affective Disorder*, 166, 124-131.
59. Saravanan P., Davidson N.C., Schmidt E.B., Calder P.C. (2010). Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet*, 375, 540-50.
60. Scheeder M.R.L. (2006). *Modifying lipids: Modifying fats of animal origin for use in food*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Zurich, Switzerland.
61. Serfert Y., Drusch S., Schwarz K. (2009). Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenization, microencapsulation and storage. *Food Chemistry*, 113, 1106-1112.
62. Shaw L.A., McClements D.J., Decker E.A. (2007). Spray-dried multilayered emulsions as a delivery method for ω-3 fatty acid into food systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3112-3119.
63. Shen Z., Augustin M.A., Sanguansri L., Cheng L.J. (2010). Oxidative stability of microencapsulated fish oil powders stabilized by blends of chitosan, modified starch, and glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4487-4493.
64. Simopoulos A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-688.
65. Simopoulos A.P. (2008). The importance of the omega-6 / omēgā3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-688
66. Świderski F. (2003). *Żywność wygodna i żywność funkcjonalna*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.
67. Tan L.H., Chan L.W., Heng P.W.S. (2005). Effect of oil loading on microspheres produced by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 22, 253-259.
68. Troxell H., Anderson J., Auld G., Marx N., Harris M., Reece M., Allen K. (2005). Omega-3 for baby and me: Material development for a WIC intervention to increase DHA intake during pregnancy. *Maternal and Child Health Journal*, 9, 189-197.
69. Wcisło T., Rogowski W. (2006). Rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 w organizmie człowieka. *Cardiovascular Forum*, 11 (3).
70. William E.M. (2005). *Healthful lipids: Essential Fatty Acid Metabolism to Self-Healing Agents*. AOCS PRESS, Urbana, Illinois.
71. Velasco J., Marmesat S., Dobarganes C., Marquez-Ruiz G. (2006). Heterogenous Aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1722-1729.

72. Ward O.P., Singh A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative source of production. *Process Biochemistry*, 40, 3627-3652.
73. Whelan J., Rust C. (2006). Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annual Reviews Nutrition*, 26, 75-103.
74. Zagrodzki P. (2009). Kwasy tłuszczowe n-3 i n-6 a parametry kognitywne i behawioralne u dzieci – przegląd literatury. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLII, 3.
75. Zuidam N.J., Nedovic V. (2010). *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, Springer.

DOROTA KLENSPORF-PAWLIK¹, WOJCIECH ZMUDZIŃSKI¹,
AGNIESZKA BAŃKOWSKA¹

¹*Katedra Towaroznawstwa Żywności, Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*

OWADY JADALNE ŹRÓDŁEM BIOAKTYWNYCH LIPIDÓW

Streszczenie

Wysoka wartość odżywcza jak i przyjazność dla środowiska przemawiają za włączeniem owadów jadalnych do diety. Jednakże jadalne owady to nie tylko wysoka zawartością białka, lecz również witamin, składników mineralnych a także tłuszczu, w tym wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, stanowiących składniki bioaktywne.

Celem niniejszej pracy była analiza zawartości tłuszczu jak i składu kwasów tłuszczowych wybranych owadów jadalnych. Badania uzupełniono o zawartość suchej substancji oraz białka ogółem. Analizom poddano larwy drewnojada, mącznika młynarka, a także dorosłe osobniki świerszcza bananowego.

W analizowanych próbkach jadalnych owadów obecne są zarówno nasycone, jednonienasycone jak i wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Wśród nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) w tłuszczu analizowanych owadów dominował kwas palmitynowy (C16:0), jego zawartość kształtowała się na poziomie od 17,0 do 31,6%, odpowiednio w larwach mącznika młynarka i larwach drewnojada. Całkowitą pulę kwasów tłuszczowych jednonienasyconych (MUFA) stanowiły kwas oleinowy (C18:1 n9), którego zawartość wahała się od 26,8% w oleju ze świerszcza bananowego do 41,0% o oleju z larw mącznika młynarka oraz kwas palmitooleinowy (C16:1 n7), którego zawartość była znacznie niższa od 0,2 do 1,7%. Wśród zidentyfikowanych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na szczególną uwagę zasługuje kwas linolowy (C18:2 n-6) oraz α -linolenowy (C13:3 n-3), których zawartość w analizowanych olejach wahała się w granicach odpowiednio 20,8-29,0% i 0,9-1,7%.

Słowa kluczowe: owady jadalne, bioaktywne lipidy, nienasycone kwasy tłuszczowe

Wprowadzenie

Liczba ludności na świecie rośnie w zatrważającym tempie, według raportu Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) do 2050 roku wzrośnie do ponad 9 mld osób [van Huis i in., 2013]. Raport ten wskazuje również, iż by dostarczyć odpowiednią ilość żywności, konieczne będzie zwiększenie

jej produkcji o 70%. Poszerzanie obszarów rolniczych kosztem lasów, zwiększanie powierzchni hodowli zwierząt rzeźnych, większe zużycie pasz i wody pitnej, bezpośrednio przyczynia się do wzrostu produkcji gazów cieplarnianych, będących zagrożeniem dla środowiska naturalnego [Rumpold i Schluter, 2013]. Dlatego też poszukiwanie nowych, alternatywnych źródeł składników pokarmowych wydaje się być wysoce uzasadnione.

Nowym źródłem składników pokarmowych mogłyby stać się niewątpliwie owady jadalne. Ich hodowla nie wymaga powiększania obszarów rolniczych, przy jednoczesnym znacznie niższym zużyciu wody i paszy [van Huis, 2013] a także znacznie niższej produkcji szkodliwych dla środowiska gazów cieplarnianych [Oonincx i de Boer, 2012]. Ponadto, entomofagia oznaczająca spożywanie owadów, znana jest od wieków [Sutton, 1995]. Entomofagia praktykowana jest w ponad 110 krajach świata, a ponad 2000 gatunków uznawanych jest obecnie za jadalne [Jongema, 2017]. Na mocy Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 w sprawie nowej żywności dopuszcza się objęcie kategorią nowej żywności całych owadów i ich części, po uzyskaniu odpowiedniej zgody. Choć spożywanie owadów jadalnych budzi nadal wiele kontrowersji wśród Europejczyków, a niechęć do ich spożywania wynika najczęściej z blokady psychologicznej [Looy i in., 2014], owady uznano za żywność i od stycznia 2018 roku mogą znajdować się na rynku. Prowadzone w ostatnich latach badania dowodzą, iż owady jadalne są źródłem wielu wartościowych składników odżywczych, przede wszystkim pełnowartościowego białka, a także nienasyconych kwasów tłuszczowych, witamin, składników mineralnych czy też błonnika [Rumpold i Schluter, 2013; Tzompa-Sosa i in., 2014; Ramos-Elorduy i in., 2014; Zielińska i in., 2015; Raksakantong i in., 2010]. Olej pozyskiwany z owadów jadalnych jest źródłem nienasyconych kwasów tłuszczowych, które zaliczane są do bioaktywnych składników żywności, pozytywnie wpływających na organizm człowieka. Spożycie w odpowiednich proporcjach nasyconych, jednonienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych może pozytywnie wpływać na zdrowie. Wysokie spożycie kwasów omega-3 obniża ryzyko niedokrwiennej choroby serca [Charnock i in., 1991]. Badania dowodzą, iż skład kwasów omega-3 i omega-6 w niektórych gatunkach owadów jest porównywalny ze składem kwasów tłuszczowych występujących w tłuszczu ryb [Tzompa-Sosa i in., 2014]. Mimo niewątpliwych walorów odżywczych nie wszystkie owady są bezpieczne do spożycia przez ludzi. Niektóre gatunki mogą stanowić zagrożenie ze względu na zawartość składników antyżywnościowych [Finke, 2007], czystość mikrobiologiczną [Amadi i Kiin-Kabari, 2016] czy też obecność alergenów [Belluco i in., 2013; Srinroch i in., 2015].

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły larwy mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), larwy drewnojada (*Zophobas morio*) oraz dorosłe osobniki świerszcza bananowego (*Grylloides sigillatus*). Owady przechowywano w stanie zamrożenia, a bezpośrednio przed analizami były rozdrabniane przy użyciu młynka laboratoryjnego. W badanym materiale oznaczano zawartość wody metodą suszenia w temperaturze 105°C. Uzyskaną suchą pozostałość wykorzystywano do oznaczenia zawartości białka ogółem oraz tłuszczu ogółem. Zawartość białka ogółem oznaczono metodą Kjeldahla. W tym celu próbki poddano mineralizacji na mokro w mineralizatorze BUCHI K-425 SpeedDigester, przy użyciu stężonego kwasu siarkowego w obecności katalizatora. Powstający w czasie utleniania związków organicznych amoniak, oddestylowano w aparacie BUCHI Distillation Unit K-350. Czas analizy pojedynczej próbki, obejmujący mineralizację, destylację i miareczkowanie, wynosił około 2.5 h. Zawartość tłuszczu w suchej masie oznaczano metodą Soxhleta z zastosowaniem ekstraktora VELP Solvent Extractor SER 148. Jako rozpuszczalnik stosowano eter naftowy, temperatura ekstrakcji wynosiła 140°C, łączny czas ekstrakcji 3 h. W oleju ekstrahowanym na zimno z owadów jadalnych oznaczano skład kwasów tłuszczowych wykorzystując technikę chromatografii gazowej. Analizę estrów metyloowych kwasów tłuszczowych (FAME) przeprowadzono na chromatografii gazowej Agilent Technologies 7820 A wyposażonym w automatyczny dozownik próbek ciekłych oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Rozdziału związków dokonywano na kolumnie chromatograficznej BPX70 (60m x 250 µm x 0,25 µm), będącej kolumną polarną przeznaczoną do analizy FAME. Jako gaz nośny w analizie zastosowano hel, którego przepływ ustalono na poziomie 0,8 mL. W czasie analiz stosowano program temperaturowy: temperatura pieca 140°C (5 min), wzrost temperatury o 6°C/min do 240°C (20 min). Temperatura portu nasykującego wynosiła 250°C, aparat pracował w trybie split 50:1, temperatura detektora 270°C. Kwasy tłuszczowe identyfikowano na podstawie standardowych mieszanin estrów metyloowych kwasów tłuszczowych (FAME 37 oraz Animal PUFA, Supelco), a zawartość wyliczano na podstawie metody standaryzacji wewnętrznej.

Wyniki badań i dyskusja

Zawartość wody i białka

Zawartość podstawowych składników w wybranych owadach jadalnych przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Skład wybranych owadów jadalnych

Wyróżnik	Mącznik młynarek <i>Tenebrio molitor</i>	Drewnojad <i>Zophobas morio</i>	Świerszcz bananowy <i>Grylloides sigillatus</i>
Zawartość wody [%]	75,75±0,01	58,49±0,19	65,79±0,27
Sucha masa [%]	24,25±0,01	41,51±0,19	34,21±0,27
Białko Kp 6,25 [g/100 g s.m.]	65,12±0,68	51,95±0,06	70,61±0,66
Białko Kp 4,76* [g/100 g s.m.]	49,59±0,51	39,57±0,04	53,77±0,50
Białko Kp 6,25 [g/100 g m.m.]	15,79±0,16	21,57±0,07	24,15±0,42
Białko Kp 4,76* [g/100 g m.m.]	12,03±0,12	16,43±0,06	18,40±0,32
Tłuszcz [g/100 g s.m.]	9,79±0,23	34,66±2,12	16,02±0,73
Tłuszcz [g/100 g m.m.]	2,37±0,06	14,39±0,81	5,48±0,21

*Kp=4,76 współczynnik przeliczeniowy azotu ogólnego na białko zaproponowany przez Janssen i in. (2017)

Analizowane próbki charakteryzowały się bardzo zróżnicowaną zawartością wody od 58,49 do 75,76%. Najwyższą zawartością wody oznaczono w larwach mącznika młynarka, podczas gdy larwy drewnojada zawierały najmniej wody w swoim składzie. Białko stanowiące jeden z najważniejszych składników odżywczych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, musi być systematycznie dostarczane z dietą. Owady jadalne uznawane są za bogate źródło białka. Jego zawartość w owadach uzależniona jest nie tylko od gatunku owada, ale również od stadium jego rozwoju. Zawartość białka w owadach może wahać się od 15 do 81% suchej masy [Ramos-Elorduy i in., 1997]. Białko owadów uznawane jest również za białko pełnowartościowe, zawierające kompletny skład aminokwasów egzogennych [Ramos-Elorduy i in., 2012], a jego strawność porównywalna jest ze strawnością białek zwierzęcych [Ramos-Elorduy i in., 1997]. Zawartość białka w analizowanych próbkach owadów jadalnych wahała się od 51,95 do 70,61% w suchej masie, odpowiednio drewnojada i świerszcza bananowgo, (tab. 1). Jednakże, najnowsze doniesienia wskazują, iż zawartość białka w owadach jadalnych jest znacznie zawyżona, ze względu na błędne stosowanie w obliczeniach współczynnika przeliczeniowego azotu ogólnego na białko Kp=6,25 [Jonas-Levi i Martinez, 2017;

Janssen i in., 2017]. Zaproponowany przez Janssen i in. [2017] współczynnik przeliczeniowy $K_p=4,76$, w znaczący sposób weryfikuje uzyskane wyniki zawartości białka. Zawartość białka w analizowanych próbkach, korzystając z przelicznika $K_p=4,76$, była o około 24% niższa, w stosunku do współczynnika 6,25. Obecne w owadach chityna i chitozan, stanowią dodatkowe źródło azotu, jednakże jest to azot niebiałkowy, którego zawartość nie powinna być uwzględniana w obliczaniu zawartości białka [Janssen i in., 2017]. Chityna obecna w szkielecie zewnętrznym owadów pełni funkcję nierozpuszczalnego włókna, a jej zawartość szacuje się na 1,16-13,72 mg/100 g suchej masy [Finke, 2007], co w znaczącym stopniu może wpływać na uzyskane wyniki zawartości białka ogółem.

Zawartość tłuszczu i skład kwasów tłuszczowych

Poza wysoką zawartością białka, jadalne owady charakteryzowały się także wysoką zawartością tłuszczu, od 9,79 do 34,66% s.m., odpowiednio w larwach mącznika młynarka i drewnojada (tab. 1). Zawartość tłuszczu była charakterystyczna dla gatunku owada. Lipidy stanowią źródło energii dla organizmu, a także są źródłem kwasów tłuszczowych niezbędnych do jego prawidłowego funkcjonowania. Według DeFoliart [1991], zawartość tłuszczu w owadach waha się w przedziale od 10 do 30%, w przeliczeniu na masę owada. Jednakże, ilość wyekstrahowanego tłuszczu z owadów jest ściśle uzależniona od zastosowanej metody ekstrakcji [Tzompa-Sosa i in., 2014]. Tłuszcz znajdujący się w owadach, obecny jest w różnych formach. Ponad 80% tłuszczu stanowią triacyloglicerole, będące rezerwuarem energii w okresach wzmożonego zapotrzebowania energetycznego, np. długiego lotu [Kourimska i Adamkova, 2016].

Skład kwasów tłuszczowych w analizowanych olejach ekstrahowanych z jadalnych owadów przedstawiono w Tabelach 2 i 3.

Tabela 2. Procentowy skład kwasów tłuszczowych w olejach pozyskiwanych z wybranych owadów jadalnych

Kwas tłuszczowy	Mącznik młynarek <i>Tenebrio molitor</i>	Drewnojad <i>Zophobas morio</i>	Świerszcz bananowy <i>Grylloides sigillatus</i>
C 14:0	2,63±0,09	1,07±0,00	0,83±0,01
C 14:1	nd	0,35±0,00	nd
C 16:0	16,94±0,66	31,54±0,12	27,58±0,04
C 16:1	1,71±0,08	1,06±0,02	0,22±0,00
C 17:0	nd	0,75±0,01	0,21±0,00
C 17:1	nd	0,63±0,01	nd
C 18:0	3,61±0,15	7,92±0,02	11,20±0,03
C 18:1 n9 <i>trans</i>	0,55±0,02	nd	0,39±0,00
C 18:1 n9 <i>cis</i>	40,98±2,30	34,34±0,05	26,78±0,02
C 18:1 n7	1,70±0,08	0,24±0,03	0,60±0,00
C 18:2 n6	28,88±1,15	20,76±0,21	29,02±0,05
C 18:3 n3	1,34±0,05	0,97±0,02	1,71±0,01
C 20:3 n3	nd	0,15±0,01	nd
C 20:5 n:3	nd	nd	0,22±0,00
C 22:0	0,44±0,01	nd	nd
C 22:1	0,38±0,02	nd	nd
C 22:2	0,85±0,03	nd	nd
C 22:6 n3	nd	nd	1,22±0,01
C 24:0	nd	0,19±0,03	nd
n6/n3	21,55	18,53	9,21
COX*	0,32	0,23	0,33

*COX – obliczony wskaźnik utlenialności $COX=(0,02*C18:1+ 1*C18:2 + 2*C18:3)$ [Cosgrove i in., 1987].

nd – nie identyfikowany

Zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) w owadach jadalnych wahała się od 23,62% w larwach mącznika młynarka do 41,47% w larwach drewnojada (tab. 3). Wśród nasyconych kwasów tłuszczowych w oleju z owadów jadalnych dominował kwas palmitynowy (C16:0). Jednakże jego zawartość w poszczególnych próbkach była zróżnicowana, od 16,94% w oleju z mącznika młynarka do 31,54% w oleju

z drewnojada (tab. 2). Z kolei zawartość kwasu stearynowego oznaczono na poziomie 3,61% w oleju z mącznika młynarka do 11,20% w oleju ze świerszcza bananowego. Zielińska i in. [2015] wykazali, iż zawartość dwóch dominujących nasyconych kwasów tłuszczowych w oleju z mącznika młynarka wynosiła 18,0% i 3,84%, a w oleju ze świerszcza bananowego 23,5% i 7,35%. Zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) oznaczono na poziomie 28,00% w świerszczu bananowym do 45,31% w mączniku młynarku. Dominującym jednonienasyconym kwasem tłuszczowym we wszystkich próbkach był kwas oleinowy (C18:1 n9). Najwyższą jego zawartość oznaczono w mączniku młynarku (40,98%), podczas gdy najniższą w świerszczu bananowym (26,78%). Najwyższą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) charakteryzował się świerszcz bananowy (32,18%), zbliżoną zawartość oznaczono w mączniku młynarku (31,07%), a najniższą w larwach drewnojada. Dominującym kwasem PUFA był kwas linolowy (omega-6), zidentyfikowany we wszystkich próbkach owadów, na poziomie od 20,76 do 29,02%. Kwas α -linolenowy, należący do rodziny omega-3, zidentyfikowano również we wszystkich analizowanych próbkach, jednakże na znacznie niższym poziomie, 0,97-1,71%. Ponadto w próbkach mącznika młynarka zidentyfikowano w niewielkich ilościach kwas dokozanowy (C22:0), kwas erukowy (C22:1) oraz kwas dokozydienowy (C22:2). Natomiast w próbkach drewnojada zidentyfikowano kwas ikozatrienowy (C20:3), podczas gdy w próbkach świerszcza bananowego kwas dokozaheksaenowy (C22:6).

Ważnym elementem z punktu widzenia żywieniowego są wielonienasycone kwasy tłuszczowe, zaliczane do bioaktywnych lipidów. Ich poziom w oleju z owadów uzależniony jest w głównej mierze od gatunku, lecz także od szeregu czynników biologicznych i środowiskowych. W dobie szeroko rozpowszechnionych chorób cywilizacyjnych pojawiają się nowe zalecenia odnośnie spożywania tłuszczów, w szczególności ilości pobieranych z pokarmem kwasów omega 6 i omega 3. Zachodnia dieta niestety charakteryzuje się zbyt dużym poborem kwasów omega 6, nawet 10-15:1 [Simopoulos, 2008]. Najniższym współczynnikiem omega-6/omega-3 charakteryzował się olej ze świerszcza (9,21:1), natomiast najwyższym olej z mącznika młynarka (21,55:1). Uwzględniając zalecany przez Harrisa i in. [2009] współczynnik kwasów omega-6/omega-3 równy 2:1, można stwierdzić iż wprowadzając do codziennej diety larwy mącznika młynarka i drewnojada lub dorosłe osobniki świerszcza bananowego, należałoby wzbogacić dietę w dodatkowe źródła kwasów omega-3.

Tabela 3. Średnia zawartość poszczególnych grup kwasów tłuszczowych w badanych olejach pozyskiwanych z owadów jadalnych

Kwasy tłuszczowe	Mącznik młynarek <i>Tenebrio molitor</i>	Drewnojad <i>Zophobas morio</i>	Świerszcz bananowy <i>Grylloides sigillatus</i>
SFA	23,62±0,91	41,47±0,15	39,82±0,04
UFA	76,38±0,91	58,53±0,15	60,18±0,04
MUFA	45,31±2,13	36,65±0,04	28,00±0,03
PUFA	31,07±1,22	21,88±0,19	32,18±0,05

SFA – suma kwasów tłuszczowych nasyconych, UFA – suma kwasów tłuszczowych nienasyconych, MUFA – suma kwasów tłuszczowych jednonienasyconych, PUFA – suma kwasów tłuszczowych wielonienasyconych

Otrzymywane z owadów jadalnych oleje mogą znaleźć szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym zarówno jako oleje spożywane na surowo, jak również jako dodatek do sałatek czy dressingów [Zielińska, 2016]. Jednakże zastąpienie tradycyjnie stosowanych w technologii żywności tłuszczów olejami z owadów może być ograniczone ich stabilnością. Analizując skład kwasów tłuszczowych olejów pozyskiwanych z jadalnych owadów należy stwierdzić, iż są to oleje wysoce nienasycone, zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych wahała się od 58,53% do 76,38% (tab. 3). Ich stopień nienasyconienia może bezpośrednio przyczyniać się do małej lub obniżonej stabilności oksydacyjnej. Na podstawie procentowego składu nienasyconych kwasów osiemnastowęglowych wyliczono współczynniki utlenialności (COX) poszczególnych olejów. Wartość współczynników COX wahała się w granicach od 0,23 do 0,33 (tab. 2) i była niższa niż dla oleju rzepakowego (COX 0,37) uznawanego za olej o wysokiej stabilności [Tańska i in., 2011].

Podsumowanie

Pomimo, iż owady stanowią źródło pożywienia w wielu krajach, ich wprowadzenie na stałe do codziennej diety Europejczyków rozpatrywane jest nadal jako małoprawdopodobna alternatywa. Jednakże, ze względu na wysoką zawartość białka, wysoką zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych i innych cennych składników mogłyby stanowić surowiec do wzbogacania żywności lub pełnowartościowy produkt spożywczy.

Literatura

1. Amadi E., Kiin-Kabari D. (2016). Nutritional composition and microbiology of some edible insects commonly eaten in Africa, hurdles and future prospects: a critical review. *Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene*, 1: 1-7.
2. Belluco S., Losasso C., Magioletti M., Alonzi C.C., Paoletti M.G., Ricci A. (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 296-313.
3. Charnock J.S., McLennan P.L., Sundram K., Abeywardena M.Y. (1991). Omega-3 PUFAs reduce the vulnerability of the rat heart to ischaemic arrhythmia in the presence of a high intake of saturated animal fat. *Nutrition Research* 11, 1025-1034.
4. Cosgrove J.P., Church D.F., Pryor W.A. (1987). The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 2, 299-304.
5. DeFoliart G.R. (1991). Insect fatty acids: similar to those of poultry and fish in their degree of unsaturation, but higher in the polyunsaturates. *Food Insects Newsletter*, 4, 1-4.
6. Finke M.D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*, 26, 105-115.
7. Harris W.S., Mozzaffarian D., Rimm E., Kris-Etherton P., Rudel L.L., Appel L.J. i in. (2009). Omega-6 fatty acids and risks for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association subcommittee of the Council on nutrition, physical activity and metabolism; council on cardiovascular nursing; and council on epidemiology and prevention. *Circulation*, 119, 902-907.
8. van Huis A., van Itterbeeck J., Klunder H. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy.
9. Janssen R.H., Vincken J-P., van den Broek L.A.M., Fogliano V., Lakemond C.M.M. (2017). Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 2275-2278.
10. Jongema Y. (2017). List of edible insects of the world (April 2017) – Wageningen University & Research. <https://www.wur.nl/en/Research-Results/Chair-groups/Plant-Sciences/Laboratory-of-Entomology/Edible-insects/Worldwide-species-list.htm>
11. Kourimska L., Adamkova A. (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*, 4, 22-26.
12. Jonas-Levi A., Martinez J-J.I. (2017). The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 184-188.
13. Looy H., Dunkel F., Wood J. (2014). How then shall we eat? Insect-eating attitudes and sustainable foodways. *Agriculture and Human Values*, 31:131-141.
14. Oonincx D.G.A.B., de Boer I.J.M. (2012). Environmental impact of the production of mealworms as protein source for humans – a life cycle assessment. *PLOS One* 7: 51145.
15. Raksakantong P., Meeso N., Kubola J., Siriamornpun S. (2010). Fatty acids and proximate composition of eight Thai edible terrecolous insects. *Food Research International*, 43, 350-355.
16. Ramos-Elorduy J., Moreno J.M.P., Camacho V.H.M. (2012). Could grasshoppers be a nutritive meal. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 164-175.
17. Ramos-Elorduy J., Moreno J.M.P., Prado E.E., Perez M.A., Otero J.L., De Guevara O.L. (1997). Nutritional value of edible insects from state of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), 142-157.
18. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 w sprawie nowej żywności, zmieniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 1169/2011 oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie Komisji (WE) nr 1852/2001.
19. Rumpold B.A., Schuler O.K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57: 802-823.
20. Simopoulos A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acids ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-685.
21. Srinroch C., Srisomsap C., Chokchaichamnankit D. (2015). Identification of novel allergen in edible insect, *Gryllus bimaculatus* and its cross-reactivity with *Macrobrachium* spp. allergens. *Food Chemistry*, 184: 160-166.

22. Sutton M. (1995). Archaeological aspects of insect use. *Journal of Archaeological Method and Theory*, 2: 253-298.
23. Tańska M., Rotkiewicz D., Ambrosewicz M. (2011). Porównanie trwałości tłoczonych na zimno olejów lnianego i rzepakowego. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 3, 521-527.
24. Tzompa-Sosa D.A., Yi L., van Valenberg H.J.F., van Boekel M.A.J.S., Lakemond C.M.M. (2014). Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International*, 62, 1087-1094.
25. Zielińska E. (2016). Możliwość praktycznego wykorzystania owadów jadalnych w przemyśle spożywczym. S. 178-187. W: Szala M., Kropiwek K. *Przegląd wybranych zagadnień z zakresu przemysłu spożywczego*.
26. Zielińska E., Baraniak B., Karaś M., Rybczyńska K., Jakubczyk A. (2015). Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International*. 77, 460-466.

MAŁGORZATA KARWOWSKA¹, WERONIKA SOKOŁOWSKA¹,
ANNA KONONIUK¹, KAROLINA M. WÓJCIAK

¹*Katedra Technologii Surowców Pochodzenia Zwierzęcego, Zakład Technologii Mięsa i Zarządzania
Jakością, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

WPŁYW SERWATKI KWASOWEJ NA WYBRANE CECHY JAKOŚCIOWE WOŁOWYCH PRODUKTÓW MIĘSNYCH

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu serwatki kwasowej na cechy fizykochemiczne i zawartość amin biogennych w wołowych wędlinach surowo dojrzewających. Badanym materiałem były wędzonki wołowe, przygotowane w 3 wariantach: W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu), W2 (z dodatkiem soli morskiej), W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej, z dodatkiem soli morskiej). Podczas produkcji mięso pokrywano pastą, do której przygotowania użyto: gorczycy białej, czosnku niedźwiedziego, pieprzu czarnego, kminku, kolendry, papryki świeżej, świeżego czosnku oraz wody. Przeprowadzone badania obejmowały oznaczanie wartości pH, aktywności wody, wskaźnika TBARS, zawartości żelaza hemowego, wyróżników barwy (L^* , a^* , b^*) oraz zawartości amin biogennych. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wykazały, że zastosowanie serwatki kwasowej w produkcji wołowych wędzonek surowo dojrzewających wpłynęło na obniżenie parametru pH w czasie ich chłodniczego przechowywania. Próby wędzonek wyprodukowanych bez azotanu sodu charakteryzowały się mniejszym udziałem barwy czerwonej w porównaniu do próby z dodatkiem azotanu sodu. Zawartość żelaza hemowego ulegała zmianie wraz z upływem czasu chłodniczego przechowywania. Uzyskane wyniki wskazują na korzystny wpływ serwatki kwasowej na zawartość żelaza hemowego w wędzoncek wołowych dojrzewających. W czasie trzymiesięcznego przechowywania produkt z zastosowaniem serwatki charakteryzował się najniższą zawartością amin biogennych.

Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazują na celowość kontynuacji badań nad wykorzystaniem serwatki kwasowej do produkcji wyrobów mięsnych surowo dojrzewających bez dodatku związków azotowych.

Słowa kluczowe: serwatka kwasowa, wędliny surowo dojrzewające, aminy biogenne

Wprowadzenie

Produkty mięsne fermentowane cieszą się coraz większym zainteresowaniem wśród konsumentów. Spośród tradycyjnych wyrobów wyróżniają je intensywny smak oraz walory prozdrowotne. Wędliny surowo dojrzewające stanowią ważny asortyment

na rynku światowym i istotny segment produktów tradycyjnych Włoch, Portugalii, Hiszpanii oraz Francji. Ich wysoka wartość odżywcza oraz walory smakowe powodują, że również konsumenci w Polsce coraz chętniej po nie sięgają [Chwastowska-Siwecka i in., 2017].

Istotnym wyzwaniem w produkcji wędlin, nabierającym w ostatnich latach szczególnego znaczenia, jest dążenie do wyeliminowania związków azotowych. Konsumenci oczekują produktów mięsnych bezazotanowych, w szczególności wśród grupy produktów premium, do których należą wędliny surowo dojrzewające. Alternatywą procesu peklowania z użyciem azotanu sodu może być serwatka kwasowa. W produktach mięsnych białka serwatkowe mogą pełnić rolę naturalnych antyoksydantów. Są źródłem γ -glutamylcysteiny, dipeptydu stanowiącego prekursor glutationu wykazującego właściwości przeciwutleniające [Worobiej i in., 2008]. Równowaga oksydacyjno-redukcyjna utrzymana jest przez zredukowaną formę glutationu (GSH) w reakcji redukcji reaktywnych form tlenu (RFT) [Stadnik, 2016; Wójciak i in., 2014]. W czasie ukwaszenia mleka w serwatce powstają liczne metabolity szczepów bakterii kwasu mlekowego m.in. o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym (np. kwas mlekowy i bakteriocyny). Zawarte w serwatce aminokwasy takie jak metionina i cysteina posiadają działanie przeciwnowotworowe.

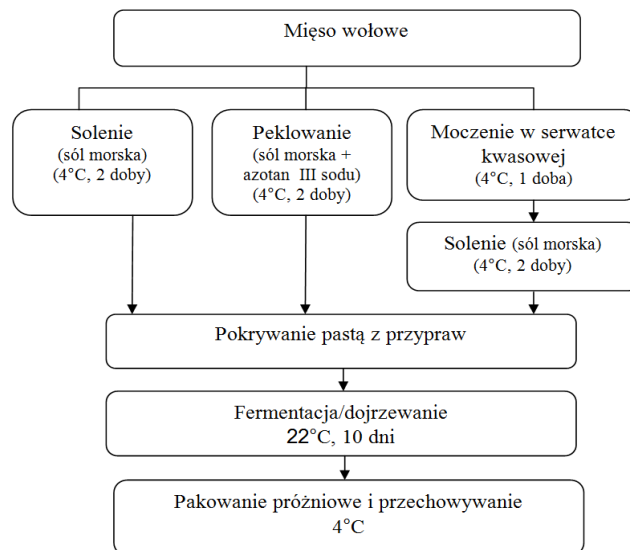
Badania wykazały pozytywny wpływ dodatku serwatki na kształtowanie cech jakościowych produktów mięsnych [Karwowska i in., 2014; Karwowska i in. 2015; Karwowska i Dolatowski, 2017].

Celem pracy była ocena wpływu serwatki kwasowej na cechy fizykochemiczne i zawartość amin biogennych w wołowych wędlinach surowo dojrzewających.

Materiał i metody badań

Materiałem badanym było mięso wołowe oraz wołowe wędzonki surowo dojrzewające. Mięso wykorzystane do produkcji pochodziło z udźca od bydła rasy białogrzbieta w wieku 27 miesięcy. Tusze po uboju zostały wychłodzone przez 7 dni, w temperaturze 4 °C. Wychłodzony surowiec mięsny został przewieziony do Zakładu Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, gdzie przeprowadzono produkcję w warunkach półtechnicznych.

Surowiec dodatkowy do produkcji wędzonek stanowiła serwatka kwasowa (pH 4,47±0,03) pozyskana z tradycyjnej produkcji twarogu (z mleka niepasteryzowanego). Do produkcji użyto także soli morskiej drobnoziarnistej (producent Cenoss) o zawartości 99,5% chlorku sodu.



Rys. 1. Schemat produkcji wołowych wędzonek surowo dojrzewających



W1

W2

W3

Rys. 2. Przekrój wołowych wędzonek surowo dojrzewających po zakończeniu produkcji

W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu),

W2 (z dodatkiem soli morskiej),

W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej, z dodatkiem soli morskiej)

Materiał badany przygotowano w 3 wariantach: W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu), W2 (z dodatkiem soli morskiej), W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej (pH 4,47±0,03) przez 24 godziny w temperaturze 4°C, z dodatkiem soli morskiej). Podczas produkcji mięso pokrywano

pastą, do której przygotowania użyto: gorczycy białej, czosnku niedźwiedziego, pieprzu czarnego, kminku, kolendry, papryki świeżej, świeżego czosnku oraz wody. Wyroby mięsne przygotowano według schematu zaprezentowanego na rysunku 1.

Metody badań

Oznaczanie pH i aw

Kwasowość ogólną oznaczono zgodnie z normą PN-ISO 2917:2001. Pomiar wykonywano w homogenatach za pomocą elektrody zespolonej typ EHR-111 z wykorzystaniem cyfrowego pH/konduktometru CPC-501 (Elmetron, Polska). Pomiaru aktywności wody dokonano w temperaturze 20 °C w urządzeniu do pomiaru aktywności wody (Novasina AG, Lachen, Switzerland).

Oznaczanie zawartości żelaza hemowego [ppm]

Zawartość barwników hemowych oznaczano według metody Hornsey [1956]. W celu oznaczenia ogólnej zawartości barwników hemowych przeprowadzono ich ekstrakcję zakwaszonym roztworem acetonu. Absorbancję próbki przy długości fali 640 nm mierzono przy użyciu spektrofotometru Nicolet Evolution 300 (Thermo Electron Corporation) i kuwety kwarcowej (długość drogi optycznej 10 mm). Zawartość żelaza hemowego (ppm) obliczano według formuły $A_{640} \times 680 \times 8,82 / 100$.

Wskaźnik TBARS ($mg\ kg^{-1}$)

Wartość wskaźnika TBARS oznaczano wg metody Pikula i in. [1989]. Pomiar absorbancji przy długości fali 532 nm wykonano przy użyciu spektrofotometru Nicole Evolution 300 (Thermo Electron Corporation). Wartość TBARS wyrażono w miligramach substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym na 1 kg próby.

*Pomiar parametrów barwy $L^*a^*b^*$*

Pomiaru wyróżników $L^*a^*b^*$ barwy wykonywano metodą odbiciową przy użyciu spektrofotometru sferycznego 8200 Series (X-Rite). Pomiar prowadzono z uwzględnieniem połysku (SPIN) w zakresie pomiarowym $\lambda = 400 \div 700$ nm przy wykorzystaniu standardowego źródła światła D65 oraz standardowego obserwatora kolorymetrycznego o polu widzenia 10°. Otrzymane wyniki wyrażono w jednostkach systemu CIE $L^*a^*b^*$, gdzie: L^* – jasność barwy, a^* – chromatyczność w zakresie czerwono-zielonym, b^* – chromatyczność w zakresie żółto-niebieskim.

Zawartość amin biogennych

10 g rozdrobnionej próbki homogenizowano z 50 ml 10% kwasu trichlorooctowego. Próbkę pozostawiono na 1 godzinę w temperaturze 4 °C bez dostępu światła. Następnie

próbę wirowano przy 5000 g przez 20 minut przy użyciu wirówki MPW – 350R (MPW Med-Instruments, Polska). Supernatant sączone przez bibułę Whatman 1, a następnie przez filtr nylonowy 0,22 μm (ALFATEC, Micro Pore). Zawartość amin biogennych w przygotowanych próbach oznaczono przy użyciu analizatora AAA 500 (Ingos Ltd.) wyposażonego w kolumnę jonowymienną (Ostion Lg ANB, 7x0.37 cm, 75°C).

Statystyczna analiza wyników badań

Doświadczenie powtórzono dwukrotnie z zachowaniem identycznych warunków. Wszystkie oznaczenia wykonano w czterech powtórzeniach dla każdej próby. Dokonano charakterystyki próby obliczając wartości średnie oraz odchylenia standardowe. Otrzymane wyniki poddano analizie wariancji (ANOVA). Do oceny istotności różnic ($p < 0,05$) między próbami oraz w obrębie tej samej próby w poszczególnym okresie przechowywania zastosowano test T-Tukeya.

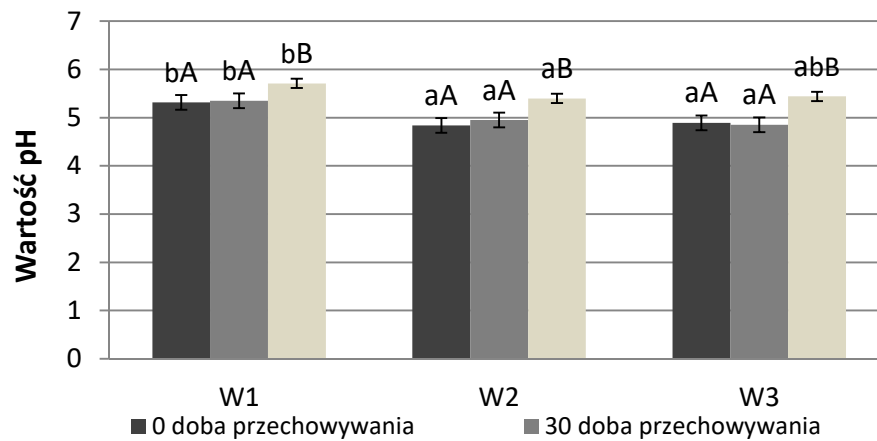
Wyniki badań i ich dyskusja

Oznaczone parametry fizykochemiczne surowca mięsnego przedstawiono w tabeli 1. Uzyskane wyniki świadczą o dobrej jakości wołowiny wykorzystanej do produkcji wędzonek surowo dojrzewających.

Tab. 1. Charakterystyka surowca mięsnego

Parametr	Surowiec mięsny
pH	5,29 \pm 0,01
a_w	0,990 \pm 0,01
Wskaźnik TBARS (mg kg ⁻¹)	1,21 \pm 0,08
Zawartość żelaza hemowego (ppm)	23,45 \pm 1,29
Parametr L* barwy	38,77 \pm 1,37
Parametr a* barwy	13,88 \pm 1,21
Parametr b* barwy	9,49 \pm 1,49

Analizując wartości pH prób wyrobów mięsnych po zakończeniu produkcji (0 doba przechowywania) oraz po 30 i 90 dobach przechowywania wykazano istotny wpływ zastosowania serwatki oraz czasu przechowywania (rysunek 3). Po zakończeniu produkcji próba wyprodukowana z zastosowaniem serwatki kwasowej charakteryzowała się istotnie niższą wartością pH w porównaniu do próby W1 wyprodukowanej z dodatkiem azotanu sodu.



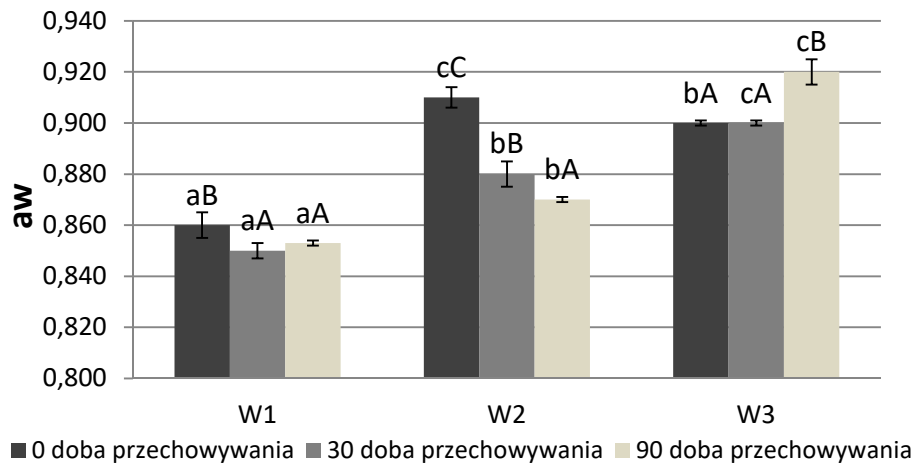
Rys. 3. Wartości pH wołowych wędzonek surowo dojrzewających podczas przechowywania

Średnie oznaczone tymi samymi małymi literami pomiędzy próbami oraz dużymi literami w obrębie próby w różnych okresach przechowywania nie różnią się istotnie ($p < 0,05$)

W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu)

W2 (z dodatkiem soli morskiej)

W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej, z dodatkiem soli morskiej)



Rys. 4. Wartości aktywności wody wołowych wędzonek surowo dojrzewających podczas przechowywania

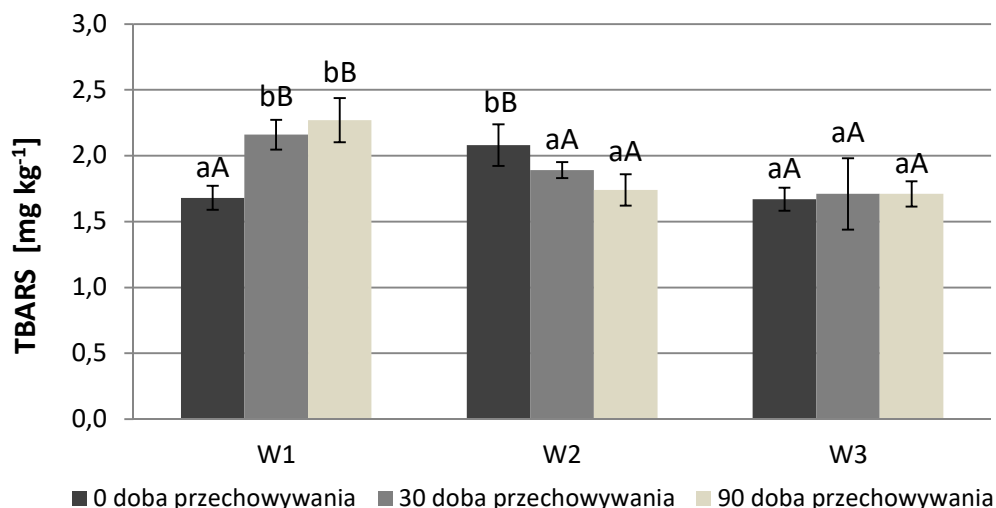
Średnie oznaczone tymi samymi małymi literami pomiędzy próbami oraz dużymi literami w obrębie próby w różnych okresach przechowywania nie różnią się istotnie ($p < 0,05$)

W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu)

W2 (z dodatkiem soli morskiej)

W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej, z dodatkiem soli morskiej)

Analizując wyniki aktywności wody poszczególnych prób doświadczalnych stwierdzono najniższe wartości w próbie W1 z dodatkiem azotanu sodu (0,85). Podobne wyniki uzyskali w swoich badaniach Kaban i in. [2013], którzy ocenie poddali tradycyjną turecką Pastirmę. Istotnie wyższą aktywnością wody charakteryzowały się próby W2 i W3 podczas całego okresu przechowywania. Według Kaban i in. [2013], dla zachowania bezpieczeństwa mikrobiologicznego w produkcie końcowym aktywność wody powinna wynosić poniżej 0,9. Wyższa wartość tego parametru stwarza zagrożenie rozwoju mikroflory chorobotwórczej. Znacznie wyższa aktywność wody w produkcie wyprodukowanym z zastosowaniem serwatki kwasowej może mieć związek z najmniejszym odwodnieniem produktu.



Rys. 5. Wartości wskaźnika TBARS wołowych wędzonek surowo dojrzewających podczas przechowywania

Średnie oznaczone tymi samymi małymi literami pomiędzy próbami oraz dużymi literami w obrębie próby w różnych okresach przechowywania nie różnią się istotnie ($p < 0,05$)

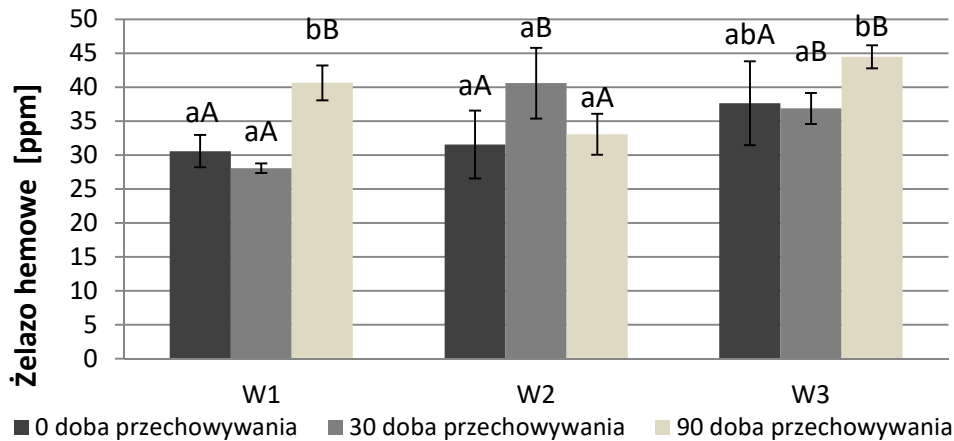
W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu)

W2 (z dodatkiem soli morskiej)

W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej, z dodatkiem soli morskiej)

Analiza wskaźnika TBARS wykazała znaczący wpływ dodatku serwatki kwasowej na ilość wtórnych produktów utleniania tłuszczu. Próby poddane oddziaływaniu serwatki osiągnęły istotnie niższe wartości wskaźnika TBARS ($1,6 \text{ mg kg}^{-1}$) podczas przechowywania niż pozostałe warianty doświadczalne. Podobne wartości uzyskali Wójciak i in. [2014] w badaniach prowadzonych na kiełbasach surowo dojrzewających z dodatkiem serwatki. W próbie W2 wartości wskaźnika malały wraz z wydłużeniem

czasu przechowywania, co może wskazywać na tworzenie trwałych kompleksów substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym z innymi składnikami obecnymi w mięsie.



Rys. 6. Zawartość żelaza hemowego w wołowych wędzoncek surowo dojrzewających podczas przechowywania

Średnie oznaczone tymi samymi małymi literami pomiędzy próbkami oraz dużymi literami w obrębie próby w różnych okresach przechowywania nie różnią się istotnie ($p < 0,05$)

W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu)

W2 (z dodatkiem soli morskiej)

W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej, z dodatkiem soli morskiej)

Mięso wołowe charakteryzuje się względnie wysoką zawartością żelaza hemowego. Przeprowadzone badania własne wskazały na obecność w surowcu użytym do przygotowania próbek, żelaza hemowego w ilości 23,45 ppm (tabela 1). Przeprowadzona ocena próbek wołowych wyrobów mięsnych surowo dojrzewających wskazała na znaczny wzrost zawartości żelaza hemowego wynikający z odwodnienia mięsa podczas produkcji.

Wyniki oznaczeń parametrów barwy nie wykazały wpływu zastosowanych dodatków na parametry $L^*a^*b^*$ barwy wołowych wędzonek surowo dojrzewających bezpośrednio po zakończeniu produkcji oraz w 30 dobie przechowywania (tabela 2). Wszystkie próby (zarówno peklowana, jak i bez dodatku azotanu sodu) charakteryzowały się zbliżonymi wartościami parametru a^* barwy określającego udział barwy czerwonej. Według Mority i in. [1998] możliwe jest uzyskanie nitrozylohemoglobiny w wędlinach surowych bez dodatku azotanu sodu. Jest to możliwe przy zastosowaniu do produkcji szczepów niektórych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus*, które na skutek prowadzonego procesu proteolizy powodują powstawanie tlenku azotu z α -argininy.

W następstwie dochodzi do łączenia się cząsteczki mioglobiny z kompleksem tlenu azotu i α -argininy tworząc nitrozylomioglobinę.

Wraz z upływem czasu przechowywania zaobserwowano obniżanie wartości parametru określającego udział barwy czerwonej. Istotne różnice między próbami stwierdzono dla parametru a^* barwy w 90 dobie przechowywania. Najniższą wartość parametru a^* wykazywała próba W3 wyprodukowana z udziałem serwatki.

Zmiana barwy w czasie przechowywania mogła być spowodowana działalnością enzymów własnych oraz licznych procesów fizykochemicznych. Skwarek i in. [2014] zwrócili uwagę na wpływ kwasu mlekowego na obniżenie udziału barwy czerwonej w szynkach surowo dojrzewających. Kwas mlekowy zawarty w serwatce kwasowej oddziałując na różne formy mioglobiny, denaturuje białka zawarte w mięsie, przez co może obniżać udział barwy czerwonej.

Tab. 2. Parametry barwy wołowych wędzonek surowo dojrzewających podczas przechowywania

Parametr	Czas przechowywania	W1	W2	W3
L*	0 doba	39,15 ± 2,92aA	36,70 ± 2,65aA	39,18 ± 2,83aA
	30 doba	37,83 ± 2,88aA	39,86 ± 1,05aA	37,81 ± 2,79aA
	90 doba	40,31 ± 1,28aA	40,06 ± 1,20aA	39,61 ± 2,28aA
a*	0 doba	8,30 ± 1,29aB	8,78 ± 0,87aC	7,93 ± 2,15aC
	30 doba	6,94 ± 1,28aB	6,05 ± 0,52aB	5,67 ± 0,91aB
	90 doba	2,93 ± 0,60bA	3,34 ± 0,33cA	1,96 ± 0,31aA
b*	0 doba	4,92 ± 1,92aB	5,41 ± 1,02aB	4,65 ± 0,73aB
	30 doba	3,57 ± 0,46aB	4,42 ± 0,51aA	4,21 ± 0,52aB
	90 doba	2,61 ± 0,45aA	4,22 ± 0,69bA	2,95 ± 0,41aA

Srednie oznaczone tymi samymi małymi literami pomiędzy próbami oraz dużymi literami w obrębie próby w różnych okresach przechowywania nie różnią się istotnie ($p < 0,05$)

W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu)

W2 (z dodatkiem soli morskiej)

W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej, z dodatkiem soli morskiej)

Ze względu na znaczną ilość białka, wędliny surowo dojrzewające mogą zawierać wyższe niż dopuszczalne stężenia amin biogennych, które są składnikami naturalnie występującymi w surowcach i produktach spożywczych [Stadnik, 2014]. Aminy biogenne są organicznymi zasadami wykazującymi właściwości biologicznie czynne. Powstają i ulegają usunięciu w organizmie w wyniku normalnej aktywności metabolicznej roślin, zwierząt oraz mikroorganizmów. Powstają w procesie

dekarboksylacji wolnych aminokwasów lub w wyniku aminowania i transaminowania aldehydów i ketonów. Usuwanie grupy α -karboksylowej z aminokwasu, prowadzi do powstawania odpowiednich amin biogennych [Stadnik i Dolatowski, 2010]. Aminy biogenne spełniają szereg funkcji w organizmie, zaangażowane są w naturalne procesy biologiczne, takie jak transmisja synaptyczna, kontrola ciśnienia krwi, reakcje alergiczne oraz kontrola wzrostu komórek. Niemniej jednak mogą być także niebezpieczne dla zdrowia, jeżeli ich poziom w produktach żywnościowych zostanie przekroczony [EFSA, 2011].

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały wpływ zastosowania serwatki kwasowej na istotne obniżenie zawartości amin biogennych zarówno w 30 jak i 90 dobie przechowywania (tabela 3). Stwierdzono znacznie niższe zawartości histaminy, putrescyny, spermidyny oraz sperminy w próbie W3 w porównaniu do próby W1.

Tab. 3. Zawartość amin biogennych [mg g^{-1}] w 30 i 90 dobie przechowywania

Amina biogenna	W1	W2	W3
30 doba przechowywania			
Histamina	3,40b	0,52a	0,41a
Kadaweryna	n.w.	0,01	0,03
Putrescyna	0,24b	0,05a	0,03a
Spermidyna	0,24	0,02	nw.
Spermina	0,27b	0,05a	0,04a
Suma	4,15b	0,65a	0,51a
90 doba przechowywania			
Histamina	5,28b	5,87b	3,07a
Kadaweryna	0,10a	0,28b	0,39b
Putrescyna	0,52b	0,41b	0,03a
Spermidyna	0,24b	0,16a	0,32b
Spermina	0,43b	0,47b	0,17a
Suma	6,57b	7,19b	3,98a

Średnie oznaczone tymi samymi małymi literami pomiędzy próbami nie różnią się istotnie ($p < 0,05$)

n.w.- nie wykryto

W1 (z dodatkiem mieszanki: 99,5% soli morskiej + 0,5% azotanu III sodu)

W2 (z dodatkiem soli morskiej)

W3 (poddany działaniu serwatki kwasowej, z dodatkiem soli morskiej)

Wnioski

1. Zastosowanie serwatki kwasowej w produkcji wołowych wędzonek surowo dojrzewających wpłynęło na obniżenie ich wartości pH.
2. Poddanie mięsa wołowego oddziaływaniu serwatki kwasowej korzystnie wpływa na hamowanie przemian oksydacyjnych zachodzących w produkcie podczas przechowywania.
3. Zawartość żelaza hemowego uległa zmianie pod wpływem przechowywania. Uzyskane wyniki wskazują na korzystny wpływ serwatki kwasowej na zawartość barwników hemowych w wędzonkach wołowych.
4. Po 90 dobach przechowywania produkt z zastosowaniem serwatki charakteryzował się najniższą zawartością amin biogennych.

Literatura

1. Chwatowska-Siwecka J., Baryczka M.J., Sadowska E. (2017). Charakterystyka oraz specyfika produkcji szynek surowo dojrzewających. *Gospodarka Mięsna*, 11, 22-27.
2. Cieslik J., Migdał W. (2011). Aminy biogenne w żywności. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLIV, 4, 1087-1096.
3. EFSA, (2011). European Food Safety Authority Scientific Opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), s. 23-93.
4. Hornsey H.C. (1956). The color of cooked cured pork, I. Estimation of the nitric oxide-heme pigments. *Journal of Food Science and Agriculture*, 7, 534-540.
5. Maślanka S., Kos A., Bańczyk M., Czopek I., Adam Ł., Dorszewska J., Starczewska K. (2015). Badanie stężenia kwasu mlekowego, otrzymanego w procesie fermentacji mlekowej laktozy, zawartej w serwatce poprodukcyjnej przy udziale *Lactobacillus*. *Chemik*, 69(4), 241-251.
6. Morita H., Yoshikawa H., Sakata R., Nagata Y. (1998). Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidine nitrogens of α - arginine by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Bacteriology*, 179, 7812-7815.
7. Kaban G. (2013). Sukuc and Pastrima: Microbiological changes and formation of violate compounds. *Meat Science*, 95, 912-91.
8. Karwowska M., Wójciak K., Dolatowski Z.J. (2014). Comparative studies on lipid oxidation of organic model sausage without nitrite produced with the addition of native or autoclaved mustard seed and acid whey. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2563-2570.
9. Karwowska M., Wójcik K., Dolatowski Z.J. (2015). The influence of acid whey and mustard seed on lipid oxidation of organic fermented sausage without nitrite. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 628-634.
10. Karwowska M., Dolatowski Z.J. (2017). Effect of acid whey and freeze-dried cranberries on lipid oxidation and fatty acid composition of nitrite-/nitrate-free fermented sausage made from deer meat. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 30, 1, 85-93.
11. Pikul J., Leszczyński D.E., Kumerow F.A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 37(5), 1309-1313.
12. PN-ISO 2917:2001. Mięso i przetwory mięsne. Pomiar pH (metoda odwoławcza).
13. Worobiej E., Wujkowska A., Drużyńska B., Wołosiak R. (2008). Aktywność przeciwutleniająca handlowych preparatów białek serwatkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(59), 35-42.
14. Wójciak K.M., Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D. (2014). Stabilność oksydacyjna ekologicznej kielbasy surowo dojrzewającej z dodatkiem probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 i serwatki kwasowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 21(2), 93-109.

15. Skwarek M., Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D. (2014). Wpływ naparu zielonej herbaty i sproszkowanej papryki na barwę probiotycznych szynek surowo dojrzewających. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3(94), 108-122.
16. Stadnik J., Dolatowski Z.J. (2010). Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(3), 251-263.
17. Stadnik J. (2014). Aminy biogenne jako marker bezpieczeństwa zdrowotnego wyrobów mięsnych surowo dojrzewających. W: T. Tarko, A. Duda-Chodak, M. Witczak, Najgebauer-Lejko D., *red.* Właściwości produktów i surowców żywnościowych wybrane zagadnienia, Kraków: Wydawnictwo PTTŻ.

JOANNA MAJOWSKA¹, IRENEUSZ MACIEJASZEK², BARBARA SURÓWKA³,
KRZYSZTOF SURÓWKA²

¹*Instytut Nauk Technicznych, Państwowa Wyższa Szkoła Wschodnioeuropejska w Przemysłu*

²*Katedra Chłodnictwa i Koncentratów Spożywczych, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

³*Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Jagielloński - Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

ŻELE ŻELATYNOWE BARWIONE BARWNIKAMI NATURALNYMI

Streszczenie

Podjęto próbę określenia wpływu czynników ochronnych w postaci ograniczenia dostępu światła oraz obniżenia temperatury składowania na zachowanie barwy w żelach żelatynowych barwionych preparatami pochodzenia naturalnego. Założono, że stabilność barwy można zwiększyć poprzez wyeliminowanie efektu fotochemicznego indukowanego światłem oraz ograniczenie destrukcyjnych procesów chemicznych poprzez obniżenie temperatury. Badania prowadzono przez okres 5 miesięcy. Rejestrowano widma spektrofotometryczne w zakresie światła widzialnego oraz wykonano pomiary barwy zgodnie z modelem CIE L*a*b* za pomocą spektrofotometru CM5 firmy Konica Minolta.

Wykazano w jakim zakresie temperatura i światło rozproszone oraz słoneczne wpływają na utrzymanie barwy w żelach żelatynowych barwionych czerwienią buraczną, antocyjanami z owoców maliny, karmelem oraz ekstraktem z szafranu. Ważnym czynnikiem mającym wpływ na zachowanie barwy była temperatura przechowywania, najmniejsze zmiany nastąpiły w próbach składowanych w temp. 6°C. Również brak światła ma istotne znaczenie w utrzymaniu barwy. Żele składowane w świetle rozproszonym, a szczególnie w ekspozycji słonecznej szybciej traciły barwę niż próbki przechowywane w ciemności.

Słowa kluczowe: żelatyna, barwniki naturalne, betalainy, antocyjany, karotenoidy, karmel.

Wprowadzenie

Żelatyna jest powszechnie stosowanym składnikiem żywności pochodzenia zwierzęcego o charakterze białkowym wytwarzanym z kolagenu na skutek częściowej jego termicznej hydrolizy. Jej szczególnie przydatną z technologicznego punktu widzenia właściwością jest zdolność żelowania. Znamienne jest to, że żele żelatynowe w odróżnieniu od większości innych żeli nie tylko rozpuszczają się w wodzie, ale w temperaturze ciała ludzkiego w ustach wykazują zdolność topienia się. Ta unikalna ich

cecha sprawia, że szczególnie chętnie wykorzystywane są w produkcji żywności. Ze względu jednak na neutralne zabarwienie tych żeli często wymagają one barwienia.

Barwienie produktów spożywczych jest znane i stosowane od kilku tysięcy lat. Do tego celu przez wieki używano barwników naturalnych [Zawirska-Wojtasik, 2005], później dzięki rozwojowi chemii zaczęto stosować barwniki syntetyczne, jednak obecnie obserwuje się powrót do wykorzystywania naturalnych substancji barwiących. Przyczynia się do tego rosnąca świadomość konsumentów oraz moda na ekologiczny tryb życia [Krępska i in., 2015]. Ograniczenia prawne dotyczące substancji syntetycznych w żywności też mają wpływ na rosnącą popularność barwników naturalnych [Harasym i Bogacz-Radomska, 2016]. Dlatego, aby spełnić oczekiwania konsumentów, technolodzy żywności coraz częściej wykorzystują barwniki pozyskiwane z surowców naturalnych, które są bezpieczne dla człowieka [Krępska i in., 2014]. Poszukuje się również nowych źródeł barwników naturalnych, m.in. w tym celu, aby nadawać atrakcyjną barwę nowo opracowywanym produktom żywnościowym. Liczne z nich to różnego rodzaju desery otrzymywane m.in. na bazie żelatyny, która jest składnikiem funkcjonalnym obecnym w szerokiej gamie produktów spożywczych. Dlatego ważne wydaje się pozyskiwanie wiedzy na temat efektywności jej barwienia barwnikami naturalnymi oraz trwałości barwy uzyskiwanych żeli żelatynowych.

Największą zaletą barwników naturalnych jest ich pochodzenie, które sprawia, że powszechnie są uważane za bezpieczne i jako takie akceptowane przez konsumentów. Mają jednak istotne wady, do których zalicza się głównie ograniczoną paletę barw, niską relatywnie siłę barwiącą, zależność barwy od odczynu środowiska i jej trwanie pod wpływem światła, ciepła, tlenu oraz jonów metali, występujący niekiedy charakterystyczny zapach lub smak oraz wysokie koszty barwienia [Czerwińska, 2010].

Z uwagi na relatywnie niską stabilność przechowalniczą barwników naturalnych podjęto próbę określenia wpływu zastosowania czynników ochronnych w postaci ograniczenia dostępu światła oraz obniżenia temperatury składowania na zachowanie barwy żeli żelatynowych barwionych wybranymi naturalnymi substancjami barwiącymi. Założono, że stabilność barwy analizowanych żeli można zwiększyć poprzez wyeliminowanie efektu fotochemicznego indukowanego światłem oraz ograniczenie destrukcyjnych procesów chemicznych poprzez obniżenie temperatury. Hipotezę tę zweryfikowano prowadząc przez okres 5 miesięcy badania zmian charakterystyki spektralnej oraz parametrów barwy w systemie CIE L*a*b* barwionych żeli żelatynowych.

Material i metody

Przedmiotem badań były 4 preparaty barwników naturalnych: czerwień buraczana, barwnik z malin, karmel oraz wyciąg z szafranu. Jako czynnik żelujący zastosowano wieprzową żelatynę spożywczą typu A, a w charakterze środka bakteriostatycznego wykorzystano roztwór azydku sodu.

Na wstępie przygotowano roztwory wodne o następujących stężeniach: czerwień buraczana (3 g/L), barwnik z malin (6 g/L), karmel (1 g/L), wyciąg z szafranu (10 g/L). Następnie w buforze cytrynianowym o pH 6,2 przygotowano roztwór azydku sodu o stężeniu 2 g/L. Poszczególne roztwory barwników wymieszano z tym roztworem w taki sposób, że pobrano: 0,36 g roztworu czerwieni buraczanej, 0,72 g roztworu barwnika z malin i 0,12 g roztworu karmelu i zmieszano z porcjami 60 ml roztworu azydku sodu. Zaś wyciąg szafranowy w ilości 5 ml zmieszano z 95 ml r-ru NaN_3 . Powstałe w ten sposób roztwory posłużyły następnie do wykonania barwionych żeli żelatynowych. W tym celu pobrano po 50 ml każdego z nich i bardzo dokładnie wymieszano z 50 ml porcjami roztworu żelatyny o stężeniu 3%. Następnie pipetą odmierzano po 3 ml każdego barwnika w roztworze żelatyny i wprowadzano do kuwetek o grubości 10 mm. Po zżelowaniu powierzchnię każdej z nich zabezpieczono parafiną i nakryto parafilmem.

Gotowe próby przechowywano w różnych warunkach: pierwszą w temperaturze $6\pm 1^\circ\text{C}$ w ciemności, drugą w $20\pm 2^\circ\text{C}$ w ciemności, trzecią również w $20\pm 2^\circ\text{C}$ lecz w rozproszonym świetle dziennym, a czwartą bezpośrednio na świetle słonecznym w temp. $26\pm 2^\circ\text{C}$. Próby przechowywano przez 5 miesięcy i dokonywano pomiarów po 2 tygodniach oraz po 1; 2; 3 i 5 miesiącach.

Pomiary widm spektrofotometrycznych przeprowadzono względem wody przy wykorzystaniu kompaktowego spektrofotometru UV/VIS Nanocolor (Macherey-Nagel GmbH&Co.KG) dla zakresu długości fal od 350 nm do 800 nm. Ilościowe pomiary barwy wykonano zgodnie z modelem CIE $L^*a^*b^*$ przy użyciu spektrofotometru CM5 (Konica Minolta, Japonia). Aparat ustawiono na pomiar transmisji rejestrując składowe L^* , a^* , oraz b^* . Współrzędna L^* oznacza jasność, im jest ona większa, tym jasność większa, przy czym 100 przyjmuje się dla bieli, a 0 dla czerni. Wartość dodatnia parametru barwy a^* odpowiada barwie czerwonej, a ujemna zielonej. W przypadku parametru barwy b^* dodatnia wartość odpowiada barwie żółtej, a ujemna barwie niebieskiej. W oparciu o uzyskane dane obliczono bezwzględną różnicę barw (ΔE) próbek bezpośrednio po przygotowaniu i po składowaniu. Do tego celu wykorzystano zależność:

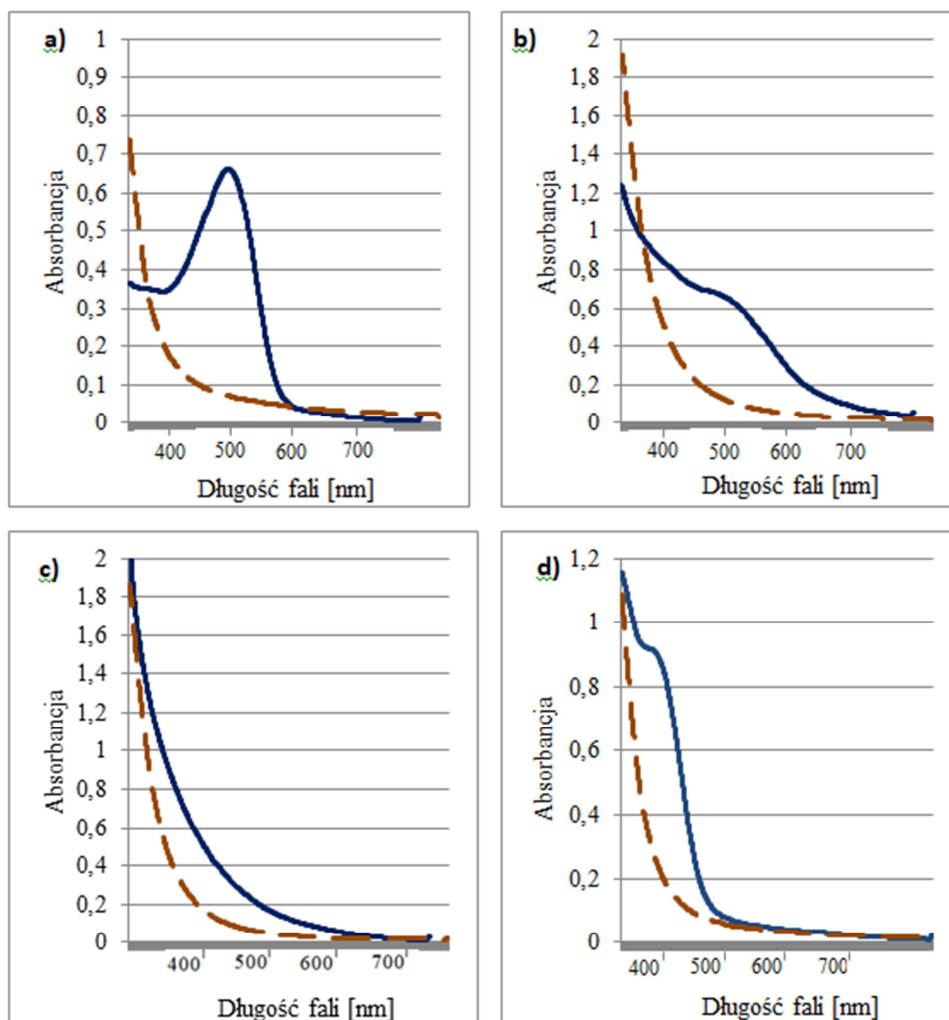
$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L_1^*)^2 + (a_0^* - a_1^*)^2 + (b_0^* - b_1^*)^2}$$

gdzie:

- L_0^* , a_0^* , b_0^* – składowe barwy świeżo przygotowanych próbek,
- L_1^* , a_1^* , b_1^* – składowe barwy próbek badanych po składowaniu.

Wyniki i dyskusja

Na rysunku 1 przedstawiono widma żeli, które zabarwiono poszczególnymi barwnikami i przechowywano przez 5 miesięcy w najbardziej niekorzystnych warunkach, t.j. w $26 \pm 2^\circ\text{C}$ na świetle słonecznym. Widać wyraźnie, że warunki takie znacząco

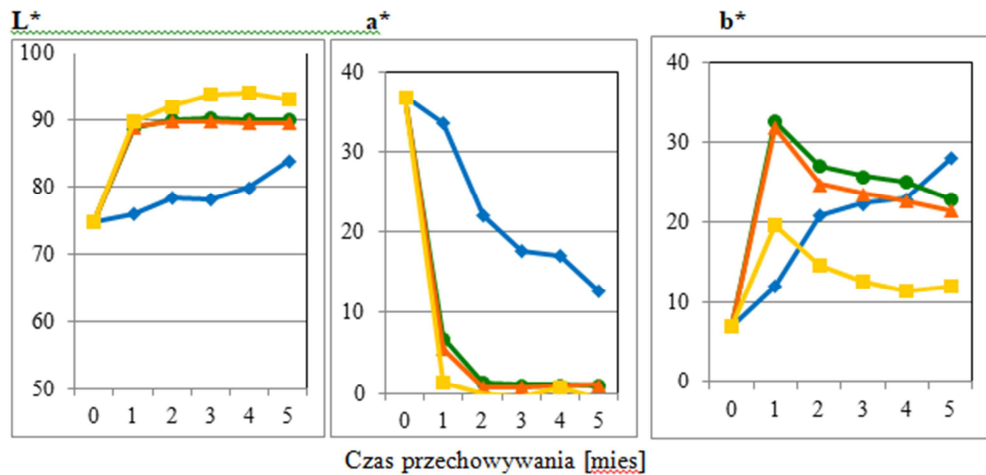


Rys. 1. Widma żeli żelatynowych barwionych czerwień buraczną (a), barwnikiem z malin (b), karmelem (c) i szafranem (d) bezpośrednio po sporządzeniu (linia ciągła) i po 5-miesięcznym przechowywaniu w 26°C na słońcu (linia przerywana)

wpływają na przebieg linii widmowych. Widmo wyjściowe (rys. 1a) barwnika czerwieni buraczanej zawiera tylko jeden pik typowy dla betaniny. Po składowaniu pik ten zanika całkowicie (rys. 1a). Już po połowie miesiąca w każdych z zastosowanych tu warunków przechowywania dało się zauważyć obniżenie widma (dane nieprezentowane), a dalsze składowanie powoduje stopniowe zanikanie pików i tylko w materiale zabezpieczonym chłodniczo nawet po 5 miesiącach pik jeszcze występuje, co świadczy o częściowym zachowaniu barwy. Wszystkie te zmiany znajdują odzwierciedlenie w barwie postrzeganej wizualnie, jednak w celu obiektywnego określenia obserwowanych prawidłowości posłużono się pomiarem instrumentalnym barwy w przestrzeni CIE $L^*a^*b^*$. Na rysunku 2 przedstawiono dynamikę zmian jego parametrów w próbkach trzymanyh w różnych warunkach. Przechowywanie powodowało zwiększenie L^* , co odpowiada częściowemu wyblaknięciu próbek oraz spadek a^* i wzrost b^* .

W przypadku tych wszystkich wyróżników największa zmiana nastąpiła w pierwszym miesiącu składowania. Należy jednak nadmienić, że w próbkach pochodzących z warunków chłodniczych (6°C) i ciemności zmiany, chociaż wyraźne to jednak były najmniejsze. Interesującym spostrzeżeniem wydaje się fakt, że linie zmian w/w składowych próbek przetrzymywanych w 20°C , tak w ciemności jak i na świetle, w znacznym stopniu się pokrywają. Znajduje to potwierdzenie w wartościach odległości w przestrzeni barwy ΔE . W poszczególnych miesiącach pomiary tej wartości ilustrującej odległość od barwy próbki wyjściowej dawały prawie te same rezultaty (rys. 3). Zbliżone do nich wartości ΔE były też w próbkach wyeksponowanych na działanie słońca, jednak w tym, przypadku były one efektem głównie większych niż w próbce wyjściowej wartości L^* i mniejszych b^* .

W podsumowaniu można stwierdzić, że czerwień buraczana w formie barwionego żelu żelatynowego jest barwnikiem nietrwałym. W temperaturze pokojowej (20°C) nawet w ciemności łatwo traci barwę, a jedynie w warunkach chłodniczych (6°C) i w ciemności barwa jej jest w miarę dobrze zachowana przez okres ok. 1 miesiąca, chociaż ΔE i tak przekracza 5, czyli poziom, w którym obserwator odnosi wrażenie dwóch różnych barw. Można zatem barwnik ten zalecić do nadawania koloru wyrobom przeznaczonym do spożycia w krótkim terminie (np. słodkie wypieki, torty) oraz takim, które przechowuje się w niskich temperaturach (np. lody). Przypuszczalnie barwnik ten będzie znacznie trwalszy, nawet w temperaturze pokojowej, jeśli występował będzie w formie suchej, a więc np. nie gotowej galaretki, a mieszanki przeznaczonej do jej wytworzenia na krótko przed konsumpcją.



Rysunek 2. Zmiany parametrów barwy L^* , a^* i b^* wywołane przechowywaniem żeli żelatynowych barwionych czerwienią buraczaną w różnych warunkach temperatury i dostępu światła. Oznaczenia: \blacklozenge 6 °C/ciemność, \blacklozenge 20 °C/ciemność, \blacktriangle 20 °C/światło, \blacksquare 26 °C/światło

Poza analizowanymi tu czynnikami, czyli temperaturą i dostępem światła, dane literaturowe podają, że istotny wpływ na trwałość betalain ma również pH. Są one najbardziej stabilne w zakresie pH 4-5 [Bołongowska i in., 2011; Janiszewska, 2016]. Innymi czynnikami środowiskowymi o istotnym znaczeniu jest obecność jonów żelaza i miedzi, tlenu, aktywnych przeciwutleniaczy oraz aktywności wody [Klewicka, 2012]. Dlatego betalainy mają największe zastosowanie w świeżej żywności, w produktach niepoddanych długotrwałym zabiegom termicznym oraz w wyrobach pakowanych w atmosferze modyfikowanej [Bołongowska i in., 2011].

Na widmie świeżo przyrządzonego żelu zabarwionego preparatem z owoców maliny widać uwypuklenie w zakresie od 450 do 550 nm odpowiadające antocyjanom (rys. 1b). Już od początku składowania we wszystkich przypadkach odnotowuje się wyraźne zmiany absorbancji polegające na jej wzroście przy falach krótszych i obniżeniu w kierunku fal dłuższych. Największe zmiany zaszły w próbie przechowywanej na słońcu (rys. 1b).

Na rysunku 4 przedstawiono zmiany czasowe parametrów barwy L^* , a^* i b^* w różnych warunkach. Przechowywanie na słońcu, już od początku, powodowało wyraźny wzrost L^* , co przejawiało się pojaśnieniem prób. Dalsze przechowywanie również skutkowało jego podnoszeniem, ale już w wolniejszym tempie. W pozostałych przypadkach te zmiany były niewielkie przez cały okres składowania. Składowa a^* ulegała niewielkiemu zmniejszeniu jeśli chodzi o próby przechowywane w temperaturze chłodniczej i pokojowej tak w ciemności jak i na świetle. Natomiast składowa ta w żelu

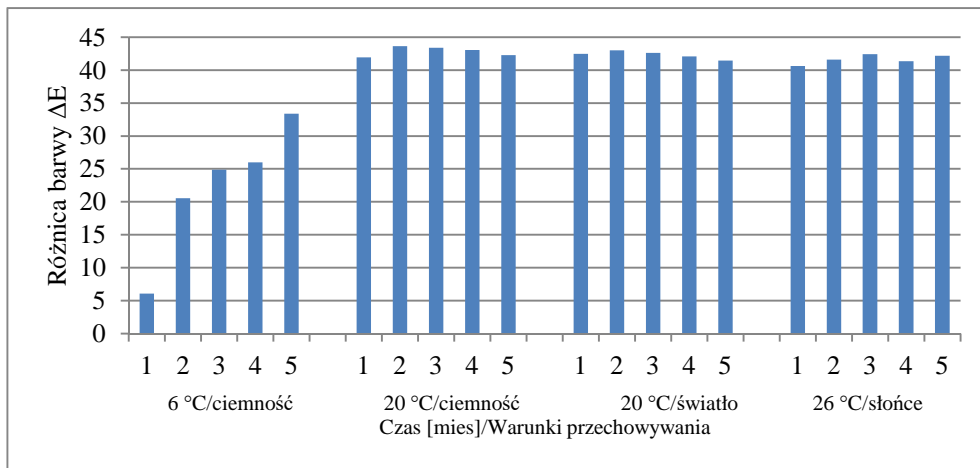
wyeksponowanym na bezpośrednie działanie słońca do 2 miesiąca przechowywania szybko zmniejszyła się i wyraźnie oddaliła od barwy czerwonej. Składowa b^* rosła w różnym tempie w zależności od warunków składowania z tym, że w przypadku próby przechowywanej na słońcu po początkowym wzroście zaobserwowano jej spadek.

Z zestawienia zaprezentowanego na rysunku 5 widać, że największe różnice barwy w stosunku do próby wyjściowej wystąpiły w 26°C i na słońcu, a najmniejsze w 6°C w ciemności. Wykazano również negatywny wpływ światła na zachowanie barwy w 20°C, gdyż żele przetrzymywane w jego obecności miały większe ΔE niż w ciemności.

Przeprowadzone badania potwierdziły umiarkowaną trwałość antocyjanów z owoców maliny w zastosowaniu do barwienia żeli żelatynowych. Pod wpływem światła szybko tracą one barwę, natomiast, gdy są przechowywane w warunkach chłodniczych i w ciemności ich barwa, nawet przez okres kilkumiesięczny jest w miarę dobrze zachowana. Mając na względzie powyższe obserwacje można zalecić, aby preparat antocyjanów z maliny stosować w połączeniu z innymi związkami z tej grupy do barwienia wyrobów przechowywanych w niższych temperaturach i bez dostępu światła.

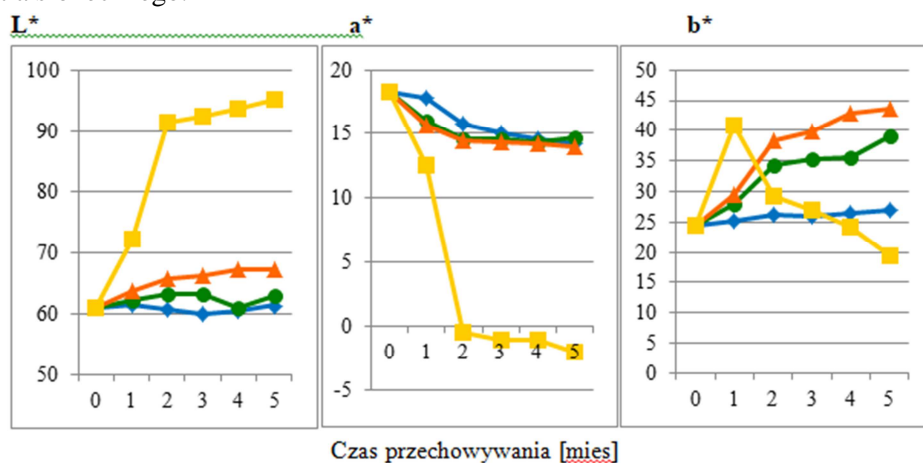
Naturalnych barwników antocyjanowych znanych jest około dwustu [Rutkowski i in., 2003]. Ze względu na różną budowę chemiczną charakteryzują się one barwą od czerwonej poprzez fioletową, aż po niebieską [Piątkowska i in., 2011] i jest ona uzależniona od pH. Jest to grupa barwników uważanych ogólnie za mało trwałe. Na skalę światową otrzymuje się je m.in. z wyłoków aronii, czarnej porzeczki i winogron [Rutkowski i in., 2003].

Cechą charakterystyczną widma żelu żelatynowego barwionego karmelem jest brak maksimum i hiperboliczne obniżanie się absorbancji w kierunku fal dłuższych. Kształty linii widmowych we wszystkich zastosowanych warunkach składowania nie różnią się od siebie. Jednak w warunkach słonecznego naświetlenia w 26°C (rys.1c) linie te są wyraźnie obniżone, co widać na widmie próbki składowanej 5 miesięcy. Na rysunku 6 ilustrującym zmiany w czasie parametrów L^* , a^* i b^* widać, że jedynie składowanie na słońcu (26°C) zmieniło parametr L^* przesuwając go w kierunku jasności. Duże zmiany a^* i b^* polegające na znacznym ich początkowym spadku wystąpiły również tylko w przypadku próby trzymanej w tych warunkach. W pozostałych przypadkach żel barwiony karmelem był skutecznie zabezpieczony przed zmianami. Potwierdzają to wartości ΔE odległości od barwy wyjściowej (rys. 7). Przez cały okres składowania w żelach przechowywanych w ciemności, a także w świetle rozproszonym były one niskie. Jedynie w próbie składowanej na słońcu ΔE wzrosło bardzo wyraźnie i to już w pierwszym miesiącu przechowywania.

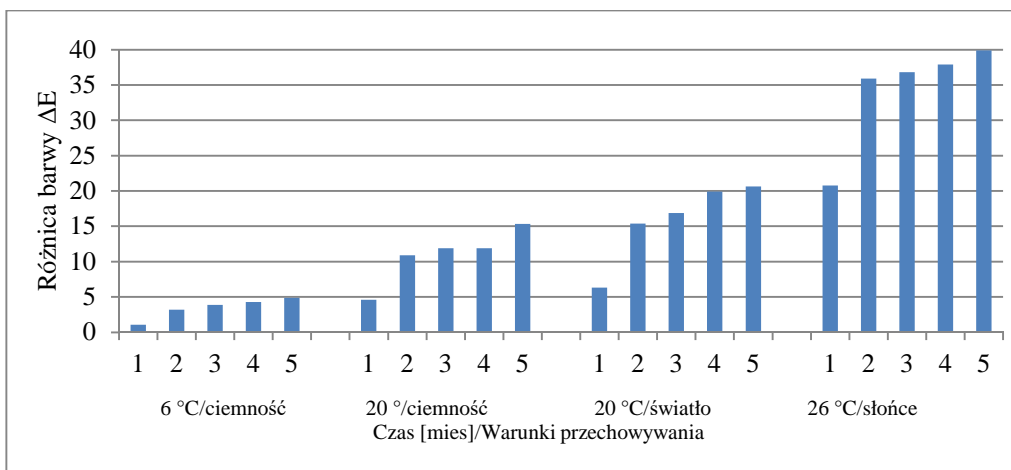


Rysunek 3. Zmiany wartości ΔE wywołane przechowywaniem żelu żelatynowego barwionego czerwinią buraczną w różnych warunkach temperatury i dostępu światła

Podsumowując, żele żelatynowe barwione karmelem zarówno w ciemności jak i w świetle rozproszonym trwale zachowują barwę. Nie ulega ona znaczącym zmianom i dobrze zachowana była przez cały 5-miesięczny okres składowania. Jednak pod wpływem światła słonecznego (26°C), podobnie jak inne badane barwniki karmel szybko odbarwia się. Można dodawać go nawet do wyrobów o długiej dacie ważności, zwracać jednak należy uwagę na to, aby nie były one ekspozowane na bezpośrednie działanie światła słonecznego.



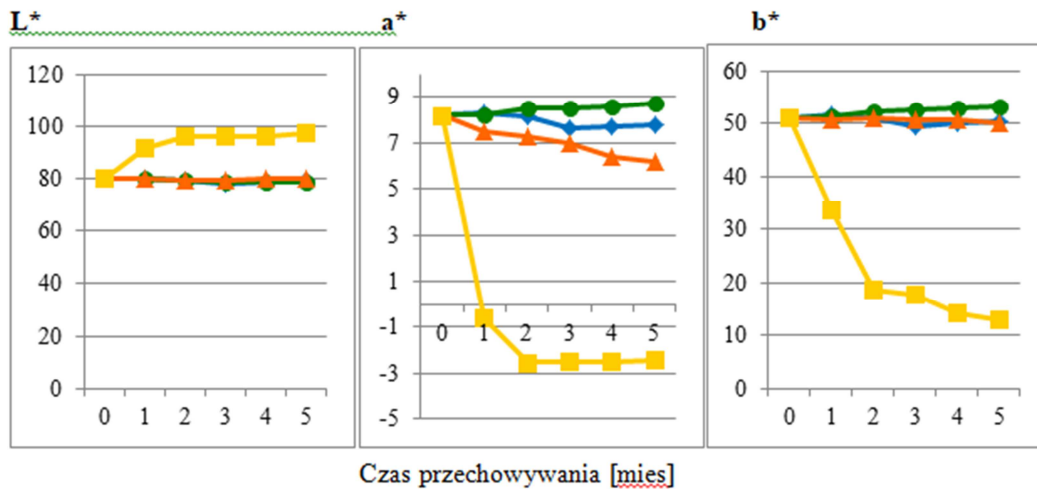
Rysunek 4. Zmiany parametrów barwy L^* , a^* i b^* wywołane przechowywaniem żeli żelatynowych barwionych antocyjanami z owoców malin w różnych warunkach temperatury i dostępu światła. Oznaczenia: \blacklozenge 6 °C/ciemność, \bullet 20 °C/ciemność, \blacktriangle 20 °C/światło, \blacksquare 26 °C/słońce



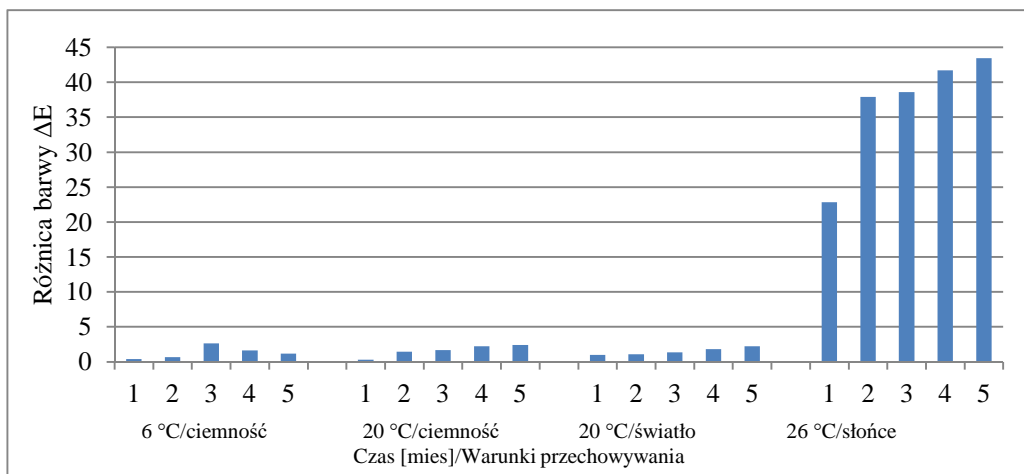
Rysunek 5. Zmiany wartości ΔE wywołane przechowywaniem żelu żelatynowego barwionego antocyjanami z owoców maliny w różnych warunkach temperatury i dostępu światła

Odnotowana w tej pracy relatywnie wysoka trwałość barwy żelatynowych żeli barwionych karmelem wynika z jego specyficznej budowy chemicznej. Karmele, podobnie jak melanoidy powstają podczas procesów technologicznych, ale zaliczane są do barwników naturalnych [Hajduk, 2010]. Zarówno karmelizacja jak i reakcje Maillarda należą do procesów tzw. nieenzymatycznego brązowienia żywności [Michalska i Zieliński 2007]. Proces karmelizacji polega na kontrolowanym ogrzewaniu węglowodanów w temperaturze powyżej 120°C.

Pomimo stwierdzonej, spośród badanych w tej pracy barwników, największej trwałości karmel naturalny jest uważany za mniej odporny niż barwniki syntetyczne na działanie takich czynników jak: światło, temperatura, pH oraz czynniki redukujące czy utleniające [Wilk, i in., 2015].



Rysunek 6. Zmiany parametrów barwy L*, a* i b* wywołane przechowywaniem żeli żelatynowych barwionych karmelem w różnych warunkach temperatury i dostępu światła. Oznaczenia: ◆ 6 °C/ciemność, ● 20 °C/ciemność, ▲ 20 °C/światło, ■ 26 °C/słońce

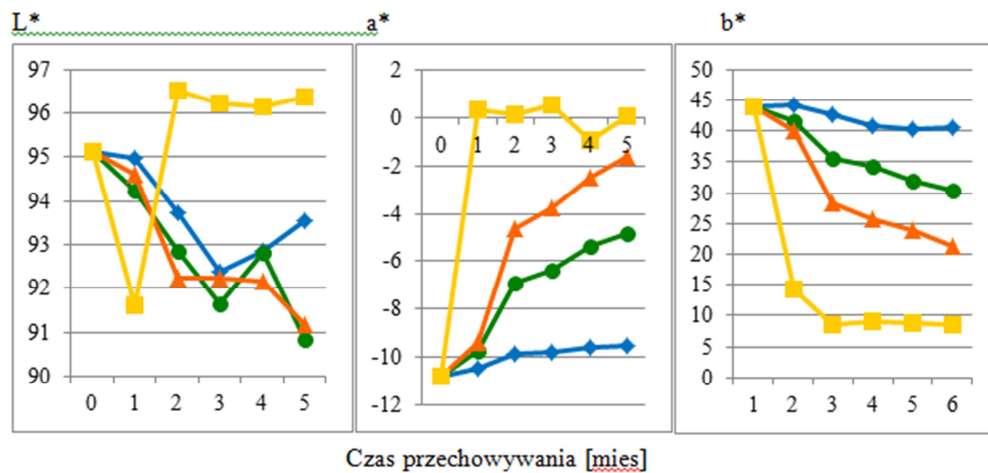


Rysunek 7. Zmiany wartości ΔE wywołane przechowywaniem żelu żelatynowego barwionego karmelem w różnych warunkach temperatury i dostępu światła

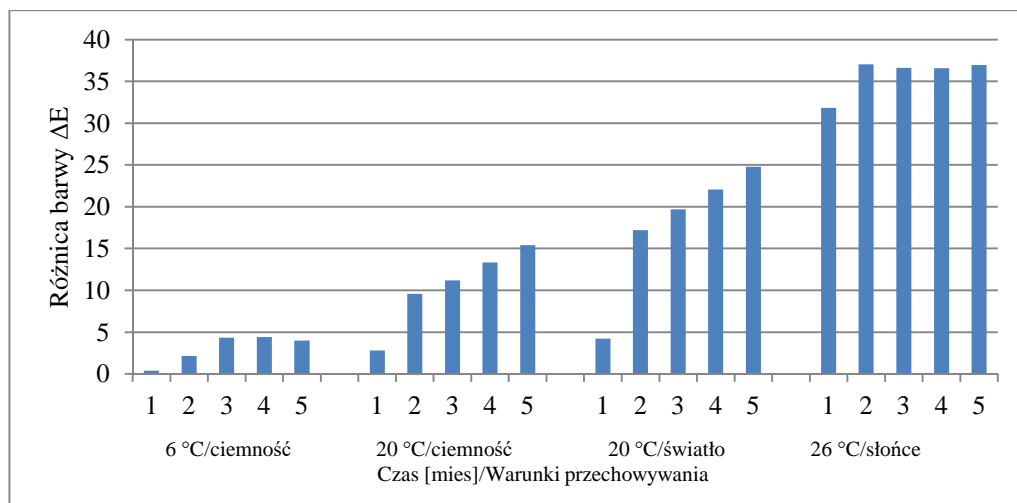
Do roślinnych surowców barwiących należy szafran, chociaż jako barwnik nie jest on wyodrębniony [Rutkowski i in., 2003]. Ekstrakt z niego produkowany jest z suszonych znamion kwiatowych krokusa uprawnego „*Crocus dativus*” [Sobiech, 2010]. Głównymi substancjami barwnymi szafranu są związki należące do karetonoidów takie

jak: krocyna i krocetyna [Krępska i in., 2014]. Rysunek 1d przedstawia widma żeli barwionych wyciągiem z szafranu bezpośrednio po przygotowaniu oraz po przechowywaniu przez 5 miesięcy na świetle słonecznym (26°C). Widmo wyjściowe na początku składowania zawierało jedno maksimum przy długości fali ok. 400 nm. W miarę upływu czasu zanikało ono z tym, że proces ten w temperaturze chłodniczej i w ciemności zachodził bardzo powoli, a najbardziej wyraźny był w żelach składowanych na świetle słonecznym (rys. 1d). Z przedstawionej na rysunku 8 zmienności w czasie parametrów CIE $L^*a^*b^*$ w próbach przechowywanych w różnych warunkach wynika m.in., że składowanie powodowało zmniejszenie L^* , ale w przypadku próby pochodzącej z ekspozycji słonecznej (26°C) po miesiącu ten parametr zwiększył się. Z kolei a^* rosło, a b^* malało wraz upływem czasu. Zmiany te dało się zauważyć już od samego początku przechowywania, jednakże o ile wzrost parametru a^* i spadek parametru b^* był w miarę równomierny w próbach trzymanyh w chłodziarce (6°C) i w temperaturze pokojowej (20°C) zarówno w ciemności jak i na świetle, to w próbie eksponowanej na słońcu w 26°C już po 1 miesiącu przechowywania zauważono wyraźne skokowe zmiany, które w okresie późniejszym były już niewielkie. Dobrze koresponduje to ze zilustrowanymi na rysunku 9 zmianami ΔE .

Przeprowadzone badania wskazały zatem, że żel z ekstraktem z szafranu jedynie w warunkach chłodniczych i ciemności nie traci zbyt szybko barwy. W temperaturze pokojowej, nawet bez dostępu światła, następuje stopniowa degradacja barwnika. Jest ona wzmacniana w obecności światła rozproszonego, a światło słoneczne działa na ten barwnik destrukcyjnie od samego początku. Uzyskane rezultaty wskazują na to, że barwnikiem otrzymanym z szafranu można śmiało nadawać kolor produktom o krótkiej dacie ważności, nieeksponowanych na działanie światła słonecznego. Ważnym czynnikiem ograniczającym utratę barwy jest stosowanie obniżonej temperatury składowania.



Rysunek 8. Zmiany parametrów barwy L*, a* i b* wywołane przechowywaniem żeli żelatynowych barwionych ekstraktem z szafranu w różnych warunkach temperatury i dostępu światła. Oznaczenia: \blacklozenge 6 °C/ciemność, \bullet 20 °C/ciemność, \blacktriangle 20 °C/światło, \blacksquare 26 °C/słońce



Rysunek 9. Zmiany wartości ΔE wywołane przechowywaniem żeli żelatynowego barwionego ekstraktem z szafranu w różnych warunkach temperatury i dostępu światła

Wnioski

1. Najmniej stabilnym barwnikiem spośród zastosowanych w badaniach była czerwień buraczana, która najszybciej traciła barwę od samego początku składowania, z kolei barwnikiem najbardziej trwałym okazał się karmel.
2. W celu zapewnienia jak najlepszej stabilności żeli żelatynowych barwionych zastosowanymi tu barwnikami naturalnymi wskazane jest ich przechowywanie w temperaturze chłodniczej (6°C). Możliwe jest również ich składowanie w temperaturze pokojowej, lecz wówczas należy unikać dostępu światła, szczególnie światła słonecznego.
3. Ze względu na ograniczoną trwałość naturalnych barwników w obecności wody jak ma to miejsce w gotowych produktach (np. żelach żelatynowych czy deserach) celowym jest sporządzanie tych ostatnich, najlepiej na krótko przed spożyciem z koncentratów zawierających barwniki w formie stałej lub stężonej.

Literatura

1. Bołongowska O., Pietrosiuk A., Sykłowska-Baranek K. (2011). Roślinne związki barwne ich właściwości biologiczne oraz możliwości wytwarzania w kulturach *in vitro*. Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
2. Czerwińska D. (2010). Wykorzystanie barwników spożywczych w przetworach owocowo-warzywnych. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 54, 11-12, 38-40.
3. Hajduk E. (2010). Ogólna technologia żywności. Skrypt do ćwiczeń. Wyd. UR, Kraków.
4. Harasym J., Bogacz-Radomska L. (2016). Barwniki w żywności – historia wykorzystania, obecne źródła i perspektywy. Postęp Cywilizacyjny - stan obecny i perspektywy. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o.o., Lublin.
5. Janiszewska-Turak E., Pisarska A., Królczyk J. (2016). Natural food pigments application in food products. Nauka Przyroda Technologie 10, (4), 51-55.
6. Klewicka E. (2012). Betacyjaniny - biodostępność i biologiczna aktywność. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 19, (2), 5-21.
7. Krępska M., Jagiełło J., Lasoń-Rydel M. (2014). Nowe kierunki i perspektywy rozwoju barwienia produktów spożywczych barwnikami naturalnymi. Technologia i Jakość Wytwarzania 59, 17-22.
8. Krępska M., Lasoń-Rydel M., Jagiełło J. (2015). Barwniki spożywcze i ich wpływ na organizm człowieka. Technologia i Jakość Wytwarzania 60, 83-90.
9. Michalska A., Zieliński H. (2007). Produkty reakcji Maillarda w żywności. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2 (51), 5-16.
10. Piątkowska E., Kopeć A., Leszczyńska T. (2011). Antocyjany - charakterystyka, występowanie i oddziaływanie na organizm człowieka. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 4, 77, 24-35.
11. Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K. (2003). Kompendium dodatków do żywności. Wyd. Hortimex, Konin.
12. Sobiech K. (2010). Szafran – stary lek na choroby współczesności. Gazeta Farmaceutyczna 4, 36-37.
13. Wilk M., Krzywonos M., Seruga P., Kucharczyk M., Borowiak D. (2015). Karmel w żywności. Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, Wybrane zagadnienia z bioekonomii, 411, 141-149.
14. Zawirska-Wojtasik R. (2005). Aromaty, barwniki, konserwanty – perspektywy stosowania. Przemysł Spożywczy 59, 2-10.



<http://www.biogenet.pl/>



Ergo Solutions
30-438 Kraków, ul. Borkowska 9/6
Tel. 12 445 64 49
email: info@ergosol.pl
<http://www.ergosol.pl/>

Firma Ergo Solutions została utworzona w 2002 roku. Jej głównym celem działalności jest świadczenie kompleksowych usług dla przedsiębiorstw w branży spożywczej. Ergo Solutions to zespół specjalistów z wieloletnim stażem w przemyśle spożywczym. W skład zespołu wchodzi: auditorzy, konsultanci, trenerzy oraz praktycy i teoretycy przemysłu spożywczego. W zależności od potrzeb, do współpracy z klientem dobierany jest interdyscyplinarny zespół osób o uzupełniających się kompetencjach. Oferta Ergo Solutions dotyczy w szczególności: badań i doskonalenia wyrobów oraz wdrażania i doskonalenia systemów zarządzania.



<http://www.sokipawlowski.pl/>

**Makarony
Polskie**

<https://www.makarony.pl/>



**Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego**

XIII Konferencja Naukowa z cyklu ŻYWNOŚĆ XXI WIEKU „ŻYWNOŚĆ A SKŁADNIKI BIOAKTYWNE”, 24-25 września 2018 - zadanie finansowane w ramach umowy 774/P-DUN/2018 ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na działalność upowszechniającą naukę.