

**POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI
ODDZIAŁ MAŁOPOLSKI**

**WYDZIAŁ TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI
UNIWERSYTET ROLNICZY IM. HUGONA KOLŁĄTAJA
W KRAKOWIE**

KOMITET NAUK O ŻYWNOŚCI PAN

TECHNOLOGIA PRODUKCJI I BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOŚCI

**Tomasz Tarko, Aleksandra Duda-Chodak
Mariusz Witczak, Dorota Najgebauer-Lejko
(redaktorzy)**

Recenzenci Naukowi

Dr inż. Emilia Bernaś, Prof. dr hab. inż. Ewa Cieślik, Prof. dr hab. inż. Jacek Domagała, Dr Iwona Drożdż, Dr hab. inż. Agnieszka Filipiak-Florkiewicz, Dr inż. Adam Florkiewicz, Prof. Dr hab. Teresa Fortuna, Dr inż. Dorota Gałkowska, Prof. dr hab. inż. Halina Gambuś, Dr hab. inż. Piotr Gębczyński, Dr Maja Grabacka, Prof. dr hab. inż. Grażyna Jaworska, Dr hab. inż. Lesław Juszczak, Dr hab. inż. Aneta Kopeć, Dr hab. inż. Jarosław Korus, Prof. dr hab. inż. Zofia Lisiewska, Dr hab. inż. Ryszard Macura, Dr Jagoda Majcherczyk, Dr Małgorzata Makarewicz, Prof. Dr hab. inż. Władysław Migdał, Dr hab. Magdalena Mika, Dr inż. Dorota Najgebauer-Lejko, Dr inż. Paulina Pająk, Dr hab. inż. Sławomir Pietrzyk, Dr inż. Izabela Przetaczek-Rożnowska, Dr Jacek Rożnowski, Dr Sadowska-Rociek, Dr inż. Marek Sady, Dr hab. inż. Paweł Satora, Prof. dr hab. inż. Elżbieta Sikora, Dr Łukasz Skoczylas, Dr Marta Skoczylas-Liszka, Dr Joanna Sobolewska-Zielińska, Dr Robert Socha, Dr Paweł Sroka, Dr inż. Anna Starzyńska-Janiszewska, Prof. dr hab. inż. Krzysztof Surówka, Dr inż. Tomasz Tarko, Dr Kinga Topolska, Dr inż. Maria Walczycka, Dr Ewelina Węsierska, Dr hab. inż. Mariusz Witczak, Dr inż. Teresa Witczak, Dr inż. Marzena Zając, Dr inż. Rafał Ziobro, Dr inż. Daniel Żmudziński

Redakcja

Dr inż. Tomasz Tarko
Dr Aleksandra Duda-Chodak
Dr hab. inż. Mariusz Witczak
Dr inż. Dorota Najgebauer-Lejko

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

ISBN 978-83-937001-3-4

Za treść zamieszczonych materiałów odpowiadają ich autorzy

SPIS TREŚCI

<i>Danuta KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, Małgorzata WRZOSEK, Beata BILSKA, Karol KRAJEWSKI</i>	5
Ryzyko powstawania strat i marnotrawstwa żywności a możliwość ich ograniczenia	
<i>Joanna BERŁOWSKA, Maria BALCEREK, Katarzyna PIELECH-PRZYBYLSKA, Piotr PATELSKI, Halina KALINOWSKA, Piotr DZIUGAN, Paulina PRZYBYLAK</i>	17
Dobór drożdży do fermentacji hydrolizatów z wysłodków buraka cukrowego	
<i>Piotr PATELSKI, Maria BALCEREK, Katarzyna PIELECH-PRZYBYLSKA, Izabela CHMIELEWSKA</i>	31
Wpływ mikroflory powierzchni owoców śliwy na przebieg fermentacji zacierów śliwkowych	
<i>Katarzyna PIELECH-PRZYBYLSKA, Joanna BERŁOWSKA, Maria BALCEREK, Piotr PATELSKI, Halina KALINOWSKA, Piotr DZIUGAN</i>	43
Fermentacja alkoholowa hydrolizatów z wysłodków buraka cukrowego	
<i>Paweł SROKA, Paweł SATORA, Tomasz TARKO, Aleksandra DUDA-CHODAK, Piotr TELEC</i>	54
Wpływ dodatku gumy arabskiej na przebieg fermentacji brzeczki miodowych o różnej zawartości jonów magnezu	
<i>Urszula BŁASZCZYK, Iwona DROŹDŹ, Paweł SATORA</i>	68
Wpływ warunków hodowli na biosyntezę karotenoidów przez drożdże z rodzaju <i>Rhodotorula</i>	
<i>Karolina PYCIA, Lesław JUSZCZAK, Robert SOCHA</i>	78
Wpływ czasu hydrolizy na spektrum oligosacharydowe maltodekstryn ziemniaczanych	
<i>Teresa WITCZAK, Anna STĘPIEŃ, Grzegorz POTASIEWICZ, Mariusz WITCZAK</i>	88
Charakterystyka termodynamiczna kleikowania skrobi ziemniaczanej w obecności mieszaniny hydrokoloidów nieskrobiowych: inuliny, pektyny i gumy guar.....	
<i>Szymon MANIA, Robert TYLINGO</i>	100
Metoda kapsułkowania z wykorzystaniem systemu współosiowego	
<i>Viera DUCKOVÁ, Miroslav KROČKO, Margita ČANIGOVÁ, Jana BEZEKOVÁ, Monika LAVOVÁ, Vladimíra KŇAZOVICKÁ, Anna KREBS-ARTIMOVÁ</i>	110
The evaluation of the enterococci ability to form biofilm and survive the process of sanitation <i>in vitro</i>	
<i>Małgorzata ZIARNO</i>	119
Biologiczne determinanty bezpieczeństwa żywności	
<i>Anna PLATTA</i>	127
Korzyści i zagrożenia wynikające ze spożywania suplementów diety przez wybraną grupę młodych, aktywnych zawodowo osób	
<i>Adam FLORKIEWICZ, Kinga TOPOLSKA, Agnieszka FILIPIAK-FLORKIEWICZ</i>	137
Próba oszacowania pobrania kadmu z diety przez populację osób w wieku produkcyjnym z terenu aglomeracji miejskiej	
<i>Fabian NOWAK, Joanna MICHAŁAK</i>	148
Pieczyno jako źródło potencjalnie szkodliwych związków reakcji Maillarda – ocena narażenia zdrowia ...	
<i>Magdalena ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK, Dorota PIASECKA-KWIATKOWSKA, Agata ZEMLEDUCH-BARYLSKA, Celina POPOWSKA, Sylwia KOLECKA, Paulina GÓRECKA</i>	158
Detekcja alergennych białek mleka w wybranych produktach spożywczych	
<i>Tomasz SZABLEWSKI, Kinga STUPER-SZABLEWSKA, Renata CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, Łukasz TOMCZYK</i>	170
Oznaczenie ergosterolu jako chemicznego wskaźnika zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi	
<i>Anna OSTROWSKA, Kinga STUPER-SZABLEWSKA, Anna MATYSIAK, Marian FILIPIAK, Juliusz PERKOWSKI</i>	175
Aktywność fungistatyczna preparatów białkowych pozyskanych z <i>Paenibacillus alvei</i> względem <i>Trichoderma spp.</i>	
<i>Anna OSTROWSKA, Kinga STUPER-SZABLEWSKA, Maciej BUŚKO, Marian FILIPIAK, Juliusz PERKOWSKI</i>	181
Biologiczna kontrola wzrostu grzybów z rodzaju <i>Trichoderma</i> jako patogenów bocznika ostrygowatego..	
<i>Ewa TRZETZELEWSKA-LALIK, Tadeusz TUSZYŃSKI, Czesław PUCHAŁSKI</i>	188
Czystość mikrobiologiczna powietrza w zakładzie ciastkarskim i jego wpływ na stabilność wyrobów kremowych	
<i>Iwona DROŹDŹ, Małgorzata MAKAREWICZ, Tadeusz TUSZYŃSKI, Katarzyna ŁĄCZ, Urszula BŁASZCZYK</i>	201
Monitoring jakości mikrobiologicznej produktów spożywczych dla dzieci	
<i>Anna SADOWSKA-ROCIK, Ewa CIEŚLIK</i>	215
Pestycydy nowej generacji - pozostałości w żywności, metody oznaczania i wyzwania analityczne	
<i>Agnieszka TAJNER-CZOPEK</i>	224
Akrylamid - potencjalnym zagrożeniem w przetworzonej żywności	
<i>Alicja ZACHARA</i>	233
Analiza zawartości WWA w wyrobach tradycyjnie wędzonych a wymagania prawne UE	

<i>Jozef GOLIAN, Lubomír BELEJ, Radoslav ŽIDEK, Jozef ČURLEJ</i> Quality and safety of meat and meat products in the Slovak Republic	242
<i>Vladimír VIETORIS, Hana BALKOVÁ</i> Application of marginal sensory methods	254
<i>Anna STĘPIEŃ, Teresa WITCZAK, Mariusz WITCZAK</i> Aktywności wody a bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności	264
<i>Joanna SOBOLEWSKA-ZIELIŃSKA, Lidia TYLEK, Małgorzata BĄCZKOWICZ, Teresa FORTUNA</i> Aktywność wody jako parametr trwałości wyrobów cukierniczych	273

DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA¹, MAŁGORZATA WRZOSEK¹,
BEATA BILSKA¹, KAROL KRAJEWSKI²

*¹Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności
Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Polskie Towarzystwo Technologów Żywności*
*²Katedra Ekonomii i Zarządzania
Collegium Mazovia Innowacyjna Szkoła Wyższa w Siedlcach
Polskie Towarzystwo Technologów Żywności*

RYZYKO POWSTAWANIA STRAT I MARNOTRAWSTWA ŻYWNOSCI A MOŻLIWOŚĆ ICH OGRANICZENIA

Streszczenie

Zgodnie z nomenklaturą przyjętą przez Grupę Roboczą ds. Racjonalnego Wykorzystania Żywności przy Federacji Polskich Banków Żywności straty to zmniejszenie masy jadalnej żywności wynikające z niegospodarności, błędów i nieprawidłowości w przebiegu procesów zachodzących podczas produkcji przetwórstwa, dystrybucji, handlu. Natomiast termin marnotrawstwo żywności odnosi się do nieracjonalnych procesów gospodarowania zachodzących w obszarze gastronomii i gospodarstw domowych.

Odpowiedzialność za marnotrawstwo żywności spoczywa na wszystkich podmiotach łańcucha żywnościowego, a zatem należy podejmować wspólne inicjatywy w celu jego ograniczenia.

W pracy przedstawiono przyczyny marnowania i strat żywności. W opracowanym według modelu Ishikawy diagramie, przedstawiono pięć determinantów warunkujących marnotrawstwo produktów spożywczych: maszyny, materiały, zarządzanie, metody, ludzie. Ponadto przeprowadzono analizę skutków strat żywności, które mogą zachodzić na takich etapach łańcucha żywnościowego, jak produkcja podstawowa, przetwórstwo, dystrybucja i handel.

Odpowiedzią na zdiagnozowane zjawiska jest nowatorski projekt o nazwie „Model ograniczania strat i marnowania żywności z korzyścią dla społeczeństwa” (akronim MOST), realizowany przez konsorcjum kierowane przez Polskie Towarzystwo Technologów Żywności. Celem projektu jest opracowanie praktycznej procedury współpracy, która określi zasady przekazywania żywności na cele społeczne.

Słowa kluczowe: straty i marnowanie żywności, przyczyny marnowania żywności, model MOST.

Istota problemu strat i marnotrawstwa żywności

Zgodnie z definicją FAO bezpieczeństwo żywnościowe to nieprzerwany, swobodny dostęp fizyczny i ekonomiczny do żywności, który pozwala na zaspokojenie potrzeb żywnościowych i gwarantuje prawidłowy rozwój oraz zachowanie sprawności fizycznej i intelektualnej ludzi. Przy jednoczesnym podkreśleniu aspektu bezpieczeństwa zdrowotnego żywności, rozumianej jako brak zanieczyszczeń biologicznych, chemicznych i fizycznych, które mogłyby zagrażać zdrowiu konsumentów [Gustavsson i in., 2011]. Jednym z wiodących problemów XXI wieku w ujęciu globalnym jest zróżnicowany poziom życia, a co za tym idzie brak środków finansowych na optymalny pod kątem ilościowym, jak i jakościowym zakup artykułów żywnościowych. W krajach rozwiniętych dominuje model nadkonsumpcji, zaś w krajach rozwijających się ludność zmaga się z problemem niedożywienia i głodu. Najbardziej optymalnym rozwiązaniem jest utrzymanie równowagi pomiędzy popytem a podażą żywności, ponieważ możliwe w każdą ze stron odchylenia prowadzą do niepożądanych zjawisk. Nadmiar żywności znajdującej się w obrocie prowadzi do marnowania produktów i surowców spożywczych, które mogłyby być wykorzystane na cele konsumpcyjne.

Ze względu na złożoność łańcucha żywnościowego - jego wieloetapowość, skomplikowaną strukturę organizacyjną, proces zarządzania racjonalnym przepływem i zagospodarowaniem żywności jest dużym wyzwaniem. Efektem zachodzących błędów, wzrostu masy towarów znajdującej się w obrocie oraz wydłużania się kanałów dystrybucyjno – logistycznych jest coraz większa skala strat i marnotrawstwa żywności na świecie. Zjawisko to dotyczy wszystkich etapów łańcucha żywnościowego „od pola do stołu” poczynając od produkcji pierwotnej, przetwórstwa, handlu, gastronomii, dystrybucji, kończąc na gospodarstwach domowych. Szacowana przez EUROSTAT procentowa struktura źródeł odpadów żywnościowych produkowanych w 27 krajach Unii Europejskiej przedstawia się następująco [Preparatory Study..., 2010]:

- gospodarstwa domowe – 42%
- produkcja – 39%
- usługi żywieniowe – 14%
- sprzedaż detaliczna i hurtowa – 5%.

W międzynarodowej literaturze funkcjonują różne terminy i definicje dotyczące nieracjonalnego gospodarowania żywnością [Gustavsson i in., 2011; Griffin i in., 2009; Hodges i in., 2011; Schneider, 2013]. Według FAO straty żywności odnieść można do zmniejszenia ogólnej masy jadalnych części żywności, których pierwotne przeznaczenie związane było z konsumpcją przez ludzi. Ujmuje ona ilość żywności, która początkowo była wyprodukowana na cele konsumpcyjne, jednak ostatecznie uległa naturalnym ubytkom masy (np. wysychanie), zepsuciu lub została wykorzystana w innym celu (np. do produkcji biopaliwa, kompostu, pasz itd.). Do strat nie wlicza się natomiast

części niejadalnych (np. kości, łupiny itd.) oraz surowców i produktów pierwotnie wytworzonych na cele niekonsumpcyjne (pasza, biokomponenty, bioenergia, surowce opakowalnicze itd.) [Gustavsson i in., 2011]. Zgodnie z nomenklaturą przyjętą przez Grupę Roboczą ds. Racjonalnego Wykorzystania Żywności przy Federacji Polskich Banków Żywności straty to zmniejszenie masy jadalnej żywności wynikające z niegospodarności, błędów i nieprawidłowości w przebiegu procesów np. w produkcji rolniczej, podczas zbiorów, w przetwórstwie, transporcie czy handlu. Natomiast termin marnotrawstwo żywności odnosi się do nieracjonalnych procesów gospodarowania zachodzących w obszarze gastronomii i gospodarstw domowych [Wrzosek i in., 2012].

Odpowiedzialność za marnotrawstwo żywności spoczywa na wszystkich podmiotach łańcucha żywnościowego, a zatem należy podejmować wspólne inicjatywy w celu jego ograniczenia. Posiadając odpowiednią wiedzę na temat mechanizmów powstawania strat można opracować odpowiednie działania pozwalające na ich zminimalizowanie. Dokumenty unijne nawołują państwa członkowskie do ograniczenia powstawania odpadów żywnościowych, na wszystkich etapach łańcucha żywnościowego. Działania te wpisują się w założenia związane ze strategią „Europa 2020”. Komisja Europejska w komunikacie dotyczącym efektywnego korzystania z zasobów, jeden ustęp poświęciła problemowi produktów żywnościowych i konieczności zmniejszenia ich marnotrawstwa. Ponadto Parlament Europejski 19 stycznia 2012 r. przyjął rezolucję w sprawie strategii zmierzającej do większej wydajności łańcucha żywności. Zwrócił się w niej do Komisji Europejskiej o przyjęcie konkretnych środków zmierzających do zmniejszenia o 50% marnotrawstwa żywności do 2025 r. [NAT/570, 2013].

Jak podaje raport Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa rocznie na świecie marnuje się około 1/3 ogółu produkowanej żywności. Wyrażając dane w ujęciu masowym poziom strat to ok. 1,3 miliarda ton żywności, która mogła być wykorzystana na cele konsumpcyjne. Dla porównania w samej Europie marnuje się ok. 89 mln ton żywności, odpowiadającej 20-30% ogólnej masy zakupionych produktów spożywczych, z czego prawie 67% nadawałaby się do konsumpcji.

W przeliczeniu na jednego mieszkańca, w Europie wyrzuca się średnio około 179 kg żywności rocznie. Natomiast na obszarze Afryki subsaharyjskiej lub południowo-wschodniej Azji straty wynoszą zaledwie od 6 do 11 kg na osobę na rok [Gustavsson i in., 2011]. W ujęciu dla poszczególnych krajów europejskich za największą masę marnowanej żywności odpowiedzialni są kolejno: Holendrzy (579 kg/os/rok), Belgowie (399 kg/os/rok) oraz Cypryjczycy (334 kg/os/rok), natomiast wśród krajów marnujących najmniej wyróżnia się: Grecję (44 kg/os/rok), Maltę (62 kg/os/rok) i Czechy (71 kg/os/rok) [Buchner i in., 2012]. Szacuje się, że w Polsce marnuje się ok. 235 kg/os/rok.

W strukturze marnowanych produktów żywnościowych na świecie, dominują: warzywa oraz owoce (27%), następnie napoje (17%), pieczywo (11%), dania gotowe (10%), nabiał (10%) i mięso (7%) [Which types..., 2012]. Z badań przeprowadzonych przez MillwardBrown SMG/KRC, wynika, że w polskich gospodarstwach domowych marnuje się aż 50% ogółu kupowanego pieczywa, 33% warzyw, 33% wędlin, 29% ziemniaków. Następnie największy udział strat dotyczy owoców (26%), jogurtów (14%), dań głównych (12%) i serów (11%). Produktami odznaczającymi się najniższym poziomem w udziale w stratach gospodarstw domowych są jaja (1%) i ryby (1%). Warto jednak zaznaczyć, że zgodnie z danymi opublikowanymi przez Federację Polskich Banków Żywności do marnotrawstwa przyznaje się około 24% konsumentów [Marnowanie żywności..., 2012].

Problem zmarnowanej żywności, dotyczy nie tylko skali zjawiska i aspektów etycznych, ale również późniejszego postępowania z odpadami. Należy pamiętać, że wzrost ogólnej masy wyrzucanej żywności, warunkuje konieczność zagospodarowania większej ilości odpadów organicznych i nieorganicznych (opakowania). Konsekwencją produkcji odpadów jest nasilenie emitowanego do środowiska metanu. Jak podają dane literaturowe za powstawanie około 1/5 gazów cieplarnianych odpowiedzialne są ogniwa przetwórstwa i dystrybucji żywności. Innym aspektem środowiskowym jest zużywanie dużej ilości wody i energii. Szacuje się, że na wyprodukowanie 1 kg wołowiny przypada ok. 5-10 tys. litrów wody [Food Statistics Pocketbook, 2012].

Ponadto zagospodarowanie nieracjonalnej ilości odpadów generuje dodatkowe koszty związane z wywozem na wysypisko, opłatami, podejmowaniem działań prewencyjnych, czy utylizacją. Należy zwrócić uwagę na ponoszone nakłady finansowe wynikające z nakładu pracy ludzkiej, zakupu surowców, eksploatacji maszyn, utrzymywania systemów gwarantujących bezpieczeństwo zdrowotne, czy też zużycie zasobów naturalnych. Szacuje się, że produktami charakteryzującymi się największym zużyciem zasobów naturalnych i potencjalnie możliwie największym negatywnym wpływem na środowisko naturalne jest wołowina oraz produkty mleczarskie [Tukker i Jansen, 2006].

Przyczyny marnowania i strat żywności

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe aspekty należałoby się zastanowić w jaki sposób minimalizować marnotrawstwo żywności. Na rys. 1 przedstawiono przyczyny marnowania i strat żywności. W opracowanym według modelu Ishikawy diagramie, przyjęto pięć determinant warunkujących marnotrawstwo produktów spożywczych (maszyny, materiały, zarządzanie, metody, ludzie).

Każde przedsiębiorstwo musi dysponować odpowiednimi zasobami rzeczowymi, w tym wyposażeniem, właściwym do wykonywanych procesów, aby móc sprawnie

funkcjonować. Niezwykle istotny jest stan techniczny maszyn, który powinien być regularnie kontrolowany. Wszelkie awarie urządzeń wiążą się ze stratami surowców, półproduktów czy wyrobu gotowego, a można im zapobiegać poprzez systematycznie prowadzony przegląd i konserwację, które to działania powinny być częścią każdego systemu zarządzania przedsiębiorstwem.

Ważną rolę w produkcji żywności stanowi dostęp do odpowiedniej ilości surowców o właściwej jakości. Ryzyko powstawania strat żywności związane jest na przykład z podjęciem współpracy z nieodpowiednimi dostawcami. Jakość produktu finalnego warunkowana jest przez wiele czynników, m.in. przez jakość surowców podstawowych, pomocniczych, opakowań. Norma ISO 9004 [2010] zaleca, aby każde przedsiębiorstwo ustanowiło i utrzymywało procesy identyfikowania, wyboru i oceny swoich dostawców, w celu ciągłego doskonalenia ich zdolności do zapewnienia, że wyroby lub surowce, które dostarczają, spełniają potrzeby i oczekiwania organizacji. Każdy zakład powinien posiadać specyfikację jakościową dla przyjmowanych surowców, zawierającą informacje dotyczące wymaganych cech. Przy ocenie dostawców można korzystać z audytów i bazować na ich wynikach. Błąd dostawcy (np. nieterminowa dostawa surowców) może wiązać się z wystąpieniem sytuacji kryzysowych w przedsiębiorstwie.

Polskie przedsiębiorstwa branży żywnościowej są zobowiązane przez odpowiednie akty prawne do wdrożenia obowiązkowych systemów zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Dodatkowo mogą wdrażać inne systemy, jak np. ISO 9001, ISO 22000. O ich prawidłowym funkcjonowaniu i osiągnięciu korzyści przez organizację, można mówić wtedy, gdy są one w sposób ciągły doskonalone. Ważnym aspektem jest zaangażowanie kierownictwa, wyrażane m. in. przez opracowanie i wdrożenie polityki jakości, określenie odpowiednich mierzalnych celów dla całej organizacji, przeprowadzenie regularnych przeglądów zarządzania, zapewnienie odpowiednich zasobów. Po opracowaniu polityki jakości należy ją zakomunikować wszystkim pracownikom. Właściwe funkcjonowanie organizacji wymaga, aby były ustalone zasady odpowiedzialności za poszczególne procesy oraz przydzielone odpowiednie uprawnienia i zasoby do właściwego realizowania zadań. Poruszając aspekt strat i marnowania żywności należy zwrócić uwagę na zarządzanie produktem. Do czynników warunkujących potencjalne powstawanie strat można zaliczyć: przeszacowanie wielkości produkcji i zamówień, zwłaszcza w szczytach sprzedaży przypadających na np. okres świąt, długich weekendów, wadliwe stosowanie zasady FIFO (ang. first in – first out), stosowanie strategii „pełnej półki”.

Wszystkie przedsiębiorstwa działające na rynku spożywczym są zobowiązane do przestrzegania wymagań higienicznych, dotyczących m.in. higieny personelu, kontroli mycia i dezynfekcji, zabezpieczenia przed szkodnikami, usuwania odpadów i ścieków.

Stosowanie odpowiednich technik, metod i procedur w procesach produkcyjnych zapewnia bezpieczeństwo produkowanej żywności. Natomiast brak przestrzegania zasad higieny produkcji może skutkować otrzymaniem produktu niezgodnego z wymaganiami, który musi zostać poddany utylizacji, a zatem zmarnotrawiony.

W każdym przedsiębiorstwie kluczową rolę odgrywa człowiek. Dlatego tak istotne jest, aby na każdym etapie łańcucha żywnościowego personel był świadomy, że każde jego niewłaściwe działanie skutkuje błędami, które w konsekwencji mogą prowadzić do strat żywności. W doskonaleniu umiejętności pracowniczych istotną rolę pełnią szkolenia pracownicze, które pozwalają minimalizować ryzyko popełniania błędów. Szkolenia powinny być przeprowadzane okresowo w celu aktualizacji i ugruntowania wiedzy. Natomiast przeprowadzanie oceny szkoleń powinno być integralną częścią doskonalenia kadr. Pozwala ono sprawdzić jakość szkoleń, efektywność oraz ułatwia stwierdzenie osiągnięcia postawionych celów [Trafiałek i Pawłowska, 2013].

Jakość kadry pracowniczej ma bardzo duże znaczenie w procesie planowania i prowadzenia działalności. Od wysoko wykwalifikowanych pracowników o znacznych umiejętnościach zawodowych można oczekiwać, że będą mogli wykonywać samodzielnie trudne zadania oraz będą wykazywać się kreatywnością. Poziom wiedzy i kwalifikacje pracowników powinny być odpowiednie do charakteru wykonywanych przez nich czynności.

Analizę skutków strat żywności, które mogą zachodzić na poszczególnych etapach łańcucha żywnościowego przedstawiono w tabeli 1. Działaniami eliminującymi żywność z dalszego obrotu i konsumpcji jest m.in. przekroczenie dopuszczalnych limitów lub terminu przydatności do spożycia, błędy podczas przetwórstwa, przerwanie łańcucha chłodniczego, czy też uszkodzenie opakowań jednostkowych. Wśród procesów, które mogą skutkować poniesieniem strat, ale nie powodują zagrożeń związanych z bezpieczeństwem zdrowotnym, można wymienić: restrykcyjne wymogi dotyczące kształtu, barwy, wielkości surowców, bliski termin przydatności do spożycia, uszkodzenia mechaniczne opakowań zbiorczych.

Na podstawie analizy określono możliwości zapobiegania stratom żywności na każdym z czterech ogniw, przez przekazanie do organizacji pożytku publicznego. Jednym z kluczowym obszarów w odpowiedzialnym zarządzaniu produktami w kontekście ograniczania ich strat jest niedopuszczanie do przekroczenia terminu przydatności do spożycia, co pozwoli na wykorzystanie ich na cele konsumpcyjne. Żywność, która zostaje wykorzystana na cele społeczne może charakteryzować się krótkim terminem przydatności do spożycia, niejednokrotnie 2 lub 3 dniowym.

Działania organizacji charytatywnych muszą być wspierane odpowiednimi aktami prawnymi, które gwarantują, że przedsiębiorcy nie będą ponosić dodatkowych

kosztów związanych z przekazywanymi darowiznami. Takim aktem prawnym znoszącym istotną barierę jest nowelizacja Ustawy o podatku od towarów i usług (Ustawa z dnia 26 lipca 2013 r. o zmianie ustawy o podatku od towarów i usług oraz niektórych innych ustaw, Dz.U. z 2013 r. poz. 1027), która weszła w życie 1 października 2013 roku i zniósła z organizacji handlu i dystrybucji konieczność odprowadzania podatku VAT od darowizn żywnościowych.

Idea modelu MOST

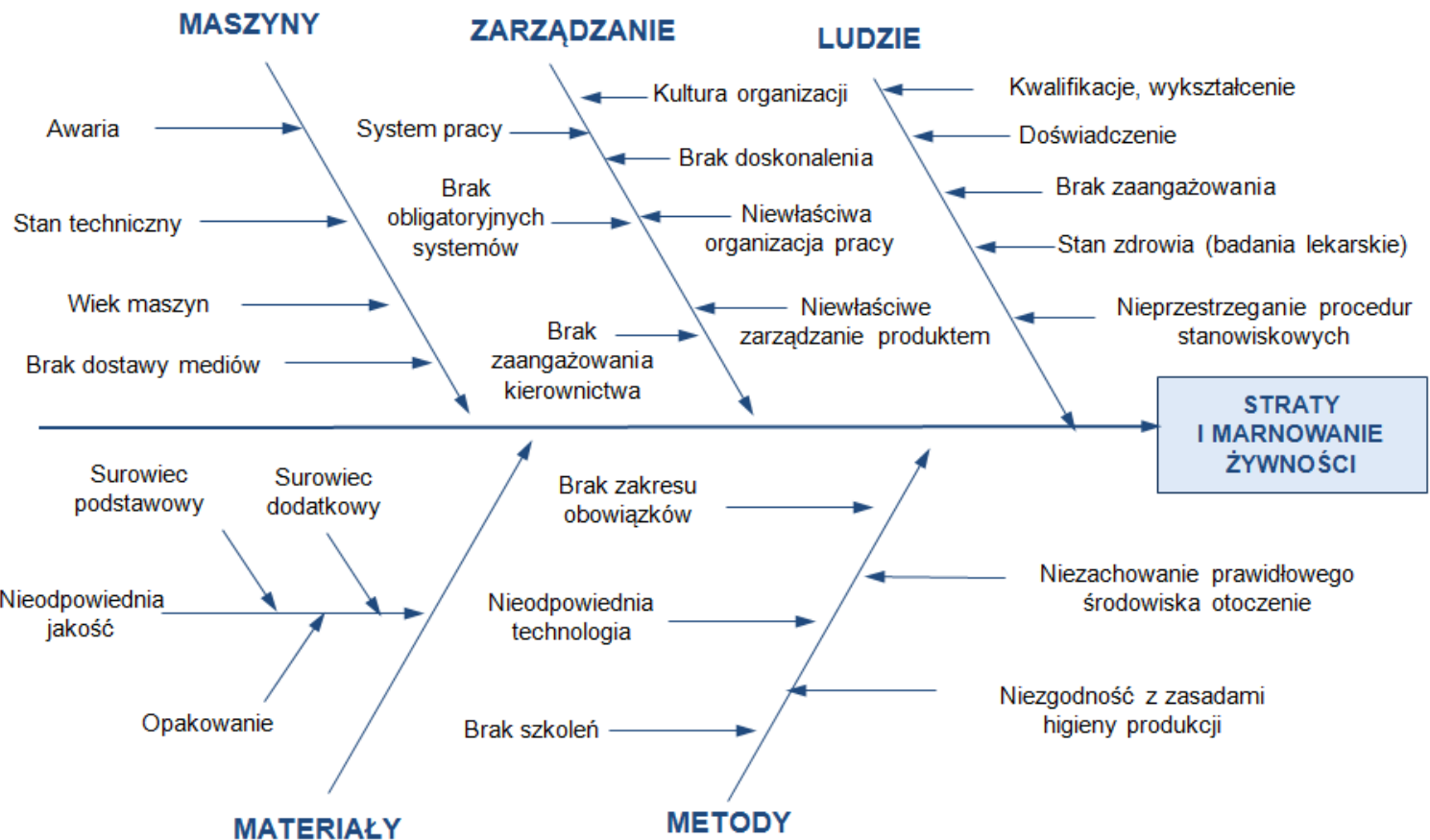
Jednym z narzędzi, które mogłyby pomóc i doprowadzić do ograniczenia marnotrawstwa żywności, jest wspieranie działań przedsiębiorstw przez opracowanie procedur pozwalających na racjonalne wykorzystanie żywności na cele społecznie użyteczne, w ramach obowiązujących zasad prawnych dotyczących zachowania bezpieczeństwa zdrowotnego żywności.

Z dostępnej literatury przedmiotu wynika, że w Polsce jak dotąd nie były zrealizowane kompleksowe badania z zakresu problematyki strat żywności ponoszonych na poszczególnych etapach łańcucha żywnościowego.

Odpowiedzią na zdiagnozowane zjawiska jest nowatorski projekt o nazwie „Model ograniczania strat i marnowania żywności z korzyścią dla społeczeństwa” (akronim MOST), realizowany i finansowany w ramach I konkursu Innowacje Społeczne Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt został zgłoszony przez konsorcjum pod kierownictwem Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności.

Celem podstawowym projektu jest wskazanie przyczyn strat żywności i punktów krytycznych, w których one zachodzą oraz opracowanie praktycznej procedury współpracy, która określi zasady przekazywania żywności na cele społeczne. Model będzie oparty na istniejących w zakładach metodach i systemach zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności, czyli na obligatoryjnych programach GHP, GMP oraz systemie HACCP. Elementem modelu będzie również dokumentacja pozwalająca na identyfikowalność surowców, półproduktów i wyrobów gotowych. Dzięki takiemu rozwiązaniu aplikacja procedur w zakładach nie będzie wymagała ponoszenia nadzwyczajnych kosztów ani przebudowy struktury organizacyjnej, natomiast bezpośrednie powiązanie z Federacją Polskich Banków Żywności umożliwi podejmowanie szybkich działań ograniczających straty i marnowanie żywności. Dotychczas podobnego rozwiązanie w skali naszego kraju jeszcze nie ma [Kołozyn-Krajewska i in., 2014].

Opracowywane rozwiązanie będzie miało charakter innowacyjny, ułatwiające racjonalne gospodarowanie produktami żywnościowymi na poziomie przedsiębiorstw, a także ich efektywną dystrybucję przez organizację pozarządową do osób potrzebujących.



Rysunek 1. Przyczyny marnowania i strat żywności

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 1. Analiza skutków strat żywności oraz możliwości ich ograniczenia na czterech etapach łańcucha żywnościowego

ETAP	PRZYCZYNY STRAT	SKUTEK	MOŻLIWOŚCI OGRANICZENIA
PRODUKCJA PODSTAWOWA	nieodpowiednie warunki produkcji i/lub magazynowania	surowce nie nadają się do wykorzystania	poprawa warunków produkcji i/lub magazynowania
	surowce odrzucone ze względu na niepożądane parametry	warunkowa możliwość wykorzystania surowców	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
		brak możliwości wykorzystania surowców - utylizacja	poprawa warunków produkcji
	ubytki naturalne	zmniejszenie masy surowców	poprawa warunków magazynowania
	nadprodukcja	surowce nadają się do wykorzystania	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
	kłęski żywiołowe	surowce nie nadają się do wykorzystania	-
	załamanie się rynku zbytu	surowce nadają się do wykorzystania	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
PRZETWÓRSTWO	błędy w czasie procesu produkcyjnego	produkty nie nadają się do sprzedaży i konsumpcji - utylizacja (np. niezapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego)	zapobieganie błędom
		produkty nie nadają się do sprzedaży, ale mogą zostać skonsumowane (np. błędy na etykiecie, niewłaściwa masa produktu)	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
	nadprodukcja załamanie się rynku zbytu	produkty nadają się do konsumpcji (niedopuszczenie do przekroczenia terminu przydatności do spożycia)	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
		produkty nie nadają się do konsumpcji (przekroczenie terminu przydatności do spożycia) - utylizacja	zapobieganie przekroczeniu terminu przydatności do spożycia
	przyjęcie surowców o niewłaściwej jakości	utylizacja	poprawa procedury przyjęcia surowców
	straty wynikające z niedoskonałości procesów produkcji	niższa wydajność procesów	poprawa procesów produkcyjnych
	awarie urządzeń i/lub przerwy w dostawie mediów	straty surowców, półproduktów, produktów	zapobieganie

LOGISTYKA	uszkodzenie mechaniczne opakowań zbiorczych i/lub jednostkowych	produkty nie nadają się do sprzedaży, mogą zostać skonsumowane	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
		produkty nie nadają się do sprzedaży i konsumpcji - utylizacja	zapobieganie uszkodzeniom
	przerwanie łańcucha chłodniczego (nieodpowiednie warunki przechowywania i rozładunku)	produkty nie nadają się do sprzedaży	poprawa organizacji łańcucha chłodniczego
	awaria środka transportu, chłodni	produkty nie nadają się do sprzedaży	zapasowe urządzenia, środek transportu
		produkty nadają się do konsumpcji	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
	przeszacowanie zamówień	produkty nie nadają się do sprzedaży (przekroczenie terminu przydatności do spożycia) - utylizacja	poprawa zarządzania zamówieniami
produkty nadają się do konsumpcji (bliski termin przydatności do spożycia)		przekazanie do organizacji pożytku publicznego	
HANDEL	uszkodzenie mechaniczne opakowań zbiorczych i/lub jednostkowych	produkty nie nadają się do sprzedaży, mogą zostać skonsumowane	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
		produkty nie nadają się do sprzedaży i konsumpcji - utylizacja	zapobieganie uszkodzeniom
	niewłaściwe prognozowanie popytu nieprawidłowe strategie marketingowe	produkty nie nadają się do sprzedaży (przekroczenie terminu przydatności do spożycia) - utylizacja	poprawa zarządzania zamówieniami, właściwe stosowanie zasady FIFO
		produkty nadają się do konsumpcji (bliski termin przydatności do spożycia)	przekazanie do organizacji pożytku publicznego
przerwanie łańcucha chłodniczego (nieprawidłowe warunki przechowywania)	produkty nie nadają się do sprzedaży i konsumpcji - utylizacja	monitoring działania urządzeń chłodniczych, zapasowe urządzenia	

Źródło: Opracowanie własne

Literatura

1. Buchner B., Fishler C., Gustafson E., Reily J., Riccardi G., Ricordi C., Veronesi U. Food waste: causes, impacts and proposals. Barilla Center for food and nutrition. 2012.
2. Food Statistics Pocketbook 2012. [online] DEFRA. Dostęp w internecie: [10.05.2014]
<http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20130123162956/http://www.defra.gov.uk/statistics/files/defra-stats-foodfarm-food-pocketbook-2012-130104.pdf>
3. Gustavsson J., Cederberg C., Sonesson U., Van Otterdijk R., Meybeck A. Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention. FAO, Rome, Italy 2011.
4. Griffin M., Sobal J., Lyson T.A. An analysis of a community food waste stream. Agriculture and Human Values, 2009, 26, 67-81.
5. Hodges R.J., Buzby J.C., Benenett B. Postharvest losses and waste in developed and less developed countries: opportunities to improve resource use. Journal of agricultural Science, 2011, 149, 37-45.
6. Kołożyn-Krajewska D., Wrzosek M., Bilaska B., Krajewski K. Model Ograniczenia strat i marnowania żywności z korzyścią dla społeczeństwa. [W:] Jakość żywności a żywienie w turystyce. Red. D. Kołożyn-Krajewska, Częstochowa 2014.
7. Marnowanie żywności w Polsce i Europie. Raport Federacji Polskich Banków Żywności, Warszawa, 2012. [online] FPBŻ Dostęp w internecie: [05.05.2014]
http://www.lubelskie.pl/img/userfiles/files/PDF/organizacje_pozarzadowe/SDZ_20_12_10_16_RAPORT.pdf.
8. NAT/570 Zapobieganie marnotrawstwu żywności i ograniczanie go, Europejski Komitet Ekonomiczno-Społeczny w sprawie wkładu społeczeństwa obywatelskiego w strategię na zapobiegania stratom i marnotrawstwu żywności i na rzecz ich ograniczenia (opinia z inicjatywy własnej). Wyd. Europejski Komitet Ekonomiczno-Społeczny, Bruksela 2013.
9. PN:EN ISO 9004:2010 Zarządzanie ukierunkowane na trwały sukces organizacji. Podejście wykorzystujące zarządzanie jakością.
10. Preparatory Study On Food Waste Across Eu 27. Technical Report, October 2010. [online] European Communities. Dostęp w internecie: [05.05.2014].
http://ec.europa.eu/environment/eussd/pdf/bio_foodwaste_report.pdf.
11. Schneider F. Review of food waste prevention on an international level. Waste and Resource Management, 2013, 166, 187-203.
12. Tukker A., Jansen, B. Environmental impact of products: a detailed review of studies. Journal of Industrial Ecology, 2006, 10(3), 159-182.

13. Trafiałek J., Pawłowska J. Analiza efektów szkolenia pracowników firmy cateringowej z wdrożonym systemem zarządzania bezpieczeństwem żywności, zgodnym z normą ISO serii 22000. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2013, 1 (86), 217-229.
14. Ustawa z dnia 26 lipca 2013 r. o zmianie ustawy o podatku od towarów i usług oraz niektórych innych ustaw. Dz.U. z 2013 r. poz. 1027.
15. Which types of food are wasted the most. 2012. [online] Dostęp w internecie: [05.05.2014] <http://england.lovefoodhatewaste.com/node/3420>
16. Wrzosek M. Kołożyn-Krajewska D., Krajewski K. Nieracjonalne wykorzystanie żywności – perspektywa globalna i odpowiedzialności społecznej. *Prace Studentów i Młodych Pracowników Nauki. Teoria i praktyka zarządzania przedsiębiorstwem. Wybrane zagadnienia*, 2012, 4, 59-72.

Publikacja przygotowana w ramach Umowy z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju Nr/IS-1/031/NCBR/2014 o wykonanie i finansowanie projektu realizowanego w ramach program "Innowacje Społeczne" pt. "Model ograniczania strat i marnowania żywności z korzyścią dla społeczeństwa" (akronim MOST).

JOANNA BERŁOWSKA¹, MARIA BALCEREK²
KATARZYNA PIELECH-PRZYBYLSKA², PIOTR PATELSKI², HALINA KALINOWSKA³,
PIOTR DZIUGAN¹, PAULINA PRZYBYLAK²

¹*Zakład Technologii Fermentacji /Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności/Politechnika Łódzka*

²*Zakład Technologii Spirytusu i Drożdży /Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności/Politechnika Łódzka*

³*Instytut Biochemii Technicznej/Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności/Politechnika Łódzka*

DOBÓR DROŹDŹY DO FERMENTACJI HYDROLIZATÓW Z WYSŁODKÓW BURAKA CUKROWEGO

Wstęp

Obecna sytuacja przemysłu paliwowego, w obliczu wyczerpujących się naturalnych zasobów energii, zmusza do poszukiwania alternatywnych, odnawialnych źródeł energii. Ławo dostępna i obficie występująca biomasa jest idealnym surowcem dla biopaliw. Polska, to kraj posiadający wysoko rozwinięty sektor rolniczy, z dużym potencjałem rozwoju w kwestii wykorzystania biomasy na cele paliwowe.

Wyniki wielu badań potwierdzają przydatność buraków cukrowych oraz produktów ich przetwórstwa do otrzymywania bioetanolu. Poddając fermentacji alkoholowej produkty pośrednie otrzymywane w technologii produkcji cukru, tj.: sok surowy i gęsty, otrzymano wysoką wydajność alkoholu w granicach od 78 do 94% [Balcerek i Pielech-Przybylska, 2008; Pielech-Przybylska i Balcerek, 2008; Pavlečić i in., 2010; Balcerek i in., 2011; Dziugan i in., 2013].

Za wykorzystaniem buraka cukrowego na cele biopaliwowe przemawia krótki czas jego konwersji oraz dobry stopień rozkładu, wynikający z jego składu (ok. 70% masy organicznej to sacharoza). Burak cukrowy, którego uprawy mogą być przeznaczone na otrzymywanie bioetanolu, jest szansą na niezależność energetyczną naszego kraju, a także na poprawę sytuacji polskich gorzelni oraz cukrowni, które mogłyby ze sobą współpracować [Leja i in., 2009].

Cukrownictwo buraczane oprócz cukru, który jest głównym i podstawowym produktem, wytwarza również produkty uboczne jakimi są: wysłodki, melasa buraczana oraz osad saturacyjny. Podstawowym zastosowaniem wysłódków jest ich wykorzystanie jako wysokoenergetycznej paszy dla zwierząt hodowlanych, w formie kiszzonek, wysłódków wyżętych czy też suszu [Wolak i Złocińska, 2012]. Wysłodki buraczane są wartościową biomasą, głównie ze względu na zawartość składników węglowodanowych (celuloza i hemiceluloza).

Możliwe jest również skojarzenie biosyntezy etanolu z produkcją białka paszowego. Dzięki dużej zawartości celulozy w wysłódkach, mogą one stanowić

odnawialne źródło tego składnika węglowodanowego. Wykazano, że zawarta w wysłódkach celuloza wykazuje lepsze właściwości fizykochemiczne, niż celuloza roślinna z innych surowców.

Najczęściej używane do fermentacji alkoholowej szczepy drożdży z gatunku *Sacharomyces cerevisiae* nie są w stanie fermentować pentoz obecnych w lignocelulozowej biomase [Kumari i Pramanik, 2012]. Potrzebne są organizmy mogące zwiększyć szansę otrzymania etanolu z tych surowców. Zasadne są badania mające na celu skonstruowanie nowych szczepów drożdży, charakteryzujących się wysoką wydajnością syntezy etanolu z biomasy zawierającej lignocelulozę jako główny składnik. Prowadzone badania polegają na ulepszaniu dotychczas wykorzystywanych i dobrze poznanych szczepów (*Sacharomyces cerevisiae*), poprzez wprowadzenie do nich genów metabolizmu ksylozy i arabinozy, pochodzących z innych organizmów. Prace badawcze koncentrują się również na gatunkach drożdży niewykorzystywanych do tej pory do produkcji bioetanolu, a wykazujących uzdolnienia do fermentacji ksylozy: *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Hansenula polymorpha* [Sybirny i in., 2007]. Mimo dobrych zdolności fermentowania pentoz, ich wykorzystanie do produkcji etanolu z ksylozy jest ograniczone ze względu na powolną fermentację, konieczność regulacji stężenia tlenu, wrażliwości na inhibitory, a także niską tolerancją na etanol [Kuhad i in., 2011]. Ponadto, drożdże fermentujące pentozy wymagają obecności tlenu, aby efektywnie wykorzystały ksylozę. Zwiększenie poziomu napowietrzenia wpływa pozytywnie na oddychanie drożdży, jednak prowadzi również do utleniania etanolu. W efekcie otrzymuje się niską wydajność etanolu. W związku z tym, już od kilku lat, badania koncentrują się na uzyskaniu szczepów hybrydowych poprzez fuzję protoplastów *S. cerevisiae* i szczepów potencjalnie fermentujących pentozy [Byron i in., 2007].

Cel i zakres badań

Celem badań było porównanie dynamiki i wskaźników fermentacji etanolowej brzeczek hydrolizatów z wysłódków buraczanych, z udziałem trzech gatunków drożdży: *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* i *Pachysolen tannophilus*.

Zakres prowadzonych prac laboratoryjnych obejmował:

- analizę chemiczną surowców,
- przygotowanie brzeczek fermentacyjnych,
- dobór drożdży i wielkości inokulum,
- kontrolę dynamiki fermentacji,
- analizę brzeczek odfermentowanych,
- ocenę wskaźników procesu, tj. wykorzystania cukrów i wydajności fermentacji.

Surowce i materiały

Badania prowadzono z użyciem hydrolizatów wysłodków buraczanych świeżych, suszonych niemelasowanych i melasowanych. Wysłodki pochodziły z cukrowni Dobrzelin (Krajowa Spółka Cukrowa S.A.). Do fermentacji wykorzystywano suszone drożdże gorzelnicze Ethanol Red (Fermentis – Lesaffre, Francja) oraz drożdże fermentujące pentozy - *Pichia stipitis* oraz *Pachysolen tannophilus*, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ.

Hydrolizaty wysłodków buraka cukrowego otrzymywano, poddając hydrolizie (24 h) mieszaninę wysłodków z wodą (1 l wody na 0,5 kg wysłodków mokrych), w temperaturze 50°C, preparatami enzymatycznymi firmy Novozymes (Dania): Viscozyme (pH 3,3-5,5; temp. 25-55°C) oraz Ultraflo Max (pH 4,0-6,5; temp. 45-70°C), w proporcji 1:1 (v/v) [Brewing Handbook, 2013; Rosnah, Chan, 2014].

Brzeczki fermentacyjne suplementowano pożywką mineralną $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, w ilości 0,2 g/l brzeczki i szczepiono drożdżami w ilości od 0,5 do 1,5 g s.s./l., w postaci monokultury *S. cerevisiae* lub kultury mieszanej. Fermentacje prowadzono w temperaturze 28-30°C, w ciągu 72 h.

Metody badań

Analizy chemiczne hydrolizatów wysłodków buraczanych (obejmujące pomiar pozornej zawartości suchej substancji za pomocą areometru wyskalowanego w °Brix, pH, cukrów, azotu ogółem) wykonane zostały metodami zalecanymi w przemyśle cukrowniczym [Polska Norma PN-76/R-64772].

Zasada oznaczenia azotu ogółem polega na przeprowadzeniu organicznych substancji azotowych w sole amonowe i oddestylowaniu amoniaku do mianowanego roztworu kwasu HCl. Zawartość azotu wyrażono w %.

Brzeczki odfermentowane analizowano metodami przyjętymi w przemyśle gorzelniczym [Jarosz i in., 1955]. Oznaczano w nich: odfermentowanie pozorne (ekstrakt pozorny), odfermentowanie rzeczywiste (ekstrakt rzeczywisty), zawartość etanolu oraz stężenie cukrów nieodfermentowanych.

Po zakończeniu fermentacji, brzeczki poddano destylacji w celu całkowitego wydzielenia alkoholu, z wykorzystaniem aparatu do szybkiej destylacji (GIBERTINI, Włochy).

Oznaczanie zawartości cukrów ogółem w hydrolizatach oraz brzeczkach odfermentowanych, wykonywano metodą Schoorla–Regenboga, w roztworze poddanym odbiałczeniu i inwersji (z uwagi na obecność sacharozy). Brzeczki odfermentowane poddawano ocenie na zawartość cukrów ogółem i glukozy po wcześniejszym oddestylowaniu etanolu.

Stężenia glukozy oznaczano wykorzystując testy enzymatyczne firmy BioMaxima (Lublin, Polska). Zasada metody polega na utlenieniu glukozy zawartej w próbce, pod wpływem oksydazy glukozy (GOD), do kwasu glukonowego i nadtlenu wodoru. W obecności peroksydazy nadtlenek wodoru reaguje z fenolem i 4-aminoantypiryną, dając barwny związek. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia glukozy w próbce. Po przygotowaniu roztworów wzorcowych i właściwych (rozcieńczonych 100-krotnie), odczytano absorbancję prób wobec próby odczynnikowej, przy długości fali 500 nm za pomocą spektrofotometru LABOMED (USA).

Wskaźniki fermentacji

Wykorzystanie cukrów, czyli stopień odfermentowania obliczano jako stosunek ilości cukrów ogółem zużytych podczas fermentacji do ich zawartości w brzeczce przed fermentacją:

$$\% \text{ odf} = \frac{SR_0 - SR_K}{SR_0} \cdot 100$$

SR_0 – zawartość cukrów przed fermentacją

SR_K – zawartość cukrów po fermentacji

Wydajność syntezy alkoholu etylowego podano w procentach wydajności teoretycznej. Teoretyczną ilość powstającego alkoholu wyliczono z zawartości cukrów przed fermentacją, w oparciu o równanie stechiometryczne fermentacji. Wartość ta posłużyła do obliczenia wydajności praktycznej, tj. stosunku rzeczywistej ilości alkoholu wydzielonego z brzeczki odfermentowanej do ilości teoretycznej.

Wyniki badań i ich omówienie

Charakterystyka chemiczna przerabianych surowców

Hydrolizaty z wysłodków świeżych oraz niemelasowanych, odznaczały się zbliżoną zawartością suchej substancji (8,1-8,2°Bx), natomiast w hydrolizacie z wysłodków melasowanych zawartość ekstraktu była wyższa i wynosiła 10°Bx. Stężenie cukrów ogółem kształtowało się w granicach od 4,31 g inwertu (hydrolizat z wysłodków świeżych) do 5,14 g/100 ml (hydrolizat z wysłodków melasowanych). Wartość pH była najniższa w hydrolizacie z wysłodków świeżych (3,64), zaś dla wysłodków niemelasowanych wynosiła 3,81. Najwyższym pH (4,12) odznaczał się hydrolizat z wysłodków melasowanych. Badane surowce odznaczały się niską zawartością azotu ogólnego (0,059-0,069%), co wskazywało na potrzebę wzbogacenia brzeczki fermentacyjnych pożywkami azotowymi dla drożdży.

Ocena wyników składu chemicznego badanych surowców cukrowniczych świadczy, że mogą być one dobrym surowcem do fermentacji alkoholowej, nie wymagającym stosowania zabiegów niezbędnych w przypadku przerobu surowców skrobiowych. Wskazana jest jedynie korekta pH i suplementacja pożywką dla drożdży.

Tabela 1. Skład chemiczny hydrolizatów wysłodków buraczanych

Rodzaj hydrolizatu		Hydrolizat z wysłodków świeżych	Hydrolizat z wysłodków suszonych bez dodatku melasy	Hydrolizat z wysłodków suszonych z dodatkiem melasy
Parametr				
Pozorna zawartość suchej substancji [°Bx]		8,1	8,2	10,0
pH		3,64	3,81	4,12
Cukry	redukujące ogółem [g/100 ml]	5,18	5,02	7,02
	glukoza [g/100 ml]	1,25	1,47	1,77
Azot ogółem [%]		0,069	0,060	0,06

Wpływ warunków na przebieg fermentacji brzeczek z hydrolizatów wysłodków buraczanych

Badano wpływ gatunku drożdży oraz wielkości inokulum na dynamikę i efektywność przebiegu fermentacji brzeczek z hydrolizatów wysłodków buraczanych świeżych, suszonych bez dodatku melasy oraz suszonych wzbogaconych dodatkiem melasy. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 1-3 i na rysunkach 1-3.

Hydrolizat z wysłodków buraczanych świeżych

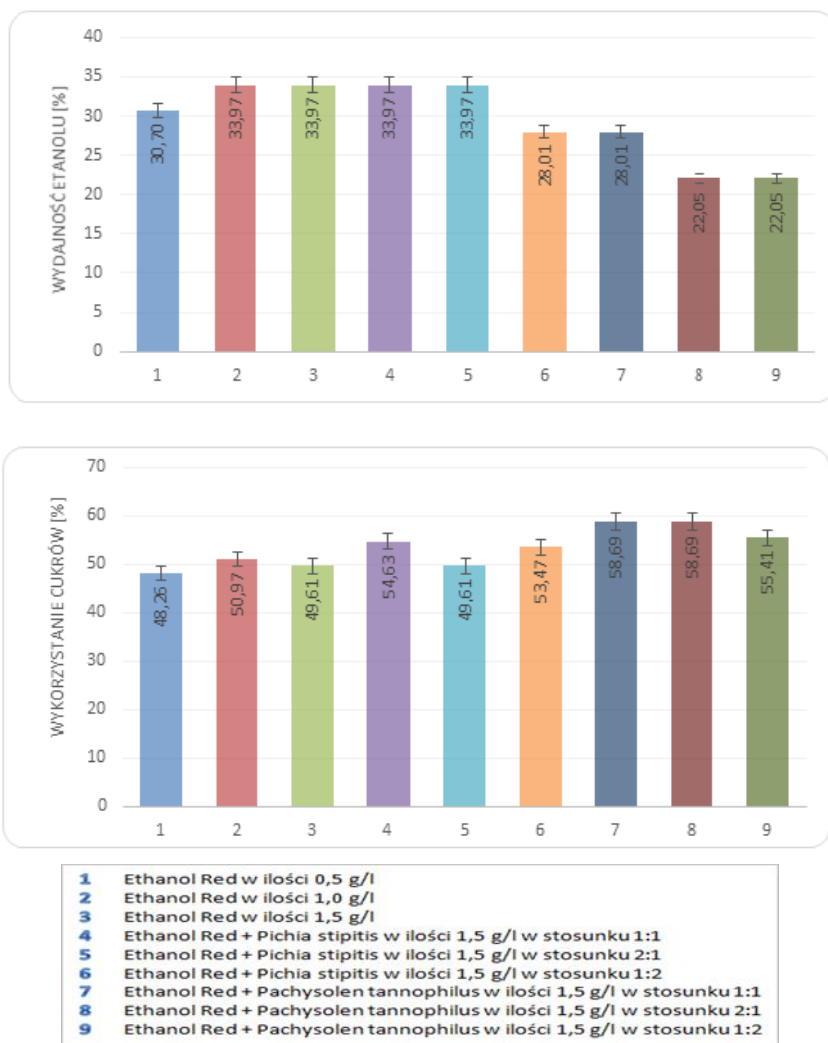
Najbardziej wydajnie proces fermentacji hydrolizatów z wysłodków świeżych przebiegał z dodatkiem inokulum drożdży *Ethanol Red*, w ilości od 1,0 do 1,5 g/l (tab. 2). Próby te charakteryzowały się również najkrótszą fazą zafermentowania. Dodanie do brzeczek fermentacyjnych drożdży *Pichia stipitis* bądź *Pachysolen tannophilus* nie wpłynęło na wzrost stężenia oraz wydajności etanolu w porównaniu z brzeczka fermentowaną wyłącznie drożdżami *Ethanol Red*. Zawartość etanolu w brzeczce odfermentowanej z dodatkiem drożdży *Ethanol Red* i *Pachysolen tannophilus* była na najniższym poziomie i wynosiła 0,74-0,94% obj., natomiast wydajność procesu mieściła się w granicach od 22,05% do 28,01% wydajności teoretycznej. Dla brzeczek z dodatkiem drożdży *Ethanol Red* i *Pichia stipitis*, wartości te kształtowały się

na wyższym poziomie i wynosiły odpowiednio: 0,94-1,14% obj. oraz 28,01-33,97% wydajności teoretycznej.

Najwyższy stopień odfermentowania wynoszący 55,41-58,69%, zaobserwowano w przypadku brzeczek z dodatkiem mieszanki drożdży *Ethanol Red* i *Pachysolen tannophilus*. W pozostałych wariantach fermentacji, wykorzystanie cukrów było na niższym poziomie, mieszczącym się w granicach od 48,26% w próbce z dodatkiem drożdży *Ethanol Red* do 54,63 % w brzeczce z dodatkiem mieszanki drożdży *Ethanol Red* i *Pichia stipitis* (rys. 1). Spośród cukrów redukujących, uwagę zwraca ponad 99% wykorzystanie glukozy (tab. 2).

Tabela 2. Wyniki fermentacji brzeczek z hydrolizatów wysłodków świeżych

Wariant fermentacji	Ekstrakt pozorny [°Bx]	Ekstrakt rzeczywisty [°Bx]	Zawartość etanolu [% obj.]	Cukry	
				redukujące ogółem [g/100 ml]	glukoza [g/100 ml]
<i>Ethanol Red</i> (0,5 g/l)	5,0	5,2	1,03	2,68	0,0129
<i>Ethanol Red</i> (1,0 g/l)	5,1	5,2	1,14	2,54	0,0137
<i>Ethanol Red</i> (1,5 g/l)	5,0	5,1	1,14	2,61	0,0127
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. stipitis</i> (1,5 g/l, 1:1)	5,0	5,1	1,14	2,35	0,0016
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. stipitis</i> (1,5 g/l, 2:1)	5,0	5,1	1,14	2,61	0,0044
<i>Ethanol Red</i> + <i>Pichia stipitis</i> (1,5 g/l, 1:2)	5,1	5,2	0,94	2,41	0,0020
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, 1:1)	5,0	5,1	0,94	2,14	0,0009
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, 2:1)	5,0	5,1	0,74	2,14	0,0010
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, 1:2)	5,0	5,1	0,74	2,31	0,0016



Rys. 1. Wskaźniki fermentacji brzeczek z hydrolizatów wysłodków świeżych

Hydrolizat z wysłodków suszonych bez dodatku melasy

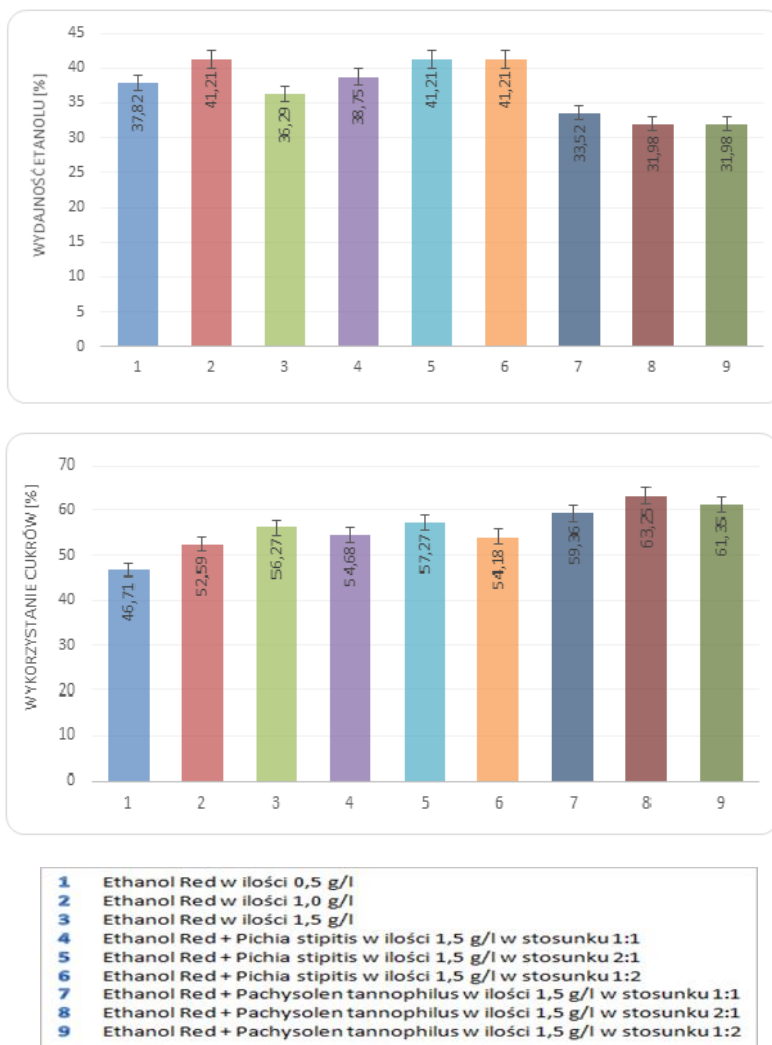
Czas zafermentowania w przypadku wszystkich wariantów fermentacji był podobny i nie przekraczał 2 godzin. Najszybszą dynamiką fermentacji charakteryzowała się próba z dodatkiem mieszanki drożdży *Ethanol Red* (1,0 g/l) i *Pichia stipitis* (0,5 g/l), czyli w stosunku ilości inokulum 2:1. W przypadku brzeczek z mieszkanką drożdży *Ethanol Red* i *Pachysolen tannophilus* można zauważyć, że próba ta odznaczała się najkrótszą fazą zafermentowania, jednak ostatecznie odnotowano najmniej intensywny przebieg procesu fermentacji (wyniki badań nie zostały zamieszczone w niniejszym opracowaniu).

Z danych zestawionych w tabeli 3 wynika, że w przypadku fermentacji brzeczki z dodatkiem mieszkanki drożdży *Ethanol Red* i *Pichia stipitis*, uzyskano najwyższą zawartość etanolu, w granicach od 1,26% obj. w przypadku stosunku ilości inokulum 1:1 do 1,34% obj. dla dwóch pozostałych wariantów. Potwierdzeniem wydajnie przeprowadzonej fermentacji dla tego wariantu są również najwyższe wydajności etanolu (38,75-41,21% wydajności teoretycznej). Podobne wyniki otrzymano w przypadku próby z dodatkiem drożdży *Ethanol Red* w ilości 1,0 g/l (wydajność etanolu 41,21%).

Najslabsze wyniki odnotowano w przypadku mieszanej kultury drożdży *Ethanol Red* i *Pachysolen tannophilus*. Pomimo, iż w próbach tych odnotowano największe wykorzystanie cukrów (59,36-63,25%), przy prawie 100% zużyciu glukozy, stężenie alkoholu kształtowało się na poziomie 1,04-1,09% obj., natomiast wydajność etanolu mieściła się w granicach od 31,98% do 33,52%.

Tabela 3. Wyniki fermentacji brzeczki z hydrolizatów wysłodków suszonych bez dodatku melasy

Wariant fermentacji	Ekstrakt pozorny [°Bx]	Ekstrakt rzeczywisty [°Bx]	Zawartość etanolu [% obj.]	Cukry	
				redukujące ogółem [g/100 ml]	glukoza [g/100 ml]
<i>Ethanol Red</i> (0,5 g/l)	4,2	4,3	1,23	2,67	0,0021
<i>Ethanol Red</i> (1,0 g/l)	4,2	4,3	1,34	2,38	0,0015
<i>Ethanol Red</i> (1,5 g/l)	4,0	4,1	1,18	2,19	0,0013
<i>Ethanol Red</i> + <i>Pichia stipitis</i> (1,5 g/l, 1:1)	4,0	4,1	1,26	2,27	0,0018
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. stipitis</i> (1,5 g/l, 2:1)	3,9	4,0	1,34	2,15	0,0019
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. stipitis</i> (1,5 g/l, 1:2)	4,2	4,4	1,34	2,31	0,0021
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, w stosunku 1:1)	4,1	4,3	1,09	2,04	0,0110
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, 2:1)	4,0	4,3	1,04	1,85	0,0008
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, 1:2)	4,1	4,2	1,04	1,94	0,0016



Rys. 2. Wskaźniki fermentacji brzeczki z hydrolizatów wysłodków suszonych bez dodatku melasy

Hydrolizat z wysłodków suszonych z dodatkiem melasy

W przypadku próby fermentacyjnej wyłącznie z dodatkiem drożdży *Ethanol Red*, obserwowano wzrost intensywności procesu wraz ze wzrostem inokulum od 0,5 g/l do 1,5 g/l. Ponadto, w próbie zaszczepionej drożdżami w ilości 0,5 g/l, faza zafermentowania była najdłuższa spośród wszystkich i trwała około 4 godzin (wyniki nie zostały zamieszczone w niniejszej pracy). Najmniej dynamicznym przebiegiem fermentacji, w porównaniu z próbą z dodatkiem drożdży *Ethanol Red* (1,5 g/l), charakteryzowały się próby zaszczepione mieszanką drożdży *Ethanol Red* i *Pachysolen tannophilus*, zarówno w stosunku 1:2, jak i 2:1.

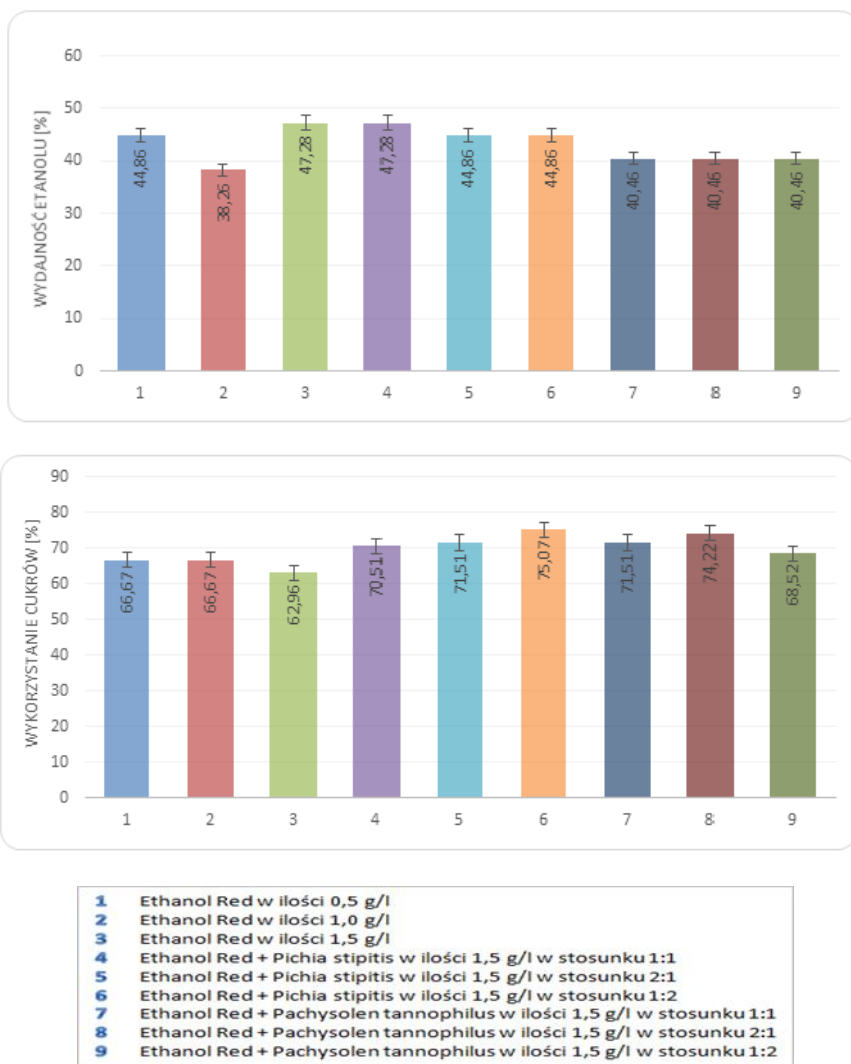
W warunkach prowadzonych doświadczeń, drożdże *Pachysolen tannophilus* okazały się nieco słabsze w porównaniu z *Pichia stipitis*. W próbie fermentowanej z udziałem mieszanej kultury *Ethanol Red* i *Pachysolen tannophilus*, uzyskano maksymalną wydajność alkoholu na poziomie 40,46%, natomiast stężenie alkoholu wynosiło 1,84%, bez względu na stosunek wielkości inokulum (tab. 4). Najlepszą wydajność etanolu w granicach od 44,86 do 47,28% oraz najwyższą zawartość etanolu (2,04-2,15% obj.) uzyskano w przypadku wariantu z mieszanką drożdży *Ethanol Red* i *Pichia stipitis*.

Najniższy stopień odfermentowania odnotowano w brzeczkach zaszczepionych wyłącznie drożdżami *Ethanol Red* (62,96-66,67%). Najwyższe wykorzystanie cukrów na poziomie 75,07%, zaobserwowano w próbie z dodatkiem mieszanki drożdży *Ethanol Red* i *Pichia stipitis*, przy stosunku inokulum 1:2. W pozostałych wariantach odfermentowanie wynosiło od 68,52% do 74,22% (rys. 3). Analogicznie, jak w przypadku prób fermentacyjnych z hydrolizatów wysłodków świeżych i suszonych bez dodatku melasy, wykorzystanie glukozy było na wysokim poziomie, bliskim 100%. W przypadku hydrolizatu z wysłodków wzbogaconych dodatkiem melasy, najlepszym wariantem fermentacji okazał się ten z wykorzystaniem mieszanki drożdży *Ethanol Red* i *Pichia stipitis*. Stosunek wielkości inokulum nie miał istotnego wpływu na dynamikę oraz uzyskanie wysokich wskaźników procesu fermentacji.

Relatywnie wysoka wydajność fermentacji hydrolizatów z wysłodków z dodatkiem melasy, może być konsekwencją tego, że w wyniku tego zabiegu, wysłodki wzbogacone zostają w cukry fermentujące (sacharoza), jak również w substancje mineralne (m.in. potas), istotne dla prawidłowego rozwoju i aktywności fermentacyjnej drożdży. Potwierdzają to dane zestawione w tabeli 1, z których wynika, że hydrolizat z wysłodków suszonych z dodatkiem melasy charakteryzował się najwyższą zawartością cukrów redukujących ogółem (po hydrolizie), wynoszącą 7,02 g/100 ml.

Tabela 4. Wyniki fermentacji brzeczek z hydrolizatów wysłodków suszonych z dodatkiem melasy

Wariant fermentacji	Ekstrakt pozorny [°Bx]	Ekstrakt rzeczywisty [°Bx]	Zawartość etanolu [% obj.]	Cukry	
				redukujące ogółem [g/100 ml]	glukoza [g/100 ml]
<i>Ethanol Red</i> (0,5 g/l)	5,3	5,4	2,04	2,34	0,0060
<i>Ethanol Red</i> (1,0 g/l)	5,0	5,1	1,74	2,29	0,0025
<i>Ethanol Red</i> (1,5 g/l)	4,8	5,0	2,15	2,60	0,0033
<i>Ethanol Red</i> + <i>Pichia stipitis</i> (1,5 g/l, 1:1)	4,6	4,8	2,15	2,07	0,0005
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. stipitis</i> (1,5 g/l, 2:1)	4,6	4,7	2,04	2,00	0,0009
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. stipitis</i> (1,5 g/l, 1:2)	4,6	4,8	2,04	1,75	0,0006
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, w stosunku 1:1)	4,9	5,0	1,84	2,00	0,0002
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, 2:1)	4,6	4,8	1,84	1,81	0,0007
<i>Ethanol Red</i> + <i>P. tannophilus</i> (1,5 g/l, 1:2)	5,2	5,4	1,84	2,21	0,0004



Rys. 3. Wskaźniki fermentacji brzeczek z hydrolizatów wysłodków suszonych z dodatkiem melasy

Podsumowanie

Najbardziej dynamiczny przebieg oraz najwyższą wydajność fermentacji brzeczek z hydrolizatów wysłodków buraczanych świeżych oraz suszonych, bez i z dodatkiem melasy, zapewniło zastosowanie do prowadzenia procesu mieszanej kultury drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (*Ethanol Red*) i *Pichia stipitis*, w ilości 1, 5 g/l (1:1). Najwyższą wydajność etanolu na poziomie 47,28% wydajności teoretycznej, przy 63% wykorzystaniu cukrów, odnotowano po fermentacji brzeczeki sporządzonej z hydrolizatów wysłodków wzbogaconych dodatkiem melasy, fermentowanej z udziałem mieszanej kultury drożdży *Ethanol Red* i *Pichia stipitis* (1:1). Zastosowanie do fermentacji

hydrolizatów wysłodków buraczanych mieszanej kultury drożdży *Ethanol Red* i *Pachysolen tannophilus* (1,5 g/l; 1:1), wpłynęło na obniżenie wskaźników procesu, w porównaniu z mieszanką *Ethanol Red* i *Pichia stipitis*.

Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę kontynuacji badań w zakresie poprawy stopnia wykorzystania substratów cukrowych obecnych w badanych hydrolizatach wysłodków buraczanych.

Badania były realizowane w ramach projektu badawczego nr PBS/B8/3/2012, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Literatura

1. Balcerek M., Pielech-Przybylska K. Dobór drożdży do fermentacji brzeczek z soku gęstego, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2008, 11, 37-40.
2. Balcerek M., Pielech-Przybylska K., Patelski P. Selection of yeast strains for alcoholic fermentation of sugar beet thick juice and green syrup, *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(12), 4841-4848.
3. Byron C.H. Chu, Lee H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation, *Biotechnology Advances*, 2007, 25(5), 425-441.
4. *Brewing Handbook*, Version 1. 2013.
http://www.novozymes.com/en/solutions/food-and-beverages/brewing/Documents/2013-11705-01%20Brewing%20Handbook_final_spreads.pdf (dostęp online 15.06.2014 r.).
5. Dziugan P., Balcerek M., Pielech-Przybylska K., Patelski P. Evaluation of fermentation of high gravity sugar beet thick juice worts for efficient bioethanol production, *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6, 158.
6. Jarosz K., Muszkat T., Skibniewski C., Suchodolski J., Urbański M. Kontrola produkcji w przemyśle spirytusowym. WPLiS, Warszawa 1955.
7. Kumari R., Pramanik K. Improved bioethanol production using fusants of *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeasts, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167(4), 873-884.
8. Kuhad R.C., Gupta R., Khasa Y.P., Singh A., Zhang Y.H.P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, 15(9), 4950-4962.
9. Leja K., Lewandowicz G., Grajek W. Produkcja bioetanolu z surowców celulozowych, *Biotechnologia*, 2009, 4(87), 88-101.
10. Pavlečić M., Vrana I., Vibovec K., Santek M.I. Ethanol production from different intermediates of sugar beet processing, *Food Technology and Biotechnology*, 2010, 48(3), 362-367.

11. Pielech-Przybylska K., Balcerek M. Dobór warunków fermentacji brzeczek z soku gęstego, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2008, 5, 10-12.
12. PN-76/R-64772, Melas buraczany.
13. Rosnah S., Chan S.C. Enzymatic rettings of green pepper berries for white pepper production. *International Food Research Journal*, 2014, 21(1), 237-245.
14. Sybirny W., Puchalski C., Sybirny A. Metaboliczna inżynieria drobnoustrojów do konstruowania wydajnych producentów bioetanolu z lignocelulozy, *Biotechnologia*, 2007, 4(79), 38-54.
15. Pavlečić M., Vrana I., Vibovec K., Santek M.I. Ethanol production from different intermediates of sugar beet processing, *Food Technology and Biotechnology*, 2010, 48(3), 362-367.
16. Wolak P., Złocińska A. Badanie składu chemicznego wysłodków buraczanych – produktu ubocznego przemysłu cukrowniczego, *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 2012, 2(5), 109-118.

PIOTR PATELSKI*, MARIA BALCEREK,
KATARZYNA PIELECH-PRZYBYLSKA, IZABELA CHMIELEWSKA

*Politechnika Łódzka, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź*

**email: piotr.patelski@p.lodz.pl*

WPLYW MIKROFLORY POWIERZCHNI OWOCÓW ŚLIWY NA PRZEBIEG FERMENTACJI ZACIERÓW ŚLIWKOWYCH

Streszczenie

Przemysłowa produkcja alkoholu możliwa jest nie tylko z wykorzystaniem czystych kultur drożdży, lecz również na drodze fermentacji spontanicznej. Szczepy mikroorganizmów występujące na skórkach owoców charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami fermentacyjnymi, a obecność różnych drobnoustrojów jest jednym z czynników wpływających na właściwości organoleptyczne destylatów owocowych.

W niniejszej pracy dokonano oceny wpływu mikroorganizmów z powierzchni owoców śliwy oraz rodzynek na przebieg fermentacji etanolowej zacierów śliwkowych. Surowcem wykorzystywanym w pracy były śliwki odmiany węgierka zwykła (*Prunus domestica L.*) Sterylne i niesterylne zacierzy śliwkowe, szczepiono inokulum izolowanym z powierzchni rodzynek oraz z powierzchni owoców śliwy węgierki zwykłej lub drożdżami winiarskimi *Saccharomyces bayanus*. W zacierach niesterylnych inokulum stanowiła mikroflora spontaniczna bytująca na powierzchni owoców śliwy.

Po zakończeniu fermentacji zacierów, wykonano analizy, zarówno zacieru odfermentowanego jak i destylatu mające na celu określenie m.in. stężenia etanolu, zawartości związków ubocznych, cukrów oraz wydajności procesu.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzić można, że dodatek do zacierów inokulum drożdżowego wyizolowanego z powierzchni rodzynek oraz owoców śliwy skutkowało znacznie lepszą dynamiką fermentacji, niż w przypadku pozostałych wariantów. Analiza GC wykazała, że destylaty uzyskane w wyniku fermentacji spontanicznej zacierów śliwkowych zawierają nawet dwukrotnie większe stężenie alkoholu metylowego, niż jest to dopuszczalne przez Polską Normę oraz największą sumaryczną ilość lotnych produktów ubocznych.

Wstęp

Brandy owocowe, do których należy między innymi brandy śliwkowe, które otrzymuje się ze śliwek są najbardziej popularne w Europie Środkowej i Wschodniej. Ten specyficzny rodzaj alkoholu, który jest powszechnie znany jako śliwowica, pochodzi z rejonów bałkańskich.

Aby otrzymać śliwovicę, należy zmielić śliwki z około 5-15% ich pestek. Otrzymany zacier poddaje się fermentacji, natomiast po jej zakończeniu należy oddestylować na drodze rektyfikacji frakcje lotne zawierające etanol i związki aromatyczne, a następnie przeprowadzić wzmocnienie destylatu. Na tym etapie możliwe jest usunięcie niektórych niepożądanych frakcji. Następnie do dębowych beczek przenosi się frakcję, która zawiera 60-75 % v/v, aby mogła dojrzewać w nich od 2 do 5 lat. Destylat taki można rozcieńczyć wodą w celu uzyskania niższej zawartości alkoholu do około 45-50 %. W zależności od technologii, można otrzymać produkty o różnorodnym bukacie [Satora i Tuszyński, 2008].

Na południu Polski, produkcja śliwownicy jest prowadzona w rejonie górskim, w okolicach Łącka, które od ponad 100 lat szczyci się produkcją znanej w całej Polsce „Śliwownicy Łąckiej”. Uprawa śliwek w rejonie łąckim znana była już w XII wieku. Na przełomie XIX i XX wieku na terenie gminy znajdowała się wytwórnia Śliwownicy, której właścicielem był Samuel Grossbard, gorzelnikiem zaś Salomon Goldchein. Gorzelnia wyrabiała Śliwovicę Pejseczną, którą dystrybuowano do sklepów i wyszynków w Łącku. Po wojnie gorzelnię upaństwowiono, a domowa produkcja stała się nielegalna. Nielegalnym pędzeniem zajęli się okoliczni mieszkańcy - byli pracownicy zakładu. W tej formie tradycja produkcji tego szlachetnego trunku przetrwała do końca XX wieku.

Wyjątkowość śliwownicy wynika ze spontanicznej fermentacji śliwek odmiany węgierka zwykła. Na powierzchnię owoców, drobnoustroje przenoszone są za pośrednictwem powietrza lub owadów, w których przewodzie pokarmowym pełnią często rolę symbiontów. Skażenie mikrobiologiczne owoców, następuje także podczas ich bezpośredniego kontaktu z podłożem (trawą, glebą), w czasie zbiorów [Morais i in., 1995; Satora i Tuszyński, 2001; Satora i in., 2010]. Fermentacja rozpoczyna się w wyniku działania drożdży z gatunków *Kloeckera apiculata* i *Candida pulcherrima* – autochtonicznej mikroflory śliwek. Wraz ze wzrostem zawartości alkoholu w środowisku fermentacyjnym szczepy te giną, a dalszy proces fermentacji prowadzą drożdże *Saccharomyces cerevisiae* – również rodzime [Satora i Tuszyński, 2008]. Śliwowica Łącka charakteryzuje się niepowtarzalnym smakiem i zapachem, który jest indywidualny i swoisty dla tego regionu [Satora i Tuszyński, 2005]. Chociaż moc śliwownicy jest wysoka, ponieważ zazwyczaj osiąga ponad 70 % v/v, wyczuwalny jest silny owocowy aromat. Przepis jej produkcji jest przekazywany w tajemnicy, z pokolenia na pokolenie [Satora i Tuszyński, 2001].

Wytwarzane przez mikroorganizmy związki chemiczne, takie jak: alkohole, kwasy organiczne, związki karbonylowe, estry i inne, w sposób znaczny i bezpośredni wpływają na bukiet smakowo-zapachowy produktu finalnego [Satora i in., 2002].

Celem badań była ocena wpływu mikroorganizmów z powierzchni owoców śliwy oraz rodzynek na przebieg fermentacji etanolowej zacierów śliwkowych.

W zakres badań wchodziło:

- 1) Przygotowanie sterylnych i niesterylnych zacierów śliwkowych z dodatkiem drożdży winiarskich, bądź mikroflory rodzynek albo śliwek, jako źródła drobnoustrojów.
- 2) Fermentacja przygotowanych zacierów.
- 3) Ocena dynamiki i wydajności fermentacji, tworzenia lotnych, ubocznych produktów fermentacji

Materiały i metody badań

Surowcem przeznaczonym do przygotowania zacieru były śliwki należące do odmiany węgierka zwykła, przechowywana w warunkach chłodniczych.

Inokulum stanowiły opcjonalnie:

- a) Drożdże winiarskie *Saccharomyces bayanus* – dozowane w postaci suszonej
- b) Mikroflora spontaniczna bytująca na powierzchni owoców śliwy (owoce mrożone) - tych prób nie zaczepiano dodatkowo żadnymi drożdżami lub (opcjonalnie) dodawano do zacieru rodzynki
- c) Drożdże izolowane z powierzchni rodzynek suszonych oraz z powierzchni owoców śliwy (*Prunus domestica L.*) Izolację wykonano przez 24 h inkubację 100 g próbki owoców (lub rodzynek) w pożywce YPG (300cm³) z dodatkiem penicyliny i streptomycyny. Po 24h wyhodowaną biomasę drożdży oddzielano od owoców, wydzielano z pożywki przez wirowanie i dwukrotnie przemywano sterylną wodą destylowaną, na koniec zawieszając odwirowaną biomasę w 100 cm³ 0,85% roztworu NaCl. Tak przygotowana zawiesina stanowiła inokulum dla wybranych prób fermentacyjnych.

Każdy wariant fermentacji przeprowadzono w dwóch równoważnych powtórzeniach, a wyniki powtórzeń uśredniono.

Skróty nadane w zależności od zastosowanego inokulum

Oznaczenie	Rodzaj mikroflory wchodzącej w skład inokulum
R	Mikroflora pozyskana z powierzchni rodzynek
M	Mikroflora pozyskana z powierzchni śliwek (<i>Prunus domestica L.</i>)
S	Fermentacja spontaniczna – mikroflora bytująca na powierzchni śliwek
SR	Fermentacja spontaniczna z dodatkiem rodzynek do zacieru
SRR	Mikroflora pozyskana z powierzchni rodzynek. Dodatkowo po fermentacji (przed destylacją) wprowadzono rodzynki – 100 g/3500 g zacieru
B	Dodatek drożdży winiarskich <i>Saccharomyces bayanus</i>

Przygotowanie zacieru

Owoce przeznaczone do fermentacji, po pozabawieniu pestek, zostały poddane mechanicznemu rozdrabnianiu.

Miazgę rozdzielono do kolb fermentacyjnych w ilości po 3,5 kg do każdej. Do miazgi dodano również po 15% (z całkowitej ilości owoców) rozdrobnionych pestek. Tak przygotowane zacieru zadano pożywką dla drożdży w postaci $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w ilości 0,2 g/kg masy owoców.

W zależności od próby zacieru zaszczipiano odpowiednio:

- R – po 15 ml zawiesiny drobnoustrojów/kolbę fermentacyjną
- M – po 15 ml zawiesiny drobnoustrojów/kolbę fermentacyjną
- S – bez dodatku innych mikroorganizmów (zacier niesterylny)
- SR – zacier niesterylny + dodatkowo po 100g rodzynek/kolbę fermentacyjną
- SRR – po 15ml zawiesiny drobnoustrojów/kolbę fermentacyjną
- B – po 0,7 g drożdży suszonych *S.bayanus*/kolbę fermentacyjną

Analiza zacierów

Przed rozpoczęciem fermentacji pobrano próbkę zacieru w celu dokonania pomiaru kwasowości, ekstraktu z użyciem areometru oraz oznaczenia zawartości cukrów redukujących metodą Schoorla-Regenboga [Schoorl i Rogenbogen, 1917] i cukrów ogółem, przeprowadzając uprzednio inwersję.

Analizy te wykonano według metod powszechnie stosowanych w przemyśle spirytusowym w przypadku destylatów z owoców pestkowych [Krelowska-Kulaś, 1993].

Fermentacja

Fermentację prowadzono w kolbach z płaskim dnem z korkami zaopatrzonymi w rurki fermentacyjne wypełnione glicerolem. Temperatura fermentacji wynosiła 28-30°C. W celu obserwacji dynamiki fermentacji stosowano metodę wagową. Metoda ta opiera się na spadku masy w czasie trwania procesu, co równoznaczne jest z ubytkiem dwutlenku węgla. Czas fermentacji wyniósł 168h

Analiza zacieru odfermentowanego

W próbce zacieru odfermentowanego dokonano pomiaru kwasowości i ekstraktu. Oznaczono również zawartość etanolu oraz cukrów ogółem.

Analiza destylatów metodą GC

W celu określenia związków powstałych w wyniku fermentacji, przeprowadzono analizę GC prób otrzymanych po dwukrotnej destylacji zacierów śliwkowych. Do analizy użyto chromatografu gazowego (Agilent 7890A, USA) sprzężonym ze spektrometrem

mas (Agilent MSD 5975C, USA) z pojedynczym kwadropolem, z zastosowaniem kolumny kapilarnej HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).

Parametry pracy GC:

- temperatura dozownika (SSL) – 250°C
- objętość dozowanej próbki – 1 μ l
- split 1:40
- piec – program temperaturowy: 40°C (3 min); wzrost temperatury 5°C/min do 100°C; wzrost 10°C/min. do 200°C (2 min.)
- gaz nośny – hel, natężenie przepływu 1,3 ml/min

Parametry pracy MS:

- temperatura źródła jonów – 230°C
- temperatura linii przesyłowej - 250°C
- energia jonizacji EI70eV
- praca w trybie SCAN (analiza jakościowa) – zakres mas od 20 do 230 u
- praca w trybie SIM (analiza ilościowa) – identyfikacja jonów z wymienionych związków (czas monitorowania poszczególnych jonów – Dwell Time 15 ms)

Oznaczenie aldehydu octowego i metanolu przeprowadzono w chromatografie gazowym 7890A, wyposażonym w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) z zastosowaniem kolumny HP-Innowax (60 m x 0,32 mm x 0,5 μ m).

Parametry analizy:

- temperatura dozownika (SSL) – 250°C
- temperatura detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID) 250°C
- objętość dozowanej próbki – 1 μ l
- split 1:50
- piec – program temperaturowy: 40°C (4 min); wzrost 10°C/min. do 195°C (2 min.)
- gaz nośny – hel, natężenie przepływu 1,5 ml/min.

Analizę ilościową przeprowadzono metodą wzorca zewnętrznego (kalibracji zewnętrznej), z wykorzystaniem oprogramowania Agilent MassHunter.

Omówienie i dyskusja wyników

Analiza zacieru słodkiego

W tabeli 1 zestawiono wyniki analiz zacieru przed fermentacją.

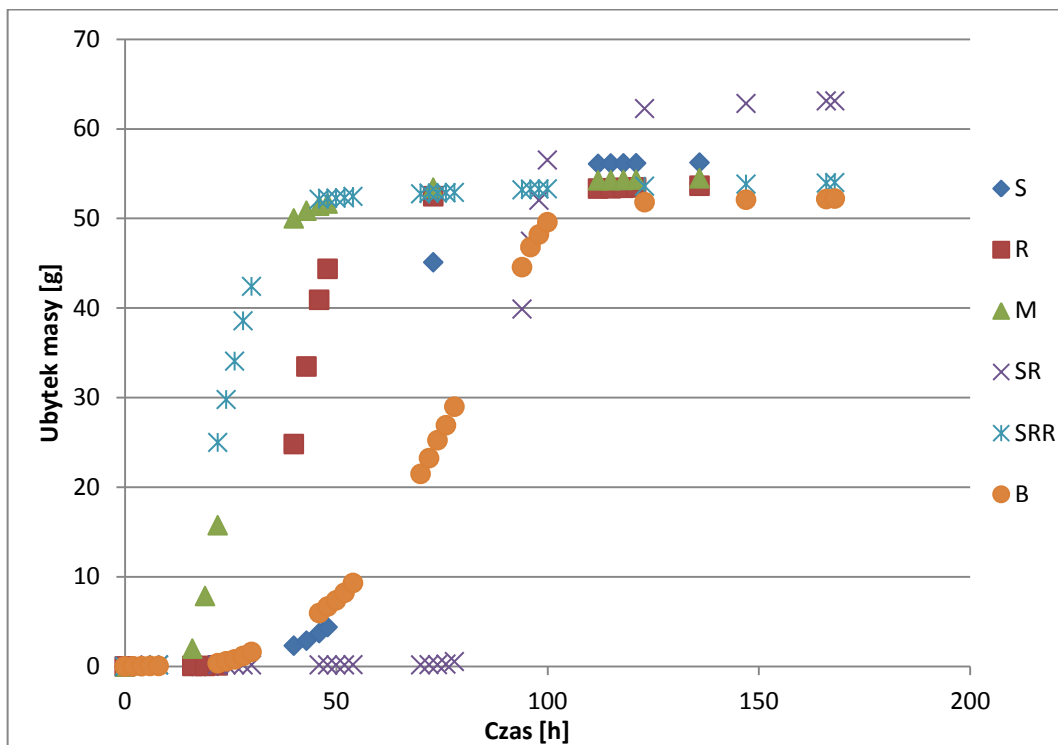
Tabela 1. Wartości podstawowych parametrów w zacierze słodkim

Parametr	Wartość oznaczona	Wartość literaturowa [Balcerek i Szopa, 2005]
Ekstrakt [°B]g]	19,2	15,5
Kwasowość [g kw. jabł./100 g]	1,05	0,90
Cukry redukujące [g glukozy/100 cm ³]	6,18	6,38
Cukry ogółem [g cukru inwertowanego/100 cm ³]	12,38	7,16

Badane parametry okazały się być nieco większe od wartości literaturowych [Balcerek i Szopa, 2005]. Różnice mogą wynikać ze zmiennych warunków uprawy śliwy oraz stopnia dojrzałości owoców.

Dynamika fermentacji

Postęp procesu fermentacji oznaczano metodą wagowa polegająca na regularnym rejestrze ubytku CO₂. Pomiar prowadzono do momentu, aż masa próby pozostawała na stałym poziomie. Dynamikę fermentacji przeliczoną na 1 kg nastawu przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Dynamika fermentacji zacierów śliwkowych

Najszybszy ubytek masy obserwowano w próbach SRR i R zaszczipionych inokulum z rodzynek oraz M zaszczipionych inokulum pozyskany z powierzchni śliwek mrożonych. W ich przypadku po upływie pierwszej doby od rozpoczęcia fermentacji nastąpił gwałtowny ubytek masy, który po 48 godzinach zakończył się i wydzielanie CO₂ utrzymywało się na stałym poziomie. Najdłuższym okresem zafermentowania odznaczały się próby SR, czyli fermentacje spontaniczne z dodatkiem rodzynek do zacieru, co wynikać mogło z długotrwałego namnażania drożdży zdolnych do konwersji cukrów do etanolu i ich współzawodnictwa. Co interesujące, w próbach z dodatkiem drożdży szlachetnych *Saccharomyces bayanus* fermentacja główna rozpoczęła się w porównywalnym czasie do prób spontanicznych S, trwała zaś dłużej o około 15 godzin.

Opóźnienie etapu fermentacji głównej i wydłużenie etapu zafermentowania można wytłumaczyć niedostateczną ilością mikroflory epifitycznej na początku procesu. Powolny wzrost kinetyki fermentacji może być również spowodowany zmianami zachodzącymi w środowisku fermentacyjnym. Szczepy drożdży dzikich *Kloeckera apiculata* hamują wzrost i rozwój *Saccharomyces cerevisiae*, co może mieć wpływ na wydłużenie czasu fermentacji. Ponadto, najwyższej utracie masy spowodowanej wydzielaniem CO₂ towarzyszy najwolniejsza kinetyka fermentacji. Zjawiska

te spowodowane są zwiększaniem się stężenia etanolu oraz utratą składników odżywczych [Satora i Tuszyński, 2008].

Analiza zacieru odfermentowanego

W próbkę zacieru odfermentowanego dokonano pomiaru poziomu ekstraktu, kwasowości oraz alkoholu. Tabela 2 przedstawia otrzymane wyniki.

Tabela 2. Zestawienie wyników analizy podstawowych parametrów zacieru odfermentowanego

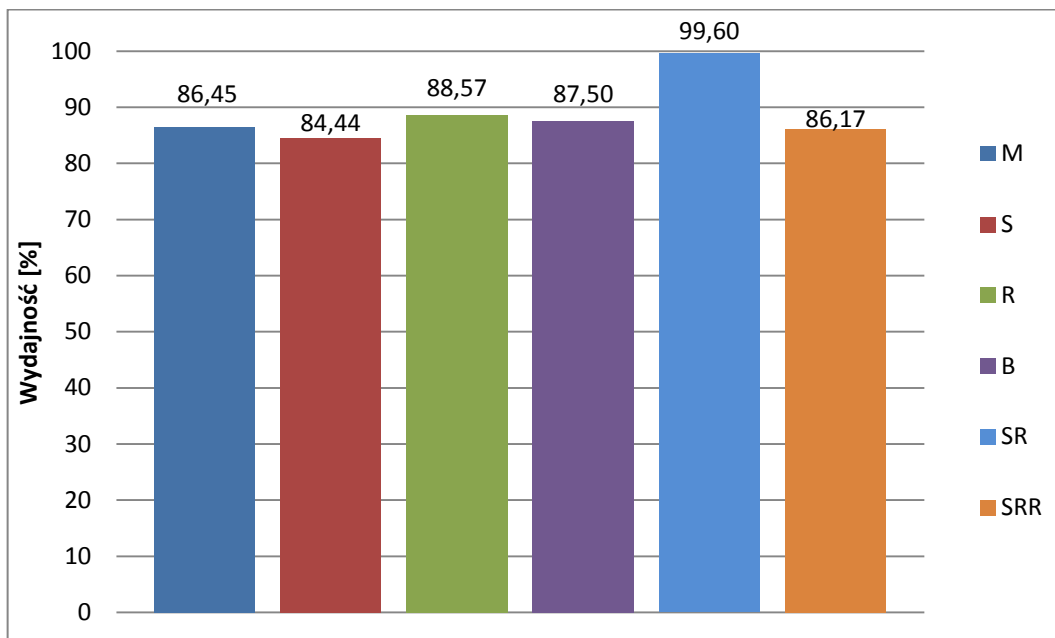
Próba	Ekstrakt pozorny [°Blg]	Ekstrakt rzeczywisty [°Blg]	Kwasowość [g kw. jabł./100 g]
M	5,63	9,20	0,94
R	5,67	7,95	1,01
S	5,73	8,20	0,89
B	5,30	8,15	1,01
SR	5,55	8,00	1,07
SRR	5,30	7,40	1,04

Wykorzystanie inokulum z drożdży izolowanych z powierzchni śliwek lub rodzynek bądź drożdży szlachetnych do prowadzenia fermentacji pozwalało z reguły na szybsze odfermentowanie niż w przypadku przebiegu procesu w sposób spontaniczny. Zacierzy fermentowane w sposób spontaniczny charakteryzowała wyższa kwasowość. Najwyższym poziomem ekstraktu rzeczywistego odznaczały się zacierzy fermentowane z dodatkiem inokulum ze śliwek mrożonych, najniższym zaś próby zaszczipione inokulum z rodzynek.

Wydajność fermentacji

Po zakończeniu fermentacji przeprowadzono destylację alkoholu z zacieru odfermentowanego. Oznaczono również zawartość cukrów w odfermentowanych zacierach co pozwoliło na ustalenie wydajności fermentacji prób.

Efektywność fermentacji, wyrażono jako procent teoretycznie możliwej do otrzymania ilości etanolu z cukrów obecnych w zacierze. Wyniki zestawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Wydajność fermentacji wszystkich zacierów

Najwyższym wskaźnikiem konwersji cukrów na etanol odznaczały się próby SR, w których fermentacja miała charakter spontaniczny, wspomagany dodatkiem rodzynek (i ich mikroflory). W próbach spontanicznych S (bez dodatku rodzynek) etap fermentacji burzliwej rozpoczął się około 2 doby wcześniej, niż w próbach SR, mimo to różnica wydajności pomiędzy nastawami S, a SR, wynosiła nieco ponad 15%. Jest ona znacząca, zważając na fakt, iż warunki fermentacji obu prób były bardzo zbliżone. Analizując wyniki wydajności prób zaszczerpionych inokulum ze śliwek (M), bądź z rodzynek (R i SRR) można stwierdzić, że pozostają na podobnym poziomie.

Nielepkowicz-Charczuk i Balcerek [1995] donosiły o wydajności spontanicznej fermentacji równej 73,08% w stosunku do wydajności teoretycznej. W ramach niniejszej pracy uzyskano lepsze rezultaty przeprowadzonych fermentacji sponatnicznych: SR – 99,6%, S – 84,44%. Mogło to być wynikiem znacznie większą ilością mikroflory epifitycznej na początku procesu fermentacji. Satora i Tuszyński w swoich eksperymentach również otrzymali niższy wynik wydajności fermentacji spontanicznej owoców śliwy – 96,6% [Satora i Tuszyński, 2005].

Analiza ubocznych produktów fermentacji

Wykonanie analizy destylatów metodą chromatografii gazowej pozwoliło na określenie tworzenia ubocznych produktów fermentacji oraz na zdefiniowanie stężenia metanolu w uzyskanych destylatach.

Tabela 3. Związki lotne obecne w destylatach śliwkowych – wyniki analizy GC

Próba Związek	R	M	S	B	SR	SRR
	mg/dm ³ sp. 100% obj.					
1-propanol	1766,95	2327,89	1561,49	1188,46	1751,34	2155,64
Octan etylu	517,53	363,65	299,76	123,66	218,77	201,56
Izobutanol	1547,35	2558,13	654,34	613,14	2023,18	2102,67
1-butanol	14,72	11,62	18,07	13,81	17,93	10,64
3-metylo-1-butanol	1874,36	2097,79	1119,56	2541,79	1557,05	2060,08
2-metylo-1-butanol	646,85	822,30	396,70	511,40	704,32	727,84
Maślan etylu	1,12	1,19	1,03	0,72	1,17	1,85
Octan izoamylu	13,69	21,86	3,01	8,00	11,58	7,13
Heksanal	3,74	6,14	8,70	6,52	3,83	6,30
Furfural	18,83	36,69	152,37	26,04	22,51	54,73
1-Heksanol	34,90	30,89	48,56	19,44	17,78	21,58
Benzaldehyd	8,64	6,72	11,95	7,21	6,33	12,27
Kapronian etylu	5,61	6,27	5,16	4,55	5,40	7,44
Octan heksylu	1,48	2,05	0,45	0,76	0,96	0,30
Alkohol benzylowy	24,18	17,29	25,21	19,26	18,74	19,44
Benzoesan metylu	0,02	0,02	0,27	0,01	0,05	0,04
Benzoesan etylu	3,18	4,13	9,96	1,86	2,94	3,01
Kaprylan etylu	21,01	20,16	17,34	12,62	19,66	21,40
Metanol	1659,29	2203,56	15422,3	1257,00	9575,06	1754,45
Aldehyd octowy	50,60	65,63	113,22	147,84	66,59	62,50

M – mikroflora izolowana z powierzchni śliwek mrożonych; R – mikroflora izolowana z powierzchni rodzynek; S – fermentacja spontaniczna (w oparciu o mikroflorę surowca); B – inokulum w postaci drożdży suszonych *Saccharomyces bayanus*; SRR - mikroflora izolowana z powierzchni rodzynek + rodzynki po fermentacji jako źródło aromatu; SR – fermentacja spontaniczna (w oparciu o mikroflorę surowca) z dodatkiem rodzynek do zacieru słodkiego.

Stężenie metanolu kształtowało się w granicach od 1257 do 15422,39 mg/dm³ 100% obj. Najniższą zawartością alkoholu metylowego charakteryzowały się próby B, powstałe w wyniku fermentacji zacierów z udziałem drożdży szlachetnych *Saccharomyces bayanus*, zaś najwyższą próby S i SR, czyli destylaty uzyskane poprzez fermentację spontaniczną. Stężenie metanolu w destylatach po fermentacji spontanicznej przekraczało nawet dwukrotnie zalecenia Polskiej Normy [Polska Norma, 2002], która dopuszcza 0,8 g metanolu/100 cm³ sp. 100% obj.

Wyższy poziom metanolu w brandy śliwkowej może zależeć od enzymatycznej degradacji pektyn obecnych w skórkach owoców, stężenia pektyn w owocach aktywności metyloesterazy pektynowej oraz drożdży prowadzących proces fermentacji [Satora i Tuszyński, 2005].

Badania nad kompozycją związków lotnych obecnych w brandy z jabłek, gruszek, a szczególnie ze śliwek potwierdziły, że metanol stanowi znaczną część wszystkich badanych substancji. Aldehyd octowy, powstający w wyniku dehydrogenacji etanolu, a także octan etylu, są głównymi związkami odpowiedzialnymi za smak i jakość destylatów [Rusu-Coldea i in., 2011]. Stężenie tych związków zależne jest od pochodzenia surowca i drożdży użytych do fermentacji. Modyfikacja ich zawartości następuje podczas dojrzewania spirytusu, w wyniku wyodrębniania substancji lotnych i nielotnych z beczek dębowych [Tesević i in., 2005].

Analiza GC pozwoliła stwierdzić, że stężenie lotnych produktów ubocznych było najwyższe dla spirytusów uzyskanych drogą fermentacji spontanicznej (S i SR). Brak dodatku inokulum do zacierów i przeprowadzenie fermentacji z udziałem natywnej mikroflory, skutkowało bogatszym składem chemicznym otrzymanych destylatów.

Wnioski

1. Użycie inokulum drożdżowego wyizolowanego z powierzchni rodzynek oraz owoców śliwy do sterylnych zacierów śliwkowych poprawia dynamikę fermentacji oraz odfermentowanie.
2. Dodatek rodzynek (i ich mikroflory natywnej) do fermentujących spontanicznie zacierów śliwkowych poprawia wydajność fermentacji.
3. Spirytusy otrzymane w wyniku fermentacji spontanicznej zacierów śliwkowych charakteryzują się dwukrotnie większym stężeniem alkoholu metylowego, niż jest to dopuszczalne przez Polską Normę oraz dużą ilością lotnych ubocznych produktów fermentacji.

Literatura

1. Balcerek M., Szopa J.St. Wpływ warunków fermentacji zacierów śliwkowych na powstawanie karbaminianu etylu. *Przem.Ferm.Owoc.-Warz.*, 2005, 11, 23-25.
2. Krełowska-Kułas M. Badanie jakości produktów spożywczych. Państwowe wydawnictwo ekonomiczne, Warszawa 1993.
3. Krzysztofik B. Mikrobiologia powietrza. Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1992.
4. Morais P.B., Martins M.B., Klaczko L.B., Medonca-Hagler L.C., Hagler A.H. Yeasts succession in the Amazon Fruit Parahancornia amapa as resource

- partitioning among *Drosophila* spp. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(12), 4251-4257.
5. Nielepkiewicz-Charczuk A., Balcerek M. Przerób mrożonych śliwek na spirytus, Przem. Ferment. i Owoc.-Warz., 1995, 39(8), 11-14.
 6. Polska Norma: PN-A-79523:2002. Destylat rolniczy.
 7. Rusu-Coldea T,E., Socaciu C., Parv M., Vodnar D. Gas-Chromatographic Analysis of Major Volatile Compounds Found in Traditional Fruit Brandies from Transylvania, Romania, Notulac Botanice Horti Agrobotanics, 2011, 39(2), 109-116.
 8. Satora P., Tuszyński T. Biodiversity of yeast during plum Węgierka Zwykła spontaneous fermentation, Food Technol. Biotechnol., 2005, 43(5), 277-282.
 9. Satora P., Tuszyński T. Charakterystyka mikrobiologiczna sadu śliwy Węgierki Zwykłej, XXXII Sesja Naukowa KTiChZ PAN, Warszawa 2001.
 10. Satora P., Tuszyński T. Chemical characteristics of Śliwowica Łącka and other plum brandies, J. Sci. Food Agric., 2008, 88, 98-102.
 11. Satora P., Tuszyński T. Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies, Food Microbiol., 2010, 27(3), 418-424.
 12. Satora P., Tuszyński T., Walczyk W. Ogólna charakterystyka wybranych szczepów drożdży i pleśni wyizolowanych z sadu śliwkowego. XXXIII Sesja Naukowa KTiChZ PAN, Lublin 2002.
 13. Satora P., Tuszyński T., Tomczyk E. Enological profile of *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolated from fermenting plum mashes, Acta Sci. Pol., 2010, 9(1), 33-44.
 14. Schoorl N., Regenbogen A. Gravimetric sugar assays. Z. Anal. Chem., 1917, 56, 191-202.
 15. Tesević V., Nikicević N., Jovanović A. Djoković D., Vujisić L., Vucković I., Bonić M. Volatile components from old plum brandies, Food Technol. Biotechnol., 2005, 43, 367-372.

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu PBS2/B8/9/2013

¹*Zakład Technologii Spirytusu i Drożdży /Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności/Politechnika Łódzka*

²*Zakład Technologii Fermentacji /Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności/Politechnika Łódzka*

³*Instytut Biochemii Technicznej/Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności/Politechnika Łódzka*

FERMENTACJA ALKOHOLOWA HYDROLIZATÓW Z WYSŁODKÓW BURAKA CUKROWEGO

Wstęp

W krajach Unii Europejskiej uprawa buraków cukrowych utrzymuje się na wysokim poziomie. Szacuje się, że 400 tysięcy plantatorów (ok. 33 tysięcy w Polsce) produkuje ok. 100 milionów ton buraków rocznie, które blisko w 100% wykorzystywane są do produkcji cukru [Stankiewicz, 2014]. Produktem ubocznym pozostałym po procesie wytwarzania cukru buraczanego są m.in. liście buraków oraz wysłodki. Z jednej tony buraków uzyskuje się ok. 70 kg wysłodków, co daje ok. 5 milionów ton suchej masy wysłodków w skali roku [Chudoba, 2005].

Zagospodarowanie ww. odpadów odbywa się przede wszystkim poprzez ich wykorzystanie na cele paszowe. Należy jednak mieć na względzie fakt, że w najbliższych latach planowane jest zniesienie kwotowania produkcji cukru w UE, co zdaniem niektórych pozwoli zwiększyć skalę upraw buraka cukrowego. To z kolei może doprowadzić do nadprodukcji wysłodków. W tym kontekście interesującym zagadnieniem jest opracowanie technologii, która umożliwi ich kompleksowe zagospodarowanie w postaci hydrolizatów z wysłodków (łącznie ze stałymi pozostałościami po hydrolizie) lub ich filtratów, do fermentacji etanolowej i hodowli grzybów strzępkowych. Natomiast osad po filtracji, wywar po produkcji etanolu lub pozostałości podłoża po hodowli grzybów strzępkowych, mogą być wykorzystane do produkcji biogazu.

W skład wysłodków z buraka cukrowego wchodzi głównie polisacharydy – nawet do 80% suchej masy – i są to głównie: celuloza, hemicelulozy i pektyna, które tworzą zwarty, silnie usieciowany kompleks z ligniną. Ich hydroliza zwiększa dostępność cukrów prostych (heksoz i pentoz), takich jak: glukoza, arabinoza, ksyloza, galaktoza, mannoza, ramnoza [Wawro i in., 2007]. Kluczowym etapem biokonwersji wysłodków jest zatem hydroliza ww. polisacharydów metodami chemicznymi lub enzymatycznymi. Zastosowanie metod chemicznych wiąże się z dodatkowym generowaniem produktów ubocznych (furfural, 5-hydroksymetylofurfural), które są toksyczne m.in. dla drożdży i ich atywności fermentacyjnej. Alternatywnym rozwiązaniem jest hydroliza

enzymatyczna polisacharydów, niemniej metoda ta wymaga zastosowania odpowiednich preparatów enzymatycznych zawierających enzymy rozkładające celulozę, hemicelulozę i pektynę oraz dobrania parametrów hydrolizy (pH, temperatura). Kluczowym zagadnieniem jest również dobór odpowiednich mikroorganizmów, w postaci monokultur lub kultur mieszanych, które będą charakteryzowały się zdolnością fermentowania wszystkich produktów hydrolizy polisacharydów wysłodków buraczanych, tj. heksoz i pentoz, w celu zwiększenia wydajności etanolu.

Celem badań była ocena warunków fermentacji hydrolizatów z wysłodków buraka cukrowego, z zastosowaniem wstępnej obróbki podłoża oraz suplementacji fosforanem(V) diamonu, na dynamikę procesu i wydajność etanolu oraz stężenie lotnych ubocznych produktów fermentacji.

Materiały i metody badań

W badaniach, do celów fermentacyjnych, wykorzystano hydrolizaty otrzymane z wysłodków buraka cukrowego: świeżych, suszonych niemelasowanych oraz suszonych melasowanych, które były fermentowane bezpośrednio oraz po zatężeniu (na wyparce próżniowej, w temp. 60°C).

Hydrolizaty z wysłodków buraka cukrowego przygotowano z zastosowaniem metody enzymatycznej. Proces prowadzono w mieszalniku z płaszczem grzejnym (24 h), poddając hydrolizie mieszaninę wysłodków z wodą (1 litr wody na 0,5 kg wysłodków mokrych), w temperaturze 50°C, stosując dwa preparaty enzymatyczne firmy Novozymes (Dania): Viscozyme (pH 3,3-5,5; temp. 25-55°C) oraz Ultraflo Max (pH 4,0-6,5; temp. 45-70°C) [Brewing Handbook, 2013; Rosnah i Chan, 2014], w proporcji 1:1 (v/v).

Brzeczki fermentacyjne były wzbogacane fosforanem(V) diamonu, w ilości 0,2 g/l, a następnie fermentowane z udziałem drożdży Ethanol Red (0,5 g/l) wyprodukowane przez firmę Lesaffre (Francja). Przygotowano również brzeczki bez suplementacji. Wszystkie próby były wykonane w trzech powtórzeniach.

Analiza fizyko-chemiczna hydrolizatów obejmowała oznaczenie pH, zawartości ekstraktu, cukrów redukujących oraz cukrów ogółem [AOAC, 1995; PN-76/R-64772].

Fermentacje prowadzono w kolbach płaskodennych o pojemności 500 ml, zawierających 200 ml brzeczki. Po zaszczepleniu drożdżami, kolby zamknięto korkami z rurkami fermentacyjnymi wypełnionymi gliceryną i umieszczono w pokoju termostatowym, w temperaturze 28-30°C. W czasie fermentacji, próby ważono w celu pomiaru ubytku masy związanej z wydzielaniem ditlenku węgla.

W brzeczkach, po zakończeniu fermentacji, wykonano następujące oznaczenia: pH, ekstrakt pozorny i rzeczywisty, zawartość etanolu oraz cukrów nieodfermentowanych (redukujących i ogółem). Obliczono ponadto wskaźniki fermentacji, tj. stopień

odfermentowania cukrów (wykorzystanie cukrów ogółem) oraz wydajność, którą obliczono w odniesieniu do cukrów ogółem przed fermentacją.

Analizę ilościową lotnych związków w brzeczkach wykonano z zastosowaniem techniki chromatografii gazowej, z wykorzystaniem statycznej analizy headspace. Oznaczenia prowadzono na chromatografie gazowym Agilent 7890B (USA), wyposażonym w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) i dozownik SSL (Split/Splitless). Próbki o objętości 10 ml w szczelnie zamkniętych fiolkach termostatowano w piecu aparatu Headspace Analyzer w temperaturze 50°C przez 30 minut (bez mieszania). Warunki analizy headspace były następujące: czas podwyższonego ciśnienia 0,2 min., czas napełniania pętli dozującej 0,2 min., czas równoważenia pętli dozującej 0,05 min., czas dozowania 0,7 min., temperatura pętli dozującej 65°C, temperatura linii transferowej 70°C. Do rozdziału związków zastosowano kapilarną kolumnę HP-Innowax (firmy Agilent) o wymiarach 60 m×0,32 mm×0,5 μm z polarną fazą stacjonarną w postaci poli(tlenku etylenu). Temperatura detektora wynosiła 250°C, a próbki dozowano przez dozownik (temperatura dozownika 200°C) z dzieleniem strumienia gazu split 1:20. Jako gaz nośny zastosowano hel (2 ml/min). Warunki programowanej temperatury były następujące: 40°C (6 min.); 2°C/min. do 100°C (0 min.); 10°C/min. do 220°C (2 min.). Analizę ilościową przeprowadzono metodą wzorca zewnętrznego (kalibracji zewnętrznej), z wykorzystaniem oprogramowania Agilent MassHunter.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu STATISTICA 6.0 (Statsoft, USA), z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA), wykorzystując test porównań wielokrotnych post-hoc Tukey'a na poziomie istotności 0,05.

Wyniki

Przedmiotem badań była ocena przydatności hydrolizatów z wysłodków buraka cukrowego do celów fermentacyjnych. Ocenie poddano trzy rodzaje hydrolizatów z wysłodków: świeżych, suszonych niemelasowanych oraz suszonych melasowanych.

Melasowanie wysłodków polega na dodawaniu melasy do wysłodków świeżych przed ich suszeniem oraz do wysłodków suchych przed ich peletowaniem. Dodatek melasy zwiększa stopień odwodnienia wysłodków podczas suszenia oraz wzbogaca otrzymany susz w składniki mineralne (cele paszowe), natomiast podczas peletowania wysłodków suchych melasa stosowana jest jako składnik wiążący, tzw. lepiszcze.

Podłoża fermentowano bezpośrednio, tj. bez wstępnej obróbki oraz po ich wstępnym zatężeniu na wyparce, przygotowując breczki z suplementacją fosforanem(V) diamonu oraz bez suplementacji.

Wstępna analiza przygotowanych brzeczek (tab. 1) wykazała, że zabieg melasowania wysłodków w procesie ich suszenia wpłynął na wyższą (o 14%) zawartość cukrów w otrzymanych hydrolizatach ($p < 0,05$), w porównaniu do hydrolizatów z wysłodków niemelasowanych.

W celu podwyższenia stężenia cukrów fermentujących w podłożu, hydrolizaty zatężono na wyparce próżniowej, redukując objętość o ok. połowę. Rezultatem wstępnej obróbki było stężenie cukrów ogółem, wyższe o 45-62% w odniesieniu do hydrolizatów bez zatężania ($p < 0,05$).

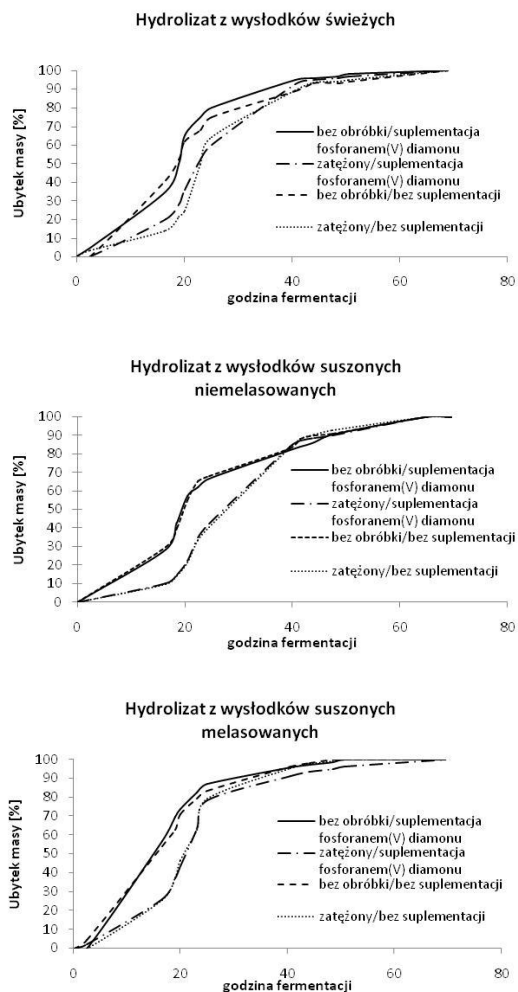
Tabela 1. Wyniki analizy hydrolizatów z wysłodków buraka cukrowego

HYDROLIZAT		OZNACZENIE			
		pH	Ekstrakt [°Błg]	Cukry redukujące [g glukozy/100 ml]	Cukry ogółem [g inwertu/100 ml]
Wysłodki świeże	Bez obróbki	3,8±0,1	8,3±0,2	4,31±0,14	5,18±0,17
	Zatężony	3,7±0,1	14,2±0,3	7,22±0,23	8,24±0,19
Wysłodki suszone bez melasy	Bez obróbki	3,8±0,1	8,2±0,1	4,45±0,15	6,17±0,16
	Zatężony	3,7±0,1	15,4±0,5	7,63±0,17	9,04±0,12
Wysłodki suszone z melasą	Bez obróbki	3,8±0,1	9,4±0,3	5,14±0,11	7,02±0,10
	Zatężony	3,8±0,1	18,1±0,1	9,59±0,18	11,43±0,11

Z przygotowanych brzeczek nastawiono fermentacje (w trzech powtórzeniach). W celu kontrolowania dynamiki procesu, kolby z brzeczkami ważono w różnych odstępach czasu. Otrzymane wyniki zestawiono w formie graficznej (rys. 1), przedstawiając ubytek masy w czasie, związany z wydzielanym podczas fermentacji ditlenkiem węgla. Zastosowana wstępna obróbka hydrolizatów przez ich zatężanie, miała na celu podwyższenie zawartości suchej substancji, w tym cukrów, w fermentowanym podłożu. Obserwowany, w porównaniu z próbami bez wstępnego zatężania, wydłużony czas zafermentowania, był związany z wyższym ekstraktem (rys. 1, tab. 1).

Oceniając natomiast wpływ rodzaju hydrolizatu na dynamikę fermentacji, za korzystny zabieg należy uznać melasowanie wysłodków. Fermentacja hydrolizatów z wysłodków melasowanych (bez wstępnej obróbki) przebiegała dynamiczniej, w porównaniu z pozostałymi hydrolizatami.

Zastosowanie suplementacji fosforanem(V) diamonu nie wpłynęło na dynamikę fermentacji badanych hydrolizatów, w porównaniu z próbkami kontrolnymi bez dodatku tego związku (rys. 1). Podobną zależność odnotowano, analizując zawartość etanolu w brzczykach odfermentowanych (tab. 2), ($p>0,05$).



Rys. 1. Dynamika fermentacji hydrolizatów z wysłodków buraka cukrowego (na wykresie przedstawiono wynik średnie z trzech prób)

Fermentacje hydrolizatów z wysłodków melasowanych (zateżonych) charakteryzowały się dynamiczniejszym przebiegiem, co miało odzwierciedlenie w wyższej zawartości etanolu, o 16 i 47%, w porównaniu z próbkami odpowiednio hydrolizatów otrzymanych z wysłodków suszonych bez melasy i świeżych ($p<0,05$). Analogiczne wyniki otrzymano, porównując stężenie etanolu w hydrolizatach przygotowanych z trzech

rodzajów wysłodków, które fermentowano bez zateżania – w brzeczkach hydrolizatów z wysłodków melasowanych było wyższe o ponad 80% ($p < 0,05$).

Na podstawie wyników analizy brzeczek odfermentowanych, tj. zawartości cukrów oraz etanolu, obliczono dwa wskaźniki fermentacji: stopień odfermentowania cukrów oraz wydajność etanolu (tab. 2).

Tabela 2. Wyniki analizy odfermentowanych hydrolizatów z wysłodków buraka cukrowego

HYDROLIZAT		OZNACZENIE	WSKAŹNIKI FERMENTACJI							
			pH	Ekstrakt pozorny [°B]g]	Ekstrakt rzeczywisty [°B]g]	Cukry redukujące [g glukozy/100 ml]	Cukry ogółem [g inwertu/100 ml]	Zawartość etanolu [% obj.]	Stopień odfermentowania [%]	Wydajność [% wyd. teoretycznej]
Wysłodki świeże	Bez obróbki	Bez dodatku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,5±0,1	5,2±0,2	6,0±0,2	3,26±0,13	4,64±0,23	1,0±0,0	10,42±0,41	29,80±1,02
		Z dodatkiem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,5±0,1	5,0±0,1	5,8±0,3	2,96±0,10	4,17±0,19	1,0±0,0	19,50±0,63	29,80±1,41
	Zatężony	Bez dodatku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,3±0,1	9,1±0,3	10,4±0,4	4,82±0,17	4,88±0,18	1,8±0,1	40,78±1,02	33,72±1,20
		Z dodatkiem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,4±0,2	8,9±0,4	10,1±0,3	4,51±0,20	4,72±0,22	1,9±0,1	42,72±1,10	35,60±1,35
Wysłodki suszone bez melasy	Bez obróbki	Bez dodatku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,4±0,1	5,6±0,2	6,2±0,1	3,38±0,14	3,45±0,12	0,4±0,0	44,08±1,42	10,01±0,24
		Z dodatkiem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,3±0,1	4,7±0,1	5,5±0,2	4,39±0,19	4,73±0,17	1,0±0,0	23,34±0,59	25,02±0,65
	Zatężony	Bez dodatku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,1±0,1	8,7±0,3	9,4±0,3	5,69±0,31	7,37±0,30	1,7±0,1	18,47±0,36	29,03±0,97
		Z dodatkiem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,2±0,1	6,8±0,2	8,3±0,2	4,36±0,22	4,48±0,20	2,5±0,1	50,44±1,74	42,69±1,99
Wysłodki suszone z melasą	Bez obróbki	Bez dodatku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,5±0,2	6,0±0,3	7,8±0,4	2,97±0,17	3,14±0,17	1,8±0,1	55,27±1,43	39,58±1,17
		Z dodatkiem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,0±0,1	5,6±0,1	6,6±0,2	2,72±0,11	2,95±0,11	1,5±0,1	57,98±1,65	32,99±1,21
	Zatężony	Bez dodatku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,1±0,1	7,0±0,3	8,9±0,3	4,38±0,25	4,75±0,10	2,9±0,1	58,44±1,76	39,17±1,36
		Z dodatkiem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,0±0,1	6,1±0,2	8,1±0,3	4,34±0,21	4,82±0,12	2,8±0,1	57,83±1,48	37,82±1,09

Wydajność przeprowadzonych fermentacji obliczono w odniesieniu do cukrów ogółem przed fermentacją, podając wynik jako % wydajności teoretycznej. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w próbach zatężonych hydrolizatów z wysłodków melasowanych oraz świeżych ($p > 0,05$), natomiast wydajność etanolu w hydrolizatach fermentowanych bez wstępnej obróbki była najwyższa w próbach otrzymanych

z wysłodków melasowanych ($p < 0,05$), w zakresie 33-39% wydajności teoretycznej, co dało wyższe o 16-30% rezultaty, w porównaniu z dwoma pozostałymi hydrolizatami.

Oceniając wpływ suplementacji mineralną fosforanem(V) diamonu na wydajność etanolu wykazano, że hydrolizaty otrzymane z wysłodków suszonych niemelasowanych, z dodatkiem fosforanu(V) diamonu w ilości 0,2 g/l, zarówno bez obróbki, jak i po wstępnym zatężeniu, fermentowały z wyższą wydajnością ($p < 0,05$), w odniesieniu do prób kontrolnych bez suplementacji (tab. 2).

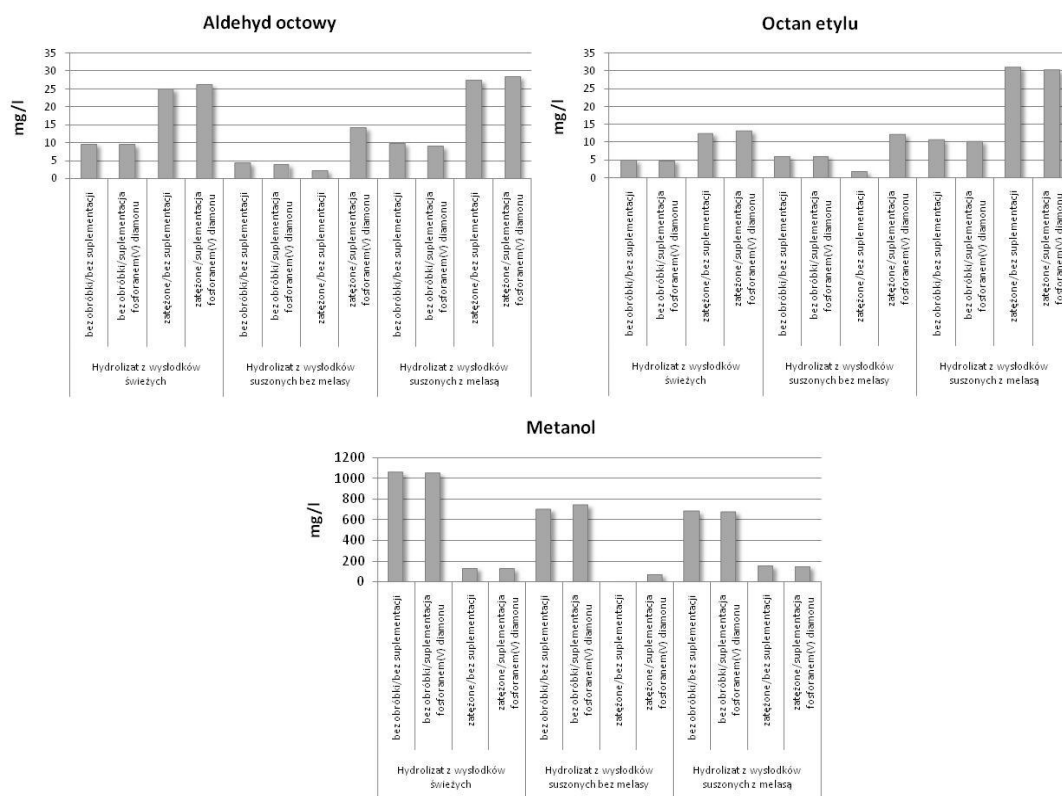
Po zakończonych fermentacjach brzeczki były również analizowane z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej z analizą fazy nadpowierzchniowej, w celu oznaczenia metanolu oraz lotnych związków. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie graficznej na rysunkach 2 i 3, tj. zawartość: aldehydu octowego, octanu etylu, metanolu oraz wyższych alkoholi (1-propanolu, 1-butanolu, izobutanolu, 2-metylo-1-butanolu i 3-metylo-1-butanolu).

Aldehyd octowy, przy prawidłowo prowadzonym procesie fermentacji, jest związkiem pośrednim, który z udziałem dehydrogenazy alkoholowej drożdży jest redukowany do alkoholu etylowego. Niemniej, znanych jest wiele czynników wpływających negatywnie na przebieg ostatniego etapu fermentacji etanolowej, w wyniku hamowania aktywności tego enzymu. Do najważniejszych zalicza się fermentację brzeczek stężonych, wysoką temperaturę podczas fermentacji, dużą koncentrację drożdży w fermentowanym medium, zakażenia mikrobiologiczne, obecność jonów metali ciężkich. Zwiększenie stężenia cukrów powyżej 12-14% w podłożu fermentacyjnym prowadzi do nadmiernej koncentracji produktów ubocznych, w tym aldehydów, jak również fuzli i estrów. Istotnym zagadnieniem w kontekście wysokiej koncentracji aldehydów jest również stężenie związków mineralnych, przede wszystkim związków magnezu, cynku, wapnia, fosforu [Walker, 1994; Kłosowski i in., 1995; Walker i Birch, 1996; Stanisławski i in., 2009].

Analiza otrzymanych wyników, wykazała ponad 2,5-krotnie wyższą koncentrację aldehydu octowego w hydrolizatach zatężonych, w porównaniu z wynikami prób bez wstępnej obróbki (rys. 2) ($p < 0,05$). Wyjątkiem była brzeczka z hydrolizatem z wysłodków niemelasowanych bez dodatku fosforanu(V) diamonu – w tym przypadku, oprócz niższej wydajności etanolu od pozostałych podłoży po zatężeniu, próba charakteryzowała się niższym (o ponad 80%) stężeniem aldehydu octowego, w porównaniu do swoich odpowiedników w próbach fermentacyjnych hydrolizatów z wysłodków świeżych oraz melasowanych ($p < 0,05$). Wyraźny wpływ zatężania obserwuje się również w odniesieniu do zawartości oznaczanego w badaniach octanu etylu. Jest to związek z grupy estrów, który występuje w najwyższym stężeniu w fermentujących podłożach – jego udział w całkowitej

sumie wszystkich oznaczanych estrów, przekracza ponad 90%. Poziom octanu etylu w odfermentowanych hydrolizatach z wysłodków melasowanych wstępnie zatężonych, był najwyższy (ponad 30 mg/l brzeczki), przekraczając o ponad 60% stężenie octanu etylu w brzeczkiach z hydrolizatów bez obróbki, oraz o ponad 50% stężenie w brzeczkiach z hydrolizatów zatężonych.

Ocenie poddano również zawartość metanolu w analizowanych brzeczkiach. Charakterystycznym zjawiskiem było kilkukrotnie, a w jednym przypadku nawet kilkudziesięciokrotnie, wyższe stężenie metanolu w hydrolizatach fermentowanych bez wstępnej obróbki, w porównaniu do hydrolizatów zatężonych (rys. 2), ($p < 0,05$).

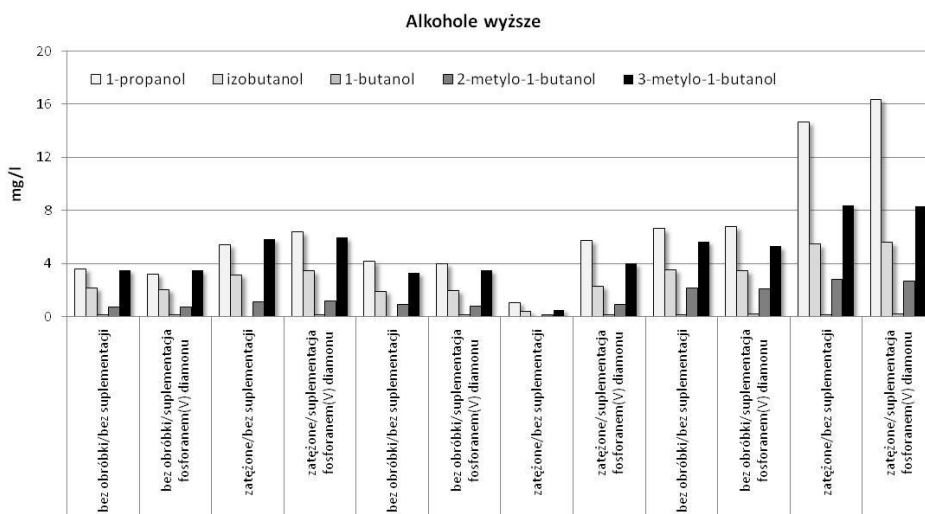


Rys. 2. Zawartość aldehydu octowego, octanu etylu, oraz metanolu w odfermentowanych hydrolizatach z wysłodków buraka cukrowego (wyniki podano jako średnią z trzech prób)

Metanol powstaje w wyniku destryfikacji pektyn obecnych w surowcach roślinnych, która może zachodzić na drodze enzymatycznej, termicznej lub chemicznej. W wyniku działania pektynoesteryazy, powstają pektyny o niższym stopniu zestyfikowania lub kwasy pektynowe z jednoczesnym uwolnieniem metanolu [Tarko

i Tuszyński, 2006]. Wysoką zawartość tego związku w hydrolizatach bez wstępnej obróbki, można tłumaczyć aktywnością, w procesie fermentacji, enzymu pektynazy zastosowanej z preparatami w procesie hydrolizy wysłodków. Stosowany do hydrolizy masy wysłodkowej preparat Viscozyme, charakteryzuje się bowiem wysoką aktywnością pektynazy (dane własne niepublikowane) [Rosnah i Chan, 2014]. Wstępna obróbka otrzymanych hydrolizatów w przeprowadzonych badaniach, poprzez zateżanie na wyparce próżniowej w temp. 60°C przez okres 30 minut, przyczyniła się prawdopodobnie do obniżenia aktywności tego enzymu, co skutkowało znacznie niższą zawartością metanolu w zateżonych brzeczках (p<0,05) po zakończonych fermentacjach, bez względu na rodzaj wysłodków, z których były przygotowane hydrolizaty.

Oprócz ww. związków, w czasie fermentacji etanolowej syntetyzowane są również alkohole wyższe (fuzle), najczęściej: 1-propanol, izobutanol, alkohole amyłowe (2-metylo-1-butanol i 3-metylo-1-butanol) oraz 1-butanol. W odfermentowanych brzeczках, stężenie fuzli kształtowało się na poziomie od 2,3 do 33,3 mg/l brzeczki (rys. 3). W najwyższym stężeniu oznaczono 1-propanol, izobutanol oraz alkohole amyłowe. Analizując otrzymane wyniki, wykazano wpływ hydrolizatu oraz wstępnej obróbki na stężenie wyższych alkoholi w brzeczках odfermentowanych. Fermentacja hydrolizatów otrzymanych z wysłodków melasowanych skutkowała większą zawartością 1-propanolu, izobutanolu i alkoholi amyłowych, w porównaniu z hydrolizatami z wysłodków niemelasowanych oraz świeżych.



Rys. 3. Zawartość alkoholi wyższych w odfermentowanych hydrolizatach z wysłodków buraka cukrowego

Podsumowanie

Wysłodki buraka cukrowego są produktem odpadowym przemysłu cukrowniczego, zawierającym polisacharydy, które po enzymatycznej depolimeryzacji do cukrów prostych mogą być fermentowane np. przez drożdże. Niska zawartość węglowodanów ogranicza możliwość otrzymania dużych ilości etanolu. Niemniej, wykorzystanie mieszanych kultur drobnoustrojów, może zwiększyć wykorzystanie cukrów (heksoz i pentoz) podczas fermentacji, poprawiając jej wydajność. Ponadto wywary otrzymane po destylacji hydrolizatów wysłodków buraczanych mogą być przekazywane do zagospodarowania ich na cele produkcji biogazu.

Wydajność etanolu w przeprowadzonych fermentacjach brzeczek z hydrolizatów wysłodków (świeżych oraz suszonych niemelasowanych i melasowanych) wyniosła od 10 do 43% wydajności teoretycznej, przy stopniu odfermentowania cukrów ogółem na poziomie 10-58%. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (preparat Ethanol Red) wykorzystywane w badaniach, charakteryzuje wysoka wydajność fermentacji glukozy. Natomiast fermentacja innych cukrów obecnych w wysłodkach (np. galaktozy, mannozy, arabinozy, ksylozy) jest możliwa z udziałem np. drożdży paszowych (*Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, i in.), ponieważ udział drożdży *S. cerevisiae* w metabolizmie tych związków jest ograniczony. Rozwiązaniem może być zatem stosowanie kultur mieszanych drożdży, np. *S. cerevisiae* z drożdżami paszowymi wykazującymi uzdolnienia do fermentacji niektórych pentoz i heksoz, co mogłoby zwiększyć stopień odfermentowania cukrów w hydrolizatach z wysłodków buraczanych i zwiększyć wydajność etanolu.

Literatura

1. AOAC: Official Methods of Analysis of AOAC International. 2nd edition. Maryland USA: AOAC International; 1995. Vol. 16. Methods: 906.03; 930.36; 932.14; 968.28.
2. Brewing Handbook, Version 1. 2013.
http://www.novozymes.com/en/solutions/food-and-beverages/brewing/Documents/2013-11705-01%20Brewing%20Handbook_final_spreads.pdf (dostęp online 15.06.2014 r.).
3. Chudoba Ł. Przemysł cukrowniczy – informacja dla producentów cukru. Polska wieś w Europie. Przemysł cukrowniczy., Fundacja Fundusz Współpracy, Biuro Programów Wiejskich, Warszawa 2005, 1-18.
4. Dziugan P., Balcerek M., Pielech-Przybylska K., Patelski P. Evaluation of the fermentation of high gravity thick sugar beet juice worts for efficient bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6, 158, doi:10.1186/1754-6834-6-158.

5. Kłosowski G., Czupryński B. Przyczyny powstawania związków karbonylowych w spirytusie surowym ze szczególnym uwzględnieniem aldehydu octowego-przegląd wiadomości. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo Warzywny*, 1993, 37, 8-10.
6. Krajowy Związek Plantatorów Buraka Cukrowego <http://kzpb.com.pl/projekt-beet-pulp,9,pl.html> (dostęp on-line: 15.06.2014 r.)
7. Polska Norma PN-76/R-64772 – Melasa.
8. Rosnah, S., Chan, S.C. Enzymatic rettings of green pepper berries for white pepper production. *International Food Research Journal*, 2014, 21(1), 237-245.
9. Stanisław M., Sapińska E., Pielech-Przybylska K. Charakterystyka zanieczyszczeń występujących w spirytusach surowych. *Zeszyty Naukowe PŁ Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, 2009, 73, 1058, 105-121.
10. Stankiewicz D. Sektor cukrowniczy w Unii Europejskiej. *Analizy BAS*, nr 3(107), Wydawnictwo Biura Analiz Sejmowych, 2014, 1-7.
11. Tarko T., Tuszyński T. Metanol i metody jego oznaczania. *Laboratorium*, 2006, 7, 32-37.
12. Walker G. The roles of magnesium in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1994, 14(4), 311-354.
13. Walker G., Birch R. Magnesium, calcium and fermentative metabolism in industrial yeasts. *The Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1996, 54(1), 13-18.
14. Wawro S., Gruska R., Kalinowska H. Walory buraków cukrowych, jako surowca przemysłowego. Materiały konferencyjne STC "Postęp techniczny w przemyśle cukrowniczym", 2007, 21-22.05.2007.

Podziękowania

Badania były realizowane w ramach projektu badawczego nr PBS1/B8/3/2012, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Autorzy badań pragną podziękować firmie Fermentis (Division of S. I. Lesaffre) za przekazanie do badań drożdży Ethanol Red.

WPŁYW DODATKU GUMY ARABSKIEJ NA PRZEBIEG FERMENTACJI BRZECZEK MIODOWYCH O RÓŻNEJ ZAWARTOŚCI JONÓW MAGNEZU

Streszczenie

Fermentacja stężonych brzeczek miodowych jest trudna ze względu na duże ciśnienie osmotyczne działające na komórki drożdży. Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że wyższe stężenie jonów magnezu lub dodatek hydrokolooidów do nastawu chroni komórki przed niekorzystnymi czynnikami zawartymi w roztworze, przyczyniając się do zwiększenia odfermentowania. Celem pracy było określenie wpływu stężenia jonów magnezu na przebieg fermentacji brzeczek miodowych za pomocą drożdży *Saccharomyces cerevisiae* unieruchomionych gumą arabską. Po zakończeniu fermentacji wykonano podstawowe analizy chemiczne młodych miodów, a z osadu drożdżowego przygotowano preparaty do analizy mikroskopowej SEM.

Nastawy suplementowane jonami magnezu różniły się od prób kontrolnych pod względem zawartości etanolu. Największe stężenie alkoholu etylowego wynosiło 12,83% obj. Wyniki kwasowości ogólnej nie różniły się istotnie, natomiast najniższą kwasowość lotną (1,21 g/l) uzyskano dla prób suplementowanych 25mM jonów magnezu.

Wzrost stężenia jonów magnezu istotnie wpływa na strukturę matrycy unieruchamiającej komórki drożdży, ułatwiając transport substratów i produktów. Na podstawie uzyskanych wyników analiz stwierdzono, że guma arabska zwiększa stopień odfermentowania brzeczek miodowych oraz przyspiesza klarowanie miodów pitnych.

Przegląd literatury

Miód pitny jest uzyskiwany w procesie fermentacji alkoholowej wodnego roztworu miodu z ewentualnym dodatkiem ziół i przypraw korzennych. Może on zawierać od 9 do 18% obj. alkoholu. Miody pitne możemy podzielić ze względu na stosunek objętościowy miodu do wody na: czwórniaki (1:3), trójniaki (1:2), dwójniaki (1:1) i półtoraki (2:1) [Nowak i Żmudzińska-Żurek, 2008]. Do produkcji miodów pitnych używa się różnych odmian miodu pszczelego, jednakże najbardziej pożądane, o mocnym aromacie, otrzymane są z gryki, akacji, lipy i wrzосу. Miód sycony jest ogrzewany do wrzenia. Podczas tego procesu traci się część substancji zapachowych, witamin, enzymów. Proces fermentacji stężonych brzeczek miodowych jest trudny ze względu

na wysokie stężenie cukrów. Temperatura fermentacji nie powinna być wyższa od 22°C, a czas trwania fermentacji wynosi od 4-8 tygodni [Gogol i Tuszyński, 1996].

Drożdże wykorzystywane przy produkcji miodów są najczęściej winiarskimi kulturami starterowymi *Saccharomyces cerevisiae* adaptowanymi do wysokich stężeń cukrów. Brzeczki są wzbogacane w związki azotowe, fosforowe i inne substancje mineralne [Pereira i in., 2009]. Istotnym składnikiem, który powinien być obecny w nastawie są jony magnezu, pełniące bardzo ważne role w fizjologii komórek drożdżowych. Są one niezbędne do funkcjonowania wielu enzymów związanych m.in. z glikolizą i syntezą kwasów tłuszczowych, a także wpływają na aktywność ATP-azy membranowej, prawidłowego funkcjonowania rybosomów oraz stymulacji cyklu podziałów komórkowych. Jony magnezu z fosfolipidami tworzą związki kompleksowe budujące struktury błon komórkowych. Zwiększają one płynność i przepuszczalność błon cytoplazmatycznych. Działają ochronie na DNA, wspomagając utrzymanie prawidłowej struktury. Jony magnezu są istotne w mechanizmach adaptacyjnych i ochronnych komórek drożdży w warunkach stresu etanolowego, wysokiej temperatury i ciśnienia osmotycznego [Bonin i Ślusarska, 2007]. Obecność jonów magnezu inicjuje syntezę białek szoku termicznego, zwiększa przeżywalność oraz przyspiesza wzrost komórek. Suplementacja nastawów jonami magnezu powoduje uzyskanie lepszego odfermentowania oraz zwiększoną syntezę etanolu [Sroka i in., 2005]. Może być to powiązane z regulacyjną rolą aktywności enzymów glikolitycznych [Gibson i in., 2007]. Minimalne zapotrzebowanie komórek drożdży na magnez wynosi 0,65-1,7mM [Bonin i Ślusarska, 2007].

Guma arabska jest nietoksycznym biopolimerem pozyskiwanym z wydzielin dojrzałych drzew *Acacia senegal*. W głównej mierze składa się ona z węglowodanów (97%, D-galaktoza oraz L-arabinoza). Pozostałe 3% stanowią białka. Guma arabska wykazuje właściwości amfifilowe, czyli zarówno hydrofobowe, jak i hydrofilowe, jest dobrze rozpuszczalna w wodzie przy relatywnie niskiej lepkości w porównaniu do innych gum. Jest ona stosowana jako czynnik klarujący, emulgator i składnik mikrokapsulek w różnych gałęziach przemysłu spożywczego [Montenegro i in., 2012].

Immobilizacja komórek drożdży umożliwia ich ochronę przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi takimi jak: wysokie stężenie etanolu, kwasów organicznych lub ciśnienie osmotyczne. W przypadku stosowania pułapkowania na powierzchni matrycy adsorbują się toksyczne substancje powierzchniowo czynne. Immobilizacja zapobiega jednocześnie powstawaniu roztworów przesyconych dwutlenkiem węgla, gdyż podobnie do naturalnych zawiesin stanowią one aktywne centra wydzielania dwutlenku węgla [Sroka i Błaszczuk, 2010].

W winiarstwie najczęściej stosowane są drożdże unieruchamiane na powierzchni lub wewnątrz nośnika. Komórki, które wykazują naturalną zdolność do przylegania

do niektórych powierzchni, mogą być im mobilizowane na powierzchni matrycy. Stosowanymi w tym przypadku nośnikami mogą być: skały wulkaniczne (kissiris), szkło porowate, pochodne celulozy, gluten oraz owoce. Podstawą oddziaływania pomiędzy komórką, a nośnikiem są wiązania: van der Waalsa, jonowe, kowalencyjne, hydrofobowe lub też ich kombinacja. W przypadku drożdży kluczową rolę pełnią oddziaływania jonowe. Na stopień unieruchomienia będą mieć wpływ: skład chemiczny i struktura nośnika, zastosowanych mikroorganizmów oraz ich wieku. Immobilizacja wewnątrz nośnika polega na zamykaniu komórek w włóknistych lub porowatych kuleczkach żelu lub wewnątrz membran półprzepuszczalnych [Kourkoutas, 2004]. Najczęściej stosowanymi nośnikami są: alginiany, karagenian, chitozan, agar i pektyna. Rozmieszczenie komórek podczas immobilizacji w kuleczkach żelu ograniczone jest dyfuzją substratów i tlenu poprzez warstwę żelu oraz zwiększonym, hamującym fermentację stężeniem etanolu. Powstający w wyniku fermentacji dwutlenek węgla powoduje pękanie żelu [Bonin, 2006]. Do immobilizacji można także wykorzystać kawałki owoców, np. jabłoni oraz pigwy [Kourkoutas i in., 2001, Kourkoutas i in., 2003]. Są one tanim nośnikiem; ponadto unieruchamianie drożdży przy ich pomocy daje produkt o wzmocnionych cechach sensorycznych. Mallouches i in. [2003] stosował natomiast skórki z winogron. W badaniach tych zaobserwował większą wydajność przy wytwarzaniu etanolu oraz pozytywny wpływ na aromat wina.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu stężenia jonów magnezu na przebieg fermentacji brzeczek miodowych za pomocą drożdży *Saccharomyces cerevisiae* immobilizowanych z udziałem gumy arabskiej. W odfermentowanych nastawach oznaczono zawartość etanolu, kwasowość ogólną i lotną oraz wykonano obserwację komórek drożdżowych za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej.

Materiały i metody

Material biologiczny

W badaniach wykorzystano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* rasy Johannisberg-Riesling pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Katedry Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Drożdże były przechowywane w temperaturze 4°C na skosach z ekstraktu słodowego 9°Blg zestalonego agarem (2%). Niechmieloną brzeczkę piwną, rozcieńczano do 9°Blg i rozlewano po 10 cm³ do kolb stożkowych o pojemności 100 cm³. Kolby zabezpieczano korkiem z gazy oraz folią aluminiową, poddawano sterylizacji (121°C, 20 min), chłodzono i szczepiono kulturą drożdży pobraną z uprzednio przygotowanego skosu agarowego (3 oczka ezy), a następnie prowadzono hodowlę stacjonarną w cieplarni (24h, 30°C). Po pierwszym etapie przenoszono gęstwę do kolb stożkowych o pojemności

500 cm³, zawierających po 100 cm³ wysterylizowanej brzeczki piwnej (9°Błg) i prowadzono dalsze namnażanie na wytrząsarce laboratoryjnej (120 obr/min, 24h, 30°C). Otrzymaną kulturę umieszczano w chłodni na 3h, następnie odwirowywano w sterylnych naczyniach wirówkowych (740×g, 10 min.), osad drożdży przemywano jałową wodą i ponownie wirowano. W tak uzyskanej zawieszynie komórek oznaczano zawartość suchej substancji przy użyciu wagosuszarki. Przygotowaną czystą kulturę drożdży dodawano do nastawów w ilości 0,5 g/dm³ (w przeliczeniu na suchą substancję).

Przygotowanie brzeczki miodowej

Do badań użyto miodu gryczanego. Surowiec przetrzymywano w temperaturze pokojowej, w szklanych pojemnikach o pojemności 1l. Miód zmieszano z wodą w stosunku 1:2 (trójniak), następnie sycono przez 10 minut, usunięto część piany, dopełniono do pierwotnej objętości i dodano kwas cytrynowy (0,25 g/l), wodofosforan(V) amonu (0,4 g/l) oraz sproszkowaną gumę arabską (1 g/l). Oznaczono ekstrakt na refraktometrze, za pomocą sterylnej wody skorygowano ekstrakt do wartości 33°Błg i rozlano do wyjałowionych butelek z ciemnego szkła o pojemności 500 ml. Do gorącej brzeczki dodawano siarczan(VI) magnezu (5, 10, 15, 20 lub 25mM), a następnie, po wychłodzeniu do temperatury fermentacji (20°C), zaszczerpiono gęstwą drożdżową w ilości 0,5g s.s/l. Butelki zamykano korkami zaopatrzonymi w rurkę fermentacyjną, wypełnioną gliceryną. Podwójną próbę kontrolną stanowiła brzeczka zaszczerpiona drożdżami bez dodatku gumy arabskiej i magnezu, oraz z dodatkiem gumy arabskiej bez dodatku soli magnezu. Fermentacja prowadzona była w temperaturze 20°C przez około 4 tygodnie. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Dynamika fermentacji

Butelki z fermentującym nastawem ważono z dokładnością do 0,1 g, trzy razy w tygodniu, notując ich masy. Przed pomiarem naczynia były wytrząsane przez 30 sekund w celu usunięcia CO₂. Wyniki przedstawiono jako procentowy ubytek masy medium fermentującego (średnia z trzech powtórzeń). Odfermentowane nastawy poddano wirowaniu w celu oddzielenia drożdży i osadów. Roztwory przechowywano w lodówce (w temperaturze 8°C) do czasu oznaczenia.

Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego

Przeprowadzono destylację prostą (50 ml próby, 2,5 ml 2M roztworu Ca(OH)₂, 13 ml wody destylowanej) (Dz. U., 2013a). Destylat uzupełniono do pierwotnej objętości wodą destylowaną i piknometrycznie oznaczono jego gęstość. Następnie z tablic odczytano zawartość alkoholu etylowego [Dz. U., 2006].

Oznaczanie kwasowości ogólnej

Kwasowość ogólną oznaczano metodą potencjometryczną przez miareczkowanie próbki do pH 7 przy pomocy 0,1M NaOH [Dz. U., 2013a]. Wynik podano w przeliczeniu na kwas jabłkowy.

Oznaczanie kwasowości lotnej

Próbkę 25 ml odfermentowanego nastawu z dodatkiem 0,5 g kwasu winowego poddano destylacji z parą wodną. Do otrzymanego destylatu dodano 3 krople fenoloftaleiny i miareczkowano 0,1M roztworem NaOH do pierwszej zmiany barwy (bładoróżowa) utrzymującej się przez 30 sekund [Dz. U., 2013a]. Kwasowość lotną podaną w przeliczeniu na kwas octowy.

Przygotowanie próbek do obserwacji za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego

Próbki osadu z nastawów kontrolnych oraz nastawu zawierającego dodatek 25 mM magnezu przeniesiono do probówek Eppendorfa (1,5 ml pojemności), wstępnie przepłukano 0,1M buforem fosforanowym i utrwalono 3% aldehydem glutarowym (24h). Po tym etapie osady ponownie przepłukano 0,1M buforem fosforanowym, oraz utrwalono 4% roztworem OsO₄ (3h), przepłukano 0,1M buforem fosforanowym oraz odwodniono w wodnym szeregu alkoholowym (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 10 min traktowania oraz odwirowanie, 2075×g, 3 min) oraz acetonem (15 min). Wyszuszone preparaty naniesiono na grafitową nakleję umieszczoną na stoliku aluminiowym, napyłono złotem (65 sekund) i przeprowadzono obserwacje przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (Hitachi VP-SEM S-3400N, napięcie przyspieszające 25 kV, detektor SE).

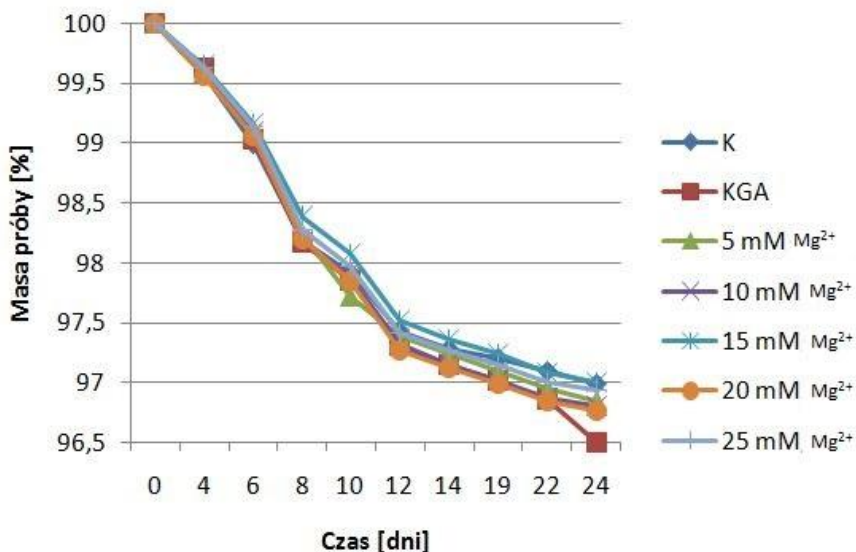
Analiza statystyczna

Wyniki analiz poddano interpretacji statystycznej. Na podstawie uzyskanych rezultatów wyznaczono wartości średnie i odchylenia standardowe. Przeprowadzono również jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) za pomocą programu IBM SPSS Statistics 20 przy poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Wyniki i dyskusja

Fermentujące próby w czasie fermentacji były ważone, zmiana masy jest proporcjonalna do ilości wydzielonego w czasie fermentacji dwutlenku węgla. Ubytek masy (rys. 1) we wszystkich próbach był na podobnym poziomie. Przez pierwsze 8 dni stwierdzono gwałtowne zmniejszenie masy prób, co odpowiada burzliwej fazie fermentacji. Zmiana wynosiła około 2%. W kolejnych dniach zmiany nie były już tak

intensywnie. Po zakończeniu fermentacji największe zmiany masy wykazano w przypadku próby kontrolnej zawierającej dodatek gumy arabskiej (zmiana wynosiła około 3,5% masy początkowej).

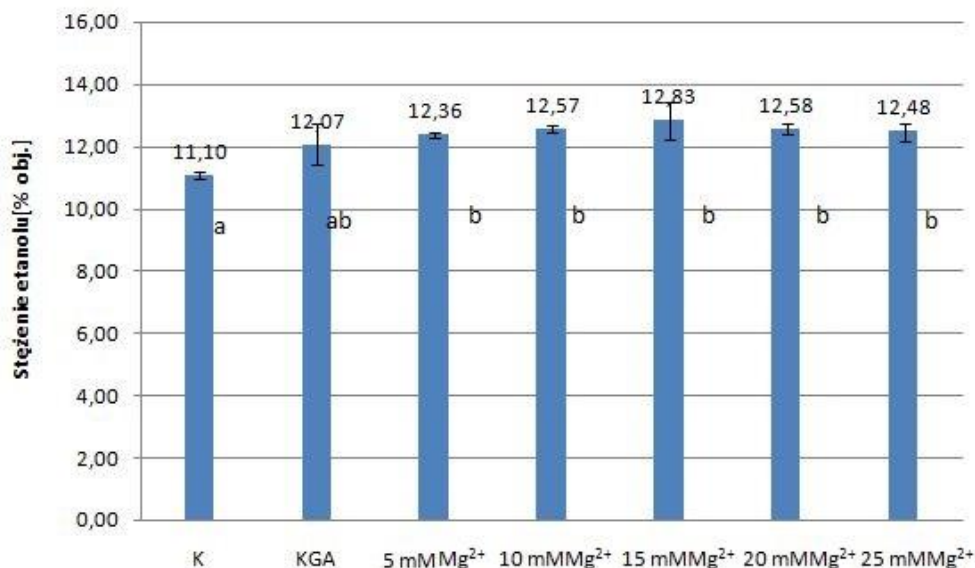


Rysunek 1. Dynamika procesu fermentacji, K - próba kontrolna, KGA - próba kontrolna zawierająca gumę arabską

Tempo zafermentowania w głównej mierze zależy od stresu osmotycznego wywołanego przez duże stężenie cukrów [Sroka i Tuszyński, 2007]. Jony magnezu natomiast zabezpieczają komórki drożdży przed niekorzystnym działaniem stresu wywołanego przez etanol, wysoką temperaturę, czy też ciśnienie osmotyczne [Bonin i Ślusarska, 2007]. Roldán i in. [2011] w swoich badaniach nad wpływem pyłku kwiatowego na produkcję miodu pitnego zaobserwowali istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną, a próbkami zawierającymi dodatek pyłku, uzyskując w krótszym czasie lepiej odfermentowane nastawy. Mendes-Ferreira i in. [2010] w badaniach nad optymalizacją fermentacji miodów wykazali, iż dodatek wodorofosforanu(V) amonu w stężeniu 1 g/l powodował lepsze odfermentowanie nastawów.

W odfermentowanych próbkach stwierdzono istotne różnice pod względem zawartości etanolu (rys. 2). Najmniejsze stężenie alkoholu etylowego wykazano w przypadku nastawu kontrolnego niezawierającego gumy arabskiej (11,10% obj.), natomiast najwyższe w próbce suplementowanej 15 mM jonów magnezu (12,83% obj.). Według Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi [Dz. U. 2013b], zawartość etanolu w przypadku trójniaków powinna wynosić od 12 do 14% obj. Doświadczenia przeprowadzone przez Bonin i in. [2007] polegające na suplementacji nastawu

otrzymanego z koncentratu jabłkowego (31°B_{lg}) za pomocą 240 mg/l (w przybliżeniu 5 mM) magnezu, umożliwiły uzyskanie wina o mocy 16% obj. etanolu.



Rysunek 2. Zawartość alkoholu etylowego w odfermentowanych brzeczках, K- próba kontrolna, KGA - próba zawierająca gumę arabską, te same litery przy słupkach oznaczają brak istotnych różnic statystycznych

Jednak w przypadku brzeczek miodowych w nastawie występuje wiele substancji odpowiedzialnych za spowolnienie fermentacji oraz niepełne odfermentowanie [Sroka i Tuszyński 2007]. Należy także zwrócić uwagę na fakt, że 1 g gumy arabskiej ma możliwość wiązania około 2 g magnezu [Kunkel i in., 1996]. Navrail i in. [2001] w trakcie badań nad produkcją miodu pitnego przy pomocy drożdży immobilizowanych galakturonianem wapnia otrzymali napoje winiarskie o zawartości etanolu równej 16% obj. W przypadku dodatku pyłku kwiatowego do brzeczek Roldán i in. [2011] uzyskali młode miody pitne, które zawierały 12% obj. alkoholu etylowego.

Wyniki oznaczeń kwasowości ogólnej odfermentowanych prób nie różniły się istotnie. Kwasowość ogólna otrzymanych młodych miodów pitnych była poniżej wartości 3,5 g/l (w przeliczeniu na kwas jabłkowy) wyznaczonej przez Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi [Dz. U. 2013b], dla nastawów zawierających dodatek jonów magnezu mniejszy od 20 mM. Próby te wymagają dodatkowego dokwaszenia po zakończeniu fermentacji.

Kwasowość lotna we wszystkich nastawach kształtowała się w okolicach górnej granicy normy (1,4 g/l w przeliczeniu na kwas octowy). Wzbogacanie brzeczek

miodowych jonami magnezu w ilości od 120 do 480 mg/l powoduje obniżenie kwasowości ogólnej od 0,4 do 0,92 g/l oraz lotnej nawet o 0,5 g/l [Sroka i in., 2005].

Może to oznaczać, że guma arabska, będąca polielektrolitem, wiąże jony magnezu, które w tym przypadku są niedostępne lub trudno przyswajalne przez komórki drożdży. W próbach zawierających 25 mM stwierdzono blisko 20% zmniejszenie kwasowości lotnej. Jest to niezwykle istotna informacja, ponieważ kwasowość lotna uzyskanych miodów jest bardzo wysoka.

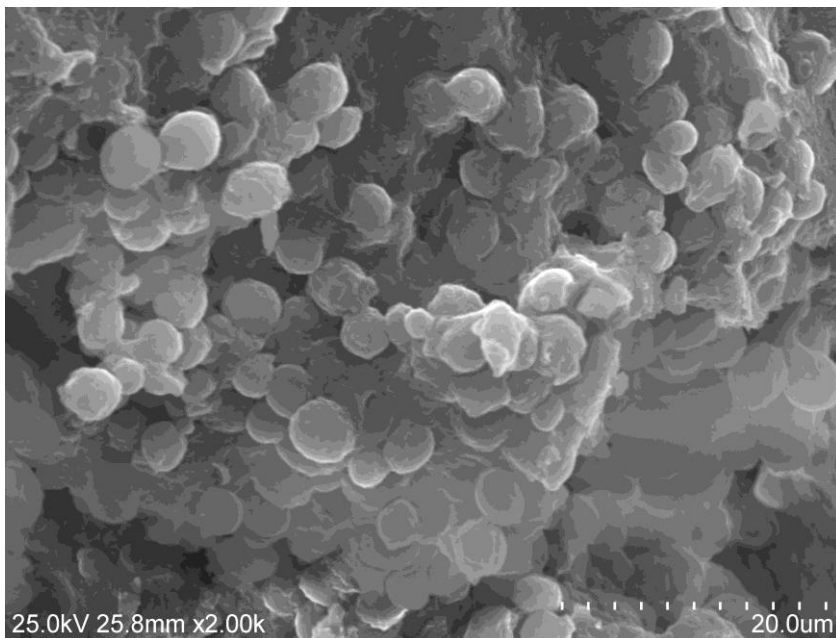
Tabela 1. Kwasowość odfermentowanych nastawów, K - próba kontrolna, KGA - próba kontrolna zawierająca dodatek gumy arabskiej

	Kontrola	K _{GA}	Dodatek jonów magnezu [mM]				
			5	10	15	20	25
Kwasowość ogólna [g/l]	3,10	2,70	2,90	2,79	3,39	3,71	3,70
Kwasowość lotna [g/l]	1,33	1,39	1,44	1,31	1,46	1,48	1,21

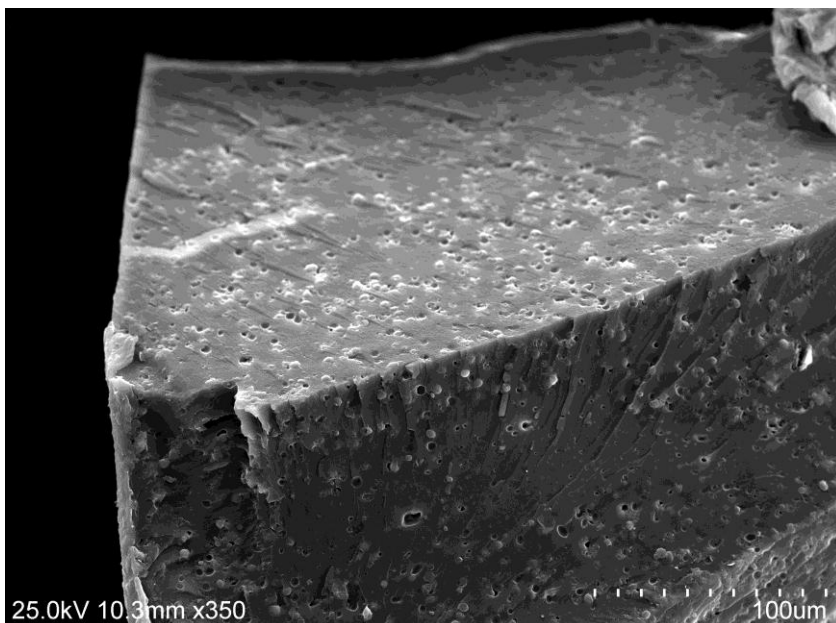
Obserwacja pod mikroskopem SEM

Obserwacja mikroskopowa komórek drożdży wykazała istotne różnice pomiędzy analizowanymi próbkami. Preparaty przed obserwacją zostały specjalnie utrwalone za pomocą aldehydu glutarowego oraz czterotlenku osmu, a następnie odwodnione za pomocą etanolu. W czasie przygotowania preparatów utrwalony osad drożdżowy znacznie zmniejszył swoją objętość. Roztwory etanolu zastosowane do suszenia spowodowały intensywne kurczenie żelu otrzymanego z gumy arabskiej. Na rysunku 3 można zaobserwować skupisko drożdży znajdujących się w osadzie z nastawu bez dodatku gumy arabskiej. Można na nim dostrzec skupiska oraz pojedyncze komórki drożdży, jak również materiał organiczny pochodzący z miodu pszczelego.

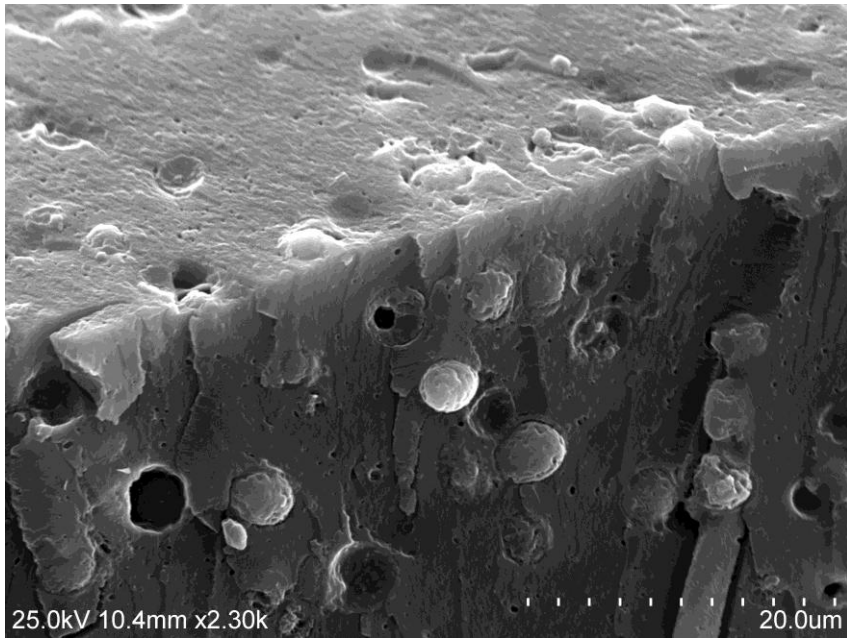
Obrazy (rys. 4 i 5) zarejestrowano dla preparatów otrzymanych z osadu grupy kontrolnej zawierającej dodatek gumy arabskiej. Można na nich zauważyć strukturę wysuszonego żelu (kserożelu) zawierającego zamknięte komórki drożdżowe. Na fotografiach można zaobserwować pory, będące częścią kanalików, które powstały podczas fermentacji, w wyniku wydzielania się CO₂. Otwartokomórkowa struktura żelu ułatwia wymianę masy w trakcie fermentacji. Ich średnica jest większa w okolicy komórek drożdżowych (ok. 1 μm), natomiast wewnątrz matrycy żelowej powstałej z gumy arabskiej stwierdzono liczne kapilary o średnicy około 300 nm (rys. 5).



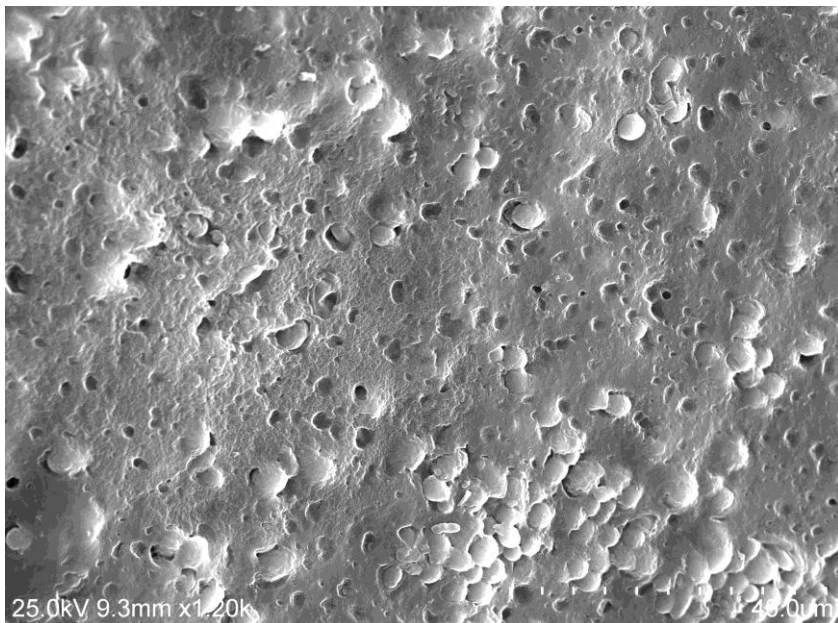
Rysunek 3. Próba kontrolna, powiększenie 2 tys. razy



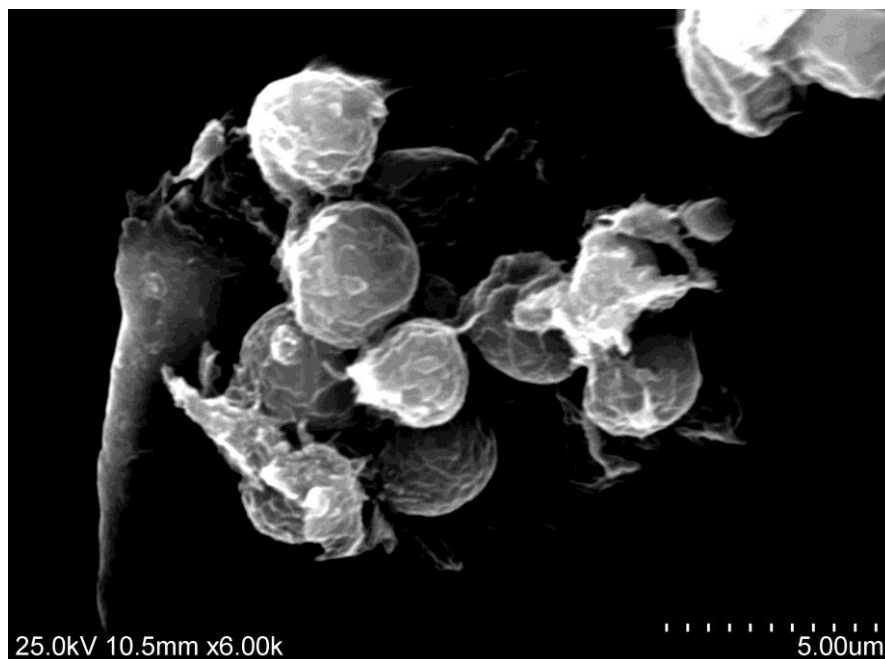
Rysunek 4. Fragment osadu z próby kontrolnej zawierającej gumę arabską, powiększenie 350 razy



Rysunek 5. Drożdże immobilizowane w gumie arabskiej, powiększenie $2,3 \times 10^3$



Rysunek 6. Preparat osadu pobrany z próby suplementowanej jonami magnezu, powiększenie $1,2 \times 10^3$



Rysunek 7. Agregaty komórek drożdżowych, powiększenie 6×10^3

W preparatach wykonanych z osadu z prób zawierających dodatek gumy arabskiej oraz prób suplementowanych jonami magnezu stwierdzono strukturę mniej zwartą w porównaniu z preparatem wykonanym z próby kontrolnej z gumą arabską (rys. 6). Żel był bardziej porowaty z licznymi, szerokimi otwartokomórkowymi kapilarami. Struktura uzyskanych żeli umożliwia szybszą wymianę materii, ogranicza opory dyfuzyjne, a jednocześnie tworzy mikrośrodowisko dla komórek drożdży umożliwiające intensywną fermentację przy niekorzystnych warunkach charakterystycznych dla stężonej brzezki miodowej, takich jak wysokie ciśnienie osmotyczne, wysokie stężenie etanolu oraz obecność inhibitorów fermentacji. Inhibitory mogą ponadto adsorbować się na rozbudowanej powierzchni żelu, co zmniejsza efektywne stężenie środków powierzchniowo czynnych, takich jak np. średnicząsteczkowe kwasy tłuszczowe. Należy zauważyć, że w próbach z dodatkiem gumy arabskiej stwierdzono także agregaty komórek potwierdzające flokulację drożdży (rys. 7). Guma arabska jest substancją stosowaną do klarowania napojów winiarskich [DZ. U., 2013b].

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że guma arabska wpływa na kinetykę procesu, zwiększa stężenie etanolu oraz stopień odfermentowania brzezek miodowych i przyspiesza ich klarowanie. Suplementacja nastawów za pomocą

jonów magnezu w stężeniu do 25mM nie wpływa istotnie na stężenie etanolu w młodych miodach. Guma arabska jest polielektrolitem i prawdopodobnie wiąże jony magnezu dodane do brzezki, ograniczając ich efektywne stężenie i zmniejszając dostępność jonów magnezu dla komórek drożdżowych. Wykazano, że jony magnezu wpływają na rozluźnienie struktury matrycy immobilizującej komórki, co może korzystnie wpływać na transport substratów i produktów w żelu. W próbach suplementowanych za pomocą 25 mM jonów magnezu stwierdzono około 20% zmniejszenie kwasowości lotnej, co jest niezwykle istotne, ponieważ pozostałe młode miody charakteryzowały się wysoką kwasowością lotną. W przeprowadzonych doświadczeniach stwierdzono także, że próby suplementowane gumą arabską był klarowne po zakończeniu fermentacji i nie wymagały dodatkowych zabiegów.

Wnioski

- Dodatek gumy arabskiej zwiększa stężenie etanolu i stopień odfermentowania brzeczki miodowych.
- Suplementacja nastawów za pomocą jonów magnezu wpływa na zmianę struktury matrycy hydrożelowej unieruchamiającej komórki drożdży, co przyczynia się do ułatwienia transportu substratów oraz produktów.
- Dodatek gumy arabskiej powoduje wytrącenie koloidów obecnych w brzezce i skraca czas klarowania młodych miodów pitnych.

Literatura

1. Bonin S. Zastosowanie mikroorganizmów immobilizowanych w winiarstwie. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2006, 3(48), 5-15.
2. Bonin S., Ślusarska M. Wpływ dodatku soli magnezu i wapnia do wysokocukrowych nastawów na proces fermentacji winiarskiej i przyrost biomasy drożdży. *Żywność. Nauka, Technologia, Jakość*, 2007, 4(53), 109-119.
3. Dz. U. 2006 r. nr 106 poz. 716, Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 25 maja 2006 r. w sprawie liczbowych danych odniesienia dla mieszanin alkoholu etylowego i wody.
4. Dz. U. 2013a r. poz. 624, Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 21 maja 2013r. w sprawie szczegółowego sposobu wyrobu fermentowanych napojów winiarskich oraz metod analiz tych napojów do celów urzędowej kontroli w zakresie jakości handlowej.
5. Dz. U. 2013b r., poz.633, Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 maja 2013 r. w sprawie rodzajów fermentowanych napojów winiarskich oraz szczegółowych wymagań organoleptycznych, fizycznych i chemicznych, jakie powinny spełniać te napoje.

6. Gibson B.R., Lawrence S.J., Leclaire J.P.R., Powell C.D., Smart K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(5), 535-568.
7. Gogol D., Tuszyński T. Miody pitne - tradycje, surowce i technologie. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo Warzywny*, 1996, 8, 25-27.
8. Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I.M., Marchant R., Koutinas A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 2007, 21, 377-397.
9. Kourkoutas Y., Komaitis M., Koutinas A.A., Kaliafas A., Kanellaki M., Marchant R., Banat I.M. Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0°C. *Food Chemistry*, 2003, 82, 353-360.
10. Kourkoutas Y., Komaitis M., Koutinas A.A., Kanellaki M. Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low room temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 1417-1425.
11. Kunkel M.E., Seo A., Minten T.A. Magnesium binding by gum arabic, locust bean gum, and arabinogalactan. *Food Chemistry*, 1996, 59, 87-93.
12. Mallouchos A., Komaitis M., Koutinas A., Kanellaki M. Wine fermentation by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. *Food Chemistry*, 2003, 80, 109-113.
13. Mendes-Ferreira A., Cosme F., Barbosa C., Falco V., Inés A., Mendes - Faia A. Optimization of honey must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144, 193-198.
14. Montenegro M.A., Boiero M.L., Valle L., Borsarelli C.D. Gum arabic: more than an edible emulsifier. *Products and Applications of Biopolymers*, 2012, 4-26.
15. Navrátil M., Šturdík E., Gemeiner P. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol - tolerant yeast. *Biotechnology Letters*, 2001, 23, 977-982.
16. Nowak K., Żmudzińska - Żurek B. Miód - najstarsza substancja słodząca - zastosowanie w przemyśle fermentacyjnym (1). *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2008, 8, 45-46.
17. Pereira A.P., Dias T., Andrade J., Ramalhosa E., Estevinho L.M. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47, 2057-2063.
18. Roldán A., Van Muiswinkel G.C.J., Lasanta C., Palacios V., Caro I. Influence of pollen addition on mead elaboration, Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 2011, 126, 574-582.

19. Sroka P. Błaszczyk U. Inhibitory fermentacji etanolowej w winiarstwie. Przemysł Fermentacyjny i Owowcowo-Warzywny, 2010, 23-25.
20. Sroka P. Tuszyński T. Change in organic content during mead wort fermentation. Food Chemistry, 2007, 104, 1250-1257.
21. Sroka P., Tuszyński T., Tarko T. Wpływ jonów wapnia i magnezu na fermentację brzeczki miodowych. Mat. XXXVI Sesji Nauk. KTChŻPAN, Szczecin 2005, 100.

Źródło finansowania DS3700/WTŻ/2013-2014

WPŁYW WARUNKÓW HODOWLI NA BIOSYNTEZĘ KAROTENOIDÓW PRZEZ DROŹDŹE Z RODZAJU *RHODOTORULA*

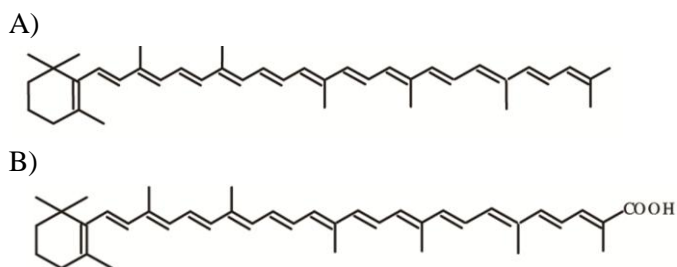
Streszczenie

Karotenoidy to związki terpenowe charakteryzujące się barwą żółtą, pomarańczową lub czerwoną. Ze względu na udokumentowane właściwości prozdrowotne ciągle wzrasta zainteresowanie metodami ich pozyskiwania. Przemysłowe zapotrzebowanie na karotenoidy pokrywają głównie procesy syntezy chemicznej. Jednak w związku z rosnącym popytem na naturalne barwniki coraz większego znaczenie nabiera możliwość produkcji tych związków z udziałem mikroorganizmów. Proces ten uznawany jest za bardziej wydajną i efektywniejszą metodę otrzymywania karotenoidów w porównaniu z ekstrakcją z roślin. Do mikroorganizmów, które syntetyzują barwniki karotenoidowe należą drożdże z rodzaju *Rhodotorula*. Wśród korzyści płynących z ich zastosowania w produkcji karotenoidów można wymienić m.in. zdolność szybkiego wzrostu, a także możliwość użycia tanich surowców odpadowych, jako źródła węgla i azotu. Poza wyborem odpowiednich szczepów charakteryzujących się intensywną biosyntezą karotenoidów, w celu uzyskania satysfakcjonujących wydajności pożądanego produktu konieczna jest również optymalizacja warunków hodowli.

Wprowadzenie

Karotenoidy to grupa naturalnych barwników szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie. Obecnie znanych jest ponad 700 tego typu związków, z czego około 50 wykazuje aktywność prowitaminy A [Frasar i Bramley, 2004; Ye i in., 2008]. Karotenoidy odgrywają istotną rolę w procesach widzenia, chronią skórę przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem UV, wzmacniają system immunologiczny organizmu, ponadto spowalniają procesy starzenia, przyspieszają procesy regeneracji i gojenia ran [Astorg, 1997; Krinsky i Johnson, 2005]. Organizm ludzki nie posiada zdolności syntetyzowania tych związków *de novo*, dlatego muszą być dostarczane z pożywieniem [Lorenz i Cysewski, 2000; Breithaupt, 2007]. Karotenoidy znalazły zastosowanie jako dodatki do produktów spożywczych, suplementów diety, kosmetyków, stanowią również cenny składnik pasz dla drobiu, zwierząt, ryb i skorupiaków [Błaszczyk i Sroka, 2013]. Do grupy barwników karotenoidowych o największym znaczeniu przemysłowym zalicza się obecnie β -karoten, astaksantynę i luteinę.

Ze względu na udokumentowane właściwości prozdrowotne oraz liczne możliwości zastosowania ciągle wzrasta zainteresowanie metodami pozyskiwania karotenoidów. Popyt na te związki pokrywa głównie synteza chemiczna (np. w 2004 roku – blisko 85 % całkowitego zapotrzebowania) i w znacznie mniejszym stopniu ekstrakcja z naturalnych źródeł [Sandmann, 2001; Del Campo i in., 2007; Ye i in., 2008]. Jednak w związku z panującym trendem prozdrowotnego odżywiania, a więc spożywania produktów naturalnych i mało przetworzonych, zainteresowanie konsumentów, a przez to również producentów żywności coraz bardziej skupia się na karotenoidach pochodzenia naturalnego. Ekstrakcja tych barwników z roślin często okazuje się być procesem dość kosztownym, ponadto obserwowane jest niekorzystne zjawisko polegające na zmniejszającym się lub niestabilnym dostępie do surowca, z którego uzyskiwane są te związki, w dużej mierze ze względu na zmieniające się warunki klimatyczne. Co więcej, zawartość i jakość karotenoidów może być istotnie uzależniona od danej partii surowca [Maldonado i in., 2007]. Dlatego obiecującą alternatywą wydają się być karotenoidy pochodzenia mikrobiologicznego. Grupa drobnoustrojów zdolnych do produkcji omawianych barwników obejmuje grzyby strzępkowe (*Blakeslea trispora*), algi (*Dunaliella*, *Haematococcus*), drożdże (*Phaffia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium*) oraz bakterie z rodzajów *Flavobacterium* i *Micrococcus*. Technologia pozyskiwania karotenoidów na drodze mikrobiologicznej staje się użyteczną przemysłowo, jeśli zastosowane mikroorganizmy zdolne są do biosyntezy znacznych ilości barwników oraz koszt produkcji może zostać zminimalizowany, np. przez użycie tanich surowców jako źródła węgla i azotu [Lewicka i in., 2009]. Obecnie, w niektórych krajach, β -karoten otrzymywany jest na skalę komercyjną z wykorzystaniem mikroorganizmów *Blakeslea trispora* oraz *Dunaliella salina*, natomiast astaksantyna z udziałem mikroalg *Haematococcus pluvialis* [Dufossé i in., 2005; Błaszczuk i Sroka, 2013].



Rys. 1. Typowe karotenoidy drożdży *Rhodototula*
A) torulen; B) torularodina

Drożdże z rodzaju *Rhodotorula* syntetyzują takie barwniki karotenoidowe jak β -karoten, torulen i torularodyna [Perrier i in., 1995; Maldonade i in., 2008]. Torulen – typowy karotenoid drożdży (rys. 1), wykazuje aktywność prowitaminy A i właściwości antyoksydacyjne [Maldonade i in., 2007].

Czynniki wpływające na biosyntezę karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula*

1. Światło

Jednym z czynników, który w istotny sposób może modyfikować syntezę karotenoidów w komórkach mikroorganizmów jest światło, jednakże zarówno jego natężenie, jak i czas ekspozycji optymalny do pobudzenia karotenogenezy, bywają różne dla poszczególnych grup drobnoustrojów.

Sakaki i in. [2001] w swoich doświadczeniach nad wpływem światła białego na biosyntezę karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula glutinis* wykazali, że naświetlanie hodowli intensyfikowało produkcję torularodyny. Odbywało się to jednakże kosztem zahamowania wzrostu wspomnianego mikroorganizmu. Jak pokazały badania Bhosale i Gadre [2002] ten niekorzystny efekt może zostać wyeliminowany poprzez odpowiednie dobranie warunków hodowli. Ekspozycja na światło białe w późnej fazie wzrostu logarytmicznego w niewielkim stopniu wpływała na otrzymany plon biomasy drożdży, wzmacniała jednak syntezę β -karotenu o 58% [Bhosale i Gadre, 2002]. W zależności od gatunku i szczepu drożdże *Rhodotorula* charakteryzują się różną tolerancją na światło. Zaobserwowano, że zastosowanie światła o natężeniu rzędu 5000 lx nie zaburzało wzrostu *Rhodotorula minuta* [Tada i in., 1990], podczas gdy rozwój *Rhodotorula glutinis* był wyraźnie ograniczony już przy 1000 lx [Bhosale i Gadre, 2002].

Właściwie dobrana dawka światła może zatem korzystnie wpływać na wzrost mikroorganizmów i w rezultacie wyższą koncentrację karotenoidów w przeliczeniu na jednostkę objętości hodowli. Z drugiej strony zwiększenie komórkowej zawartości tychże barwników tłumaczy się wyższą aktywnością enzymów uczestniczących w biosyntezie karotenoidów [Frengova i Beshkova 2009]. Prawdopodobnie jeden lub więcej enzymów wchodzących w szlak biosyntezy karotenoidów jest indukowanych światłem [Tada i in., 1990; Bhosale, 2004].

2. Temperatura

Temperatura jest jednym z ważniejszych czynników wpływających na wzrost mikroorganizmów. Parametr ten ma również niebagatelne znaczenie w przypadku biosyntezy barwników karotenoidowych. Uważa się, że temperatura kontroluje poziom enzymów zaangażowanych w szlak produkcji karotenoidów [Bhosale, 2004]. Simpson

i in. [1964] zaobserwowali, że w obniżonej temperaturze drożdże *Rhodotorula glutinis* syntetyzują więcej β -karotenu, podczas gdy produkcja torulenu wzrasta w warunkach podwyższonej temperatury. Zjawisko to można wytłumaczyć indukowanym wzrostem aktywności enzymów zaangażowanych w syntezę torulenu, natomiast w obniżonej temperaturze enzymy te są mniej aktywne i dlatego powstaje więcej β -karotenu [Simpson i in., 1964; Bhosale, 2004]. Doświadczenie, w którym drożdże *Rhodotorula* były inkubowane przez 21 dni w temperaturze 5°C wykazało, że w opisanych warunkach dochodzi do zablokowania produkcji torulenu i torularodiny, natomiast w komórkach akumulowany jest β -karoten [Frengova i in., 1995].

3. Odczyn środowiska

Kolejnym czynnikiem jest pH. Wpływa ono zarówno na wzrost mikroorganizmów, jak i stężenie powstających produktów ich procesów metabolicznych. Wiele badań dotyczących biosyntezy karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula* wykazało, że optymalny odczyn medium hodowlanego zwykle mieści się w zakresie pH wynoszącym 6–7 [Bhosale i Gadre, 2001a; Tinoi i in., 2005; Aksu i Eren, 2007; Malisorn i Suntornsuk, 2008].

4. Napowietrzanie

Zapewnienie odpowiedniego napowietrzania jest warunkiem koniecznym do wydajnego wzrostu mikroorganizmów tlenowych. Właściwe natlenowanie ma również istotny wpływ na proces biosyntezy karotenoidów. W przypadku drożdży *Rhodotorula* odnotowano, że parametry takie jak szybkość mieszania hodowli oraz przepływ powietrza powinny mieścić się w zakresie odpowiednio 180-190 rpm i 0,5-1,9 l/min [Bhosale i Gadre, 2001b; Bhosale i Gadre, 2002; Frengova i Beshkova, 2009].

Aksu i Eren [2007] wykazali, że zmiana szybkości napowietrzania z 0 do 2,4 vvm w sposób znaczący wzmocniła produkcję karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula glutinis*. Całkowita zawartość karotenoidów zwiększyła się z poziomu 63,4 mg/l (warunki beztlenowe) do 105,8 mg/l (szybkość napowietrzania 2,4 vvm), natomiast wydajność syntezy karotenoidów w przeliczeniu na g suchej masy komórek wynosiła odpowiednio 13,5 mg i 19,6 mg.

W innych badaniach zaobserwowano natomiast, że ilość dostarczonego tlenu może również wpływać na udział poszczególnych barwników w całkowitej puli karotenoidów. W przypadku kultury mieszanej *Rhodotorula rubra* i *Lactobacillus casei* zwiększenie szybkości przepływu powietrza nasiliło produkcję β -karotenu, ograniczyło natomiast biosyntezę torularodiny [Frengova i Beshkova, 2009].

5. Stosunek źródła węgla do azotu

Biosynteza karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula* jest ściśle powiązana zarówno ze stosunkiem C/N, jak i początkowym stężeniem węgla i azotu w medium hodowlanym. W badaniach Braunwald i in. [2013] odnotowano, że produkcja karotenoidów jest stymulowana wysokim stosunkiem zawartości węgla do azotu. Wykazano, że akumulacja karotenoidów nie była bezpośrednio sprzężona z przyrostem biomasy *Rhodotorula glutinis*. Przy proporcji C:N wynoszącej 20:1 zaobserwowano najintensywniejszy wzrost i jednocześnie najniższą zawartość karotenoidów w komórkach drożdży. Co ciekawe, w omawianych warunkach synteza β -karotenu było najwyższa spośród przetestowanych wariantów C/N, pomimo niskiej ogólnej puli otrzymanych karotenoidów. Wydaje się, że przy niskich początkowych stężeniach źródła węgla może dochodzić do ograniczenia syntezy barwników karotenoidowych, ze względu na szybkie wyczerpanie tego pierwiastka podczas hodowli. Wzrost stosunku C/N do wartości 120 spowodował wzmocnienie syntezy karotenoidów, szczególnie obserwowane w późnych etapach hodowli (120-216 h). W fazie wstępnej (do 96 h) produkcja karotenoidów przebiegała wolno, co można powiązać z hamującym wpływem wysokiego, początkowego stężenia glukozy [Braunwald i in., 2013]. Dlatego szczególnie istotne jest ustalenie optymalnej, początkowej ilości źródła węgla w korelacji z odpowiednio długim czasem hodowli. Nie bez znaczenia jest również zawartość azotu w medium hodowlanym. Przy niskim początkowym stężeniu tego pierwiastka zaobserwowano wyraźne ograniczenie produkcji karotenoidów [Somashekar i Joseph, 2000; Aksu i Eren, 2007; Braunwald i in., 2013].

6. Jony metali

Wiadomo, że niektóre dwuwartościowe jony metali (Ba^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} i Co^{2+}) stymulują wzrost drożdży *Rhodotorula glutinis* [Komemushi i in., 1994], natomiast Mahattanatavee i Kulprecha [1991] zaobserwowali, że suplementacja podłoża hodowlanego jonami miedzi, cynku oraz żelaza w znaczący sposób pobudzała syntezę karotenoidów. Bhosale i Gadre [2001b] również wykazali w swoich badaniach intensyfikację produkcji barwników karotenoidowych przez drożdże *Rhodotorula glutinis* po zastosowaniu dodatku soli wapnia, cynku i żelaza do medium hodowlanego. Wspomniane sole powodowały dwukrotny wzrost całkowitej zawartości karotenoidów.

Doświadczenia przeprowadzone przez Buzzini i in. [2005] dowiodły, że zawartość pierwiastków śladowych w podłożu hodowlanym ma wpływ na profil karotenoidów produkowanych przez drożdże *Rhodotorula graminis*. Jony Al^{3+} i Zn^{2+} stymulowały syntezę β -karotenu, natomiast Zn^{2+} i Mn^{2+} hamowały produkcję torulenu i torularodiny. Możliwe, że obecność niektórych jonów metali działa pobudzająco lub

spowalniająco na specyficzne enzymy zaangażowane w biosyntezę karotenoidów [Frengova i Beshkova, 2009].

7. Dodatek aktywatorów

Dowiedziano, że niektóre związki, takie jak oleje, rozpuszczalniki organiczne (m.in. etanol, metanol, izopropanol), detergenty, surfaktanty wzmacniają produkcję karotenoidów [Kim i in., 1997; Bhosale, 2004]. W przypadku drożdży z rodzaju *Rhodotorula* efekt taki zaobserwowano po zastosowaniu oleju bawełnianego [Asku i Eren, 2005; Aksu i Eren, 2007]. Bez dodatku aktywatora ogólna pula karotenoidów produkowanych przez *Rhodotorula mucilaginosa* wynosiła 39,5 mg/l, a w obecności oleju bawełnianego 57,6 mg/l [Asku i Eren, 2005].

Z kolei badania Margalith i Meydav [1968] wykazały, że suplementacja podłoża etanolem (2% (v/v)) nasiliła produkcję β -karotenu i torulenu, natomiast synteza torularodiny została zahamowana.

Stabnikowa i in. [1979] zastosowali etanol w stężeniu 3,6% jako jedyne źródło węgla w medium hodowlanym i odnotowali wzrost drożdży *Rhodotorula glutinis* oraz nasiloną produkcję β -karotenu. Omawiany alkohol prawdopodobnie wpływa hamująco na proces utleniania torulenu oraz stymulująco na syntezę β -karotenu [Bhosale, 2004].

W innych doświadczeniach zaobserwowano, że zawartość β -karotenu w komórkach *Rhodotorula glutinis* wzrastała aż o 35%, gdy medium hodowlane zawierało fenol w stężeniu 500 ppm. Zwiększenie ilości fenolu w podłożu powodowało ograniczenie syntezy torularodiny, podczas gdy zawartość torulenu pozostawała na stałym poziomie [Kim i in., 2004].

Antybiotyki również mogą wpływać na biosyntezę barwników karotenoidowych. Badania przeprowadzone przez Margalith i Meydav [1968] wykazały, że chloramfenikol w stężeniu 1 mg/l intensyfikował syntezę karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula mucilaginosa*.

Suplementacja medium hodowlanego z użyciem surfaktantów może prowadzić do zmiany właściwości fizjologicznych mikroorganizmów, pobudzić ich wzrost, nasilić produkcję metabolitów, a także zmienić przepuszczalność błon komórkowych [Saenge i in., 2011]. Spośród trzech testowanych surfaktantów, takich jak Tween 20, Tween 80 i guma arabska, tylko pierwszy z wymienionych wzmacniał zarówno produkcję karotenoidów, jak i lipidów przez drożdże *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 [Saenge i in., 2011].

Podsumowanie

Popyt rynku na barwniki karotenoidowe w przeważającym stopniu pokrywa technologia oparta na syntezie chemicznej. Jednak w związku z obserwowanym

zainteresowaniem konsumentów zdrową żywnością oraz powszechnym przekonaniem o szkodliwości syntetycznych barwników ciągle wzrasta zapotrzebowania na naturalne karotenoidy. Dlatego coraz większego znaczenie nabiera możliwość produkcji tych związków z udziałem mikroorganizmów. Ten sposób pozyskiwania karotenoidów uznawany jest za bardziej wydajną i efektywniejszą metodę w porównaniu z ekstrakcją z roślin, która często okazuje się być procesem kosztownym. Wśród mikroorganizmów zdolnych do biosyntezy karotenoidów, obiecującym źródłem tych barwników wydają się być drożdże, w tym te z rodzaju *Rhodotorula*. Jako szczególne zalety ich zastosowania w mikrobiologicznej syntezie karotenoidów można wymienić m.in. zdolność szybkiego namnażania, a także możliwość wykorzystania tanich surowców odpadowych jako źródła składników pokarmowych. Poza wyborem odpowiednich szczepów charakteryzujących się intensywną biosyntezą karotenoidów, w celu uzyskania satysfakcjonujących wydajności pożądanego produktu konieczne jest również dobranie optymalnych warunków prowadzenia hodowli.

Literatura

1. Aksu Z., Eren A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastws as a carbon source. *Process Biochem.*, 2005, 40, 2985-2991.
2. Aksu Z., Eren A.T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochem. Eng. J.*, 2007, 35, 107-113.
3. Astorg, P. Food carotenoids and cancer prevention. An overview of current research. *Trends Food Sci. Technol.*, 1997, 8, 406-413.
4. Bhosale P. Enviromental and culture stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 63, 351-361.
5. Bhosale P., Gadre R.V. β -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2001a, 26, 327-332.
6. Bhosale P. Gadre R.V. Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001b, 55, 423-427.
7. Bhosale P., Gadre R.V. Manipulation of temperature and illumination condition for enhanced β -carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002, 34, 349-353.
8. Błaszczuk U., Sroka P. Mikrobiologiczna produkcja karotenoidów. *Przemysł Spożywczy*, 2013, 5, 32-35.
9. Braunwald T., Schwemmlin L., Graeff-Hönninger S., French W.T., Hernandez R., Holmes W.E., Claupein W. Effect of different C/N ratios on carotenoids and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97, 6581-6588.

10. Breithaupt D.E. Modern application of xanthophylls in animal feeding – a review. *Trends in Food Science and Technology*, 2007, 18, 501-506.
11. Buzzini P., Martini A., Gaetani M., Turchetti B., Pagnoni U.M., Davoli P. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 36, 687-692.
12. Del Campo J.A., Garcia-Gonzales M., Guerrero M.G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74, 1163-1174.
13. Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Arad S.M., Blanc P., Murthy C.K.N., Ravishankar G.A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, 16, 389-406.
14. Fraser P.D., Bramley P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.*, 2004, 43, 228-265.
15. Frengova G.I., Beshkova D.M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Pfaffia*: yeast of biotechnological importance. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 36, 163-180.
16. Frengova G., Simova E., Beshkova K. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lactic acid in whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Lett.*, 1995, 17, 1001-1006.
17. Kim B.K., Park P.K., Chae H.J., Kim E.Y. Effect of phenol on β -carotene content in total carotenoids production in cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Korean J. Chem. Eng.*, 2004, 21, 689-692.
18. Kim S., Seo W., Park Y. Enhanced synthesis of trisporic acid and β -carotene production in *Blakeslea trispora* by addition of a non-ionic surfactant, Span 20. *J. Ferment. Bioeng.*, 1997, 4, 330-332.
19. Komemushi S., Sakaki H., Yokoyama H., Fujita T. Effect of barium and other metals on the growth of a D-lactic acid assimilating yeast *Rhodotorula glutinis* N21. *J. Antibact. Antifung. Agt.*, 1994, 22, 583-587.
20. Krinsky N.I., Johnson E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.*, 2005, 459-516.
21. Lewicka A., Błażej S., Migdał M. Tradycyjne i nowe kierunki biotechnologicznego wykorzystania drożdży z rodzaju *Rhodotorula*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, 3(64), 19-31.
22. Lorenz R.T., Cysewski G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.*, 2000, 18, 160-167.

23. Mahattanatavee K., Kulprecha S. Production of β -carotene by *Rhodotorula* sp. Y1621. *Microbial Utiliz. Renew. Resources*, 1991, 7, 295-300.
24. Maldonade I.R., Rodriguez-Amaya D.B. Scamparini A.R.P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chem.*, 2008, 107, 145-150.
25. Maldonade I.R., Scamparini A.R.P., Rodriguez-Amaya D.B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeast from Campinas region, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 2007, 38, 65-70.
26. Malisorn C., Suntornsuk W. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresour. Technol.*, 2008, 99, 2281-2287.
27. Margalith P., Meydav S. Carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Phytochemistry*, 1968, 7, 765-768.
28. Perrier V., Dubreucq E., Galzy P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch. Microbiol.*, 1995, 164, 173-179.
29. Saenge C., Cheirsilp B., Suksaroge T.T., Bourtoom T. Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2011, 16 23-33.
30. Sakaki H., Nakanishi T., Tada A., Miki W., Komemushi S. Activation of thorularodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, 92, 294-297.
31. Sandmann G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6, 14-17.
32. Simpson K.L., Nakayama T.O.M., Chichester C.O. Biosynthesis of yeast carotenoids. *J. Bacteriol.*, 1964, 88, 1688-1694.
33. Somashekar D., Joseph R. Inverse relation between carotenoids and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 16, 491-493.
34. Stabnikowa E.V. Slyusarenko T.P., Burik M.A., Polishchuk G.I. Optimization of the nutrient medium for the cultivation of carotene-forming yeast. *Kharchova Promislovist*, 1979, 25, 55-59.
35. Tada M., Tsubouchi M., Matsuo K., Takimoto H., Kimura Y., Takagi S. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta*. VIII. Effect of mevinolin on photoinduced carotenogenesis. *Plant Cell Physiol.*, 1990, 23, 319-323.
36. Tinoi J., Rakariyatham N., Deming R.L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochem.*, 2005, 40, 2551-2557.

37. Ye Z.W., Jiang J.G., Wu G.H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnol. Adv.*, 2008, 26, 352-360.

Źródło finansowania DS3700/WTŹ/2013-2014

WPŁYW CZASU HYDROLIZY NA SPEKTRUM OLIGOSACHARYDOWE MALTODEKSTRYN ZIEMNIACZANYCH

Streszczenie

Maltodekstryny jako produkty częściowej hydrolizy enzymatycznej skrobi charakteryzowane są przy użyciu uniwersalnego parametru jakim jest równoważnik glukozowy DE (ang. *dextrose equivalent*). Stopień hydrolizy enzymatycznej ma istotny wpływ na właściwości oraz skład chemiczny maltodekstryn. Hydrolizaty charakteryzujące się tymi samymi wartościami równoważnika glukozowego mogą wykazywać odmienne spektrum oligosacharydowe. Celem niniejszej pracy była ocena wpływu zastosowanego czasu hydrolizy enzymatycznej skrobi na spektrum oligosacharydowe maltodekstryn ziemniaczanych różniących się pod względem wartości równoważnika glukozowego DE. Analizę spektrum oligosacharydowego maltodekstryn ziemniaczanych o DE 6, 11 oraz 16 otrzymanych metodą laboratoryjną wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem detektora refraktometrycznego (RI). Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, że analizowane maltodekstryny w zależności od zastosowanego czasu hydrolizy a tym samym od stopnia scukrzenia różniły się pod względem składu cukrów. Najniższą zawartość glukozy stwierdzono w przypadku maltodekstryny o stopniu scukrzenia DE 6. Udział procentowy poszczególnych frakcji DP1-DP5 wzrastał w miarę wydłużania czasu hydrolizy enzymatycznej. Wraz ze wzrostem stopnia scukrzenia malał procentowy udział frakcji wysoko spolimeryzowanych oligosacharydów oraz cukrów wyższych (>DP5).

Słowa kluczowe: maltodekstryna, spektrum oligosacharydowe, hydroliza enzymatyczna.

Summary:

Maltodextrins that the enzymatic partial hydrolysis products of starch are characterized by using a universal parameter, which is the dextrose equivalent DE. The degree of enzymatic hydrolysis are a significant influence on the properties and chemical composition of maltodextrins. The hydrolysates are characterized by the same values dextrose equivalent spectrum may exhibit distinct oligosaccharides. The aim of this study was to evaluate the impact of the applied time of enzymatic hydrolysis of starch on the potato maltodextrins spectrum of oligosaccharide differ in terms of the value of dextrose

equivalent DE. Oligosaccharide spectrum analysis of potato maltodextrins with a DE of 6, 11 and 16 received by the laboratory method's was made using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using refractometric detector (RI). Based on the results of the study found that maltodextrin analyzed depending on the applied time of hydrolysis and thereby the degree of saccharification differ in composition sugars. The lowest concentration of glucose was found in the degree of saccharification maltodextrin DE 6. Percentage of individual DP1-DP5 increase as lengthening the time of enzymatic hydrolysis. With the increasing percentage of saccharification decreasing fraction of highly polymerized higher oligosaccharides and sugars (> DP5).

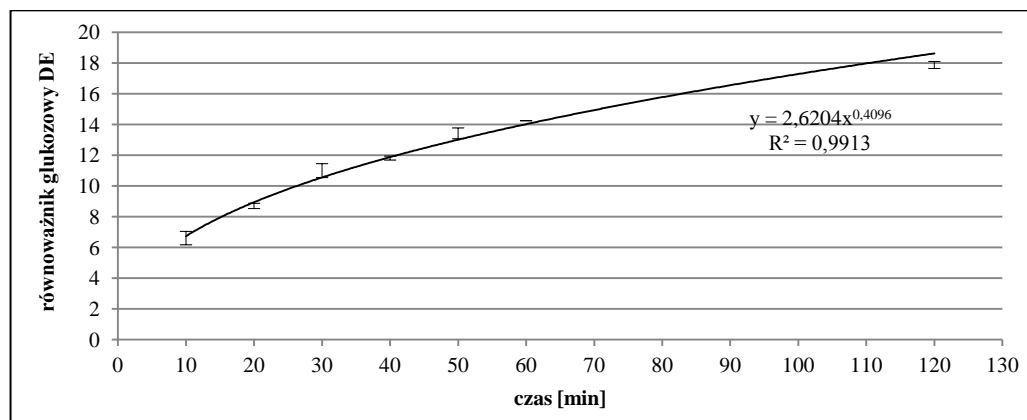
Key words: maltodextrin, oligosaccharide spectrum, enzymatic hydrolysis.

Wprowadzenie

Maltodekstryny jako produkty częściowej hydrolizy enzymatycznej skrobi charakteryzowane są przy użyciu uniwersalnego parametru jakim jest równoważnik glukozowy DE (ang. *dextrose equivalent*). Określa on procentowy udział cukrów redukujących, wyrażonych jako glukoza, w przeliczeniu na suchą masę produktu. Przyjęto, że mianem maltodekstryn charakteryzuje się produkty hydrolizy skrobi o równoważniku glukozowym mniejszym niż 20 [Wang i Wang, 2000; Krzyżaniak i in., 2003; Tur i in., 2004]. Pod względem fizycznym mają one postać białego proszku, dobrze rozpuszczalnego w wodzie, a w zależności od wartości DE wykazują smak słodki [Fortuna i Sobolewska, 2000]. Na ogół do przemysłowej produkcji maltodekstryn stosuje się skrobię ziemniaczaną, kukurydzianą lub pszeną [Nebesny, 1993]. Hydrolizaty te powstają w wyniku zastosowania enzymów amylolitycznych, które w różny sposób mogą hydrolizować skrobię. Przy czym końcowy efekt ich działania jest funkcją licznych czynników takich jak czas, temperatura, wartość pH, obecność jonów oraz rodzaju i stężenia zastosowanych enzymów [Nebesny, 1993; Krzyżaniak i in., 2003]. Charakter prowadzenia hydrolizy enzymatycznej wpływa na skład chemiczny oraz właściwości uzyskanych hydrolizatów. Dla przykładu α -amylaza bakteryjna należąca do endoamylaz katalizuje jedynie rozkład wiązań α -1,4-glikozydowych frakcji amylozy oraz amylopektyny [Nebesny, 1993]. Stopień hydrolizy enzymatycznej ma istotny wpływ na właściwości oraz skład chemiczny maltodekstryn. Hydrolizaty charakteryzujące się tymi samymi wartościami równoważnika glukozowego mogą wykazywać odmienne spektrum oligosacharydowe oraz właściwości fizykochemiczne. Dodatkowym czynnikiem kształtującym skład chemiczny maltodekstryn są właściwości skrobi poddanej enzymatycznej hydrolizie (stopień rozgałęzienia, zawartość amylozy, obecność składników nieskrobiowych) [Kołodziej, 1995; Udomrati i in., 2011].

Material i metody badań

Materiał badawczy stanowiły maltodekstryny ziemniaczane (MSZ) otrzymane metodą laboratoryjną o trzech różnych stopniach scukrzenia DE 6, 11 oraz 16. Zastosowana metoda laboratoryjna polegała na zadaniu zawiesiny skrobi ziemniaczanej Superior Standard (Luboń) dawką enzymu amylolitycznego α -amylazy bakteryjnej o handlowej nazwie BAN 480L (Novozymes) w ilości 25 μ l. Hydrolizę enzymatyczną prowadzono przez czas zależny od uzyskania pożądanego stopnia scukrzenia skrobi. Stosowany czas hydrolizy skrobi przy użyciu enzymu amylolitycznego został wyznaczony doświadczalnie. Procedura ta polegała na zadaniu zawiesiny skrobiowej dawką enzymu α -amylazy bakteryjnej i prowadzeniu hydrolizy przez 10, 20, 30, 40, 50, 60 oraz 120 minut. Oprócz czasu hydrolizy pozostałe parametry takie jak pH, stężenie skrobi oraz enzymu był stałe. Działanie enzymu było przerywane termicznie poprzez podnoszenie temperatury roztworu do 95°C. Poszczególne hydrolizy zostały przeprowadzone w dwóch powtórzeniach. W maltodekstrynach uzyskanych w wyniku poszczególnych hydroliz zostały wyznaczone wartości równoważnika glukozowego DE metodą Schoorla-Rebengobena [PN-78/A-74701]. Na tej podstawie wykreślono zależność równoważnika glukozowego DE od czasu prowadzonej hydrolizy (rys. 1).



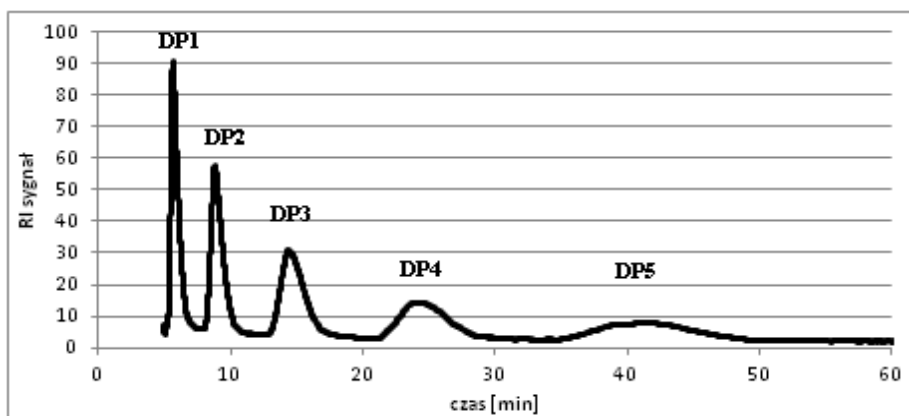
Rysunek 1. Krzywa hydrolizy enzymatycznej naturalnej skrobi ziemniaczanej

W oparciu o opisaną zależność dopasowano równanie matematyczne, przy użyciu którego obliczono niezbędny czas prowadzenia hydrolizy enzymatycznej w celu uzyskania hydrolizatów o pożądanym stopniu scukrzenia (tab.1).

Otrzymane hydrolizaty były suszone metodą liofilizacyjną przy użyciu liofilizatora ALPHA 1-2 LD *plus* a następnie rozdrabniane w młynku i przesiewane przez sito o średnicy oczek 200 μ m.

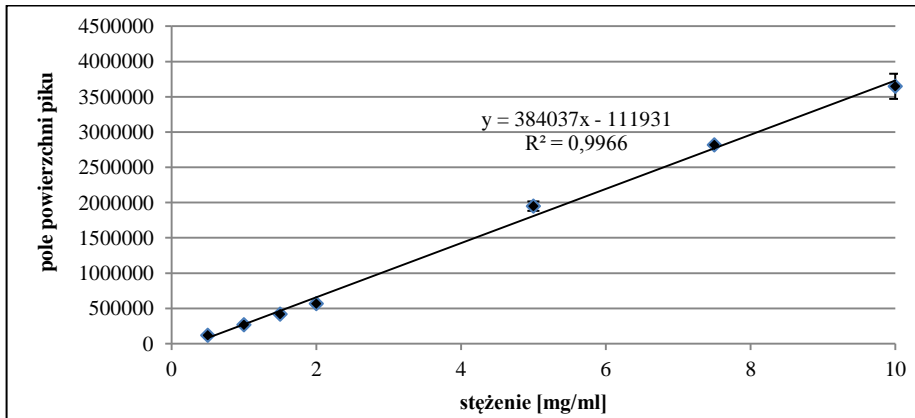
Analizę składu sacharydowego badanych hydrolizatów przeprowadzono z zastosowaniem chromatografu LaChrom firmy MERCK HITACHI (Japonia)

wyposażonego w detektor refraktometryczny (RI) oraz kolumnę o długości 250 mm oraz średnicy wewnętrznej 4.6µm z wypełnieniem typu Purospher STAR NH₂. Kolumna, w której następował rozdział cukrów była poprzedzona prekolumną Purospher STAR wypełnioną złożem o średnicy 5 µm. Jako eluent zastosowano mieszaninę acetonitrylu (CH₃CN) – woda dejonizowana w proporcji (80:20, v/v). Optymalne warunki rozdziału uzyskano w temperaturze 30 °C, przy szybkości przepływu eluentu o wartości 1,000 ml/min. Objętość nastrzykiwanej próbki wynosiła 20µl. Rejestrację danych przeprowadzono przy pomocy programu D-700 HSM. Rozdział chromatograficzny właściwych próbek został poprzedzony analizą rozdziału substancji wzorcowych o różnych stopniach polimeryzacji (DP): DP1 (glukoza krystaliczna), DP2 (maltoza), DP3 (maltotrioza), DP4 (maltotetraoza), DP5 (maltopentaoza). Pozwoliło to na uzyskanie chromatogramu obrazującego czasy retencji oraz pola powierzchni pików pochodzących od poszczególnych wzorców w zależności od ich stężenia (rys. 2).



Rysunek 2. Chromatogram mieszaniny substancji wzorcowych DP1-DP5

Wzorce do analizy spektrum oligosacharydowego pochodziły z następujących firm: ChemPur (DP1, DP2), Sigma Aldrich (DP3, DP4, DP5). Każdy rozdzielany wzorec sacharydowy charakteryzuje się indywidualnym czasem retencji, na podstawie którego identyfikowano sacharydy w badanych maltodekstrynach. Dla wzorców DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 czasy retencji wynosiły odpowiednio 5, 8, 12, 20 oraz 40 min. Próbkę wzorców po uprzednim przygotowaniu zostały rozdzielone przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Na podstawie zależności pola powierzchni pików poszczególnych wzorców od ich stężenia sporządzono krzywe wzorcowe. Przykładową krzywą dla roztworu wzorcowego glukozy przedstawiono na rysunku 3.



Rysunek 3. Krzywa wzorcową dla roztworu glukozy (DP1)

Zawartość poszczególnych cukrów w badanych maltodekstrynach obliczano na podstawie równania krzywej wzorcowej dla cukrów wzorcowych o kolejnych stopniach polimeryzacji (DP). Wynik końcowy [%] uwzględniał stężenie roztworu podstawowego oraz zawartość suchej masy. Dodatkowo obliczono zawartość procentową pozostałych sacharydów o DP>5 na podstawie różnicy całkowitej zawartości cukrów oraz sumy procentowych zawartości cukrów DP1-DP5.

W celu wyznaczenia spektrum oligosacharydowego badanych maltodekstryn na bazie naturalnej skrobi ziemniaczanej o różnym stopniu scukrzenia sporządzono 100 cm³ roztworu maltodekstryn o stężeniu 10 %. Po upływie 15 minut roztwór przesączono przez sączek bibułowy. Następnie przesącz ponownie przefiltrowano do suchej próbki przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μm.

Wszystkie analizy zostały wykonane w trzech powtórzeniach, dla poszczególnych wyników obliczono średnie oraz wartości odchyłeń standardowych. W celu oceny istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Duncana na poziomie istotności α=0,05.

Wyniki i dyskusja

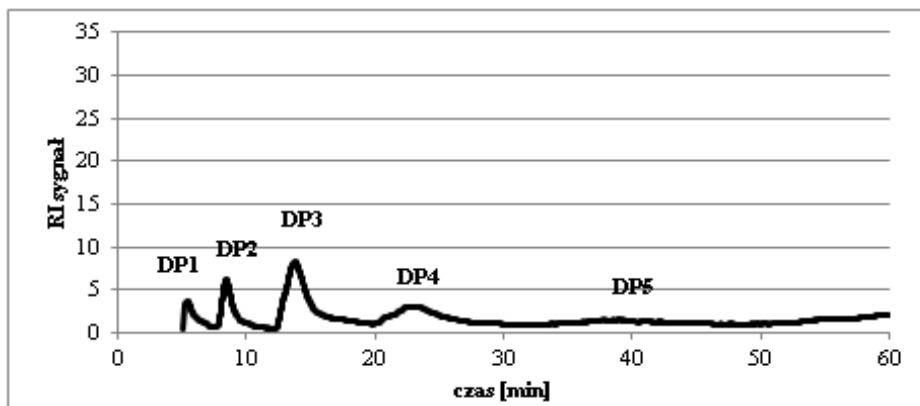
Skrobia naturalna uważana jest za najstarszy biotechnologiczny materiał w historii ludzkości. Jedną z wielu możliwych metod jej modyfikacji jest rozkład pod wpływem enzymów. Kinetyka enzymatycznej degradacji skrobi mierzona jest poprzez pomiar stopnia jej depolimeryzacji, wartości masy cząsteczkowej oraz stężenia cukrów redukujących [Heitmann i in., 1997]. Hydroliza enzymatyczna skrobi ziemniaczanej przy zastosowaniu preparatu enzymatycznego α-amylazy bakteryjnej pozwoliła na uzyskanie hydrolizatów o pożądanych stopniach depolimeryzacji. Do otrzymywania maltodekstryn stosuje się głównie enzymy amylolityczne z grupy endoglikanaz takie jak α-amylazy bakteryjne i pleśniowe, pullulanazy oraz izoamylazy. Jakkolwiek ze względu

na wymagany, niski stopień depolimeryzacji skrobi do otrzymywania omawianych hydrolizatów nie stosuje się egzo-glukanaz [Krzyżaniak i in., 2003]. Stosując stałe warunki dla wszystkich przemian enzymatycznych a sterując jedynie czasem hydrolizy uzyskano maltodekstryny o stopniu scukrzenia DE 6, 11 oraz 16. W tabeli 1 zebrano czas przez jaki prowadzono hydrolizę skrobi z zastosowaniem optymalnych warunków dla enzymów amylolitycznych. Niezbędny czas hydrolizy enzymatycznej został obliczony na podstawie wyznaczonego eksperymentalnie równania (rys. 1). W oparciu o wyniki badań można stwierdzić, że w miarę wydłużania czasu hydrolizy enzymatycznej stopień depolimeryzacji skrobi wzrastał czego efektem był wzrost wartości równoważnika glukozowego DE, przy czym intensywny wzrost DE obserwowano w ciągu pierwszych 60 minut hydrolizy. Dalszy przyrost redukcyjności skrobi nie był tak intensywny (rys. 1).

Tabela 1. Czas hydrolizy enzymatycznej skrobi ziemniaczanej niezbędny do otrzymania hydrolizatów o założonym stopniu scukrzenia

próbka	stopień scukrzenia (DE)		
	6	11	16
	czas hydrolizy enzymatycznej [min.]		
MSZ	8,5	31,7	85,3

Celem pracy było określenie wpływu stopnia modyfikacji enzymatycznej skrobi na skład chemiczny otrzymanych maltodekstryn różniących się pomiędzy sobą stopniem scukrzenia wyrażonym w wartościach DE. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają hipotezę, która zakładała wpływ czasu hydrolizy enzymatycznej skrobi na spektrum oligosacharydowe hydrolizatów skrobiowych. Jak oczekiwano wydłużanie czasu hydrolizy wpłynęło znacząco na wzrost zawartości cukrów o niskim stopniu polimeryzacji w maltodekstrynach. Wielkości pików poszczególnych sacharydów na chromatogramie roztworu maltodekstryny o DE 6 wskazują na niewielki stopień hydrolizy enzymatycznej (rys. 4).



Rysunek 4. Chromatogram roztworu maltodekstryny na bazie skrobi naturalnej o stopniu scukrzenia DE 6

W tabeli 2 zebrano średnie procentowe zawartości poszczególnych oligosacharydów oznaczonych przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

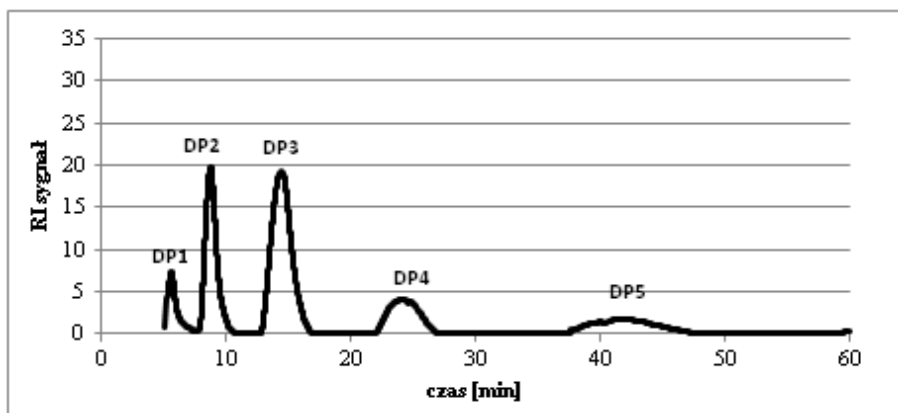
Tabela 2. Skład węglowodanowy badanych maltodekstryn ziemniaczanych o różnym stopniu depolimeryzacji

DE	zawartość cukrów [%]					
	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP>5
6	0,35 ^a ±0,01	0,84 ^a ±0,04	3,98 ^a ±0,11	2,21 ^a ±0,04	2,66 ^a ±0,08	89,96
11	0,47 ^b ±0,00	2,74 ^b ±0,11	6,79 ^b ±0,31	4,62 ^b ±0,07	3,98 ^b ±0,15	81,40
16	1,71 ^c ±0,07	5,44 ^c ±0,19	9,01 ^c ±0,26	7,12 ^c ±0,35	6,33 ^c ±0,13	70,39

średnie wartości oznaczone w kolumnach tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

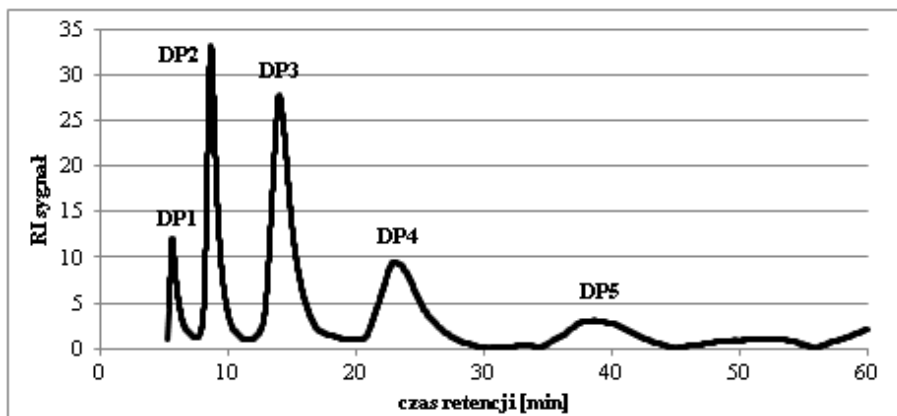
Przeprowadzona analiza chromatograficzna jednoznacznie wykazała różnice w składzie węglowodanowym pomiędzy maltodekstrynami różniącymi się pomiędzy sobą pod względem stopnia depolimeryzacji. W przypadku maltodekstryny o stopniu scukrzenia DE 6 stwierdzono, niewielką zawartość glukozy (DP1) wynoszącą 0,35% oraz najwyższą zawartość cukrów wysoko spolimeryzowanych oraz długołańcuchowych oligosacharydów (DP>5). Na uwagę zasługuje stosunkowo wysoka zawartość frakcji maltotriozy (DP3) oraz maltotetraozy (DP4) w porównaniu do glukozy (tab. 2). Wartości te znajdują potwierdzenie w analizie chromatogramu obrazującego rozdział poszczególnych frakcji (DP1-DP5). Przy czym w miarę wzrostu stopnia depolimeryzacji skrobi, uległa obniżeniu procentowa zawartości wysoko spolimeryzowanych cukrów o DP>5. Równoważnik glukozowy DE jest parametrem charakteryzującym maltodekstryny pod względem stopnia scukrzenia. Opisuje on przybliżoną zawartość cukrów w przeliczeniu na glukozę [Kołodziej, 1995; Wang i Wang, 2000]. Jednak zdaniem badaczy [Krzyżaniak i in., 2003] równoważnik glukozowy nie w pełni charakteryzuje spektrum oligosacharydowe maltodekstryn, gdyż hydrolizaty o tej samej

wartości stopnia scukrzenia wykazują odmienne zawartości poszczególnych cukrów o różnym stopniu polimeryzacji. Przytoczona obserwacja znajduje odzwierciedlenie w analizie porównawczej spektrum sacharydowego handlowego preparatu maltodekstryny ziemniaczanej o nazwie Paselli MD10. Omawiany preparat charakteryzował się równoważnikiem glukozowym DE 5,9, tak więc jego wartości była bardzo zbliżona ze stopniem scukrzenia badanych maltodekstryn DE 6. Jak podaje Wang i Wang [2000] zawartość glukozy w handlowym preparacie wynosiła 0,64%, maltozy 1,47%, maltotriozy 2,84%, maltotetraozy 1,57%, maltopentaozy 2,45%, a pozostałych cukrów o stopniu polimeryzacji (DP>5) 91,03%. Skład chemiczny preparatu Paselli MD10 różni się istotnie od zawartości cukrów oznaczonych w hydrolizacie ziemniaczanym o DE 6. Pomimo zbliżonych wartości DE zawartości poszczególnych frakcji cukrów są różne. Przyczyną takiego stanu może być zastosowanie innych preparatów enzymatycznych oraz odmienna metoda scukrzenia skrobi. Ponadto Tur i in. [2004] stwierdzili, że na spektrum oligosacharydowe maltodekstryn istotny wpływ ma rodzaj obróbki termicznej skrobi. Jak podają przytoczeni badacze maltodekstryny na bazie skrobi ekstrudowanej charakteryzowały się dużo wyższą zawartością cukrów o stopniu polimeryzacji DP3-DP8 i była dużo wyższa w porównaniu do maltodekstryny otrzymanej ze skrobi poddanej autoklawowaniu. Podobną prawidłowość zauważył w swoich badaniach Krzyżaniak i in. [2003]. Analizując skład sacharydowy maltodekstryny na bazie skrobi ziemniaczanej o równoważniku glukozowym DE 11 na uwagę zasługują dużo wyższe zawartości wszystkich analizowanych cukrów o stopniu polimeryzacji DP1-DP5 (tab. 2). Analiza chromatograficzna maltodekstryny o DE 11 wykazała wyższą zawartości glukozy, maltozy, maltotriozy, maltotetraozy oraz maltopentaozy w porównaniu do hydrolizatu o niższym stopniu scukrzenia. Dane te znajdują potwierdzenie w wartościach wysokości pików chromatograficznych obrazujących stężenia poszczególnych cukrów (rys. 5).



Rysunek 5. Chromatogram roztworu maltodekstryny na bazie skrobi naturalnej o stopniu scukrzenia DE 11

Stopień scukrzenia hydrolizatu DE 11 został uzyskany dzięki dłuższej ekspozycji kleiku skrobiowego na działanie enzymu amylolitycznego (tab. 1). Znamiennym efektem takiego stanu są wyższe zawartości cukrów w porównaniu do hydrolizatu o DE 6 (tab. 2). Podobną prawidłowość zauważyła Nebesny [1993]. Stwierdziła ona, że procentowa zawartość poszczególnych frakcji spektrum oligosacharydowego wzrastała w miarę postępu hydrolizy enzymatycznej. Maltodekstryna ziemniaczana o stopniu scukrzenia DE 16 charakteryzowała się najwyższymi zawartościami poszczególnych cukrów DP1-DP5 spośród wszystkich badanych maltodekstryn oraz jednocześnie najniższą zawartością procentową cukrów wysoko spolimeryzowanych o DP>5 (tab. 2). Dane liczbowe znajdują potwierdzenie w wielkościach pików chromatograficznych odzwierciedlających stężenia poszczególnych cukrów DP1-DP5 (rys.6).



Rysunek 6. Chromatogram roztworu maltodekstryny na bazie skrobi naturalnej o stopniu scukrzenia DE 16

Równoważnik glukozy omawianej maltodekstryny charakteryzuje preparat otrzymany w wyniku hydrolizy trwającej najdłuższy okres czasu spośród wszystkich analizowanych (tab. 1). Dzięki dłuższej ekspozycji kleiku skrobiowego na działanie enzymu powstało więcej cukrów o różnym stopniu depolimeryzacji. Jak podaje Nebesny [1989] skład sacharydowy maltodekstryn otrzymanych w toku hydrolizy enzymatycznej jest uzależniony nie tylko od wartości równoważnika glukozy, ale także od rodzaju zastosowanych enzymów oraz ich wzajemnych proporcji.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w miarę wzrostu czasu hydrolizy enzymatycznej skrobi ziemniaczanej wzrastał jej stopień depolimeryzacji. Enzymatyczna modyfikacja skrobi ziemniaczanej wpłynęła znacząco na spektrum oligosacharydowe otrzymanych maltodekstryn przy czym wraz ze wzrostem czasu hydrolizy enzymatycznej wzrastała wartość równoważnika glukozy DE,

obrazującego stopień depolimeryzacji skrobi. Analiza z wykorzystaniem chromatografii cieczerwowej (HPLC) wykazała, że maltodekstryny o stopniu scukrzenia DE 6, 11 oraz 16 różniły się statystycznie istotnie pod względem składu cukrowego. Maltodekstryna o równoważniku glukozowym DE 6 charakteryzowała się najniższą zawartością cukrów o niskim stopniu polimeryzacji DP<5 oraz najwyższą zawartością cukrów wysoko spolimeryzowanych DP>5. Niemniej jednak spektrum oligosacharydowe maltodekstryny o DE 16 znacząco różniło się od składu cukrów w maltodekstrynach o równoważniku glukozowym DE 6 oraz 11.

Literatura

1. Fortuna T., Sobolewska J. Maltodekstryny i ich wykorzystanie w przemyśle spożywczym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, 2(23), 100-109.
2. Heitmann T., Wenzing E., Mersmann A. Characterization of three different potato starches and kinetics of their enzymatic hydrolysis by an α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20, 259-267.
3. Kołodziej Z. Maltodekstryny i ich znaczenie żywieniowe. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1995, 3(4), 9-13.
4. Krzyżaniak W., Olesienkiewicz A., Białas W., Słomińska L., Jankowski T., Grajek W. Charakterystyka maltodekstryn o małym równoważniku glukozowym otrzymanych przez hydrolizę enzymatyczną skrobi ziemniaczanej za pomocą alfa - amylazy. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 2003, 2(2), 5-15.
5. Nebesny E. Carbohydrate composition and molecular structure of dextrans in enzymatic high conversion starch syrups. *Starch/Stärke*, 1989, 41(11), 431-435.
6. Nebesny E. Changes of carbohydrate compositions during enzymatic hydrolysis of starches of various origin. *Starch/Stärke*, 1993, 45(12), 426-429.
7. Polska Norma PN-78/A-74701. Hydrolizaty skrobiowe (krochmalowe). Metodyka badań.
8. Przetaczek-Rożnowska I., Fortuna T. Wpływ ogrzewania mikrofalowego na zmianę wybranych właściwości maltodekstryn. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 2(69), 111-131.
9. Tur W., Szczepanik E., Krzyżaniak W., Białas W., Grajek W. Charakterystyka maltodekstryn otrzymanych ze skrobi ziemniaczanej przy użyciu preparatów amylolitycznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, 4(41), 79-94.
10. Udomrati S., Ikeda S., Gohtani S. The effect of tapioca maltodextrins on the stability of oil-in-water emulsions. *Starch/Stärke*, 2011, 63, 347-353.
11. Wang Y.J., Wang L. Structures and properties of commercial maltodextrines from corn, potato and rice starches. *Starch/Stärke*, 2000, 52, 296-304.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/N/NZ9/01604

CHARAKTERYSTYKA TERMODYNAMICZNA KLEIKOWANIA SKROBI ZIEMNIACZANEJ W OBECNOŚCI MIESZANINY HYDROKOLIDÓW NIESKROBIOWYCH: INULINY, PEKTYNY I GUMY GUAR

Wprowadzenie

Inulina jest biopolimerem, stanowiącym materiał zapasowy roślin, o interesujących właściwościach funkcjonalnych i prozdrowotnych [Meyer i in., 2011; Praznik i in., 2002; Juszcak i in., 2012]. Zbudowana jest z reszt fruktozowych połączonych wiązaniami $\beta(2,1)$ -glikozydowymi, zakończonych pojedynczymi cząstkami glukozy. Występuje w takich roślinach jak np.: cykoria, cebula, czosnek, topinambur, słonecznik bulwiasty, mniszek lekarski, oman wielki, pomidory, banany, pszenica [Trabs i in., 2011; Ślizewska i in., 2013; Nowak i in., 2012]. Właściwości inuliny uzależnione są od stopnia polimeryzacji i charakteru wiązań, które warunkowane są źródłem pochodzenia inuliny [Trabs i in., Ślizewska i in., 2013]. Ze względu na jej właściwości prowadzonych jest coraz więcej badań na temat możliwości wykorzystania inuliny w różnych produktach spożywczych. Wymienić tu można produkty mleczne [Glibowski i Kowalska, 2012; Tárrega i in., 2011], pieczywo tradycyjne i bezglutenowe [Juszcak i in., 2012, Ziobro i in., 2013, Morris i Morris, 2012], czekolada [Aidoo, 2014], produkty mięsne [Menegas, 2013] i wiele innych.

Pomimo, iż inulina występuje w wielu z tych układów w połączeniu ze skrobią oraz hydrokolidami nieskrobiowymi, brak jest prac próbujących wyjaśniać wzajemne oddziaływanie pomiędzy poszczególnymi składnikami w układach modelowych. Wymienić tu można pracę Zimeri i Kokini [2003a; 2003b] oraz Witczak i in. [2014]. Dotyczą one jednak w głównej mierze właściwości reologicznych w układach dwu lub trójskładnikowych. Dlatego celem niniejszej pracy była analiza wzajemnych oddziaływań pomiędzy inuliną i hydrokoloidami nieskrobiowymi (pektyną i gumą guar) oraz ich wpływu na charakterystykę termodynamiczną kleikowania skrobi ziemniaczanej.

Materialy

W badaniach wykorzystano skrobię ziemniaczaną (Trzemeszno S.A., Polska), pektynę (Hortimex, Polska), gumę guar (Regis, Polska) oraz wysokowydajną inulinę HPX (DP>23) (BNEO-Orafti, Belgia). Analizie poddano mieszaniny suchych składników z wodą w stosunku 1:3. Suche składniki zawierały 95 % skrobi ziemniaczanej

i 5 % układu trójskładnikowego, którego skład określono na bazie eksperymentu sympleksowo – kratowego. Skład poszczególnych układów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład badanych układów

Próbka	Udział składników			Guma Guar	Pektyna	Inulina
	Guma Guar	Pektyna	Inulina			
	X ₁	X ₂	X ₃	g/100 g	g/100 g	g/100 g
S1*	1	0	0	100	0	0
S2	0	1	0	0	100	0
S3	0	0	1	0	0	100
S4	0,333	0,667	0	33,3	66,7	0
S5	0,333	0	0,667	33,3	0	66,7
S6	0	0,333	0,667	0	33,3	66,7
S7	0,667	0,333	0	66,7	33,3	0
S8	0,667	0	0,333	66,7	0	33,3
S9	0	0,667	0,333	0	66,7	33,3
S10	0,333	0,333	0,333	33,3	33,3	33,4

*Badania nie zostały wykonane ze względu na trudności w przygotowaniu próbki

Metody

Charakterystykę termodynamiczną kleikowania skrobi wykonano za użyciem skaningowej kalorymetrii różnicowej z wykorzystaniem kalorymetru DSC F204 Phoenix (Netzsch, Niemcy). Odważoną ilość suchych składników mieszano z wodą (1:3) przez 15 minut, następnie z uzyskanej mieszaniny pobierano ok. 15 mg próbki, zamykano i ogrzewano w naczynkach aluminiowych w zakresie temperatur 25-110°C z szybkością 10°C/min. Jako próbkę referencyjną stosowano puste naczynko aluminiowe. Wyznaczono charakterystyczne temperatury przemiany: początku (T_{ong}), piku (T_{pg}), i końca (T_{endg}) oraz entalpię kleikowania (ΔH_{gel}). Dodatkowo wyznaczono zakres temperatur kleikowania GR ($T_{endg}-T_{ong}$). Po schłodzeniu próbki przechowywano w warunkach chłodniczych ($4\pm 1^\circ\text{C}$) przez 7 dni. Retrogradację skrobi zbadano ogrzewając ponownie próbki w analogiczny sposób jak przy kleikowaniu. Wyznaczono charakterystyczne temperatury przemiany skrobi po retrogradacji: początku (T_{onr}), piku (T_{pr}), i końca (T_{endr}) oraz entalpię retrogradacji (ΔH_{ret}). Stopień retrogradacji obliczono jako stosunek entalpii retrogradacji do entalpii kleikowania [Singh i Singh, 2001; Pycia i in., 2012; Witczak i in., 2014]. Entalpię wyrażono w $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ suchej skrobi.

Analizy statystyczne

W celu oceny zmienności i różnic pomiędzy średnimi wykonano jednoczynnikową analizę wariancji i test Duncana na poziomie istotności 0,05. Wielkości

charakteryzujące próbki przeanalizowano z użyciem modeli dla mieszanin. W obliczeniach wykorzystano pełny model kubiczny (NIST/SEMATECH), z którego usuwano stopniowo nieistotne składniki interakcyjne wyższych rzędów, do chwili uzyskania modelu, w którym wszystkie współczynniki przy składnikach interakcyjnych były statystycznie istotne. W ocenie adekwatności modelu wykorzystano test ANOVA oraz wartość współczynnika R^2 . Obliczenia wykonano z użyciem pakietu Statistica 9.0 (StatSoft Inc., Stany Zjednoczone) z wykorzystaniem wartości unormowanych (pseudoskładników) i rzeczywistych.

Wyniki i dyskusja

Tabela 2 przedstawia wyniki charakterystyki kleikowania z użyciem DSC dla badanych układów. Zakres temperatur kleikowania zawierał się od 60,0 do 74,2°C i mieścił się w zakresach podawanych w literaturze dla skrobi ziemniaczanej [Singh i in., 2003; Abdel-Aal, 2009; Pycia i in., 2012]. Wszystkie trzy charakterystyczne temperatury (początku T_{ong} , piku T_{pg} i końca T_{endg}) istotnie zależały od składu analizowanych mieszanek. Jednoczynnikowa analiza wariancji nie wykazała takiej zależności dla podstawowej wielkości, jaką jest entalpia kleikowania, dla której zależność od składu badanych układów była statystycznie nieistotna, pomimo tego iż zmieniała się w dość szerokim zakresie (tabela 2).

Najwyższymi temperaturami początku przemiany charakteryzowały się próbki bez udziału inuliny, obecność inuliny powodowała jej spadek, przy czym najwyższy zanotowana dla układu trójskładnikowego, co wskazuje na istotny udział interakcji pomiędzy składnikami w ustaleniu wartości tego parametru. Obecność gumy guar powodowała wzrost temperatury początku przemiany, który powiązany był z wzajemnym oddziaływaniem pomiędzy pektyną i gumą guar. Analiza wyników z użyciem modelu kubicznego (tabela 4) z kolejną eliminacją składników nieistotnych, wskazała na istotność oddziaływania efektów głównych oraz wzajemnego oddziaływania gumy guar i pektyny. Zbliżone wartości współczynników modelu przy głównych oddziaływaniach wskazują na podobny wpływ wszystkich czynników na wartości T_{ong} , z najsilniejszym gumy guar. Dodatkowo istotny wpływ na wartość T_{ong} mają wzajemne oddziaływania pektyny i gumy guar powiększające wartość tej wielkości (dodatnia wartość współczynnika). Ujemne wartości współczynników interakcji wyższych rzędów wskazują na spadek wartości T_{ong} uzależniony od udziału poszczególnych składników w mieszaninie, a siła tego wpływu uzależniona jest od wzajemnych proporcji pomiędzy poszczególnymi hydrokolidami. Z kolei wartość R^2 (tabela 4) wskazuje, że parametr ten zależy również od innych czynników, w tym losowych, a analizowane wielkości wyjaśniają ok. 88% zmienności. Tym dodatkowym czynnikiem mogą być interakcje

między skrobią a poszczególnymi hydrokolidami, których w niniejszej pracy nie analizowano, a których siła zależy od rodzaju hydrokoloidu i jego udziału w mieszaninie.

Na wartość temperatury piku (T_{pg}) w trakcie kleikowania istotny wpływ, poza efektami głównymi, miały oddziaływania pomiędzy gumą guar i pektyną oraz gumą guar i inuliną. Przy czym obecność poszczególnych czystych składników w podobny sposób powodowała wzrost tej temperatury, natomiast interakcje pomiędzy składnikami jej obniżanie.

Tabela 2. Charakterystyka termodynamiczna kleikowania skrobi w badanych układach (średnia z trzech powtórzeń \pm odchylenie standardowe)

Próbka	T_{ong} [°C]	T_{pg} [°C]	T_{endg} [°C]	$-\Delta H_{gel}$ [J·g ⁻¹]	GR [°C]
S2	60,2 \pm 0,06 ^{bc}	65,7 \pm 0,06 ^{cde}	73,1 \pm 0,25 ^b	13,3 \pm 0,381	12,9 \pm 0,30 ^c
S3	60,1 \pm 0,12 ^{ab}	65,6 \pm 0,21 ^{cd}	72,6 \pm 0,01 ^a	14,4 \pm 0,754	12,5 \pm 0,12 ^b
S4	60,6 \pm 0,06 ^f	65,8 \pm 0,12 ^{de}	73,9 \pm 0,21 ^c	13,6 \pm 0,607	13,2 \pm 0,25 ^c
S5	60,3 \pm 0,15 ^{cd}	65,4 \pm 0,12 ^a	73,5 \pm 0,30 ^d	13,3 \pm 0,085	13,2 \pm 0,23 ^c
S6	60,3 \pm 0,06 ^{bcd}	65,7 \pm 0,01 ^{cd}	72,6 \pm 0,21 ^a	13,5 \pm 0,173	12,3 \pm 0,20 ^b
S7	60,5 \pm 0,01 ^e	65,6 \pm 0,01 ^{bcd}	72,4 \pm 0,06 ^a	13,0 \pm 0,368	11,9 \pm 0,06 ^a
S8	60,4 \pm 0,01 ^{de}	65,6 \pm 0,06 ^{bc}	72,5 \pm 0,21 ^a	13,2 \pm 0,317	12,1 \pm 0,21 ^{ab}
S9	60,1 \pm 0,06 ^{ab}	65,9 \pm 0,10 ^e	73,0 \pm 0,32 ^b	13,7 \pm 0,567	12,9 \pm 0,26 ^c
S10	60,0 \pm 0,06 ^a	65,4 \pm 0,06 ^{ab}	74,2 \pm 0,12 ^e	13,4 \pm 0,953	14,2 \pm 0,17 ^d
Jednoczynnikowa ANOVA - p					
	<0,001	<0,001	<0,001	0,200	<0,001

Średnie w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie istotności $\alpha=0,05$. T_{on} - temperatura początku przemiany, T_p -temperatura piku, T_{end} -temperatura końca, g-kleikowanie, GR- zakres temperatur kleikowania ($T_{endg}-T_{og}$), ΔH_{gel} -entalpia kleikowania (na gram skrobi).

Z interakcji wyższych rzędów, istotny i obniżający wpływ na wartość T_{pg} miały jedynie wzajemne proporcje pomiędzy zawartością gumy guar i pektyny. Stosunkowo niska wartość R^2 wskazuje, że T_{pg} zależy w dużej mierze od innych czynników (w tym losowych), a analizowany skład wyjaśnia tylko ok. 69% zmienności. Zależność temperatury końca przemiany (T_{endg}) oraz zakresu temperatur kleikowania zależała od tych samych składników. W pierwszym przypadku wpływ głównych składników był podobny, przy czym najsilniej T_{endg} podnosiła pektyna, podobnie wzrost tej temperatury powodowały interakcje pomiędzy gumą guar i pektyną oraz gumą guar i inuliną, a także wszystkich trzech składników jednocześnie. W tym przypadku jednak nic nie wskazuje na wpływ wzajemnych proporcji pomiędzy składnikami na wartość temperatury końca przemiany. Zależność zakresu temperatur kleikowania GR była już bardziej zróżnicowana niż pojedynczych temperatur. Najsilniej zakres ten rozszerzany był poprzez

dodatek pektyny, następnie inuliny, a najmniej na zakres kleikowania wpływała guma guar. Jednocześnie stosunkowo silny wpływ na te wartości miały oddziaływania pomiędzy gumą guar i pektyną oraz gumą guar i inuliną, jak również wzajemne oddziaływania w układzie trójskładnikowym. Nieco mniejszy, jednak statystycznie istotny wpływ mają również wzajemne proporcje pomiędzy pektyną i inuliną. W przypadku tym model wyjaśnia również największą część zmienności (ok. 93%). Według jednych autorów wzrost stężenia pektyny do 5% dość wyraźnie podnosi wartości temperatur charakterystycznych kleikowania [Tester i Sammerville, 2003], natomiast według innych obecność pektyny podnosi wartość T_{ong} i nie wpływa na T_{pg} [Rojas i in., 1999]. Z kolei według Witczak i in. [2014], badających wpływ DP inuliny na interakcje w układzie skrobia ziemniaczana – inulina – pektyna, temperatura końca przemiany zależy głównie od stężenia inuliny, a wartość dodatku inuliny nie wpływała istotnie na ten parametr. Natomiast temperatura końca i piku zależała zarówno od stężenia inuliny, jak i pektyny. Według Torres i in. [2013] obecność gumy guar podnosi wartości temperatur charakterystycznych kleikowania, opóźniając przebieg tego procesu.

W przypadku entalpii kleikowania statystycznie istotne okazały się jedynie efekty główne, wpływające na ten parametr w podobny sposób. Jednak należy zauważyć, że model wyjaśnia w tym przypadku jedynie ok. 26 % zmienności, a wynik oceny istotności modelu daje stosunkowo wysoką wartość $p=0,03$, co wskazuje, że o zmienności decydują inne czynniki (w tym losowe). Rezultat ten jest zgodny z wynikiem jednoczynnikowej analizy wariancji wskazującej na nieistotność różnic (przy $p=0.05$) pomiędzy średnimi charakteryzującymi badane układy (tabela 2). Według Rojas i in. [1999] hydrokoloidy oddziałują ze skrobią powodując zmianę wartości entalpii kleikowania, uzależnioną od rodzaju hydrokoloidu. Według Witczak i in. [2014] entalpia kleikowania w układzie z inuliną i pektyną zależy tylko od stężenia pektyny, natomiast inulina nie wpływa na ten parametr, niezależnie od średniej wartości DP. Z kolei według Tester i Sammerville [2003] wzrost stężenia pektyny do 5% tylko nieznacznie redukuje wartość entalpii kleikowania, a wyraźny efekt można zaobserwować tylko w warunkach ograniczonej dostępności wody. Dodatek gumy guar natomiast powoduje wzrost wartości entalpii [Torres i in., 2013].

Tabela 3. Charakterystyka termodynamiczna badanych układów po przechowywaniu (średnia z trzech powtórzeń ± odchylenie standardowe)

Sample	T_{onr}	T_{pr}	T_{endr}	$-\Delta H_{ret}$	R
	[°C]	[°C]	[°C]	[J·g ⁻¹]	%
S2	40,9±1,21 ^{abc}	58,4±1,17	70,5±1,03 ^a	4,49±0,894 ^a	33,6±5,98 ^a
S3	40,2±0,86 ^{abc}	59,7±0,91	75,7±3,13 ^{cd}	7,72±0,210 ^b	53,9±2,62 ^c
S4	40,1±1,17 ^{abc}	58,7±1,29	72,0±2,42 ^{ab}	4,78±0,549 ^a	35,3±4,13 ^{ab}
S5	38,8±1,35 ^a	57,3±1,73	74,7±0,67 ^{bc}	4,60±0,245 ^a	34,6±1,78 ^a
S6	41,8±0,84 ^{bc}	58,5±0,21	79,3±0,89 ^e	4,95±0,437 ^a	36,6±3,47 ^{ab}
S7	41,8±0,96 ^{bc}	58,3±0,55	79,7±1,27 ^e	5,40±0,138 ^a	41,6±2,20 ^b
S8	41,3±1,97 ^{bc}	57,2±0,56	79,2±1,44 ^e	4,50±0,514 ^a	34,1±3,66 ^a
S9	39,4±1,97 ^{ab}	57,7±1,25	75,4±1,30 ^{cd}	4,95±0,332 ^a	36,1±3,07 ^{ab}
S10	42,5±0,60 ^c	58,3±0,35	78,1±0,81 ^{de}	5,38±0,464 ^a	40,2±2,73 ^{ab}
	0,042	0,157	<0,001	<0,001	<0,001

Średnie w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie istotności $\alpha=0,05$. T_{onr} - temperatura początku przemiany, T_p -temperatura piksu, T_{end} -temperatura końca, r- retrogradacja, ΔH_{ret} - entalpia retrogradacji, R-stopień retrogradacji (stosunek entalpii kleikowania do entalpii retrogradacji)

Retrogradacja jest jednym z podstawowych zjawisk występujących w układach ze skrobią i charakter jej przebiegu decyduje w dużej mierze o przydatności technologicznej zarówno skrobi, jak i dodatków mających za zadanie jej ograniczenie, a przez to stabilizację układów wykorzystujących skrobię i hydrokoloidy nieskrobiowe. O ile w przypadku kleikowania obecność hydrokoloidów nie wpływała istotnie na wartość entalpii przemiany, to w przypadku entalpii próbek przechowywanych (ΔH_{ret}) i stopnia retrogradacji (R) ten wpływ był bardzo silny (tabela 3). Najwyższe wartości tego parametru uzyskano dla układu z inuliną, a najniższe dla układów z dodatkiem gumy guar i samej pektyny. Wyniki analizy statystycznej z użyciem modelu kubicznego i eliminacji współczynników nieistotnych wskazują, że w najmniejszym stopniu na obniżenie wartości entalpii retrogradacji wpływa inulina, a najbardziej obniża te wartości pektyna. Według Witczak i in. [2014] spadek entalpii po przechowywaniu próbek pod wpływem inuliny, związany jest w głównej mierze z obecnością cukrów, które ograniczają szybkość retrogradacji skrobi [Aee i in.,1998; Babić i in., 2009], przy czym zjawisko to odgrywa główną rolę przy niskiej wartości DP preparatów inuliny. W przypadku analizowanej inuliny HPX (nie zawierającej cukrów według deklaracji producenta), wpływ ten jest ograniczony i związany może być ze zjawiskiem częściowej hydrolizy w trakcie ogrzewania próbek, prowadzącej do powstawania cukrów o niskiej masie cząsteczkowej, których ilość zależy od temperatury ogrzewania i stężenia inuliny [Kim i in., 2001]. Interakcje wyższych rzędów wskazują, że obecność inuliny w układzie

z pektyną i gumą guar obniża wartość ΔH_{ret} w stosunku do średniej, natomiast w układzie trzech składników uzyskano wyższe wartości niż średnia dla badanych układów. Statystycznie istotne i zwiększające entalpię retrogradacji w stosunku do średniej są również wzajemne proporcje pomiędzy pektyną a inuliną. Stopień retrogradacji R rośnie w stosunku do średniej dla wszystkich czystych dodatków. Również wszystkie interakcje wyższych rzędów powodują wzrost stopnia retrogradacji w stosunku do wartości średniej dla badanych układów. W przypadku temperatury początku i temperatury piku stwierdzono słabą zależność od składu (w drugim przypadku statystycznie nieistotna na poziomie 0,05), a stosunkowo niska wartość R^2 , świadczy o zależności od innych czynników, należy przypuszczać, że w głównej mierze losowych.

Tabela 4. Wartości parametrów modelu adekwatnego–składniki rzeczywiste–po usunięciu nieistotnych składników z modelu pełnego kubicznego–charakterystyczne temperatury kleikowania

Zmienna zależna	T_{one}			T_{pe}			T_{endz}		
	value	SE	p	value	SE	p	value	SE	p
[A] GG	242,2	0,26	0,000	265,4	0,94	0,000	276,5	1,54	0,000
(B) P	240,9	0,15	0,000	263,3	0,22	0,000	292,7	0,42	0,000
(C) I	240,6	0,14	0,000	262,7	0,22	0,000	290,0	0,42	0,000
A×B	12,4	3,64	0,003	-29,6	8,72	0,003	141,5	16,05	0,000
A×C	ns	ns	ns	-40,0	9,08	0,000	158,3	16,05	0,000
B×C	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A×B×C	-636,6	82,39	0,000	ns	ns	ns	950,5	267,79	0,002
A×B×(A-B)	-103,3	28,69	0,002	-150,6	52,77	0,010	ns	ns	ns
A×C×(A-C)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B×C×(B-C)	-68,8	28,14	0,024	ns	ns	ns	ns	ns	ns
R^2	0,883 (0,848)			0,687 (0,612)			0,909 (0,888)		

Nieco silniejszą zależność stwierdzono dla temperatury końca przemiany, której wartość w stosunku do średniej, najsilniej wzrastała pod wpływem gumy guar, a na zbliżonym poziomie pod wpływem pektyny i inuliny. Interakcje pomiędzy gumą guar a inuliną powodowały spadek tej temperatury, a zatem zawężenie zakresu przemiany, natomiast pomiędzy inuliną a pektyną wzrost T_{endz} , czyli rozszerzenie zakresu temperatur analizowanej przemiany.

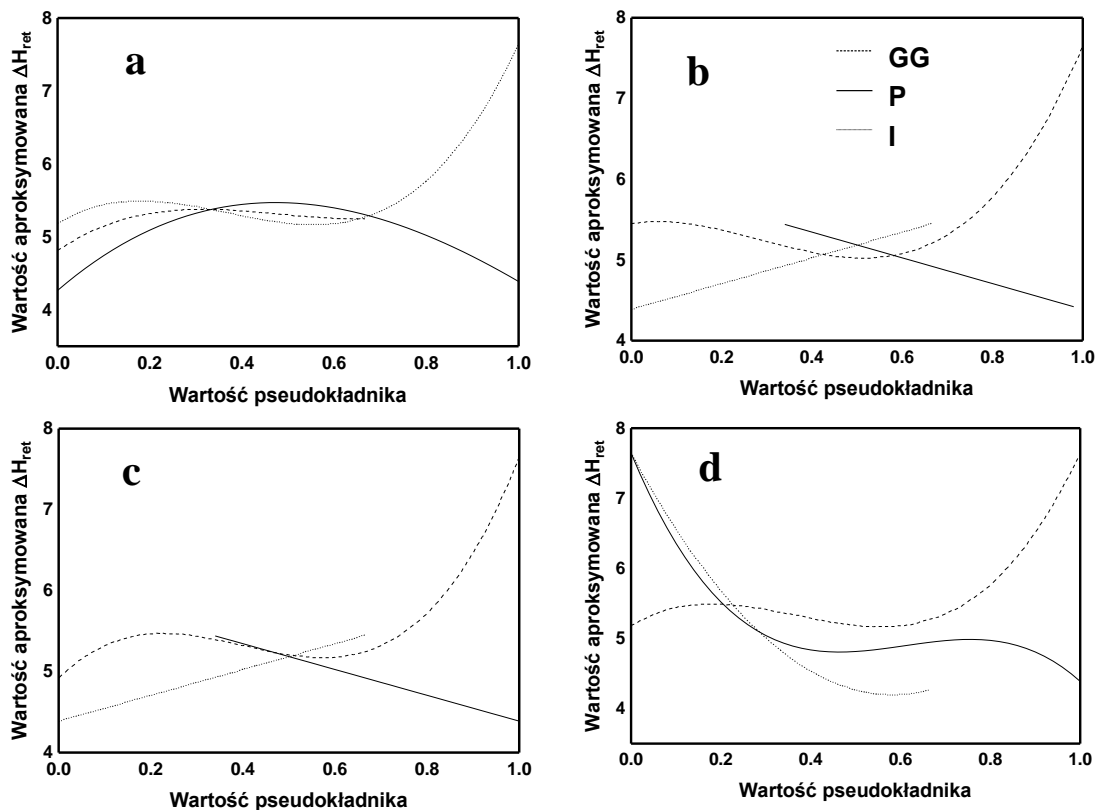
Tabela 5. Wartości parametrów modelu adekwatnego – składniki rzeczywiste – po usunięciu nieistotnych składników z modelu pełnego kubicznego - charakterystyczne temperatury retrogradacji

Zmienna zależna	T_{onr}			T_{pr}			T_{endr}		
	value	SE	p	value	SE	p	value	SE	p
(A) GG	187,3	8,68	0,000	58,8	0,81	0,000	336,6	6,22	0,000
(B) P	163,8	2,43	0,000	58,0	0,44	0,000	276,4	3,83	0,000
(C) I	160,8	2,43	0,000	59,3	0,47	0,000	302,4	4,10	0,000
A×B	-209,8	90,71	0,031	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A×C	-249,5	90,71	0,012	-7,4	2,86	0,016	-200,9	86,57	0,030
B×C	ns	ns	ns	ns	ns	ns	371,0	72,17	0,000
A×B×C	5298,4	1510,5	0,002	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A×B×(A-B)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A×C×(A-C)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B×C×(B-C)	1112,8	458,2	0,025	ns	ns	ns	ns	ns	ns
R^2	0,535 (0,396)			0,301 (0,210)			0,746 (0,700)		

Tabela 6. Wartości parametrów modelu adekwatnego –składniki rzeczywiste – po usunięciu nieistotnych składników z modelu pełnego kubicznego–charakterystyczne temperatury kleikowania

Zmienna zależna	GR			$-\Delta H_{gel}$			$-\Delta H_{ret}$			R		
	value	SE	p	value	SE	p	value	SE	p	value	SE	p
(A)GG	36,2	1,45	0,000	51,1	1,20	0,000	23,9	1,57	0,000	182,6	11,5	0,000
(B)P	51,5	0,41	0,000	53,9	0,87	0,000	17,6	0,98	0,000	130,3	7,19	0,000
(C)I	49,6	0,41	0,000	55,9	0,87	0,000	30,6	1,06	0,000	214,0	7,79	0,000
A×B	114,6	15,2	0,000	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A×C	138,5	15,2	0,000	ns	ns	ns	163,1	22,43	0,000	1098,1	164,6	0,000
B×C	ns	ns	ns	ns	ns	ns	76,9	18,83	0,001	480,4	138,2	0,002
A×B×C	1728	253,3	0,000	ns	ns	ns	1793	532,8	0,003	1256,8	3910	0,004
A×B×(A-B)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A×C×(A-C)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B×C×(B-C)	192,3	76,8	0,021	ns	ns	ns	468,4	174,2	0,014	2803	1279	0,040
R^2	0,933 (0,912)			0,259 (0,197)			0,843 (0,796)			0,801 (0,742)		

Na rysunku 1 przedstawiono wykresy przekrojowe zmiany entalpii przemiany próbek po przechowywaniu przy różnych mieszalinach odniesienia. Analizy rysunków pokazują, że bez względu na skład mieszanki odniesienia, wzrost zawartości inuliny powoduje początkowo niewielki wzrost entalpii, następnie stabilizację i niewielki spadek jej wartości oraz gwałtowne podniesienie jej wartości w końcowym etapie, przy spadku do zera udziału pozostałych dwóch hydrokoloidów.



Rysunek 1. Wykres przekrojowy dla entalpii przemiany po przechowywaniu przy różnych mieszalinach odniesienia: a) GG – 0,0833, P – 0,0833, I – 0,0833, b) GG- 0,1667, P- 0,0833, I – 0, c) GG- 0,0833, P- 0,1667, I – 0, d) GG- 0, P- 0, I – 0,25.

Przedstawione rysunki pokazują również początkowy spadek entalpii pod wpływem dodatku pektyny i inuliny, następnie jej stabilizację w zakresie 0,4-0,6 udziału pseudoskładników w badanych mieszankach (rysunek 1d). Rysunek 1b i c pokazują zmianę entalpii przy odpowiednio przewadze w mieszaninie odniesienia gumy guar (rysunek 1a) i pektyny (rysunek 1b). Widać wyraźnie wyższą stabilność tej wielkości w obecności gumy guar w początkowym okresie wzrostu udziału inuliny. W dalszym etapie zachowanie obu układów jest podobne.

Wnioski

Wartość entalpii kleikowania w niewielkim stopniu zależy od rodzaju i wzajemnych interakcji pomiędzy hydrokoloidami dodawanymi do skrobi. Natomiast skład mieszaniny hydrokoloidów i inuliny w sposób istotny wpływa na charakterystyczne temperatury kleikowania, w większości przypadków powodując ich wzrost.

Entalpia próbek po przechowywaniu istotnie zależy od składu mieszaniny hydrokoloidów i inuliny, co wskazuje na zmienność struktury wytwarzanej przez te dodatki, co w efekcie prowadzi do różnej szybkości retrogradacji i zmienności w wielkości i stopniu krystaliczności skrobi po retrogradacji. Temperatury charakterystyczne po przechowywaniu w niewielkim stopniu zależą od składu. Wyjątek stanowi temperatura końca przemiany, dla której stwierdzono istotną zależność od składu badanych próbek.

Literatura

1. Abdel-Aal, E.S.A. Functionality of starches and hydrocolloids in gluten-free foods. In E. Gallagher (Ed.), *Gluten-free food science and technology*. Wiley-Blackwell, Oxford 2009, 200.
2. Aee, L.H., Hie, K.N., Nishinari, K. DSC and rheological studies of the effects of sucrose on the gelatinization and retrogradation of acorn starch. *Thermochimica Acta*, 1998, 322, 39-46.
3. Aidoo, R.P., Afoakwa, E.O., Dewettinck, K. Optimization of inulin and polydextrose mixtures as sucrose replacers during sugar-free chocolate manufacture – Rheological, microstructure and physical quality characteristics. *Journal of Food Engineering*, 2014, 126, 35-42.
4. Babić, J., Šubarić, D., Miličević, B., Aćkar, D., Kopjar, M., Tiban, N.N. Influence of trehalose, glucose, fructose, and sucrose on gelatinisation and retrogradation of corn and tapioca starches. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, 27, 151-157.
5. Glibowski, P., Kowalska, A. Rheological, texture and sensory properties of kefir with high performance and native inulin. *Journal of Food Engineering*, 2012, 111, 299-304.
6. Juszczak, L., Witczak, T., Ziobro, R., Korus, J., Cieślik, E., Witczak, M. Effect of inulin on rheological and thermal properties of gluten-free dough. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90, 353-360.
7. Kim, Y., Faqih, M.N., Wang, S.S. Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 46, 135-145.
8. Menegas, L.Z., Pimentel, T.C., Garcia, S., Prudencio, S.H. Dry-fermented chicken sausage produced with inulin and corn oil: Physicochemical, microbiological, and

- textural characteristics and acceptability during storage. *Meat Science*, 2013, 93, 501-506.
9. Meyer, D., Bayarri, S., Tárrega, A., Costell, E. Inulin as a texture modifier in dairy products. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25, 1881-1890.
 10. Morris, C., Morris, G.A. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight manageme. A review. *Food Chemistry*, 2012, 133, 237-248.
 11. NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, 19.05.2014.
 12. Nowak, A., Klimowicz, A., Bielecka-Grzela, S., Piechota, M. Inulina – cenny składnik żywieniowy. *Roczniki Pomorskiej Akademii medycznej w Szczecinie*, 2012, 58(1), 62–65.
 13. Praznik, W., Cieślík, E., Filipiak-Florkiewicz, A. Soluble dietary fibers in jerusalem artichoke powders: composition and application in bread. *Nahrung/Food*, 2002, 45, 151-157.
 14. Pycia, K., Juszczak, L., Galkowska, D., Witczak, M. Physicochemical properties of starches obtained from Polish potato cultivars. *Starch/Stärke*, 2012, 64, 105-114.
 15. Rojas, J.A., Rosell, C.M., de Barber, C.B. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. *Food Hydrocolloids*, 1999, 13, 27-33.
 16. Singh, J., Singh, N. Studies on the morphological, thermal and rheological properties of starch separated from some Indian potato cultivars. *Food Chemistry*, 2001, 75, 67-77.
 17. Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh Sodhi, N., Singh Gill, B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 2003, 81, 219-231.
 18. Śliżewska, K., Nowak, A., Barczyńska, R., Libudzisz, Z. Prebiotyki – definicja, właściwości i zastosowanie w przemyśle. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, 1(86), 5-20.
 19. Tárrega, A., Torres, J.D., Costell, E. Influence of the chain-length distribution of inulin on the rheology and microstructure of prebiotic dairy desserts. *Journal of Food Engineering*, 2011, 104, 356-363.
 20. Tester, R.F., Sommerville, M.D. The effects of non-starch polysaccharides on the extent of gelatinization, swelling and α -amylase hydrolysis of maize and wheat starches. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, 41-54.
 21. Torres, M. D., Moreira, R., Chenlo, F., Morel, M.H. Effect of water and guar gum content on thermal properties of chestnut flour and its starch. *Food Hydrocolloids*, 2013, 33, 192-198.

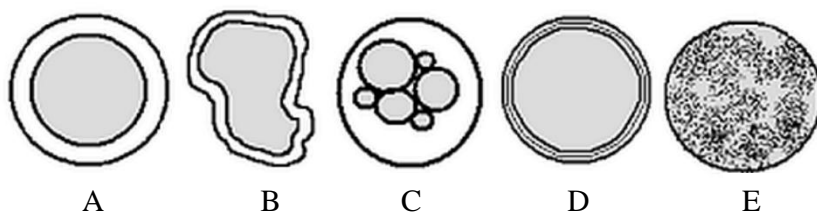
22. Trabs, K., Kasprick, N., Henle, T. Isolation and identification of Di-D-fructose dianhydrides resulting from heat-induced degradation of inulin. *European Food Research and Technology*, 2011, 233, 151-158.
23. Witczak, T., Witczak, M., Ziobro, R. Effect of inulin and pectin on rheological and thermal properties of potato starch paste and gel. *Journal of Food Engineering*, 2014, 124, 72-79.
24. Zimeri, J.E., Kokini, J.L. Rheological properties of inulin–waxy maize starch systems. *Carbohydrate Polymers*, 2003a, 52, 67-85.
25. Zimeri, J.E., Kokini, J.L. Morphological characterization of the phase behavior of inulin–waxy maize starch systems in high moisture environments. *Carbohydrate Polymers*, 2003b, 52, 225-236.
26. Ziobro, R., Korus, J., Juszczak, L., Witczak, T. Influence of inulin on physical characteristics and staling rate of gluten-free bread. *Journal of Food Engineering*, 2013, 116, 21-27.

METODA KAPSUŁKOWANIA Z WYKORZYSTANIEM SYSTEMU WSPÓŁOSIOWEGO

Wstęp

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat mikrokapsułki stały się ważnym narzędziem w dostarczaniu substancji aktywnych przy jednoczesnej ochronie substancji niestabilnych. Gałęzie przemysłu w których mikrokapsułki znalazły zastosowanie to przemysł farmaceutyczny i biomedyczny, produkcja kosmetyków, przemysł spożywczy, ochrona roślin, budownictwo i wiele innych. Pierwsze doniesienia o praktycznym wykorzystaniu procesu mikrokapsułkowania pojawiły się w latach trzydziestych XX wieku [Shahidi i Han, 1993]. Możliwość zastosowania tego procesu w wielu dziedzinach spowodowało wzrost ilości badań. W obrębie samej bazy czasopism naukowych Science Direct, w 2011 roku zanotowano 57 publikacji o tej tematyce.

Mikrokapsułkowanie jest technologią umożliwiającą m.in. zamykanie mikroskopijnej ilości substancji (tworzącej tzw. rdzeń mikrokapsułki lub inkorporowanej w całej objętości nośnika), w otoczkach formowanych z jednego lub kilku różnych polimerów na drodze określonych procesów fizycznych i reakcji chemicznych [Renken i Hunkeler, 1998]. W zależności od użytej techniki kapsułkowania możliwe jest otrzymanie wielu zbliżonych kształtem, lecz różniących się pod względem operacji dyfuzyjnych struktur (rys.1.)



Rys.1. Rodzaje struktur możliwych do uzyskania za pomocą dostępnych technik kapsułkowania: A - mikrokapsułka z wyodrębnionym rdzeniem i ścianą, B - mikrokapsułka z nieregularnym kształtem rdzenia, C - mikrokapsułka wielordzeniowa, D - mikrokapsułka z wielowarstwową ścianą (płaszczem), E – mikrosfera (Mania, 2013).

W zakresie budowy, mikrokapsułki można podzielić na cztery główne grupy: mikrokapsułki o kształcie regularnym lub nieregularnym, mikrokapsułki wielowarstwowe (z co najmniej dwoma warstwami opłaszczającymi) oraz mikrosfery. Najprostszą formę stanowią mikrokapsułki przypominające strukturą jajo kurze, w których substancja czynna otoczona jest jednolitej grubości, jednowarstwową ścianą lub błoną. W przypadku kapsulek wielowarstwowych koncentrycznie położony rdzeń pokryty jest kilkoma warstwami tej samej bądź różnych substancji. Jest to zazwyczaj celowy zabieg związany ze stopniowym uwalnianiem cząsteczek substancji rdzenia. Osobną i jednocześnie najlepiej zbadaną do tej pory grupę kapsulek stanowią mikrosfery, czyli monolityczne, porowate kuleczki o wielkości od 1 do 500 μm . Zbudowane są z różnego rodzaju polimerów, w których substancja aktywna jest rozpuszczona bądź zawieszona [Janicki i in., 2008].

Uwalnianie substancji aktywnej z wnętrza mikrokapsułki może zachodzić w wyniku czterech różnych mechanizmów. Są to: frakturacja, dyfuzja, rozpuszczanie (topnienie) oraz biodegradacja. Pierwszy z nich związany jest z mechaniczną degradacją kapsułki (pęknięcie lub przełamanie płaszczka) na skutek działania zewnętrznych czynników takich jak ciśnienie, siły ścinające lub ultradźwięki. Jednak najczęściej stosowanym mechanicznym sposobem uwalniania substancji czynnej jest mielenie. W przypadku dyfuzji, często opisywanej jako dyfuzja kontrolowana, płaszcz kapsułki pozostaje nienaruszony, a substancje rdzeniowe uwalniane są dzięki gradientowi stężeń występującemu pomiędzy wnętrzem kapsułki a jej otoczeniem. Warto zauważyć, że ze względu na bardzo małe rozmiary mikrokapsulek, stosunek ich powierzchni do jednostki wagowej jest relatywnie duży, co ma korzystny wpływ na zjawisko dyfuzji. Mikrokapsułki mogą funkcjonować w sposób podobny do membrany półprzepuszczalnej. Stosowanie ciepła lub nieznaczny wzrost rozpuszczalności (np. poprzez wzrost wilgotności) zwiększa przepuszczalność płaszczka kapsułki zmieniając jej stan krystaliczny do bardziej mobilnej postaci - zawiesiny. W ten sposób przepływ substancji aktywnej z rdzenia jest ułatwiony [Barbosa-Cànovas, 2005]. Niektóre źródła rozróżniają dwa rodzaje dyfuzji kontrolowanej, system monolityczny i zbiornikowy. W pierwszym przypadku, substancja czynna jest uwalniana poprzez dyfuzję zachodzącą przed lub jednocześnie z degradacją matrycy polimerowej. W systemie zbiornikowym uwalnianie substancji aktywnej nie ma wpływu na degradację matrycy. Następuje ona dopiero po całkowitym uwolnieniu substancji aktywnej [Agnihotri i in., 2012]. Kolejnym sposobem uwalniania substancji czynnej z mikrokapsułki jest zjawisko rozpuszczania lub roztapiania, podczas których integralność powłoki zostaje naruszona w wyniku zastosowania odpowiedniego rozpuszczalnika lub na drodze termicznej. Otoczki mikrokapsulek zbudowane z materiałów rozpuszczalnych w wodzie mogą zostać

łatwo rozpuszczone poprzez zwiększenie wilgotności. Natomiast rozpuszczanie poprzez podniesienie temperatury wywołujące zmianę fazy skupienia otoczki jest powszechnie stosowane wobec kapsułek tłuszczowych. Wówczas powłoka rozplywa się od rdzenia, uwalniając w ten sposób jego składniki w takich warunkach, jakie występują np. podczas pieczenia [Barbosa-Cànovas, 2005]. Kolejnym mechanizmem jest erozja płaszcza kapsułki, określana też jako biodegradacja. Zniszczenie substancji stanowiącej otoczkę mikrokapsułki może następować pod wpływem zmian pH oraz degradacji enzymatycznej (np. powłoki lipidowe mogą być degradowane przez lipazy). Mechanizm ten wykorzystywany jest w przypadku stosowania do konstrukcji kapsułek substancji takich jak monostearynian glicerolu, alkohol stearylowy czy wosk pszczeli [Agnihotri i in., 2012].

Przegląd powszechnie stosowanych metod mikrokapsułkowania

Obecnie ilość technologii stosowanych do produkcji mikrokapsułek jest bardzo duża. Wybór jednej z nich nie jest łatwym zadaniem, gdyż technika mikrokapsulacji jest typowym przykładem interdyscyplinarnego wykorzystania teoretycznej i praktycznej wiedzy, obejmującej podstawy nauk takich jak chemia materiałów (polimerów, biopolimerów), chemia leków, biochemia związków spożywczych i biologicznych, inżynieria procesów oraz specjalistyczne metody i sposoby analizy jakości surowców i produktów procesu. Jednak aby mogły one spełniać swoje zadanie, jakim jest umożliwienie produkcji mikrokapsułek o ściśle zdefiniowanych właściwościach, powinny spełniać określone kryteria, tj. [Agnihotri i in., 2012].:

- możliwość zamykania w mikrokapsułkach substancji aktywnej o wysokim stężeniu,
- stabilność preparatu po syntezie podczas całego dopuszczalnego okresu przechowywania,
- możliwość regulacji wielkości cząstek i zdolności dyspersji w środowisku wodnym,
- możliwość kontrolowania uwalniania substancji aktywnej poprzez długi okres czasu,
- biokompatybilność,
- kontrolowana zdolność do biodegradacji,
- podatność na modyfikacje chemiczne.

Do powszechnie stosowanych metod mikrokapsułkowania należą techniki suszenia rozpyłowego, powlekania złożem fluidalnym, liofilizacji, ekstruzji czy koacerwacji.

Suszenie rozpyłowe jest techniką, w której substancja czynna rozpuszcza się lub zawiesza w roztworze polimeru (lub ich mieszaninie), a następnie zamyka matrycy w postaci sfer podczas suszenia w temperaturze ok. 180°C. Technika ta teoretycznie umożliwia kapsułkowanie materiałów nietrwałych, ponieważ czas ich ekspozycji w suszarce jest bardzo krótki (zazwyczaj kilka sekund). Z drugiej strony niewielkie rozmiary suszonych cząstek (<100 mikrometrów) sugerują także krótki czas potrzebny do osiągnięcia w ich wnętrzu temperatury panującej w komorze. Stosując proces suszenia rozpyłowego trzeba jednak liczyć się z pewnymi ograniczeniami, szczególnie w przypadku immobilizacji substancji spożywczych. Dostarczone ciepło może powodować np. odparowywanie składników lotnych będących istotnym składnikiem smaku lub przyspieszenie procesu utleniania wiązań nienasyconych kwasów tłuszczowych występujących w olejach. Wysoka temperatura może również uszkodzić powłokę kapsułki powodując mikropęknięcia, które mogą prowadzić do jej rozpadu, słabego zatrzymywania smaku oraz niepożądanych zmian w smaku [Barbosa-Cánovas, 2005].

W celu uniknięcia problemów związanych ze zbyt dużym rozdrobnieniem proszków otrzymywanych w technice suszenia rozpyłowego, cząstki poddaje się procesowi aglomeracji w wyniku zastosowania odrębnej techniki, czyli powlekania złożem fluidalnym (lub powlekania fluidyzacyjnego). Technika ta ogranicza się do kapsułkowania stałych cząstek lub materiałów porowatych, na których zaadsorbowana jest ciecz. Zaletą tej metody jest możliwość zastosowania różnorodnych preparatów do powlekania jak lateksowe dyspersje wodne, roztwory materiałów powłokowych w rozpuszczalnikach organicznych lub wodne roztwory materiałów powłokowych [Lasoń i Ogonowski, 2012]. Powlekanie złożem fluidalnym przebiega w kilku etapach. W początkowym etapie cząstki fluidyzowane są w gorącej atmosferze w specjalnej komorze. Następnie materiał powłokowy rozpylany jest przez dyszę, gdzie trafia na rozgrzane cząstki substancji aktywnej, co sprzyja tworzeniu cienkiego filmu na powlekanym cząsteczkach. Małe kropelki rozpylanej cieczy dostają się na powierzchnię cząstek i łączą się tworząc fazę ciągłą. Cząsteczki są zwilżane i suszone. Rozpuszczalnik jest odparowywany przez gorące powietrze, co zapewnia dobre przyleganie materiału powłokowego na cząsteczkach [Madene i in., 2006]. Do zalet kapsułek wytworzonych tą techniką zaliczyć należy: przedłużony okres trwałości, możliwość maskowania niepożądanych smaków, a także możliwość kontrolowanego uwalniania substancji z kapsułek [Desai i Park, 2005]. Pomimo wielu korzyści wynikających ze stosowania prezentowanej techniki posiada ona pewne ograniczenia technologiczne związane z wieloetapowością produkcyjną oraz wykorzystywaniem podwyższonych temperatur co wpływa negatywnie na aktywność substancji kapsułkowanych.

Alternatywną metodą wykluczającą inaktywację termiczną kapsułkowanych produktów jest wykorzystanie do tego celu liofilizacji, podczas której rozpuszczalnik usuwany jest w niskich temperaturach [Desai i Park, 2005]. Ponieważ wykorzystane w tej technice zjawisko sublimacji zachodzi w warunkach niskiej temperatury oraz niskiego ciśnienia, operacja ta powinna wykazywać wysoką retencję wobec lotnych związków. Fakt ten tłumaczy częste stosowanie liofilizacji do mikrokapsułkowania substancji zapachowych. Niestety do jej wad oprócz długiego czasu trwania operacji zaliczyć trzeba wysokie zapotrzebowanie na energię.

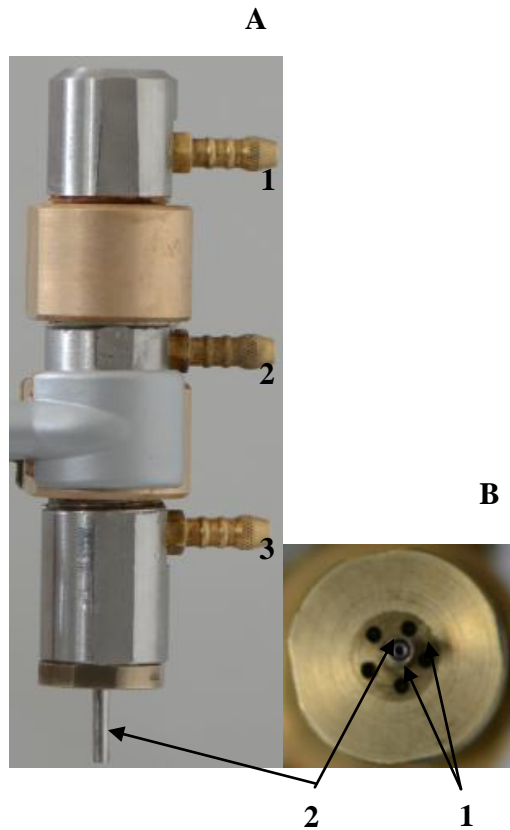
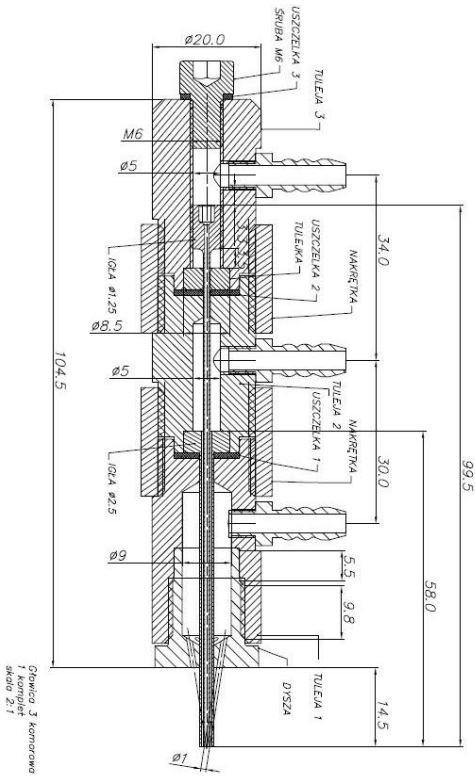
Klasyyczna ekstruzja prowadzona jest zwykle w warunkach wysokiego ciśnienia i temperatury [Barbosa-Cànovas, 2005]. W kontekście mikrokapsułkowania termin ten związany jest z tworzeniem emulsji, która w dalszym etapie wyłaczana jest przez dyszę pod ciśnieniem poniżej 700kPa oraz w temperaturze poniżej 115°C. Ekstruzja stosowana jest do kapsułkowania substancji smakowych, witaminy C, a także barwników. Proces ten obejmuje rozproszenie materiału rdzenia w stopionej masie długołańcuchowych cząsteczek np. węglowodanów. Następnie za pomocą szeregu matryc trafia do kąpieli w cieczy odwodniającej, gdzie twardej zamykając materiał rdzenia [Shahidi i Han, 1993]. Główną zaletą ekstruzji jest znakomita ochrona substancji smakowych przed utlenianiem. Badania nad okresem ważności ekstrudowanego oleju ze skórki pomarańczowej pokazały, że jego właściwości fizykochemiczne nie zmieniają się przez około 4 lata. Jest to znacznie dłuższy okres trwałości w porównaniu z trwałością substancji smakowych kapsułkowanych innymi metodami [Barbosa-Cànovas, 2005]. Niestety ekstruzja obarczona jest także szeregiem wad. Pierwszą z nich jest wysoka temperatura stosowana podczas procesu. Kolejną to niska zawartość substancji smakowej w pojedynczych mikrokapsułkach (8-12%, w porównaniu z 20% zawartością substancji smakowych w mikrokapsułkach wyprodukowanych metodą suszenia natryskowego). Co więcej, koszty ekstruzji szacowane są na prawie dwukrotnie wyższe w porównaniu z suszeniem rozpyłowym.

Koacerwacja jest zjawiskiem występującym w roztworach koloidalnych. Polega na oddzieleniu z roztworu cząstek rozproszonych, które aglomerują w oddzielną fazę ciekłą zwaną koacerwatem. Koacerwacja może być zainicjowana na wiele różnych sposobów – w wyniku zmiany temperatury, pH lub dodatku wodnego roztworu soli o wysokim stężeniu. Proces składa się zazwyczaj z trzech etapów. Pierwszy to utworzenie trzech niemieszających się faz: fazy materiału rdzenia, fazy substancji powłokowej oraz fazy, w której znajdują się obie te substancje, służącej jako rozpuszczalnik dla roztworu polimeru. Kolejny krokiem jest osadzanie roztworu opłaszczającego kapsułkę na materiale tworzącym rdzeń. Ostatni etap to stabilizacja materiału powłokowego nazywany utwardzeniem. Stabilizacja może się odbywać na drodze termicznej lub poprzez sieciowanie czy desolwatację [Agnihotri i in.,

2012]. Najdokładniej zbadanym złożonym układem koacerwacyjnym jest układ żelatyna - guma arabska. Koacerwacja takiego układu jest możliwa tylko przy wartościach pH poniżej punktu izoelektrycznego żelatyny. Przy takich wartościach pH, żelatyna posiada dodatni ładunek, a guma arabska nadal pozostaje naładowana ujemnie [Agnihotri i in., 2012]. Wodna zawiesina żelatyny w wodzie (o stęż. 10%) jest ogrzewana do temperatury ok. 50°C przy ciągłym mieszaniu. Następnie dodawany jest roztwór siarczanu(VI) sodu lub etanolu (o stęż. 20%), tak, aby jego udział wynosił 50 - 60% całkowitej końcowej objętości, w celu indukcji koacerwacji. Układ ten chłodzi się do 40°C, po czym konieczny jest również dodatek odczynnika sieciującego (np. aldehyd glutarowy) i dostosowanie pH. Otrzymane mikrokapsułki są przemywane i suszone. W przypadku koacerwacji złożonej stosowane są dwa lub więcej polimerów. Koacerwacja złożona polega na zdolności wzajemnego oddziaływania w wodzie polimerów kationowych i anionowych do utworzenia ciekłej fazy bogatej w polimery, zwanej koacerwatem złożonym. Różnorodne, naturalne i syntetyczne, rozpuszczalne w wodzie polimery reagują z żelatyną tworząc złożone koacerwaty odpowiednie do kapsułkowania, które występują w równowadze z klarowną cieczą na powierzchni [Lasoń i Ogonowski, 2012]. Pomimo różnorodności stosowanych nośników metoda ta posiada ograniczenia związane z rozpuszczalnością poszczególnych składników (w określonym zakresie pH), szczególnie w przypadku złożonych układów.

Metoda tworzenia kapsulek z wykorzystaniem systemu współosiowego

Zasada tworzenia kapsulek metodą współosiową (*ang. coaxial*) polega na koncentrycznym transporcie mediów umożliwiających formowanie opisanych struktur, tzn. roztworów płaszcza oraz rdzenia kapsułki, a także strumienia gazu inertnego regulującego ich wielkość. Konstrukcja urządzenia służąca do tego celu oparta jest na umiejscowieniu igły w igle o odpowiednio dobranych średnicach, zapewniając jednocześnie swobodny przepływ mediów (rys 2.). Taki system umożliwia tworzenie struktur typu „kropla w kropli”, która po utwardzeniu w odpowiednim roztworze, pozwala uzyskać kapsułkę z odrębnym rdzeniem (substancją aktywną, składnikiem żywności itp.).



Rys. 2. Schemat oraz prototyp głowicy do mikrokapsułkowania (A- widok ogólny: 1- króciec wlotowy roztworu rdzenia, 2- króciec wlotowy roztworu płaszcza, 3-króciec wlotowy strumienia azotu; B- widok głowicy od spodu: 1- dysze wyprowadzające azot, 2- miejsce formowania się kropli (głowica zaprojektowana w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej)

Łączenie do głowicy roztworów do produkcji płaszcza (najczęściej naturalnych bądź syntetycznych polimerów lub ich kompozytów) oraz aktywnych składników rdzenia w fazie ciekłej odbywa się za pomocą gazu inertnego (azotu), który z butli poprzez reduktor oraz rotametr z precyzyjnym zaworem doprowadzany jest do zbiorników z roztworem. Wzrost ciśnienia w naczyniach z roztworami rdzenia oraz płaszcza kapsułki powoduje przetłoczenie ich do głowicy, a następnie odpowiednio do igły wewnętrznej oraz zewnętrznej. Uformowana u wylotu igieł kropla w kropli spada grawitacyjnie do roztworu utwardzającego (siecącego).



Rys. 3. Kapsułki utworzone metodą koaksjalną (płaszcz: 3% roztwór alginianu sodu, rdzeń: olej rzepakowy, roztwór sieciujący: 3% CaCl_2)

Wielkość kapsułek regulowana jest za pomocą zmiany prędkości przepływu strumienia azotu (króciec nr 3) (rys. 2.) i mieści się w granicach 1 - 4 mm dla kapsułek uwodnionych.

Aby roztwory mogły być tłoczone przez głowicę konieczne jest, aby ich lepkość dynamiczna nie przekraczała wartości 1000 ± 25 mPas przy prędkości ścinania 55 1/s, w temperaturze 25°C. Lepkość ta uwarunkowana jest nie tylko ich stężeniem, ale również temperaturą. W większości przypadków wzrost temperatury powoduje spadek lepkości roztworu. W związku z tym możliwe jest także przetłaczanie roztworów o wyższych stężeniach, w odpowiednio wyższej temperaturze, o ile operacja taka nie spowoduje degradacji rozpuszczonych w nich związków. Roztwory przeznaczone do tłoczenia muszą być pozbawione pęcherzyków powietrza, tworzących się podczas ich przygotowywania (mieszania). Są one przyczyną wahań ciśnienia, wskutek czego zaburzony zostaje jednostajny przepływ roztworów przez głowicę. Cenną informacją jest także fakt, iż formowanie się kapsułek typu kropla w kropli jest tym łatwiejsze im bardziej zbliżone są do siebie wartości lepkości tłoczonych roztworów płaszczka i rdzenia.

Do tej pory w literaturze naukowej pojawiło się niewiele doniesień prezentujących praktyczne podejście do współosiowej techniki tworzenia mikrokapsułek z odrębnym rdzeniem [Kontturi i in., 2011; Wen i in., 2013; Liu i in., 2014]. Dlatego szczególnie istotna jest prezentacja zalet i rozwiązań, którymi ona dysponuje. Metoda koaksjalna pozwala na:

- tworzenie kulistych kapsułek z oddzielnym rdzeniem i płaszczem, w przeciwieństwie do sfer produkowanych w większości dobrze poznanych już metod,

- możliwość zamykania większości ciekłych związków bez względu na ich właściwości fizyko-chemiczne,
- stosowanie niskich temperatur podczas procesu formowania kapsułek, szczególnie ze względu na substancje wrażliwe na podwyższoną temperaturę (białka enzymatyczne, oleje spożywcze),
- sterowanie porowatością płaszcza, zapewniające kontrolę nad związkami przenikającymi do wewnątrz i z zewnątrz kapsułki,
- wydajną produkcję (mikro)kapsułek w wyniku zastosowania baterii złożonej z kilku lub kilkunastu głowic,
- możliwość tworzenia uwodnionych oraz suchych kapsułek,
- możliwość wykorzystania kapsułek praktycznie w każdej gałęzi przemysłu, ze szczególnym uwzględnieniem przemysłu spożywczego (kapsułki z naturalnych polimerów jak: alginian, guma arabska, chitozan).

Literatura

1. Agnihotri N., Mishra R., Goda C., Arora M. Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 2, 1-20.
2. Barbosa-Cánovas G.V. *Food Powders Physical Properties, Processing, and Functionality*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York 2005.
3. Desai K.G., Park H.J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 2005, 22, 179-192.
4. Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M. *Farmacja stosowana*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008, 217- 235.
5. Kontturi L.S., Yliperttula M., Toivanen P., Määttä A., Määttä A.M., Urtti A.A. laboratory-scale device for the straightforward production of uniform, small sized cell microcapsules with long-term cell viability. *Journal of Controlled Release*, 2011, 152, 376-381.
6. Lasoń E., Ogonowski J. Kapsułkowanie – metoda immobilizacji materiałów bioaktywnych. *Labportal* 2012.
7. Liu X.M., He J., Liu S.Y., Chen J.F., Le Y. A novel method for the preparation of electrophoretic displaymicrocapsules. *Materials Science and Engineering B*, 2014, 185, 94-98.
8. Madene A., Jacquot M., Scher J., Desobry S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 2006, 41, 1-21.

9. Mania S. Microcapsules and their applications in pharmaceutical and food industry. PhD Interdisciplinary Journal. Gdańsk, 2013, 2, 71-75.
10. Renken A., Hunkeler D. Microencapsulation: A review of polymers and technologies with a focus on bioartificial organs. Polimery, 1998, 430 530-539.
11. Shahidi F., Han X-Q. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1993, 33, 501.
12. Wen Y., Ramos Gallego M., Feldskov Nielsen L., Jorgensen L., Horn Mřller E., Mřrck Nielsen H. Design and characterization of core-shell mPEG-PLGA composite microparticles for development of cell-scaffold constructs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013, 85, 87-98.

THE EVALUATION OF THE ENTEROCOCCI ABILITY TO FORM BIOFILM AND SURVIVE THE PROCESS OF SANITATION *IN VITRO*

Bacteria of the genus *Enterococcus*, or enterococci, are ubiquitous Gram-positive, non-sporeforming, microaerobic/anaerobic cocci that occur singly, in pairs, or in chains. Enterococci grow optimally at temperature of 35 °C although most species in the genus will grow at temperatures ranging from 10 to 45 °C. They can also grow in the presence of 6.5 % NaCl, at pH 9.6, and they survive heating at 60 °C for 30 min [Foulquie Moreno et al., 2006].

Enterococci constitute a large proportion of autochthonous bacteria associated with the mammalian gastrointestinal tract. Also occur in large numbers in soil, surface water, vegetables, plant material, and foods, especially those of animal origin such as dairy and meat products [Giraffa, 2003; Klein 2003]. Enterococci are used as indicator of fecal contamination through food production chain [Foulquie Moreno et al., 2006].

The survival in the environment and insensitivity against pH changes or high salt contents are pre-requisites to be present in an indicator organism. This group of bacteria could withstand normal conditions of food production. Therefore enterococci are now also considered as normal parts of the food microflora and not only as indicator poor hygiene [Giraffa, 2003; Klein, 2003].

Traditionally enterococci are considered as part of the lactic acid bacteria. They are present in the microbial association of a variety of fermented foods such as cheeses [Sarantinopoulos et al., 2001; Koluman et al., 2009], fermented sausages [Peters et al., 2003; Barbosa et al., 2010] and fermented vegetables [Pérez-Pulido et al., 2006].

In cheese, particularly in traditional artisan raw milk cheeses, they are involved in the primary fermentation activity, but they also form part of the secondary non-starter lactic acid bacteria involved in the ripening process and in aroma development. The positive influence of enterococci on cheese, respectively on other fermented foods, seems due to specific biochemical traits such as proteolytic, lipolytic activity, citrate utilisation, and production of aromatic volatile compounds [Sarantinopoulos et al., 2001; Giraffa, 2003; Foulquie Moreno et al., 2006].

Enterococci have the ability to produce bacteriocins, the so-called enterocins, with antimicrobial activity towards bacteria including spoilage or pathogenic bacteria [Franz et al., 1996; Sarantinopoulos et al., 2002; Giraffa, 2003].

Some strains of *E. faecalis* and *E. faecium* are used in “food technology” because of their ability to produce bacteriocins and to act as a starter in fermented products [Settanni – Moschetti, 2010]. Moreover, enterococci are used in some countries as probiotics [Foulquie Moreno et al., 2006]. Established enterococcal probiotics include *E. faecium* SF68[®] and *E. faecalis* Symbioflor 1 [Franz et al., 2011].

Using enterococci as starters and probiotics is a disputed issue given the increasing incidence of human enterococcal diseases and multi-resistant enterococcal strains. Antibiotic resistance, and in particular multiresistance, is a dramatic public health problem since it may cause the failure of therapeutic treatment in case of enterococcal infections [Franz et al., 2011].

A range of natural and acquired antibiotic resistances is characteristic for enterococci. The natural resistance includes cephalosporines, aminoglycosides (low-level type), polymyxins, lincomycin and clindamycin (mostly). Additionally, enterococci often possess resistance or intermediate susceptibility to quinolones. Furthermore, they are able to acquire resistance to macrolides, tetracyclines, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole, rifampicin, aminoglycosides (high-level type) and ampicillin. Also glycopeptide-resistant enterococci were detected [Peters et al., 2003].

Several investigations showed the occurrence of vancomycin resistant enterococci also in food of animal origin [Klein, 2003; Kročko et al., 2011; Ducková et al., 2014].

Enterococcus spp. is able to transfer antibiotic genes to its own species, to other pathogens and to non pathogenic bacteria, in human or animal intestinal tract, in the environment, or even in food, thus contributing to the dissemination and persistence of antimicrobial resistance [Pesavento et al., 2014].

Several studies have also shown that enterococci posse virulence determinants, such as enterococcal surface protein gene (*esp*), aggregation substances (*agg*), cell wall adhesions (*efaAfm* and *efaAfs*), gelatinase (*gelE*) and cytolysin (*cyl*) [Barbosa et al., 2010].

The ability of enterococci to form biofilm is a further important virulence property. Biofilm production can promote increase resistance to antibiotic [Tsikrikonis et al., 2012]. Biofilm is a multicultural community anchored to a substratum and embedded in an organic polymer matrix. It is the important reservoir of microorganisms, which can cause post-processing contamination leading to lowered shelf-life of product and transmission of diseases [Sharma – Anand, 2002]. It has also been found that biofilm

cells of microorganisms are more resistant than planktonic cells to disinfectants containing e.g. chlorine, iodine, quaternary ammonium and anionic acid compounds [Salo et al., 2006].

The adhesion of bacteria to surface is the first and essential stage in the formation of biofilm. This adhesion depends on both physicochemical properties of cell surface and solid surface, and also on characteristics of the surrounding medium [Hamadi et al., 2013]. To control these problems with biofilm formation and produced food contamination, it has been recognised that greater understanding the interaction between microorganisms and food-processing surfaces is required [Barnes et al., 1999].

Sanitizer efficacy is generally determined with microorganisms cultured under ideal conditions. However, there is a lack of information on sanitizer efficacy against adhered microorganisms in conditions resembling those encountered in food industry [Carballo – Araújo, 2012].

The aim of this study was therefore to investigate the adhesion of enterococci to stainless steel in environment with different content of milk residues and then to evaluate the ability of enterococci to survive the sanitation process *in vitro*.

Tested strains of enterococci were isolated from different sources (Table 1).

Table 1. Tested strains of enterococci and their origin

Strains of enterococci	Origin
1. <i>Enterococcus faecalis</i> 1	Bryndza cheese
2. <i>Enterococcus faecalis</i> 2	Bryndza cheese
3. <i>Enterococcus faecium</i> 1	Sheep milk
4. <i>Enterococcus faecalis</i> 3	Rinse water after milking machine sanitation
5. <i>Enterococcus faecium</i> 2	Rinse water after milking machine sanitation
6. <i>Enterococcus faecalis</i> 4	Rinse water after milking machine sanitation

The adhesion of enterococci to stainless steel was determined modified method described by Carballo and Araújo [2012]. Overnight cultures of enterococci (37°C) in Trypton Soy Broth (TSB) (*HiMedia*, India) were pelleted by centrifugation (4000 rpm, 20 min). Separated bacteria washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and were suspended in PBS. Bacterial cell density was adjusted with PBS to 8 log CFU.ml⁻¹ by spectrophotometer.

In farms with milk production and also in dairies, some impurities are not always removed by sanitation from the surfaces of machines and equipments. The residues of milk and dairy products can consequently form favorable conditions for the biofilm formation. Therefore except enterococcal suspension in PBS, were also prepared enterococcal suspension in PBS with content of 0.1% of skimmed reconstituted milk and in PBS with content of 1% of skimmed reconstituted milk.

Stainless steel, commonly present in the dairy processing equipment, was cut in plates 10x25x1 mm, washed and sterilized (160°C, 4 h).

Stainless steel plates were immersed into bacterial suspensions (4 ml) and were incubated for 1 h at 37°C. After incubation, plates were rinsed twice with 4 ml of PBS, immersed in 4 ml of TSB. Adhered enterococci were immediately released from stainless steel plates with ultrasonic probe UP 100 H (*Hielscher ultrasound technology*, Germany) (30 W, 20 s). Ten-fold serial dilutions of TSB in saline were made. After 48 hours incubation at 37°C on Slanetz-Bartley agar (*HiMedia*, India), the number of enterococci was counted. Each experiment was performed twice.

In the second part of this study, efficacy of two commercial sanitizers was tested on enterococci adhered on stainless steel plates. The sanitation solutions were prepared and tested according to manufacturer recommendations (concentrations 0.25%, contact time 20 min, temperature 20°C). Both tested sanitizers are commonly used for sanitation of machine and equipments processing milk. Alkaline sanitizer contained NaOH and NaClO, acidic sanitizer contained H₃PO₄.

The plates of stainless steel with adhered enterococci, obtained as explained previously, were immersed into 4 ml of each sanitation solution for 20 min. Then, the plates were washed with PBS (4 ml, twice) and the number of surviving enterococci was determined as already explained.

Results of adhesion of enterococci to stainless steel plates in environment with different content of milk residues are in Table 2.

Table 2. Numbers (log CFU.mm⁻²) of adhered enterococci released from stainless steel plates after 1 hour cultivation at 37°C in different environments

Strains of enterococci	Initial numbers of enterococci in suspension (log CFU.mm ⁻²)	Adhered enterococci (log CFU.mm ⁻²)		
		in PBS	in PBS with 0.1% milk	in PBS with 1% milk
<i>E. faecalis 1</i>	8.74	4.22	3.77	3.03
<i>E. faecalis 2</i>	8.71	3.58	2.69	2.76
<i>E. faecium 1</i>	8.69	3.45	2.58	2.58
<i>E. faecalis 3</i>	7.61	2.92	2.12	1.65
<i>E. faecium 2</i>	8.66	2.90	2.72	2.68
<i>E. faecalis 4</i>	8.71	3.09	2.51	2.42
\bar{x}	8.52	3.36	2.73	2.52
X _{min}	7.61	2.90	2.12	1.65
X _{max}	8.74	4.22	3.77	3.03

Comparable results in environment of PBS (from 3.9 to 4.7 log CFU.mm⁻²) found Carballo and Araújo [2012] for bacteria of genus *Salmonella* and higher ability to

adhere on stainless steel had tested strains of *Listeria monocytogenes* (5.1 – 5.5 CFU.mm⁻²).

Table 2 shows effect of different concentrations of milk in environment to adhesion of enterococci on stainless steel surface. It can be concluded, that increase of milk residues in environment, paradoxically decreased the adhesion of enterococci on stainless steel surface. The differences between compared numbers of enterococci were not statistically significant ($P > 0.05$).

The role of milk or milk components in inhibiting bacterial adhesion was reported previously by several works. Hamadi et al. [2012] reported that milk reduces *Staphylococcus aureus* adhesion and the level of this reduction depends on contact time. Also Barnes et al. [1999] reported that pre-treatment of stainless steel with skim milk was found to reduce *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens* adhesion. Also Individual milk proteins α -casein, β -casein, κ -casein and α -lactalbumin were found to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.

The adhesion results obtained in mentioned studies were discussed and interpreted in terms of hydrophobicity and electron donor/electron acceptor properties of both surfaces (cell surface, stainless steel surface) [Hamadi et al., 2012]. Dat et al. [2010] and Srey et al. [2013] explain lower bacterial adhesion on surfaces with dairy residues with repulsion between negatively charged milk proteins and equally charged surfaces of bacterial cells. Another explanation of mentioned results is the lack of nutritional substances in the environment, because according Mah and O'Toole [2001], initiation of biofilm formation is the natural behavior of bacteria in nutrient deficient environment.

Tables 3 and 4 show the effect of alkaline and acidic sanitation solutions, respectively, on enterococci adhered on stainless steel plates.

Table 3. Effectiveness of alkaline sanitation solution (concentration 0.25%, temperature 20°C, 20 min) against enterococci adhered on stainless steel surface in environment with different content of milk residues

Tested strains of enterococci	Adhered enterococci (log CFU.mm ⁻²) on stainless steel surface					
	in PBS		in PBS with 0.1 % milk		in PBS with 1 % milk	
	before sanitation	after sanitation	before sanitation	after sanitation	before sanitation	after sanitation
<i>E. faecalis 1</i>	4.22	-	3.77	-	3.03	-
<i>E. faecalis 2</i>	3.58	-	2.69	-	2.76	-
<i>E. faecium 1</i>	3.45	-	2.58	-	2.58	-
<i>E. faecalis 3</i>	2.92	-	2.12	-	1.65	-
<i>E. faecium 2</i>	2.90	-	2.72	-	2.68	-
<i>E. faecalis 4</i>	3.09	-	2.51	-	2.42	-

Table 4. Effectiveness of acidic sanitation solution (concentration 0.25%, temperature 20°C, 20 min) against enterococci adhered on stainless steel surface in environment with different content of milk residues

Tested strains of enterococci	Adhered enterococci (log CFU.mm ⁻²) on stainless steel surface					
	in PBS		in PBS with 0.1% milk		in PBS with 1% milk	
	numbers before sanitation	reduction after sanitation	numbers before sanitation	reduction after sanitation	numbers before sanitation	reduction after sanitation
<i>E. faecalis 1</i>	4.22	2.52	3.77	2.48	3.03	1.37
<i>E. faecalis 2</i>	3.58	2.48	2.69	2.25	2.76	1.48
<i>E. faecium 1</i>	3.45	2.93	2.58	2.11	2.58	2.20
<i>E. faecalis 3</i>	2.92	2.92*	2.12	2.12*	1.65	1.65*
<i>E. faecium 2</i>	2.90	2.62	2.72	2.72*	2.68	2.68*
<i>E. faecalis 4</i>	3.09	3.09*	2.51	2.51*	2.42	2.42*
\bar{x}	3.36	2.76	2.73	2.37	2.52	1.97
X _{min}	2.90	2.48	2.12	2.11	1.65	1.37
X _{max}	4.22	3.09	3.77	2.72	3.03	2.68

* Total elimination

Alkaline sanitation solution containing NaOH and NaClO was 100% effective against all tested strains enterococci, which were adhered on stainless steel plates regardless to content of milk residues in environment. Acidic sanitation solution containing H₃PO₄ was 100% effective only against *E. faecalis 3*, *E. faecalis 4* and *E. faecium 2* (except of PBS environment). The values of reduction of enterococci adhered on stainless steel after application of acidic sanitation solution decrease with increase of milk residues content in environment for which stainless steel plates were in contact. Effectiveness of acidic sanitation solution obviously decreased presence of milk residues.

Similar results reported Trachoo and Frank [2002], who found that sanitizer containing chlorine are more effective than acidic sanitizers based on peracetic acid or mixture of peracetic and peroxyoctanoic acid against *Campylobacter jejuni* in biofilms.

Carballo and Araújo [2012] reported that by the manufacturer recommended concentrations of sanitation solutions (quaternary ammonium compounds and alquyldiethylenediamineglycine and di-alquyldiamineethylglycine) were not effective to kill *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp., especially they were adhered to surfaces.

Also none of tested sanitizers (based on benzalkonium chloride, hypochlorite, peroxides, and aldehydes) was sufficiently effective with all tested strains at the devitalization of the biofilm or at its removal, when used at concentration

recommended by the manufacturer and at duration of exposure of 10 min. Neither a prolonged exposure of 30 min, nor a three-fold increase in the concentration led to a significant improvement in the efficiency of the sanitizers [Koreňová et al., 2011].

It may be concluded that obtained results contribute to the better understanding of enterococci adhesion as initial phase of forming biofilm and as mechanism of survival enterococci in dairy industry. Results also indicate that adhered enterococci can survive sanitation process, especially by using acidic sanitation solutions. Therefore, manufacturers of sanitizers should test their products not only against planktonic pathogenic microorganisms but also against microorganisms in biofilm (in different phase). In dairy industry it is necessary to prevent biofilm formation and the contamination of food undesirable microorganisms by thorough cleaning and sanitation process. The risks of biofilm not consist only in food contamination but also in possibility of antibiotic resistance genes transfer.

Acknowledgements

This work was supported by the VEGA grant from Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak republic, grant No 1/0679/13 and project TRIVE - Development of International Cooperation for the Purpose of the Transfer and Implementation of Research and Development in Educational Programs ITMS 26110230085.

Literature

1. Barbosa J., Gibbs P.A., Teixeira P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products in North of Portugal. *Food Control*, 2010, 21, 651-656.
2. Barnes L.M., Lo M.F., Adams M.R., Chamberlain A.H.L. Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10), 4543-4548.
3. Carballo J., Araújo A.B. Evaluation of the efficacy of commercial sanitizers against adhered and planktonic cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 2012, 32(3), 606-612.
4. Dat N.M., Hamanaka D., Tanaka F., Uchino T. Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk solutions at different pH values and its effect on bacterial adherence. *Food Control*, 2010, 21, 1769-1773.
5. Ducková V., Čanigová M., Kročko M., Lavová M. Antibiotic susceptibility and biofilm-forming capacity of enterococci isolated from food of animal origin. *Medycyna weterynaryjna*, 2014, 70(1), 36-37.

6. Franz C.M.A.P., Schillinger U., Holzapfel W.H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29, 255-270.
7. Franz C.M.A.P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151, 125-140.
8. Folque Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106, 1-24.
9. Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88(2-3), 215-222.
10. Hamadi F., Hassan L., Asserne F., Elabed S., Zahir H., Koraichi Saad I., Hanine H., Bengourram J. Quantitative Adhesion of *Staphylococcus aureus* on Stainless Steel Coated with Milk. *Food and Nutrition Science*, 2013, 4, 299-304.
11. Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88, 123-131.
12. Koluman A., Akan L.S., Cakiroglu F.P. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*, 2009, 20, 281-283.
13. Koreňová J., Urdová K., Oravcová K. Efficacy of some sanitizers for devitalization and removal of bacterial biofilms. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2011, 50(1), 13-20.
14. Kročko M., Čanigová M., Ducková V., Krebs Artimová A., Bezeková J., Poston J. Antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw foods of animal origin in South West part of Slovakia. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011, 29(6), 654-659.
15. Pérez-Pulido R., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas R., Martínez-Canamero M., Gálvez A. Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44(12), 2070-2077.
16. Pesavento G., Calonico C., Ducci B., Magnanini A., Lo Nostro A. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology*, 2014, 41, 1-7.
17. Peters J., Mac K., Wichmann-Schauer H., Klein G., Ellerbroeck L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88, 311-314.
18. Sarantinopoulos P., Andrighetto Ch., Georgalaki M., Reac M., Lombardi A., Cogan T., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. Biochemical properties of enterococci

- relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 2001, 11(8), 621-647.
19. Sarantinopoulos P., Leroy F., Leontopoulou E., Georgalaki M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., De Vuyst L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 72, 125-136.
 20. Settanni L., Moschetti G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 2010, 27(6), 691-697.
 21. Sharma M., Anand S.K. Biofilm evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control*, 2002, 13, 469-477.
 22. Srey S., Kabir Jahid K., Ha S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 2013, 31(2), 572-585.
 23. Trachoo N., Frank J.F. Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni* containing biofilms. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(7), 1117-1121.
 24. Tsikrikonis G., Maniatis A.N., Labrou M., Ntokou E., Michail G., Daponte A., Stathopoulos S., Tsakris A., Pournaras S. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microbial Pathogenesis*, 2012, 52, 336-343.

BIOLOGICZNE DETERMINANTY BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOCI

Codex Alimentarius [Food Hygiene Basic Texts, 4th Ed.] definiuje bezpieczeństwo żywności (z ang. *food safety*), jako zapewnienie, że żywność nie spowoduje uszczerbku na zdrowiu konsumenta, jeśli jest przygotowana i/lub spożywana zgodnie z zamierzonym zastosowaniem. Podobną definicję przyjęto na potrzeby unijnego Rozporządzenia nr (WE) 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych. Zgodnie z nim bezpieczeństwem żywności jest zapewnienie, aby środki spożywcze po przygotowaniu i spożyciu nie miały szkodliwego wpływu na zdrowie konsumentów. Przy czym bierze się pod uwagę: (1) normalne warunki użytkowania; (2) informacje dostarczane konsumentowi; (3) prawdopodobny natychmiastowy lub odroczonego wpływu na zdrowie; (4) skumulowane skutki toksyczności; (5) szczególną wrażliwość zdrowotną określonej kategorii konsumentów. Według Rozporządzenia (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności, żywność musi być bezpieczna dla konsumenta pod każdym względem. Środek spożywczy jest uznawany za niebezpieczny, jeżeli: (a) jest szkodliwy dla zdrowia; oraz (b) nie nadaje się do spożycia przez ludzi. Żaden niebezpieczny środek spożywczy nie może być wprowadzany na rynek. Podejście obejmuje zarówno produkty żywnościowe produkowane w UE, jak i artykuły importowane z krajów trzecich. Według natomiast amerykańskiej Agencji Ds Żywności i Leków [Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2nd Ed.] żywność jest niebezpieczna, jeśli zawiera: (1) trujące lub w inny sposób szkodliwe substancje, które nie są naturalnym składnikiem samej żywności, w ilości stwarzającej ryzyko uszkodzenia zdrowia; lub (2) substancję, która jest nieodłącznie naturalnym składnikiem samej żywności; nie jest wynikiem rolniczych, przemysłowych lub innych zanieczyszczeń środowiska; i jest obecna w ilości czyniącej żywność szkodliwą dla zdrowia.

W związku z przedstawionymi przykładami definiowania bezpieczeństwa żywności, należy zadać pytanie, jakie są determinanty tego bezpieczeństwa? Z opracowanych zasad systemu HACCP wiadomo, że żywność jest narażona na trzy typy zagrożeń. Zagrożenia mikrobiologiczne są związane z obecnością mikroorganizmów chorobotwórczych i saprofitycznych, pasożytów, szkodników, które mogą spowodować

zepsucie żywności, wytwarzać toksyny, enzymy, aminy biogenne lub inne produkty ich metabolizmu. Zagrożenie chemiczne jest to przeniesienie substancji szkodliwych powszechnie występujących w środowisku do żywności z surowców, z aktywności rolniczo-hodowlanej, aktywności sanitarnej, technologicznej, dodatków do żywności. Zagrożenia fizyczne są to wszystkie ciała stałe obce: naturalne (kości, pestki, kamienie, piasek), kawałki tworzyw sztucznych (z maszyn, opakowań), metali (opiłki lub fragmenty części maszyn, opakowań), szkło, drewno, inne (guziki, włosy). Opierając się na takiej klasyfikacji zagrożeń nie jest trudno wywnioskować, że biologicznymi determinantami tego bezpieczeństwa są mikroorganizmy, pasożyty i szkodniki. Zapisy Rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, poszerzają rozumienie pojęcia mikroorganizmy, przyjmując na swój użytek, że są to bakterie, drożdże, pleśnie, glony, wirusy, pierwotniaki pasożytnicze, mikroskopijne robaki pasożytnicze, a także ich toksyny i metabolity. Opracowane w ramach cytowanego rozporządzenia kryterium bezpieczeństwa żywności wymienia nie tylko wybrane patogeny, np. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Enterobacter sakazakii* czy *E. coli*, ale także enterotoksyny gronkowcowe oraz histaminę. Również FDA w opracowaniu „Bad Bug Book” wymienia liczne czynniki pochodzenia biologicznego, nie ograniczając się tylko do samych mikroorganizmów. Zatem za determinanty biologiczne bezpieczeństwa żywności można uznać czynniki mikrobiologiczne (bakterie, drożdże, pleśnie, glony, wirusy, pierwotniaki pasożytnicze, mikroskopijne robaki pasożytnicze), a także ich toksyny i metabolity (np. aminy biogenne), ale podobnie można zaklasyfikować priony, alergeny, GMO oraz naturalnie występujące toksyny żywności i inne naturalnie występujące substancje.

Mikroorganizmy mogące występować w produktach spożywczych można sklasyfikować na dwie kategorie: (1) saprofityczne, niechorobotwórcze, ale mogące powodować zepsucie produktów; (2) chorobotwórcze, których bezwzględnie nie powinno być w produktach żywnościowych. Źródłami mikroorganizmów w produktach spożywczych mogą być: surowce, stosowane dodatki, proces produkcji, opakowania jednostkowe oraz człowiek. Dostając się do organizmu konsumenta drogą pokarmową mogą one być przyczyną zatruc pokarmowych. Dane epidemiologiczne wskazują, że głównymi przyczynami zatruc pokarmowych są przede wszystkim zbyt wysoka temperatura przechowywania żywności skażonej patogenami, niewłaściwa higiena osobista osób przetwarzających żywność, przygotowujących lub spożywających posiłki, a także zanieczyszczenia wtórne żywności mające miejsce po ostatniej obróbce termicznej mogącej eliminować czynnik patogenny. Potencjalnym źródłem zatruc pokarmowych jest przede wszystkim żywność bogata w białka, produkty o wysokiej wartości pH lub o dużej aktywności wody. Oczywiście od tych obserwacji epidemiologicznych są nieliczne wyjątki, np. produkty wysokoskrobiowe, które mogą

być przyczyną zatrucia pokarmowego toksyną *Bacillus cereus* typu wymiotnego. Rozróżnia się dwa rodzaje zatruc pokarmowych: intoksykacje i toksykoinfekcje. Intoksykacje występują po spożyciu toksyn bakteryjnych. Obecność żywych komórek bakterii nie jest konieczna do wystąpienia objawów zatrucia. Warunkiem koniecznym powodowania zatrucia typu intoksykacja jest to, że najpierw mikroorganizmy muszą namnożyć się w żywności do takich liczby, aby powstały odpowiednie ilości toksyn. Wytworzone toksyny są egzotoksynami, czyli substancjami wydzielanymi przez komórki mikroorganizmów na zewnątrz. Przykładami intoksykacji są zatrucie jadem kiełbasianym, czyli toksyną botulinową *Clostridium botulinum* i zatrucie enterotoksyną gronkowcową *Staphylococcus aureus*. Toksykoinfekcje są wywoływane po spożyciu żywych komórek mikroorganizmów. Czasami wystarczy już niewielka liczba ich komórek w żywności. Mikroorganizmy te również są zdolne do wytwarzania toksyn, ale są to endotoksyny, czy substancje wewnątrzkomórkowe. Toksykoinfekcje mogą być wywoływane przez m.in.: *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Cl. perfringens*, *B. cereus*, *Campylobacter jejuni*, *L. monocytogenes*. Wymienione przykłady mikroorganizmów odpowiadają nie tylko za zatrucia pokarmowe. Przykładowo, *Y. enterocolitica* znane są z powodowania infekcji gardła. Od lat wiadomo, że *L. monocytogenes* odpowiadają za obumieranie płodu i choroby zwierząt (w tym zapalenie opon mózgowych lub mózgu), a także ludzi (zapalenie opon mózgowych, posocznica i różne inne choroby, np. serca. *C. jejuni* są przyczyną poronień i zapaleń jelit u owiec i bydła domowego. *Cl. perfringens* wywołują zgorzel gazową (z łac. *gangraena gaseosa*), czyli martwicę mięśni lub tkanki łącznej. Gronkowce, streptokoki i enterokoki mogą powodować z kolei ropne stany zapalne błon śluzowych.

Od kilkunastu lat znamy pojęcie „nowych patogenów”. Są to bardzo często mikroorganizmy znane ludzkości, ale pokazujące nam swoje nowe oblicze. Na przykład *Y. enterocolitica*, które zaczęły wykazywać zdolność do rozwoju w niskich temperaturach (0-4°C) przechowywania żywności minimalnie przetworzonej i produktach typu ready-to-eat. Innym „sztandarowym” przykładem nowego patogenu są *L. monocytogenes* dobrze tolerujące podwyższone stężenia soli, pH i rozwijające się w zakresie temperatur 0-44°C, mogące przetrwać proces mrożenia, suszenia lub delikatnego ogrzewania. Do „nowych patogenów” zalicza się także np. *C. jejuni*, *Helicobacter*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* oraz patogenne szczepy *Escherichia coli*, taki jak bardzo rzadki szczep O104:H4 należący do typu enterokrwotocznych *E. coli* (EHEC), który kilka lat temu spowodował falę zachorowań w Niemczech.

Kolejnym czynnikiem biologicznym determinującym bezpieczeństwo żywności są wirusy. Są to cząsteczki inwazyjne, niezdolne do rozmnażania się poza organizmem gospodarza i przeprowadzania samodzielnie procesów metabolicznych. Pomimo, że nie są zaliczane do świata organizmów żywych, najczęściej są z nimi kojarzone

i na listach czynników patogenów wymieniane wraz z mikroorganizmami. Wśród wirusów istotnych dla żywności wymienić można następujące rodzaje: (1) adenowirusy powodujące infekcje błony śluzowej górnych dróg oddechowych, oczu, węzłów chłonnych, gorączkę u ludzi, zapalenie wątroby u zwierząt; (2) astrowirusy wywołujące zapalenie żołądka i jelit, wodnistą biegunkę, nudności, wymioty, gorączkę, złe samopoczucie, brak łaknienia, bóle brzucha; (3) norowirusy, np. wirus Norwalk odpowiedzialny za ok. 90% epidemii niebakteryjnego zapalenia żołądka i jelit; (4) herpeswirusy, np. opryszczka, ospa wietrzna, półpasiec, zakażenia skóry, ośrodkowego układu nerwowego, oczu i błon śluzowych; (5) pikornawirusy odpowiedzialne za choroby układu pokarmowego, nerwowego, skóry i błon śluzowych, przeziębienia, wirusowe zapalenie wątroby; (6) rotawirusy wywołujące infekcje układu oddechowego, zapalenie jelit, wysoką temperaturę, biegunkę, zapalenie mięśnia sercowego, jelit i wątroby. Wydaje się, że w chwili obecnej nie doceniamy tego zagrożenia. Tymczasem zdaniem amerykańskiego Centers for Disease Control and Prevention za około 70% ognisk norowirusa przenoszonych ze skażonej żywności odpowiadają ludzie [CDC.gov].

Pośród pasożytów istotne dla żywności i jej bezpieczeństwa dla konsumenta mają endopasożyty, czyli pasożyty wewnętrzne, żyjące wewnątrz obcego organizmu będącego źródłem pożywienia dla nich. Mogą być one przyczyną poważnych chorób. Do takich pasożytów należą m.in. nicienie: włosień kręty, spiralny (*Trichinella spiralis*), glista ludzka (*Ascaris lumbricoides hominis*), owsik ludzki (*Enterobius vermicularis* syn. *Oxyuris vermicularis*) oraz włosogłówka ludzka (*Trichuris trichiura* syn. *Trichocephalus trichiurus*). Pasożytami są również płazińce – tasiemce: uzbrojony, soliter (*Taenia solium*), nieuzbrojony (*Taenia saginata*), bąblowcowy, bąblowiec (*Echinococcus granulosus*) i bruzdogłowiec szeroki (*Diphyllobothrium latum*). Do pierwotniaków zalicza się wielkociec jelitowy (*Giardia lamblia*, syn. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*), pełzak czerwony (*Entamoeba histolytica*) oraz *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*. Do najgroźniejszych przywr należą: motyllica wątrobowa (*Fasciola hepatica*), motyliczka (*Dicrocoelium lanceatum*), przywry kocia i tropikalna. Biologicznymi czynnikami decydującymi o bezpieczeństwie żywności są również szkodniki. Ich obecność może sprzyjać przenoszeniu na produkty spożywcze innych biologicznych determinantów bezpieczeństwa żywności. Do szkodników żywności należy zaliczyć: roztocza (rozkruszki, roztoczki), nicienie (włosień kręty, węgorek pszeniczny, węgorek octowy), owady (wołek zbożowy, motyle: mól ziarniak, mklik mączny, karaczany), muchę domową oraz gryzonie (np. myszy i szczury).

Mówiąc o mikroorganizmach i innych żywych organizmach, jako biologicznych determinantach bezpieczeństwa żywności, nie sposób pominąć ich metabolitów. Do takich metabolitów zaliczyć należy przede wszystkim toksyny bakteryjne

i mikotoksyny grzybowe. Spośród toksyn bakteryjnych najważniejsze dla bezpieczeństwa żywności są te, charakteryzujące się stabilnością, np. termiczną, gdyż pozostają one w produkcie finalnym stanowiąc ryzyko dla zdrowia człowieka, pomimo eliminacji żywych komórek ich producenta. Do takich toksyn zalicza się m.in. ciepłostabilne toksyny *Staphylococcus aureus*, ciepłostabilne neurotoksyny *Clostridium botulinum* oraz toksynę wymiotną (ETE) i enterotoksyny HBL, Nhe, EntK wytwarzane przez *Bacillus cereus*. Mikotoksyny są wtórnymi metabolitami, nieposiadającymi biochemicznego znaczenia dla wzrostu i rozwoju grzybów pleśniowych je wytwarzających. Toksynotwórcze pleśnie mogą wytwarzać jedną lub więcej takich toksycznych wtórnych metabolitów. Przy czym nie wszystkie pleśnie są toksynotwórcze i nie wszystkie ich wtórne metabolity są toksyczne dla człowieka. Dotychczas w żywności i paszach zidentyfikowano ponad 400 różnych mikotoksyn. Znane są dwie drogi narażenia ludzkiego organizmu na działanie tych substancji: bezpośrednie (spożywanie produktów żywnościowych pochodzenia roślinnego zanieczyszczonych mikotoksynami) oraz pośrednie (spożywanie produktów pochodzenia zwierzęcego, pozyskiwanych od zwierząt skarmianych paszą skażoną grzybami mikotoksynotwórczymi lub mikotoksynami). Od pewnego czasu mówi się o tzw. mikotoksynach maskowanych lub sprzężonych, które często są obecne w surowcach żywnościowych i w paszach. Ponieważ wchodzą w wiązania z innymi cząsteczkami, np. glukozą, nie są wykrywane w trakcie rutynowych analiz, natomiast mogą być uwalniane podczas trawienia pokarmów w układzie pokarmowym człowieka lub zwierząt, powodując nieznanne stany chorobowe (brak danych naukowych na ten temat).

Mikrobiologicznymi metabolitami są również aminy biogenne. Są to związki azotowe, proste zasady organiczne o małej masie cząsteczkowej, powstające w wyniku dekarboksylacji aminokwasów lub aminacji i transaminacji ketonów i aldehydów. Obecności amin biogennych należy spodziewać się w każdego rodzaju żywności, która zawiera białka lub wolne aminokwasy i stwarza możliwość rozwoju mikroorganizmów: (1) jako efekt mikrobiologicznego zepsucia żywności; lub (2) jako efekt fermentacji żywności. Większość ludzi wychodzi z założenia, że substancje naturalne są bezpieczne. Tymczasem obecność amin biogennych w surowcach żywnościowych lub produktach przetworzonych może być wynikiem szlaków metabolicznych zachodzących w surowcach żywnościowych (w tkance roślinnej lub zwierzęcej) bez udziału komórek mikroorganizmów. Wysoki poziom amin biogennych jest naturalną cechą niektórych produktów żywnościowych, np.: cytrusów, porzeczki, truskawek, winogron (putrescyna), pomidorów (tyramina, tryptamina), bananów (tyramina, tryptamina), śliwek (tyramina), szpinaku (histamina), roślin strączkowych, czekolady, kakao, ziarna kakaowca (fenyloetyloamina).

Również inne naturalnie występujące w żywności substancje mogą być niebezpieczne dla organizmu człowieka. Wymienić tu trzeba przede wszystkim: (1) glikozydy cyjanogenne, kumarynowe, saponinowe, nasercowe, np.: amygdalina obecna w pestkach moreli, śliwek, wiśni, migdałów, brzoskwini, jarzębinie), związki saponinowe (obecne w szpinaku, burakach, szparagach, soi); (2) alkaloidy, czyli związki zasadowe, na ogół heterocykliczne, zawierające azot, głównie pochodzenia roślinnego, m.in.: atropina, skopolamina, kokaina, chinina, morfina, kodeina, alkaloidy sporyszu, solanina, chalkonina, tomatyna; (3) substancje wolotwórcze: tiocyjaniany, izotiocyjaniany, tiooksazolidyny; (4) inhibitory trypsyny (obecne w soi, fasoli, grochu, kukurydzy, ziemniakach, białku jaja); (5) fitohemaglutyniny z grupy lektyn, wywołujące rzadko spotykane zatrucie nazywane w wielu krajach „zatruciem czerwoną fasolą”; (6) grajanotoksyny wywołujące „odurzenie miodowe”, czyli zatrucie po spożyciu miodu zanieczyszczonego toksynami, które pszczoły zebrały razem z nektarem roślin ozdobnych, szczególnie rododendronów; (7) toksyny mięczaków, wytwarzane przez algi obecne w planktonie, którym żywią się mięczaki, toksyny te są akumulowane lub metabolizowane przez mięczaki, znane zatrucia tego typu to np. zatrucie paralityczne, PSP, biegunkowe, DSP, neurotoksyczne, NSP, amnezyjne, ASP; (8) tetrodotoksyny wytwarzane w organizmach ryb rzędu *Tetraodontiformes*; (9) ciguatoksyny powodujące zatrucia po spożyciu niektórych gatunków ryb morskich zwrotnikowych i podzwrotnikowych.

O istotności substancji naturalnie występujących w żywności dla bezpieczeństwa człowieka świadczyć może przykład badań nad β -kazeiną, frakcją kazeiny, głównego białka mleka. Znanych jest 13 wariantów genetycznych β -kazeiny, ale u bydła mlecznego najpowszechniejszymi są A1 i A2. Na skutek trawienia β -kazeiny A1 w układzie pokarmowym jest uwalniana znaczna ilość β -kazomorfina-7, a w przypadku trawienia β -kazeiny A2 uwalniane jest bardzo mało tej substancji. Istnieje hipoteza, że β -kazomorfina-7 może mieć poważne konsekwencje zdrowotne - uczestniczyć m.in. etiologii choroby wieńcowej, cukrzycy insulino-zależnej u dzieci do 14 r.ż., a także schorzeń takich jak autyzm. Dlatego od lat trwają badania, których celem jest potwierdzenie tej hipotezy, a także próby wyhodowania krów, które nie syntetyzują β -kazeiny w formie A1.

Stosunkowo nowym problemem w systemach bezpieczeństwa żywności są alergeny, które dostając się do ludzkiego organizmu drogą pokarmową, mogą wywoływać objawy alergii pokarmowej, czyli gwałtownej reakcji organizmu spowodowanej pobudzeniem mechanizmów immunologicznych. Alergia pokarmowa jest często mylona z nietolerancją pokarmową, czyli nadwrażliwością na żywność lub jej składnik. Nietolerancja pokarmowa ma nieco inny przebieg i objawy niż alergia pokarmowa. Zgodnie z unijnym Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom

informacji na temat żywności, producenci są zobowiązani do wykazywania w składzie produktów żywnościowych nazw substancji lub składników powodujących alergię lub reakcję nietolerancji za pomocą tekstu wyraźnie odróżniającego ją od reszty wykazu składników. Substancjami lub produktami powodującymi alergię lub reakcje nietolerancji są: zboża zawierające gluten, tj. pszenica, żyto, jęczmień, owies, orkisz, kamut lub ich odmiany hybrydowe, a także produkty pochodne (z wyjątkami), skorupiaki i produkty pochodne, jaja i produkty pochodne, ryby i produkty pochodne (z wyjątkami), orzeszki ziemne (arachidowe) i produkty pochodne, soja i produkty pochodne (z wyjątkami), mleko i produkty pochodne (łącznie z laktozą) (z wyjątkami), orzechy, tj. migdały, orzechy laskowe, orzechy włoskie, orzechy nerkowca, orzeszki pekan, orzechy brazylijskie, pistacje/orzechy pistacjowe, orzechy makadamia lub orzechy Queensland, a także produkty pochodne (z wyjątkami), seler i produkty pochodne, gorczyca i produkty pochodne, nasiona sezamu i produkty pochodne, dwutlenek siarki i siarczyny (z zastrzeżeniami), łubin i produkty pochodne, a także mięczaki i produkty pochodne.

Niepodważalnym biologicznym zagrożeniem bezpieczeństwa żywności są priony (z ang. *proteinaceous infectious particle*), czyli białkowe cząsteczki zakaźne PrP (z ang. *Prion Protein*), białka o strukturze drugorzędowej innej niż białka normalnie funkcjonujące w żywych organizmach. Co ciekawe, priony są czynnikiem patogennym niezawierającym informacji genetycznej. Powodują choroby układu nerwowego zwierząt, m.in. scrapie, gąbczastą encefalopatię bydła, zwana chorobą szalonych krów (BSE, z ang. *bovine spongiform encephalopathy*), pasażowalną encefalopatię norek (z ang. *transmissible mink encephalopathy*), encefalopatię gąbczastą kotów (z ang. *feline spongiform encephalopathy*), przewlekłą chorobę wyniszczającą jeleniowatych (z ang. *chronic wasting disease*). A także odpowiedzialne za wiele chorób ludzkich, m.in.: chorobę Creutzfeldta-Jakoba, chorobę Gerstmana-Strausslera-Steinkera, kuru, śmiertelną bezsenność rodzinną (z ang. *fatal familial insomnia*). Badania genetyczne dowodzą, że priony są białkami kodowanymi w DNA: gen *PRNP* u ludzi, gen *Prn-p* u wszystkich ssaków, gadów i płazów, a nawet w komórkach mikroorganizmów. Co ciekawe, u *Saccharomyces cerevisiae* zwiększają zdolności adaptacyjne i umożliwiają przeżycie w niekorzystnych warunkach środowiskowych.

Od pewnego czasu biotechnologia i genetyka są zafascynowane narzędziami inżynierii genetycznej pozwalającymi na modyfikacje genów. Dzięki nim otrzymaliśmy organizmy genetycznie modyfikowane (GMO, z ang. *genetically modified organism*). Od chwili powstania takich organizmów, w tym mikroorganizmów, świat podzielił się na zwolenników ich stosowania i ich przeciwników. Jak dotąd brak jednoznacznych wskazań, że GMO jest niebezpieczne dla człowieka. Niezaprzeczalnie, producenci żywności korzystają z dobrodziejstwa mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie, uzyskując dzięki nim wiele wartościowych substancji w warunkach biotechnologicznych.

Coraz intensywniej mówi się o powszechnej produkcji surowców żywnościowych modyfikowanych genetycznie. Na terenie krajów Unii Europejskiej podjęto próbę prawnej regulacji użytkowania GMO. Do tego celu opracowano Rozporządzenie (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy. Zgodnie z prawem, na terenie UE jest zakaz stosowania składników modyfikowanych genetycznie do żywności i do pasz dla zwierząt, bez odpowiedniego oznakowania. Oznacza to, że w momencie nieuprawnionej obecności w surowcach i produktach żywnościowych GMO można tą żywność traktować jako zagrożenie biologiczne.

Podsumowując, znanych jest bardzo dużo czynników mikrobiologicznych i chemicznych, które można uznać za biologiczne determinanty bezpieczeństwa żywności. Lista tych czynników nie skraca się pomimo postępu nauki, techniki i technologii. W pewnym sensie postęp techniczny i technologiczny przyczyniają się do pojawiania nowych zagrożeń lub selekcji nowych odmian/szczepów starych zagrożeń. Z drugiej strony wiedza naukowa i analityczna pozwalają wykrywać i szacować nowe zagrożenia, powoli uczą się jak radzić sobie z tymi zagrożeniami. Należy zadać sobie pytanie "Jakie są wizje na przyszłość?". Analizując powyższy przegląd można stwierdzić „Lepiej chyba nie będzie...”.

KORZYSCI I ZAGROŻENIA WYNIKAJĄCE ZE SPOŻYWANIA SUPLEMENTÓW DIETY PRZEZ WYBRANĄ GRUPĘ MŁODYCH, AKTYWNYCH ZAWODOWO OSÓB

Streszczenie

Celem badań była ocena wiedzy młodych, aktywnych zawodowo konsumentów na temat dostępnych na rynku suplementów diety oraz zagrożeń wynikających z ich spożywania.

Badanie empiryczne w oparciu o kwestionariusz ankiety zostało zrealizowane w grupie 100 losowo wybranych studentów pierwszego i drugiego stopnia studiów niestacjonarnych kierunku Towaroznawstwo Wydziału Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa Akademii Morskiej w Gdyni. Do analizy statystycznej wyników badań zastosowano test zgodności χ^2 (chi kwadrat), porównując uzyskane rozkłady odpowiedzi z rozkładem jednostajnym.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano wniosek końcowy: osobom młodym, aktywnym zawodowo potrzebna jest dodatkowa edukacja zdrowotna z zakresu suplementacji, gdyż dokonywany przez nie wybór suplementów diety nie może być przypadkowy i oparty o rekomendację znajomych oraz relację ceny do wielkości opakowania.

Słowa kluczowe: suplementy diety, zagrożenia zdrowotne, młodzi konsumenci

Wprowadzenie

Suplementy diety są łatwo dostępnym i pożądanym przez konsumentów produktem. Jednym z czynników rozwoju rynku suplementów diety są działania marketingowe, zwiększające wiedzę społeczeństwa o asortymencie tych produktów. Perspektywa rozwoju rynku suplementów diety w dużej mierze uzależniona jest od dalszego wzrostu znaczenia profilaktyki prozdrowotnej wśród społeczeństwa oraz utrzymania się trendu na zdrowy wygląd [Waszkiewicz-Robak, 2009].

Jednym z czynników sprzyjających rozwój rynku leków sprzedawanych bez recepty (OTC) i suplementów diety jest utrudniony dla ludności dostęp do lekarza specjalisty oraz rekomendacje udzielane przez farmaceutów. Wprowadzenie do sprzedaży leków OTC i różnego rodzaju suplementów diety, w sklepach ogólnodostępnych (hipermarketach, supermarketach, małych sklepach spożywczych, kioskach, stacjach benzynowych, w sklepach zielarsko-medycznych), a nawet w urzędach pocztowych,

miało wpływ na wzrost spożycia tych preparatów. Coraz bardziej znaczącym, stanowiącym udogodnienie dla odbiorców, kanałem dystrybucji jest internetowa sprzedaż wysyłkowa. Mimo rozwoju rynku poza aptecznego, głównym kanałem dystrybucji suplementów diety w Polsce są apteki. Około 80% wszystkich artykułów sprzedawanych w aptekach to suplementy diety. Klienci stosują je w szeroko rozumianej profilaktyce zdrowotnej. Drugim, bardzo istotnym czynnikiem mającym wpływ na sprzedaż suplementów diety jest sezonowość i moda, poparta skutecznymi kampaniami reklamowymi [<http://www.egospodarka.pl/...>].

Chociaż dynamika rozwoju rynku suplementów diety jest obecnie niższa niż w latach poprzednich to warto podkreślić, że wciąż jest bardzo wysoka i wyższa niż dla leków OTC. Zakłada się, że nadal będą kontynuowane trendy, które występowały w poprzednich latach i pozytywnie wpływały na sprzedaż suplementów, takie jak: starzenie się społeczeństwa, wzrost zainteresowania samoleczeniem, zdrowym stylem życia i wyglądem zewnętrznym, produktami pochodzenia naturalnego i ziołowego [<http://www.pmrpublications.com/...>].

Na polskim rynku dostępna jest obecnie szeroka gama suplementów diety. W sprzedaży dostępne są między innymi: odżywki dla sportowców (na zwiększenie masy), suplementy i preparaty odchudzające, suplementy poprawiające wygląd skóry, włosów i paznokci, środki i suplementy na męskie problemy seksualne, suplementy dla kobiet, suplementy prozdrowotne, suplementy pomocne przy nauce i pracy umysłowej, suplementy dla osób aktywnych i sportowców.

Suplementy diety mają właściwości wzmacniające stan zdrowia człowieka. Mogą też zmniejszać ryzyko zachorowania na wybrane jednostki chorobowe przez działanie w obszarze utrzymania przez organizm homeostazy [Stoś i Szponar, 2006]. W praktyce rozważa się znaczenie suplementów jako składników uzupełniających nieprawidłową dietę, bądź zmniejszających ryzyko wystąpienia przewlekłych chorób niezakaźnych [Kłosowicz-Latoszek i in., 2008]. Niemniej w niektórych stanach fizjologicznych, takich jak: okres ciąży czy laktacji, zwiększony wysiłek fizyczny, choroby, niewłaściwy styl życia, suplementacja niektórymi składnikami, a zwłaszcza witaminami i składnikami mineralnymi może być wskazana [Gertig i Przysławski, 2006]. Ważne jest, aby stosowane ilości suplementów witaminowych, czy mineralnych nie przekraczały dawek uznanych według aktualnego stanu wiedzy za bezpieczne oraz by korygować popełniane błędy w sposobie żywienia [Brzozowska i in., 2005].

Bardzo niebezpieczne jest zjawisko tzw. samoleczenia, polegające na dowolnym doborze suplementów diety i niejednokrotne środków farmakologicznych. Dowolne stosowanie leków, czy też ziół może wywoływać nieodwracalne zmiany w organizmie [Waszkiewicz-Robak, 2009].

Wiele z suplementów diety cieszących się niezwykłą popularnością zawiera surowce roślinne, w tym zielarskie. Często są to jednak tzw. „produkty z pogranicza lek/żywność”, a surowce w nich zawarte wchodziły do tej pory wyłącznie w skład produktów leczniczych. Suplementy diety stanowią jedynie uzupełnienie normalnej diety w wartościowe składniki pochodzenia roślinnego i nie mogą być alternatywą dla leku roślinnego. Jednak w związku z tym pojawia się wiele pytań i kontrowersji na ten temat, np.: jakie surowce roślinne mogą wchodzić w skład suplementów diety, jak ustalić maksymalne i minimalne dawki dobowe dla tych surowców, aby nie stanowiły one zagrożenia zdrowotnego dla konsumentów, ale wywoływały pożądany „efekt fizjologiczny” oraz jakie powinny być badania odnośnie jakości i standaryzacji surowców zielarskich wchodzących w skład suplementów diety [Derebecka-Hołyśz i Mścisz, 2007].

Według Ustawy z dnia 6 września 2001 r. o prawie farmaceutycznym produktem leczniczym jest substancja lub mieszanina substancji, przedstawiana jako posiadająca właściwości zapobiegania lub leczenia chorób występujących u ludzi lub zwierząt lub podawana w celu postawienia diagnozy lub w celu przywrócenia, poprawienia lub modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu poprzez działanie farmakologiczne, immunologiczne lub metaboliczne. Suplementy diety natomiast są przeznaczone są natomiast do uzupełnienia diety w składniki niedoborowe i nie przypisuje się im efektu leczniczego. Oczywiście zarówno suplementy diety jak i leki mają na celu utrzymanie równowagi fizjologicznej organizmu.

Z prawnego punktu widzenia suplementy diety i produkty farmaceutyczne (lecznicze) to całkowicie odmienne kategorie produktów, chociaż w ich składzie można dopatrzeć się wielu wspólnych cech. Problemem w prawidłowej klasyfikacji produktu, jako suplementu diety, stwarzają pewne substancje aktywnie czynne, inne niż witaminy i składniki mineralne, czyli surowce znane z tradycji ich spożywania, wykorzystywane w medycynie wschodu i ziołolecznictwie, ale też stosowane w preparatach farmaceutycznych. Należy zaznaczyć, że żaden produkt nie może być produktem farmaceutycznym i równocześnie środkiem spożywczym w postaci suplementu diety, chociaż w obu przypadkach mogą one zawierać te same substancje, lecz w różnych ilościach [Waszkiewicz-Robak, 2009].

Celem badań była ocena wiedzy młodych, aktywnych zawodowo konsumentów na temat dostępnych na rynku suplementów diety oraz zagrożeń wynikających z ich spożywania.

Material i metody

Badanie empiryczne zrealizowano metodą wywiadu bezpośredniego w 2012 roku w grupie 100 kobiet i mężczyzn, w wieku od 19 do 30 lat. Badana grupa składała się z osób młodych, aktywnych zawodowo i stosujących suplementację. Kobiety stanowiły

56%, a mężczyźni 44% ogółu badanych. Osoby do badania wylosowano metodą prostą, indywidualną. Do wylosowania badanej grupy zastosowano tabelę liczb losowych. Operatorem losowania była lista studentów pierwszego i drugiego stopnia studiów niestacjonarnych kierunku Towaroznawstwo Wydziału Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa Akademii Morskiej w Gdyni. Badana grupa studentów reprezentowała wiedzę charakterystyczną dla ludzi młodych, dobrze wykształconych, ponieważ ich wiedza po przeprowadzeniu procesu rekrutacji na studia nie odbiegała od przeciętnej wiedzy młodych Polaków. Przy analizie wyników uwzględniono płeć respondentów oraz zastosowano test zgodności χ^2 (chi kwadrat), porównując uzyskane rozkłady odpowiedzi z rozkładem jednostajnym.

Badanie przeprowadzono w oparciu o autorski kwestionariusz ankiety zawierający 11 pytań typu zamkniętego. Zakres analizowanych zagadnień umożliwił ocenę sposobu żywienia badanej grupy studentów, rodzaju, formy, pory roku i częstości spożywania suplementów diety, źródeł pozyskiwania informacji na temat suplementacji (2 pytania w ankiecie badawczej), czynników wpływających na zakup oraz miejsca zakupu suplementów, ustalenie czynników wpływających na stosowanie suplementów diety przez badaną grupę respondentów, określenie rodzaju najczęściej kupowanych suplementów, ocenę wiedzy badanej grupy kobiet i mężczyzn na temat zagrożeń wynikających z przyjmowania suplementów diety.

Wyniki i dyskusja

W XX i XXI wieku codzienny rytm życia większości ludzi uległ znacznym zmianom. Obecnie niewiele czasu i uwagi poświęca się na przygotowywanie pełnowartościowych posiłków, a stosowanie suplementów diety w celu uzupełnienia składników odżywczych stało się coraz bardziej powszechne. Jednocześnie obserwuje się coraz większą dbałość Polaków o kondycję fizyczną, witalność i wygląd zewnętrzny [Tyrakowska i in., 2009].

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że ponad połowa mężczyzn (55%) i niemal połowa kobiet (45%) uważała swój sposób żywienia za prawidłowy. Mimo to respondenci zadeklarowali, że kupują i spożywają suplementy diety. Badana grupa najczęściej zażywała suplementy diety jesienią i zimą (54% kobiet i 65% mężczyzn), czyli w okresie osłabionej odporności organizmu i wzmożonych przeziębień. Najmniejszy odsetek badanych przyjmował suplementy diety wiosną (12% kobiet i 9% mężczyzn) i latem (6% kobiet i 8% mężczyzn). Określono, że większy odsetek kobiet (28%) niż mężczyzn (18%) stosował suplementację przez cały rok. Najwięcej, bo 48% kobiety i 41% mężczyzn zadeklarowało spożycie suplementów diety w zależności od potrzeb. Dwa procent kobiet i 9% mężczyzn stosowało suplementację diety kilka raz dziennie, 20% kobiet i 14% mężczyzn raz dziennie, a 11% kobiet i 20% mężczyzn kilka

razy w tygodniu. Sigłowa i wsp. na podstawie przeprowadzonych badań w grupie studentów różnych kierunków, między innymi dietetyki, nauki o żywieniu, zdrowia publicznego, pielęgniarstwa, farmacji, turystyki, informatyki/elektroniki, stwierdzili, że przedstawiciele obu płci najczęściej deklarowali spożycie suplementów diety raz dziennie, w tym 54,7% kobiet i 48,3% mężczyzn [Sigłowa i in., 2009]. Stwierdzona regularność przyjmowania suplementów przez badaną grupę była zbliżona do wyników uzyskanych przez Sigłowa i in. [2009]

Obserwując stronę podażową polskiego rynku suplementów diety, można zauważyć, że ilość produkowanych preparatów stale rośnie, a nowe produkty kierowane są do kolejnych, wąskich grup odbiorców [Tyrałowska i in., 2009]. Miechota-Katulka i in. [2009] stwierdzili, że najczęściej stosowanymi suplementami diety przez młode kobiety (42%) były preparaty witaminowo – wzmacniające, a następnie środki odchudzające (25%) i poprawiające pamięć oraz koncentrację (21%). Według Miechoty-Katulckiej i in. [2009] mężczyźni przypisywali największe znaczenie preparatom witaminowo - wzmacniającym (28%), poprawiającym koncentrację (27%) oraz przeznaczonym dla sportowców (23%). Wyniki badań własnych potwierdziły tę zależność. Najczęściej spożywanymi suplementami przez kobiety (53%) i mężczyzn (43%) były suplementy witaminowo - mineralne. Ponadto respondenci spożywali suplementy diety wspomagające odchudzanie (18% kobiet i 6% mężczyzn), dla sportowców (24% mężczyzn i 1% kobiet), wspomagające pracę umysłową (13% kobiet i 11% mężczyzn), poprawiające proces widzenia (6% kobiet i 6% mężczyzn), na kobiece/męskie problemy (5% kobiet, 1% mężczyzn), zawierające wielonienasycone kwasy tłuszczowe (3% kobiet, 9% mężczyzn). Najczęściej suplementy diety przyjmowane były w formie tabletek i kapsułek (45% kobiet i 41% mężczyzn), tabletek musujących (32% kobiet i 38% mężczyzn) oraz herbat (20% kobiet i 10% mężczyzn). Najmniejszą popularnością, zarówno wśród kobiet (3%) jak i mężczyzn (11%), cieszyły się napoje ze skoncentrowaną dawką składników wspomagających.

Według danych literaturowych do najistotniejszych i najbardziej popularnych źródeł informacji o suplementach diety, mających znaczący wpływ na podjęcie przez konsumentów decyzji o ich zakupie należą: reklamy w mediach (75,5%), informacje dostępne w internecie (47%) oraz w niewielkim stopniu fachowa porada uzyskana od lekarza (24%) [Tyrałowska i in., 2009]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że 37% kobiet i 43% mężczyzn dokonywało zakupu suplementów diety pod wpływem przekazu reklamowego zamieszczonego w mediach i internecie. Duża liczba respondentów brała pod uwagę przy zakupie suplementów opinię rodziny i znajomych (25% kobiet i 36% mężczyzn), poradę uzyskaną od farmaceuty (26% kobiet i 12% mężczyzn) i lekarza (11% kobiet i 5% mężczyzn) oraz inne źródła informacji (1% kobiet i 4% mężczyzn). Według Tyrałowskiej i in. [2009] konsumenci w swoich decyzjach

nabywczych powinni kierować się przede wszystkim wiarygodną poradą lekarza, szczególnie w odniesieniu do sposobu i przeciwwskazań stosowania preparatów farmaceutycznych. Wykazano, że osoby młode, najczęściej dokonywały zakupu suplementów diety w aptece (75% kobiet i 41% mężczyzn), przez internet (10% kobiet i 25% mężczyzn), w hipermarketach (15% kobiet i 28% mężczyzn) oraz na stacjach benzynowych (tylko 4% mężczyzn) i w innych miejscach sprzedaży detalicznej (2% mężczyzn). Kobiety, jako miejsce zakupu suplementów wybierały głównie apteki, ponieważ korzystały w nich z darmowej porady farmaceuty. Mężczyźni kupowali suplementy głównie w aptekach, hipermarketach i na stacjach benzynowych.

Według Sigłowej i in. [2009] stosowanie suplementów diety powinno być świadome i uzasadnione ze zdrowotnego punktu widzenia, bowiem bezkrytyczne przyjmowanie tego rodzaju preparatów może prowadzić między innymi do przekroczenia zalecanej dawki pobrania składników odżywczych i związanych z tym konsekwencji zdrowotnych. Szacuje się, że niedobór lub też nadmiar niektórych składników odżywczych w diecie człowieka przyczynia się do rozwoju ok. 80 dietozależnych jednostek chorobowych, którymi dotkniętych jest ok. 20% ogółu ludności naszego kraju. Do jednostek tych zalicza się między innymi chorobę niedokrwinną serca, nadciśnienie tętnicze, udary mózgu, cukrzycę, kamice żółciową, osteoporozę, otyłość i szereg innych schorzeń. Jeżewska-Zychowicz [2007] do najistotniejszych czynników wyboru suplementów diety przez młode osoby zaliczyła stan zdrowia, poglądy dotyczące konieczności uzupełniania diety, dbałość o wygląd zewnętrzny oraz sposób żywienia. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły istnienie zależności między wyborem suplementów diety, a oceną swojego stanu zdrowia przez respondentów. Do głównych czynników wpływających na stosowanie suplementów diety przez badaną grupę kobiet i mężczyzn zaliczono: stan zdrowia (79% ogółu badanych, w tym 46% kobiet i 33% mężczyzn), sposób żywienia (69% ogółu badanych, w tym 42% kobiet i 27% mężczyzn), dbałość o wygląd zewnętrzny (69% ogółu badanych, w tym 44% kobiet i 25% mężczyzn) i aktywność fizyczną (62% ogółu badanych, w tym 30% kobiet i 32% mężczyzn). W mniejszym stopniu na stosowanie suplementów diety przez badaną grupę miała wpływ możliwość łatwego zakupu (55% ogółu badanych, w tym 27% kobiet i 28% mężczyzn) i reklama (33% ogółu badanych, w tym 20% kobiet i 13% mężczyzn).

Kolejnym ważnym aspektem dotyczącym oceny zachowań młodych konsumentów na rynku suplementów diety było określenie czynników wpływających na zakup suplementów. Stwierdzono, że respondenci starali się dokonywać rozsądnych decyzji przy zakupie suplementów wybierając znane marki (56% ogółu badanych, w tym 32% kobiet i 24% mężczyzn) oraz biorąc pod uwagę opinię lekarza (54% ogółu badanych, w tym 33% kobiet i 21% mężczyzn), farmaceuty (55% ogółu badanych, w tym 34% kobiet i 21% mężczyzn) oraz postać preparatu (55% ogółu badanych, w tym 31%

kobiet i 24% mężczyzn). Należy jednak podkreślić fakt, że świadomość marki wśród konsumentów budowana jest dzięki intensywnym kampaniom reklamowym, które nie są wiarygodnym źródłem informacji o prezentowanych produktach [Michota-Katulska i in., 2009]. Do mniej rozsądnych czynników prozakupowych wskazanych przez respondentów zaliczono: polecenie znajomych (70% ogółu badanych, w tym 39% kobiet i 31% mężczyzn) oraz relacją ceny do wielkości opakowania (68% ogółu badanych, w tym 40% kobiet i 28% mężczyzn). Polecenie suplementów diety przez kosmetyczkę w opinii respondentów 28% ogółu badanych, w tym 17% kobiet i 11% mężczyzn, oraz wygląd opakowania w opinii 23% ogółu badanych, w tym 13% kobiet i 10% mężczyzn, zostały zaliczone do mało istotnych czynników decydujących o ich zakupie, co potwierdzają wyniki badań Michoty-Katulskiej i in. [2009].

Stwierdzono, że w opinii młodych konsumentów stosowanie preparatów jednoskładnikowych w dużych dawkach zwiększa ryzyko wystąpienia zaburzeń w organizmie oraz że nadmierna suplementacja witaminami i składnikami mineralnymi może spowodować wystąpienie skutków ubocznych, a niewłaściwe ich dawkowanie może być przyczyną zatrucia. Ponadto respondenci stwierdzili, że spożywanie suplementów diety może wpływać na wyniki badań diagnostycznych oraz że nie można nimi zastępować leków (tab.1).

Wyniki przeprowadzonych testów wskazują, że dla wszystkich analizowanych kryteriów istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy pozytywnymi, a negatywnymi odpowiedziami na zadawane pytania. Wysokie wartości statystyki testowej przemawiają na niekorzyść hipotez zerowych. Różnice są wyraźne i za każdym razem zgodne z aktualnym stanem wiedzy na temat suplementacji, jej skutków i potencjalnych zagrożeń. Wskazuje to na znaczną wiedzę badanych osób w zakresie dostępnych na rynku suplementów diety oraz zagrożeń wynikających z ich stosowania (tab.1).

Największą popularnością wśród kobiet i mężczyzn cieszyły się preparaty witaminowe i witaminowo - mineralne, szczególnie multiwitaminy różnych producentów i preparaty zawierające magnez oraz magnez z witaminą B₆. Szeroka gama tych środków jest powszechnie popularna i łatwa do nabycia, zarówno w sklepach, w aptekach, jak i za pośrednictwem internetowej sprzedaży wysyłkowej. Mężczyźni częściej niż kobiety spożywali preparaty dla sportowców, np. białko HMB, a kobiety suplementy wspomagające odchudzanie oraz suplement Skrzypowita (tab.2).

Tabela 1. Istotności różnic pomiędzy pozytywnymi i negatywnymi odpowiedziami na pytania dotyczące wiedzy respondentów na temat suplementów oraz ewentualnych zagrożeń wynikających z ich stosowania

Kryterium	Odpowiedzi pozytywne	Odpowiedzi negatywne	Wartość statystyki χ^2
Nadmierne spożywanie witamin i składników mineralnych może spowodować wystąpienie skutków ubocznych	76	17	37,43**
Suplementy diety powinny stosować się po konsultacji z lekarzem	58	19	19,75**
Jednym z niebezpieczeństw nieodpowiedniego stosowania suplementów diety są interakcje między lekami a składnikami mineralnymi	51	11	25,81**
Suplementy diety mogą wpływać na wyniki badań diagnostycznych	69	8	48,32**
Suplementy diety mogą zastąpić niektóre leki	23	58	15,12**
Spożywanie tzw. żywności funkcjonalnej (celowo wzbogacanej w dodatkowe składniki odżywcze) zalicza się do suplementacji diety	46	16	14,52**
Stosowanie preparatów jednoskładnikowych w dużych dawkach powoduje ryzyko powstawania zaburzeń w organizmie	71	9	48,05**
Niewłaściwe dawkowanie preparatów zawierających witaminy i/lub składniki mineralne może być przyczyną zatrucia	72	13	40,95**
* - istotność na poziomie $\alpha = 0,05$, wartość krytyczna równa 3,84			
** - istotność na poziomie $\alpha = 0,01$, wartość krytyczna równa 6,63			

Źródło: badania własne

Tabela 2. Najczęściej spożywane suplementy diety przez respondentów wg płci i rodzaju produktu [%]

Rodzaj suplementu		Płeć		Ogółem
		Kobiety	Mężczyźni	
Preparaty witaminowe	Kwas foliowy	1	0	1
	Capivit	2	0	2
	Vitalal	1	0	1
	Immunaron Forte	1	0	1
	Nursea	1	0	1
	Multiwitamina	3	10	13
Preparaty witaminowo - mineralne	Magnez	6	6	12
	Wapń	2	1	3
	Magnez + wit. B ₆	5	2	7
	Pluszz	2	9	11
	Rutinacea	2	2	4
	Cynk	2	0	2
	Ambio-Vitamins A-Z	1	0	1
	Vigor	0	2	2
	Magnum	0	1	1
Preparaty energetyzujące	Pluszz Activ	1	2	3
	Bodymax	2	0	2
Inne	Linea	2	0	2
	BioCLA	1	0	1
	Skrzypowita	6	0	6
	Błonnik	3	0	3
	Lecytyna	1	0	1
	Vitapil	2	0	2
	Belissa	4	0	4
	Provag	1	0	1
	Aqua Slim	1	0	1
	Omega – 3	2	1	3
	Calivita	1	0	1
	Białko HMB	0	4	4
	Kreatyna	0	3	3
	Glukozamina	0	1	1

Źródło: badania własne

Wnioski

1. Osoby młode, aktywne zawodowo stosowały suplementy diety przede wszystkim w celu zwiększenia odporności organizmu, poprawy koncentracji oraz z uwagi na dbałość o wygląd zewnętrzny i sposób żywienia.
2. Konsumenci nie brali pod uwagę opinii lekarza na temat konsekwencji zdrowotnych wynikających z niewłaściwego przyjmowania suplementów diety.
3. Osobom młodym, aktywnym zawodowo potrzebna jest dodatkowa edukacja zdrowotna z zakresu suplementacji, gdyż dokonywany przez nie wybór suplementów

diety nie może być przypadkowy i oparty o rekomendację znajomych oraz relację ceny do wielkości opakowania.

Literatura

1. Brzozowska A., Roszkowski W., Pietruszka B., Kałuża J. Witaminy i składniki mineralne jako suplementy diety. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, 4(45), Supl. 8-14.
2. Derebecka-Hołyś N., Mścisz A. Suplementy diety- czy są alternatywą dla leku roślinnego? *Herba Polonica*, 2007, 2, 48-49.
3. Gertig H., Przysławski J. *Bromatologia. Zarys nauki o żywności i żywieniu*. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2006, 385.
4. <http://www.egospodarka.pl/74402,Rynek-suplementow-diety-2011-2013,1,39,1.html> [Pobrano: 21.12.2011]
5. <http://www.pmrpublications.com/press-releases/287/rynek-suplementow-diety-osiagnie-wartosc-25-mld-zl-w-2012-> [Pobrano: 15.12. 2011]
6. Jeżewska-Zychowicz M. Stosowanie suplementów wśród młodzieży z uwzględnieniem kontroli ich stosowania. *Żywność Człowieka i Metabolizm*, 2007, 34, 481-485.
7. Kłosowicz-Latoszek L., Stoś K., Respondek W. Rola suplementów diety w realizacji norm żywienia. (W:) Jarosz M., Bułhak - Jachymczyk B. (red.): *Normy żywienia człowieka. Podstawy prewencji otyłości i chorób niezakaźnych*. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2008, 404-408.
8. Michota-Katuliska E., Zegan M., Sińska B., Miskowska M. Suplementy diety - popularność stosowania a świadomość młodych konsumentów. *Żywność Człowieka i Metabolizm*, 2009, 1(36), 85-89.
9. Sigłowa A., Bertrandt B., Conder M., Bertrandt K., Lisiecka A., Kubiak P., Urbańska A. Suplementacja diety wśród studentów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, 4(65), 236-249.
10. Stoś K., Szponar L. Suplementy diety w ochronie zdrowia człowieka. *Przemysł Spożywczy*, 2006, 5, 34-35.
11. Tyrakowska B., Świrska M., Ankiel-Homa M. Suplementy diety w decyzjach nabywczych konsumentów. *Żywność Człowieka i Metabolizm*, 2009, 1(36), 78-89.
12. Waszkiewicz-Robak B. Suplement diety - środek spożywczy czy alternatywa produktu leczniczego? *Agro Przemysł*, 2009, 2, 34-37.

¹ *Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Technologii Żywności;
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

² *Katedra Technologii Gastronomicznej i Konsumpcji; Wydział Technologii Żywności;
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

PRÓBA OSZACOWANIA POBRANIA KADMU Z DIETĄ PRZEZ POPULACJĘ OSÓB W WIEKU PRODUKCYJNYM Z TERENU AGLOMERACJI MIEJSKIEJ

Kadm jest metalem ciężkim, którego ilość w środowisku rośnie nieprzerwalnie [Dźygóra, 2009]. Szacuje się, że rocznie o około 0,2% wzrasta stężenie kadmu w glebach [Jin, 2002]. Kadm jest powszechnie stosowany w przemyśle do produkcji stopów, baterii, powłok galwanicznych, a także pigmentów dodawanych do farb, emalii, gumy czy też tworzyw sztucznych [Witkiewicz, 2008]. Ponadto jest wykorzystywany jako stabilizator w produkcji ceramiki. Kadm ma również zastosowanie w fotografii, grawerstwie, litografii oraz produkcji lamp fluorescencyjnych i luminescencyjnych. Inne powszechne zastosowanie kadmu to: produkcja fungicydów, elektronika, pręty kontrolne w reaktorach atomowych. Światowa produkcja kadmu wynosi 15–20 tysięcy ton/rok. Z kolei jego roczna emisja do środowiska w skali globalnej wynosi 3,3–14,6 tysięcy ton, w tym aktywność wulkaniczna, czyli naturalne źródło stanowi około 10%. Kadm jest łatwo wchłaniany i kumulowany w tkankach roślin i zwierząt. Wśród zwierząt niektóre gatunki wykazują szczególną zdolność akumulacji tego pierwiastka. Wysokie stężenia Cd stwierdza się przede wszystkim w tkankach skorupiaków i mięczaków. Z kolei wśród ssaków występuje on w największych ilościach w wątrobie oraz nerkach zwierząt hodowlanych i dzikich [Bonda, 2007]. Ze względu na długi okres półtrwania kadmu wynoszący 10–30 lat, u ludzi gromadzi się on w tkankach, co zwiększa ryzyko wystąpienia objawów toksycznych [Waisber, 2003]. Do organizmu człowieka i zwierząt kadm przedostaje się różnymi drogami. Człowiek najczęściej pobiera ten pierwiastek z pożywieniem. Ponadto kadm przedostaje się do organizmu z dymem papierosowym [Brzozowska, 2004]. Przy zawodowym narażeniu na kadm najważniejszą rolę odgrywa wchłanianie inhalacyjne.

Obecnie bardzo dużą uwagę zwraca się na skażenie środowiska związkami tego pierwiastka ze względu na jego właściwości kancerogenne dla organizmów żywych [Parus, 2012]. Kadm został zakwalifikowany do kategorii A ludzkich karcynogenów, wśród innych czynników takich jak: azbest, benzen, aflatoksyny, wirus Hepatitis B. Szkodliwość kadmu wynika w dużym stopniu m. in. z łatwej absorpcji z przewodu pokarmowego, przenikania przez łożysko, tworzenia połączeń z sulfohydrylowymi grupami białek czy też uszkodzania budowy łańcucha kwasów nukleinowych (DNA

i RNA). Jego ilość w organizmie zwiększa się wraz z wiekiem. W korze nerkowej noworodka raczej nie stwierdza się obecności kadmu, natomiast u dorosłego człowieka ilość tego pierwiastka może wahać się w granicach 40–50 $\mu\text{g/g}$. Jednak największe stężenie tego toksycznego metalu obserwuje się u ludzi w wieku 40–60 lat [Satarug, 2003]. To właśnie w tej grupie najczęściej opisuje się toksyczne efekty działania kadmu, np.: nieodwracalne uszkodzenia nerek, wątroby, płuc, osteoporozę i anemię [Jarup, 1998]. Przeprowadzone w Polsce badania wykazały, że w dużych aglomeracjach miejskich, u osób powyżej 50 lat w korze nerek średnie stężenie kadmu wynosi 29–51 $\mu\text{g/g}$ [Siemiński, 2007].

Skutki nadmiernego działania kadmu mogą prowadzić do nowotworów m.in. trzustki, nerek, płuc czy prostaty [Waalkes, 2003]. Narażenie organizmu na działanie toksyczne kadmu może wiązać się z podwyższeniem ryzyka śmiertelności. Taki efekt został zaobserwowany na zanieczyszczonych przez ten metal terenach zarówno wśród ludzi, jak i zwierząt, gdzie stwierdzono obniżenie przeżywalności głównie młodych osobników [Larison, 2000].

Skutki, spowodowane przez nadmierne stężenie metali ciężkich w organizmie, powodują niekorzystne zmiany na tle biochemicznym. Do takich zmian należy m.in.: niszczenie błon komórkowych, wymiana podstawowych jonów, reakcje z grupami fosforanowymi w ADP oraz ATP, a także reakcje z grupami –SH. Organizmy żywe mogą tolerować niewielkie wahania poziomu większości pierwiastków, ale zbyt duży ich nadmiar w dłuższym czasie powoduje wystąpienie skutków toksycznych, które mogą doprowadzić nawet do śmierci. Przykładem kontroli nadmiaru metali w organizmie jest tworzenie się białek metalosiarkowych. W przypadku roślin tę samą funkcję pełnią fitochelatyny, które wiążą kadm w postaci fizjologicznie nieaktywnej. Homeostatyczne mechanizmy zwierząt często wykorzystują białka – metalotioneiny. Mogą one wiązać kadm tworząc niedostępne biologicznie postaci. Jako wskaźnik toksyczności substancji stosuje się LD50 (dawka śmiertelna), która w przypadku kadmu wynosi 1500–9000 mg/dzień, z kolei dawka toksyczna kadmu to 3–330 mg/dzień [Alloway i Ayres, 1999].

W organizmie kadm oddziałuje z wieloma enzymami. Uszkodzenie nerek jest wynikiem szkodliwego działania na enzymy, które są odpowiedzialne za resorpcję białek w kanalikach nerkowych. Dodatkowo kadm redukuje aktywność syntetazy kwasu sigma –aminolewulinowego, dehydrogenazy alkoholowej, a także dehydrogenazy lipoamidowej. Zwiększa natomiast aktywność dehydratazy kwasu sigma aminolewulinowego, dehydrogenazy pirogronowej i dekarboksylazy pirogronowej [Gary, 2007].

W warunkach zawodowego narażenia na kadm oraz w przypadku wysokiego zanieczyszczenia środowiska kadm sprzyja powstawaniu schorzeń kości. U zwierząt doświadczalnych stwierdza się osteoporozę, która może być następstwem uszkodzenia

nerek, zaburzenia metabolizmu witaminy D i hormonu tarczycy, a także zwiększonego wydalania wapnia i fosforu. U osób narażonych na ten pierwiastek stwierdza się osteomalację (rozmiękczenia kości), a także osteopenię i osteoporozę. Istnieje dodatnia korelacja pomiędzy poziomem kadmu w moczu, a calciurią oraz aktywnością fosfatazy zasadowej. Może to wskazywać na istnienie zależności pomiędzy poziomem biologicznym kadmu i rozwojem osteopenii. Spożywanie produktów, które zawierają dużą ilość błonnika może ograniczyć wchłanianie kadmu i zmniejszyć w ten sposób jego toksyczne działanie na organizm.

Teratogenne efekty oraz działanie toksyczne na płód stwierdzono przy wysokim stężeniu kadmu u gryzoni. Jeżeli pierwiastek ten zostanie podany we wczesnym okresie ciąży ma działanie teratogenne, które objawia się wodogłowiem, brakiem kości czaszki, rozszczepem warg u potomstwa. Z kolei podany w późnym okresie ciąży uszkadza łożysko, w związku z czym może nastąpić śmierć płodu. Łožysko stanowi skuteczną barierę, która chroni płód, kadm przedostaje się przez nie w niewielkich ilościach i jego zawartość w organizmie noworodka wynosi około 0,2 µg. U szczurów, którym kadm podawano w sposób ciągły, zaobserwowano obniżenie spermatogenezy oraz ruchliwości plemników. W badaniach z udziałem szczurów ekspozowanych inhalacyjnie na ten pierwiastek stwierdzano zwiększone występowania nowotworów płuc. Jednak takiego samego działania nie udowodniono w przypadku innych organizmów (myszy i chomiki) [Parus, 2012]. Komórkowy mechanizm kancerogennego wpływu kadmu jest związany z aktywacją procesów ontogenezy, blokowania supresorów nowotworowych oraz blokowaniem mechanizmu naprawy DNA. Blokowanie to jest związane ze zdolnością jonów kadmu do wypychania jonów cynku z kompleksów białkowych [Parus, 2012].

Mając na uwadze negatywne skutki nadmiernego pobrania kadmu, celem pracy była próba oszacowania pobrania tego pierwiastka z diety przez osoby dorosłe.

Material i metody badań

Badanie przeprowadzono w grupie osób w wieku 19-26 lat, mieszkających na terenie Krakowa. W pierwszym etapie przeprowadzono badanie ankietowe służące określeniu zwyczajów żywieniowych i wielkość spożycia produktów spożywczych (metodą historii żywienia oraz wywiadu 24-godzinne). Dodatkowo respondenci zostali poproszeni o wskazanie miejsc dokonywania zakupów produktów spożywczych. Z opracowanej - na podstawie ww. badań - listy produktów do drugiego etapu wybrano te, które (zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) NR 629/2008 z dnia 2 lipca 2008 roku zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych) mogą być źródłem kadmu. W ww. produktach oznaczono zawartość tego metalu. Sposób przygotowania

próbek był zgodny z PN-EN 13804 „Artykuły żywnościowe; oznaczanie pierwiastków śladowych; kryteria sprawności, zasady ogólne i przygotowanie próbek”.

W celu odpowiedniego przygotowania próbek przeprowadzono mineralizację mikrofalową. Oznaczenie zawartości kadmu wykonano metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją elektrotermiczną wg PN-EN 13804:2003 i PN-EN 14084:2004. Do wzmocnienia sygnału w przypadku małych stężeń analitu zastosowano wielokrotne podanie próbki. Podczas oznaczania nie stosowano metody dodatku wzorca. Jako modyfikator został zastosowany mianowany roztwór palladu 1000 mg/l w ilości 5 µl, który był dodawany wraz z próbką. Krzywa wzorcowa zależności absorbancji od stężenia została wykreślona dla sześciu powtórzeń.

Wyniki

Zgodnie z rozporządzeniem Komisji Europejskiej (WE) nr 629/2008 źródłem kadmu mogą być produkty takie jak ryby i inne owoce morza, warzywa (szczególnie liściaste), mięso i podroby oraz zboża i ich przetwory.

Najczęściej wybieranym przez osoby ankietowane produktami były ziemniaki (63% badanej populacji). Często spożywano także piersi z kurczaka (ok. 1/3 badanych osób) oraz chleb pszenny i makarony (ok. 1/4). Pozostałe produkty spożywano już dużo rzadziej (tab. 1).

Tabela 1. Produkty spożywcze wybrane do badań na zawartość kadmu [%]

Produkt spożywczy	Procent spożycia
Ziemniaki	63
Pierś z kurczaka	33
Chleb pszenny	24
Makarony	23
Pomidor	17
Tuńczyk z puszki	13
Ogórek zielony	10
Marchew	9
Ogórek kiszony	8
Chleb razowy	7
Papryka czerwona	7
Chleb żytni	6
Otręby pszenne	6
Kapusta pekińska	6
Bułka pszenna	5,5

Na podstawie otrzymanej od respondentów gramatury produktów i potraw obliczono średnie spożycie przypadające na jedną osobę. Wyniki przedstawiono w tabeli 2. Spośród wybranych produktów, respondenci spożywali dziennie najwięcej chleba

pszennego (0,16 kg). Na drugim miejscu znalazł się pomidor (0,12 kg), a na dalszych pierś z kurczaka oraz ogórek świeży, odpowiednio 0,09 i 0,08 kg. Najmniejsze średnie spożycie dotyczyło makaronu, kapusty pekińskiej oraz bułki pszennej - po 0,03 kg dziennie.

Tabela 2. Średnie dzienne spożycie badanych produktów [kg]

Produkt spożywczy	Średnie dzienne spożycie surowca
Chleb pszenny	0,16
Pomidor	0,12
Ziemniaki	0,12
Pierś z kurczaka	0,09
Ogórek zielony	0,08
Tuńczyk z puszki	0,06
Marchew	0,06
Chleb razowy	0,05
Ogórek kiszony	0,05
Chleb żytni	0,04
Otręby pszenne	0,04
Papryka czerwona	0,04
Bułka pszenna	0,03
Kapusta pekińska	0,03
Makarony	0,03

Na podstawie wyników otrzymanych z przeprowadzonych ankiet wybrano trzy sieci sklepów, w których respondenci najczęściej robili zakupy. Produkty wymienione w tab. 2 zakupiono we wskazanych przez respondentów miejscach, a następnie oznaczono w nich zawartość kadmu (tab. 3).

Na podstawie Rozporządzenia Komisji (WE) NR 629/2008 z dnia 2 lipca 2008 roku zmieniającej rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych można stwierdzić, że tylko w marchewce zakupionej w markecie 3 dopuszczalny poziom kadmu (0,1 mg/kg) został przekroczony. Pozostałe przebadane produkty nie zawierały wysokiej ilości kadmu.

Tabela 3. Zawartość kadmu w badanych produktach [mg/kg]

Produkt	Miejsce zakupu		
	Market 1	Market 2	Market 3
Pierś z kurczaka	0,0015	0	0
Bułka pszenna	0,04	0,048	0,043
Chleb żytni	0,03	0,006	0,027
Chleb razowy	0,026	0,0163	0,018
Ziemniaki	0,042	0,05	0,04
Chleb pszenny	0,025	0,021	0,023
Marchew	0,009	0,007	0,159
Ogórek kiszony	0,0017	0,0015	0,008
Otręby pszenne	0,0228	0,157	0,093
Makaron spaghetti	0,022	0,029	0,027
Papryka czerwona	0,003	0,0028	0,004
Ogórek zielony	0	0	0
Kapusta pekińska	0,023	0,018	0,025
Pomidor	0,001	0,001	0,001
Tuńczyk z puszki	0,006	0,0064	0,04

W oparciu o wyniki badań ankietowych oraz analiz chemicznych oszacowano pobranie kadmu ze spożywanymi produktami (tab. 4).

Tabela 4. Rzeczywiste pobranie kadmu z badanych produktów [mg/dzień]

Produkt	Market 1	Market 2	Market 3
Pierś z kurczaka	0,0001	0	0
Bułka pszenna	0,0012	0,0015	0,0013
Chleb żytni	0,0012	0,0003	0,0011
Chleb razowy	0,0013	0,0008	0,0009
Ziemniaki	0,0050	0,0060	0,0048
Chleb pszenny	0,0040	0,0034	0,0037
Marchew	0,0005	0,0004	0,0088
Ogórek kiszony	0,0001	0,0001	0,0004
Otręby pszenne	0,0010	0,0065	0,0037
Makaron spaghetti	0,0006	0,0007	0,0007
Papryka czerwona	0,0001	0,0001	0,0001
Ogórek zielony	0	0	0
Kapusta pekińska	0,0007	0,0006	0,0005
Pomidor	0,0001	0,0001	0,0001
Tuńczyk z puszki	0,0004	0,0004	0,0024
Suma	0,0164	0,0209	0,0285
PTWI	0,1148	0,1463	0,1995

Dyskusja

Wyniki badań monitoringowych przeprowadzonych zarówno w Polsce, jak i w innych krajach Unii Europejskiej wykazują najwyższe zanieczyszczenie kadmem w rybach, owocach morzach, glonach, a także suplementach diety, czekoladzie, podrobach i nasionach roślin oleistych. Jednak największy udział w całkowitym pobraniu kadmu z żywnością mają zboża, produkty zbożowe, warzywa oraz ziemniaki. W krajach europejskich średnie dzienne pobranie kadmu z produktami zbożowymi wynosi 4 μg , w Polsce jest wyższe - 5 μg [Wojciechowska-Mazurek i in., 2010]. Warzywa i produkty zbożowe dostarczają około 75% całkowitego pobrania kadmu [Kot, 2003]. W Polsce obecnie spożywa się od 180 do 250 kg produktów zbożowych i ziemniaków, a ich udział w diecie wynosi od 36 do 40%.

Zawartość kadmu w badanych produktach była zbliżona do wartości podawanych przez innych autorów. Kot [2003] przeprowadził wiele badań dotyczących ilości Cd w produktach zbożowych. Otrzymane przez niego wyniki wskazały, że chleb razowy zawierał 0,008 mg/kg kadmu, chleb żytni 0,006 mg/kg kadmu, chleb pszenny 0,016 mg/kg kadmu, bułka pszenna 0,014 mg/kg kadmu, a otręby pszenne 0,112 mg/kg kadmu. Podobne badania tego autora [Kot i Zaręba, 2007; Kot i in., 2009] wykazały zbliżony poziom tego pierwiastka. Fiłon i Karczewski [2012] oznaczyli zawartość kadmu w produktach zbożowych, w zależności od regionu ich zakupu (regiony północny, środkowy, zachodni i południowy). W pieczywie białym najmniejszą zawartość kadmu (0,007 – 0,030 mg/kg) zaobserwowano w regionie północnym, z kolei największą zawartość kadmu wykazano w regionie południowym (0,027 – 0,0197 mg/kg). W przypadku pieczywa razowego najmniejszą zawartość kadmu stwierdzono w regionie północnym 0,003 mg/kg, a największą w regionie zachodnim 0,025 mg/kg.

Żywność pochodzenia zwierzęcego może zawierać wysokie stężenie kadmu. Bardzo często towarzyszy temu nadmierne stężenie miedzi, cynku czy też żelaza. Nerki oraz wątroba - ze względu na pełnione funkcje - są narządami, które gromadzą w swoich tkankach szkodliwe związki dla zdrowia, w związku z czym mogą być swoistym wskaźnikiem zanieczyszczenia środowiska. Wagner i in. [1999] w swoich badaniach stwierdziła, że największą zawartość kadmu odnotowano w wątrobie. Stężenie tego metalu pochodzącego z regionu Elku i Wolbromia wyniosło odpowiednio 0,03 mg/kg oraz 0,24 mg/kg świeżej masy. Bardzo niskie stężenie tego toksycznego pierwiastka stwierdzono w schabie oraz w polędwicy sopockiej. Podobne badania przeprowadziła Wagner w 2000 roku. Przebadano wybrane gatunki mięsa (mięso wołowe i wieprzowe różnych klas), a także wędliny pod względem zawartości w nich pierwiastków, w tym kadmu. Mięso i jego przetwory pochodziły z ZM „Służewiec” (Warszawa). Zawartość kadmu tylko w jednym przypadku (kielbasa zwyczajna) przekroczyła nieznacznie wartość podaną w wymaganiach i wyniosła 0,04 mg/kg produktu [Wagner i in., 2000].

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano (za wyjątkiem marchwi) zwiększonej zawartości kadmu w porównaniu do dopuszczalnego limitu. Nie zanotowano także niebezpieczeństwa przekroczenia dawki PTWI. Tymczasowa dawka tolerowanego tygodniowego pobrania (PTWI) kadmu ustalona przez Komitet Ekspertów WHO/FAO dla człowieka zdrowego o masie 70 kg wynosi 0,49 mg/osobę/tydzień.

Także badania przeprowadzone przez Sikorę i Cieślik [2003] wykazały, że racje pokarmowe młodzieży nie stanowiły większego ryzyka zdrowotnego w związku z obecnością w nich kadmu. Pierwiastek ten był na poziomie niższym od tymczasowego tolerowanego pobrania tygodniowego (PTWI). Również Kłós i in. [2012] nie zaobserwowali przekroczenia dopuszczalnych wartości tygodniowego tolerowanego pobrania kadmu przez studentów.

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności ustalił ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego oraz ustanowił procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. Opracowano opinię naukową dotyczącą zagrożenia dla zdrowia spowodowanego zanieczyszczeniem środków spożywczych kadmem. Opinia ta uzasadnia potrzebę przyjęcia dla kadmu 2,8 razy niższej wartości tolerowanego pobrania tygodniowego (TWI) czyli 2,5 µg/kg masy ciała. Uwzględnia się ciągłe pobranie tego pierwiastka, które u 95% ludzi w wieku 50 lat może spowodować wzrost stężenia kadmu w moczu nawet do 1 µg/g kreatyniny. Również zwraca się uwagę na konieczność działań, które zmniejszają zagrożenie dla zdrowia i w miarę możliwości weryfikacje obowiązującego ustawodawstwa w zakresie dopuszczalnego poziomu zanieczyszczeń kadmem w środkach spożywczych.

Wnioski

1. Najczęściej spożywanymi produktami spożywczymi były ziemniaki (63%), pierś z kurczaka (33%), chleb pszenny (24%) oraz makarony (23%).
2. Respondenci w największej ilości w ciągu dnia spożywali chleb pszenny, pomidory i ziemniaki, zaś w najmniejszej - bułki pszenne, kapustę pekińska i makarony.
3. Ankietowane osoby najczęściej jako miejsce zakupów wybierały sklepy należące do największych sieci handlowych na polskim rynku. W sumie stanowiły one 56% wszystkich miejsc zakupowych.
4. Zakupione produkty spożywcze w większości zawierały kadm w ilości poniżej dopuszczonego limitu. Jedynie w przypadku marchwi zanotowano większą niż dopuszczalna zawartość tego pierwiastka.
5. Średnie tygodniowe pobranie kadmu wyliczone na podstawie danych ankietowych i wyników analiz chemicznych nie przekraczało w żadnym omawianym przypadku tymczasowej dawki tolerowanego tygodniowego pobrania (PTWI).

Literatura

1. Alloway B.J., Ayres D.C. Chemiczne podstawy zanieczyszczenia środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999, 218-242.
2. Boczoń W., Wachowski L. Chemia środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa – Wrocław 1998, 255-256.
3. Bojakowska I. Kadm w surowcach mineralnych Polski i jego potencjalna emisja do środowiska. Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, 2009, 40, 22-30.
4. Bonda E., Włostowski T., Krasowska A. Metabolizm i toksyczność kadmu u człowieka i zwierząt. Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych, 2007, 56(1-2), 87-88.
5. Bonenberg K. Kadm – broń o opóźnionym działaniu. Aura, 2012, 10, 34-35.
6. Brzozowska A. Toksykologia żywności. Przewodnik do ćwiczeń. Wydanie III poprawione i rozszerzone, Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004.
7. Ciepła R. Kumulacja metali ciężkich i siarki w roślinach wybranych gatunków oraz glebie jako wskaźnik stanu skażenia środowiska terenów chronionych województw śląskiego i małopolskiego. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, 1999.
8. Cousins R.J., Blanchard R.K., Moore J.B., Cui L., Green C.L., Liuzzi J.P., Cao J., Bobo J.A. Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes. The Journal of Nutrition, 2003, 133(5), 1521S-1526S.
9. Dźygóra W. Środowisko – Człowiek – Zdrowie, Wybrane problemy ekologiczne i ekologiczno – zdrowotne. Kolegium Karkonoskie w Jeleniej Górze, 2009.
10. Fiłon J., Karczewski J. Próba oceny zagrożenia zdrowia w oparciu o stężenia Pb i Cd w produktach zbożowych w różnych regionach woj. Podlaskiego. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 2010, 43(2), 158-162.
11. vanLoon G.W., Duffy S.J. Chemia środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, 275-277.
12. Gawęda E. Kadm i jego związki w środowisku pracy – zagrożenia, ocena ryzyka zawodowego. Instytut Badawczy Bezpieczeństwo Pracy, 2003, 10, 17-19.
13. Gertig H., Duda G. Żywność a zdrowie i prawo. Wyd. II uzupełnione. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
14. Glibowski P. Zawartości wybranych metali w owocach i warzywach w latach 2001 – 2005. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo – Warzywny, 2007, 7-8, 62-64.
15. Gomółka E., Szaynok A., Chemia wody i powietrza. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997.
16. Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure: a review of the literature and risk estimate. Scand J Work Environ Health, 1998, 24(3), 240.

17. Jin T, Nordberg M, Frech W, Dumont X, Bernard A, Ye T, Kong Q, Wang Z, Li P, Lundström N-G, Li Y, Nordberg G.F. Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposed to cadmium from smelting in China (ChinaCad). *BioMetals* 15, 2002, 397-410.
18. Kłos A. Bertrandt J., Długaszek M., Szymańska W. Wstępne badania zawartości ołowiu i kadmu w całodziennych racjach pokarmowych studentów Szkoły Głównej Służby Pożarniczej (SGSP), *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2012, 45(3), 808-812.
19. Kot A. Produkty zbożowe źródłem kadmu i ołowiu, *Żywnienie człowieka i metabolizm*, 2003, 30(3/4), 1097-1101.
20. Kot A., Zaręba S., Wyszogrodzka-Koma L., Ocena skażenia kadmem zbóż, przetworów zbożowych i ziemniaków. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2009, 42(3), 537-542.
21. Kot A., Zaręba S., Wyszogrodzka-Koma L. Ocena skażenia ołowiem zbóż, przetworów zbożowych i ziemniaków z regionu lubelskiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, 4(65), 86-91.
22. Larison J.R. Cadmium toxicity among wildlife In the Colorado Rocky Mountains. *Nature*, 2000, 406, 181-183.
23. Marchewka Z. Mechanizm neurotoksycznego działania wybranych metali ciężkich. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2009, 42, 1135-1143.
24. Orzeł D., Biernat J. Wybrane zagadnienia z toksykologii żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, 2012, 45-46.
25. Ostrowska P. Kadm – występowanie, źródła zanieczyszczenia, metody recyklingu. *Gospodarka Surowcami Mineralnymi*, 2008, 24.
26. Parus A. Wpływ kadmu na organizmy. *Aura - ochrona środowiska*, 2012, 7, 18-19.
27. Piotrowski J. Podstawy toksykologii kompendium dla studentów szkół wyższych. *WNT* 2006, 165-174.
28. ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 629/2008 z dnia 2 lipca 2008 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych.
29. Satarug S., Baker J.R., Urbenjapol S., Haswell-Elkins M., Reilly P.E., Williams D.J., Moore M.R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters.*, 2003, 137(1-2), 65-83.
30. Il'yasova D., Schwartz G.G. Cadmium and renal cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 207(2), 179-186.
31. Siemiński M., Środowiskowe zagrożenie zdrowia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.

32. Sikora E., Cieślik E. Zawartość kadmu ołowiu oraz wybranych składników mineralnych w racjach pokarmowych młodzieży. *Żywność Człowieka i Metabolizm*, 2003, 30(3/4).
33. Stężycka E., Bzdęga J., Pawlikowska K., Siwicki A. Zawartość metali w rybach z okolic Włocławka. *Żywność Człowieka i Metabolizm*, 2003, 30(1/2), 593-597.
34. Szozda R. *Kadm. Atest*, 2006, 4, 38-39.
35. Witkiewicz Z., Łakomy R., Kubica R. *Paradoks trucizn: substancje chemiczne przyjazne i wrogie*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2008.
36. Waalkes M.P. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003, 533(1-2), 107-120.
37. Wagner J. Kopeć Z. Lewandowski, W. Bryłka J. Adamczyk L. Kurbat E. Zawartość niektórych metali toksycznych w mięsie i jego przetworach, *Przemysł Spożywczy*, 1999, 7, 43.
38. Wagner, J. Glaza, R. Lewandowski, W. Hotowy, A. Lewandowska, H. Surowiec, J. Kubat, E. Zawartość mikro- i makroelementów w mięsie i niektórych wędlinach, *Przemysł Spożywczy*, 2000, 12, 49.
39. Waisberg M., Pius Joseph P, Hale B., Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology*, 2003, 192(2-3), 95-117.
40. Wojciechowska-Mazurek M., Mania M., Starska K., Opoka M. Kadm w środkach spożywczych – celowość obniżenia limitów. *Przemysł Spożywczy*, 2010, 64, 45-48.

FABIAN NOWAK, JOANNA MICHALAK

*Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Wydział Nauki o Żywności,
Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie,
ul. Heweliusza 6, 10-724 Olsztyn, e-mail: fabian.nowak@uwm.edu.pl*

PIECZYWO JAKO ŹRÓDŁO POTENCJALNIE SZKODLIWYCH ZWIĄZKÓW REAKCJI MAILLARDA – OCENA NARAŻENIA ZDROWIA

Dla większości polskich konsumentów pieczywo pozostaje podstawowym elementem codziennej diety. Podczas procesu produkcji pieczywa zachodzi szereg następujących po sobie reakcji chemicznych pomiędzy wolną grupą karbonylową cukrów redukujących, a wolną grupą aminową aminokwasów, peptydów lub białek. W określonych warunkach podczas wypieku mogą powstawać związki potencjalnie szkodliwe dla zdrowia człowieka w tym także akrylamid. Celem pracy była ocena zawartości akrylamidu w wybranych typach pieczywa, oraz szacunkowa ocena narażenia zdrowia konsumenta na podstawie średniego spożycia. Badania pokazały, że wszystkie analizowane próbki pieczywa zawierają znaczne ilości akrylamidu. Średnia zawartość akrylamidu w badanych próbkach pieczywa wahała się w granicach 162,53-372,83 µg/kg dla miękiszu oraz 48,02-1537,83 µg/kg dla skórki. Najwyższą ogólną zawartością akrylamidu cechowało się pieczywo zwykle mieszane (938,55 µg/kg), najniższą pieczywo zwykle pszenne (290,28 µg/kg). W wyniku szacunkowej oceny narażenia konsumenta na toksyczne działanie akrylamidu, stwierdzono, że jedynie systematyczne spożycie pieczywa zwykłego mieszanego może wiązać się z niebezpieczeństwem dla zdrowia (w kontekście oddziaływania kancerogennego). Zaznaczyć jednak trzeba, że pieczywo nie jest jedynym źródłem tego związku, tym bardziej zasadną jest stała kontrola jego zawartości w żywności.

Słowa kluczowe: reakcja Maillarda, akrylamid, pieczywo, zdrowie

Wprowadzenie

Reakcje Maillarda

Podczas przetwarzania żywności zachodzą reakcje chemiczne odpowiedzialne za powstawanie takich charakterystycznych cech żywności jak odpowiedni smak, zapach i wygląd [Tessier i Birlouez-Aragon, 2012]. Reakcje, w wyniku których kształtowane są w żywności wyżej wymienione cechy nazywane są reakcjami nieenzymatycznego brązowienia lub reakcjami Maillarda [Purlis, 2010; Yu i in., 2012].

Reakcje Maillarda należą do grupy bardzo złożonych i kompleksowych reakcji chemicznych zachodzących pomiędzy grupą aminową (aminokwasów, peptydów, białek), a grupą karbonylową (cukrów redukujących) [Michalska, Zieliński 2007; Roux i in. 2009].

Podczas reakcji nieenzymatycznego brązowienia tworzy się wiele związków odpowiedzialnych za powstawanie oczekiwanych cech organoleptycznych (smak, zapach, kolor). Jednak obok związków pożądanых występuje wiele produktów reakcji Maillarda o udowodnionym lub potencjalnym działaniu toksycznym (mutagennym, kancerogennym, neurotoksycznym). Do nich należy zaliczyć m.in. akrylamid [Michalska i in. 2008; Purlis 2010; Kwon i in. 2011; Hwang i in. 2012].

Akrylamid

Akrylamid (AA) to bezbarwne (lub białe), bezwonne ciało stałe o krystalicznej budowie przypominającej płatki śniegu. Jest substancją łatwo rozpuszczalną w rozpuszczalnikach polarnych m.in.: acetonie, metanolu, etanolu, eterach i wodzie. Nie jest rozpuszczalna w benzenie lub heptanie (rozpuszczalnikach niepolarnych) [Mustafa, 2008; Jankowska i in., 2009].

Związek ten należy do grupy silnie reaktywnych związków i charakteryzuje się obecnością wiązania podwójnego oraz fragmentu amidowego w swojej cząsteczce. Silną reaktywność akrylamidu determinuje jego budowa cząsteczki, w szczególności obecność wielokrotnego wiązania elektrofilowego [Żyżlewicz i in., 2010].

Istnieje kilka hipotez mówiących o szlakach tworzenia się akrylamidu w żywności, jednak wyróżnia się dwa główne modele, w których związek ten powstaje [Karamat i in., 2011].

Pierwszy z nich polega na reakcjach zachodzących pomiędzy aminokwasami (kwasem asparaginowym, glutaminą, waliną, kwasem glutaminowym, lizyną oraz głównie asparaginą), a cukrami redukującymi (głównie glukozą i fruktozą) w temperaturze powyżej 120 °C. Schemat ten jest ściśle związany z reakcjami Maillarda. W fazie wstępnej reakcji Maillarda, podczas ogrzewania grupa aminowa aminokwasu reaguje z grupą karbonylową cukrów redukujących. W reakcji tej powstaje (po odczepieniu cząsteczki wody) zasada Schiff'a, która odgrywa kluczową rolę w powstawaniu akrylamidu. Dalsze przemiany prowadzące do powstawania akrylamidu mogą mieć różny przebieg, m.in. obejmują degradację Stracker'a (w bardzo wysokich temperaturach rzędu 180-220°C) lub bezpośrednie przejście zasady Schiff'a do akrylamidu [Markowicz-Bostos i in., 2012].

Drugi model zakłada, że akrylamid tworzy się w trakcie termicznej degradacji gliceroli, podczas której powstaje akroleina, która ulega utlenieniu do kwasu akrylowego.

Ostatnim etapem jest reakcja kwasu akrylowego z amoniakiem (wytworzonym podczas pirolizy), czego efektem jest powstawanie akrylamidu [Bekas i in., 2006].

Proces tworzenia się akrylamidu w żywności jest skomplikowany i wpływa na niego szereg złożonych parametrów. Głównie zależy od temperatury zastosowanej w trakcie obróbki cieplnej (powyżej 120°C), czasu jej trwania oraz zawartości aminokwasów (asparaginy) i cukrów redukujących. Udowodniono, że zmiany stosunków ilościowych substratów reakcji kondensacji (w badaniach modelowych) skutkowały tworzeniem się akrylamidu o zróżnicowanych stężeniach. Biorąc pod uwagę fakt, że AA może powstawać na drodze reakcji Maillarda, znaczącym czynnikiem determinującym poziom stężenia tego związku może być pH środowiska. Najwyższe stężenia akrylamidu stwierdza się dla pH w granicach 7-8, natomiast obniżenie pH do ok. 4 (w badaniach modelowych) powoduje spadek zawartości AA nawet o ok. 99% [Michalak i in., 2011].

W 1994 roku IARC (International Agency for Research on Cancer) uznała akrylamid za substancję należącą do kategorii substancji średnio niebezpiecznych, potencjalnie wywołujących raka (grupa 2A). W obszarze UE substancja ta uznawana jest za kancerogen grupy 2., co oznacza, że należy traktować ją, jako substancję wywołującą raka [Lingnert i in., 2002; Sanfanyado i in., 2011].

Prowadzone na zwierzętach badania pozwoliły naukowcom ustalić bezpieczny poziom akrylamidu, przy którym nie powinno dochodzić do niekorzystnych skutków zdrowotnych. Tolerowana dzienna dawka (TDI) akrylamidu dla działania neurotoksycznego została ustalona na poziomie 40 µg/kg masy ciała, natomiast TDI dla działania kancerogennego na poziomie 2,6 µg/kg m.c [Tardiff i in., 2009].

Akrylamid występuje w dużej ilości produktów żywnościowych. Głównymi jego źródłami są produkty żywnościowe produkowane na bazie zbóż, ziemniaków oraz kawy. Ze względu na fakt, że produkty zbożowe (zwłaszcza pieczywo) w diecie człowieka stanowią dość duży procent ogólnego spożycia pokarmów w ciągu doby, nawet niskie stężenia akrylamidu w tego rodzaju produktach może nieść za sobą niekorzystne skutki [Mustafa, 2008].

Materiały i metody badań

Materiał badań

Badania zostały przeprowadzone na próbkach pieczywa dostępnego na lokalnym rynku. Pieczywo nabyto w sieciowych sklepach wielkopowierzchniowych oraz w piekarniach. Badane pieczywo zostało podzielone na 5 typów, w obrębie których znajdowało się kilka rodzajów pieczywa (6-10) odpowiednich dla konkretnego typu. Tabela 1 pokazuje wszystkie typy badanego pieczywa z uwzględnieniem ilości analizowanych próbek. Dla każdego pieczywa przeprowadzono oddzielne analizy

zarówno dla skórki jak i miękiszu. W sumie, analizie poddano 68 próbek pieczywa (34 dla skórki i 34 dla miękiszu) pod kątem zawartości akrylamidu.

Tabela 1. Typy analizowanego pieczywa z podaną liczbą analizowanych próbek

Typ pieczywa	Liczba prób (n)
<i>Zwykłe pszenne</i>	6
<i>Zwykłe żytnie</i>	6
^A <i>Zwykłe mieszane</i>	6
<i>Wyborowe pszenne</i>	10
<i>Wyborowe żytnie</i>	6

A – pieczywo wypiekane z mieszanki mąk: pszennej i żytniej z przewagą mąki pszennej

Próbki skórki i miękiszu pobierane były w taki sposób, aby pozostałość miękiszu pod powierzchnią skórki nie była większa niż 2 mm. Wszystkie pobrane próbki (oddzielnie miękisze i skórki) rozdrabniano w blenderze w celu ujednoczenia, a następnie poddano analizie. Dla każdej próbki pieczywa analiza była prowadzona w dwóch równoległych powtórzeniach.

Do określenia średniego spożycia pieczywa w gospodarstwie domowym - tym samym szacunkowej oceny narażenia ludności Polski na potencjalnie szkodliwe działanie akrylamidu – posłużyły dane statystyczne Głównego Urzędu Statystycznego odnośnie Budżetów gospodarstw domowych w 2012 r.

Metody badań

Dokładnie rozdrobniony i ujednoczony materiał, odważano w ilości 1-2 g do kolby stożkowej. Do naważonej próbki dodawano 20 ml 80% metanolu w celu dokonania ekstrakcji akrylamidu. Ekstrakcja prowadzona była w wytrząsarce w temperaturze 60°C przez 60 min. Następnie próbki chłodzono i sączono przez sączek papierowy, a otrzymany filtrat poddano odtłuszczeniu. W tym celu do przesączu dodawano heksanu (20 ml) i wytrząsano przez 10 minut. Po upływie założonego czasu górną warstwę (tłuszczowo-heksanową) odrzucano i czynność powtarzano jeszcze dwukrotnie. Odtłuszczonej próbkę pobierano w ilości 5 ml i przenoszono do próbki wirowniczej, po czym wymrażano w temperaturze -18°C przez 24 h. Bezpośrednio po wymrażaniu, próbki wirowano przez 20 min. przy prędkości 12000 rpm (7200×g) w temperaturze 5°C. Odwirowany supernatant pobierano i oczyszczano za pomocą

techniki SPE (ekstrakcja do fazy stałej) [Peterson i in., 2006; Nilsen i in., 2006; Michałak i in., 2011].

Proces oczyszczania próbek przeprowadzono w celu pozabawienia ekstraktu z soli i związków niepolarnych oraz wyodrębnienia ekstraktu akrylamidu. Podczas procesu zastosowano kolumnienki *Oasis*[®] HLB Waters WAT 094225 (1ml, 30 mg) zakupione od firmy Waters (Milford, ME) wg procedury Nielsen i in. [2006], Michałak i in. [2011].

Otrzymane próbki sączono przez 0,45 µm nylonowy filtr strzykawkowy i analizowano z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (HPLC-RP). Do analizy zastosowano chromatograf cieczowy firmy Shimadzu LC-10A, sprzężony z układem komputerowym z programem do integracji LC Solution Shimadzu. Zestaw chromatograficzny wyposażony był w detektor UV-Vis pracujący w zakresie 190 – 600 nm, ciśnieniowy degazer, automatyczny podajnik próbek, podwójną pompę oraz termostat kolumn. Do oznaczeń użyto kolumnę chromatograficzną Synergi 4 µM Hydro – RP 80A, 250 x 4,6 mm firmy Phenomenex (Torrance, CA). Oznaczenia prowadzone były przy następujących warunkach pracy: faza ruchoma - roztwór buforowy 5mM sulfonianu heptanu w wodzie/acetonytryl (97/3; v/v); prędkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min; objętość nastrzyku – 100 µl; temperatura kolumny - 25°C; czas analizy - 30 min.; system detekcji - detektor Shimadzu UV-Vis z matrycą fotodiod (DAD) SPD – M 20A (ustawiona długość fali detektora $\lambda = 200$ nm). Sygnał akrylamidu pojawiał się w ok. 8-9 minucie. Interpretację jakościową i ilościową otrzymanych rozdzielonych chromatograficznie przeprowadzono na podstawie porównania czasu retencji i wielkości pola powierzchni piku akrylamidu w próbkach wzorca z czasem retencji i wielkością pola powierzchni pików tego związku w badanych próbkach. W tym celu posłużono się równaniem regresji otrzymanym na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej akrylamidu w zakresie stężeń 0,006-12 µg/ml. Pozwoliło to na otrzymanie krzywej regresji ($y = 000000022x + 0,00193$) o zadowalającej liniowości ($R^2 = 0,9997$, $n = 5$). Stężenie akrylamidu wyrażone zostało w µg/kg.

Analiza statystyczna

Oznaczenia dla każdej z próbek zostało wykonane w dwóch powtórzeniach. Dane przedstawiono w formie średniej arytmetycznej z podaniem odchylenia standardowego pomiędzy próbkami. Wszystkie obliczenia statystyczne dokonane były przy użyciu pakietu Statystyka 10.0 (StatSoft, Inc. 2011, STATISTICA version 10). Istotność różnic obliczono za pomocą analizy wariancji jednoczynnikowej przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Celem badań było porównanie zawartości akrylamidu w pieczywie różnego typu, ogólnie dostępnego w handlu detalicznym oraz szacunkowa ocena narażenia zdrowia konsumenta na ten związek chemiczny na przykładzie ludności Polski. Tabela 2 przedstawia zawartość akrylamidu w badanych próbkach pieczywa.

Tabela 2. Zawartość akrylamidu w badanych próbkach pieczywa

Typ pieczywa	Akrylamid ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							M/S (%)
	n	Miękkisz			Skórka			
		min / max	$X_{sr} \pm s$	CV%	min / max	$X_{sr} \pm s$	CV %	
Zwykłe pszenne	6	130,37/210,25	162,53 \pm 32,35 ^{ace}	19,90	325,96/538,29	418,02 \pm 85,73 ^{ab}	20,51	38,89
Zwykłe żytnie	6	145,21/201,21	166,23 \pm 23,86 ^{bdf}	14,35	541,13/838,31	655,72 \pm 100,87 ^{ac}	15,38	25,35
Zwykłe mieszane	6	251,03/392,00	339,26 \pm 56,87 ^{ab}	16,76	1201,25/1895,57	1537,83 \pm 260,58 ^{acd}	16,94	22,06
Wyborowe pszenne	10	201,56/321,12	271,60 \pm 37,37 ^{cd}	13,76	494,64/779,43	649,94 \pm 83,51 ^{bd}	12,85	41,79
Wyborowe żytnie	6	321,25/395,21	372,83 \pm 24,92 ^{ef}	6,68	731,21/1000,12	897,81 \pm 83,43 ^a	9,29	41,53

n – liczba próbek, *min* – wartość minimalna, *max* – wartość maksymalna, X_{sr} – wartość średnia, *s* – odchylenie standardowe CV% - procentowy współczynnik zmienności, M/S – stosunek pomiędzy zawartością oznaczanego związku w miękkiszu i skórce. Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami (a, b, c, d, e, f) są istotnie różne (statystycznie) przy poziomie istotności $p < 0,05$.

We wszystkich typach pieczywa zostały oznaczone znaczące ilości akrylamidu. Średnia zawartość tego związku w miękkiszu pieczywa wahała się w granicach od 162,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla pieczywa zwykłego pszennego do 372,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w przypadku pieczywa wyborowego żytniego. Minimalną zawartością akrylamidu w skórce cechowało się pieczywo zwykłe pszenne ze średnią zawartością tego związku na poziomie 418,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, maksymalną natomiast pieczywo zwykłe mieszane ze średnią zawartością akrylamidu wynoszącą 1537,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W każdym z przypadków zawartość akrylamidu w skórce pieczywa była wyższa niż w jego miękkiszu. Procentowa różnica wahała się w granicach 58 – 80%. Największą różnicą pomiędzy zawartością akrylamidu w skórce i w miękkiszu cechowało się pieczywo zwykłe mieszane. Różnica stężeń w tym przypadku wynosiła 1198,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (77,94%). Tak duże zawartości tego związku w pieczywie tego typu mogą świadczyć o nieuczciwych praktykach producentów m.in. polegających na dobarwianiu pieczywa karmelem. Należy podkreślić, że stosunkowo wysokie wartości odchylenia standardowego oraz procentowego współczynnika zmienności wynikać mogą z faktu, iż materiał badań pochodził z różnych źródeł (różne surowce piekarnicze

i techniki wypieku) oraz niejednorodnego stopnia spieczenia skórki w analizowanych próbkach pieczywa.

Analiza statystyczna otrzymanych wyników akrylamidu dla badanych typów pieczywa wykazała statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy poszczególnymi typami pieczywa w co najmniej jednym przypadku dla każdego z nich. Stwierdzono również istnienie statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) pomiędzy zawartością akrylamidu w skórce i w mięksiszu dla każdego typu analizowanego pieczywa.

Tabela 3. Porównanie teoretycznej dawki przyjmowanego akrylamidu w kontekście typu spożywanego pieczywa oraz przeciętnego spożycia pieczywa dla różnego typu gospodarstwa domowego

	Typ gospodarstwa domowego						Średnia
	1 - osobowe	2 - osobowe	3 - osobowe	4 - osobowe	5 - osobowe	>5 - osobowe	
	^A Przeciętne miesięczne spożycie na członka rodziny (kg)						
Typ pieczywa	5,68	4,93	4,21	3,84	4,10	4,31	4,51
	^B Przeciętne dzienne spożycie na członka rodziny (kg)						
	0,19	0,16	0,14	0,13	0,14	0,14	0,15
	^C Przeciętne dzienne dawka przyjętego akrylamidu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)						
<i>Zwykłe pszenne</i>	54,96	47,70	40,74	37,16	39,67	41,70	43,65
<i>Zwykłe żytnie</i>	77,81	67,54	57,67	52,60	56,17	59,04	61,81
<i>Zwykłe mieszane</i>	177,70	154,23	131,71	120,13	128,27	134,84	141,15
<i>Wyborowe pszenne</i>	87,24	75,72	64,66	58,98	62,97	66,20	69,29
<i>Wyborowe żytnie</i>	120,29	104,40	89,16	81,32	86,83	91,27	95,55

A – na podstawie „Budżet gospodarstw domowych w 2012 roku” (Główny Urząd Statystyczny; B – na podstawie miesięcznego spożycia, zakładając: miesiąc = 30 dni; C – na podstawie przedstawionych wyników badań zawartości akrylamidu w badanych próbkach pieczywa

W celu oszacowania stopnia narażenia ludności polskiej na akrylamid przyjmowany poprzez spożycie pieczywa posłużono się danymi statystycznymi budżetów gospodarstw domowych w 2012 roku. Dane te pozwoliły na porównanie średniej dziennej dawki przyjmowanego akrylamidu w odniesieniu do typu spożywanego pieczywa oraz ilości osób w gospodarstwie domowym (dane przeliczone na 1 osobę). Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 3. Z zaprezentowanych danych wynika, że najwięcej pieczywa spożywają osoby, które same stanowią gospodarstwo domowe (gospodarstwa 1 – osobowe), spożycie w tym przypadku sięga 5,68 kg/miesiąc (0,19 kg/dzień). Najmniejsze spożycie przypada na osobę w 4 – osobowych gospodarstwach domowych, w tym przypadku wynosi ono 3,84 kg/miesiąc

(0,13 kg/dzień). Średnie spożycie pieczywa wynosi (bez względu na typ gospodarstwa domowego) ok. 4,51 kg/miesiąc (0,15 kg/dzień). W odniesieniu do dziennego spożycia pieczywa oszacowano średnią zawartość akrylamidu, którą przyjmuje statystyczny Polak w ciągu dnia (z wyszczególnieniem badanych typów pieczywa). Z szacunkowych danych wynika, że największą ilość akrylamidu dostarcza do organizmu człowieka spożywanie pieczywa zwykłego mieszanego (średnio 141,15 µg/dzień), najmniejszą natomiast spożywanie pieczywa zwykłego pszennego (średnio 43,65 µg/dzień). Różnica pomiędzy największą średnią wartością, a najmniejszą wynosiła 97,5 µg (czyli ok. 3 razy więcej).

Tabela 4. Maksymalne limity dla potencjalnego oddziaływania wybranych związków reakcji Maillarda

<i>Potencjalne oddziaływanie</i>	^A Przeciętna waga dorosłego Polaka wg. płci (kg)	
	Kobiety	Mężczyźni
	65	90
	^B Limit przyjmowanego akrylamidu (µg)	
<i>Neurotoksyczne</i>	2600	3600
<i>Kancerogenne</i>	169	234

A – na podstawie badań firmy Estimator na reprezentatywnej grupie 800 Polaków w wieku 18-80 lat; *B* – na podstawie wyników badań Tardiff i in. [2010]

W Tabeli 4 przedstawiono graniczne limity przyjmowania akrylamidu, powyżej których stwierdza się działania niepożądane dla organizmu człowieka. Maksymalna dawka dla przeciętnej polskiej kobiety (waga 65 kg) w przypadku działania neurotoksycznego wynosi ok. 2600 µg (40 µg/kg mc), w przypadku działania kancerogennego ok. 169 µg (2,6 µg kg/mc). Dla przeciętnego polskiego mężczyzny (waga 90 kg) dawki te wynoszą 3600 µg – działanie neurotoksyczne oraz 234 µg – działanie kancerogenne. Należy zaznaczyć, że dane przedstawiają dopuszczalne dzienne dawki dla ludności Polski w wieku 18 – 80 lat. Dla ludności poniżej 18 lat (dzieci) dawki te są czasami 2-3 krotnie mniejsze [Tardiff i in., 2010]. Porównując graniczne dzienne dawki niewywołujące niepożądanego działania z danymi dotyczącymi dziennego spożycia akrylamidu w pieczywie można stwierdzić, że w przypadku ludności Polski w wieku 18-80 lat niebezpieczne (kancerogenne) może okazać się systematyczne spożycie pieczywa zwykłego mieszanego. Z punktu widzenia przeprowadzonych badań najmniej inwazyjne dla zdrowia człowieka może okazać się spożycie pieczywa zwykłego pszennego.

Podsumowanie

Przeprowadzone analizy pokazały, że akrylamid obecny był we wszystkich badanych typach pieczywa. Największą średnią zawartością tego związku cechowało się pieczywo wyborowe żytnie (w przypadku miękiszu) oraz pieczywo zwykle mieszane (w przypadku skórki). Wyniki badań pokazały również, że istnieją liczne statystycznie istotne różnice zarówno pomiędzy poszczególnymi typami pieczywa, jak i pomiędzy skórka, a miękiszem. Różnice pomiędzy typami wynikać mogły z różnego rodzaju składu surowcowego (tym samym różnej ilości reagentów w reakcji powstawania akrylamidu), jak również z różnych metod wypieku. Z tego samego powodu mogą wynikać różnice pomiędzy poziomem akrylamidu w skórce i w miękiszu. Szacunkowa analiza narażenia ludności Polski pokazała, że każdy Polak przyjmuje ok. 43,65-141,15 μg akrylamidu dziennie (w zależności od spożywanego typu pieczywa). W porównaniu do zalecanego granicznego poziomu tego związku w diecie człowieka wyłącznie systematyczne spożycie pieczywa zwykłego mieszanego może okazać się niebezpieczne i skutkować pojawieniem się choroby nowotworowej. Spożywanie pozostałych typów pieczywa nie niesie bezpośredniego zagrożenia neurotoksycznego czy kancerogennego. Zaznaczyć trzeba, że pieczywo nie jest jedynym źródłem akrylamidu w diecie człowieka i ze względu na to należy zwrócić szczególną uwagę na monitorowanie zawartości tego związku w różnych rodzajach żywności.

Literatura

1. Bekas W., Kowalska D., Kowalski B. Akrylamid w żywności. Przemysł spożywczy, 2006, 6, 36-39.
2. Hwang I.G., Kim H.Y., Lee S.H. Woo K.S. Ban J.O., Hong J.T., Yu K.W., Lee J., Jeong H.S. Isolation and identification of an antiproliferative substance from fructose-tyrosine Maillard reaction products. Food Chemistry, 2012, 130, 547-551.
3. Karamat J., LaBail A., Prost C., Jafari M. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. Food Bioprocess Technology, 2011, 4, 530-543.
4. Kwon G.Y., Hong J.H., Kim Y.S., Lee S.M., Kim K.O. Sensory Characteristics and Consumer Acceptability of Beef Stock Containing Glutathione Maillard Reaction Product Prepared at Various Conditions. Journal of Food Science, 2011, 76(1), 51-57.
5. Lingnert H., Grivas S., Jegerstad M, Skog K., Tornqvist M., Aman O. Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of food. Scandinavian Journal of Food & Nutrition, 2002, 46(4), 159-172.
6. Markowicz-Bastos D., Monaro E., Siguemoto E., Sefora P. Maillard Reaction Products in Processed Food: Pros and Cons, (w:) Food Industrial Processes - Methods and Equipment, 2012, 15, 281-300.

7. Michalak J., Gujska E., Klepacka J. The effect of domestic preparation of same potato products on acrylamide content, *Plant Foods for Human Nutrition*, 2011, 66(4), 307-312.
8. Michalska A., Zieliński H. Produkty reakcji Maillarda w żywności. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2007, 2, 5-16.
9. Michalska A., Amigo-Benavent M., Zieliński H., Castillo M.D. Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48, 123-132.
10. Nielsen J., Granby K., Hedegaard R.V., Skibsted L.H. A liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagines and reducing sugars in bread. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 557, 211-220.
11. Peterson E.V., Rosen J., Turner C., Denielsson R., Hellenas K.E. Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from foods: An optimization study. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 557, 287-295.
12. Purlis E. Browning development in bakery products - A review. *Jurnal of Food Engineering*, 2010, 99, 239-249.
13. Sanganyado E., Parekh C. T., Eriksson S. Analasis of acrylamide in traditional foodstuffs in Zimbabwe. *African Journal of Food Science*, 2011, 5(17), 910-913.
14. Tardiff R. G., Gargas M.L., Kirman C.R., Carson M.L., Sweeney L. M. Estimation od safe dietary intake levels of acrylamide for humans. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48, 658-667.
15. Tessier F., Birlouez-Aragon I. Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids*, 2012, 42, 1119-1131.
16. Yu X., Zhao M., Hu J., Zeng S., Bai X. Correspondence analysis of antioxidant activity and UV-Vis absorbance of Maillard reaction products as related to reactants. *LWT - Food Science and Technology*, 2012, 46, 1-9.
17. Żyżlewicz D., Nebesny E., Oracz J. Akrylamid - powstawania, właściwości fizykochemiczne i biologiczne. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2010, 3, 415-427.

MAGDALENA ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK, DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA,
AGATA ZEMLEDUCH-BARYLSKA, CELINA POPOWSKA,
SYLWIA KOŁECKA, PAULINA GÓRECKA

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

DETEKCJA ALERGENNYCH BIAŁEK MLEKA W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Streszczenie

W prezentowanym doświadczeniu białka mleka wyizolowano z różnych produktów spożywczych przy użyciu czterech ekstrahentów. Następnie przeprowadzono identyfikację beta-laktoglobuliny i kazeiny techniką Western blot z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał detekcyjnych. Spośród zastosowanych czterech ekstrahentów najskuteczniejszym okazał się 4% dodecylosiarczan sodu. Stwierdzono obecność alergenów mleka również w produktach o niezadeklarowanej ich zawartości.

Słowa kluczowe: alergia pokarmowa, kazeina, beta-laktoglobulina, Western blot

Wprowadzenie

Alergie pokarmowe dotyczą obecnie około 3,5-4% osób dorosłych oraz 6-8% dzieci [Maleki i in., 2000]. Ponieważ jedyną metodą unikania kontaktu z immunoreaktywnymi proteinami i glikoproteinami, jest stosowanie przez konsumenta diety eliminacyjnej, konieczne jest prawidłowe etykietowanie produktów spożywczych, przestrzeganie przez producentów czystości linii technologicznych i stosowanych surowców. Przed analitykami żywności stoi natomiast wyzwanie opracowania skutecznych metod wykrywania nawet śladowej ilości niebezpiecznych białek w surowcach i produktach spożywczych.

Okolo 170 rodzajów żywności może wywołać reakcję alergiczną, ale w grupie ośmiu najbardziej alergenów składników żywności wskazanych przez Codex Alimentarius Commission w 1999 r. znajdują się: mleko krowie, jaja, ryby, skorupiaki, orzechy drzewne, orzeszki arachidowe, soja i pszenica [Wróblewska, 2002].

Na pierwszym miejscu wymieniane jest więc mleko krowie, które ze względu na skład aminokwasowy przez żywieniowców uważane jest za świetne źródło aminokwasów egzogennych, bliskie wzorcowi WHO/FAO/UNO 2007 r. i białku jaja [Normy Żywienia Człowieka, 2008]. W składzie mleka krowiego występuje jednak 18-26 białek alergenów, a ponadto jest ono źródłem wywołującej nietolerancję pokarmową laktozy.

Poza wysoką wartością odżywczą, białka mleka krowiego cechują się bardzo dobrymi właściwościami funkcjonalnymi; do których należą: rozpuszczalność, właściwości emulgujące, żelujące i zdolność tworzenia piany. Stąd mleko i izolowane z niego białka stosowane są podczas produkcji wielu produktów spożywczych w celu poprawienia ich wartości odżywczej, właściwości reologicznych, pienistości, stabilności itp. [Gilbowski, 2004]. Podczas produkcji żywności następują znaczne modyfikacje białek mleka, szczególnie gdy stosowana jest obróbka cieplna [Ziarno, 2006] i modyfikacje enzymatyczne [Guanhao i in., 2013]. Modyfikacje te nie gwarantują jednak alergikom bezpieczeństwa zdrowotnego produktów uzyskanych z dodatkiem białek mleka i dlatego konieczne jest opracowanie szybkich i skutecznych metod detekcji tych białek w żywności.

Podstawowym problemem w analizie żywności jest najczęściej odpowiednie przygotowanie próbki do analizy. W przypadku wielu metod analitycznych kluczowym punktem staje się prawidłowe przygotowanie ekstraktu. Białka mleka wprowadzone do żywności wchodzi w liczne interakcje z jej składnikami, a jednocześnie podlegają różnorodnym przemianom, w skutek denaturacji czy hydrolizy. Utrudnia to proces ich wydobywania z matrycy, a w konsekwencji dalszą analizę jakościową i ilościową.

Celem prezentowanych badań było porównanie zdolności ekstrakcyjnych czterech różnych rozpuszczalników sugerowanych do ekstrakcji białek mleka, a następnie detekcja beta-laktoglobuliny – głównego białka alergennego mleka oraz kazeiny – dominującego białka mleka w izolatach otrzymanych z produktów spożywczych.

Materiały i metody

Badane produkty

Prezentowane badania wykonano dla dostępnych w handlu produktów spożywczych, które zestawiono w grupy obejmujące produkty wyprodukowane przez tego samego producenta, a na podstawie deklarowanej zawartości białek mleka podzielono na klasy, tj.: 1- produkty, dla których nie zadeklarowano na etykiecie zawartości białek mleka, 2- produkty o zadeklarowanej możliwej obecności śladowych ilości białek mleka oraz 3- produkty, które na etykiecie zawierały informację o dodanych do produktu białkach mleka.

Pierwsza grupa obejmowała czekolady A: mleczną (3. klasa) i gorzką (klasa 2.), grupa druga: czekolady B, wyprodukowane przez innego producenta, w tym mleczna (3. klasa) i gorzka (2. klasa). Trzecia grupa obejmowała sosy, w tym sos chrzanowy (klasa 3.) i majonez (klasa 1.). W grupie 4. znalazły się wyroby piekarskie, które nie posiadały etykiet z zadeklarowanym składem surowcowym: chleb pszenno-żytni, bułka pszenno-żytnia (klasa 1.) oraz chleb na maślanie i bułka mleczna, dla których producent nie zadeklarował składu, jednak nazwa produktów sugeruje dodatek białek mleka

do produkcji, dlatego zakwalifikowano je w prezentowanych badaniach do klasy 3. W ostatniej, piątej grupie, znalazły się desery, czyli: kisiel truskawkowy (klasa 2.), kisiel truskawkowy instant (klasa 1.), kaszka manna (klasa 3.), budyń śmietankowy instant (klasa 3.) oraz galaretka wiśniowa (klasa 1.).

Ekstrakcja

Produkty o zadeklarowanej wysokiej zawartości tłuszczu przed przystąpieniem do ekstrakcji odtłuszczano trzykrotnie za pomocą heksanu.

Ekstrakcję wykonano przy zastosowaniu następujących rozpuszczalników: 4% roztworu dodecylsulfanu sodu (SDS), 0,1M buforu fosforanowego o pH 7,4 z 4% dodatkiem SDS, 0,1M buforu fosforanowego o pH 7,4 z 1% dodatkiem Tweenu 20 oraz 0,1M buforu fosforanowego o pH 7,4 z 0,4% dodatkiem Tritonu X-100. Próby wytrząsano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, stosując proporcję rozpuszczalnika do naważki produktu 20 ml : 1g.

Analiza otrzymanych ekstraktów

Stężenie białka w otrzymanych ekstraktach oznaczano metodą z czernią amidową [Popov i in., 1975], stosując jako standard do przygotowania krzywej wzorcowej albuminę surowicy wołowej. Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe, a analiza wariancji (ANOVA) pozwoliła na wyznaczenie statystycznie istotnych różnic między średnimi wartościami (na poziomie istotności $p < 0.05$), przy wykorzystaniu programu Statistica 10 (StatSoft, Inc.).

Następnie wykonano rozdział elektroforetyczny otrzymanych izolatów metodą SDS-PAGE, stosując 4% żel zagęszczający i 12% żel rozdzielający [Laemmli, 1970]. Transfer białek z żelu na membranę z polifluorku winylidenu wykonywano przy wykorzystaniu sił ciężkości. Przeciwciałami detekcyjnymi były: poliklonalne królicze przeciwciało skierowane przeciwko β -laktoglobulinie (Abcam, ab11289) oraz poliklonalne królicze przeciwciało skierowane przeciwko kazeinie (Abcam, ab 166596). Natomiast jako przeciwciało drugorzędowe wykorzystano kozie poliklonalne przeciwciało skierowane przeciw całej cząsteczce IgG królika, skoniugowane z alkaliczną fosfatazą (Sigma, A3686). Do sycenia membrany stosowano 1% żelatynę wieprzową (Sigma). Reakcję barwną wywoływano z substratem BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indoilo-fosforan/błękit nitrotetrazolowy, Calbiochem).

Omówienie wyników i dyskusja

Ekstrakcja białek z żywności determinowana jest zarówno właściwościami wyodrębnianych białek, jak i matrycy, w której się znajdują. Izolację białek mleka dodatkowo utrudnia ich tendencja do tworzenia układów micelarnych, dlatego często

w składzie ekstrahentów sugerowanych do ich ekstrakcji znajdują się detergenty [Steinhoff i in., 2011]. W omawianym doświadczeniu wykonano ekstrakcję jednostopniową, aby nie doprowadzać do zbędnego rozcieńczania izolatów, chociaż oczywiście należy spodziewać się, że ekstrakcja nie była całkowita. Ponieważ rozpuszczalność białek mleka najniższa jest w pH 5,7 (punkcie izoelektrycznym), do ekstrakcji stosuje się bufor np. o pH 7,4 [Steinhoff i in., 2011; Monaci i in., 2011]. Udowodniono również wzrost ekstraktywności białek wraz ze wzrostem temperatury, jednak obróbka termiczna ekstraktów wpływa na zmiany konformacji epitopów odpowiadających za wiązanie specyficznych przeciwciał [Besler i in., 2001], dlatego omawiane izolacje wykonano w temperaturze pokojowej.

W izolatach otrzymanych z czekolad mlecznych (od producenta A i B) największą ekstraktywność wykazano dla roztworu SDS, natomiast stężenia białek oznaczone w pozostałych izolatach, nie różniły się statystycznie istotnie (ryc. 1A i 1B). W przypadku czekolad gorzkich, obecność białek potwierdzono jedynie w jednym ekstrakcie: otrzymanym z czekolady gorzkiej A z 4% SDS (ryc. 1A).

Ekstrakty otrzymane z majonezu, niezależnie od zastosowanego ekstrahentu różniły się istotnie statystycznie, przy czym największe stężenie białka stwierdzono w izolacie z 4% SDS (ryc. 2). Natomiast izolaty z sosu chrzanowego tworzą 3 grupy jednorodnych: 4% SDS wykazał największą skuteczność, dalej bufor dodatkiem SDS i Tritonu X-100, natomiast nie powiodła się ekstrakcja przy użyciu buforu z dodatkiem Tweenu 20 (ryc. 2).

Skuteczna ekstrakcja z wyrobów piekarskich możliwa była tylko przy zastosowaniu ekstrahentów zawierających SDS, przy czym 4% roztwór SDS był ponownie skuteczniejszy niż zbuforowany roztwór SDS (pH 7,4), za wyjątkiem ekstraktów otrzymanych z bułki pszenno-żytniej (ryc. 3).

W piątej badanej grupie produktów, tj. w deserach, otrzymane wyniki były najbardziej zróżnicowane (ryc. 4). Z produktów, które w swoim składzie zawierają znaczne ilości białek, czyli budyniu (zawierającego mleko), galaretki (żelatynę wieprzową) i kaszki manny (mleko i ziarno pszenicy), otrzymano izolaty o dużej zawartości białek (od 16,82 mg z kaszki manny roztworem zawierającym Tween 20, do 66,04 mg z galaretki roztworem SDS). Ponownie najlepszym spośród stosowanych ekstrahentów okazał się roztwór SDS. Dla budyniu wyraźne były różnice pomiędzy skutecznością każdego z badanych roztworów ekstrakcyjnych. Natomiast dla galaretki i kaszki manny wyodrębniono 3 jednorodne grupy. Zawsze najmniej skutecznym ekstrahentem okazywał się bufor fosforanowy z dodatkiem Tweenu 20.

Natomiast stężenie białka w ekstraktach otrzymanych z kisielii, w których składzie wykazana była jedynie skrobia oraz substancje smakowe i aromatyzujące, nie przekraczało wyznaczonego progu detekcji.

Spośród badanych, zalecanych do izolacji białek mleka ekstrahentów wybranych na podstawie przeglądu literatury, do ilościowej izolacji białek najlepszy okazał się 4% roztwór SDS. Zaraz po nim najlepszą skuteczność ekstrakcji wykazano dla buforu fosforanowego z dodatkiem SDS. Jedynie w przypadku czekolad A lepsze zdolności ekstrakcyjne ze względu na ilość wyizolowanego białka uzyskano dla buforu fosforanowego z dodatkiem Tweenu 20.

Prezentowane wyniki zgodne są z obserwacjami Steinhoffa i in. (2011), którzy z jedenastu roztworów zastosowanych do ekstrakcji białek mleka z mleka w proszku, słodkiej i kwaśnej serwatki, najlepsze zdolności izolacyjne wykazali dla 4% roztworu SDS.

Kolejnym etapem badania skuteczności badanych ekstrahentów do izolacji białek mleka była próba jakościowej detekcji kazeiny i beta-laktoglobuliny (BLG) metodą Western blot.

W badanych czekoladach, zarówno mlecznych, jak i gorzkich wykryto obecność BLG, białka o masie cząsteczkowej 18,6 kDa (ryc. 5A i B), przy czym w izolatach otrzymanych z czekolad mlecznych widoczne są także prążki sugerujące obecność dimeru tego białka. Ponadto na obrazie immunoblottingu czekolady A stwierdzono reakcję przeciwciała z białkiem, którego masa cząsteczkowa nie odpowiada ani mono-, ani dimerowi BLG. We wszystkich otrzymanych izolatach z czekolad wykryto również obecność kazeiny, przy czym najslabsza detekcja tego białka wystąpiła w przypadku czekolad gorzkich A (ryc. 6). Obecność białek mlecznych w badanych czekoladach była wykazana na etykietach przez producenta (produkty zakwalifikowane do 2 i 3 klasy). W przypadku czekolad mlecznych białka mleka są istotnym składnikiem produkcyjnym, natomiast w przypadku czekolad gorzkich prawdopodobnie nastąpiła kontaminacja produktu wewnątrz zakładu produkcyjnego. Producent informował o takiej możliwości, umieszczając zapis „produkt może zawierać mleko”.

W przypadku ekstraktów otrzymanych z badanych sosów potwierdzono obecność zarówno mono- jak i dimeru BLG w sosie chrzanowym (Ryc. 5), natomiast w ekstraktach otrzymanych z majonezu, podobnie jak w przypadku czekolady gorzkiej A, zauważono oddziaływanie przeciwciała z dwoma białkami o masach cząsteczkowych nie odpowiadających ani monomerowi, ani dimerowi BLG (ryc. 5.). Ponieważ jednak na obrazach membran po detekcji z przeciwciałem poliklonalnym przeciwko kazeinie nie zauważono obecności białek mleka w majonezie (ryc. 6), stwierdzono, że należy uznać ten produkt za pozbawiony białek mleka, a więc zgodny z deklaracją na etykiecie. Pomimo tego, że w tym samym zakładzie produkowany jest sos chrzanowy zawierający białka mleka (produkt klasy 3), producent zachował czystość linii technologicznej dla innego produktu – tj. majonezu (klasa 1).

Wśród wyrobów piekarskich nie stwierdzono obecności kazeiny w produktach pszenno-żytnich (ryc. 6), chociaż wykryto w nich śladowe ilości BLG (ryc. 5). Natomiast w przypadku wyrobów, których nazwa jednoznacznie sugeruje dodatek białek mleka, chociaż brak jest stosownej etykiety, potwierdzono w nich obecność zarówno białek kazeinowych, jak i serwatkowych (ryc. 5 i 6). Zaskakujący był fakt małej intensywności prążków zidentyfikowanych przez przeciwciała anty-kazeinowe w izolatach z bułki mlecznej, w porównaniu do izolatów z chleba na maślanie. Otrzymane wyniki świadczą o możliwym wystąpieniu zanieczyszczeń wtórnych produktów o niezdeklarowanej zawartości białek mleka (klasa 1) w trakcie wytwarzania na terenie jednego zakładu produkcyjnego. Możliwym powodem kontaminacji produktu jest niewłaściwa higiena utrzymywana na linii produkcyjnej lub niepoprawny sposób przechowywania i transportu poszczególnych składników lub gotowego produktu związany z krzyżowaniem linii technologicznych wytwarzających różne produkty – bułki i chleby z dodatkiem białek mleka, z linią dla produktów pszenno-żytnich.

W ostatniej badanej grupie nie stwierdzono obecności białek mleka w galaretkach (ryc. 5 i 6). W kisielu truskawkowym instant, który należy do klasy 1. stwierdzono obecność białek kazeinowych (Ryc. 6). Natomiast zarówno w kaszce mannie, jak i budyniu potwierdzono zarówno obecność BLG (i jej dimerów), jak i kazeiny. W tych produktach ponownie wykryto białko o masie cząsteczkowej innej, niż dla monomeru i dimeru BLG. Poza kisielem instant, badane produkty z grupy 5. były prawidłowo oznakowane. W tym samym zakładzie wytworzono zarówno pozbawioną białek mleka galaretkę, jak i mleczny budyń. Niestety kisiel instant został wtórnie zanieczyszczony.

Na podstawie uzyskanych techniką western-blotting obrazów membran stwierdzono, że zastosowane bufory ekstrakcyjne skutecznie wyizolowały alergenne frakcje białek mleka z badanych produktów spożywczych, przy czym zazwyczaj najkorzystniejszym ekstraktem był 4% SDS, o czym świadczy intensywność wybarwienia prążków na obrazach immunoblottingu.

Podsumowanie

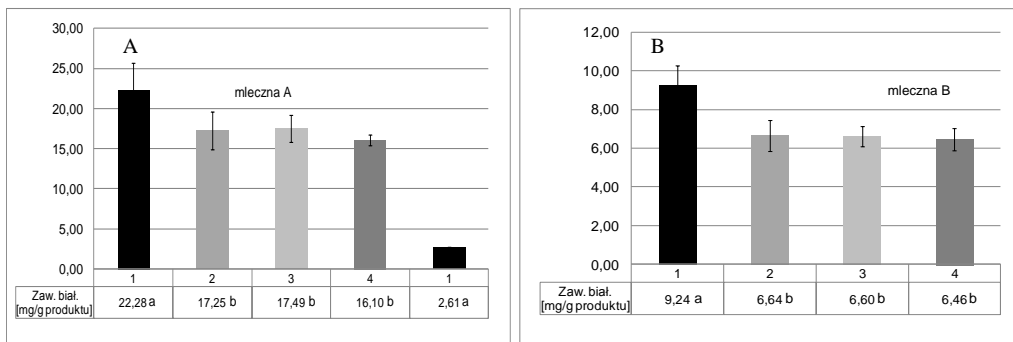
Wśród zastosowanych czterech wariantów ekstrahentów najlepsze zdolności ekstrakcyjne dla białek mleka wykazał 4% roztwór SDS. Ekstrahował największe ilości białek, wśród których zidentyfikowano alergenne frakcje białek mleka, beta-laktoglobuliny i kazeiny.

W piętnastu przebadanych produktach spożywczych potwierdzono obecność białek mleka we wszystkich produktach, które taką zawartość miały zadeklarowaną na etykiecie. Niestety stwierdzono obecność tych białek również w produktach, dla których producent nie podaje informacji o składzie jakościowym (ani na etykiecie, ani w miejscu ich sprzedaży), tj. wyrobach piekarskich. Brak deklaracji o zawartości białek

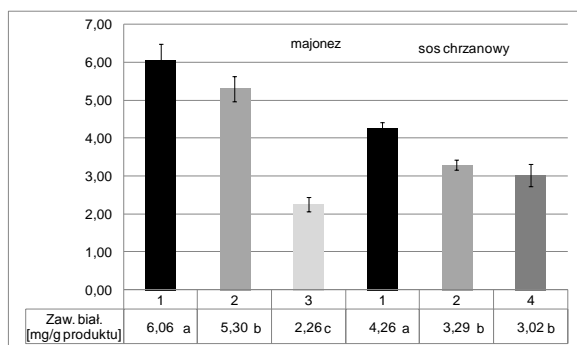
mleka we wszystkich produktach piekarskich niekoniecznie wynika ze złej woli producenta, lecz prawdopodobnie z faktu, że nikt obecnie takich etykiet nie oczekuje. Zmieniające się jednak w 2016 r. prawo, dotyczące etykietowania produktów w zakresie obecności alergenów, wymusi także na producentach pieczywa takie deklaracje.

Literatura

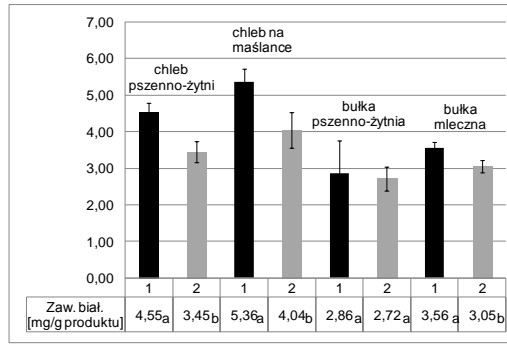
1. Besler M., Steinhart H., Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography B*, 2001, 756, 207-228.
2. Gilbowski P. Zastosowanie białek serwatkowych w przemyśle spożywczym. *Przegląd Mleczarski*, 2004, 9, 10-13.
3. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259), 680-685.
4. Monaci L., Brohee M., Tregoat V., Van Hengel A. Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food Chemistry*, 2011, 127, 669-675.
5. Normy Żywienia Człowieka (red.) M. Jarosz, B. Buhlak-Jachymczyk, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
6. Popov N., Schmitt S., Matthies H. Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehalts in Gewebshomogenaten. *Acta Biologica et Medica Germanica*, 1975, 34, 1441-1446.
7. Steinhoff M., Fischer M., Paschke-Kratzin A. Comparison of extraction conditions for milk and hen's egg allergens. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 2011, 28(4), 373-83.
8. Westphal C.D. Approaches to the detection of food allergens, from a food science perspective. W: *Food Allergy*, red. : S.J. Maleki, A.W. Burks & R.M. Helm, ASM Press, Washington DC 2006.
9. Wróblewska B. Wielka ósemka alergenów pokarmowych. *Alergia*, 2002, 4(15), 18-23.
10. Ziarno M. Alergia na białka mleka a procesy technologiczne. *Przemysł spożywczy*, 2006, 7, 26-28.



Ryc. 1. Zawartość białka w izolatach otrzymanych z czekolad A (A) i B (B) [mg/g produktu] przy użyciu: 1 – 4%. roztworu SDS, 2- buforu fosforanowego+4% SDS, 3- buforu fosforanowego+1% Tween 20, 4 - buforu fosforanowego+0,4% Tritonu X-100. Wartości oznaczone w wierszach tabeli innymi indeksami literowymi wykazują statystycznie istotne różnice w obrębie ekstraktów z badanego produktu.

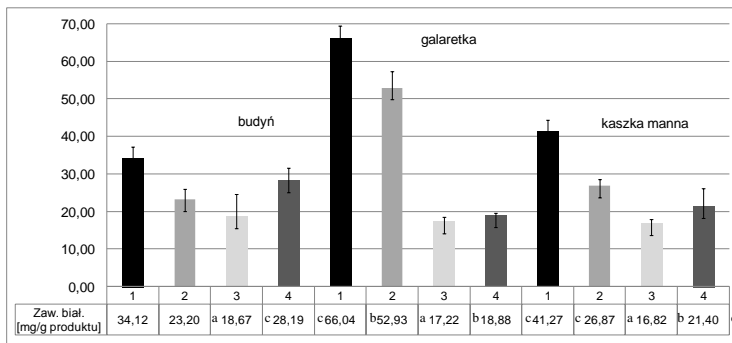


Ryc. 2. Zawartość białka w izolatach otrzymanych z sosów – majonezu i sosu chrzanowego [mg/g produktu] przy użyciu: 1 – 4%. roztworu SDS, 2- buforu fosforanowego+4% SDS, 3- buforu fosforanowego+1% Tween 20, 4 - buforu fosforanowego+0,4% Tritonu X-100. Wartości oznaczone w wierszach tabeli innymi indeksami literowymi wykazują statystycznie istotne różnice w obrębie ekstraktów z badanego produktu.



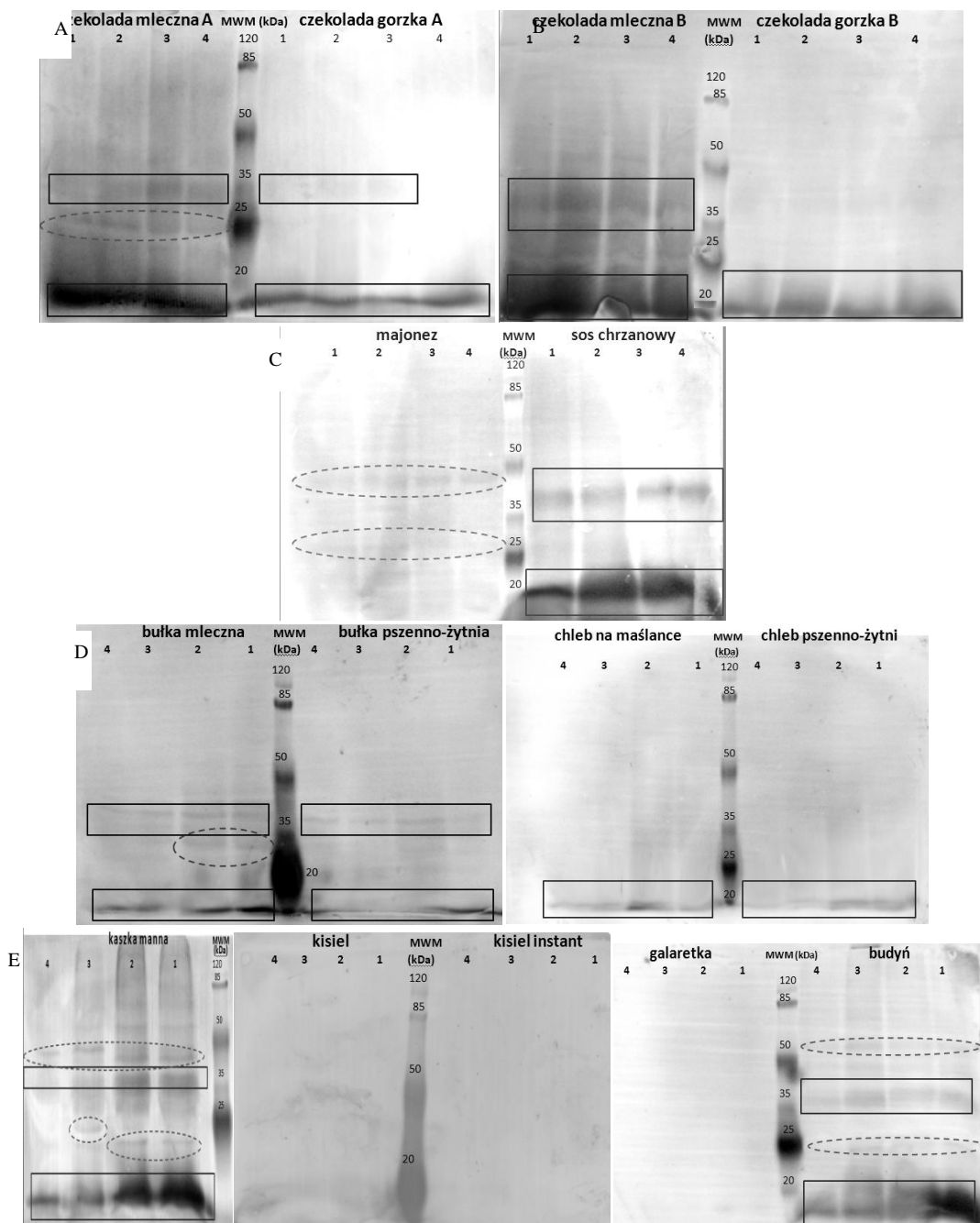
Ryc. 3. Zawartość białka w izolatach otrzymanych z wyrobów piekarskich – chlebów i bułek [mg/g produktu] przy użyciu: 1 – 4% roztworu SDS, 2- buforu fosforanowego+4% SDS, 3- buforu fosforanowego+1% Tween 20, 4 - buforu fosforanowego+0,4% Triton X-100.

Wartości oznaczone w wierszach tabeli innymi indeksami literowymi wskazują statystycznie istotne różnice w ekstraktach otrzymanych z tego samego produktu.



Ryc. 4. Zawartość białka w izolatach otrzymanych z deserów o wysokiej zawartości białek– budyniu, galaretki i kaszki mannej [mg/g produktu] przy użyciu: 1 – 4% roztworu SDS, 2- buforu fosforanowego+4% SDS, 3- buforu fosforanowego+1% Tween 20, 4 - buforu fosforanowego+0,4% Triton X-100.

Wartości oznaczone w wierszach tabeli innymi indeksami literowymi wykazują statystycznie istotne różnice pomiędzy ekstraktami otrzymanym z tego samego produktu.

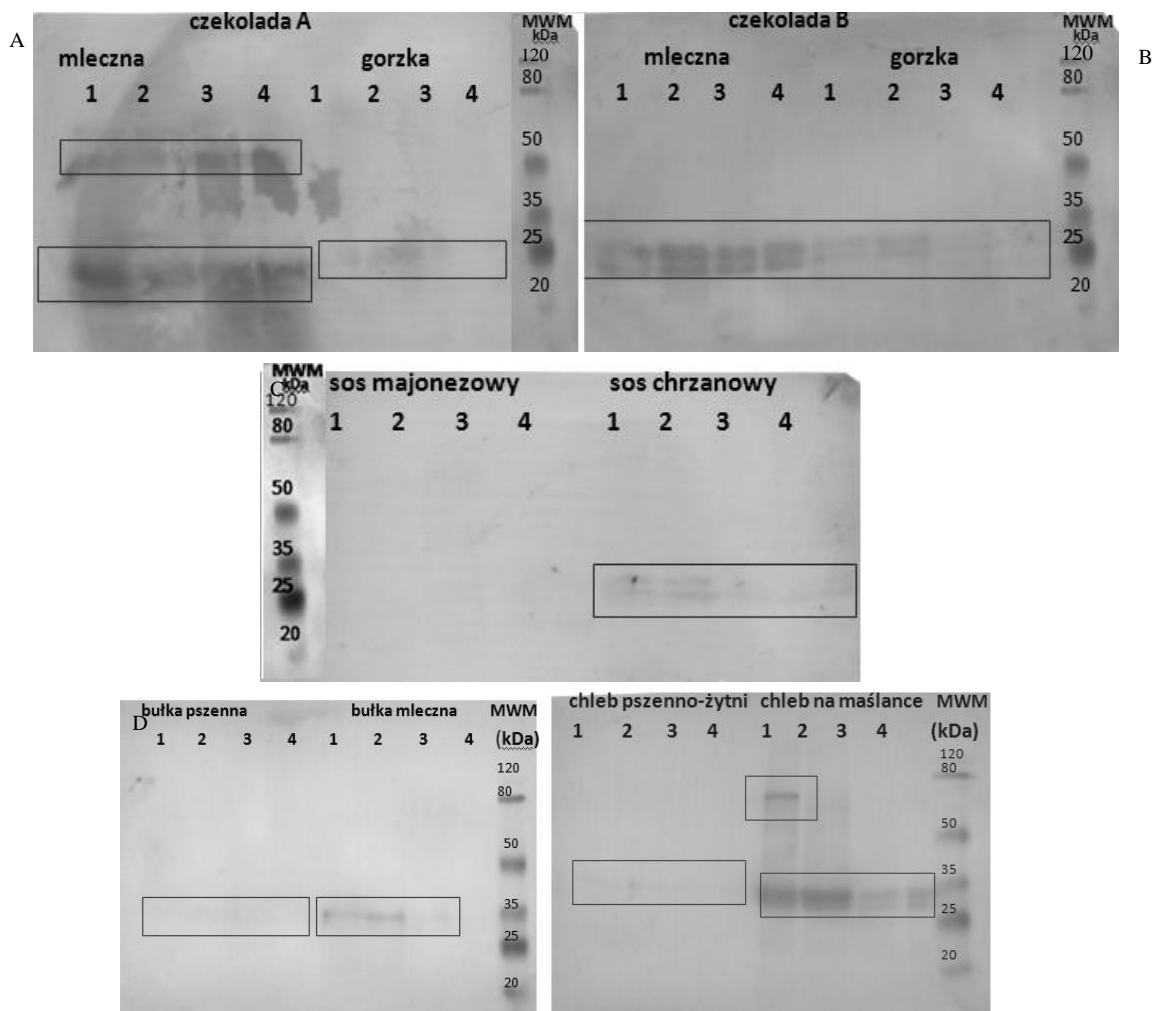


Ryc. 5. Obrazy membran uzyskane po immunodetekcji z poliklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko beta-laktoglobulinie. A – ekstrakty z czekolad wyprodukowanych przez producenta A, B - ekstrakty z czekolad z grupy B, C - ekstrakty uzyskane z sosów, D – ekstrakty z wyrobów piekarskich, E – ekstrakty z produktów deserowych.

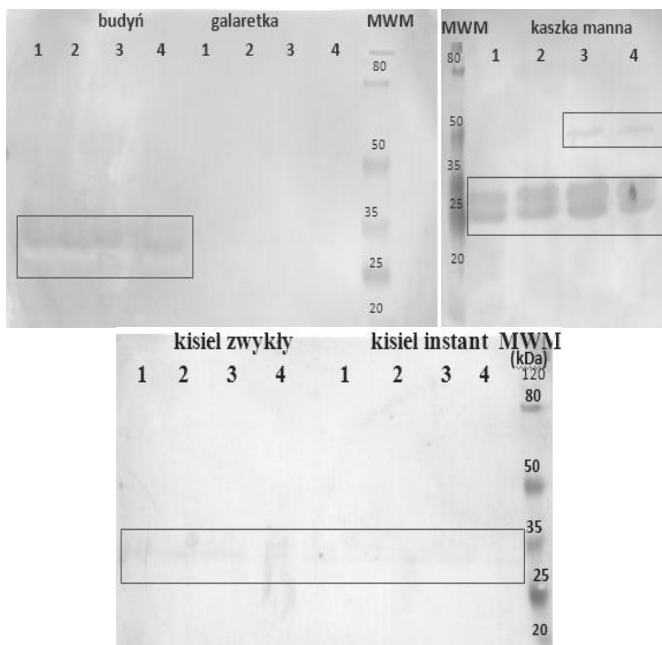
Cyfry 1-4 na ścieżkach elektroforetycznych odpowiadają rozpuszczalnikom zastosowanym do ekstrakcji, czyli: 1 – 4% roztworu SDS, 2- buforu fosforanowego+4% SDS, 3- buforu fosforanowego+1% Tween 20, 4 - buforu fosforanowego+0,4% Triton X-100. MWM – marker mas cząsteczkowych.

W ramkach – białka zidentyfikowane jako BLG (monomer lub dimer).

Linią przerywaną oznaczono białka reagujące z przeciwciałem anti-BLG, o masie cząsteczkowej innej, niż charakterystyczna dla tego białka.



E



Ryc. 6. Obrazy membran uzyskane po przeprowadzeniu immunoblotingu z poliklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko kazeinie. A – ekstrakty z czekolad wyprodukowanych przez producenta A, B - ekstrakty z czekolad z grupy B, C - ekstrakty uzyskane z sosów, D – ekstrakty z wyrobów piekarskich, E – ekstrakty z produktów deserowych.

Cyfry 1-4 na ścieżkach elektroforetycznych odpowiadają rozpuszczalnikom zastosowanym do ekstrakcji, czyli: 1 – 4% roztworu SDS, 2- buforu fosforanowego+4% SDS, 3- buforu fosforanowego+1% Tween 20, 4 - buforu fosforanowego+0,4% Triton X-100. MWM – marker mas cząsteczkowych.

W ramkach – białka zidentyfikowane jako kazeinowe.

TOMASZ SZABLEWSKI¹, KINGA STUPER-SZABLEWSKA²,
RENATA CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA¹, ŁUKASZ TOMCZYK¹

¹*Katedra Zarządzania Jakością Żywności, ²Katedra Chemii
¹Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, ²Wydział Technologii DREWNA
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań*

OZNACZANIE ERGOSTEROLU JAKO CHEMICZNEGO WSKAŹNIKA ZANIECZYSZCZENIA GRZYBAMI MIKROSKOPOWYMI

Wstęp

Grzyby mikroskopowe są wszechobecnymi, cudzożywnymi organizmami wielokomórkowymi, stanowiącymi zanieczyszczenie wielu produktów spożywczych, w tym jaj konsumpcyjnych [Szablewski i in., 2010]. Wzrastają szybko i agresywnie tworząc sieć strzępek zwanych grzybnią, a ich rozwojowi towarzyszy zwykle wytwarzanie mikotoksyn. Do pełnej oceny zagrożeń wynikających z obecności grzybów mikroskopowych niezbędne jest określenie ich ilości. Obecnie odchodzi się od klasycznych ilościowych metod oznaczania pleśni na rzecz szybszych i precyzyjniejszych chemicznych metody analizy zawartości wybranych markerów, tj. chityny, adenosynotrifosforanu [ATP] i ergosterolu [ERG] [Stuper, 2010]. ERG (ergosta-5,7,22-trien-2 β -ol) jest głównym steroidem występującym w błonach komórkowych większości grzybów mikroskopowych, a jego ilość ergosterolu istotnie koreluje z zawartością mikotoksyn [Osborne i in., 1982] oraz liczbą jednostek tworzących kolonie [Pasanen i in., 1999]. Stosunkowo szybka metoda oznaczenia ilości ERG stała się swoistym wskaźnikiem obecności mikroflory grzybowej. Metodę oznaczania ilości biomasy grzybowej na podstawie stężenia ergosterolu stosuje się powszechnie do analiz porażenia pleśniami ziarna [Seitz i in., 1977], pasz [Müller i Schwadorf, 1990], gleby [Ruzicka i in., 2000], materiałów budowlanych [Müller i Lehn., 1988] oraz produktów żywnościowych, w tym jaj [Szablewski i in., 2010], ponieważ metabolit ten nie jest integralnym składnikiem jaja [Elkin i Lorenz, 2009].

W ostatnich latach w coraz większym stopniu bezpieczeństwo żywności decyduje o wyborze zakupu określonego produktu przez konsumenta. Amerykańska organizacja FDA (*Food and Drug Administration*) spośród wszystkich zagrożeń występujących w żywności na pierwszym miejscu wymienia drobnoustroje chorobotwórcze. Specyficzne mikroorganizmy zasiedlające skorupy jaj także stanowią potencjalne ryzyko zatruc pokarmowych, prowadzących czasem do poważnych schorzeń. W przypadku większości świeżo zniesionych jaj ich treść jest jałowa. Do zanieczyszczenia jaj dochodzi najczęściej w kurniku i w czasie przechowywania w nieodpowiednich warunkach. W ostatnich latach

dowodzono, że podczas magazynowania jaj dochodzi do migracji mikroflory obecnej na ich powierzchni do wnętrza przez pory skorupy [Węsierska, 2006]. Bogate w składniki odżywcze wnętrze jaja stanowi idealne środowisko dla rozwoju bakterii, a także grzybów mikroskopowych. Ponadto specyficzny mikroklimat kurnika tj. podwyższona temperatura i wilgotność sprzyja wzrostowi pleśni. Stopień jej zanieczyszczenia związany jest także z systemem chowu kur niosek. Wykazano, że jaja od kur trzymany na głębokiej ściółce mają na skorupie i błonach podskorupowych około 15-krotnie więcej bakterii niż jaja od kur trzymany w klatkach [Harry, 1963]. Łatwo też dochodzi do zanieczyszczenia skorup, gdy w gniazdach dla niosek ściółka jest brudna i wilgotna. Warunki te sprzyjają wzrostowi grzybów mikroskopowych m.in. z rodzajów *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Candida* [Board i Tranter, 1986]. Zdecydowana ich większość produkuje drugorzędowe metabolity wtórne zwane mikotoksynami, które wpływają toksycznie zarówno na drób jak i na konsumentów, powodując choroby zwane mikotoksykozami. W literaturze przedmiotowej pojawiają się pojedyncze doniesienia dotyczące penetracji strzępek pleśni przez skorupę do treści jaj, zarówno konsumpcyjnych jak i wylęgowych [Szablewski i in., 2010, Nowaczewski i in., 2011]. Postanowiono więc wykonać oznaczenia zawartości mikroflory grzybowej za pomocą chemicznej metody (ERG) w różnych częściach jaj pochodzących z intensywnego systemu chowu klatkowego i ściółkowego.

Material i metody

Do badań użyto po 150 sztuk jaj pochodzących z chowu ściółkowego i klatkowego. Jaja z chowu ściółkowego pozyskano od stada niosek Zielononózka kuropatwiana w szczycie nieśności żywionych paszą pełnoporcjową, natomiast jaja z chowu klatkowego pozyskano od stada niosek rasy Rhode Island Red również w szczycie nieśności, żywionych paszą pełnoporcjową. Jaja przechowywano przez okres 4 tygodni, w temperaturze $6\pm 2^{\circ}\text{C}$. Z każdego tygodnia przechowywania każdorazowo z 30 jaj przygotowano próbki białka, żółtka i skorupy, odwodnione przez liofilizację (FreeZone Plus, Labconco, Kansas City, MO) i poddano analizie ERG.

Analizę stężenia ERG w przygotowanych próbkach wykonano za pomocą metody opisanej przez Perkowskiego i in. [2008]. Do analiz pobrano 0,10 g próby i umieszczano w zakręcanych probówkach o pojemności 17 ml, gdzie przeprowadzono ekstrakcję ergosterolu z jednoczesnym zmydleniem. W tym celu do próbek dodawano 2 ml metanolu oraz 1 ml 0,5M roztworu wodorotlenku sodu i dwukrotnie poddano działaniu mikrofal o mocy 350 W, przez okres 20 s (Whirlpool model AVM 401/1/WH, 2450 MHz, 900 W). Po schłodzeniu próbki poddano neutralizacji za pomocą 1M wodnego roztworu kwasu solnego i po dodaniu 2 ml metanolu ERG ekstrahowano za pomocą 12 ml pentanu (3x4 ml). Uzyskane ekstrakty pentanowe na bieżąco

przenoszono do fiolki o pojemności 8 ml, po czym odparowano do sucha w strumieniu azotu. Przed rozpoczęciem analizy próby rozpuszczano w 1 ml metanolu. Analizę przeprowadzono za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczonego (Waters SDS 501) z detektorem absorbcyjometrycznym (Waters 486 Tunable Absorbance Detector). Rozdział chromatograficzny odbywał się na kolumnie Nova Pack C18, (150x3,9 mm), jako fazę wymywającą stosowano mieszaninę metanol:acetonitryl 90:10 (v/v). Pomiar stężenia ergosterolu następował przy użyciu wzorca zewnętrznego przy długości fali $\lambda=282$ nm. Identyfikacja związku odbywała się na podstawie porównania czasu retencji badanego pliku z czasem retencji standardu oraz poprzez dodanie do badanej próbki określonej ilości standardu (>95 %, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) i powtórna analizę. Poziom detekcji wynosił 0,01 mg/kg.

Wyniki i dyskusja

W wyniku przeprowadzonych analiz zaobserwowano obecność ERG w treści jaj co świadczy o zdolności grzybów mikroskopowych do przerastania przez pory skorupy. Zawartość ergosterolu w próbach jaj była zróżnicowana w zależności od rodzaju chowu. W przypadku chowu ściółkowego stężenie ERG we wszystkich częściach jaja było istotnie wyższe niż w przypadku chowu klatkowego. Obserwowana zależność wynika z faktu, że skorupa jaj z chowu ściółkowego ma bezpośredni kontakt ze ściółką co powoduje jej zanieczyszczenie grzybami mikroskopowymi. Interesującym wydaje się fakt, iż obecność tego metabolitu grzybowego stwierdzono w znacznej większości prób tylko w skorupie i białku (Tabela 1).

Tabela 1. Stężenie ergosterolu (mg/kg) w 300 próbach skorupy, białka i żółtka jaja z chowu klatkowego i ściółkowego

Rodzaj próby	Chów klatkowy					Chów ściółkowy				
	Czas przechowywania (tygodnie)					Czas przechowywania (tygodnie)				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Skorupa	0,45	0,99	1,54	2,10	3,27	0,50	2,39	3,40	4,48	5,27
Białko	0,01	0,19	0,22	0,48	0,63	0,02	1,39	2,04	2,66	2,94
Żółtko	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

<LOD = poniżej limitu detekcji

Na podstawie tych krótkich, wstępnych badań zaobserwowano pewną prawidłowość w przypadku wszystkich prób. Największe stężenie ERG występuje w skorupie, z kolei niższe w białku, natomiast w żółtku stwierdzono śladowe ilości tego metabolitu. Podobne zjawisko autorzy zaobserwowali w przypadku ziarniaków zbóż [Jackowiak i in, 2005; Packa i in., 2008]. Mechanizm zasiedlania ziarniaków przez grzyby mikroskopowe rozpoczyna się od zewnętrznej warstwy, następnie strzępki

grzybni wnikają do wnętrza ziarniaka i w poszczególnych jego warstwach obserwuje się zmieniającą się zawartość ERG [Perkowski i in., 2008]. Stężenie ERG zmniejsza się wraz z głębokością warstwy mierzonej od powierzchni skorupy. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż strzępki grzybów mikroskopowych wnikają przez skorupę do treści jaja dzięki obecności porów. Mechanizmy obronne jaj oddziałają głównie wobec bakterii, natomiast grzyby mikroskopowe prawdopodobnie są na nie w pewnym zakresie odporne i mogą wnikać do wnętrza jaja.

Dotychczasowych publikacji nad zawartością ergosterolu w jajach konsumpcyjnych jest bardzo mało. Szablewski i in. [2010] wykazali, że zawartość ergosterolu w jajach zależy od systemu chowu ptaków. Najwyższe stężenie ERG otrzymano z prób skorup przechowywanych 7 dni z chowu ściółkowego, wynoszące 17,01 mg/kg, odpowiednio niższe w próbach białek (6,49 mg/kg). Dla systemu klatkowego, najwyższe stężenie ERG wynosiło 3,17 mg/kg w próbach skorup oraz 0,97 mg/kg w próbach białek.

Podsumowanie

Wzrost grzybów mikroskopowych na produktach spożywczych stanowi poważny problem ze względu na możliwość wytwarzania przez nie szkodliwych metabolitów - mikotoksyn. W przypadku jaj konsumpcyjnych, niewidoczny wzrost mikroflory grzybowej na ich powierzchni może stanowić potencjalne źródło problemów zdrowotnych dla konsumenta. Nieodpowiednie warunki sanitarne panujące w kurnikach zwiększają wyjściowe zanieczyszczenie jaj i sprzyjają dalszemu rozwojowi grzybów mikroskopowych, które podczas przechowywania jaj zdolne są do przerastania przez pory w skorupie do wnętrza.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że podczas przechowywania następuje wzrost mikroflory grzybowej zarówno na jej powierzchni jak i w treści niezależnie od okresu życia niosek. Z jednej strony niskie wymagania odżywcze grzybów mikroskopowych zapewniają im ciągły wzrost na powierzchni skorupy, mimo stosowania odpowiednich warunków przechowalniczych jaj (temp. do 18°C, wilgotność do 85%), a z drugiej, dłuższy proces przechowywania i postępujący proces „starzenia się” jaj osłabia naturalne bariery przeciwdrobnoustrojowe.

Literatura

1. Board R.G., Tranter H.S. The microbiology of eggs. In: Egg Science and Technology. Eds. W.J. Stadelman, O.J. Cotterill. AVI Publishing Company Inc., Westport 1986, 75.

2. Elkin R.G, Lorenz E.S. Feeding laying hens a bioavailable soy sterol mixture fails to enrich their eggs with phytosterols or elicit egg yolk compositional changes. *Poultry Science*, 2008, 88, 152-158.
3. Harry E.G. The relationship between egg spoilage and the environment on the egg when laid. *British Poultry Science*, 1963, 4, 91-100.
4. Jackowiak H., Packa D., Wiwart M., Perkowski J. Scanning electron microscopy of *Fusarium* damaged kernels of spring wheat. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, 98, 113-123.
5. Müller H.M., Lehn C. Ergosterin als Mass für das Pilzwachstum in Futtermitteln. I. Mitteilung. Ergosteringehalt von Getreide. *Archiv für Tierernährung*, 1988, 38, 227-240.
6. Müller H.M., Schwadorf K. Ergosterol and fungal count in cereal by-products. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1990, 64, 215-219.
7. Nowaczewski S., Stuper K., Szablewski T., Kontecka H. Microscopic fungi in eggs of ring-necked pheasants kept in aviaries. *Poultry Science*, 2011, 90, 2467-2470.
8. Osborne, B.G. Mycotoxins and the cereals industry—a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 1982, 17, 1-9.
9. Packa D., Jackowiak H., Góral T., Wiwart M., Perkowski J. Scanning electron microscopy of *Fusarium* – infected kernels of winter triticale (x *Triticosecale* Wittmack). *Seed Science and Biotechnology*, 2008, 2 (1), 27-31.
10. Pasanen A.L, Yli-Pietila K., Pasanen P., Kalliokoski P., Tarhanen J. Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65, 138-142.
11. Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Szwajkowska-Michałek L. Concentration of ergosterol in small – grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia*, 2008, 63(4), 542 -547.
12. Ruzicka S., Edgerton D., Norman M., Hill T. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32, 989-1005.
13. Seitz L.M., Mohr H.E., Burroughs R., Sauer D.B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*, 1977, 54, 1207-1217.
14. Szablewski T., Stuper K., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J., Perkowski J. Ergosterol as an indicator of the presence of microscopic fungi in eggs for human consumption produced in different husbandry systems. *Poultry Science*, 2010, 89, 2491-2493.
15. Węsierska E. Czynniki jakości mikrobiologicznej spożywczych jaj kurzych. *Medycyna Weterynaryjna*, 2006, 62, 11, 1222-1228.

AKTYWNOŚĆ FUNGISTATYCZNA PREPARATÓW BIAŁKOWYCH POZYSKANYCH Z *PAENIBACILLUS ALVEI* WZGLĘDEM *TRICHODERMA SPP.*

Wstęp

Paenibacillus alvei jest gatunkiem bakterii Gram-dodatnich, mezofilnych, które klasyfikuje się jako obligatoryjne tlenowce, izolowane przede wszystkim z gleby. *Paenibacillus spp.* wykazuje zdolność do sporulacji i może przetrwać nawet najbardziej restrykcyjne warunki środowiskowe, obejmujące między innymi: suszę, promieniowanie jonizujące, promieniowanie ultrafioletowe, a także kontakt z toksycznymi substancjami chemicznymi [McSpadden, 2004; Larsen i in., 2009; Raza i in., 2009; Zarschler i in., 2010].

Bakterie *Paenibacillus alvei* są zdolne do wytwarzania metabolitów o właściwościach fungistatycznych. Są nimi antybiotyki peptydowe ograniczające rozwój grzybni i kiełkowanie zarodników oraz enzymy zewnątrzkomórkowe [McSpadden, 2004; Larsen i in., 2009; Deng i in., 2011]. Antybiotyki wytwarzane są rybosomalnie, podczas fazy wzrostu biomasy bakteryjnej albo pozarybosomalnie, po jej zakończeniu [Lee i in., 2008]. Najczęściej produkowanymi przez *Paenibacillus spp.* substancjami tego typu są: polimyksyna, polipeptyna, jolipeptyna, gawaseryna, kolistyna oraz saltawalina [Chung i in., 2000; Choi i in., 2008]. Jednakże za najważniejsze, z uwagi na wywoływany efekt fungistatyczny, uznaje się metabolizowane w mniejszych ilościach fusaricydyny A, B, C i D. Należą one do grupy cyklicznych depsypteptydów związanych z resztą kwasu pentadekanowego i wolną grupą aminową [Raza i in., 2009]. Typową chitynazą produkowaną przez *Paenibacillus alvei* jest β -glukanaza [Hong i Meng, 2003]. Ponadto bakterie *Paenibacillus spp.* zdolne są do wytwarzania innych pozakomórkowych enzymów hydrolitycznych takich jak: proteazy, celulazy, ksylanazy, lipazy, amylazy i chitynazy, które są przydatne w biologicznej kontroli grzybów [Selim i in., 2005; Raza i in., 2009].

Agresywne szczepy grzybów z rodzaju *Trichoderma* są czynnikiem powstawania zespołu chorobowego, określanego mianem zielonej pleśni i stanowią poważną przyczynę strat w uprawach boczniaka ostrygowatego na całym świecie [Velazquez-Cedeno i in., 2008]. Stwierdzono, że w towarowej uprawie boczniaka w Polsce największe jego straty obserwuje się po zakażeniu grzybni boczniakowej następującymi

patogenami: *Trichoderma aggressivum f. europeanum*, *Trichoderma pleuroticola* oraz *Trichoderma pleurotum* [Sobieralski i in., 2012].

Celem pracy była ocena przydatności fungistatycznej *Paenibacillus alvei* względem *Trichoderma spp.* jako patogenów bocznika. Badaniu właściwości fungistatycznych poddano następujące preparaty pozyskane z *Paenibacillus alvei* PCM 481: supernatant, preparat białkowy uzyskany po wysoleniu i dializie, preparat białkowy po wysoleniu i dializie poddany inaktywacji enzymatycznej oraz 2 białka otrzymane w wyniku rozdziału chromatograficznego.

Material i metody

W badaniach właściwości fungistatycznych zastosowano *Paenibacillus alvei* PCM 481 jako szczep bakterii testowych. Przygotowano go z zachowaniem następujących warunków hodowli:

- podłoże - bulion odżywczy,
- temperatura - 30°C,
- czas - 48 godzin.

Badanie bakteryjnych preparatów białkowych obejmowało izolację i częściowe oczyszczanie białek.

Namnożoną płynną hodowlę bakteryjną odwirowano w temperaturze 20°C (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Supernatant zlano do jałowych kolb. Wszystkie kolby (poza jedną, której zawartość zamrożono) ogrzewano następnie w łaźni wodnej w temperaturze 80°C przez 15 minut. Po ochłodzeniu przesącza do temperatury 4°C poddano go wysalaniu. Proces ten przebiegał w temperaturze 4°C i trwał 24 godziny. Następnie roztwór poddano kolejnemu wirowaniu w temperaturze 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Supernatanty odrzucono, a uzyskane osady rozpuszczono w 0,05M buforze potasowo-fosforanowym o pH 6,8, otrzymując końcową objętość łącznego preparatu 50 ml. Objętość ta została następnie podzielona między 2 woreczki dializacyjne (MWCO 3500, średnica 22 mm) po 25 ml. Oba woreczki umieszczono w zlewkach o pojemności 2l wypełnionych 0,05M buforem potasowo-fosforanowym o pH 6,8 i prowadzono dializę na miesadłach magnetycznych przez 24 godziny. W czasie dializy kilkakrotnie wymieniono bufor. Po jej zakończeniu woreczki dializacyjne opróżniono, a ich zawartość przeniesiono do próbek i zamrożono.

Chromatografia żelowa

Na uprzednio aktywowaną i zrównoważoną 0,05M buforem potasowo-fosforanowym o pH 6,8 kolumnę (wysokość 30 cm, średnica 1,7 cm, wypełnienie Sephadex G-75) naniesiono 1 ml rozmrożonego preparatu białkowego. Rozdział prowadzono przez 3 godziny przy prędkości przepływu 33 ml/h. Kolumnę żelową

uzupełniano 0,05M buforem potasowo-fosforanowym o pH 6,8. W tym czasie kolektor frakcji zbierał po 50 kropeł filtratu do każdej probówki, a spektrofotometr mierzył jednocześnie absorbancję tego eluentu przy długości fali $\lambda=280$ nm. Wartości absorbancji były zapisywane przez rejestrator. Po zakończeniu chromatografii frakcje odpowiadające poszczególnym pikom połączono i zamrożono.

Inaktywacja enzymami proteolitycznymi

Hydroлизę enzymatyczną białka wykonano z użyciem termostabilnej proteazy bakteryjnej (P-5380, Sigma Chemicals).

Określenie właściwości fungistatycznych uzyskanych preparatów

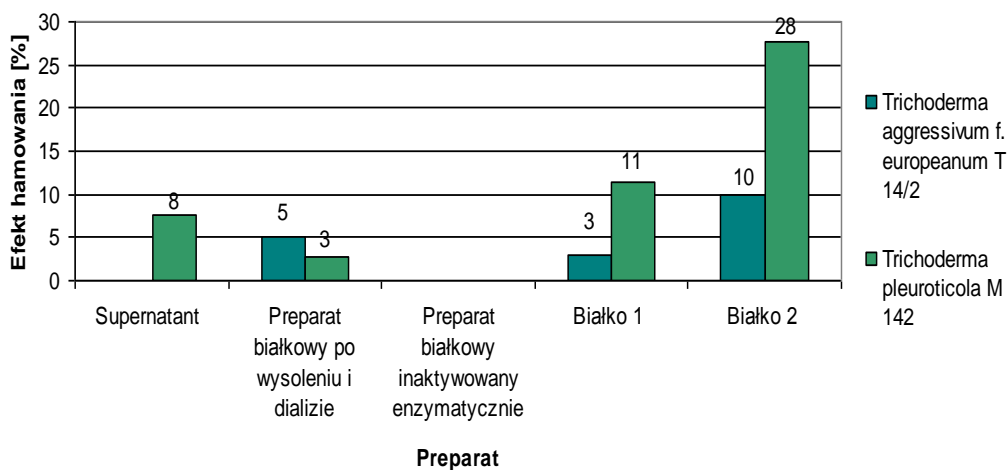
Badanie zostało przeprowadzone na podłożu z pożywki pszennej. Do upłynnionej pożywki dodawano preparaty bakteryjne w stężeniu 10%. Tak przygotowane pożywki wylewano na płytki Petriego o średnicy 6 cm w trzech powtórzeniach. Po zestaleniu pożywki na centralnej części każdej płytki umieszczano krążek (o średnicy 1 cm) wyrosniętej kultury grzyba jednego z dwóch analizowanych szczepów wskaźnikowych, które wykazały największą wrażliwość względem wybranego biologicznego czynnika kontroli. Jednocześnie prowadzono hodowle kontrolne pozbawione dodatku szczepów testowych. Co 24 h dokonywano pomiaru średnicy grzybni i wyliczano procentowy efekt hamowania według wzoru przedstawionego poniżej.

$$\text{efekt hamowania wzrostu} = \frac{\text{średnica próby kontrolnej [cm]} - \text{średnica próby badanej [cm]}}{\text{średnica próby kontrolnej [cm]}} * 100\%$$

Obserwacje przerywano w dniu, w którym grzybnia w próbach kontrolnych osiągała brzeg płytki Petriego, po czym określano ostateczny stopień zahamowania wzrostu.

Wyniki i dyskusja

Badaniu właściwości fungistatycznych poddano następujące preparaty pozyskane z *Paenibacillus alvei* PCM 481: supernatant, preparat białkowy uzyskany po wysoleniu i dializie, preparat białkowy po wysoleniu i dializie poddany inaktywacji enzymatycznej oraz 2 białka otrzymane w wyniku rozdziału chromatograficznego (białko 1- suma frakcji od 5 do 7, białko 2- suma frakcji od 12 do 16). Testowano je względem *Trichoderma aggressivum f. europeum* T 14/2 oraz *Trichoderma pleuroticola* M 142. Stwierdzono, że analizowane patogeny wykazały zróżnicowaną wrażliwość na 10% dodatek badanych preparatów biologicznych (rys. 1).



Rys. 1. Efekty fungistatyczne preparatów bakteryjnych

W przypadku *Trichoderma aggressivum f. europeanum* T 14/2 najlepsze oddziaływanie grzybobójcze wykazało białko 2, jednakże wartość tego oddziaływania wyniosła jedynie 10%. Dodatek preparatu białkowego po wysoleniu i dializie oraz białka 1 dał mniejsze efekty hamujące grzyby. Z kolei przy dodatku preparatu białkowego inaktywowanego enzymatycznie nie zaobserwowano podczas badania efektów hamujących rozwój analizowanych patogenów. W przypadku *Trichoderma pleuroticola* M 142 oddziaływanie hamujące wykazał już sam supernatant. Preparat białek wysolonych działał mniej skutecznie niż wydzielone z niego białka 1 i 2. Ponadto uzyskane efekty fungistatyczne białek 1 i 2 były istotnie większe od rezultatów zaobserwowanych w kierunku *Trichoderma aggressivum f. europeanum* T 14/2. W obu przeprowadzonych doświadczeniach nie zaobserwowano oddziaływania fungistatycznego w próbach, do których dodawano preparaty białek inaktywowanych enzymatycznie. Ponadto zauważono także, że wyższe oddziaływanie antygrzybowe występuje, gdy do prób dodaje się preparaty białek rozdzielonych chromatograficznie, niż gdy dodaje się mieszaninę białek wysolonych z supernatantu. Pozwala to wnioskować, iż im bardziej oczyszczone białko tym lepszy efekt fungistatyczny. Poczyniona dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA pozwoliła ponadto stwierdzić, że ostateczne efekty fungistatyczne zależały od rodzaju zastosowanego preparatu z *Paenibacillus alvei* PCM 481 i od rodzaju szczepu wskaźnikowego.

Wnioski

Na podstawie wyników uzyskanych po przeprowadzeniu badań przedstawiono następujące wnioski:

1. Aktywność przeciwgrzybowa preparatów białkowych pozyskanych z *Paenibacillus alvei* PCM 481 jest zróżnicowana i zależna od rodzaju zastosowanego preparatu i szczepu wskaźnikowego.
2. Na efekt fungistatyczny preparatów białkowych uzyskanych z hodowli *Paenibacillus alvei* PCM 481 wpływa stopień ich oczyszczenia.

Literatura

1. Choi S., Park S., Kim R., Lee Ch., Kim J., Park S. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Penibacillus polymyxa* E681. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 365, 89-95.
2. Chung Y., Kim Ch., Hwang I., Chun J. *Paenibacillus koreensis* sp. nov, a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50, 1495-1500.
3. Deng Y., Lu Z., Lu F., Wang Y., Bie X. Study on antimicrobial protein produced by *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27, 1803-1807.
4. Hong T.Y., Meng M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* spp. isolated from soil garden. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61, 471-478.
5. Larsen J., Cornejo P., Barea J. Interactions between the arbuscularmycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41, 286-292.
6. Lee Y., Senthilkumar M., Kim J., Swarnalakshmi K., Annapurna K. Purification and partial characterization of antifungal metabolite from *Paenibacillus lentimorbus* WJ5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24, 3057-3062.
7. McSpadden B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 2004, 94 (11), 1252-1258.
8. Raza W., Yang X., Wu H., Wang Y., Xu Y., Shen Q. Isolation and characterization of fusaricidin-type compound-producing strain of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 active against *Fusarium oxysporum* f.sp. *neivum*. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 125, 471-483.
9. Selim S., Negrel J., Govaerts C., Gianinazzi S., Tuijn D. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* spp. strain B2

- isolated from the sorghum mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (11), 6501-6507.
10. Sobieralski K., Siwulski M., Kommon-Żelazowska M., Błaszczuk L., Sas-Golak I., Frużyńska-Józwiak D. Impact of *Trichoderma pleurotum* and *T.pleuroticola* isolates on yielding of *Pleurotusostreatus* (fr.) Kumm. *Journal of Plant Protection Research*, 2012, 52 (1), 165-168.
 11. Velazquez-Cedeno M., Farnet A., Mata G., Savoie J. Role of *Bacillus spp.* in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzanium* in heat-treated wheat-straw substrates. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 6966-6973.
 12. Zarschler K., Janesch B., Ristl R., Messner P., Schaffer Ch. Cell surface display of chimeric glycoproteins via the S-layer of *Paenibacillus alvei*. *Carbohydrate Research*, 2010, 345, 1422-1431.

BIOLOGICZNA KONTROLA WZROSTU GRZYBÓW Z RODZAJU *TRICHODERMA* JAKO PATOGENÓW BOCZNIAKA OSTRYGOWATEGO

Wstęp

Biologiczna kontrola z zastosowaniem rozmaitych organizmów żywych jest gałęzią nauki obejmującą zarówno: rolnictwo, ogrodnictwo, biotechnologię, jak też przemysł spożywczy [Someya, 2008; Abou-Zeid i in., 2009]. Powstała ona na skutek próby ograniczenia stosowania chemicznych środków ochrony roślin, przy jednoczesnym wzroście zainteresowania środkami ekologicznymi, szczególnie w produkcji żywności oraz wyższej świadomości społeczeństwa dotyczącej konieczności ochrony środowiska naturalnego [Kühne, 2008].

Literatura przedmiotu podaje, że mikroorganizmy takie jak bakterie (przede wszystkim z rodzajów *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*), pleśnie (między innymi z rodzajów *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*) oraz niektóre drożdże wykazują istotną skuteczność aktywnego hamowania wzrostu wybranych grup patogenów roślinnych [Seddon i in., 1997; Larkin i Fravel, 1998; Ghai i in., 2007; Chaiharh i in., 2009; Abou-Zeid i in., 2009].

Bocznik (*Pleurotus spp.*) jest drugim po pieczarce (*Agaricus spp.*) grzybem jadalnym uprawianym na skalę przemysłową. Wzrastające zainteresowanie konsumentów oraz eksporterów przyczynia się do dynamicznego wzrostu jego produkcji w wielu krajach, w tym także w Polsce. Grzyb ten cechują wyjątkowe walory sensoryczne, a działanie zdrowotne, interesuje badaczy z dziedzin takich jak medycyna, czy farmacja [Tomalak, 2008].

Uprawa grzybów napotyka na wiele problemów i ograniczeń. Jednym z poważniejszych zagrożeń jest porażenie uprawy przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Patogeny te są czynnikiem chorobotwórczym powodującym duże straty w uprawie bocznika, a także innych grzybów i powodującym obniżenie ich plonowania. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* konkurują z innymi grzybami uprawnymi o pokarm i mogą zahamować wzrost ich grzybni lub nawet spowodować jej zanik. Niektóre z nich pasożytują na żywej grzybni, inne rozwijają się tylko w podłożu [Sobieralski i in., 2007].

Dotychczas nie opracowano skutecznej metody zwalczania *Trichoderma spp.* w uprawie grzybów, a stosowane środki chemiczne są małoefektywne [Sobieralski i in., 2012].

Jednym ze sposobów walki z niepożądanymi mikroorganizmami jest wykorzystanie przeciwdrobnoustrojowych właściwości innych mikroorganizmów. W niniejszej pracy podjęto próbę wykazania fungistatycznego oddziaływania niektórych szczepów bakterii z gatunków *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus macerans* na wybrane patogenne gatunki *Trichoderma spp.* i na samego bocznika ostrygowatego celem wyboru optymalnego biologicznego czynnika kontroli. Ponadto w tym kierunku przebadano także biofungicyd Serenade Max na bazie *Bacillus subtilis*. Wybór wyżej wymienionych gatunków bakterii, jako naturalnych czynników hamujących rozwój badanych pleśni, wynikał z wcześniejszych doniesień naukowych, które wskazały, że mikroorganizmy te, wskutek produkcji antybiotyków, biosurfaktantów, enzymów i bakteriocyn, skutecznie ograniczają wzrost wielu grzybowych patogenów roślinnych, między innymi z rodzajów: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* i *Sclerotinia* [Moita i in., 2005; Ghai i in., 2007; Li i in., 2009; Seddon i in., 2007; Todorova i Kozhuharova, 2010; Radzhabov i Davranov, 2010]. Brak jest jednak informacji o szerszym zakresie oddziaływania tych mikroorganizmów, co pozwoliłoby ocenić ich praktyczną przydatność do biologicznej kontroli w uprawie bocznika.

Material i metody

W badaniach właściwości fungistatycznych zastosowano następujące szczepy bakterii testowych: *Bacillus subtilis* PCM 2021, *Brevibacillus brevis* PCM 2020, *Paenibacillus alvei* PCM 481 oraz *Paenibacillus macerans* PCM 1399, a także preparat handlowy Serenade Max. Wszystkie szczepy pochodziły z kolekcji Katedry Przyrodniczych Podstaw Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Zostały one przygotowane z zachowaniem następujących warunków hodowli:

- podłoże: bulion odżywczy,
- temperatura: 30°C,
- czas: 48 godzin.

Jako organizmy wskaźnikowe wykorzystano: *Trichoderma aggressivum f. europeanum* T 14/2, *Trichoderma aggressivum f. europeanum* T 14/12, *Trichoderma pleuroticola* M 142, *Trichoderma pleuroticola* T 4, *Trichoderma pleurotum* E 136, *Trichoderma pleurotum* T 127 oraz *Pleurotus ostreatus* K 22. Szczepy pochodziły z kolekcji Katedry Przyrodniczych Podstaw Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Grzyby przygotowano zgodnie z zachowaniem następujących warunków hodowli:

- podłoże: agar na brzeczce,
- temperatura: 24°C,
- czas: 14 dni.

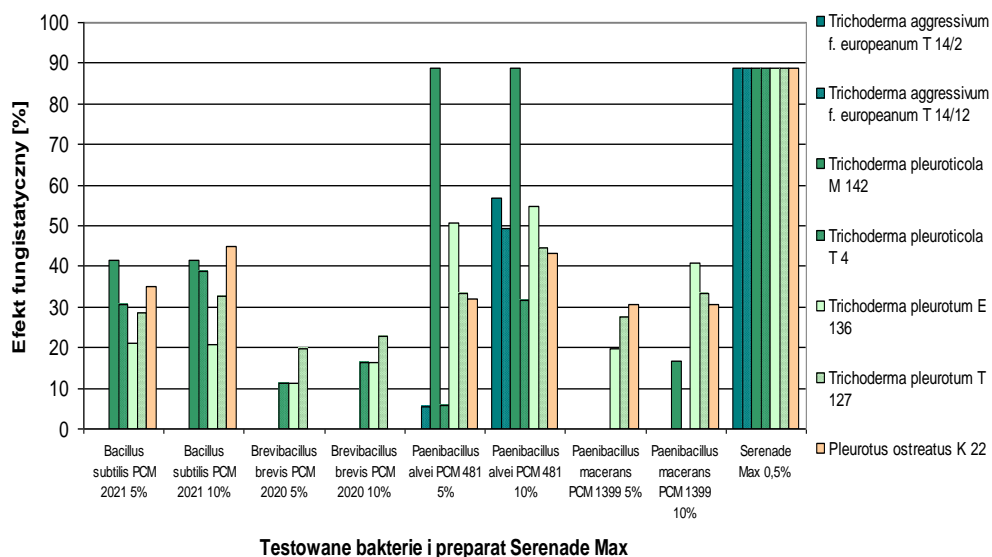
Badanie właściwości fungistatycznych bakterii szczepów testowych i biologicznego preparatu handlowego zostało przeprowadzone metodą płytkową na podłożu z pożywki pszennej. Do upłynnionej pożywki dodawano hodowle bakterii w stężeniach 5 i 10%, a w przypadku preparatu Serenade Max w stężeniu 0,5% (najniższa dawka efektywna zgodnie z zaleceniem producenta). Następnie wylewano je na płytki Petriego o średnicy 9 cm w dwóch powtórzeniach. Po zestaleniu pożywki na centralnej części każdej płytki umieszczano krążek wyrosniętej kultury grzyba szczepu wskaźnikowego o średnicy 1 cm. Jednocześnie prowadzono hodowle kontrolne pozbawione dodatku szczepów testowych i biologicznego preparatu handlowego. Następnie w wybranych odstępach czasu dokonywano pomiary średnicy grzybni i wyliczano procentowy efekt hamowania według wzoru przedstawionego poniżej.

$$\text{efekt hamowania wzrostu} = \frac{\text{średnica próby kontrolnej [cm]} - \text{średnica próby badanej [cm]}}{\text{średnica próby kontrolnej [cm]}} * 100\%$$

W przypadku prób zaszczepionych *Trichoderma spp.* pomiary dokonywano codziennie, a w przypadku *Pleurotus ostreatus* codziennie od czwartego dnia po posiewie. Obserwacje przerywano w dniu, w którym grzybnia w próbach kontrolnych osiągała brzeg płytki Petriego, po czym określano ostateczny stopień zahamowania wzrostu.

Wyniki i dyskusja

W pracy określono, w warunkach laboratoryjnych, właściwości fungistatyczne czterech szczepów bakterii testowych (*B. subtilis* PCM 2021, *B. brevis* PCM 2020, *P. alvei* PCM 481, *P. macerans* PCM 1399) wobec wybranych gatunków i szczepów sześciu grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma spp.*, a także wobec jednego szczepu bocznika ostrygowatego. Wyznaczono czynnik o optymalnym działaniu względem *Trichoderma spp.* oraz *P. ostreatus*. Optymalne działanie miało polegać na maksymalizacji efektu hamującego względem patogennych gatunków z rodzaju *Trichoderma* przy możliwie najmniejszym niekorzystnym oddziaływaniu względem bocznika ostrygowatego.



Rys. 1. Analiza porównawcza końcowych efektów fungistatycznych wywoływanych przez badane biologiczne czynniki kontroli względem szczepów grzybów wskaźnikowych

Poczyniona analiza porównawcza uzyskanych wyników (rys. 1) pozwoliła stwierdzić, iż preparat Serenade Max w stężeniu 0,5% wykazał zbyt silne oddziaływanie hamujące względem wszystkich analizowanych grzybów. Duże oddziaływanie hamujące było wskazane w stosunku do *Trichoderma spp.*, jednakże poszukiwano preparatu, który nie wstrzymywałby tak drastycznie rozwoju *P. ostreatus*. Analizując dalej wyniki dotyczące dodatku samych hodowli bakteryjnych do pożywki grzybowej zauważono, iż ich oddziaływanie jest wysoce zróżnicowane. Nie wszystkie szczepy testowe hamowały jednocześnie wzrost wielu grzybów patogennych. Przykładowo *B. subtilis* PCM 2021 wstrzymywał rozwój *T. pleuroticola* M 142, *T. pleuroticola* T 4, *T. pleurotum* E 136 oraz *T. pleurotum* T 127, podczas gdy *P. macerans* PCM 1399 już tylko *T. pleuroticola* M 142, *T. pleurotum* E 136 i *T. pleurotum* T 127. Uzyskane wyniki pozwoliły wnioskować, że najlepszym spośród analizowanych biologicznych czynników kontroli patogenów boczniaka ostrygowatego był izolat *P. alvei* PCM 481. W optymalizacyjnym stężeniu 10% wykazywał on działanie fungistatyczne względem wszystkich patogennych szczepów wskaźnikowych, to jest względem: *T. agr.* f. *europaeum* T 14/2, *T. agr.* f. *europaeum* T 14/12, *T. pleuroticola* M 142, *T. pleuroticola* T 4, *T. pleurotum* E 136 oraz *T. pleurotum* T 127. Ponadto wartości tych efektów hamujących były istotnie wyższe od odpowiadających im efektów uzyskanym przez dodatek innych bakterii. Co prawda *P. alvei* PCM 481 ograniczał także wzrost

P. ostreatus, ale duża siła oddziaływania hamującego względem jego patogenów była czynnikiem decydującym o zakwalifikowaniu tego szczepu testowego jako najlepszego czynnika biologicznej kontroli podczas przeprowadzonych badań.

Wyniki aktywności fungistatycznej poszczególnych szczepów testowych względem *Trichoderma spp.* poddano ostatecznie opracowaniu statystycznemu. Określono istotność wpływu rodzaju organizmu wskaźnikowego, rodzaju organizmu testowego oraz ilości dodatku hodowli bakteryjnej do podłoża grzybowego na uzyskane efekty fungistatyczne. Do oceny siły oddziaływania tych zależności wykorzystano wieloczynnikową analizę wariancji ANOVA. Badając wpływ rodzaju szczepu wskaźnikowego i rodzaju szczepu testowego na uzyskany efekt fungistatyczny stwierdzono interakcję między tymi parametrami. Ponadto zauważono, iż najbardziej efektywnym szczepem testowym był *P. alvei* PCM 481. Stanowiło to statystyczne potwierdzenie jego wyboru na najlepszy spośród badanych izolatów. W dalszej kolejności przeprowadzono analizę wariancji wskazującej na wpływ rodzaju szczepu testowego i wielkości jego dodatku do pożywki grzybowej w stosunku do uzyskanego efektu fungistatycznego. Stwierdzono istotne interakcje między tymi parametrami.

Wnioski

Na podstawie wyników uzyskanych po przeprowadzeniu badań przedstawiono następujące wnioski:

1. Wszystkie testowane szczepy bakterii, to jest: *Bacillus subtilis* PCM 2021, *Brevibacillus brevis* PCM 2020, *Paenibacillus alvei* PCM 481 oraz *Paenibacillus macerans* PCM 1399 wykazywały aktywność fungistatyczną względem grzybów z rodzaju *Trichoderma* takich jak: *Trichoderma aggressivum f. europeum* T 14/2, *Trichoderma aggressivum f. europeum* T 14/12, *Trichoderma pleuroticola* M 142, *pleuroticola* T 4, *Trichoderma pleurotum* E 136 oraz *Trichoderma pleurotum* T 127. Ich oddziaływanie było jednak zróżnicowane i zależne od szczepu testowego i wielkości jego dodatku do hodowli grzybowej, a także szczepu wskaźnikowego.
2. Najbardziej optymalnym biologicznym czynnikiem kontroli z punktu widzenia maksymalizacji efektu fungistatycznego względem *Trichoderma spp.* i minimalizacji niekorzystnego oddziaływania względem *Pleurotus ostreatus* okazał się szczep *Paenibacillus alvei* PCM 481.
3. Testowany preparat Serenade Max nie może być stosowany do ochrony bocznika ostrygowatego przed „zielonymi pleśniami”, ponieważ jego oddziaływanie przy zastosowaniu zgodnie z zaleceniem producenta jest niszczące dla grzybni *Pleurotus ostreatus*.

4. Spośród patogennych szczepów wskaźnikowych najwrażliwszy na dodatek do pożywki bakterii jest szczep *Trichoderma pleuroticola* M 142, natomiast najodporniejszy *Trichoderma aggressivum f. europeanum* T 14/2.

Literatura

1. Abou-Zeid A.M., Altalhi A.D., Abd El-Fattah R.E. Bacterial control of pathogenic fungi isolated from some wild plants in Taif Governorate, Saudi Arabia. *Mycopath*, 2009, 7 (1), 11-20.
2. Chaiharn M., Chunhaleuchanon S., Lumyong S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25, 1919-1928.
3. Ghai S., Sood S.S., Jain R.K. Antagonistic and antimicrobial activities of some bacterial isolates collected from soil samples. *Indian Journal of Microbiology*, 2007, 47, 77-80.
4. Kühne S. Perspektywy i ograniczenia wykorzystania bioinsektycydów w rolnictwie ekologicznym. *Postępy w Ochronie Roślin*, 2008, 48 (4), 1309-1313.
5. Larkin R.P., Fravel D.R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organism for control of fusarium wilt of tomato. *Plant Disease*, 1998, 82 (9), 1022-1028.
6. Li J., Yang Q., Zhao L., Zhang A., Wang Y., Zhao X. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University Science*, 2009, 10 (4), 264-272.
7. Moita C., Feio S., Nunes L., Curto M., Roseiro J. Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, 55, 261-169.
8. Radzhabov U.R., Davranov K. Metabolites of *Bacillus subtilis* SKB 256, growth inhibitors of phytopathogenic fungi. *Chemistry of Natural Compounds*, 2010, 46 (1), 160.
9. Seddon B., Edwards S.G., Markellou E., Malathrakis N.E. Bacterial antagonist-fungal interaction on the plant aerial surface. *Multitrophic interactions in terrestrial systems*, 36th Symposium of the British Ecological Society, 1997, 5-24.
10. Seddon B., McHuhg R.C., Schmitt A., Koch E., Graham N., Wilson M., Eibel P., Stephan D., Dertzakis D., Lasakari I., Tsomlexoglou E., Carvalho S.M., Marschall D., Daggas T., White D., Bouquellah N.H., Woodward S., Paloukidou E., Allan E.J. Disease control with *Bacillus brevis*: update and future prospects. *Modern fungicides and antifungal compounds V*, 15th International Reinhardsbrunn Symposium, 06.05-10.05.2007, 2007, 279-288.

11. Sobieralski K., Siwulski M., Kommon-Żelazowska M., Błaszczuk L., Sas-Golak I., Frużyńska-Józwiak D. Impact of *Trichoderma pleurotum* and *T.pleuroticola* isolates on yielding of *Pleurotus ostreatus* (fr.) Kumm. Journal of Plant Protection Research, 2012, 52 (1), 165-168.
12. Sobieralski K., Siwulski M., Irzykowska L., Sas-Golak I., Grzebielucha I. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* w uprawie pieczarki i boczniaka. Postępy Nauk Rolniczych, 2007, 4, 65-73.
13. Someya N. Biological control of fungal plant diseases using antagonistic bacteria. Journal of General Plant Pathology, 2008, 74, 459-460.
14. Todorova S., Kozhuharova L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. Worlds Journal of Microbiology and Microbiology, 2010, 26, 1207-1216.
15. Tomalak M. Problemy ochrony upraw boczniaka (*Pleurotus spp.*) przed szkodnikami. Postępy w Ochronie Roślin, 2008, 48 (3), 978-98.

CZYSTOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA POWIETRZA W ZAKŁADZIE CIASTKARSKIM I JEGO WPŁYW NA STABILNOŚĆ WYROBÓW KREMOWYCH

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych zakładu ciastkarskiego na stabilność biologiczną wyrobów kremowych przechowywanych w warunkach chłodniczych.

Badania realizowano w 2010 roku (1 etap) i w 2012 (2 etap, po wdrożeniu zaleceń higienicznych). Doświadczenia obejmowały kontrolę mikrobiologiczną powietrza, kremów i ciast. Materiał badawczy stanowiły próby reprezentujące 48 partii masy budyniowej, kremu gotowanego oraz ciast z kremem. Określano: ogólną liczbę tlenowych bakterii mezofilnych, grupę coli, wybrane bakterie chorobotwórcze (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ssp., *Bacillus cereus*) oraz drożdże i pleśnie.

Liczba drobnoustrojów skażających powietrze w 2010 r. kształtowała się w granicach od $4,0 \times 10^1$ do $3,3 \times 10^3$ jtk/m³. Wyniki badań wstępnych (2010) przyczyniły się do podjęcia działań zapobiegawczych, które wpłynęły na poprawę czystości powietrza (max. $6,8 \times 10^2$ jtk/m³).

Ocena wyrobów kremowych wykazała również istotnie wyższą czystość mikrobiologiczną w roku 2012. Ogólna liczba bakterii mezofilnych wahała się w przedziale 10^1 - 10^6 jtk/g (2010) i 10^1 - 10^4 jtk/g (2012). We wszystkich badanych wyrobach nie wykazano obecności pałeczek z rodzaju *Salmonella*, natomiast odnotowano bakterie z grupy coli, *Staphylococcus aureus* oraz *Bacillus cereus*.

Słowa kluczowe: wyroby ciastkarskie, powietrze w pomieszczeniach produkcyjnych, jakość mikrobiologiczna, poziomy zanieczyszczeń

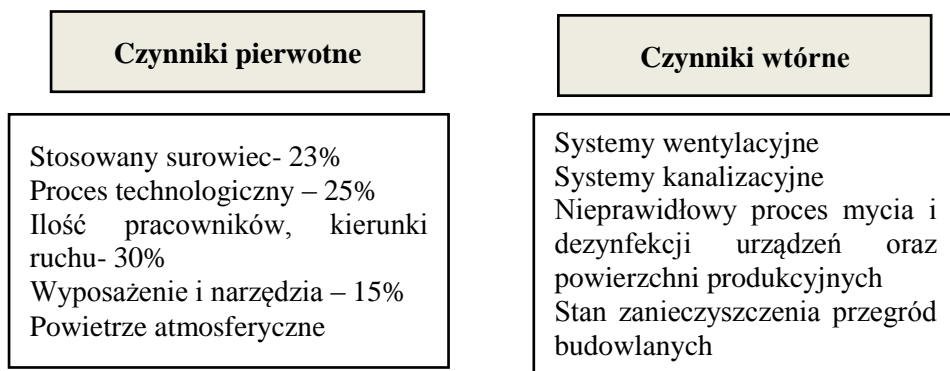
Wprowadzenie

Mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza w zakładach przemysłu spożywczego istotnie wpływa na bezpieczeństwo i jakości żywności, zarówno podczas procesów produkcyjnych, jak też podczas przechowywania [Altunatmaz i in., 2012]. W pomieszczeniach produkcyjnych występuje typowa mikroflora saprofityczna - bakterie, grzyby strzępkowe, drożdże i wirusy. Najczęściej izolowanymi drobnoustrojami

są grzyby strzępkowe z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* i *Mucor*. W halach produkcyjnych występują również bakterie, głównie z rodzaju *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* i inne specyficzne dla stosowanych procesów technologicznych [Poniżnik i Najmrodzka, 2007; Gutarowska, 2009].

Wyroby ciastkarskie, a przede wszystkim ciasta z kremem, ze względu na skład chemiczny (białka, węglowodany, tłuszcz i inne), wysoką aktywność wodną ($a_w > 85$), jak również pH bliskie obojętnemu, stanowią doskonałe środowisko rozwoju mikroorganizmów, w tym także szczepów patogennych [Sirken i in. 2009]. Produkty te są szczególnie narażone na niekorzystny wpływ zanieczyszczeń mikrobiologicznych z powietrza, również ze względu na stosunkowo długi czas ekspozycji oraz dużą powierzchnię kontaktu. Podkreślić należy, że cały proces produkcji prowadzony jest w systemie otwartym, wyroby stykają się z powietrzem na prawie każdym etapie technologicznym m.in. podczas gotowania kremów (metoda tradycyjna), ubijania, napowietrzania, smarowania, przekładania lub napełniania, krojenia, dekorowania, a także w trakcie pakowania, dystrybucji i sprzedaży. Nieodzownym postępowaniem powinien być ciągły monitoring czystości mikrobiologicznej powietrza w zakładach ciastkarskich.

W zależności od rodzaju pomieszczenia skład mikroflory może być różny i zależy głównie od liczby pracowników w strefie produkcji, wpływu środowiska zewnętrznego, zanieczyszczenia surowców, wilgotności i temperatury (rys. 1). Stopień skażenia powietrza zależy również od stanu sanitarnego pomieszczeń produkcyjnych, sprzętów, kanalizacji ściekowej oraz wentylacji. Drobnoustroje występują w powietrzu najczęściej w postaci bioaerozoli [Trzetrzelewska-Lalik i Tuszyński 2010].



Rys. 1. Czynniki wpływające na stan zanieczyszczenia mikrobiologicznego w zakładzie produkcyjnym [Gutarowska, 2011]

Bioaerozole, czyli układy zawierające fazę rozpraszającą (powietrze) oraz fazę rozproszoną w postaci drobnych cząstek cieczy, kurzu pochodzenia roślinnego, zwierzęcego czy też mineralnego, stanowią od 5 do 34% zanieczyszczeń powietrza wewnętrznego. Cząsteczki bioaerozoli mają zazwyczaj średnicę 0,3-100 μm , a komórki bakteryjne od 0,5-2,0 μm , np. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* czy *Arthrobacter*. Średnica wielu zarodników grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium* jest zwykle większa niż 2,5-3,0 μm [Bonetta i in., 2009]. Bakterie stanowią najczęściej od 19 do 26% mikroflory powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych. W powietrzu wewnętrznym może występować kilkadziesiąt różnych gatunków bakterii, wśród nich głównie z rodzaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* i *Streptomyces* [Brickus i in., 1998].

Mikroorganizmy obecne w bioaerozolach są uformowane w skupiska komórek bakterii i grzybów, połączonych cząsteczkami kurzu, a także mikrokropelkami wody. Bioaerozole drobnoziarniste (1,0-5,0 μm) zazwyczaj pozostają w powietrzu, natomiast gruboziarniste osadzając się na powierzchniach tworzą biofilmy, które są odpowiedzialne za kontaminację żywności [Osimani i in., 2013].

W prawodawstwie polskim sposób kontroli czystości mikrobiologicznej powietrza nie jest opracowany w sposób wystarczający i w efekcie stosuje się różne metodyki analityczne [Krogulski, 2006]. Niemniej jednak istnieją w piśmiennictwie liczbowe wartości standardów i wymagań jakościowych, które pomagają w interpretowaniu danych pomiarowych. W przypadku oceny stopnia zanieczyszczenia powietrza w przemyśle spożywczym stosuje się zalecenia Krzysztofika [1992], które dopuszczają ogólną liczbę mikroorganizmów w 1m³ na poziomie 6,0x10² jtk, natomiast wyklucza się obecność drożdży i pleśni [Górny, 2004].

Celem pracy było określenie stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza w zakładzie produkcyjnym (w dwóch okresach badawczych - przed i po modernizacji procesu) oraz jego wpływu na stabilność kremowych wyrobów ciastkarskich wyprodukowanych metodą tradycyjną (bez dodatku środków konserwujących), w czasie chłodniczego przechowywania.

Material i metody

Badania przeprowadzono w warunkach przemysłowych, w 2010 i 2012 roku. Materiałem badawczym było powietrze, masa budyniowa, krem półtłusty i ciasto z kremem. Próbkę powietrza pobierano w 6 strefach zakładu: przygotowalni (P), hali wykończeń (W), chłodni półproduktów (ChP), magazynie wyrobów gotowych (MG) i magazynie ekspedycyjnym (ME) oraz myjni produkcyjnej (MP). Ocenę czystości powietrza przeprowadzano metodą sedymentacyjną Kocha. Oznaczano ogólną liczbę

mezofilnych bakterii tlenowych, a także liczbę drożdży i grzybów pleśniowych [PN-ISO 7218:1998].

W celu oszacowania wpływu jakości powietrza na stabilność mikrobiologiczną badaniem objęto również wyroby kremowe (144 próby) należące do 3 grup: 1) masa budyniowa (M), 2) krem półtłusty (K) i 3) ciasto z kremem (C). Masę budyniową po ugotowaniu dzielono na porcje (5 kg) i studzono (ok. 6 godz.) w pojemnikach ze stali nierdzewnej, a następnie przechowywano w warunkach chłodniczych ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) przez okres od 1 do 3 dni. Krem sporządzano na bazie schłodzonej (20°C) masy budyniowej wymieszanej z tłuszczem. Produkt finalny powstał w wyniku połączenia ciasta biszkoptowego z uprzednio przygotowanym kremem.

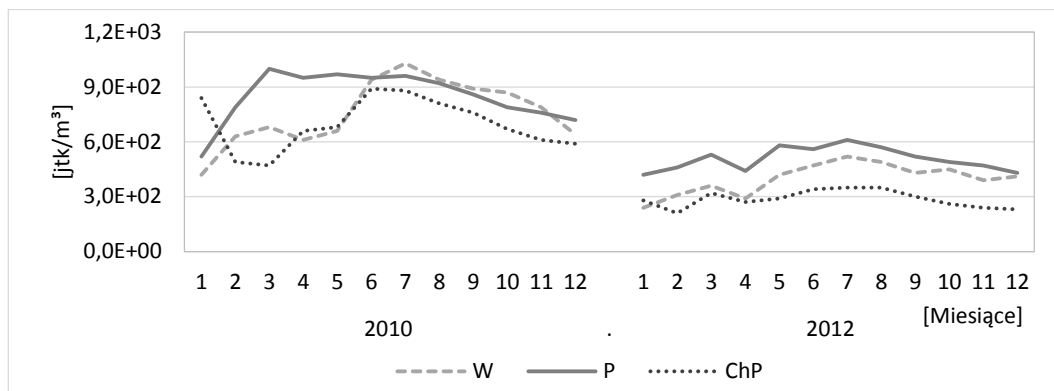
W celu oceny stabilności mikrobiologicznej badanych produktów oznaczono ogólną liczbę tlenowych bakterii mezofilnych [PN-ISO 4833], bakterie z grupy coli [PN-ISO 4832], a także wybrane bakterie chorobotwórcze (*Staphylococcus aureus* [PN-EN ISO 6888-1], *Salmonella* ssp. [PN-EN ISO 6579], *Bacillus cereus* [PN-EN ISO 7932]) oraz drożdże i pleśnie [PN-A-74134-6:1998].

Wyniki i dyskusja

Skażenie powietrza w pomieszczeniach zakładu (2010) było istotnie zróżnicowane w obrębie poszczególnych stref produkcyjnych. Stwierdzono wysoką liczbę drobnoustrojów w myjni produkcyjnej (od 10^3 do $3,3 \times 10^3$ jtk/m³), a najmniejszą w magazynie ekspedycyjnym (od 50 do $4,9 \times 10^2$ jtk/m³). Według Krzysztofika [1992] dopuszczalny stopień mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza nie powinien przekraczać poziomu 6×10^2 jtk/m³. Wyniki opisywanych badań wskazują na znaczne jego skażenie, szczególnie w pomieszczeniach produkcyjnych oraz myjni.

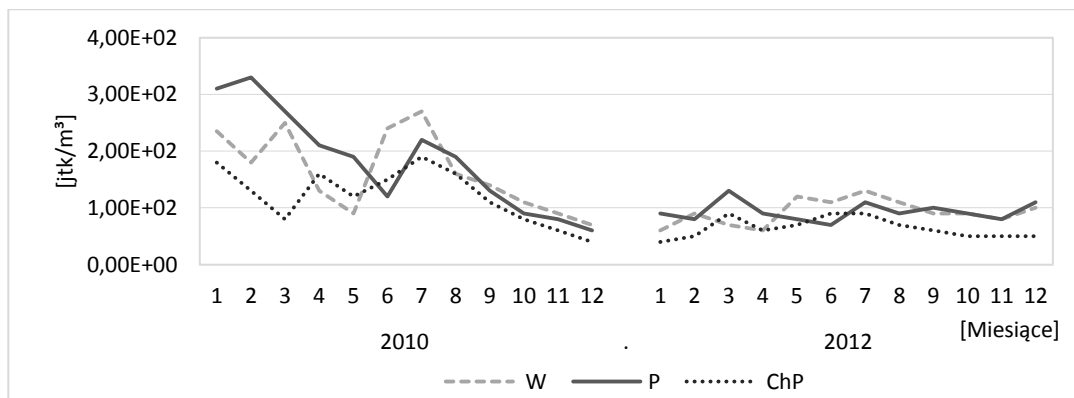
Przeprowadzony monitoring w 2010 r. przyczynił się do podjęcia w zakładzie działań modernizacyjnych i zapobiegawczych, które polegały na wydzieleniu osobnych pomieszczeń dla poszczególnych etapów produkcji, przebudowaniu myjni (zwiększenie kubatury, wydajności wentylacji i zamotowaniu osuszaczy powietrza) oraz wyposażeniu pomieszczeń w lampy UV.

Analizując uzyskane wyniki z okresu 2010 i 2012 (rys. 2) można stwierdzić, że wdrożone zalecenia higieniczne w istotny sposób przyczyniły się do poprawy stanu higienicznego powietrza w obszarze produkcji. Ilość drobnoustrojów w przygotowalni kremów obniżyła się z poziomu 10^3 jtk/m³ (2010) do $6,1 \times 10^2$ jtk/m³ (2012), w hali wykończeń z $10,1 \times 10^3$ jtk/m³ do $5,2 \times 10^2$ jtk/m³, natomiast w chłodni półproduktów z $8,8 \times 10^2$ jtk/m³ do $3,5 \times 10^2$ jtk/m³.



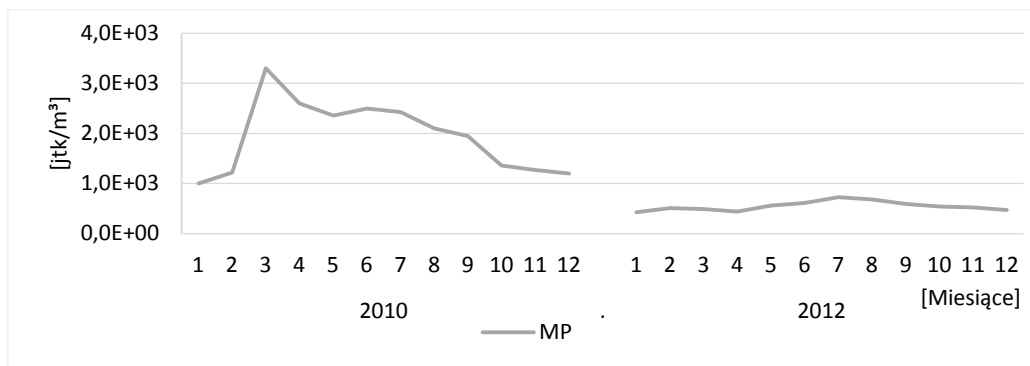
Rys. 2. Zanieczyszczenie powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych: wykańczalnia (W), przygotowalnia (P) i chłodnia półproduktów (ChP)

Jak wynika z przedstawionych danych (rys. 3), w badanych strefach produkcyjnych odnotowano wysoką liczbę pleśni i drożdży, która kształtowała się w granicach od $3,3 \times 10^2$ jtk/m³ (2010) do $1,3 \times 10^2$ jtk/m³ (2012). Wcześniejsze badania Poniżnik i Najmrodzkiej [2007] również wykazały, iż stopień zanieczyszczenia powietrza w ciastkarniach i piekarniach znacznie przekracza dopuszczalne limity stężenia bakterii oraz drożdży i pleśni. Dominującą mikroflorę stanowiły bakterie z rodzaju: *Micrococcus*, *Bacillus* oraz Gram (-) pałeczki, natomiast w przypadku grzybów izolowano: *Penicillium*, *Aspergillus* i *Cladosporium*.



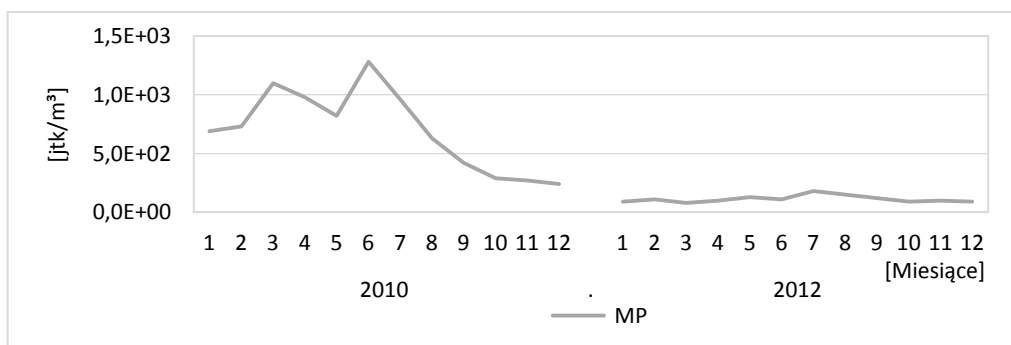
Rys. 3. Drożdże i pleśnie w wybranych pomieszczeniach produkcyjnych: wykańczalnia (W), przygotowalnia (P), chłodnia półproduktów (ChP)

Najliczniejszą mikroflorę w powietrzu (2010) stwierdzono w myjni produkcyjnej (max. $3,3 \times 10^3$ jtk/m³). Po wdrożeniu zabiegów sanitarno-higienicznych zredukowano stopień skażenia mikrobiologicznego powietrza o ponad 80% ($4,3 \times 10^2$ jtk/m³).



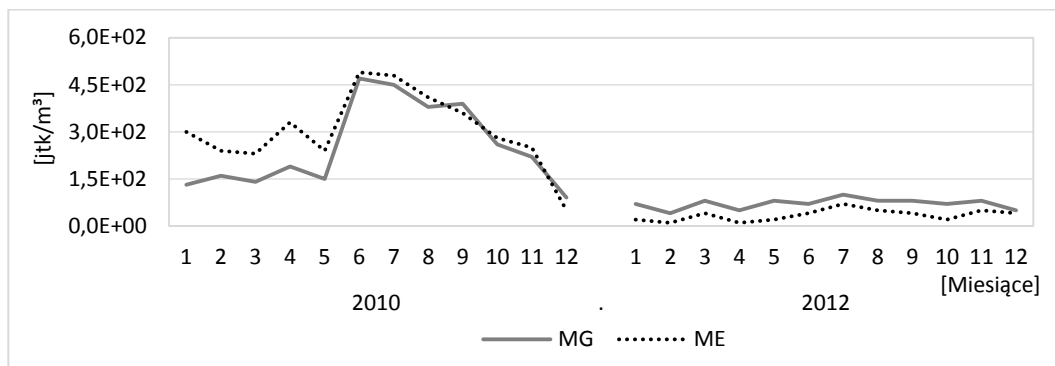
Rys. 4. Zanieczyszczenie powietrza w myjni produkcyjnej (MP)

Jak wynika z danych przedstawionych na rysunkach 4 i 5, poziom bakterii w 2010 roku wynosił od 10^3 do $3,3 \times 10^3$ jtk/m³, a grzybów od $2,4 \times 10^2$ do $1,3 \times 10^3$ jtk/m³. W 2012 odnotowano wyraźny spadek ogólnej liczby drobnoustrojów (od $4,3 \times 10^2$ do $6,8 \times 10^2$ jtk/m³), a także drożdży i pleśni (od 90 do $1,5 \times 10^2$ jtk/m³).



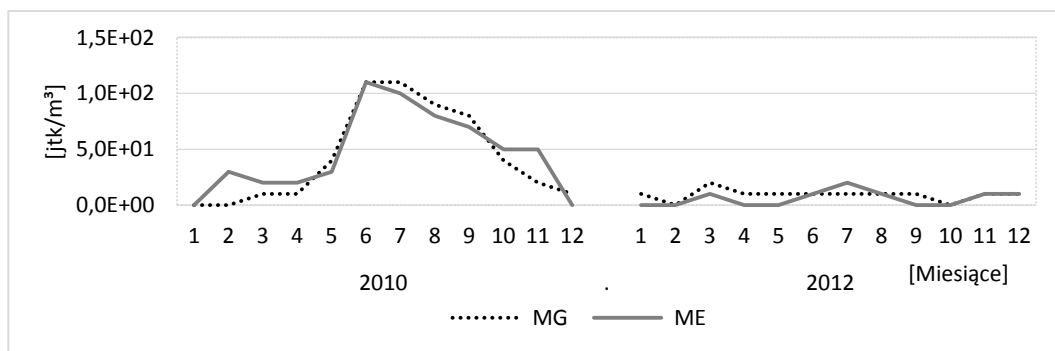
Rys. 5. Drożdże i pleśnie w myjni produkcyjnej (MP)

W magazynie wyrobu gotowego i magazynie ekspedycyjnym (rys. 6 i 7) po zainstalowaniu lamp UV oraz zwiększeniu częstotliwości mycia i dezynfekcji agregatów chłodniczych obniżono liczbę mikroorganizmów z poziomu masymalnego $4,9 \times 10^2$ jtk/m³ (2010) do 10^2 jtk/m³ (2012). W przypadku grzybów, również wskazano istotne zmniejszenie ich liczebności: od $1,1 \times 10^2$ jtk/m³ (2010) do 20 jtk/m³ (2012).



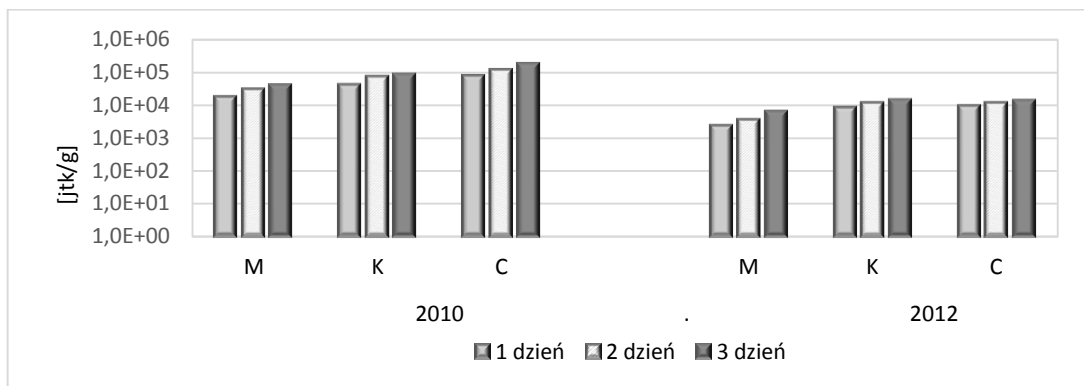
Rys. 6. Zanieczyszczenie powietrza w magazynach: produktu gotowego (MG) i ekspedycji (ME)

Istotnym problemem w zakładach ciastkarskich są drożdże i pleśnie, które stwierdzano w powietrzu we wszystkich badanych pomieszczeniach. Drobnoustroje te stanowią duże zagrożenie mikrobiologiczne, ze względu na częstotliwość występowania, oporność na niektóre środki dezynfekujące oraz trudności związane z ustaleniem źródła ich pochodzenia [Gutarowska, 2009].



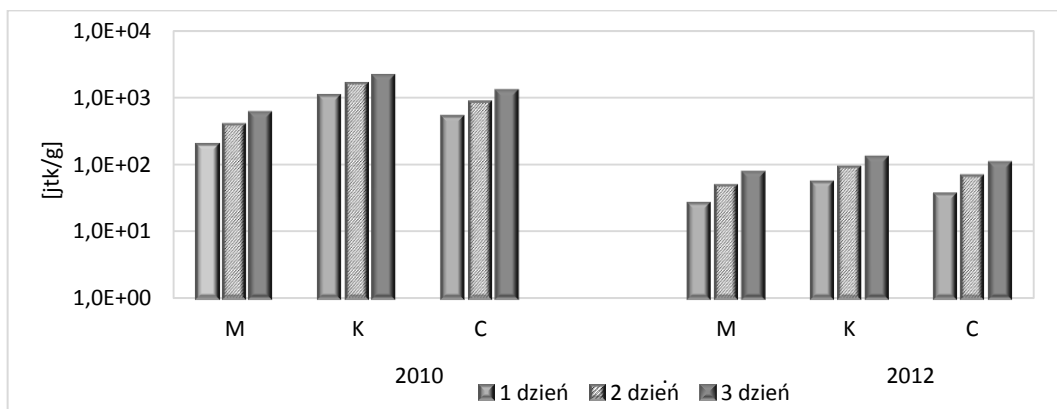
Rys. 7. Drożdże i pleśnie w magazynach: produktu gotowego (MG) i ekspedycji (ME)

Zarówno zanieczyszczenia mikrobiologiczne powietrza, jak również czas przechowywania ocenianych wyrobów kremowych miały wpływ ich na stabilność mikrobiologiczną. Ogólna liczba bakterii mezofilnych wahała się w przedziale od 10^1 - 10^6 jtk/g (2010) do 10^1 - 10^4 jtk/g (2012). Przyjmuje się, że stan produktów ciastkarskich jest zadawalający, jeśli liczba bakterii mezofilnych mieści się w granicy 10^4 - 10^5 jtk/g [WHO, 1994; Stewart i in., 2003]. Według innych źródeł za akceptowalną wartość progową tych bakterii przyjmuje się poziom 10^6 jtk/g [Siriken i in., 2009; Saddozai i in., 2009]. W odniesieniu do tych wymagań, zanieczyszczenie produktów bakteriami mezofilnymi było na zadawalającym poziomie w całym okresie badawczym.



Rys. 8. Obecność tlenowych bakterii mezofilnych w badanych produktach: masa budyniowa (M), krem półtłusty (K), ciasto z kremem (C)

Ocena produktów pod względem grzybów wykazała, że ich liczba mieściła się w zakresie od <10 do $3,9 \times 10^3$ jtk/g (2010) i od <10 do $2,7 \times 10^2$ jtk/g (2012). Dzięki wdrożonym zaleceniom higienicznym ilość drożdży i pleśni została istotnie zredukowana w ocenianych wyrobach kremowych. W 2010 roku, w około 35% badanych prób poziom ich nieznacznie przekroczył 10^3 jtk/g, z czego najwięcej grzybów stwierdzono w kremie po 2 i 3 dniu przechowywania. Wprowadzone działania podwyższające standardy higieny produkcji przyczyniły się do istotnego zmniejszenia liczby grzybów - tylko w około 26% prób w ilości 10^2 jtk/g.



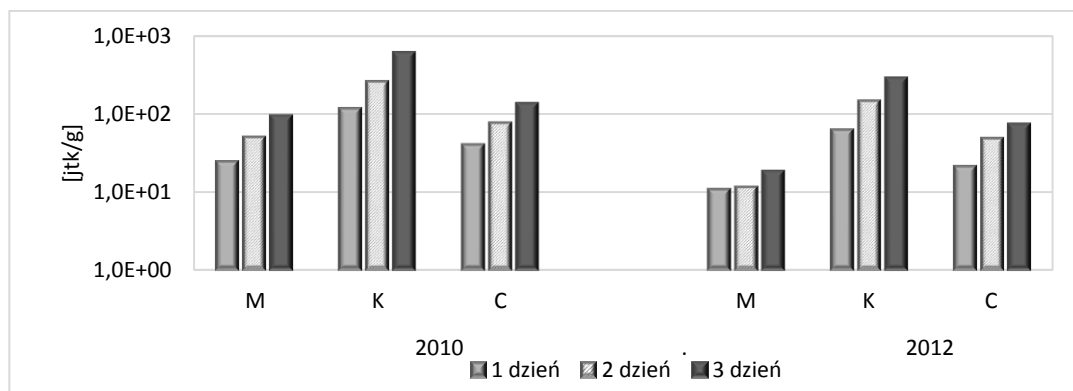
Rys. 9. Liczba drożdży i pleśni w badanych produktach: masa budyniowa (M), krem półtłusty (K), ciasto z kremem (C)

W polskich wymaganiach jakościowych nie określa się granicznej liczby grzybów w artykułach ciastkarskich. Wytyczne niemieckie wskazują, że ogólna liczba drożdży i pleśni w wyrobach piekarskich nie powinna być wyższa niż 10^3 jtk/g

[Leitenberg i Röcken, 1998]. Według innych źródeł poziom zanieczyszczenia produktów piekarskich tą grupą drobnoustrojów zawiera się w granicach 10^1 - 10^4 jtk/g [Dale, 2003]. Oznacza to, że wszystkie badane próby spełniły powyższe wymagania.

Zanieczyszczenia produktów ciastkarskich zarodnikami pleśni najczęściej pochodzą z surowców (zboża, mąka), jak również z powietrza i z powierzchni urządzeń produkcyjnych [Marin i in., 2002; Corneta i in., 2011].

Skażenie badanych prób bakteriami z grupy coli w 2010 roku było na stosunkowo wysokim poziomie (rys.10). W ponad 38 z nich (na 72 badanych - 52,8%) ilość tych bakterii wynosiła $\geq 10^2$ jtk/g, a w 2 próbach kremu stężenie ich było na poziomie $>10^3$ jtk/g. W 2012 roku odnotowano wyraźny spadek bakterii z grupy coli we wszystkich badanych grupach wyrobów kremowych. Tylko w 13 próbach (18%) stopień zanieczyszczenia pałeczkami coli kształtował się na poziomie $\geq 10^2$ jtk/g.

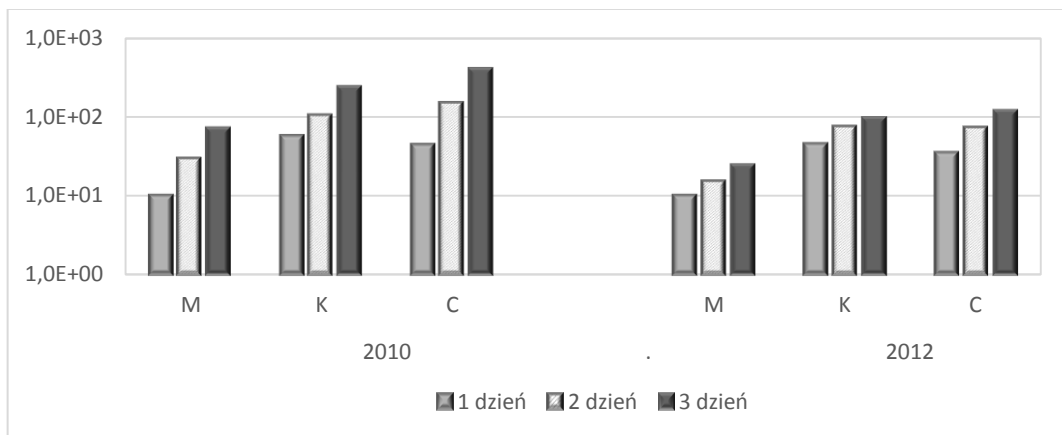


Rys. 10. Bakterie z grupy coli w badanych produktach: masa budyniowa (M), krem półtłusty (K), ciasto z kremem (C)

Warto w tym miejscu zaznaczyć, że prawo wspólnotowe [Rozporządzenie Komisji WE nr 2073/2005 wraz z nowelizacją nr 1441/2073] nie określa limitu zanieczyszczeń mikrobiologicznych dla produktów ciastkarskich. W Nowej Zelandii dopuszczalna zawartość bakterii z grupy coli wynosi 10^2 jtk/g [New Zealand Food Safety Authority, 2007]. Podobne wymagania zapisane zostały w wytycznych opracowanych dla gotowej żywności przez Center for Food Safety [2007].

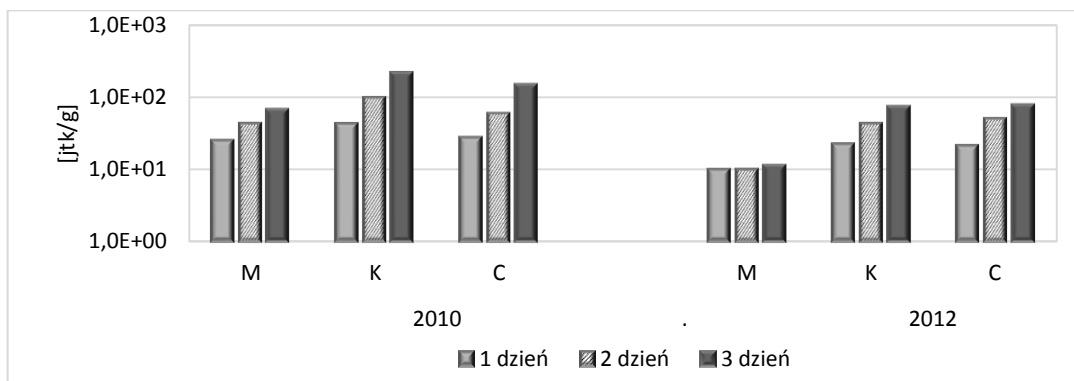
Liczba bakterii *Bacillus cereus* w ponad 42% (2010) i 20,8% (2012) analizowanych prób kształtowała się w granicach $\geq 10^2$ jtk/g. Stosunkowo wysoką ich zawartość wykazano w trzech próbach ciasta z kremem w 2010 roku ($4,5 \times 10^2$ do $8,2 \times 10^2$ jtk/g). Porównując wyniki przeprowadzonych badań z wytycznymi opracowanymi przez Center of Food Safety (CFS) oraz German Society for Hygiene and Microbiology [Leitenberg i Röcken, 1998], które dopuszczają zanieczyszczenie tymi bakteriami

na poziomie od 10^3 do $<10^4$ jtk/g, należy stwierdzić, że stan mikrobiologiczny badanych próbek był zadawalający.



Rys. 11. *Bacillus cereus* w badanych produktach: masa budyniowa (M), krem półtłusty (K), ciasto z kremem (C)

Na rys. 12 przedstawiono zanieczyszczenie badanych próbek koagulazododatnimi bakteriami z rodzaju *Staphylococcus*. Obecność gronkowców koagulazododatnich, w tym *Staphylococcus aureus* w liczbie $\geq 10^2$ jtk/g stwierdzono w 17 próbach (2010) i tylko 1 próbie ciasta z kremem po 3 dniu przechowywania w 2012 r. Odnosząc uzyskane w tym względzie wyniki do wytycznych Center for Food Safety [2007], które dopuszczają obecność gronkowców w żywności, w liczbie do 10^2 jtk/g, należy wskazać, że w 11% (na 144) badanych próbach nastąpiło przekroczenie ustalonego kryterium.



Rys. 12. *Staphylococcus* koagulazododatnie w badanych produktach: masa budyniowa (M), krem półtłusty (K), ciasto z kremem (C)

Należy zaznaczyć, że mimo wysokiego zanieczyszczenia przez bakterie, w żadnej z badanych prób nie stwierdzono obecności gramujemnych pałeczek z rodzaju *Salmonella*. Obecność tych chorobotwórczych mikroorganizmów w żywności jest niedopuszczalna.

Wnioski

1. Stan ocenianego powietrza w 2010 roku był niezadawalający. W większości hal technologicznych odnotowano przekroczenie zalecanych wskaźników mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza bakteriami (powyżej 6×10^2 jtk/m³), a także koloniami drożdży i pleśni.
2. Wdrożone zalecenia sanitarno-higieniczne przyczyniły się do zwiększenia czystości mikrobiologicznej powietrza w 2012 roku. We wszystkich obszarach produkcyjnych ustabilizowano stężenie bakterii na zadawalającym poziomie (poniżej 6×10^2 jtk/m³), jednak nie udało się całkowicie wyeliminować z powietrza drożdży i pleśni.
3. Jakość mikrobiologiczna powietrza, jak również czas przechowywania wyrobów kremowych w warunkach chłodniczych w istotnym stopniu determinują stabilność mikrobiologiczną wyrobów kremowych.

Literatura

1. Altunatmaz S.S., Issa G., Aydin A. Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 1436-1443.
2. Brickus L.S.R., Siqueira L.F.G., Aquino Neto F.R., Cardoso J.N. Occurrence of airborne bacteria and fungi in bayside offices in Rio de Janeiro, Brazil. *Indoor Built Environment*, 1998, 7(5-6), 270-275.
3. Bonetta SA., Bonetta SI., Mosso S., Sampo S., Carraro E. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system, 2009. *Environ Monit Assess*, 2010, 161, 473-83.
4. Centre for Food Safety (CFS). Wytyczne mikrobiologiczne dla żywności gotowej do spożycia. Risk Assessment Section Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department, Hong Kong 2007.
5. Corneta C.P., Ciuca M., Voaides C, Gagi V., Pop A. Incidence of fungal contamination in a Romanian bakery: a molecular approach. *Romanian Biotechnological Letters*, 2011, 16(1), 5863-5871.
6. Dale H. Microbial threats in the bakery. *International Food Hygiene*, 2003, 14(1), 9-10.

7. Gutarowska B. Mikroorganizmy w powietrzu, W: Mikrobiologia Techniczna, tom 1, pod red. Libudysz Z., Kowal K., Żakowska Z., Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009, 233-239.
8. Gutarowska B. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza w zakładach mleczarskich. Przegląd Mleczarski, 2011, 4 (www.forummleczarskie.pl)
9. Górny R. Biologiczne czynniki szkodliwe: normy, zalecenia i propozycje wartości dopuszczalnych. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, 2004, 3(41), 17-39.
10. Krogulski A. Metody oznaczania ogólnej liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym i wewnątrz pomieszczeń. Roczniki PZH, 2006, 57(1), 1-7.
11. Krzysztofik B. Mikrobiologia powietrza, Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1992.
12. Leitenberger E., Röken W. HACCP in small bakeries. Food Control, 1998, 9(2-3), 151-156.
13. Marin S., Guynot M.E., Neira P., Bernado M., Sanchis V., Ramos A.J. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acidpreservatives in the control of mould growth on bakery products. International Journal of Food Microbiology, 2002, 79, 203-211.
14. New Zealand Food Safety Authority. Microbiological Quality of Bakery Products, 2007, www.nzfsa.govt.nz.
15. Osimani A., Aquilqnti L., Tavoletti S., Clementi F. Microbiological monitoring of air quality in a university canteen: on 11-year report. Environ Monit Assess, 2013, 185, 4765-4765.
16. Poniżnik I., Najmrodzka A. Mikrobiologiczna analiza powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych wybranych zakładów przemysłowych. Problemy Higieny i Epidemiologii, 2007, 88, 56-66.
17. PN-ISO 7218, 1998. Oznaczanie mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza metodą sedymentacyjną.
18. PN-ISO 4833, 2004. Mikrobiologia. Ogólne zasady oznaczania liczby drobnoustrojów. Metoda płytkowa 30°C.
19. PN-EN ISO 7932, 2005. Oznaczanie przypuszczalnych *Bacillus cereus*.
20. PN-EN ISO 6888-1, 2001. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków. Część 1: Metoda z zastosowaniem pożywki Baird-Parkera.
21. PN-ISO 6579, 1998. Ogólne zasady wykrywania pałeczek *Salmonella*.
22. PN-ISO 7954, 1999. Ogólne zasady oznaczania drożdży i pleśni – Metoda płytkowa w 25°C.

23. Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
24. Saddozai A.A., Khalil S. Microbiological status of bakery products available in Islamabad. Pakistan J. Agric. Res. 2009, 22, 1-2.
25. Siriken B., Cadirci O., Inat G., Pamuk S. Microbiological Examination of Meatball, Cream Cake and Turkish Delight (Lokum). Journal of Animals and Veterinary Advances, 2009, 8(10), 2049-2054.
26. Stewart C. M., Cole M., Schaffer D.W. Managing the Risk of Staphylococcal Food Poisoning from Cream-Filled Baked Goods To Meet a Food Safety Objective. Journal of Food Protection, 2003, 66(7), 1310-1325.
27. Trzetrzelewska-Lalik E., Tuszyński T. Bezpieczeństwo mikrobiologiczne wyrobów ciastkarskich – cz. II., Cukiernictwo Piekarstwo, 2010, 11, 58-60.
28. Trzetrzelewska-Lalik E., Tuszyński T. Stabilność mikrobiologiczna gotowanych kremów ciastkarskich, w: Żywność Projektowana część II, pod red. Walczycka M., Jaworska G., Duda-Chodak A., Staruch L., Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2011, 232-243.
29. WHO, Guideline value for food and drinking water, World Health Organization, Geneva 1994.

Źródło finansowania DS3700/WTŻ/2013-2014

MONITORING JAKOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH DLA DZIECI

Streszczenie

Celem pracy była izolacja oraz identyfikacja drobnoustrojów z produktów spożywczych dla niemowląt i małych dzieci. Badaniu poddano 3 rodzaje artykułów: deserki, obiadki oraz soczki produkowane przez pięć wiodących na rynku europejskim przedsiębiorstw. Zbadano wpływ czasu i temperatury przechowywania na rozwój mikroorganizmów. Porównano również aktywność przeciwutleniającą pomiędzy badanymi produktami. Z analizowanych artykułów wyizolowano gramdodatnie ziarniaki, *Bacillus* oraz bakterie fermentacji mlekowej, a także pleśnie z rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* oraz *Alternaria*. Nie wykazano obecności bakterii *Escherichia coli* oraz drożdży. Ogólną liczbę bakterii oraz grzybów strzępkowych oceniono na poziomie bezpiecznym. Najliczniejszą mikroflorę oznaczono w artykułach z upraw ekologicznych. Deserki były najlepszym środowiskiem do rozwoju bakterii i pleśni. Potwierdzono niekorzystny wpływ długiego czasu oraz wysokiej temperatury przechowywania na czystość bakteryjną produktów. Najwyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się deserki, szczególnie te z upraw ekologicznych. Nie istnieją więc obawy przed podawaniem tego typu żywności niemowlakom i małym dzieciom pod warunkiem przestrzegania okresu zdolności do spożycia.

Wstęp

Sposób odżywiania ma bezpośredni wpływ na stan zdrowia. Szczególną uwagę powinno przywiązywać się do żywności podawanej małym dzieciom, aby zapewnić im optymalny rozwój psychosomatyczny oraz zmniejszyć ryzyko wystąpienia infekcji i chorób dietozależnych. Stworzono specjalistyczne modele bezpiecznego żywienia dla najmłodszych, oparte na badaniach w obszarze nauk żywieniowych i medycznych. Model taki uwzględnia częstość spożywania posiłków, ich organizację, jakość zdrowotną i wartość odżywczą podawanych pokarmów, właściwy dobór produktów, a także nawyki żywieniowe [Gawęcki i Hryniewicz, 2000; Grzymisławski i Gawęcki, 2010; Francis, 2010].

Artykuły żywnościowe dla niemowląt (noworodki i dzieci do 12 miesiąca) i małych dzieci (od 1 do 3 roku życia) należą do tzw. środków spożywczych specjalnego

przeznaczenia żywieniowego. Takie produkty mają specjalny skład i specyficzny proces wytwórczy [Rozporządzenie Ministra Zdrowia, 2010b; Dyrektywa Komisji WE, 2006].

W żywieniu dzieci zaleca się wykorzystywanie żywności mało przetworzonej, naturalnej oraz wysokiej jakości. Produkcja oparta jest na stosowaniu surowców pochodzących z kontrolowanych upraw i hodowli, które spełniają rygorystyczne wymagania odnośnie składu określającego ich wartość odżywczą oraz jakość zdrowotną. W recepturach artykułów dla dzieci wykorzystanie substancji dodatkowych i pomocniczych (sól, sacharoza czy tłuszcze nasycone) ogranicza się do minimum. Coraz powszechniejsze staje się wzbogacanie żywności, w celu poprawy profilu zdrowotnego gotowego produktu. W przetworach mlecznych zwiększa się zawartość wapnia i witaminy D, a także kontroluje ilość tłuszczu mlecznego czy laktozy. Soki oraz przeciery owocowe suplementuje się witaminą C, a do produktów zbożowych dodaje sole wapnia i żelaza oraz witaminy z grupy B. Odpowiednie połączenie takich produktów w posiłki w codziennej diecie dziecka pokrywa zapotrzebowanie na energię oraz składniki odżywcze [Weker i Więch, 2008].

Udowodniono, że związki antyoksydacyjne (polifenole oraz niektóre witaminy), zawarte w surowcach roślinnych wykazują pozytywny wpływ na organizm człowieka. Producenci żywności starają się, aby ich produkty charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwutleniającą dodając do żywności witaminy np. A, E oraz C. Żywność uzupełniana jest w składniki, które zostały utracone podczas procesu produkcyjnego lub wzbogacana w substancje, które naturalnie w niej nie występują. Witaminy należą do składników niezwykle labilnych, rozkładających się pod wpływem wysokiej temperatury podczas pasteryzacji bądź sterylizacji. Dlatego też dodatek podczas produkcji witamin jest bardzo często stosowanym zabiegiem. Suplementacja musi odbywać się zgodnie z wytycznymi Ministra Zdrowia, np. dodatki muszą mieć określoną formę chemiczną [Rozporządzenie Ministra Zdrowia, 2010a; Pisulewski i Pysz, 2008].

Ocena jakości zdrowotnej artykułów dla niemowląt oraz małych dzieci opiera się na badaniach polegających na oznaczeniu poziomu zanieczyszczeń m. in. pestycydami, azotanami i azotynami oraz metalami ciężkimi (np. Cd, Hg, Pb). Analizowana jest zawartość izomerów trans kwasów tłuszczowych i akrylamidu. Oznacza się szczegółowo czystość mikrobiologiczną [Książyk i Weker, 2007; Weker i Więch, 2009; Weker, 2011]. Wymagania dotyczące bezpieczeństwa mikrobiologicznego są regulowane prawnie przez Ministra Zdrowia oraz Wspólnotę Europejską [Rozporządzenie Ministra Zdrowia, 2010b; Ustawa, 2006].

Celem niniejszej pracy była izolacja i identyfikacja metodami klasycznymi, potencjalnych mikroorganizmów (bakterii, drożdży i pleśni) z gotowych produktów dla niemowląt i małych dzieci, a także zbadanie wpływu czasu i temperatury

przechowywania na stan mikrobiologiczny produktów. Zbadano także ich właściwości przeciwtleniające.

Materiały i metodyka

Materiałem badawczym były produkty specjalnego przeznaczenia żywieniowego dla niemowląt i małych dzieci (desery, obiady oraz soki). Ich producenci należą do wiodących na rynku europejskim (5 przedsiębiorstw). Produkty wybrano na podstawie obserwacji najbliższego środowiska (artykuły najbardziej popularne i najchętniej wybierane przez klientów). Desery dla małych dzieci, w zależności od producenta, zawierały:

deser 1: jabłka 62%, morele 19%, banany 14%, sok z winogron i cytrynowy oraz wit. C,

deser 2: jabłka 50%, banany 22,4%, sok jabłkowy 12%, brzoskwinie 10%, mąkę ryżową, wodę oraz wit. C,

deser 3: jabłka 46%, banany 18%, brzoskwinie 18%, sok jabłkowy z soku zagęszczonego, grysik ryżowy i wit. C,

deser 4 ekologiczny zawierał: jabłka 40%, banany 20%, brzoskwinie 15%, wodę, sok winogronowy, mąkę ryżową, kwas askorbinowy i kwas cytrynowy.

Obiady dla małych dzieci, w zależności od producenta, zawierały:

obiadek 1: marchew, wodę, ziemniaki, sok jabłkowy 8,1%, mięso z indyka 8%, kukurydzę, skrobię kukurydzianą, masło z mleka, jarzyny ogółem 58%,

obiadek 2: marchew 35%, wodę, ziemniaki 16%, mięso z indyka (bez wywaru) 10%, groszek 3%, skrobię pszenną bezglutenową, por 2%, olej rzepakowy,

obiadek 3: warzywa 41% (marchew, ziemniaki, pasternak), wodę, gotowany ryż, mięso z indyka 8%, sok winogronowy, cebulę, olej rzepakowy 1,2%.

Natomiast soki, w zależności od producenta, zawierały:

soczek 1: sok z jabłek (z zagęszczonego) 41%, wodę, jabłka 19%, marchew 10%, wit. C,

soczek 2: wodę, przeciery 41% z marchwi mazurskiej, malin i jabłek, syrop glukozowo-fruktozowy, kwas cytrynowy, wit. C oraz aromat.

Analizowane produkty (gęste musy owocowe, przeciery warzywne, mętne soki) rozcieńczono w sterylnej soli fizjologicznej przed posiewami (10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3}) dla każdego produktu. Do izolacji drobnoustrojów wykorzystano agar odżywczy z glukozą dla bakterii, agar brzeczkowy i agar DRBC (z dichloranem, czerwienią bengalską i chloramfenikolem; Merck) dla drożdży i pleśni, podłoże Eijkmana (LPB) dla *E. coli*, podłoże MRS (de Man, Rogosa i Sharpe; Biocorp) i Blickfeldta dla bakterii mlekowych i mlekowych typu kwaszącego, oraz podłoże dla bakterii octowych.

Posiewy na sterylne szalki Petriego z odpowiednimi podłożami oraz podłoże płynne LPB wykonano w warunkach jałowych pod komorą z laminarnym przepływem powietrza (Lamil 13). Wysiewano po 1 cm^3 z każdego rozcieńczenia. Płytki z agarem

odżywczym inkubowano w 32°C przez 24 h, a szalki z podłożem dla bakterii octowych, MRS i w 32°C przez 5 dni. Płytki z agarem brzezkowym i DRBC inkubowano w 28°C przez 48 h. Z kolei próbki z podłożem LPB w 37°C przez 48 h. Wszystkie posiewy zostały wykonane bezpośrednio po otwarciu i po przechowywaniu przez 48 h w 4°C i 20°C, a także po 7 dniach w 4°C i 20°C.

Po inkubacji policzono kolonie za pomocą licznika (LKB 2002, Pol-Eko Aparatura). W celu pozyskania czystych kultur do dalszych badań, wybrane kolonie bakterii przeszczepiono na skosy z agarem odżywczym (32°C), a pleśnie na skosy z agarem brzezkowym (28°C) i inkubowano przez 24 h. Skosy przechowywano w temp. 4°C i przeszczepiano raz w miesiącu.

Czyste kultury bakterii analizowano makro- i mikroskopowo (barwienie Grama) oraz w teście na katalazę. W celu wyznaczenia obecności bakterii z grupy *coli* oraz kwaszących typu mlekowego, obserwowano zmiany odpowiednio, na podłożu LPB i Blickfeldta.

Pleśnie analizowano makro- i mikroskopowo w preparatach przyżyciowych. Obserwacje wykonano przy pomocy mikroskopu Nikon (Eclipse), a dokumentację fotograficzną kamerą cyfrową Moticam 200 z programem Tomic Live Imaging.

Do oznaczenia aktywności przeciwutleniającej zastosowano metodę z użyciem rodnika ABTS (Sigma). Rodnik uzyskano w wyniku reakcji pomiędzy 7 mM solą dwuamonową kwasu 2,2'-azyno-benzotiazolowego i 2,45 mM pirosiarczanu potasu. Rodnik stabilizowano w 22-25°C przez 18 h, bez dostępu światła. Roztwór rozcieńczono buforem fosforanowym (PBS) tak, aby jego absorbancja przy długości fali 734 nm wyniosła $A = 0,70 \pm 0,02$ (ABTS_{0,7}). W drugim etapie wyznaczono krzywą standardową Troloxu (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy; Aldrich) dla ABTS. W tym celu wykorzystano 1 mM roztwór Troloxu w PBS (Sigma) i wykonano szereg rozcieńczeń: 0; 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10 [mg/100 cm³]. Pomiar próbek polegał na ich rozcieńczeniu (10-krotnym) i odwirowaniu. Do kuwet odmierzone po 1 cm³ ABTS_{0,7} i dokładnie, co 30 sekund, do każdej z nich dodano 100 µl badanych próbek. Absorbancję mierzono dokładnie w 6 minucie. Aktywność przeciwutleniającą wyznaczono wykorzystując krzywą kalibracyjną dla syntetycznej witaminy E (Troloxu) i wyrażono w mg Troloxu/100 cm³.

Doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Określenia istotności statystycznych między wartościami średnimi wykonano tylko dla aktywności antyoksydacyjnej, przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukey'a. Rozkład normalności wykonano testem Kołgomorowa-Smirnova (InStat3).

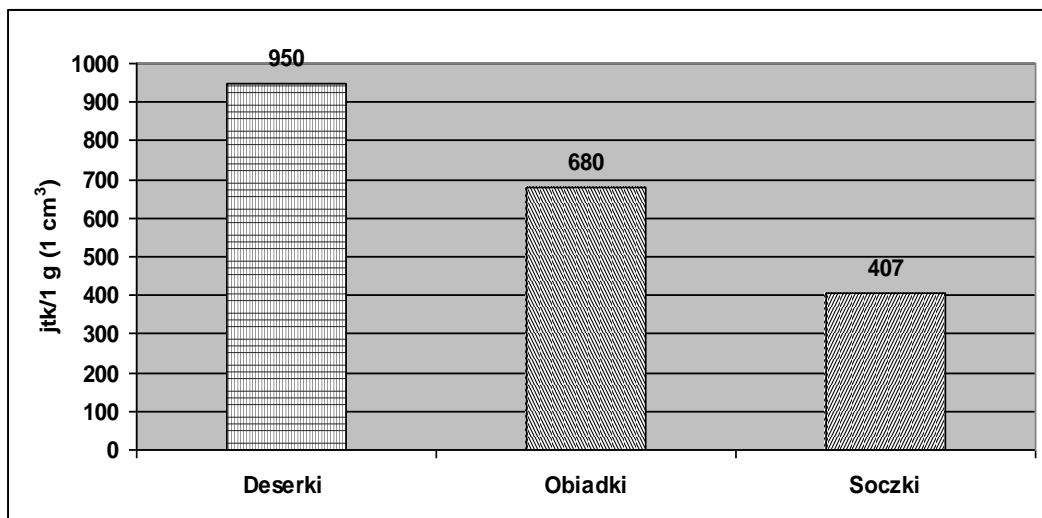
Wyniki i dyskusja

Analiza produktów żywnościowych specjalnego przeznaczenia żywieniowego obejmowała 9 produktów (4 deserki, 3 obiadki i 2 soki). W tabeli 1 przedstawiono przykładowe ilości bakterii i pleśni w jtk/1g dla deserku 1 w zależności od warunków przechowywania.

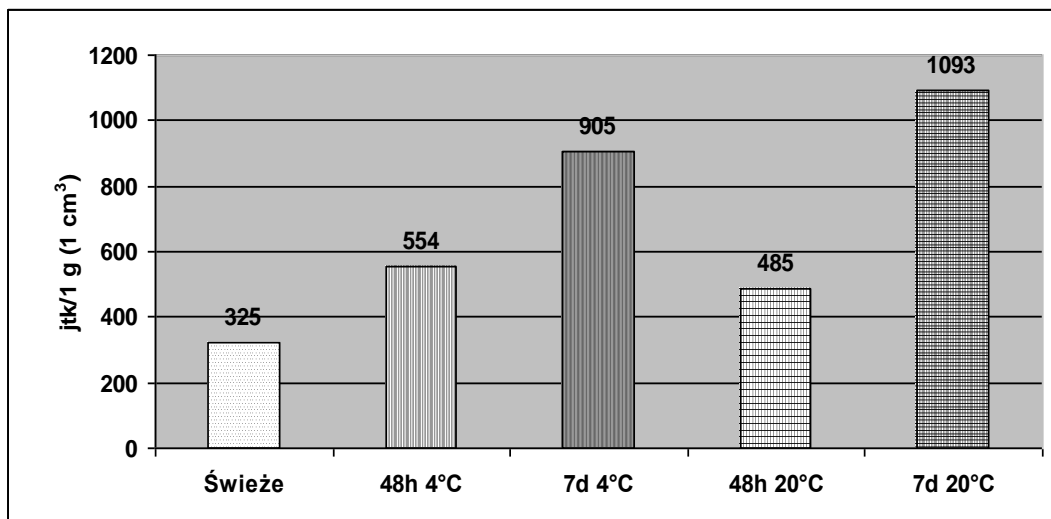
Tabela 1. Ilość bakterii w jtk/1 g dla deserku 1 w zależności od czasu i temperatury przechowywania

Drobno- ustroje	Deserek 1 [jtk/1 g]				
	Po otwarciu	Po 48 h +4°C	Po 48 h +20°C	Po 7 d. +4°C	Po 7 d. +20°C
Bakterie	56,7	89,6	59,5	123,3	1000
Pleśnie	50,6	130,55	137,8	286,1	216,1

Poniżej przedstawiono ilości kolonii bakteryjnych w zależności od rodzaju produktu: deserki, obiadki i soki (ryc. 1) oraz czasu i temperatury ich przechowywania (ryc. 2).

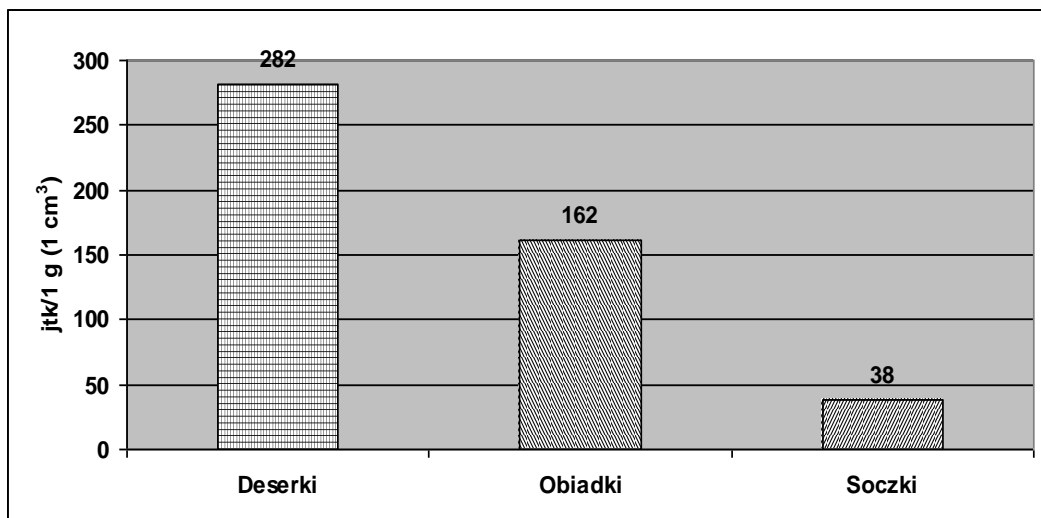


Rycina 1. Ilość kolonii bakteryjnych w zależności od rodzaju produktu

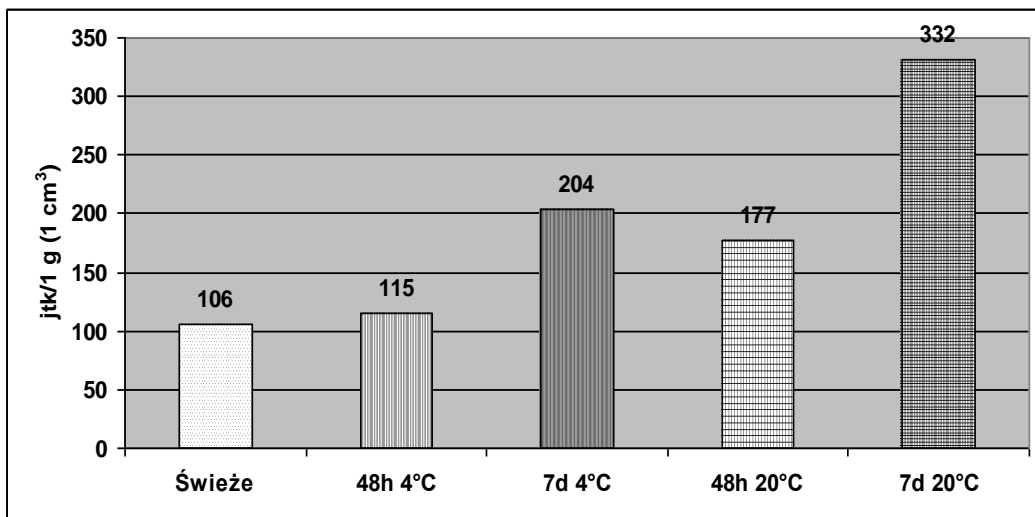


Rycina 2. Ilość kolonii bakteryjnych w zależności od czasu i temperatury przechowywania

Na rycinach 3 i 4 przedstawiono ilości kolonii pleśni w zależności od rodzaju produktu (ryc. 3) oraz czasu i temperatury ich przechowywania (ryc. 4).



Rycina 3. Ilość wyrosłych pleśni w zależności od rodzaju produktu



Rycina 4. Ilość pleśni w zależności od czasu i temperatury przechowywania

Ogólna liczba bakterii i pleśni w produktach dla małych dzieci była różna w zależności od produktu oraz czasu i temperatury przechowywania. Najmniej drobnoustrojów obserwowano w produktach zaraz po otwarciu oraz przechowywanych do 48 h w warunkach chłodniczych, co jest zgodne z zaleceniami producentów. Jak się spodziewano, dłuższe przechowywanie w 4°C czy w nieodpowiednich warunkach spowodowało wzrost ilości kolonii bakteryjnych i pleśni. Z drugiej strony takie analizy pokazały, że surowce wykorzystywane do produkcji artykułów specjalnego przeznaczenia żywieniowego rzeczywiście pochodzą z upraw kontrolowanych, odpowiadają wymogą najwyższej jakości i są szczegółowo badane pod kątem czystości mikrobiologicznej [Weker, 2011].

Niestety brak dokładnych norm dotyczących zanieczyszczeń mikrobiologicznych produktów dla małych dzieci. W badanych produktach obok owoców, warzyw, obecne były również mięso, tłuszcz i inne, które teoretycznie mogły zwiększyć ilość drobnoustrojów. Porównując uzyskane wyniki z normami np. dla świeżego mięsa, który wynosi odpowiednio 10^6 jtk/1 g dla bakterii i 10^4 jtk/1 g dla pleśni, widać, że ilość drobnoustrojów w badanych produktach jest stosunkowo niska. Artykuły dla małych dzieci są więc bezpieczne pod względem mikrobiologicznym.

Zwiększone namnażania bakterii w trakcie przechowywania artykułów po otwarciu jest związane z fazami wzrostu drobnoustrojów. Po otwarciu produktu bakterie nie rozmnażają się z maksymalną szybkością. Wraz z wydłużaniem czasu przechowywania i utratą jego sterylności (wpływ środowiska zewnętrznego) bakterie rozmnażają się coraz szybciej. Producent uznaje produkt za możliwy do spożycia tylko

do 48 h po otwarciu, jeśli przechowywany był w temperaturze +4°C [Żakowska i Stobińska, 2000; www.gerber.pl].

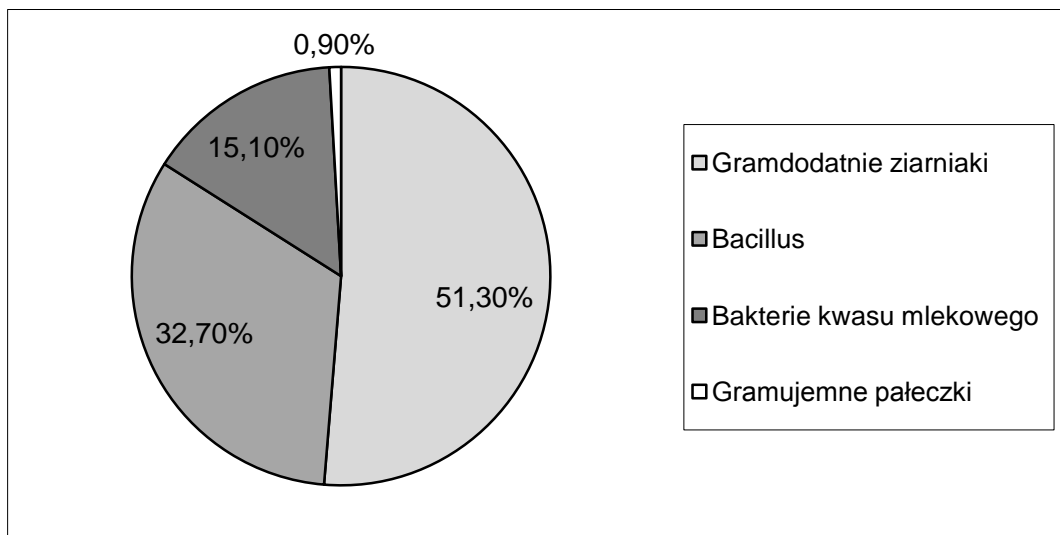
Rodzaj surowca, z którego zostały wytworzone badane produkty ma duże znaczenie dla rozwoju mikroorganizmów. Największą ilość bakterii i pleśni obserwowano w deserach, do produkcji, których wykorzystuje się głównie owoce i warzywa (ryc. 1 i 3). Surowce te są środowiskiem, w którym mogą rozwijać się liczne drobnoustroje niszczące dany surowiec lub powodując niekorzystne zmiany chemiczne. Rygorystyczne wymogi dla surowców przeznaczonych do produkcji pokarmów dla dzieci praktycznie w 100% eliminują niebezpieczną mikroflorę [Żakowska i Stobińska, 2000].

Deserki poddane badaniom były produkowane przede wszystkim z jabłek, moreli, bananów oraz brzoskwiń. Podczas produkcji przetwory owocowe są zabezpieczane przed rozwojem drobnoustrojów przez pasteryzację. Obiadki składają się głównie z warzyw (marchwi, ziemniaków, groszku) oraz mięsa drobiowego. Produkty warzywne i warzywno-mięsne są poddawane sterylizacji. W procesie pasteryzacji inaktywowane są tylko formy wegetatywne niektórych gatunków odpowiedzialnych za psucie się żywności, a także patogeny. Ogrzewanie powyżej 100°C powoduje inaktywację również form przetrwanych. Stąd obserwowany nieco większą ilość bakterii w deserkach, a nie w obiadkach [Hajduk i in., 2001].

Najwięcej bakterii rozwinęło się w deserku 4, który wyprodukowano z owoców i warzyw hodowanych ekologicznie. Taki wynik był spowodowany specyfiką produkcji [Rozporządzenie Rady (WE), 2007].

Najmniejszą ilość bakterii obserwowano w soczkach. Na taki wynik może mieć wpływ technologia produkcji. Soki są wytwarzane z zagęszczonego soku owocowego. Zagęszczanie prowadzi się na wyparkach, a surowiec poddawany jest działaniu wysokiego ciśnienia i wysokiej temperatury przez długi czas, co wpływa destrukcyjnie na mikroorganizmy. Ponadto, w czasie zagęszczania usuwana jest z produktu woda, a środowisko bezwodne nie jest korzystne dla rozwoju mikroorganizmów. Drugi badany sok zawierał syrop glukozowo-fruktozowy zwiększający stabilność mikrobiologiczną, tym samym średnia ilość bakterii dla soków była niższa [Hajduk i in., 2001].

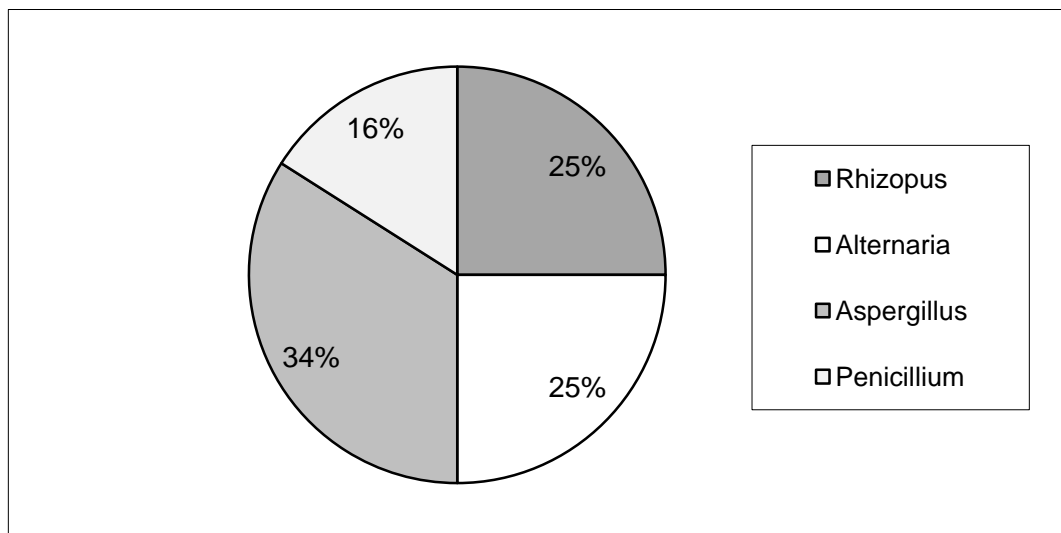
Spośród wszystkich kolonii wybrano 113 bakteryjnych i 44 szczepy pleśni, które poddano identyfikacji. Wyróżniono gramodatnie ziarniaki, laseczki *Bacillus*, bakterie kwasu mlekowego (ziarniaki i *Lactobacillus*) oraz jedną gramujemną pałeczkę. Udział procentowy bakterii w badanych produktach przedstawiono na rycinie 5. Nie obserwowano bakterii z grupy *coli*.



Rycina 5. Procentowy udział bakterii w produktach spożywczych dla małych dzieci

W analizowanych produktach spodziewano się rozwoju mikroflory typowej dla surowców owocowych (jabłka, banany, morele, brzoskwinie), warzywnych (marchewka, pasternak, ziemniaki, groszek) oraz zwierzęcych. Należy podkreślić, że większość roślin ma kontakt z glebą. Mimo dokładnego mycia i przestrzegania wszystkich rygorystycznych zasad higieny, może się zdarzyć, że część mikroflory glebowej przedostanie się na surowiec przeznaczony do przetworzenia. Ponadto, nawozy naturalne stosowane w hodowlach organicznych, z których produkuje się artykuły BIO, mogą powodować występowanie w glebie bakterii z rodzin *Enterococcaceae* oraz *Enterobacteriaceae*. W przypadku mięsa jego mikroflora jest bardzo bogata (*Proteus*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Serratia*), dlatego bardzo ważny jest jak najszybszy przerób surowca [Żakowska i Stobińska, 2000].

Obserwacje makro- i mikroskopowe pleśni pozwoliły zidentyfikować w badanych produktach pleśnie z rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* oraz *Rhizopus* (rycina 6). Nie zidentyfikowano drożdży.

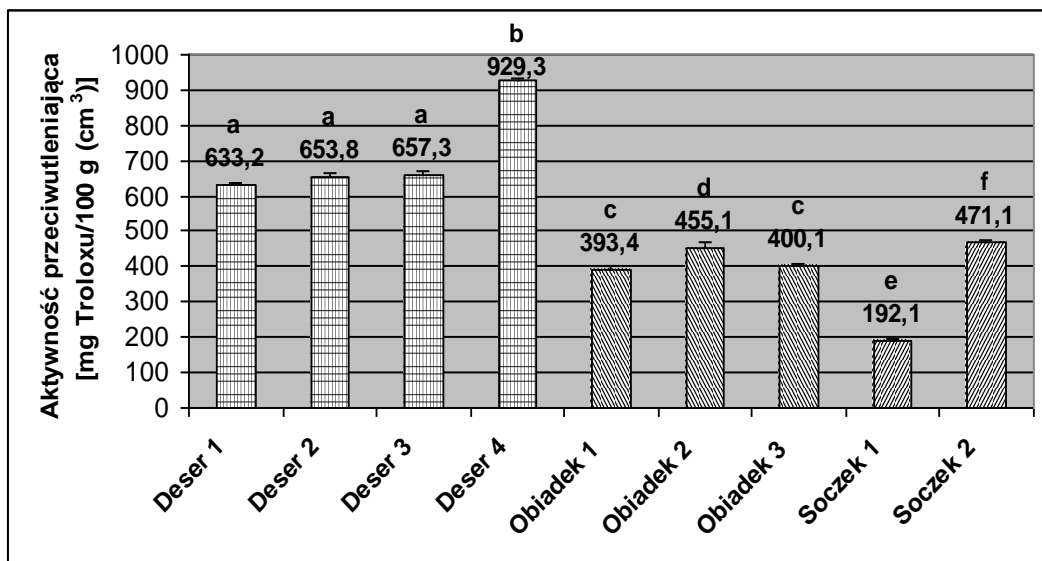


Rycina 6. Procentowy udział pleśni w produktach spożywczych dla małych dzieci

Mikroflora owoców w dużej mierze składa się z pleśni: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Alternaria* czy *Rhizopus* i *Mucor*. Mimo, iż pleśnie występują zwykle na surowcach roślinnych, to mogą pojawić się na surowcach zwierzęcych np. *Rhizopus*. Dlatego też producenci żywności dla dzieci dbają o to, aby mięso zostało przetworzone jak najszybciej po uboju zwierzęcia [Żakowska i Stobińska, 2000].

Analiza aktywności przeciwutleniającej badanych produktów dla małych dzieci (rycina 7) wskazuje, że najwyższą aktywnością charakteryzował się deserek 4 produkowany z surowców ekologicznych. Uprawy ekologiczne wpływają na zwiększoną zawartość naturalnych przeciwutleniaczy w porównaniu z uprawą konwencjonalną. Może to być związane ze specyfiką prowadzenia takiego rolnictwa, głównie z restrykcyjnym zakazem używania środków chemicznych. Przeciwutleniacze są związkami bardzo reaktywnymi i mogłyby wchodzić z nimi w reakcje powodując niekorzystne zmiany [Duthie i in., 2000; McNaughton i Marks, 2003].

Trudno w literaturze odnaleźć wartości aktywności przeciwutleniającej dla owoców lub ich przetworów, gdyż najczęściej podawana jest zawartość polifenoli. I tak stężenie np. epikatechiny w jabłkach wraz ze skórką wynosi ponad 8 mg na 100 g. Owoce aronii zawierają rekordową ilość 2080 mg polifenoli w 100 g [Dietrich i in., 2004; Wawer, 2006].



Rycina 7. Aktywność przeciwtleniająca artykułów dla niemowląt i małych dzieci. a-f - te same litery w obrębie takich samych produktów oznaczają brak różnic statystycznie istotnych, $p < 0,05$

Z badanych produktów, deserki posiadają najwyższą aktywność antyoksydacyjną. Zawierają one owoce, które są głównym źródłem przeciwutleniaczy. Badane przetwory w swoim składzie zawierały jabłka, morele, banany i brzoskwinie, które są uważane za owoce o najmniejszej wartości antyoksydacyjnej. Najbogatszym źródłem tych związków są owoce jagodowe (aronia, jeżyny, borówki, jagody oraz truskawki, poziomki i maliny). Warzywa generalnie charakteryzują się niską zdolnością do zmiatania wolnych rodników. Badane obiady zawierały warzywa (marchew, ziemniaki, groszek, por) o najniższym potencjalnie antyoksydacyjnym. Do warzyw o najbogatszych właściwościach antyoksydacyjnych zalicza się rodzinę kapustnych i cebulowych oraz buraki ćwikłowe. Także mięso dodawane do produktu w ogóle nie zawiera związków o właściwościach przeciwtleniających [Dietrich i in., 2004; Szajdek i Borowska, 2004; Cieślik i Sikora, 2007].

Niska zawartość przeciwutleniaczy w sokach, pomimo użycia owoców, związana może być z procesem technologicznym ich powstawania. Sok 2 był przecierowy, to znaczy, że tkanki owoców najbogatsze w biologiczne czynne związki antyoksydacyjne pozostały w gotowym produkcie. Jednak sok nie osiąga wysokich wyników, ponieważ składa się głównie z marchwi, która posiada niskie właściwości przeciwtleniające. Sok 1 zawierał tylko 19% jabłek, resztę stanowił odtworzony sok zagęszczony, a jego produkcja wymagała klarowania. Podczas tego procesu pozbywamy się najbardziej

wartościowych składników o właściwościach antyoksydacyjnych [Żukiewicz-Sobczak i in., 2009].

Wszystkie badane deserki i soczki w swoim składzie zawierały kwas askorbinowy, który obok polifenoli, jest jednym z najsilniejszych przeciwutleniaczy. Łatwość suplementacji witaminą C wiąże się z tym, że jest ona bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie. Oprócz zwiększenia aktywności antyoksydacyjnej, posiada zdolność do neutralizowania kancerogenów, które mogą tworzyć się w organizmie człowieka, lub dostawać się do niego wraz z pożywieniem. Zapobiega, więc tym samym rozwojowi nowotworów [Borek-Wojciechowska, 2000; Pisulewski i Pysz, 2008].

Wnioski

W produktach spożywczych dla małych dzieci stwierdzono obecność bakterii i pleśni. Zidentyfikowano gramodatnie ziarniaki, laseczki *Bacillus* i bakterie kwasu mlekowego. Wśród pleśni wyizolowano rodzaje: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* oraz *Rhizopus*. Nie wykazano obecności bakterii z grupy *coli* ani drożdży.

Najwięcej mikroorganizmów wyizolowano z deserków, szczególnie z produktu z upraw ekologicznych. Może to być związane ze specyfiką uprawy roślinnych surowców ekologicznych (stosowanie tylko nawozów naturalnych). Stwierdzono niekorzystny wpływ wysokiej temperatury i czasu przechowywania na czystość mikrobiologiczną badanych artykułów. Spożycie produktów bezpośrednio po otwarciu lub do 48 h przechowywanych w warunkach chłodniczych zapewnia zachowanie bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Pomimo tego, że w niniejszej pracy nie było to bezpośrednio badane, proces produkcji środków specjalnego przeznaczenia żywieniowego ma ogromny wpływ na rozwój mikroflory.

Aktywność antyoksydacyjną produktów można uznać za stosunkowo wysoką szczególnie w deseru ekologicznym. Niemniej jednak na aktywność przeciwutleniającą wpływ ma skład surowców wykorzystany w produkcji i technologia wytwarzania. Ilość drobnoustrojów wyizolowanych z badanych artykułów spożywczych można uznać za bezpieczną. Nie istnieją, więc uzasadnione obawy przed podawaniem gotowych produktów spożywczych dzieciom.

Literatura

1. Borek-Wojciechowska R. Znaczenie witaminy C dla organizmu człowieka. *Przem. Spoż.*, 2000, 2, 52-53.
2. Cieślik E., Sikora E. Występowanie przeciwutleniaczy w owocach jagodowych. W: *Przeciwutleniacze w żywności: aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*, red. Grajek W., WNT, Warszawa, 2007, 201-209.

3. Dietrich H., Rechner C.D., Patz C.D. Bioactive compounds in fruit and juice. *Fruit Process.*, 2004, 1, 50-55.
4. Duthie G.G., Duthie S.J., Kyle J.A. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 2000, 13(1), 79-106.
5. Dyrektywa Komisji 2006/125/WE z dnia 5 grudnia 2006 r. w sprawie przetworzonej żywności na bazie zbóż oraz żywności dla niemowląt i małych dzieci.
6. Francis J.J. *Young Children: Preparing for the Future. W: Nutrition and Health: Nutrition Guide for Physicians.*, 2010, 195-203.
7. Gawęcki J., Hryniewicz L. *Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu.* PWN, Warszawa 2000.
8. Grzymisławski M., Gawęcki J. *Żywnienie człowieka zdrowego i chorego.* PWN, Warszawa 2010.
9. Hajduk E., Surówka K., Lesińska E., Źródłowski Z., Wróblewski R., Michalczyk M. *Ogólna technologia żywności.* Wyd. AR, Kraków 2001.
10. Książek J., Weker H. Nowe zalecenia żywienia niemowląt od roku 2007. *Pediatr. Współcz. Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziecka.*, 2007, 9(4), 292-297.
11. McNaughton S.A., Marks G.C. Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *BJN*, 2003, 90(3), 687-697.
12. Pisulewski P.M., Pysz M. *Żywnienie człowieka. Zbiór ćwiczeń.* Wyd. AR, Kraków 2008.
13. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010a r. w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności i warunków ich stosowania (Dz. U. Nr 174, poz. 1184).
14. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010b r. w sprawie środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego (Dz. U. Nr 180, poz. 1214).
15. Rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych i uchylające rozporządzenie (EWG) nr 2092/91.
16. Szajdek A., Borowska J. Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2004, 4(41)S, 5-28.
17. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia – tekst jednolity. Dz. U. Nr 136, poz. 914.
18. Wawer I. *Aronia - polski paradoks.* Wyd. Agropharm SA Tuszyń, Warszawa 2006.

19. Weker H. Żywność dla niemowląt i dzieci – kryteria oceny. *Biotechnologia.pl*, 30.06.2011.
20. Weker H., Więch M. Żywność dla dzieci – podstawowe kryteria oceny. *Nauka Przyroda Technologie*. Wyd. UP w Poznaniu, 2009, 3(4), 1-5.
21. Weker H., Więch M. Żywność dla niemowląt i małych dzieci w świetle nowych regulacji prawnych. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2008, 3, 883-887.
22. www.gerber.pl
23. Żakowska Z., Stobińska H. *Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym*. Wyd. Politechniki, Łódź 2000.
24. Żukiewicz-Sobczak W., Michalak-Majewska M., Kalbarczyk J. Pojemność antyoksydacyjna wybranych napojów owocowych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, Kraków, 2009, 3, 910-915.

Źródło finansowania DS3700/WTŻ/2013-2014

PESTYCYDY NOWEJ GENERACJI – POZOSTAŁOŚCI W ŻYWNOŚCI, METODY OZNACZANIA I WYZWANIA ANALITYCZNE

W 2015 r. upływie 70 lat istnienia światowego rynku pestycydów, którego powstanie zwykło liczyć się od wprowadzenia do szerokiego stosowania preparatu DDT w 1945 r. Pestycydy, powszechnie stosowane w rolnictwie oraz gospodarstwach domowych, stanowią obecnie zróżnicowaną i liczną grupę związków chemicznych, pozyskiwanych naturalnie lub też otrzymywanych w wyniku syntez chemicznych. Jak każda substancja chemiczna, pestycydy, kumulujące się w poszczególnych elementach środowiska naturalnego, nie pozostają bez wpływu na bezpieczeństwo i jakość zdrowotną żywności. Gwałtowny rozwój wiedzy dotyczącej długofalowych skutków stosowania środków ochrony roślin spowodował, iż obecnie dąży się do wykorzystywania takich substancji czynnych, których stosowanie niesłoby ze sobą jak najmniejsze ryzyko dla funkcjonowania przyrody i organizmów żywych.

Przedstawicielami nowej generacji pestycydów są m.in. związki z grupy neonikotynoidów (np. imidakloprid, acetamiprid, nitrozoguanidyna, dinotefuran, klotianidyna, tiametoksam), stosowane głównie jako środki owadobójcze. Insektycydy neonikotynoidowe wykazują dużą skuteczność w usuwaniu owadów, z tego też powodu są szeroko stosowane w uprawach np. roślin dyniowatych [Camel, 2010; Guziejewski i in., 2011]. Neonikotynoidy działają jako agoniści dla receptorów nikotynowych acetylocholino, która odgrywa ważną rolę w synaptycznej transmisji w centralnym układzie nerwowym owadów [Xiao i in., 2011]. Wykazując działanie neurotoksyczne w organizmach niepożądanych insektów związki neonikotynoidowe powodują jednocześnie masowe giniecie pożytecznych owadów, w tym pszczół. Dotychczasowe badania wykazały, że w miejscach, gdzie użycie neonikotynoidów było większe, rodziny pszczół rozwijały się gorzej niż te umieszczone na terenach wolnych od pestycydów. W ulach umieszczonych na uprawach pochodzących z zaprawianych nasion obserwowano wyższą śmiertelność pszczół w porównaniu do uli kontrolnych, w których rodziny pozostawały zdrowe. Szczególnie istotny jest fakt, że pestycydy poza bezpośrednim oddziaływaniem na pszczoły dostają się także do pyłku oraz nektaru wielu roślin [Skubida i in., 2010].

Do pestycydów nowej generacji zaliczane są też tzw. biopestycydy uzyskiwane podczas fermentacji z udziałem niektórych mikroorganizmów glebowych lub

ekstrahowane z pewnych gatunków roślin. Należą do nich m.in. spinosad, abamektyna, azadyrachtyna, rotenon. **Spinosad**, stosowany jako środek owadobójczy, jest makrocyklicznym laktonem produkowanym w trakcie fermentacji tlenowej promieniowca *Saccharopolyspora spinosa*. W skład spinosadu wchodzi dwa metabolity: spinosyn A i spinosyn D. Z powodzeniem wykorzystywany jest do zwalczania szkodników tytoniu, bawełny, owocówek jabłoni i śliw, chrząszczy, much, szarańczaków, szkodników magazynowych oraz szkodników zbóż [Kowalska i Drożdżyński, 2009]. Spinosad wykazuje działanie wgłębne na roślinach, działa kontaktowo i żołądkowo. W organizmie owada związek ten blokuje kanały chlorkowe zakłócając tym samym proces przenikania jonów chloru. Końcowym efektem działania spinosadu jest paraliż owada. Spinosad uważany jest za insektycyd względnie bezpieczny dla człowieka i innych ssaków. Jego istotną zaletą jest także stosunkowo krótki czas karencji (3 dni), oraz szybki czas rozkładu w środowisku (około 16 dni) [Angioni i in., 2013]. Spinosad został dopuszczony na mocy rozporządzeń unijnych do stosowania w rolnictwie ekologicznym [Gerwick i Sparks, 2014]. **Abamektyna** należy do makrocyklicznych laktonów i jest naturalnym produktem fermentacji przeprowadzanej przez mikroorganizmy glebowe *Streptomyces avermitilis*. Abamektyna jest mieszaniną dwóch homologów zawierających więcej niż 80% awermektyny B1a i mniej niż 20% awermektyny B1b. Obecnie, obok spinosadu, awermektyny są jednymi z najbardziej powszechnych insektycydów stosowanych w hodowli zwierząt, w rolnictwie, a także w gospodarstwach domowych do zwalczania np. prusaków i karaczanów [Hernando i in., 2007]. Abamektyna wykazuje działanie zarówno owadobójcze jak i roztoczobójcze. Na owady działa żołądkowo i słabiej kontaktowo, a w roślinie najlepiej pobierana jest przez młode liście. Jej mechanizm działania w organizmach owadów jest analogiczny do spinosadu i opiera się na blokowaniu kanałów chlorkowych. Jednocześnie związek ten jest bardzo bezpieczny i zupełnie nieszkodliwy dla człowieka [Sannino, 2007]. **Azadyrachtyna**, ekstrahowana z kory, liści, owoców lub nasion miodli indyjskiej *Azadirachta Indicta*, jest naturalną substancją insektobójczą, wykazuje również właściwości repelentne i antyfidantne oraz hamuje zdolności rozrodcze owadów. Działanie azadyrachtyny w organizmie owadów polega na zaburzaniu procesu mitozy i uszkodzeniu systemu chromosomów [Kuhne 2008]. Substancja czynna składa się z co najmniej dziewięciu ściśle związanych izomerów terpenoidowych, charakteryzuje się niską toksycznością w stosunku do organizmów wyższych [Gai i in., 2011]. Innymi ważniejszymi triterpenoidami o właściwościach antyfidantnych, wytwarzanymi w mniejszych ilościach przez miodlę indyjską i inne rośliny z rodziny *Meliaceae* są: melianrol, salannina, nimbin i nimbidin. Znalazły one zastosowanie w ograniczaniu liczebności populacji szkodliwych owadów, w tym stonki ziemniaczanej [Malinowski, 2010]. **Rotenon** i jego pochodne, określane jako rotenoidy, są dobrze znane z ich

właściwości owadobójczych. Występują one naturalnie w korzeniach, łodygach i liściach roślin tropikalnych z gatunków *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* i *Amorpha*. Rotenon działa na owady jako trucizna żołądkowa, poprzez zaburzenie funkcji łańcucha oddechowego w mitochondriach. Jest także toksyczny dla ryb, które go szybko absorbują, dlatego też stosowany jest jako środek do ich wybijania podczas połowu. Ponieważ rotenon nie jest zbyt dobrze wchłaniany w przewodzie pokarmowym człowieka, spożywanie takich zatrutych ryb jest względnie bezpieczne. Od kilku lat podejrzewa się jednak związek pomiędzy rotenonem a chorobą Parkinsona. Rotenon łatwo ulega biodegradacji w środowisku, tworząc dihydrorotenon i wodę [Drożdżyński i Kowalska, 2009; Kuhne, 2008].

Stosowanie nowych generacji środków ochrony roślin pociąga za sobą także potrzebę rozwoju oraz optymalizacji procedur analitycznych, służących do oznaczania pozostałości tych substancji czynnych w żywności. Wymaga to często zastosowania nowoczesnych technik przygotowania próbek oraz czułych metod detekcji końcowej, z uwagi na fakt, iż pozostałości pestycydów w artykułach spożywczych zazwyczaj występują na poziomie śladów.

Przygotowanie próbki jest kluczowym etapem w całym procesie analitycznym i niesie za sobą największe ryzyko straty analitów – w tym przypadku pestycydów – oraz zanieczyszczenia próbki. Przygotowanie próbki w oznaczaniu pozostałości pestycydów polega na wyekstrahowaniu badanych związków z danego produktu spożywczego, usunięciu niepożądanych składników matrycy, które mogłyby zakłócać analizę instrumentalną oraz często związany jest z jednoczesnym wzbogaceniem analitów w celu poprawienia ich wykrywalności. Jest to więc etap czas- i pracochłonny, w którym zazwyczaj zużywa się duże ilości toksycznych rozpuszczalników organicznych. Do najczęściej stosowanych, klasycznych technik przygotowania próbek należą ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE, ang. *liquid liquid extraction*), ekstrakcja do fazy stałej (SPE, ang. *solid phase extraction*), oczyszczanie metodą chromatografii kolumnowej z zastosowaniem odpowiednich sorbentów oraz wykorzystanie chromatografii żelowej (GPC, ang. *gel permeation chromatography*).

Alternatywą dla wspomnianych metod jest zastosowanie tzw. odwróconej, dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (r-dSPE, ang. *reversed dispersive SPE*), polegającej na dosypywaniu sybkich sorbentów, takich jak PSA, GCB, SAX, NH₂, C₁₈ do roztworu ekstraktu próbki. Sorbenty te mają za zadanie wiązać, a następnie usuwać niepożądane składniki matrycy, takie jak kwasy tłuszczowe, barwniki, cukry, białka, związki fenolowe i inne. Główną wadą r-dSPE jest jednak niewystarczająca skuteczność w usuwaniu interferentów w przypadkach bardziej skomplikowanych matryc oraz strata niektórych analitów, które mogą wiązać się ze sorbentami. Niesie to za sobą konieczność stosowania nowych, bardziej efektywnych materiałów. Jednym z nich jest grafen, płaski, składający

się z atomów węgla połączonych w sześciokątne figury jednowarstwowy materiał o strukturze plastra miodu. Grafen posiada niezwykle właściwości elektroniczne, termiczne i mechaniczne, dobrą przewodność cieplną, wysokie wartości modułu Younga oraz wysoką odporność na pękanie. Grafen jest również skutecznym adsorbentem pigmentów, dlatego też materiał ten został z powodzeniem wykorzystany do oczyszczania ekstraktów próbkach ogórków, herbaty, pomarańczy, ogórka i sałaty [Wu i in., 2012; Liu i in., 2014].

Nanorurki węglowe (CNT, ang. *carbon nanotubes*) są kolejnym rozwiązaniem stosowanym w przygotowaniu próbek do oznaczania pozostałości pestycydów w żywności. Nanorurki zbudowane są z arkuszy grafenowych. Znane są dwa rodzaje nanorurek: jednościenne (SWCNT, ang. *single-walled carbon nanotubes*) i wielościenne (MWCNT, *multi-walled carbon nanotubes*). Te ostatnie składają się z wielu cylindrów grafenowych umieszczonych współosiowo jeden w drugim [Pietrzak i Jeszka, 2010]. Nanorurki węglowe posiadają szczególne właściwości fizyczne i chemiczne, wytrzymałość mechaniczną i stabilność chemiczną, niską gęstość i zdolność do wiązania grup funkcyjnych. W dziedzinie chemii analitycznej są wykorzystywane jako fazy stacjonarne w chromatografii gazowej, cieczonej, elektroforezie kapilarnej oraz w produkcji membran filtracyjnych [González-Curbelo i in., 2011]. Dzięki wyjątkowo dużej powierzchni oraz unikalnej strukturze (wąski rozkład wielkości porów), CNT charakteryzują się doskonałą zdolnością adsorpcji i mogą być stosowane jako sorbenty do ekstrakcji (SPE) lub mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Jak dotąd pojawiło się kilka prac, w których użyto CNT do oczyszczania ekstraktów próbek (sok z jabłek, winogrona, herbata, pomarańcze i owoce ananasa) w analizie pestycydów [González-Curbelo i in., 2011; Zhao i in., 2013].

Podjęto także próby wykorzystania adsorbentów magnetycznych, dzięki którym można uniknąć dużego zużycia ekstrahentów organicznych i rozdzielić fazy za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego zamiast procesu wirowania. Kompozyty te zbudowane są poprzez naniesienie warstwy porowatego polimeru na magnetyczny rdzeń wykonany z Fe_3O_4 lub naniesienie na zewnętrzną powierzchnię porowatego sorbentu nanocząstek o właściwościach magnetycznych. Sorbenty o właściwościach magnetycznych często łączą unikalne właściwości fizyczne i chemiczne nanorurek węglowych i właściwości paramagnetyczne nanocząsteczek magnetycznych. Ponadto większość adsorbentów magnetycznych może być łatwo poddawana recyklingowi przez prostą operację przemywania, co powoduje, że jest to sposób oszczędny i przyjazny środowisku. W oznaczaniu pozostałości pestycydów żywności został on zastosowany m.in. do oczyszczania próbek herbaty [Deng i in., 2014].

Oprócz powszechnie znanych i szeroko stosowanych technik ekstrakcji i oczyszczania próbek w analizie pozostałości pestycydów, w ostatnich latach na

popularności zyskuje dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (DLLME, ang. *dispersive liquid liquid microextraction*). DLLME opiera się na potrójnym układzie cieczy: wodnego roztworu zawierającego anality (pestycydy), rozpuszczalnika ekstrahującego niemieszającego się z wodą (np. chloroform) oraz rozpuszczalnika dyspersyjnego (dyspergatora, np. acetonitryl). Mieszaninę dyspergatora i rozpuszczalnika ekstrahującego wprowadza się do roztworu wodnego. Po wytrząśnięciu, osiągnięciu równowagi na powierzchni styku pomiędzy kropelkami rozpuszczalnika ekstrahującego i próbki wodnej oraz odwirowaniu, rozpuszczalnik jest pobierany z dna probówki i poddany analizie instrumentalnej [Chen i in. 2013]. Zaletą metody DLLME jest krótki czas ekstrakcji, niski koszt, łatwość wykonania oraz wysoki stopień odzysku pestycydów. Technika ta została efektywnie wykorzystana do oznaczenia pozostałości pestycydów z grup m.in. neonikotynoidów w żeńszenu, pomarańczy, miodzie [Andraščíková i in., 2012; Jovanov i in., 2014].

Ekstrakcja ciało stałe-ciecz w niskich przedziałach temperatur (SLE-LTP, ang. *solid liquid extraction with low temperature partitioning*) ze względu na możliwość jednoczesnej ekstrakcji pestycydów i oczyszczania ekstraktów jest kolejnym rozwiązaniem stosowanym w analityce pestycydów w żywności i została wykorzystana do oznaczenia m.in. tiametoksamu w ananasie. Ze względu na dużą wydajność ekstrakcji, prostotę wykonania oraz małe zużycie odczynników nawet w porównaniu do techniki QuEChERS, procedura ta może z powodzeniem zastąpić klasyczne techniki ekstrakcji [da Costa Morais i in., 2014].

Technika ekstrakcji wodą w stanie podkrytycznym (SWE, ang. *subcritical water extraction*) jest oparta na zastosowaniu wody jako rozpuszczalnika ekstrahującego. Proces przeprowadzany jest w temperaturze między 100 a 374°C, przy ciśnieniu pozwalającym utrzymać wodę w stanie ciekłym oraz obniżyć jej polarność, co sprawia, że charakteryzuje się ona właściwościami podobnymi do rozpuszczalników organicznych. SWE została wykorzystana do ekstrakcji neonikotynoidów z próbek węgorka [Xiao i in., 2013].

Analiza pozostałości dotychczasowo stosowanych pestycydów przeprowadzana była zazwyczaj metodą chromatografii gazowej (GC, ang. *gas chromatography*) z wykorzystaniem odpowiednio dobranych, selektywnych detektorów lub też w połączeniu ze spektrometrią mas (MS, ang. *mass spectrometry*) jako techniką detekcji. Obecnie wykorzystywane pestycydy są jednak bardziej polarne, nietrwałe termicznie i mało lotne, stąd istnieje konieczność użycia chromatografii cieczowej (LC, ang. *liquid chromatography*), również w połączeniu z MS, w trybie pojedynczym, tandemowym (MS/MS) lub z zastosowaniem liniowego układu trzech kwadrupoli (qqq). Aktualnie chromatografia cieczowa w różnych jej odmianach jest najpopularniejszą i najbardziej

wszechstronną techniką instrumentalną w analizie pozostałości pestycydów w żywności, głównie ze względu na wysoką czułość analiz [Camel, 2010].

Ultrawysokosprawną chromatografią cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas i jonizacją poprzez rozpylenie w polu elektrycznym (UHPLC-ESI-MS/MS, ang. *ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionisation*) ze względu na krótki czas trwania analizy, wysoką czułość i rozdzielczość w porównaniu do konwencjonalnej HPLC, jest jedną z technik stosowaną w obecnym czasie do analizy pestycydów. W UHPLC wykorzystuje się nową generację kolumn wypełnionych cząstkami o wielkości 1,7 μm , który mogą działać przy wyższych ciśnieniach, co znacznie polepsza parametry analiz [Chen i in., 2014]. Nowością jest także zastosowanie spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości (HRMS, ang. *high resolution mass spectrometry*) ze względu na wysoką dokładność pomiaru masy związków oraz wykorzystanie analizatora Orbitrap z transformacją Fouriera do identyfikacji związków. Pozwala on uzyskać dokładny pomiar masy (poniżej 1 ppm) nawet dla związków o niskiej masie molowej i charakteryzuje się również szerokim zakresem dynamicznym (ok. 6000 m/z). Z powodzeniem jest stosowany w badaniach pozostałości pestycydów z różnych klas chemicznych, w tym także spinosadu, azadyrachtyny i neonikotynoidów [Gomez i in., 2013; Jia i in., 2014; Farre i in., 2014]. Analiza mas w Orbitrapie może być też poprzedzona bezpośrednio jonizacją próbki przy użyciu lasera z promieniowaniem UV (MALDI, ang. *matrix assisted laser desorption ionisation*). Połączenie UV-MALDI-MS-Orbitrap posiada unikalne cechy instrumentalne: niskie granice wykrywalności rzędu attomola, dużą zdolność rozdzielczą pozwalającą zidentyfikować szereg pestycydów w produktach o złożonej matrycy, znaczną szybkość analiz oraz zmniejszenie ilości etapów procedury analitycznej. Technika ta została wykorzystana m.in. do identyfikacji rotenonu w oleju rzepakowym [Ivanova i Spiteller, 2014].

Alternatywną metodą do klasycznych metod chromatograficznych, stosowaną w analizie środków ochrony roślin jest micelarna chromatografia elektrokinetyczna (MEKC, ang. *micellar electrokinetic chromatography*), która jest modyfikacją elektroforezy kapilarnej. Metodą tą oznaczać można m.in. pestycydy neonikotynoidowe [Amelin i in., 2013].

Literatura

1. Amelin V. G., Bol'shakova D. S., Tret'yakov A. V. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Solid Phase Extraction of Polar Pesticides from Natural Water and Their Determination by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 68(5), 386-397.

2. Andraščíková M., Hrouzková S., Cunha S. C. Combination of QuEChERS and DLLME for GC-MS determination of pesticide residues in orange samples. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2013, 30(2), 286-297.
3. Angioni A., Porcu L., Pirisi F. LC/DAD/ESI/MS Method for the Determination of Imidacloprid, Thiacloprid, and Spinosad in Olives and Olive Oil after Field Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 59, 11359-11366.
4. Camel A. Refined Methodology for the Determination of Neonicotinoid Pesticides and Their Metabolites in Honey Bees and Bee Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 5926–5931.
5. Chen L., Yin L., Song F., Liu Z., Zheng Z., Xing J., Liu S. Determination of pesticide residues in ginseng by dispersive liquid–liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2013, 917-918, 71-77.
6. Chen L., Yin L., Song F., Liu Z., Zheng Z., Xing J., Liu S. Study of the ESI and APCI interfaces for the UPLC–MS/MS analysis of pesticides in traditional Chinese herbal medicine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406, 1481-1491.
7. da Costa Morais E.H., Zinato Rodrigues A.A., Lopes Ribeiro de Queiroz M.E., Neves A.A., Damasceno Morais P.H. Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. *Food Control*, 2014, 42, 9-17.
8. Deng X., Guo Q., Chen X., Xue T., Wang H., Yao P. Rapid and effective sample clean-up based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the determination of pesticide residues in tea by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2014, 145, 853-858.
9. Drożdżyński D., Kowalska J. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394, 2241-2247.
10. Farré M., Picó Y., Barceló D. Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1328, 66-79.
11. Gai M.N., Álvarez C., Venegas R., Morales J. An HPLC Method for Determination of Azadirachtin Residues in Bovine Muscle. *Journal of Chromatographic Science*, 2011, 49, 327-331.
12. Gerwick B.C., Sparks T.C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. *Pest Management Science*, 2014, DOI 10.1002/ps.3744.
13. Gómez-Pérez M. L., Romero-González R., Plaza-Bolaños P., Génin E., Martínez Vidal J. L., Garrido Frenich A. Wide-scope analysis of pesticide and veterinary

- drug residues in meat matrices by high resolution MS: detection and identification using Exactive-Orbitrap. *Journal of Mass Spectrometry*, 2014, 49, 27-36.
14. González-Curbelo M. A., Asensio-Ramos M., Herrera-Herrera A. V., Hernández-Borges J. Pesticide residue analysis in cereal-based baby foods using multi-walled carbon nanotubes dispersive solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404, 183-196.
 15. Guziejewski D., Skrzypek S., Ciesielski W. Application of Catalytic Hydrogen Evolution in the Presence of Neonicotinoid Insecticide Clothianidin. *Food Analytical Methods*, 2012, 5, 373-380.
 16. Hernando M.D., Suarez-Barcena J.M, Bueno M.J.M., Garcia-Reyes J.F., Fernandez-Alba A.R. Fast separation liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1155, 62-73.
 17. Ivanova B., Spitteller M. Simultaneous quantitation of naturally occurring insecticides, acaricides, and piscicides in rapeseed oil by UV-MALDI mass spectrometry. *Food Measure*, 2014, 8, 15-28.
 18. Jia W., Chu X., Ling Y., Huang J., Chang J. High-throughput screening of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1347, 122-128.
 19. Jovanov P., Guzsvány V., Franko M., Lazić S., Sakač M., Milovanović I., Nedeljković N. Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC–MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. *Food Research International*, 2014, 55, 11-19.
 20. Kowalska J., Drożdżyński D. Spinosad jako insektycyd w rolnictwie ekologicznym - możliwości stosowania i monitoring pozostałości. *Proceedings of ECOpole*, 2009, 3(1), 71-75.
 21. Kuhne S. Perspektywy i ograniczenia wykorzystania bioinsektycydów w rolnictwie ekologicznym. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 2008, 48, 1309-1313.
 22. Liu X., Guan W., Hao X., Wu X., Ma Y., Pan C. Pesticide Multi-Residue Analysis in Tea Using d-SPE Sample Cleanup with Graphene Mixed with Primary Secondary Amine and Graphitized Carbon Black Prior to LC–MS/MS. *Chromatographia*, 2014, 77, 31-37.
 23. Malinowski H. Strategie obronne roślin drzewiastych przed szkodliwymi owadami. *Leśne Prace Badawcze (Forest Research Papers)*, 2008, 69, 165-173.
 24. Pietrzak Ł., Jeszka J.K. Nanokompozyty polilaktyd/wielościennie nanorurki węglowe. *Polimery*, 2010, 55, 7-8, 524-528.

25. Sannino A. Determination of three natural pesticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2007, 21, 2079-2086.
26. Skubida M., Pohorecka K., Bober A., Zdańska D. Pestycydy a pszczoły - wyniki badań przedstawione na 41. Kongresie Apimondia w Montpellier, Francja 2009. *Pszczelarstwo*, 2010, 7, 1-5.
27. Wu X., Zhang H., Meng L., Liu X., Ma Y. Graphene for Cleanup in Trace Analysis of Pyrethroid Insecticides in Cucumber and Spinach. *Chromatographia*, 2012, 75, 1177-1183.
28. Xiao Z., Li X., Wang X., Shen J., Ding S. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine tissues by pressurized solvent extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879, 117-122.
29. Xiao Z., Yang Y., Li Y., Fan X., Ding S. Determination of neonicotinoid insecticides residues in eels using subcritical water extraction and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 777, 32-40.
30. Zhao P., Fan S., Yu C., Zhang J., Pan C. Multiplug filtration clean-up with multiwalled carbon nanotubes in the analysis of pesticide residues using LC–ESI-MS/MS. *Journal of Separation Sciences*, 2013, 36, 3379-3386.

AGNIESZKA TAJNER-CZOPEK

*Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa /Zakład Technologii Przetworów Ziemiaczanych
Wydział Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

AKRYLAMID – POTENCJALNYM ZAGROŻENIEM W PRZETWORZONEJ ŻYWNOŚCI

Rozważania na temat akrylamidu (AA) występującego w żywności zostały przedstawione przez Światową Organizację Zdrowia (WHO – World Health Organization) oraz Organizację ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO – Food and Agriculture Organization) na międzynarodowym spotkaniu, które odbyło się w 25-27 czerwca 2002 roku w Genewie [FAO/WHO, 2002]. Na kolejnym spotkaniu, które miało miejsce w Brukseli 3 lipca 2002r., dotyczącym problematyki akrylamidu zorganizowanym przez Komitet Naukowy ds. Żywności (Scientific Committee on Food), szwedzcy naukowcy przedstawili oficjalne informacje na temat akrylamidu, będącego potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia człowieka w żywności [E.C., 2002]. Od tego momentu, rozpoczęte zostały intensywne badania dotyczące akrylamidu, powstającego w żywności bogatej w węglowodany, poddanej działaniu wysokiej temperatury w procesie produkcyjnym.

Akrylamid/akryloamid (2-propenamid; ang. – acrylamide; CAS No. 79-06-1) jest to związek bez wyraźnego smaku i zapachu, bardzo dobrze rozpuszczający się w wodzie oraz w rozpuszczalnikach polarnych tj. metanol i etanol (z wyjątkiem heptanu i benzenu) [FAO/WHO, 2002; JECFA, 2005; Friedman, 2003, Żyżlewicz i in., 2010]. Akrylamid jest substancją chemiczną wykorzystywaną do produkcji i syntezy modyfikowanych poliakrylamidów, które stosowane są w przemyśle, m.in.: do produkcji sztucznych tworzyw, barwników, klejów, zapraw murarskich. Używane są do sporządzenia różnego typu preparatów kosmetycznych, do uzdatniania wody i oczyszczania ścieków oraz jako reagent chemiczny mający zastosowanie w biologii molekularnej [Friedman, 2003; Żyżlewicz i in., 2010; Pedreschi i in., 2014]. Do organizmu człowieka związek ten może dostać się przez skórę, drogą oddechową oraz przede wszystkim, drogą pokarmową [Friedman, 2003; JECFA, 2005; Friedman i Levin, 2008].

Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (IARC) zakwalifikowała akrylamid jako związek prawdopodobnie kancerogeny dla ludzi (grupa 2A), którego spożycie w żywności o podwyższonej jego ilości, znacznie zwiększa ryzyko zachorowań na raka. Wykazano także, że akrylamid może wykazywać działanie neurotoksyczne, genotoksyczne oraz mutagenne [IARC, 1994]. Badania pod tym kątem prowadzone

są intensywnie przez wiele ośrodków naukowych [Olesen i in., 2008; Hogervorst i in. 2010; Chen i in., 2012; Pennisi i in., 2013].

Akrylamid tworzy się w żywności o dużej zawartości węglowodanów, która poddana zostaje działaniu wysokiej temperatury, powyżej 120⁰C w procesach takich jak: smażenie, pieczenie, prażenie, grillowanie, tostowanie, czy też suszenie lub ekstruzja [Rosén i Hellenäs, 2002; E.C., 2002; Friedman, 2003; JECFA, 2005; FAO/WHO, 2009; Rytel i in., 2012; Tajner-Czopek i in., 2012a; Pedreschi i in., 2014]. Na początku prowadzonych badań nie stwierdzano obecności akrylamidu w nieogrzewanej lub gotowanej żywności [E.C., 2002; Rosén i Hellenäs, 2002]. Jednak w miarę, prowadzenia szeroko zakrojonych badań i zastosowania coraz dokładniejszych urządzeń oraz metod pomiarowych, umożliwiających oznaczenie śladowych zawartości tego związku, stwierdzono pewne ilości AA w wybranych produktach, tj.: gotowane ziemniaki. Friedman i Levin [2008] podają, że w gotowanych ziemniakach, ilość tego związku może kształtować się na poziomie 48 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. W soku z suszonych śliwek, przeznaczonym dla dzieci, ilość akrylamidu wahała się w zakresie od 33 do 61 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [Becalski i in., 2011], natomiast w żywności dla niemowląt (w słoiczkach) w zakresie od 2 do 162 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (średnio 55 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) [Mojska i in., 2012]. Szczególnie wysoką zawartością akrylamidu charakteryzują się produkty smażone z ziemniaka, tj.: czipsy i frytki. W czipsach ilość tego związku może się kształtować w zakresie od 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do 12000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [Friedman, 2003], natomiast we frytkach od 15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do 3700 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [Tajner-Czopek i in., 2008; Gielecińska i Mojska, 2009; Lineback i in., 2012; Tajner-Czopek i in., 2012b].

W raporcie podanym przez FAO/WHO w 2002 roku, przekazano informacje na temat zawartości akrylamidu w wybranych produktach żywnościowych. Ilość tego związku kształtowała się w zakresie od 50 do 1312 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [FAO/WHO, 2002]. Z badań monitoringowych, nad zawartością AA w żywności prowadzonych na terenie Polski, zgodnie z zaleceniem UE w latach 2007-2009 wynika, że ilość tego związku waha się w zakresie od poniżej 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do ponad 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ w zależności od produktu [Mojska i in., 2011]. W roku 2012 Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA - European Food Safety Authority) przedstawił dane dotyczące zmian zawartości akrylamidu w wybranych grupach produktów analizowanych w latach 2007-2010, z których wynikało, że ilość akrylamidu generalnie zmniejszała się [EFSA, 2012]. Kontrolę nad poziomem akrylamidu w żywności podjął również Komitet Ekspertów ds. Dodatków do Żywności (JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives) [JECFA, 2002]. Do działań włączyła się też intensywnie Europejska Komisja (EC - European Commission), która zamieściła stosowne zalecenia dotyczące AA [E.C., 2011; E.C., 2013]. W zaleceniu Komisji z dn. 8 listopada 2013r. w oparciu o wyniki dochodzeń uzyskane w latach 2011 i 2012, oraz na podstawie wyników monitorowania uzyskanych w latach wcześniejszych, zmieniono niektóre wartości wskaźnikowe, określone do

tej pory w załączniku do zalecenia z 2011r [E.C., 2011] i podano nowe [E.C., 2013]. Zobligowano też państwa członkowskie do przekazania Komisji ustaleń dotyczących AA, początkowo do dnia 31 października 2014r., a następnie do 30 kwietnia 2015r [E.C., 2013].

Pierwsze informacje na temat powstawania akrylamidu sugerowały, że może tworzyć się on, w wyniku reakcji towarzyszącej tzw. reakcji Maillarda, zachodzącej pomiędzy cukrami redukującymi, tj. glukozą i fruktozą oraz aminokwasami, głównie asparaginą [Yaylayan i in., 2003; Zyzak i in., 2003]. Ilość powstającego akrylamidu w gotowym produkcie jest uzależniona od zawartości wyżej wymienionych składników występujących w surowcu [Yaylayan i in., 2003; Friedman, 2003; Friedman i Levin, 2008]. Kolejne informacje na temat mechanizmu powstawania AA w żywności poddanej obróbce termicznej, opierały się na kilku hipotezach [Yaylayan i in., 2003; Zyzak i in. 2003]. Jedna z hipotez tworzenia się akrylamidu podaje, że konieczna jest obecność akroleiny powstającej w wyniku oksydatywnej degradacji tłuszczu lub degradacji aminokwasów i białek, która ma wpływ na powstawanie kwasu akrylowego. Natomiast kwas akrylowy może reagować z amoniakiem tworząc akrylamid [Zyzak i in., 2003; Becalski i in., 2003, Friedman, 2003].

Ilość powstającego w gotowym produkcie akrylamidu jest związana z zawartością glukozy i asparaginy, występujących w surowcu. W ziemniakach za tworzenie się AA, odpowiedzialne są głównie cukry redukujące, natomiast w zbożach czynnikiem limitującym ilość powstałego związku jest zawartość asparaginy [Claeys i in., 2005]. Do wspomnianych wcześniej produktów o wysokiej zawartości AA należą czipsy i frytki. Ilość akrylamidu we frytkach (w półprodukcie i gotowym produkcie) oraz w czipsach uzależniona może być od czynników surowcowych, technologicznych oraz metod oznaczania.

Do czynników surowcowych mających wpływ na ilość powstającego akrylamidu w usmażonych produktach zaliczana jest odmiana ziemniaka oraz kształtujące jakość surowca: czynniki klimatyczne, uprawowe oraz warunki przechowywania ziemniaków [Friedman, 2003; Mestdagh i in., 2009]. Dobór wyselekcjonowanej odmiany ziemniaka do produkcji frytek, o odpowiednio niskiej zawartości cukrów redukujących w bulwie, jest jednym z ważniejszych czynników mających wpływ na ilość AA powstającego w czasie smażenia produktu [Friedman, 2003; Tajner-Czopek i in., 2012b; Tajner-Czopek, 2011; Lineback, 2012; Pedreschi i in., 2014].

Wprowadzenie w procesie produkcji frytek i czipsów pewnych modyfikacji parametrów technologicznych ma wpływ na kształtowanie zawartości akrylamidu w gotowych produktach [Kita, 2006; Tajner-Czopek i in., 2008; Mestdagh i in., 2008; Orzeł i Biernat, 2011; Rachwał i Nebesny, 2012; Wang i in., 2013; Pedreschi i in., 2014]. Do istotnych czynników technologicznych zaliczony jest proces: blanszowania,

podsuszenia przed smażeniem i smażenia oraz dosuszanie czipsów po smażeniu. Do najczęściej modyfikowanych etapów procesu technologicznego należy blanszowanie, w którym mogą być dobierane temperatura i czas trwania procesu [Mestdagh i in., 2008] lub też mogą być zastosowane różne roztwory blanszujące z dodatkiem np.: glicyny [Kita, 2006], CaCl_2 , MgCl_2 [Gökmen i Şenyuva, 2007], kwasu fitynowego [Wang i in., 2013] lub z możliwością obniżenia pH roztworu blanszującego [Kita, 2006]. Zastosowanie procesu podsuszenia przed smażeniem prowadzone może być w różnym czasie i temperaturze procesu [van Loon i in., 2007] wraz z zastosowaniem metody konwekcyjnej, mikrofalowej, mikrofalowo-próżniowej [Tajner-Czopek i in., 2007]. Proces smażenia ziemniaków może przebiegać również w różnym czasie oraz temperaturze [Becalski i in., 2003; Friedman, 2003] przy użyciu tradycyjnych lub próżniowych metod smażenia [Yuan i in., 2007] oraz z zastosowaniem dodatku różnych przeciwutleniaczy do oleju smaźalniczego [Kita i in., 2011].

Do oznaczania zawartości AA najczęściej stosowane są metody prowadzone przy użyciu chromatografii cieczowej (LC-MS-MS) lub chromatografii gazowej (GC-MS-MS) [Friedman, 2003; Lineback i in., 2011; Oracz i in., 2011]. Stosowane są również coraz nowocześniejsze techniki pomiarowe, tj.: HPLC-DAD (z układem detekcji diod – diode array detector), HPLC-UV (detekcji UV), GC (ECD) detekcji wychwytywania elektronów, strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE), testów immuno-enzymatycznych (ELISA), elektrochemicznych biosensorów czy też spektroskopii w zakresie podczerwieni (NIR) [Lineback i in., 2011; Oracz i in., 2011; Xu i in., 2014; Pedreschi i in., 2014].

Na podstawie badań przeprowadzonych w wielu ośrodkach naukowych nad możliwością obniżenia zawartości akrylamidu w gotowych produktach, Konfederacja Żywności i Napojów UE (CIAA) mogła przedstawić producentom żywności pewne zalecenia. Dzięki nim, mogą oni podjąć próbę obniżenia ilości AA w trakcie procesu produkcyjnego [CIAA, 2011; CIAA, 2013; Pyrzanowski i in., 2013]. Zalecenia te dotyczą użytych surowców, przebiegu produkcji żywności, w tym doboru parametrów procesów technologicznych [CIAA, 2011; CIAA, 2013].

Podsumowanie

Obniżenie zawartości akrylamidu w żywności, dzięki zastosowaniu odpowiedniego surowca oraz zabiegów technologicznych w procesie produkcji, jest możliwe, ale nie zostaje ten związek całkowicie wyeliminowany. Biorąc pod uwagę stwierdzoną szkodliwość AA dla zdrowia człowieka, powinno się spożywać mniejszą ilość produktów i płynów zawierających podwyższoną zawartość akrylamidu. Postępując zgodnie z założeniem systemu ALARA (as low as reasonably or achievable = tak niskie spożycie AA, jak jest to tylko możliwe do osiągnięcia) obniżamy zagrożenie ze strony

akrylamidu dla zdrowia i życia człowieka [FAO/WHO, 2002; JECFA, 2005]. Od czasu pierwszych doniesień na temat powstawania toksycznego akrylamidu w żywności minęło zaledwie 12 lat. Porównując dane zawartości tego związku podawane przez autorów w początkach lat 2000 i obecnie są one nawet kilkunastokrotnie niższe. Jest to rezultat natychmiastowej reakcji zarówno naukowców jak i producentów żywności zagrożonej obecnością akrylamidu. Rokrocznie pojawiają się prace naukowe coraz bardziej drążące problem AA. Równoległe producenci wyrobów spożywczych, korzystając z doświadczenia naukowców oraz najnowszych danych literaturowych wprowadzili do technologii modyfikacje prowadzące do zmniejszenia zawartości akrylamidu w produktach. W związku z tym, zostało znacznie zmniejszone zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka, wynikające z obecności AA w żywności.

Literatura

1. Becalski A., Brandy B., Feng S., Gauthier B.R., Zhao T. Formation of acrylamide at temperatures lower than 100⁰C: the case of prunes and a model study. *Food Additives and Contaminants*, 2011, 28(6), 726-730.
2. Becalski A., Lau B.P.-Y., Lewis D., Seaman S.W. Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 802-808.
3. Chen M.J., Hsu H.T., Lin Ch.L., Ju W.Y. A statistical regression model for the estimation of acrylamide concentrations in French fries for excess lifetime cancer risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50, 3867-3876.
4. CIAA., FoodDrinkEurope Acrylamide Toolbox, 2011.
http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/ciaa_acrylamide_toolbox09.pdf.
5. CIAA. FoodDrinkEurope Acrylamide Toolbox, 2013. Codex Code of Practice for the reduction of acrylamide in foods. Brussels.
http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/toolbox_acrylamide_201401_en.pdf.
6. Claeys W.L., De Vleeschouwer K., Hendrickx E. Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide. *Trends in Food Science and Technology*, 2005, 16, 181-193.
7. E.C., European Commission. SCF - Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food., Brussel, Belgium, 3 July, 2002 (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out131_en.pdf)

8. E.C., European Commission. Commission Recommendation of 10.1.2011 on investigations into the levels of acrylamide in food. 10.1.2011 Brussels, C(2010) 9681 final.
9. E.C., European Commission. Commission Recommendation of 8 November 2013 on investigations into the levels of acrylamide in food. Official Journal of the European Union. (2013/647/EU) Brussels, 2013, L 301/15-17.
10. EFSA., Scientific Report of EFSA. Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. EFSA Journal., 2005, 10 (10), 2938-2975.
11. FAO/WHO., Report of a Joint FAO/WHO Consultation on the health implications of acrylamide in food. Issued by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations. 25–27 June 2002. Geneva. (<http://www.who.int/fsf>)
12. FAO/WHO., Report of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Alimentarius Commission. Draft code of practice for the reduction of acrylamide in Foods, Rome, Italy, 29 June-04 July 2009.
13. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51, 4504-4526.
14. Friedman M., Levin C.E. Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(15), 6113-6140.
15. Gielecińska I., Mojska H. Ocena zawartości akryloamidu we frytkach ziemniaczanych. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna., 2009, 42(3), 486-490.
16. Gökmen V., Şenyuva H.Z. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. Food Chemistry, 2007, 103, 196-203.
17. Hogervorst J.G.F., Baars B.J., Schouten L.J., Konings E.J.M., Goldbohm R.A., van den Brandt P.A. The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: A comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. Critical Reviews and Toxicology, 2010, 40(6), 485-512.
18. IARC - International Agency for Research on Cancer., Acrylamide. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans., IARC, Lyon, France, 1994, 60, 389-433.
19. JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives., Report of the 64-th meeting: Acrylamide., February, 2005, Rome, Italy.
ftp://ftp.fao.org/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf
20. JECFA., Report of a Joint FAO/WHO Consultation WHO Headquarters. Health Implications of acrylamide in food. 25-27.06. 2002.Geneva.

21. Kita A., Wpływ wybranych parametrów technologicznych na jakość smażonych produktów przekąskowych. *Zeszyty Naukowe A.R. we Wrocławiu, Rozprawy*, 2006, CCXL, 537, 1-65.
22. Kita A., Tajner-Czopek A., Pęksa A., Rytel E., Lisińska G. Wpływ dodatku przeciwutleniaczy do oleju smażalniczego na zawartość akrylamidu w smażonych produktach ziemniaczanych. *Żywność Nauka Technologia Jakość.*, 2011, 5(78), 37-46.
23. Lineback D.R., Coughlin J.R., Stadler R.H. Acrylamide in Foods: A Review of the Science and Future Consideration. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2012, 3, 15-35.
24. Mestdagh F., De Wilde T., Fraselle S., Govaert Y., Ooghe W., Degrootd J-M. Verhe R., Van Peteghem C., De Meulenaer B. Optimization of the blanching process to reduce acrylamide in fried potatoes. *Food Science and Technology*, 2008, 41(9), 1648-1654.
25. Mestdagh F., van Peteghem C., de Meulenaer B. A farm-to-fork approach to lower acrylamide in fried potatoes. In: Yee N., Bussel W (ed.) *Potato IV. FOOD*, 2009, 3, (Special Issue 2), 66-75.
26. Mojska H., Gielecińska I., Stoś K. Determination of acrylamide level in commercial baby foods and an assessment of infant dietary exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50, 2722–2728.
27. Mojska H., Gielecińska I., Stoś K., Jarosz M. Zawartość akryloamidu w żywności w Polsce w świetle aktualnych zaleceń Unii Europejskiej. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2011, 92(3), 625-628.
28. Olesen P.T, Olsen A., Frandsen H., Frederiksen K., Overvad K., Tjønneland A. Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *International Journal of Cancer*, 2008, 122(9), 2094-2100.
29. Oracz J., Nebesny E., Żyżlewicz D. New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, 2011, 86, 23-34.
30. Orzeł D., Biernat J. Furan i akrylamid w żywności. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna.*, 2011, 44(3), 225-232.
31. Pedreschi F., Mariotti M.S., Granby K. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94, 9-20.
32. Pennisi M., Malaguarnera G., Puglisi V., Vinciguerra L., Vacante M., Malaguarnera M. Neurotoxicity of Acrylamide in Exposed Workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2013, 10, 3843-3854.

33. Pyrzanowski K., Michałowicz J., Pingot D., Bukowska B. Charakterystyka metod biologicznych, chemicznych i fizycznych ograniczających obecność akrylamidu w żywności. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2013, 46(2), 216-224.
34. Rachwał D., Nebesny E. Redukcja zawartości akrylamidu w produktach spożywczych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2013, 2, 219-227.
35. Rosén J., Hellenäs K.E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst.*, 2002, 127, 880-882.
36. Rytel E., Tajner-Czopek A., Pęksa A., Kita A., Miedzianka J. Wpływ rodzaju dodatku i temperatury ekstruzji na zawartość akrylamidu w chrupkach kukurydzianych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2012, 45(3), 315-319.
37. Tajner-Czopek A. Wpływ zabiegów technologicznych na właściwości frytek ziemniaczanych i zawartość akrylamidu. Wrocław. Monografie CXX, 2011, 1-86.
38. Tajner-Czopek A., Figiel A., Rytel E. Effect of potato strips pre-drying methods on French fries quality. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2007, 57, 2(A), 175-181.
39. Tajner-Czopek A., Kita A., Lisińska G. Zawartość akrylamidu we frytkach w zależności od temperatury i czasu smażenia. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2008, 530, 371-379.
40. Tajner-Czopek A., Rytel E., Kita A., Pęksa A., Miedzianka J. Wpływ parametrów obróbki termicznej na zawartość akrylamidu w wybranych przetworach. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2012a, 45(3), 320-325.
41. Tajner-Czopek A., Rytel E., Nemś A. Zawartość akrylamidu w wybranych produktach ziemniaczanych w zależności od użytego surowca. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin IHAR*, 2012b, 266, 163-171.
42. van Loon W.A.M., Visser J., Linssen J.P.H., Somsen D.J., Klok H. J., Voragen A.G.J. Effect of pre-drying and par-frying conditions on the crispness of French fries. *European Food Research and Technology*, 2007, 225(5), 929-935.
43. Wang H., Zhou Y., Ma J., Zhou Y., Jiang H. The effects of phytic acid on the Maillard reaction and the formation of acrylamide. *Food Chemistry*, 2013, 141, 18-22.
44. Xu Y., Cui B, Ran R., Liu Y., Chen H., Kai G., Shi J. Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.037>
45. Yaylayan V.A., Wronowski A., Locas C.P., Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 1753-1757.

46. Yuan Y., Chen F., Zhao G.H., Liu J., Zhang H.X., Hu X.S. A comparative study of acrylamide formation induced by microwave and convectional heating methods. *Journal of Food Science*, 2007, 72, C212-C216.
47. Zyzak D.V., Sanders R.A., Stojanovic M., Tallmadge D.H., Eberhart B.L., Ewald D.K., Gruber D.C., Morsch T.R., Strothers M.A., Rizzi G.P., Villagran M.D. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 4782-4787.
48. Żyżlewicz D., Nebesny E., Oracz J. Akrylamid – powstawanie, właściwości fizykochemiczne i biologiczne. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2010, 43(3), 415-427.

ALICJA ZACHARA

*Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Laboratorium Higieny Żywności i Żywienia
Wojewódzka Stacja Sanitarno –Epidemiologiczna w Rzeszowie*

ANALIZA ZAWARTOŚCI WWA W WYROBACH TRADYCYJNIE WĘDZONYCH A WYMAGANIA PRAWNE UE

W dobie przemysłowej produkcji i przetwarzania żywności daje się zauważyć bardzo duże zainteresowanie konsumentów żywnością regionalną oraz poddaną obróbce w tradycyjny sposób. W ostatnich latach w krajach wysoko rozwiniętych można zaobserwować odwrót od konsumpcji żywności masowej na rzecz wysokiej jakości produktów lokalnych o znanym pochodzeniu, smacznych i oryginalnych [Winawer i in., 2013].

Jednym z podstawowych sposobów realizacji polityki jakości w państwach Unii Europejskiej jest wprowadzony system znakowania, który chroni i promuje produkty regionalne przyznając im następujące oznaczenia: Chroniona Nazwa Pochodzenia (ChNP) lub Chronione Oznaczenie Geograficzne (ChOG) oraz produkty i potrawy tradycyjne przyznając im znak Gwarantowana Tradycyjna Specjalność (GTS). W 2013 r. Agencja Rynku Rolnego, wspierana przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi rozpoczęła trzyletnią kampanię informacyjną pt. „Trzy znaki smaku”. Celem kampanii jest zwrócenie uwagi konsumentów na szczególnie cechy, którymi wyróżniają się produkty regionalne i tradycyjne m.in. ich jakość wynika z doświadczeń i tradycji kształtowanych przez całe pokolenia, natomiast ochrona unijnego systemu powoduje, że fałszowanie jest karane [Anonim, 2013]. Również Polska Izba Produktu Regionalnego i Lokalnego, która jest organizacją zrzeszającą producentów stawia sobie za cel zbudowanie polskiego systemu ochrony dla produktów tradycyjnych regionalnych i lokalnych. Notyfikowany w Komisji Europejskiej system „Jakość Tradycja”, gwarantuje konsumentom wysoką jakość i autentyczność produktów oraz daje im możliwość odtworzenia procesu wytwarzania, poznania składu oraz pochodzenia wszystkich surowców użytych do wyrobu produktu wyróżnionego tym znakiem. Producent musi udowodnić trwającą 50 lat tradycję wytwarzania produktu, zaś w przypadku systemów europejskich minimum 30 letnią [Winawer i in., 2013; www.produktyregionalne.pl]. Natomiast Lista Produktów Tradycyjnych prowadzona przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi promuje i opisuje produkty powstałe z zastosowaniem tradycyjnych metod produkcji znanych od co najmniej 25 lat. Powyższy wpis pozwala producentowi uzyskać

derogacje procesu produkcyjnego, jeśli jest to konieczne dla zachowania jakości i oryginalności wytwarzanego produktu [www.minrol.gov.pl].

Wśród produktów wyróżnionych europejskimi bądź polskimi znakami jakości są wyroby mięsne wędzone w tradycyjnych wędzarniach. Za ich szczególne walory odpowiadają składniki dymu nadając im charakterystyczne cechy sensoryczne, których trudno szukać w wyrobach produkowanych na skalę przemysłową z zastosowaniem preparatów dymu wędzarniczego. Dym stosowany w procesie wędzenia jest mieszaniną gazowych, ciekłych i drobnych stałych produktów otrzymanych w wyniku spalania materiału drzewnego (m.in. trocin, zrębków, szczap, brykietów) przy ograniczonym dostępie tlenu atmosferycznego. W procesie pirolizy drewna otrzymujemy dwie podstawowe fazy – fazę rozpraszającą (powietrze i gazowe produkty spalania drewna) oraz fazę rozproszoną (para wodna, pary związków organicznych oraz cząsteczki stałe). Związki chemiczne zawarte w dymie wędzarniczym pełnią funkcję utrwalającą (przeciwutleniającą i bakteriostatyczną), aromatyzującą, barwotwórczą oraz impregnującą [Kołakowski i Bolejko, 2012; Kubiak, 2014].

Jakość dymu wędzarniczego zależna jest od rodzaju [Stumpe-Viksna, 2008] i wilgotności drewna, temperatury spalania, ilości dostarczanego tlenu oraz szybkości odprowadzania lotnych związków ze strefy spalania. Drewno twarde, o zwartej strukturze pali się wolniej niż drewno miękkie o luźniejszej strukturze i podczas tego procesu powstaje do 4,5-krotnie mniej 3,4-benzopirenu [Kowalski i in., 2006]. Najkorzystniejsze jest używanie drewna o twardości nie mniejszej niż 40MPa i masie właściwej powyżej 0,500g/cm [Surmiński, 2000]. Wraz ze zwiększeniem twardości i gęstości drewna zwiększa się ilość otrzymywanych składników dymu [Kołakowski, 2012]. Najczęściej do wędzenia używane jest drewno z drzew liściastych takich jak: buk, olcha, jesion, wiąz, dąb, klon, akacja, grusza. Na Podkarpaciu i w Małopolsce popularnym drewnem jest buczyna, olszyna i dębina. Olcha posiada średnią gęstość i charakteryzuje się bardzo małą zawartością garbników, dzięki czemu smak wędzonych produktów nie wykazuje goryczki, jest często używana do wędzenia ryb oraz różnych rodzajów mięs. W trakcie wędzenia można uzyskać kolor wędzonki od ciemnożółtego do brązowego w zależności od stężenia dymu. Dym z buczyny nadaje produktom po uwędzeniu barwę złocistożółtą oraz łagodny, aromatyczny zapach i smak. Walory smakowe i zapachowe oraz barwa wędzonki są w dużej mierze zależne od stosunku wagowego pentozanów do heksozanów wchodzących w skład hemiceluloz, których zawartość w drewnie waha się od 20-35%. W hemicelulozach drzew liściastych dominują pentozy, natomiast drzew iglastych heksozany [Surmiński, 2000]. Zdecydowana większość drzew iglastych nie nadaje się do wędzenia ze względu na zawartość większej ilości żywicy, przez które dym i wędzone produkty mają nieprzyjemny zapach, kwaśny odczyn oraz gorzki smak. Niepożądaną cechą jest też duża ilość sadzy osiadająca

na wędzonych produktach. Wyjątek stanowi jałowiec dodawany na końcowym etapie wędzenia, nadający wędzonym produktom specyficzny smak i aromat, z czego słynie m.in. kielbasa jałowcowa [WE 379/2011]. Do wędzenia należy używać drewna zdrowego, okorowanego, bez śladów zagrzybienia, zgnilizny czy też porażenia przez owady. Niedopuszczalne jest używanie drewna malowanego lub impregnowanego. Najlepsze jest tzw. drewno powietrzno- suche o wilgotności w granicach 15-20%.

Czas trwania wędzenia, stężenie dymu w komorze oraz wilgotność powietrza podczas obróbki w dużej mierze wpływają na intensywność osadzania się dymu na produkcie. Nie mniej ważnymi parametrami są wielkość batonów wędlin, odstęp między wędzonymi produktami oraz rodzaj osłonki. Badania wskazują, że penetracja WWA do wnętrza produktu wędzonego nie zachodzi intensywnie, a zdjęcie osłonki lub warstwy powierzchniowej znacząco obniża zawartość tych związków [Ciecierska i in., 2012].

Temperatura zżarzania i ilość dostarczanego tlenu jest ważnym czynnikiem wpływającym na skład dymu wędzarniczego [Šimko, 2002]. Największe stężenie pożądanych związków gazowych w dymie wędzarniczym występuje w zakresie temperaturowym 200-550°C [Yang i in., 2007]. Ilość substancji lotnych wydzielających się z drewna w temperaturze powyżej 500°C jest niewielka [Kowalski i in., 2006], natomiast w tej temperaturze powstaje benzo(a)piren [McGrath i in., 2003]. Maksymalna temperatura pirolizy drewna nie powinna być wyższa niż 425-450°C przy kontrolowanym dopływie powietrza do strefy żarzenia. Dym otrzymany przy małym dopływie powietrza zawiera mniej związków z grupy WWA niż przy pełnym dopływie powietrza. W wędzeniu konwencjonalnym stosuje się w zależności podrodzaju produktu i tradycji w danym regionie tzw. wędzenie zimne (w temperaturze dymu wędzarniczego ok. 15-20°C), ciepłe (powyżej 30°C do 60°C) i gorące (powyżej 60°C). Produkty wędzone w zbyt niskiej temperaturze cechuje pogorzelisty, kwaskowaty zapach oraz luźna tekstura mięsa, natomiast w zbyt wysokiej temperaturze otrzymujemy produkt osmolony o gorzkawym smaku. Charakterystyczny zapach i smak wędzonki jest wynikiem działania fenoli i związków karbonylowych zawartych w dymie, a także produktów ich reakcji z białkami i lipidami, szczególnie podczas gorącego wędzenia. W dymie wędzarniczym zidentyfikowano ok. 1100 związków chemicznych m.in. fenole, kwasy organiczne, alkohole i estry, aldehydy i ketony oraz węglowodory alifatyczne i aromatyczne.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA, poliareny) są powszechnie występującym zanieczyszczeniem w środowisku, tworzą się w procesie niepełnego spalania węgla, podczas którego przy niewystarczającym dostępie tlenu możliwe jest formowanie i zamykanie łańcuchów węglowych w wielopierścieniowe układy aromatyczne [Starski i in., 2011]. Zanieczyszczenie środowiska WWA może być

spowodowane przez katastrofy ekologiczne, gazy spalinowe, emisję zanieczyszczeń z zakładów przemysłowych, pieców domowych, a także pożary [Fismes i in., 2002; Samsøe-Petersen i in., 2002]. Ilość WWA na którą narażony jest człowiek zależy od prowadzonego stylu życia, sposobu odżywiania oraz palenia papierosów. W przypadku palaczy to narażenie dodatkowo zwiększa się o 2-5 µg/1 paczka papierosów [Nowak i in., 2008]. Na podstawie badań stwierdzono, że ponad 80% poliarenowy człowiek pobiera wraz z żywnością. Głównymi produktami wnoszącymi WWA do diety są produkty zbożowe, owoce morza, tłuszcze roślinne i zwierzęce, produkty mięsne i rybne, warzywa, orzechy i rośliny strączkowe, a także kakao, herbata, kawa [Wieczorek i in., 2011]. Oprócz procesów wędzenia WWA powstają podczas termicznej obróbki żywności takiej jak: grillowanie, smażenie, suszenie oraz pieczenie.

O transporcie oraz kumulacji WWA decyduje ich rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa, lotność, zdolność do adsorpcji na powierzchni pyłów oraz duża rozpuszczalność w tłuszczach – związki te mogą kumulować się w tkance tłuszczowej zwierząt [Starski i in., 2011]. Grupa WWA liczy kilkaset związków, które zawierają od dwóch do kilkunastu, a nawet kilkudziesięciu pierścieni benzenowych połączonych ze sobą, co decyduje o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i toksycznych. Duża ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych posiada właściwości kancerogenne, a także może dawać silne efekty mutacji biologicznych [Walker, 2002; Jira i in., 2006], część związków mimo nie udowodnionych właściwości kancerogennych, może wykazywać działanie synergistyczne. Związki te wykazują stosunkowo niską toksyczność ostrą, ale bardzo dużą toksyczność przewlekłą. Amerykański Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii (*National Institute of Standards and Technology*) zamieścił ponad 660 wzorów strukturalnych WWA w NIST Special Publication 922/2011 nt. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Structure Index* [www.nist.gov]. Przez ostatnie kilkanaście lat związki te podlegały ocenie Międzynarodowego Programu Bezpieczeństwa Chemicznego przy Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), Komitetu Naukowego ds. Żywności (SCF, ang. *Scientific Committee on Food*) przy Komisji Europejskiej oraz Wspólnego Komitetu Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (JECFA, ang. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*).

Na początku 2014 r. w mediach, gazetach oraz różnorodnych fachowych czasopiśmie branżowych ukazały się artykuły dotyczące zmian dopuszczalnych zawartości WWA w prawie unijnym. Największe obawy producentów oraz zwolenników tradycyjnych wędzonek budziło obniżenie od 1 września 2014 r. dopuszczalnych limitów poliarenowy również w wyrobach tradycyjnie wędzonych - dla BaP do 2 µg/kg oraz dla sumy benz(a)antracenu, benzo(b)fluorantenu, benzo(a)pirenu oraz chryzenu do 12 µg/kg [WE 835/2011].

Wprowadzenie tych regulacji konsultowano z dużymi firmami z branży mięsnej w ramach Rady Gospodarki Żywnościowej. Niestety w okresie konsultacji przed resortem zdrowia nie byli reprezentowani mali producenci - lokalni wytwórcy wędzonych wędlin. Wyroby, które produkują, posiadają często unijne certyfikaty, które chronią recepturę z uwzględnieniem procesu wędzenia w tradycyjnych wędzarniach, gdzie spalanie drewna odbywa się bezpośrednio pod drążkami z kielbasą poddawaną wędzeniu np. w przypadku kielbasy jałowcowej [UE 918/2010].

EFSA opublikowała dane dotyczące 10 000 wyników analiz przekazanych przed 2006r. przez 18 państw członkowskich (bez Polski) skąd można uzyskać informacje o poziomie narażenia na WWA w różnego rodzaju środkach spożywczych. Również na podstawie analizy wyników badań przeprowadzanych w ostatnich latach przez Inspekcję Weterynaryjną (IW) pełniącą bezpośredni nadzór nad produkcją zwierzęcą oraz analiz wykonywanych w akredytowanych laboratoriach Państwowej Inspekcji Sanitarnej (PIS) można ocenić zawartość związków WWA w próbkach wędzonego mięsa i produktów mięsnych oraz próbkach wędzonych ryb i produktach rybołówstwa. Przedstawiane dane nie wykazują jednak rozróżnienia na produkty wędzone metodami tradycyjnymi i pozostałymi, w tym również z zastosowaniem preparatów wędzarniczych. W przypadku badań WWA pobór próbek oraz zastosowane procedury badawcze muszą spełniać wymagania zawarte w Rozporządzeniu WE 836/2011, które określa metody pobierania próbek (m.in. wielkość próbek, rodzaj opakowania) oraz kryteria dla metod analiz służących do celów urzędowej kontroli limitowanych poziomów.

Z ogólnych danych analizowanych przez rząd wynikało, że jedynie ok. 20% próbek przekracza normy, które będą obowiązywały od 1 września 2014r. Analizując jednak wyniki badań produktów wędzonych pochodzących z południowej części Polski można stwierdzić zdecydowanie większą rangę problemu. Interesów zagrożonej branży wędliniarskiej postanowili bronić sami producenci - właściciele ponad 150 firm mięsnych z Podkarpacia i Małopolski, którzy zawiązali Polskie Stowarzyszenia Producentów Wyrobów Wędzonych Tradycyjnie.

W 2014r. Główny Lekarz Weterynarii zorganizował pilotażowy program monitoringu WWA w wędzonych tradycyjnie produktach pochodzenia zwierzęcego. Przebadano 170 próbek mięsa i produktów mięsnych oraz 30 próbek ryb wędzonych tradycyjnymi metodami. Analiza wyników badań próbek pobranych z wszystkich województw wskazuje na wystąpienie przekroczeń aktualnie obowiązujących limitów w kielbasach wędzonych tradycyjnie na poziomie 15,7%, natomiast w wędzonkach na poziomie 4,4%. W rybach wędzonych metodami tradycyjnymi nie stwierdzono przekroczeń. Oceniając otrzymane wyniki w stosunku do mających obowiązywać od 01.09.2014 r. wymagań można stwierdzić zdecydowanie większy odsetek produktów, które nie spełnią zaostrzonych norm: kielbasy tradycyjnie wędzone - 50%, wędzonki -

20,6%. Analiza wyników badań próbek pobranych w województwie podkarpackim (30 próbek) pokazuje, że nowych limitów nie spełni – 70% produktów, natomiast w województwie małopolskim (28 próbek badanych) - 64,3% [Kijanek i in., 2014].

Zastosowanie w trakcie wędzenia kiełbas dymogeneratora z paleniskiem tradycyjnym skutkowało uzyskaniem przekroczonych zaostrożonych wymagań w ok. 65% próbkach dla sumy benz(a)antracenu, benzo(b)fluorantenu, benzo(a)pirenu oraz chryzenu. W próbkach wędzonych zmodyfikowanymi metodami z zastosowaniem urządzeń wędzarniczych typu Atmos na przemian z tradycyjnym wędzeniem nad paleniskiem, z zastosowaniem zasuw lub kanału doprowadzającego dym nie uzyskano produktów o akceptowalnych parametrach.

Monitoring zanieczyszczenia WWA w wędlinach wędzonych metodami tradycyjnymi został przeprowadzony na polecenie Głównego Inspektora Sanitarnego przez Państwową Inspekcję Sanitarną w I kwartale 2014r. W Krajowym Laboratorium Referencyjnym ds. WWA NIZP-PZH w Warszawie przebadano 100 próbek wyrobów wędzonych metodami tradycyjnymi pochodzących z obrotu handlowego z całego kraju. Wyniki badań potwierdziły, że w przypadku zaostrożenia unijnych norm ponad 50 procent produktów nie spełni nowych wymagań. W województwie podkarpackim i świętokrzyskim samorządy chcąc wesprzeć lokalnych producentów sfinansowały badania ich wyrobów. Wyniki badań po przekazaniu do Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi mają posłużyć resortowi do rozmów z Komisją Europejską w sprawie wprowadzenia zmian do rozporządzenia. Wyniki próbek zbadanych na zlecenie samorządu w województwie podkarpackiego pokazują, że 57% produktów nie spełni zaostrożonych norm Rozporządzenia UE 835/2011.

W Polsce zarejestrowanych jest ok. 950 podmiotów, które stosują tradycyjne metody wędzenia. W trakcie zorganizowanych przez MRiRW w 2014r. szkoleń dla producentów w ramach projektu „Wpływ procesu wędzenia na bezpieczeństwo żywności” współfinansowanego ze środków UE przedstawiono wyniki badań monitoringowych oraz dostępne dane naukowe nt. procesu wędzenia. Jednoznacznie można stwierdzić, że powstawanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych jest uzależnione od: gatunku i wilgotności drewna, temperatury spalania oraz utleniania, sposobu przepływu dymu przez komorę oraz czasu i sposobu wędzenia, a także wilgotności powierzchni wyrobów i ich wielkości. Odpowiednie praktyki podczas wędzenia mogą ograniczyć powstawanie szkodliwych substancji. Takie działania to na przykład odsunięcie paleniska czy miejsca wytwarzania dymu od produktu, oczyszczanie dymu, stosowanie odpowiedniego drewna - nie wszystkie te parametry można dowolnie regulować, ponieważ konsumenci poszukują określonego rodzaju produktu i oczekują tradycyjnego wyglądu i smaku. W przypadku wędzarni tradycyjnych

opartych o naturalny przepływ powietrza, to od wiedzy, doświadczenia oraz umiejętności panowania nad warunkami spalania będzie zależało bezpieczeństwo uzyskanego wyrobu.

Literatura

1. Anonim. Trzy znaki smaku. Szlakiem dobrego smaku. Wydawca: Agencja Rynku Rolnego, Warszawa 2013.
2. Ciecierska M, Obiedziński M. Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w produktach mięsnych wędzonych oznaczona metodą GC-MS. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, 45(3), 402-407.
3. Fismes J., Perrin-Ganier C., Empereur-Bissonet P., Morel J.L. Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *J. Environ. Qual.*, 2002, 31(5), 1649-1656.
4. Jira, W., Ziegenhals, K., Speer, K. PAK in geräucherten Fleischerzeugnissen nach den neuen EU-Anforderungen. *Fleischwirtschaft*, 2006, 86(10), 103-106.
5. Kijanek T., Niewiadomska A. Ocena ryzyka występowania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w żywności pochodzenia zwierzęcego poddanej procesowi wędzenia. Materiały szkoleniowe w ramach projektu "Wpływ procesu wędzenia na bezpieczeństwo żywności" opracowanego przez MRiRW 2006.
6. Kołakowski E. Technologia wędzenia żywności. Powszechne Wydawnictwa Rolnicze i Leśne, Warszawa 2012.
7. Kowalski R., Pyrcz J. Wędzenie produktów mięsnych. *Gospodarka Mięsna*, 2006, 6, 10-12.
8. Kubiak M.S. Proces wędzenia, chemizm i regulacje prawne Unii Europejskiej. *Przemysł Spożywczy*, 2014, 68, 10-13.
9. Kuna P. Zanieczyszczenie wybranych komponentów środowiska przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) w Dąbrowie Górniczej. *Nauka Przyr. Technol.*, 2011, 5, 4, 8, 1-9.
10. Lista Produktów Tradycyjnych. [online]. MRiRW [dostęp: 15.06.2014.]. Dostępna w Internecie: <http://www.minrol.gov.pl/pol/Jakosc-zywnosci/Produkty-regionalne-i-tradycyjne/Lista-produktow-tradycyjnych>.
11. McGrarh T.E., Chan W.G., Hajaligol R. Low temperature mechanism for the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of cellulose. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, 2003, 66, 51-70.
12. Nowak A., Libudzisz Z. Karcynogeny w przewodzie pokarmowym człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 4(59), 9-25.
13. Polska Izba Produktu Regionalnego i Lokalnego [online] [dostęp: 15.06.2014.]. Dostępna w Internecie: <http://www.produktyregionalne.pl>

14. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 835/2011 z dnia 19 sierpnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 odnośnie do najwyższych dopuszczalnych poziomów wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środkach spożywczych (Dz.U.UE L 215/4 z dnia 20 sierpnia 2011 r.)
15. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 836/2011 z dnia 19 sierpnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie Nr 333/2007 z dnia 28 marca 2007 r. ustanawiające metody pobierania próbek i metody analiz do celów urzędowej kontroli poziomów ołowiu, kadmu, rtęci, cyny nieorganicznej, 3-MCPD i benzo[a]pirenu w środkach spożywczych (Dz.U.UE L 215/9 z dnia 20.08.2011r.).
16. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) Nr 379/2011 z dnia 18 kwietnia 2011 r. rejestrujące w rejestrze gwarantowanych tradycyjnych specjalności nazwę [„Kielbasa jałowcowa”(GTS)]. (Dz.U.UE.L.2011.103.2 wersja: 2011-05-09).
17. Samsoe-Petersen L., Larsen E.H., Larsen P.B., Bruun P. Uptake of trace elements and PAHs by fruit and vegetables from contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, 36(14), 3057-3063.
18. Šimko P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *J. Chromatogr. B*, 2002, 770, 3-18.
19. Starski A., Jędra M. Ocena zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w oleju rzepakowym produkowanym w Polsce. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011, 44(4), 1054-1060.
20. Stumpe-Viksna I., Bartkevics V., Kukare A., Morozovs A: Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chem.*, 2008, 110, 794-797.
21. Surmiński J. *Zarys chemii drewna*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu, Poznań 2000.
22. Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B. *Podstawy ekotoksykologii*. PWN, Warszawa 2002.
23. Wieczorek J., Wieczorek Z. Pobranie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z żywnością. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011, 3, 725-731.
24. Winawer Z., Wujec H. *Produkty regionalne i tradycyjne we wspólnej polityce rolnej*. Wydawca Europejski Fundusz Rozwoju Wsi Polskiej, Warszawa 2013, wyd. II. A
25. www.nist.gov/mml/analytical/organic/upload/SP-922-Polycyclic-Aromatic-Hydrocarbon-Structure-Index-3.pdf
26. Yang H., Yan R., Chen H., Lee D.H., Zhung Ch. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 2007, 86, 1781-1788.

27. Zalecenie Komisji z dnia 4 lutego 2005 r. w sprawie dalszego badania poziomów wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w niektórych środkach spożywczych.(2005/108/WE).

QUALITY AND SAFETY OF MEAT AND MEAT PRODUCTS IN THE SLOVAK REPUBLIC

Abstract

Since 2008, the continuous exports of live animals have increased, the gross domestic beef and pork meat and meat products have been reduced and constantly imports have increased. Slovakia takes more than 78% of its pork production, while imports constitutes about 88% of total consumption. There was over 67% of total beef production exported and import comprised 62% of total consumption. In 2013, official veterinary inspections were carried out in 1276 approved establishments and approved stores, in total 12 904 veterinary checks. Deficiencies were found in 307 establishments (24.06%). Altogether, 2 244 hygiene deficiencies were identified.

Introduction

Meat quality has always been important to the consumer, and it is especially critical issue for the meat industry in the 21st century. As consumer demand for high quality meat is increasing in most countries, the meat industry should consistently produce and supply quality meat that is tasty, safe and healthy for the consumer to ensure continued consumption of meat products. In order to produce high quality meat, it is necessary to understand the characteristics of meat quality traits and factors to control them. Fresh meat quality is difficult to define because it is a complex concept determined by consumer preferences. Because fresh meat is the animal tissue that is suitable for use as food, the quality characteristics are influenced by various factors such as muscle structure, chemical composition, chemical environment, interaction of chemical constituents, *postmortem* (p.m.) changes in muscle tissues, stress and pre-slaughter effects, product handling, processing and storage, microbiological numbers and populations, etc. In particular, fresh meat quality is directly related to muscle fiber characteristics because skeletal muscles mainly consist of muscle fibers. The muscle fibers are characterized by their morphological traits, and contractile and metabolic properties [Lee et al., 2010].

The important quality traits for fresh meat are color, WHC, texture and amount of fat (intramuscular fat/ intermuscular fat/subcutaneous fat), while the important traits for eating quality of cooked meat are tenderness, flavor and juiciness. In general, consumers rate color as the most important quality trait for fresh meat, while tenderness is

rated as the most important palatability trait for cooked meat followed by flavor and juiciness [Glitsh, 2000].

However, this can vary among consumers depending upon past experiences and cultural background. Therefore, the order of importance of meat quality traits can vary by country [Warner et al., 2010]. Quality traits of fresh meat are categorized based on major intrinsic and extrinsic factors. Generally, intrinsic factors are the physiological characteristics of meat such as AQT and EQT, whereas extrinsic factors are the RQT of meat products [Joo and Kim, 2011]. All these traits contribute to the consumer's expectation of high quality meat. Consumers determine quality meat as one with desirable color, firm texture, low drip, high marbling, and moderate visible fat and fresh meat odor, while discoloration, soft texture, large amount of drip, low marbling, excessive visible fat and abnormal meat odor are considered as poor quality traits for fresh meat. Also, the consumer expects quality meat that is reliable in relation to safety, nutrition, sustainability and ethics [Troy and Kerry, 2010].

During the last decade food safety research and governance came to realize that a new strategy of collaboration between public health sector and animal health sector is needed as well as a partnership of public and private actors in the agri-food chain. Public authorities, private industries and organizations and universities in the fields of animal health and public health should collaborate regarding regulations and guidelines, scientific methods and research programs, surveillance systems and data exchange [Hueston, 2003; Stärk et al., 2006; FAO, 2008; Kahn et al., 2009; Tanner and Zinsstag, 2009; Salman, 2009; Wichmann-Schauer et al., 2009; Conraths et al., 2011]. This common approach to combat food borne hazards is summed up under the terms “Veterinary Public Health” or “One Health concept”. A well known example for veterinary public health is the appreciation of the slaughterhouse as the key point of zoonoses surveillance [Codex Alimentarius Commission, 2005] with meat inspection having dual responsibility for animal health (upstream in the food chain) and public health (downstream in the food chain) [OIE, 2011a]. Since 2002 the World Organisation for Animal Health (OIE) has a mandate to work in collaboration with the Codex Alimentarius Commission (CAC) and other international organizations [OIE, 2011b].

Safety and meat quality

The strategic objectives of the Slovak Republic in the field of food safety are based on the strategic objectives defined by the European Union *acquis communautaire*, the international commitments of the Slovak Republic, as well as the national interests and obligations of the government:

1. Ensure a high level of protection of human, animal and plant health;
2. Scientific risk assessment as a basis for decision making and risk management;

3. Effective official inspection at all stages of the food chain;
4. Effective communication with the professional and wider public.

Food safety is based on an integrated approach and the principle of "from farm to fork" understood as the safety of the entire food chain from health and plant health and welfare of animals through feed safety to food safety, including food supplements and materials in contact with food. Food safety policy is based on risk analysis, which consists of three components: risk assessment, risk management and risk communication, and food safety is addressed at three levels - international, Community and national. At the international level within the framework of the joint program of the FAO / WHO Codex Alimentarius international standards for food are handled, OIE animal health and the OECD deals with security issues of biotechnology.

At the community level it belongs below the so-called Food Safety old approach that involves a high degree of harmonization of the *acquis communautaire* in the entire food chain. Risk management at the community level is charged with DG SANCO, European Parliament and European Council. Audits of the official checks in Member States and the third countries shall be done by the FVO. Risk assessment and risk communication within the EFSA, training and education on food safety is ensured at Community level by EAHC; alternative methods of dealing with ECVAM and its network Parera.

Requirements for quality of food is given by common european legislation. In cases where the quality requirements are not established by common legislation, individual Member States regulate these requirements in national legislation.

Meat industry is one of the strategic and key sectors of the food industry in terms of diet of the population in general, but also in terms of providing the population with food. Share of total production and sales in food industry reaches 13%.

Raw materials base

Meat industry is processing raw materials originating from Slovakia but also from abroad, there are half-carcasses and quarters imported, if necessary, finished cutting meat from which meat products are produced. Effect of the export and import of live animals, carcasses of cattle and pigs significantly affects the Slovak slaughterhouses and meat handlers. In 2012, the total supply of pork was 205 thousand t, of which domestic production accounted for 77 thousand t (37.5%), and import 124 thousand t (60.5%).

Table 1. Pork balance in tonnes (t)

Indicator	2008	2009	2010	2011	2012
Initial stocks	4 726	2 379	5 945	3 245	3 230
Gross domestic production	99 723	86 558	86 621	88 197	77 767
Import	107 425	110 626	120 137	115 015	124 275
- in the EU	106 815	110 001	119 990	114 542	124 088
Change in stocks	- 72	79	0	7	0
Global tender	211 946	199 483	212 703	206 449	205 272
Export	31 701	23 566	41 617	50 089	61 108
- in the EU	31 138	23 489	41 546	49 345	59 821
Meat consumption	175 742	168 583	166 575	151 886	140 717
Other disposals	2 125	1 389	1 266	1 245	1 208
Overall use	209 567	193 538	209 458	203 220	203 033
Closing stocks	2 379	5 945	3 245	3 230	2 239

Source: VÚEPP

Total supply at beef in 2012 stood at 32 thousand t, domestic production reached 20 thousand t (64.3%) and imports 11 thousand t (34.7%).

Table 2. Beef balance in tonnes

Indicator	2008	2009	2010	2011	2012
Initial stocks	1 192	586	319	354	311
Gross domestic production	28 571	27 999	26 319	22 246	20 737
Import	8 386	7 052	11 835	11 777	11 175
- in the EU	8 163	6 989	11 553	11 587	10 980
Change in stocks	- 4	- 83	0	2	0
Global tender	38 153	35 719	38 473	34 376	32 223
Export	13 170	13 884	15 919	15 060	13 979
- in the EU	11 967	11 640	14 005	12 898	8 859
Meat consumption	23 803	21 006	21 813	18 640	17 798
Other disposals	594	511	387	364	264
Overall use	37 567	35 400	38 119	34 064	32 042

Source: VÚEPP

Production of meat and meat products and production capacity utilization

Slaughter, cutting carcasses of slaughtered animals and meat products copy the amount of purchased animals from which market offer is derived. Since 2008, the continuous exports of live animals have increased, the gross domestic beef and pork meat and meat products have been reduced and constantly imports have increased. The export of live animals at the same time takes the value added, whereas back are imported meat products with higher added value compared to raw material. From the balance point of view, Slovakia takes more than 78% of its pork production, while imports constitutes about 88% of total consumption. The beef export exceed 67% of its production and import comprises 62% of total consumption.

Table 3. Selected capacities in 2012 at meat industry production

Commodity	units	capacity	production	% utilization
Slaughter cattle	t z.hm.	53 170	11 986	22.54
Slaughter pigs	t z.hm.	182 431	61 400	33.66
Meat carcasses - bovine	tonne	26 968	4 604	17.07
Meat carcasses - pork	tonne	96 629	57 374	59.38
Meat carcasses - veal	tonne	540	11	2.04
Meat carcasses - sheep, goats	tonne	1 499	434	28.95
Refrigerators meat in vise	tonne	34 211	12 452	36.40
Worked meat cutting	tonne	67 285	26 063	38.74
Meat products	tonne	88 668	58 382	65.84
Non heated meat products	tonne	14 858	10 794	72.65
Heated meat products	tonne	15 158	11 763	77.60
Pork lard	tonne	478	253	52.93

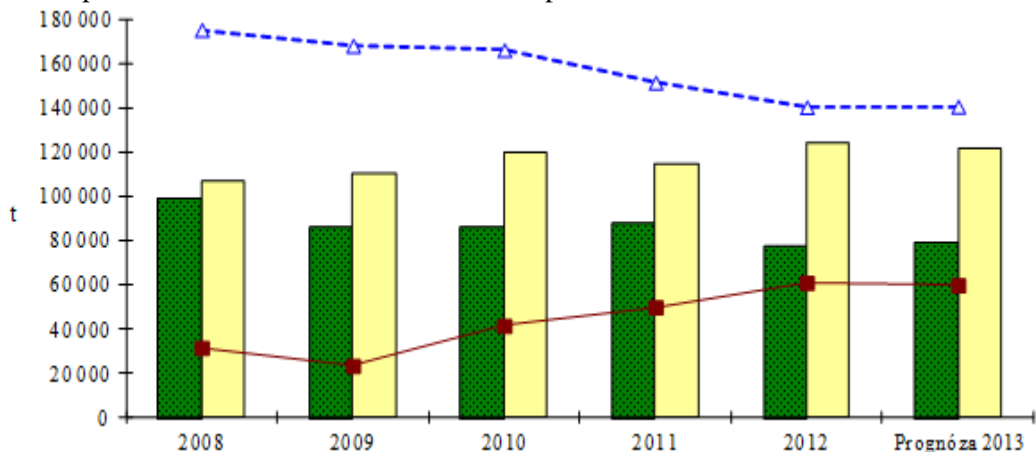
Source: POTRAV (MPRV SR) 1-02, CD MPRV SR

Table 4. Trend of pork meat products

	2008	2009	2010	2011	2012
Meat products	87 996	87 452.3	70 397.8	63 350.2	58 382
Non heated meat products	13 458	12 763.0	14 298.5	17 220	10 794
Heated meat products	23 215	21 252	12 109.8	5 594	11 763
Pork lard	452	389	120.2	199	253

Source: POTRAV (MPRV SR) 1-02, CD MPRV SR

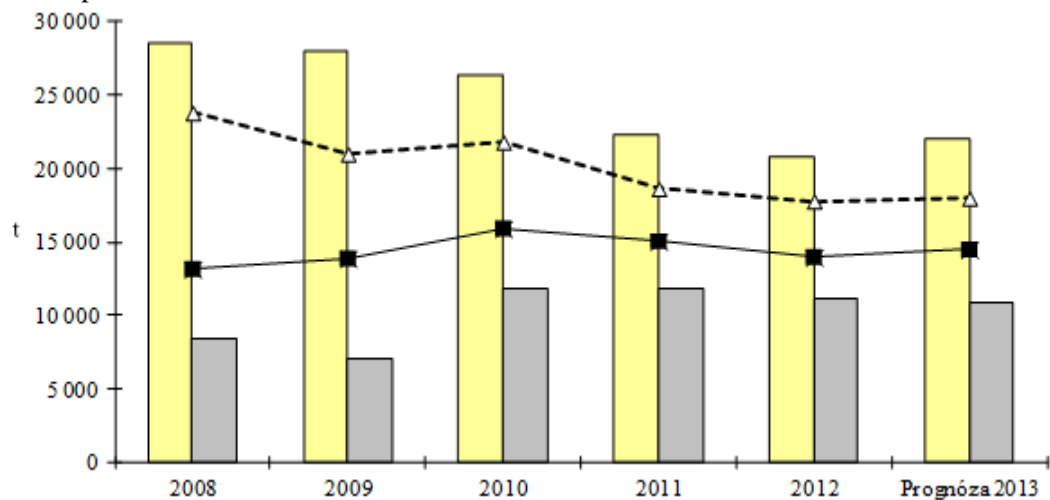
Development indicators balance the market in pork



Green-Gross domestic production, Yellow-Import, Triangle marks-Consumption of meat, Cube signs-Export

Graph 1. Evolution in balance indicators at pork market

Development of balance indicators at beef market



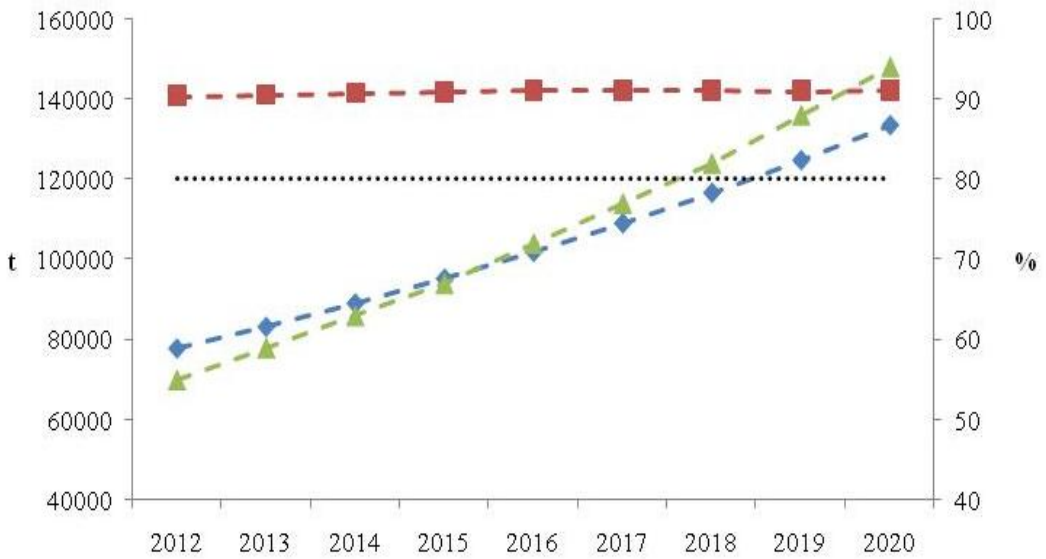
Yellow-Gross domestic production, Grey-Import, Triangle signs-Consumption of meat, Cube signs-Export

Graph 2. Balance indicators in beef market

Table 5. Estimated development of the balance at pork till 2020 in tonnes

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
production	77 767	83 211	89 035	95 268	101 937	109 072	116 707	124 877	133 618
consumption	140 717	141 000	141 400	141 700	142 000	142 140	142 000	141 950	142 000
self-sufficiency	55	59	63	67	72	77	82	88	94

Source: estimate MPRV SR, own calculations

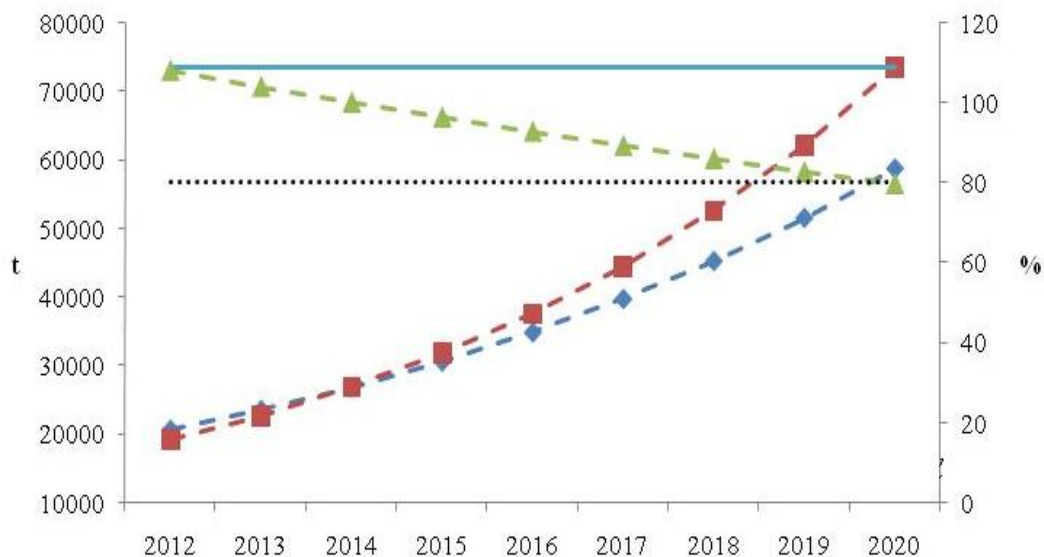


Manufacture-blue signs, Consumption-red cubes, self sufficiency-green triangles

Graph 3. Estimated development pigmeat production in 2020

Source: estimate MPRV SR, own calculations

At beef production there is no need to increase due to the fact that at present it reaches 108.2% of self-sufficiency. Slovakia is for long time in overdue in the consumption of beef per recommended dose, graph 3 shows the calculation of the consumption of beef with a view to achieve the recommended dose in 2020 and production in response to 80% of sufficiency. To achieve this scenario the consumption would need to be increased by 18.3% per annum and production by 14% per year. Currently, Slovakia does not have sufficient production capacity to meet this assumption.



Manufacture-blue signs, Consumption-red cubes, blue line- recommended dose, self sufficiency-green triangles, 80% self sufficiency-black dots

Graph 4. Assumption of the development in beef consumption increasing to the recommended dose level in 2020

Source: estimate MPRV SR, own calculations

Official checks of products of animal origin by relevant authorities were done by veterinary administration under the Act no.39/2007 Coll. and according to the law no.152/1995 Z.z. in accordance with Regulation (EC) no.882/2004 and Regulation (EC) no.854/2004 to protect the health of animals and public health at all stages of the food chain, from primary production to retail sales. The main objective of the official checks on products of animal origin was verification of compliance with legislation on food quality and safety:

1. Determination of microbiological and chemical contamination (contaminants, residues veterinary drugs, pesticide residues, food additives)
2. Check of food labeling
3. Protecting consumers against abusive and illegal practices (control of labeling and food composition)
4. Control of food with protected designations.

In 2013, official veterinarians of the Regional Veterinary and Food Administration (hereinafter "RVPS") made at 97 approved slaughterhouses (which represents a decrease compared to 2012 by 8 establishments) *ante mortem* and *post mortem* controls at 740,711 pieces of domestic ungulates, that represents compared to

2012, a decrease of 67,866 units (assessed as non-edible items there were 834 domestic ungulates, which represents a decrease compared to 2012 about by 266 pieces). At the end of the year, we registered a list of approved establishments in the amount of 17 with the discontinuance of their work and 16 establishments in which there have been approved modifications to the requirements in design and equipment. At the official veterinary inspection of carcasses of cattle and pigs there were the most frequent diagnosis of deviations in sensory characteristics, masculine odor in cryptorchids and boars, non-infectious nature of the disease (Dietary disorders), Hydrema (dropsy) and meat cachexy. Moreover, in the official veterinary inspections of sheep carcasses, parasitosis occurred. Sampling for laboratory examination was carried out under official inspection *ante mortem* and *post mortem* inspection in accordance with the Regulation (EC) no. 854/2004, whenever it was necessary to reach the definitive diagnosis or the detection of animal diseases or suspected residues of antimicrobials.

In 2013, official veterinary inspections were carried out in 1276 approved establishments and approved stores in total 12,904 veterinary checks. Deficiencies were found in 307 establishments (24.06 %). Altogether, 2,244 hygiene deficiencies were identified. The most common were found building-technical defects (damaged walls, floors, poor maintenance equipment) and problems at hygienic conditions. For the deficiencies found operators in food business were imposed to 2455 of measures (47 in the decisions or other measures), 22 penalties in the amount of € 132,532, and in 2 cases there was approval of establishment cancellation.

Checks at monitoring of processing of carcasses of domestic ungulates were carried out in approved slaughterhouses, including food establishments with a small volume production. Thus 753 inspections were performed at 33 sanitary indicators in carcasses of cattle and 580 checks were provided in 25 indicators for carcasses of domestic pigs. The most common hygienic deficiency in the case of slaughter cattle is failure to perform sorting of animals according to the purity and defects in the processing, implementation and use of appropriate killing systems and the risk of secondary contamination in naked muscle forelimbs of carcasses.

At 153 inspections in 36 establishments of controlled small-volume manufacturers, deficiencies were not found at exceeding the prescribed limited production capacity. For official controls in 2013 2,298 samples of meat products were taken, totally failed 57 samples (2.5%), that is a decrease compared to 2012 by 1.6%. Labeling requirements did not meet 8 samples (2.2% of samples taken). At 4 samples (1.1% of the samples analyzed for allergens) the presence of allergens was not labelled (the presence of unlabeled celery, soy protein and milk proteins). 14 samples did not comply with the composition (3.12% analyzed on indicators of quality - in most cases there was a false statement of the amount of meat); exceeding of the maximum level

of NaCl was found in 5 samples (2.5% of examined). Requirements for food additives did not comply one sample (0.3% - the presence of synthetic dyes). 14 samples taken largely on the basis of complaints of consumers (6.11 %) did not comply with sensory needs. 5 samples failed in microbiological criteria (0.83 % of microbiological examination - Detection of pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes*). At requirements on contaminants 3 samples failed (0.6 % of examined - inadmissible PAU content).

Minced meat and meat preparations, mechanically separated meat

In 2013, there was under official control, collected 446 samples of minced meat and meat preparations and 15 samples of mechanically separated meat. All samples MSM were of satisfactory quality. 12 samples did not comply at minced meat and meat preparations (2.69%). Sensory requirements failed 6 samples (13.33%), they were taken on the basis of complaints of consumers. 5 samples (1.75%) did not comply with the microbiological requirements for the presence of *salmonella*. One sample (1.67%) did not comply with the requirements of the food additives (the presence of preservative substances - benzoic acid and sorbic acid in minced meat).

Rendered animal fats

In 2013, under official control were collected 303 samples of rendered animal fats; 6 samples (1.98%) failed, which is a worsening by 0.28% compared to 2012. 4 samples (3.25%) failed to pass for analytical parameters, namely the failure to meet standards of free fatty acids. 2 samples (1.45%) failed to pass for failure standards for peroxides.

Targeted monitoring for the presence of RIL in pork (refrigerated, frozen and quick-frozen state) and offal - liver

Based on the publicized information on the use of veterinary medicines at pig breeding in the Member States, SVFA ordered RVFA to carry out targeted checks, the purpose was the sampling of pork in a place of slaughtering, distribution stores and shops. Of the total number of examined samples of pork (28), in neither case was confirmed positive sample for RIL, all samples met this requirement.

Conclusion

Production of meat and meat products in the Slovak Republic is under the constant control of the State Veterinary and Food Administration. In Slovakia there have not yet been recorded any food scandals at meat and meat products. The quality of meat products is particularly difficult to control. The quality of meat products imported into the Slovak Republic is often problematic. By the year 2020 is the time increase

self-sufficiency in meat production to 80% from current about 46%. To enhance the quality of meat products will be necessary to perform the checks on their originality and authenticity. Inspection of meat imported from abroad must be mainly formed on the presence of microorganisms and contaminants.

Literature

1. Codex Alimentarius Commission. Code of Hygienic Practice for Meat. CAC/RCP 58/2005.
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10196/CXP_058e.pdf.
2. Conraths F.J., Schwabenbauer K., Vallat B., Meslin F.X., Füssel A.E., Slingenbergh J., Mettenleiter T.C. Animal health in the 21st century – A global challenge. *Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 102(2), 93-97.
3. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Contributing to One World, One Health. A Strategic Framework for Reducing Risks of Infectious Diseases at the Animal-Human-Ecosystems Interface, 2008.
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/aj137e/aj137e00.pdf> [2010-08-10].
4. Glitsh K. Consumer perceptions of fresh meat quality: Cross-national comparison. *British Food Journal*, 2000, 102, 177-194.
5. Hueston W.D. Science, politics and animal health policy: epidemiology in action. Global context, generic tools: *Epidemiology for disease control on an international stage*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 60(1), 3-12.
6. Joo S.T., Kim G.D. Meat quality traits and control technologies. *Control of meat quality*, 2011, 1-29).
7. Kahn R.E., Clouser D.F., Richt J.A. Emerging Infections: A Tribute to the One Medicine, One Health Concept. Meeting Report. *Zoonoses and Public Health*, 2009, 56(6-7), 407-428.
8. Lee S.H., Joo S.T., Ryu Y.C. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat Science*, 2010, 86, 166-170.
9. OIE, World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 6.1. The role of the Veterinary Services in food safety, 2011a.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/en_chapitre_1.6.1.pdf [2012-01-06].
10. OIE, World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 6.3. The control of hazards of animal health and public health importance in animal feed, 2011b.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/en_chapitre_1.6.3.pdf [2012-01-06].

11. POTRAV (MPRV SR) 1-02, CD MPRV SR: Zelená správa Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR. 2013. www.mpsr.sk
12. Salman M. The role of veterinary epidemiology in combating infectious animal diseases on a global scale: The impact of training and outreach programs. *Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 92(4), 284-287.
13. Stärk K.D.C., Regula G., Hernandez J., Knopf L., Fuchs K., Morris R., Davies P. Concepts for risk-based surveillance in the field of veterinary medicine and veterinary public health: Review of current approaches. *BMC Health Serv Res*, 2006, 6(1), 20.
14. Tanner M., Zinsstag J. "One Health" - The potential of closer collaboration between human and animal health. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2009, 122(11-12), 410-411.
15. Troy D.J., Kerry J.P. Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Science*, 2010, 86, 214-226.
16. Warner R.D., Greenwood P.L., Pethick D.W., Ferguson D.M. Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science*, 2010, 86, 171-183.
17. Wichmann-Schauer H., Koch J., Hartung M., Roth S., Stark K., Käsbohrer A., Lorenz K., Werber D. Zusammenarbeit nationaler und europäischer Behörden im Bereich lebensmittelbedingter Zoonosen. *Bundesgesundheitsbl*, 2009, 52(2), 157-167.
18. VÚEPP 2013 situačné a výhľadové správy, www.vuepp.sk

Contact address: prof. Ing. Jozef Golian, Dr., Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology of Food Sciences, Slovak University of Agriculture Nitra. Str. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra. E-mail: Jozef.Golian@uniag.sk

This work was financially supported by scientific grants VEGA: 1/0292/14

APPLICATION OF MARGINAL SENSORY METHODS

Abstract

Sensory evaluation of food is the youngest but the most rapidly developing field of the food industry. Actually, the great emphasis is given to the production of rapid techniques of data collection, the difference between consumers and trained panel is obscured and the role of sensory methodologists is to prepare the ways for evaluation, by which a lay panel (consumers) can achieve identical results as a trained panel. Currently, there are several conventional methods of sensory evaluation of food (ISO standards), but more sensory laboratories are developing methodologies that are not strict enough in the selection of evaluators, their mechanism is easily understandable and the results are easily interpretable. This paper deals with mapping of marginal methods used in sensory evaluation of food (new types of profiles, CATA, TDS, napping).

Key words: FCP, Flash profile, CATA, TDS, napping

Introduction

Sensory analysis is a technique that grew fast over the last years and that uses the human senses to characterize a product. With the unique sensory analysis, it is possible to understand and describe how consumers evaluate the products. In other words, sensory analysis can reveal how they perceive the appearance, aroma, taste and texture of a product. In turn, it helps producers to create products based on consumer preferences. Sensory analysis is an invaluable set of methods for research and marketing. Knowledge of product variability, stability, comparison to competitor product(s), relationships to instrumental analyses and consumer understanding are all requirements for a successful product. Still nowadays, there is an evident lack of specific methods to be used by certificated bodies in sensory quality control of products with quality of distinctive labels. Many of these methods are simple and easy to apply, whereas others are more complex and require training and experience. These methods and their practical application must be independent, technically competent and as objective as possible. So, selection of the appropriate sensory method and testing conditions provide powerful results.

Free-choice profile (FCP)

New types of profiles aim at providing a quick sensory positioning of a set of products and thus by pass the time-consuming steps of attribute and scaling alignment of classical methods. These new methods build on the idea of free choice profiling that allows assessors to use their own attributes [Abdi and Valentin, 2007].

Free-choice profile (FCP) is a sensory analysis method that can be carried out by untrained panel. The assessors need only to be able to use a scale and be consumers of the product under evaluation [Aparicio et al., 2007]. It is a relatively quick, easy and inexpensive sensory method that allows an insight into the perception of products from consumers [Frances and Piggott, 2003]. FCP is a sensory methodology that differs from other descriptive methods because it is not necessary to use a common vocabulary of attributes to describe the samples, nor are the panellists expected to agree on their interpretation of the terms used [Williams and Langron, 1984]. This is based on the assumption that assessors do not differ in their perceptions, but merely in the way in which they describe them. FCP is similar to traditional profiling in that assessors must be able to detect differences between the samples, verbally describe the perceived attributes and quantify them [Oreskovich et al., 1991]. In this methodology, assessors not only set their own descriptors, but also measure their acceptability and intensity. Before the test, it is necessary that the assessors were given adequate instructions and several descriptors on consideration (flavor, appearance, flavor, texture, etc.) [González-Vinas et al., 2001]. The FCP method can yield important insights into consumer differentiation of products and establish relationships between consumer preferences and sensory characteristics [Jack and Piggott, 1992]. Regarding the number of attributes generated, this is limited only by the perceptual and descriptive skills of the consumer [Oreskovich et al., 1991] and according to Deliza et al. [2005], terms used by untrained assessors may vary, based on their individual experience and familiarity with the product. This method allows consumers to use any number of words in the description and evaluation of the intensity of selected attributes, resulting in a more effective overview of consumer perception and acceptance of products [González-Viñas et al., 2001 Delizia et al., 2005]. The data are analysed by sophisticated statistical methodologies like Generalized Procrustean Analysis (GPA) or STATIS [Aparicio et al., 2007].

Generalized Procrustes Analysis (GPA) is a useful tool for sensory professionals to analyze sensory data, especially those from free choice profiling, because it can accommodate different numbers and kinds of attributes among assessors. Moreover, GPA can be used to visually describe different effects, such as product differences, assessor agreement, and repeatability [Xiong, 2008]. It is a multivariate exploratory technique that involves transformations (i.e., translation, rotation, reflection, isotropic rescaling) of individual data matrices to provide optimal comparability. The average

of the individual matrices is called the consensus matrix. The individual and consensus matrices are typically submitted to Principal Components Analysis (PCA) and projected onto a lower dimensional space. This space provides a vantage point to compare individual data and to visualize the consensus [Dijksterhuis and Heiser, 1995].

Flash profile (FP)

Flash profile is a quick sensory profiling technique designed to meet industrial needs. This method, initially developed by Sieffermann [2000] is based on the combination of free choice profiling and a comparative evaluation of the entire product set [Delarue and Sieffermann, 2004]. The advantage of Flash profile is that the panel does not have to be trained in the long term and evaluation methodology can handle well informed consumer. The objective of this technique is achieved the rapid sensory arrangement of the whole product set and thus replace the time-consuming procedures involved in conventional methods [Abdi and Valentin, 2007]. The assessors select their own attributes and then rank order the products from least to most on each of their selected attributes. They are free to generate as many attributes as they want, but are asked to focus on descriptive terms and to avoid hedonic terms. Assessors can re-taste the products as often as they wish [Valentin et al., 2012]. The way of evaluation transcription is illustrated in Figure 1. That is, the assessor ranks the products on abscissae of attributes in order and subsequently the transcription is converted into order.

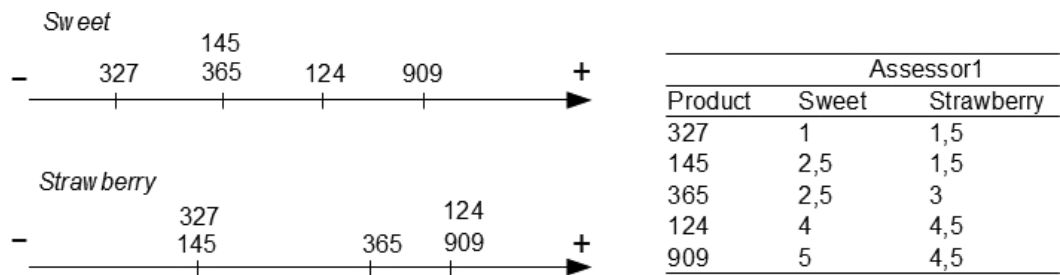


Figure 1 The form of transcription and conversion of Flash profile data [Valentin et al., 2012]

Consequently, it is necessary to process the results of all assessors. To illustrate this, the transcription of ranks for three assessors is demonstrated in Figure 2.

Product	Assessor 1				Assessor 2							Assessor 3				
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A1	A2	A3	A4	A5
327	1	1.5	4	1	2.5	1.5	5	1	1	1	4.5	1.5	4.5	3	1.5	4
145	2.5	1.5	1	4.5	1	1.5	2	4.5	2	2.5	1	4.5	2	2	1.5	1
365	2.5	3	5	2.5	2.5	4	4	2.5	3	2.5	4.5	1.5	4.5	1	3	4
124	4	4.5	2	4.5	4	3	2	4.5	4.5	4	2	4.5	1	4	4	2
909	5	4.5	3	2.5	5	5	2	2.5	4.5	5	3	3	3	5	5	4

Figure 2 Dataset prepared for statistical analysis [Valentin et al., 2012]

Ranking lists of all assessors are processed by the Generalized Procrustes Analysis (GPA) and are mostly presented by two-dimensional graph similar to the map of the principal components. After GPA it can be possible to make cluster analysis on descriptive terms, which may facilitate their easier interpretation [Tarea et al., 2007]. Flash profile became very popular in laboratory sensory analysis and its further modifications as ranking descriptive analysis (RDA) are rising. This method was designed by Bragato Richter [2010]. Methodological it is allied to "classical profile" and presents some of compromise between the descriptive classic profile and free choice profiling because it uses fixed form of attributes and ordinal scales.

Check-all-that-apply (CATA)

CATA method is based on verbal interpretation and free choice profiling. It provides information about the attributes that are detectable according to consumers and relate with overall popularity and acceptability of products [Stone and Sidel, 2007]. This technique consists of a list of attributes (words or phrases) from which assessors select all the attributes they consider appropriate to describe a product. Assessors evaluate each product and check in the list the attributes that best describe the product. They can check as many attributes as they wish and can take as much time as needed [Valentin et al., 2012]. To compare with scaling, CATA method is easier, less time consuming and more natural for assessors [Adams et al., 2007, Ares et al., 2010b]. Driesener and Romaniuk (2006) used this method for the survey of consumer perception of different brands products. According to these authors CATA method gives identical results compared with other time-demanding sensory methods. This technique can be done in several ways: consumers can select words to describe the product during the test, the entry form can provide a trained panel [Dooley et al., 2010], or dates for evaluation may be intended in the consumer group interviews (focus group), respectively alternative can be determined from the questionnaires with open questions [Ares et al., 2010a]. The completed and processed form for CATA method is illustrated in Figure 3.

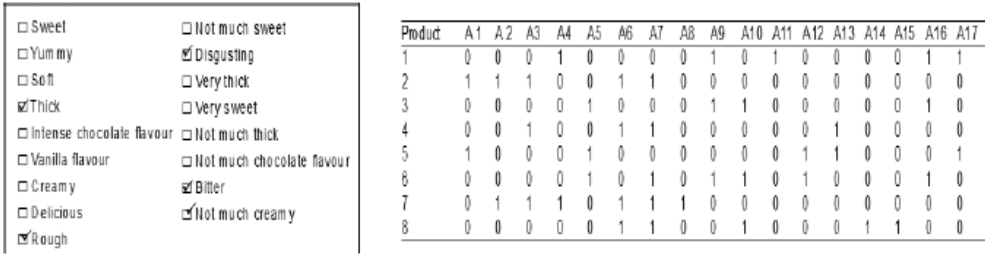


Figure 3 Example of form after processing [Valentin et al., 2012]

The result from the processing of data for this method is a matrix of frequencies and subsequent post-production of results using technique Correspondence analysis. Specialized software generates sensory map of similarity. Some studies compared the sensory maps created using the CATA method with maps of a descriptive analysis performed by a trained sensory panel and the same results were found [Ares et al., 2010a; Bruzzone et al., 2011, Dooley et al., 2010]. Several authors propose a more sophisticated approach using multivariate analysis respectively multicorrespondence analysis [Ares et al., 2011a, b], even Popper et al. [2011] suggest the use of Correspondence analysis variant called Hellinger analysis and Abdi et al. [2012] argue over the use of different metrics to measure distances between products (where classical Correspondence analysis uses chi-square procedures).

Projective mapping (Napping)

Projective mapping (napping) presents an efficient method to obtain overall product differences from consumers or trained assessors. In combination with a descriptive technique, projective mapping performed by consumers can provide insight as to which attributes are most important to consumers in determining product differences [Kenedy and Heymann, 2009]. Napping provides a simpler and faster way to obtain product tinter-distances than similarity scaling [Risvik et al., 1997] and provides better product differentiation than sorting [King et al., 1998]. Configurations from projective mapping have been shown to provide similar product maps as those from descriptive data and similarity scaling [Risvik et al., 1994]. Napping is a multivariate sensory method in which participants physically place stimuli on a large sheet of paper and orient them so that the distance between pairs represents a measure of dissimilarity [Nestrud and Lawless, 2011]. Consequently, assessors mark the position of each sample using a numerical code. Data are written in the form of coordinates of individual samples in sensory map. Way of the transcription of evaluation is illustrated in Figure 4.

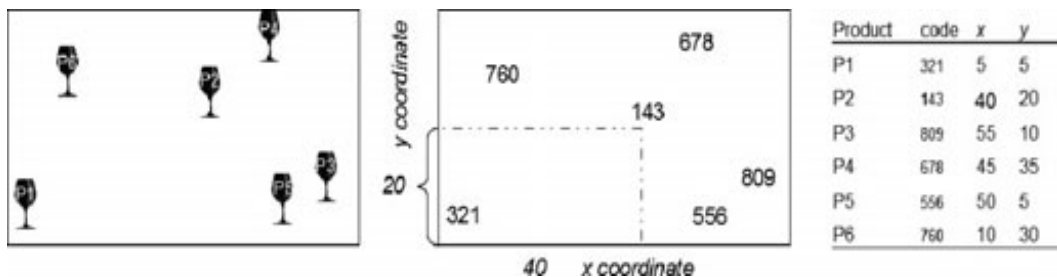


Figure 4 The form of transcription and conversion of data from napping [Valentin et al., 2012]

The results obtained in this way can then be processed using Principal component analysis (PCA) and recently Pages [2003, 2005] suggested the use of Multivariate analysis (MFA) because this technique takes into account the differences between assessors. Projective mapping or napping has been applied to various kinds of products such as cheese, wine, fruit juices, chocolate and apples [Nestrud and Lawless, 2008].

Temporal dominance of sensations (TDS)

Temporal dominance of sensations (TDS) is a recent descriptive sensory method consisting in assessing repeatedly, until the sensations end, which sensation is dominant and in scoring its intensity. Compared to time–intensity, this method considers the multidimensionality of the perceptual space over time. TDS provided reliable information close to standard sensory profiling. In addition, TDS provided information on the dynamic of perception after product consumption that was not available using a conventional profiling method and that may be critical for the understanding of complex perceptions such as refreshing [Labbe et al., 2009]. The method aims at studying the sequence of the most dominant sensations during a certain time period like the mastication or the after taste period. Investigating the quality of the panel and hence of the data is essential to judge on the reliability of the results and their interpretation. In contrast to sensory profiling, TDS includes a temporal dimension [Meyners, 2011]. It is mainly used for a description of the characteristics of each single product over time [Meyners and Pineau, 2010].

The method consists in presenting the entire set of attributes to the panelist on the computer screen with corresponding unstructured linear scales. The assessor after drinking or swallowing samples presses the start button and selects a dominant attribute on a computer screen, while its intensity is measured, usually on the 10 point scale. After the end of evaluation, it is necessary to process the results [Le Reverend et al., 2008]. The note of data transcription is illustrated in Figure 5.

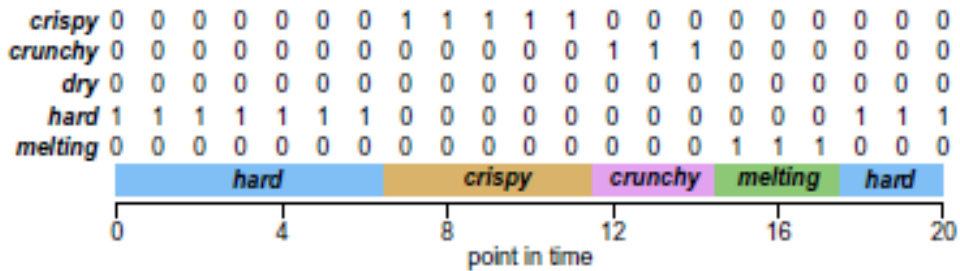


Figure 5 The time sequence of dominant attributes with pertaining matrix of data [Meyners, Pineau, 2010]

Temporal dominance of sensations is from time and financial point of view more effective than one monitoring by Time intensity method because several attributes are evaluated in a single measurement. It is simple and easily enforceable, requires only minimal training of assessors. This technique requires specialized software of collecting information [Labbe et al., 2009].

Conclusion

To sum up, sensory analysis of food is perspective science that more and more clearly connects marketing practices and analysis of consumer behavior. Currently, there are a number of new approaches based on simplicity, clarity and due to sensometry processes the elimination of extreme values and reproducibility of the results. Recently, a less known laboratory methods come to the foreground by which it can be accurately evaluated and determined the quality of the products. These methods provide information about specific differences between products, the consumers' desire for new product development in the food industry, help product developers with identifying potential risks and have an important position in a survey of demand. Their advantages are mainly the speed of applications, simplicity of methodical process and effectiveness at work with a lay panel.

Literature

1. Abdi H., Valentin D. Some new and easy ways to describe, compare, and evaluate products and assessors. *New trends in sensory evaluation of food and non-food products*, 2007, 5-18.
2. Abdi H., Williams L.J., Valentin D., Bennani-Dosse M. *Statis and Distatis: optimum multi-table principal component analysis and three way metric multidimensional scaling*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2012, 4(2), 124-167.

3. Adams J., Williams A., Lancaster B., Foley M. Advantages and uses of check-all-that-apply response compared to traditional scaling of attributes for salty snacks. 7th Pangborn Sensory Science Symposium, 12-16 August 2007. Minneapolis, USA 2007.
4. Aparicio J.P., Medina M.A.T., Rosales V.L. Descriptive sensory analysis in different classes of orange juice by a robust free-choice profile method. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 595(1-2), 238-247.
5. Ares G., Barreiro C., Deliza R., Giménez A., Gámbaro A. Application of a check-all-that-apply question to the development of chocolate milk desserts. *Journal of Sensory Studies*, 2010a, 25, 67-86.
6. Ares G., Deliza R., Barreiro C., Giménez A., Gámbaro A. Comparison of two sensory profiling techniques based on consumer perception. *Food Quality and Preference*, 2010b, 21(4), 417-426.
7. Ares G., Varela P., Rado G., Giménez A. Identifying ideal products using three different consumer profiling methodologies. Comparison with external preference mapping. *Food Quality and Preference*, 2011a, 22(6), 581-591.
8. Ares G., Varela P., Rado G., Giménez A. Are consumer profiling techniques equivalent for some product categories? The case of orange-flavoured powdered drinks. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011b, 46(8), 1600-1608.
9. Bruzzone F., Ares, G., Giménez A. Consumers' texture perception of milk desserts. II – Comparison with trained assessors' data. *Journal of Texture Studies*, 2011, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4603.2011.00332.x>.
10. Delarue J., Sieffermann J.M. Sensory mapping using Flash profile. Comparison with a conventional descriptive method for the evaluation of the flavour of fruit dairy products. *Food Quality and Preference*, 2004, 15(4), 383-392.
11. Deliza R., Macfie H., Hedderley D. The consumer sensory perception of passion-fruit juice using free-choice profiling. *Journal of Sensory Studies*, 2005, 20(1), 17-27.
12. Dijksterhuis G.B., Heiser W. The role of permutation tests in exploratory multivariate data analysis. *Food Quality and Preference*, 1995, 6(4), 263-270.
13. Dooley L., Lee Y.S., Meullenet J.F. The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. *Food Quality and Preference*, 2010, 21(4), 394-401.
14. Driesener C., Romaniuk J. Comparing methods of brand image measurement. *International Journal of Market Research*, 2006, 48(6), 681-698.

15. Frances R.J., Piggott J.R. Free choice profiling in consumer research. *Food Quality and Preference*, 2003, 3(3), 129-134.
16. González-Viñas M.A., Garrido N., Wittig De Penna E. Free choice profiling of Chilean goat cheese. *Journal of Sensory Studies*, 2001, 16(3), 239-248.
17. Jack, F.R., Piggott J.R. Free choice profiling in consumer research. *Food Quality and Preference*, 1992, 3(3), 129-134.
18. Kenedy J., Heymann H. Projective mapping and descriptive analysis of milk and dark chocolates. *Journal of Sensory Studies*, 2009, 24 (2), 220-233.
19. King M.C., Cliff M.A., Hall J.W. Comparison of Projective mapping and sorting data collection and multivariate methodologies for identification of similarity of use snack bars. *Sensory Studies*, 1998, 13(3), 347-358.
20. Labble D., Schlich P., Pineau N., Gilbert, F., Martin, N. Temporal dominance of sensations and sensory profiling: A comparative study. *Food Quality and Preference*, 2009, 20(3), 216-221.
21. Le Reverend F.M., Hidrio C., Fernandes A., Aubry V. Comparasion between temporal dominance of sensation and time intensity results. *Food Quality and Preference*, 2008, 19(2), 174-178.
22. Meyners M., Pineau N. Statistical inference for temporal dominance of sensations data using randomization tests. *Food quality and Preference*, 2010, 21(7), 805-814.
23. Meyners M. Panel and panelist agreement for product comparisons in studies of Temporal Dominance of Sensations. *Food quality and Preference*, 2011, 22(4), 365-370.
24. Nestrud M., Lawless H. Recovery of subsampled dimensions and configurations derived from napping data by MFA and MDS. *Attention, Perception and Psychophysics*, 2011, 73(4), 1266-1278.
25. Nestrud M.A., Lawless H.T. Perceptual mapping of citrus juices using projective mapping and profiling data from culinary professionals and consumers. *Food Quality and Preference*, 2008, 19(4), 431-438.
26. Oreskovich D.C., Klein B.P., Sutherland, J.W. Procrustes analysis and its application to free choice and other sensory profiling. *Sensory science theory and application in foods.*, 1991, 353-394.
27. Pagés J. Recueil direct de distances sensorielles: application a` l'e´valuation de dix vins blancs de Val de Loire. *Science des Aliments*, 2003, 23, 679-888.
28. Pagés J. Collection and analysis of perceived product interdistances using multiple factor analysis: application to the study of 10 white wines from the Loire Valley. *Food Quality and Preference*, 2005, 16(7), 642-664.

29. Popper R., Abdi H., Williams A., Kroll, B.J. Multi-block Hellinger analysis for creating perceptual maps from check-all-that-apply questions. 9th Pangborn Sensory Science Symposium. September 7th, 2011, Toronto, CA 2011.
30. Risvik E., Mcewan J.A., Colwill J.S., Rogers R., Lyon D.H. Projective mapping: A tool for sensory analysis and consumer research. *Food Quality and Preference*, 1994, 5(4), 263-269.
31. Risvik E., Mcewan J.A., Rodbotten M. Evaluation of sensory profiling and projective mapping data. *Food Quality and Preference*, 1997, 8(1), 63-71.
32. Sieffermann J.M. Le profil flash - un outil rapide et innovant d'évaluation sensorielle 683 descriptive. AGORAL XIIèmes rencontres "L'innovation: de l'idée au succès" 684 Montpellier, France 2000, 335-340.
33. Stone H., Sidel J.L. Sensory research and consumer-led food product development. In H.J.H. MacFie (Ed.), *Consumer-led food product development*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 2007, 307-320.
34. Tarea S., Cuvelier G., Sieffermann J.M. Sensory evaluation of the texture of 49 commercial apple and pear purees. *Journal of Food Quality*, 2007, 30, 1121-1131.
35. Valentin D., Chollet S., Lelievre M., Abdi H. Quick and dirty but still pretty good: a review of new descriptive methods in food science. *International Journal of Food Science and Technology*, 2012, 47(8), 1563-1578.
36. Williams A., Langron S.P. The use of free choice profiling for the evaluation of commercial ports. *Journal of Science and Food Agriculture*, 1984, 35(5), 558-568.
37. Xiong R., Blot K., Meullenet J.F., Dessirier J.M. Permutation tests for Generalized Procrustes Analysis. *Food Quality and Preference*, 2008, 18, 146-155.

STĘPIEŃ ANNA, WITCZAK TERESA, WITCZAK MARIUSZ

*Katedra Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego,
Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Balicka 122, 30-149 Kraków,
tel./fax: +48 12 6624762. e-mail address: t.witczak@ur.krakow.pl*

AKTYWNOŚCI WODY A BEZPIECZEŃSTWO MIKROBIOLOGICZNE ŻYWNOŚCI

Woda w żywności

Woda stanowi nieodłączny składnik zarówno żywności nieprzetworzonej jak i poddanej obróbce technologicznej. W zależności od rodzaju produktu jej zawartość może się wahać od kilku dziesiątych do ponad 98%. Odpowiednia wilgotność warunkuje pożądane cechy fizykochemiczne i sensoryczne żywności i tym samym wpływa na akceptację produktów przez konsumentów. Z drugiej strony, ze względu na specyficzne właściwości, woda może przyczyniać się do występowania negatywnych zmian w trakcie przechowywania produktów spożywczych. Pojęcie wilgotności, wyrażone poprzez procentową zawartość wody w materiale, nie jest wystarczającym parametrem do pełnego zdefiniowania rodzaju i kierunku przemian jakie mogą zajść w produkcie spożywczym w określonym czasie. Wiąże się to ze zróżnicowaniem form, pod jakimi występować może woda, co wynika bezpośrednio z budowy jej cząsteczek i oddziaływania z innymi składnikami układu. Produkty spożywcze mogą zawierać:

- krystaliczną wodę strukturalną, ułożoną w przestrzeniach makrocząsteczek lub związaną chemicznie w postaci wodnianów,
- wodę związaną w postaci monowarstwy, silnie oddziałującą ze zjonizowanymi składnikami bezwodnymi oraz grupami polarnymi,
- wodę związaną w kilku dalszych warstwach, o strukturze uporządkowanej wokół hydrofilowych grup składników bezwodnych,
- ruchliwą wodę wolną, powiązaną siecią wiązań wodorowych, wykazującą właściwości charakterystyczne dla wody w rozcieńczonych roztworach soli,
- wodę uwięzioną w niewypełnionych przestrzeniach składników strukturalnych lub żelach, o właściwościach wody wolnej lecz o utrudnionym przepływie.

Występowanie pięciu wymienionych powyżej form „związania” wody powoduje, że produkty o tej samej wilgotności mogą różnić się ilością wody dostępnej dla różnego rodzaju przemian, co odgrywa istotną rolę w trakcie prób prognozowania trwałości produktu. Dlatego też za podstawową wielkość, będącą termodynamicznym miernikiem potencjału chemicznego, wyrażającym podatność wody na interakcje z innymi składnikami żywności uważa się aktywność wody a_w [Ćwiertniewski i in., 2005].

Koncepcja aktywności wody

Pod pojęciem aktywności wody rozumiany jest stosunek ciśnienia pary wodnej nad żywnością do ciśnienia nad powierzchnią czystej wody w tych samych warunkach. Parametr ten może przyjmować wartości, które rosną wraz ze wzrostem udziału wody, której cząsteczki mają zdolność do wykonywania pracy w zakresie od 0 do 1 [Pałacha, 2008]. Wielkość ta, jako czynnik determinujący rozwój drobnoustrojów, wprowadzona została w pracy W.J. Scott [1953] i stała się jednym z podstawowych parametrów stosowanych w badaniach i kontroli trwałości żywności [Troller i Christian, 1978; Scott, 1953; Beuchat, 1987; Christian, 1963].

Określenie zależności pomiędzy stanem termodynamicznym wody w żywności a jej właściwościami i trwałością znajduje wykorzystanie zarówno przy przewidywaniu zmian przechowalniczych, jak i na etapie projektowania nowych produktów spożywczych. Pierwotna koncepcja aktywności wody zakładała stan termodynamicznej równowagi żywności oraz zachowywanie przez produkt najwyższej stabilności przy aktywności wody odpowiadającej zawartości wilgoci w monowarstwie, a niestabilność powyżej i poniżej tej wartości. Określenie wilgotności monowarstwy możliwe jest dzięki wykorzystaniu fizycznych modeli opisujących właściwości sorpcyjne, wśród których podstawę stanowią model BET (Brunauera, Emmetta i Tellera) i jego rozszerzona wersja, uwzględniająca właściwości materiału – model GAB (Guggenheim, Anderson, de Boer) [Al-Muhtaseb, 2002; Anderson, 1946; Bizot, 1983, Brunauer i in., 1938].

Wpływ aktywności wody na dynamikę zmian właściwości mechanicznych, przebieg reakcji chemicznych oraz wzrost drobnoustrojów przedstawiony został przez Rahmana [2009] w postaci tzw. mapy stabilności żywności. Procesy zachodzące w żywności podczas przechowywania zobrazowane zostały na obszarze poniżej monowarstwy BET, w strefie adsorpcji wielowarstwowej oraz w zakresie kondensacji kapilarnej. Obrazowe przedstawienie zmian produktów spożywczych w odniesieniu do poziomu aktywności wody stanowi przydatne narzędzie, pozwalające na szybkie oszacowanie trwałości przechowalniczej danego produktu [Pałacha, 2013].

Mimo powszechnego zastosowania, istnieją pewne ograniczenia w wykorzystaniu koncepcji aktywności wody. Jednym z nich jest możliwość występowania żywności w stanie innym niż równowagowym – produkty o niskiej zawartości wody mogą znajdować się w stanie krystalicznym, amorficznym lub szklistym. Dlatego też sama koncepcja aktywności wody nie wystarcza do wyjaśnienia zjawisk takich jak krystalizacja, żelowanie czy zbrylanie. Pewne ograniczenie stanowi również zróżnicowanie działania substancji rozpuszczonej, użytej do hamowania mikroorganizmów, tzw. specyficzny efekt substancji rozpuszczonej. Krytyczne granice aktywności wody mogą być również przesunięte przez inne czynniki, takie jak zawartość soli lub substancji przeciwdrobnoustrojowych, pH, obróbkę termiczną

lub promieniowanie elektromagnetyczne. Istotna jest również zmiana temperatury wpływająca w małym stopniu na samą aktywność wodną, lecz w dużym na szybkość reakcji. Omawiana koncepcja aktywności wody dostarcza informacji dotyczącej ilości wilgoci, stopnia związania i reaktywności, nie jest jednak wystarczająca do określenia rozpoczęcia ruchliwości molekularnej wody [Rahman i Labuza, 1999]. W związku z powyższymi ograniczeniami, aktualnie opracowywane mapy stabilności opierają się o połączone koncepcje aktywności wodnej i przemiany szklistej, wyjaśniającej wpływ temperatury na ruchliwość cząsteczek w materiale. Połączenie powyższych teorii pozwala na uzyskanie pełnego obrazu stanu produktu z uwzględnieniem mikroobszarów o zróżnicowanej stabilności [Rahman, 2012].

Aktywność wody warunkuje fizyczne, biochemiczne oraz mikrobiologiczne zmiany podczas przechowywania żywności. Najważniejszym procesem fizycznym zachodzącym przy a_w w zakresie 0,3-0,5, stanowiącym problem przy przechowywaniu żywności o dużej zawartości cukru jest krystalizacja. Prowadzi ona do uwalniania wody związanej i tym samym wpływa na strukturę i konsystencję, co ma znaczenie zwłaszcza w przypadku produktów sypkich. Może również indukować i przyspieszać dalsze zmiany chemiczne. Przy wartościach a_w poniżej 0,2 i powyżej 0,6 zachodzi najintensywniejsze utlenianie tłuszczów. Podobny zakres obowiązuje dla związków w nich rozpuszczalnych, takich jak karetonoidy i barwniki. Reakcje nieenzymatycznego brunatnienia rozpoczynają się przy takich aktywnościach, przy których woda zaczyna pełnić rolę rozpuszczalnika, natomiast spowalniane są przy a_w powyżej 0,8-0,9. Również procesy enzymatyczne uzależnione są w dużej mierze od aktywności wody, która wpływa na konformacje białek i tym samym warunkuje zdolności katalityczne. Do zajęcia hydrolizy wymagana jest minimalna wartość a_w wynosząca 0,3, natomiast reakcje z udziałem fenylooksydazy, peroksydazy i amylaz zachodzą przy $a_w > 0,8$. Optymalna zawartość wody pełni kluczową rolę w zapewnieniu odpowiednich warunków do wzrostu i rozwoju mikroflory zanieczyszczającej żywność. Uogólniona zasada głosi, że drobnoustroje nie mogą rozwijać się w aktywności wody niższej niż 0,6. Jednak ze względu na duże zróżnicowanie mikroorganizmów, jak i stosunkowo wysokie wartości a_w produktów spożywczych, kontrola bezpieczeństwa mikrobiologicznego stanowi jedno z głównych wyzwań współczesnego przemysłu spożywczego [Pałacha, 2008].

Aktywność wodna a wzrost mikroorganizmów

Zanieczyszczenia mikrobiologiczne żywności mogą być wynikiem niedostatecznego oczyszczenia surowców, złego stanu higienicznego linii technologicznej lub zakażenia wtórnego spowodowanego nieodpowiednimi warunkami przechowywania. Wszystkie drobnoustroje występujące w produktach spożywczych podzielić można, w zależności od mechanizmu działania, na dwie grupy. Pierwsza z nich

to mikroflora saprofityczna, której ściśle określona ilość może być dopuszczalna w niektórych grupach produktów. Nie jest ona chorobotwórcza, jednak przyczynia się do powstawania zmian fizykochemicznych oraz obniżenia jakości żywności. Większe zagrożenie dla zdrowia konsumentów stanowi grupa mikroorganizmów patogennych. Ich szkodliwe działanie może objawiać się poprzez intoksykację wywołaną spożyciem jedynie metabolitów, wytwarzanych przez drobnoustroje lub toksykoinfekcją wynikającą z obecności żywych komórek bakteryjnych. Wśród mikroorganizmów wytwarzających toksyny największe zagrożenie stanowi gronkowiec (*Staphylococcus aureus*) oraz szczepy *Clostridium botulinum* odpowiedzialne za zatrucie jadem kiełbasianym porażającym struktury neuronowe. Objawy chorobowe występują dopiero po przyswojeniu odpowiedniej dawki tych związków, jednak odporność metabolitów na wysokie temperatury podwyższa ryzyko zachorowań. Wystąpienie dolegliwości wywołanych toksykoinfekcją nie jest natomiast zależne od ilości spożytych drobnoustrojów, które wykazują zdolność do rozmnażania w przewodzie pokarmowym. Zaburzenia układu trawiennego wywołują zazwyczaj szczepy *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* i *Listeria monocytogenes* [Batz, 2013].

Poza uwarunkowaniami fizjologicznymi, funkcjonowanie oraz wzrost drobnoustrojów uwarunkowane są poprzez szereg czynników środowiskowych. Żywność stanowi bardzo dobre źródło niezbędnych do rozwoju mikroorganizmów składników pokarmowych. Również szeroki zakres pH produktów spożywczych umożliwia generację wielu szczepów drobnoustrojów o zróżnicowanej wrażliwości na odczyn środowiska. Innymi ważnymi parametrami warunkującymi wzrost mikroflory są: temperatura, dostępność tlenu, światło oraz obecność substancji hamujących. Istotny wpływ na intensywność procesów życiowych drobnoustrojów ma woda. Przyjmuje się, że jej minimalna zawartość umożliwiająca rozwój mikroflory w produkcie musi być wyższa niż 15%. Podobnie jak w przypadku innych zmian zachodzących w żywności, decydujący wpływ na rozwój mikroorganizmów ma nie zawartość wilgoci w środowisku a jej dostępność – aktywność wody [Muller, 1986].

Znajomość aktywności wody pozwala oszacować prawdopodobieństwo rozwoju określonych mikroorganizmów, co umożliwia dobór odpowiedniej metody utrwalania oraz warunków przechowywania żywności. Wysokie wartości a_w większości produktów spożywczych wynikają ze składu chemicznego charakterystycznego dla materiałów pochodzenia biologicznego. Najwyższą aktywnością wody od 0,94 do 0,99 cechują się produkty o wysokiej zawartości tłuszczu. Produkty mięsne mieszczą się w granicach: 0,92-0,98, a suszone owoce: 0,65-0,70. Najwyższy zakres aktywności wodnej, od 0,21 do 0,97, wykazują produkty piekarnicze [Pałacha i Makarewicz, 2011]. Obniżenie ryzyka psucia się żywności przyczynia się do konieczności stosowania zabiegów utrwalających,

zapewniających czystość mikrobiologiczną produktów przeznaczonych do obrotu i przechowywania.

Kontrola aktywności wody jest szczególnie istotna w przypadku produktów nieprzechowywanych w warunkach chłodniczych, o średniej zawartości wody. Wartość a_w tego typu żywności waha się w granicach 0,60-0,85, co nie sprzyja wzrostowi bakterii, jednak umożliwia rozwój pleśni. Trwałość takich produktów nie przekracza zazwyczaj dwóch miesięcy. Żywność o wysokiej wilgotności i a_w powyżej 0,85 wymaga przechowywania w warunkach chłodniczych, a jej data przydatności do spożycia nie przekracza kilku tygodni. Trwałość produktów spożywczych o aktywności wody poniżej 0,65 wynosi zazwyczaj więcej niż pół roku [Ćwierniewski i in., 2005].

Najważniejszymi parametrami wspomagającymi procesy kontroli stabilności mikrobiologicznej produktów żywnościowych, opartymi na koncepcji aktywności wody są:

- aktywność minimalna poniżej której drobnoustroje nie mogą się rozwijać,
- aktywność optymalna pozwalająca na maksymalny wzrost mikroorganizmów.

Tabela 1. Minimalna aktywność wody wybranych drobnoustrojów [Ćwierniewski i in., 2005; Reid, 2007]

Minimalna wartość a_w	Bakterie	Drożdże	Grzyby
0,98	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Clostridium botulinum E</i> <i>Shigella spp.</i>		
0,97	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Escherichia coli</i>		
0,95	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Vibrio cholerae</i>		
0,94	<i>Clostridium botulinum A,C</i>		<i>Stachybotrys atra</i>
0,93	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Rhizopus nigricans</i>
0,92	<i>Listeria monocytogenes</i>		
0,90	<i>Staphylococcus aureus</i> (beztlenowe)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Trichothecium roseum</i>
0,88		<i>Candida</i>	
0,86	<i>Staphylococcus aureus</i> (tlenowe)		
0,83		<i>Debarymoces hansenii</i>	<i>Penicillium expansum</i>
0,80		<i>Saccharomyces bailii</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
0,78			<i>Aspergillus flavus</i>
0,77			<i>Aspergillus Niger</i>
0,75	<i>Halobacterium halobium</i>		<i>Aspergillus ochraceus</i>
0,62		<i>Saccharomyces rouxii</i>	
0,61			<i>Xeromyces bisporus</i>

Najbardziej odporne na ograniczenie dostępu wody są grzyby strzępkowe. Przyjmuje się że średnia minimalna a_w dla tej grupy wynosi od 0,61 do 0,90, przy czym wzrost większości z nich ulega zahamowaniu przy wartościach niższych niż 0,8. Najwyższą tolerancję na obniżoną wilgotność wykazują szczepy *Xeromyces bisporus* (0,61) i *Eurotium spp.* (0,74-0,62). Szczególne zagrożenie stanowią grzyby wytwarzające toksyczne metabolity drugorzędowe, takie jak aflatoksyna (*Aspergillus*) czy ochratoksyna (*Aspergillus, Penicillum*). Charakteryzują się one stosunkowo wysoką odpornością na obniżoną wartość a_w . Podobne cechy wykazują nieco bardziej wrażliwe szczepy rodzaju *Fusarium*. W przemyśle spożywczym obecność kserofilnych grzybów wykryto m.in. w mące, ryżu i orzechach ziemnych [Christian, 2000].

Drożdże podobnie jak grzyby strzępkowe mogą rozwijać się w środowisku o obniżonej aktywności wody. Przyjmuje się, że minimalna wartość a_w dla większości z nich wynosi 0,88. Znane są jednak szczepy osmotolerancyjne z rodzaju *Zygosaccharomyces* rosnące nawet przy $a_w=0,60$, które posiadają zdolność do fermentacji oraz odporność na niskie pH i konserwanty, powodując psucie się żywności o dużej zawartości cukrów. Do innych osmotolerancyjnych drożdży zalicza się szczepy rodzaju *Torulasporea, Schizosaccharomyces, Kluyveromyces, Meyerozyma, Wickerhamomyces i Yarrowia*. Drobnoustroje odporne na wysokie stężenia sacharydów i soli mogą zatem zanieczyszczać żywność o niskiej aktywności wody jak np. suszone owoce.

Bakterie stanowią grupę drobnoustrojów rozwijających się najlepiej przy wysokich wartościach a_w . Przyjmuje się, że zahamowanie wzrostu patogenów żywności następuje w zakresie a_w od 0,85 do 0,98. Bardziej odporne na niedobór wody są gram – dodatnie szczepy z rodzaju *Bacillus, Lactobacillus, Geobacillus* dla których minimalna wartość a_w waha się w granicach od 0,91 do 0,93, podczas gdy dla bakterii gram – ujemnych wartość ta wynosi 0,95. Wśród drobnoustrojów chorobotwórczych najwyższą odporność wykazuje gronkowiec (*Staphylococcus aureus*) wykrywany często w produktach mleczarskich i mięsnych. Wyjątkową grupą są bakterie halofilne – wymagające do funkcjonowania wysokiej zawartości soli w środowisku. Ich rozwój zostaje zahamowany dopiero przy aktywności wody poniżej 0,75. Szczepy z rodzaju *Halococcus, Halomonas i Halobacterium* mogą bytować w peklowanym mięsie i solonych rybach [Kowal, 2007].

Metody obniżania aktywności wody

Możliwość limitowania wzrostu drobnoustrojów, poprzez ograniczenie dostępności wody, pozwoliła na opracowanie metod utrwalania żywności polegających na obniżeniu wartości a_w . Działanie substancji rozpuszczonych, określone za pomocą prawa Raoult'a, stanowi główny czynnik na podstawie którego opracowano większość technik wydłużania trwałości przechowalniczej żywności powiązanych z obniżeniem

aktywności wody. W zależności od rodzaju utrwalanej żywności istnieje wiele metod osiągnięcia tego celu, jednak wszystkie bazują na jednej z dwóch technik: dodatku substancji osmoaktywnych lub usunięciu części wody.

Osmoaktywne utrwalanie żywności polega na zwiększaniu ciśnienia osmotycznego fazy wodnej produktu, przez co ilość dostępnej dla mikroorganizmów wody gwałtownie się zmniejsza, a przez to stanowi poważny czynnik stresogenny. Ma to związek ze specyficzną budową błony półprzepuszczalnej, której funkcja w obecności substancji rozpuszczonych zostaje zachwiana. Wykazano, że komórki drobnoustrojów mogą reagować na stres osmotyczny na dwa sposoby. Pierwszy z nich polega na swobodnym wypływie wody z komórki, zmniejszeniu objętości cytoplazmy, co skutkuje jej śmiercią. Natomiast w przypadku kiedy spadek aktywności wody nie jest bardzo duży, komórka reaguje poprzez uaktywnienie mechanizmu osmoregulacyjnego, w wyniku czego następuje szybka synteza osmolitów, zmiana przepuszczalności błony i pobór wody z otoczenia. Związkami syntezowanymi w warunkach stresowych są m.in.: glutamina, prolina, betaina u bakterii i trehaloza w przypadku drożdży [Sochacka i Boratyński, 2011].

W praktyce osmoaktywne utrwalanie żywności polega na dodaniu do produktu odpowiedniej dawki cukru lub soli. Wśród drobnoustrojów spożywczych najbardziej odporne na wysokie stężenia sacharozy są pleśnie z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*, które mogą rozwijać się nawet przy 80% stężeniu suchej substancji, przy założeniu, że wilgotność względna środowiska przechowywania będzie wyższa niż 65%. Takie warunki mogą być wynikiem skraplania się wilgoci nad ciepłym produktem przeniesionym do chłodniejszego pomieszczenia. Wyższą niż pleśnie wrażliwość na dużą zawartość cukru wykazuje większość bakterii i drożdży, których rozwój hamowany jest już w wyniku 65% dodatku sacharozy. Ze względu na zdolność do dysocjacji, chlorek sodu wykazuje większe działanie osmoaktywne niż cukier. Bakterie gnilne hamowane są już przy 1-2% stężeniu soli, paciorkowce, drożdże oraz bakterie mlekowe do całkowitego unieszkodliwienia potrzebują ok. 15% dodatku. Przyjmuje się zatem, że chlorek sodu zapewnia całkowitą konserwację w stężeniach od 18% do 20%. Z uwagi na niekorzystne działanie nadmiaru soli w diecie (nadcisnienie, choroby nerek) stosowanie tak wysokiego dodatku, w produktach bezpośrednio przeznaczonych do spożycia jest niemożliwe. Produktami utrwalanymi tą metodą mogą być grzyby, ryby oraz mięso, które poddaje się peklowaniu.

Wśród procesów pozwalających na usunięcie części wody z produktu spożywczego wyróżnić można techniki mechaniczne (sączenie, prasowanie), fizyczno – chemiczne (dodatek środków higroskopijnych) oraz dyfuzyjno – cieplne. Najpowszechniej stosowana jest ostatnia grupa, w skład której wchodzi m.in. suszenie, zagęszczanie oraz kriokoncentracja. W przemyśle spożywczym proces zagęszczania

prowadzi się zazwyczaj poprzez odparowanie wody w wyniku kombinacji obróbki termicznej i obniżonego ciśnienia w wyparkach próżniowych. Metoda stosowana jest m.in. przy produkcji syropu skrobiowego, dżemów i marmolad, mleka zagęszczonego oraz wszelkiego rodzaju koncentratów spożywczych. Kriokoncentracja polega na wymrożeniu części wody z produktu a następnie jej odseparowaniu, najczęściej poprzez odwirowanie. Technika znajduje zastosowanie głównie przy produkcji barwników i koncentratów, gdzie istotne jest zachowanie wszystkich labilnych składników bioaktywnych. Najbardziej rozpowszechnioną metodą usuwania wody z produktów spożywczych jest suszenie. W zależności od zastosowanych urządzeń oraz parametrów procesu, zawartość wilgoci obniżana może być nawet poniżej 1%. Suszenie wykorzystywane jest niemal w każdym sektorze przemysłu spożywczego [Lada, 2008].

Literatura

1. Al-Muhtaseb A.H., McMinn W.A.M., Magee T.R.A. Moisture sorption isotherm characteristic of food products: A review, *Food and Bioproducts Processing*, 2002, 2, 118-128.
2. Anderson R.B. Modifications of the Brunauer, Emmett and Teller Equation. *Journal of American Chemical Society*, 1946, 68, 686-691.
3. Batz M.B. The foods most of ten associated with major foodborne pathogens: Attributing Illnesses to food sources and ranking patogen/foof combinations. W: Morris G.J (red.), *Foodborne Infections and Intoxications (19-35)*. Academic Press 2013.
4. Beuchat L. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection*, 1987, 46, 135-141.
5. Bizot H. Using the GAB model to construct sorption isotherms. W: Jowitt, R., Escher, F., Vos, G. (red.), *Physical properties of foods (43-54)*. London: Applied Science Publishers 1983.
6. Brunauer S., Emmett P., Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of American Chemical Society*, 1938, 60, 309-319.
7. Christian J.H.B. Water activity and the growth of microorganisms. *Recent Advances in Food Research*, 1963, 3, 248-255.
8. Christian J. Drying and reduction of water activity w *The microbial safety and quality of food*, Lund B. M., Baird-Parker T.C., Gould G.W., Aspen Publishers, 2000, 146-175.
9. Ćwiertniewski K., Polak E., Egierski K. Aktywność wody – parametr trwałości produktów spożywczych. *Przemysł Spożywczy*, 2005, 5, 16-19.
10. Kowal K. Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na wzrost mikroorganizmów. W: Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (red.), *Mikrobiologia*

- techniczna – Mikroorganizmy i środowiska ich występowania (149-162). Warszawa: PWN 2007.
11. Kowal K. Wpływ aktywności wody na wzrost drobnoustrojów. *Przemysł Spożywczy*, 2012, 8/9, 50-52.
 12. Łada E.H. Osmoaktywne metody utrwalania żywności. W: *Podstawy przetwórstwa spożywczego*, WSiP, 86-91. Muller, G. *Podstawy mikrobiologii żywności*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowo – Techniczne 2008, 60-78.
 13. Pałacha Z. Aktywność wody – ważny parametr trwałości żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2008, 2, 22-26.
 14. Pałacha Z. Koncepcje stabilności żywności o małej i średniej zawartości wody. *Przemysł Spożywczy*, 2013, 12, 24-28.
 15. Pałacha Z., Makarewicz M. Aktywność wody wybranych grup produktów spożywczych. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2011, 2, 24-29.
 16. Rahman M.S. Food stability Beyond water activity and glass transition: macro – micro region concept in the state diagram. *International Journal of Food Properties*, 2009, 12(4), 726-740.
 17. Rahman M.S. Applications of macro –micro region concept in the state diagram and critical temperature concept in determining of food stability. *Food Chemistry*, 2012, 132, 1679-1685.
 18. Rahman M.S., Labuza T.P. Water activity and foodpreservation. W: Rahman, M.S. (red.), *Handbook of food preservation* (339-382). New York: Mercel Dekker 1999.
 19. Sablani S.S., Kasapis S., Rahman M.S. Evaluating water activity and Glass transition concepts for food stability. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78, 266-271.
 20. Scott W.J. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30°C. *Australian Journal of Biological Science*, 1953, 6, 549-556.
 21. Troller J.A., Christian J.H.B. *Water Activity and Food*. New York: Academic Press 1978.
 22. Reid S.S. Water activity: Fundamentals and relationships. W: Gustavo V. Barbosa-Cánovas, G.V., Fontana, A.J., Schmidt, S.J., Labuza, T.P. (red.), *Activity in Foods: Fundamentals and Applications* (15-28). Oxford: Wiley-Blackwell 2007.

JOANNA SOBOLEWSKA-ZIELIŃSKA, LIDIA TYLEK,
MAŁGORZATA BĄCZKOWICZ*, TERESA FORTUNA,

*Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności,
*Katedra Technologii Gastronomicznej i Konsumpcji,
Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Ul. Balicka 122, 31- 149 Kraków*

AKTYWNOŚĆ WODY JAKO PARAMETR TRWAŁOŚCI WYROBÓW CUKIERNICZYCH

Wstęp

Woda jest ważnym składnikiem żywności. Stan wody w żywności zmienia się w zależności od oddziaływań wody z pozostałymi jej składnikami. Jego opis jest wyrażany za pomocą aktywności – termodynamicznego miernika potencjału chemicznego wody. W trakcie produkcji żywności i jej przechowywania zachodzą różnego rodzaju procesy chemiczne, fizyczne i biologiczne, a ich kinetyka oraz kierunek zachodzących zmian istotnie zależą od aktywności wody w środowisku [Ćwiertniewski i in., 2005; Lewicki, 2003; Pałacha, 2008]. Aktywność wody decyduje o przebiegu procesów biologicznych, a zwłaszcza wpływa na rozwój drobnoustrojów. W związku z powyższym aktywność wody zyskała znaczenie jako krytyczny parametr kontroli jakości [Tapia i in., 2008]. Kontrola wartości aktywności wody jest szczególnie ważna dla żywności o średniej zawartości wody (a_w w granicach 0,85-0,60) nieprzechowywanej w warunkach chłodniczych [Kowal, 2012]. Powszechnie przyjmuje się, że drobnoustroje nie mogą się rozwijać w żywności o a_w poniżej 0,6, a przybliżone wartości aktywności wody granicznej dla rozwoju drobnoustrojów wynoszą: dla bakterii 0,90, dla drożdży 0,85, dla większości pleśni 0,7 [Ćwiertniewicz i in., 2005; Pałacha, 2008]. Wyroby cukiernicze są zaliczane do trwałej żywności, jednak istnieją doniesienia o zatruciach *Salmonellą* poprzez spożycie wyrobów czekoladowych [Cordier, 1994; Roberts, 2005; Tamminga i in., 1977]. Zatem oznaczenie patogennych bakterii takich jak *Salmonella sp.* oraz pałeczek z grupy *coli* będących wskaźnikiem zanieczyszczeń higienicznych etapu produkcji lub surowca, przedstawia obraz jakości mikrobiologicznych wyrobów cukierniczych. Osmofilne drożdże i kserofilne pleśnie są największym zagrożeniem dla produktów o niskiej aktywności wody i wysokiej zawartości cukru, ze względu na możliwość ich wzrostu podczas przechowywania tych produktów.

Celem niniejszej pracy było wyznaczenie aktywności wody wybranych wyrobów cukierniczych, określenie stosunków wodnych panujących pomiędzy poszczególnymi warstwami bezpośrednio po wyprodukowaniu i pod koniec okresu trwałości. Zbadano, czy warunki przechowalnicze miały wpływ na rozwój lub dezaktywację drobnoustrojów.

Material i metodyka

Badaniami objęto różnorodne wyroby cukiernicze. W wyrobach składających się z więcej niż jednej warstwy (Mieszanka Krakowska Maxi o smaku cytrynowym; Michałki Białe; Śliwka w czekoladzie, Malaga czekoladka nadziewana, Czekolada cytrynowa z zieloną herbatą) przebadano cały wyrób oraz każdą warstwę osobno, natomiast w produktach jednorodnych (Krówka mleczna oraz Kakao o obniżonej zawartości tłuszczu (MT) alkalizowane) badaniom poddano cały wyrób.

We wszystkich próbkach analizy wykonano bezpośrednio po wyprodukowaniu i pod koniec okresu trwałości (dla każdego produktu indywidualnie), natomiast dodatkowo dla Mieszanki Krakowskiej i Kakao po połowie okresu trwałości.

W wyrobach na początku eksperymentu w całości i każdej warstwie:

1. oznaczono aktywność wody przy użyciu aparatu Lab Swift firmy Novasina [PN-ISO 21807:2005];
2. wykonano badania mikrobiologiczne:
 - liczbę bakterii mezofilnych tlenowych w 1 g [Pn-EN ISO 4833:2004/Ap1 2005];
 - obecność pałeczek *Salmonella* w 25g [PN-EN ISO 6579:2003];
 - liczbę bakterii z grupy *coli* w 1 g [PN-EN 4832:2007];
 - liczbę pleśni i drożdży w 1g [PN-ISO 21527-2:2009].

Aktywność wody badano w każdej warstwie, aby zaobserwować, czy nastąpiła równowaga pomiędzy korpusem i czekoladą (Mieszanka Krakowska, Śliwka w czekoladzie) lub polewą (Michałki Białe) oraz nadzieniem i czekoladą (Malaga). Kolejne analizy mikrobiologiczne wykonywano tylko w całym wyrobie.

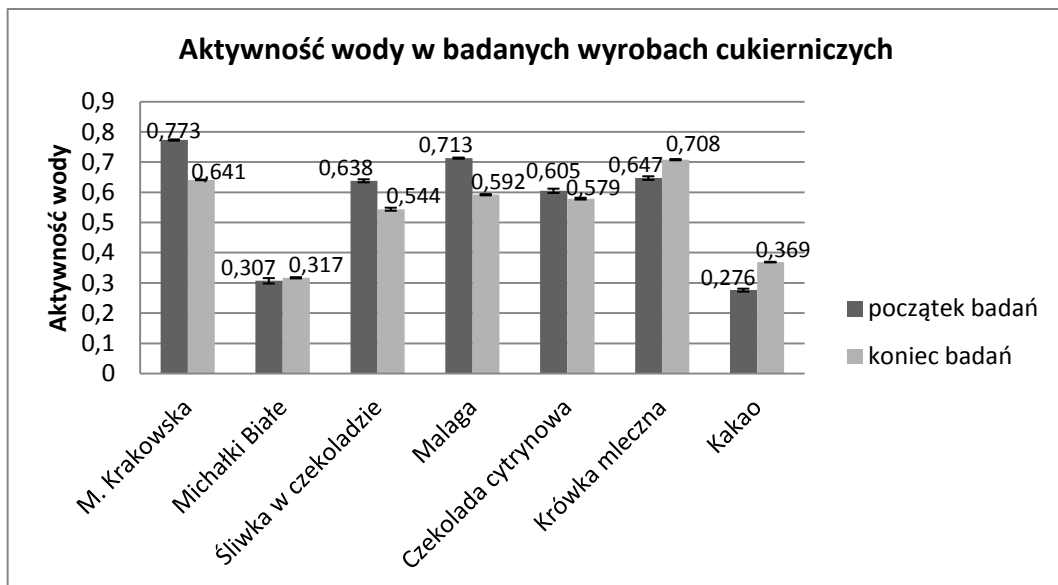
Wyroby przechowywano w oryginalnych opakowaniach, w których produkty są sprzedawane w handlu detalicznym, w klimatyzowanym magazynie w temperaturze 16-18°C.

Wyniki i dyskusja

Pośród dużej różnorodności wyrobów cukierniczych do badań wybrano siedem produktów, każdy reprezentujący inną grupę wyrobów cukierniczych.

Najwyższą aktywność wody zaobserwowano w Mieszance Krakowskiej o korpuse galaretki agarowej, a najniższą w Kakao MT alkalizowanym w postaci proszku. We wszystkich wyrobach aktywność wody nie przekroczyła 0,80, czyli zachowana jest granica bezpiecznej żywności ($a_w < 0,85$), w której nie mogą się namnożyć patogenne bakterie powodujące zatrucia pokarmowe. W Michałkach Białych i Kakao poziom a_w wyniósł poniżej 0,6. Ta wartość przy właściwym przechowywaniu gwarantuje brak możliwości namnażania się większości drobnoustrojów. Pod koniec okresu przechowywania poziom a_w poniżej 0,6 stwierdzono również w przypadku Śliwki

w czekoladzie, Malagi oraz Czekolady cytrynowej z zieloną herbatą. Wyniki te zaprezentowano na wykresie 1.



Wykres 1. Aktywność wody w badanych wyrobach cukierniczych

W trakcie badań analizowano również aktywność wody w poszczególnych warstwach każdego z produktu. Wyniki zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Aktywność wody w badanych produktach i ich warstwach podczas przechowywania

Produkt		Czas przechowywania [miesiące]					NIR $\alpha=0,05$
		0	5	6	8	12	
Mieszanka Krakowska	kuwertura	0,345 $\pm 0,004$	0,697 $\pm 0,002$	-	0,646 $\pm 0,002$	-	0,003
	korpus cukierka	0,777 $\pm 0,003$	0,735 $\pm 0,001$	-	0,707 $\pm 0,002$	-	0,004
Michałki Białe	polewa biała	0,347 $\pm 0,004$	-	0,315 $\pm 0,002$	-	-	0,026
	korpus cukierka	0,277 $\pm 0,015$	-	0,330 $\pm 0,006$	-	-	0,008
Śliwka w czekoladzi	śliwka kandyzowana	0,622 $\pm 0,002$	-	-	0,586 $\pm 0,003$	-	0,006
	kuwertura ze śliwki	0,341 $\pm 0,002$	-	-	0,467 $\pm 0,002$	-	0,004
Małaga	nadzienie	0,723 $\pm 0,001$	-	-	0,600 $\pm 0,002$	-	0,003
	kuwertura	0,468 $\pm 0,003$	-	-	0,504 $\pm 0,004$	-	0,008
Czekolada cytrynowa	nadzienie cytrynowe żelowe	0,734 $\pm 0,001$	-	-	0,649 $\pm 0,002$	-	0,004
	nadzienie z zieloną herbatą	0,387 $\pm 0,002$	-	-	0,597 $\pm 0,002$	-	0,004
	kuwertura	0,468 $\pm 0,002$	-	-	0,497 $\pm 0,002$	-	0,005
Krówka mleczna	cały produkt	0,647 $\pm 0,006$	-	-	0,708 $\pm 0,002$	-	0,005
Kakao MT	cały produkt	0,276 $\pm 0,005$	-	-	0,341 $\pm 0,001$	0,369 $\pm 0,001$	0,006

- nie dokonywano pomiaru

Początkowo niska aktywność wody kuwertury Mieszanki Krakowskiej w stosunku do korpusu skutkowałą szybkim wzrostem tego parametru w celu

wyrównania wilgotności całego układu. Dane literaturowe [Maziąg, 1999] wskazują, że a_w kuwertyury wynosi 0,3; a waha się w granicach 0,4-0,5 według Roberts i in. [2005]. Badania na podobnym wyrobie cukierniczym „Ptasim mleczku” pobranym bezpośrednio z linii technologicznej prowadziła Kita i in. [2004]. Oznaczona przez autorkę aktywność wody w korpusie wynosiła 0,678, a w kuwerturze 0,672. W niniejszych badaniach uzyskano inne wyniki. Przypuszczalnie badana kuwertura w cytowanych badaniach została zdjęta z cukierka, a nie pobrana bezpośrednio z linii produkcyjnej, stąd uzyskano taki wynik. Aby sprawdzić tą hipotezę zbadano a_w kuwertyury zdjętej z Mieszanki Krakowskiej w kilka dni po wyprodukowaniu i wartość jej wynosiła 0,706. Analizując zmiany a_w w trakcie przechowywania można stwierdzić, że równowaga między kuwerturą, a korpusem przy wyrobach oblewanych o cienkiej warstwie kuwertyury ustala się szybko. Natomiast spadek tego parametru między 5, a 8 miesiącem przechowywania wynika prawdopodobnie z tego, że po wyrównaniu a_w całego produktu następuje dyfuzja wody, prowadząca do osiągnięcia równowagi wilgoci zawartej w cukierku z otoczeniem. Kuwertura przylegająca ściśle do korpusu utrudnia oddawanie wody, a sama wysycha w pierwszej kolejności, natomiast pęknięcia w niej mogą ułatwić oddawanie wody przez korpus. Odnosząc się do otrzymanych wyników dla Michałków Białych można sądzić, że skład surowcowy korpusu (orzechy arachidowe, cukier puder, sproszkowane produkty mleczne, tłuszcz cukierniczy i herbatniki) ma wpływ na niską aktywność wody w porównaniu z pozostałymi badanymi produktami. W trakcie badania aktywności wody korpusu cukierka uzyskano największe odchylenie standardowe, a sam czas pomiaru był w tym przypadku najdłuższy. Jeżeli próbka nie znajduje się w stanie wewnętrznej równowagi wilgotnościowej, to pomiar może być zakłócony. Dotyczy to m. in. żywności suszonej, pieczonej, a również układów wielowarstwowych o zróżnicowanej a_w . Wzrost a_w w korpusie pod koniec okresu trwałości może być związany z przemianą fazową amorficznych składników korpusu: mleka, serwatki i laktozy w proszku oraz cukru pudru do stanu częściowo krystalicznego. W wyniku krystalizacji amorficznych materiałów następuje desorpcja wody, która wpływa na wzrost aktywności wody w momencie kiedy woda nie jest usuwana z układu [Roos, 2008; Roudaut, 2008]. Spadek a_w w polewie może wynikać zarówno z dyfuzji wody na zewnątrz cukierka, jak i do korpusu, z racji jego niższej aktywności wody.

Zarówno w całym produkcie Śliwka w czekoladzie jak i w śliwce kandyzowanej, znajdującej się w środku gotowego produktu, (rysunek 1 i tabela 1) w trakcie przechowywania aktywność wody znacząco się obniżyła. Parametr ten wzrósł w trakcie badania samej kuwertyury zdjętej z produktu. Opakowanie tego wyrobu (torebka papierowa i kartonik z tektury litej) pozwala na swobodną dyfuzję wody z zapakowanego wyrobu. Aktywność wody kuwertyury po 8 miesiącach przechowywania jest nadal niższa niż samej śliwki. Prawdopodobnie po wyrównaniu się a_w całego układu zmniejszona

dyfuzja wody ze śliwki pozwoliła na migrację wody z warstwy zewnętrznej i obniżenie tego parametru dla kuwertyury dążąc do wyrównania a_w całego układu. W badaniach Gondek i Lewickiego [2005] w owocach suszonych i kandyzowanych takich jak rodzynki, ananasy, mango zaobserwowano po 3 miesiącach przechowywania w środowisku o aktywności wody 0,438-0,755 osiągnięcie stanu równowagi sorpcyjnej z otoczeniem.

Kolejnym badanym wyrobem czekoladowym była Malaga – czekolada z nadzieniem pomadowo-rodzynkowym z dodatkiem alkoholu. Badając cały produkt (wykres 1) zauważono znaczne obniżenie a_w w produkcie. W kuwercie w ciągu 8-miesięcznego przechowywania nastąpił wzrost a_w , natomiast w nadzieniu jej spadek, aby wyrównać stosunki wodne panujące między warstwami. Grubsza warstwa kuwertyury niż w wyrobach oblewanych nie przeszkodziła dyfuzji wody z nadzienia.

Czekolada cytrynowa z zieloną herbatą była produktem składającym się z 3 warstw (dwóch rodzajów nadzienia – żelowego i tłustego). Pomimo tak różnorodnego układu warstw, a_w w całej czekoladzie w ciągu 8 miesięcznego okresu przydatności do spożycia nie zmieniła się znacznie. Zmiany w zakresie tego parametru nastąpiły pomiędzy warstwami nadzienia żelowego i tłustego. Nastąpiła dyfuzja wody z nadzienia żelowego charakteryzującego się początkowo wyższą aktywnością wody, które w trakcie przechowywania utraciło wodę do nadzienia tłustego, a w mniejszym stopniu do kuwertyury, która tą wodę przyjęła.

Krówka mleczna jest produktem jednorodnym. W trakcie przechowywania cukierka nastąpił wzrost aktywności wody. Proces technologiczny produkcji tego wyrobu może tłumaczyć wzrost tego parametru. Polega on na gotowaniu masy mlecznej z mleka w proszku, syropu skrobiowego, cukru, masła, dodatków smakowych. Odparowanie wody z masy odbywa się w wyparce w temperaturze ok. 120°C. Następnie gorącą masę wylewa się na okres 1,5-2 godzin na zimne stoły, gdzie w trakcie stygnięcia zachodzi wstępny proces krystalizacji masy, skutkiem czego po 5-7 dniach powstaje tzw. łożka. Bezwzględny warunkiem powstania łożki jest jak najmniejsza ingerencja w masę chłodzonego produktu. W zależności od warunków przechowywania, łożka utrzymuje się około miesiąca, a później następuje proces całkowitej krystalizacji masy [Wyczański, 1981]. W skład krowki wchodzi cukry w stanie amorficznym (sacharozę, glukozę, fruktozę, laktozę) i dlatego zachodzi ich rekrytalizacja. Przejście ze stanu amorficznego w stan krystaliczny polega na wydzieleniu wody i tym należy tłumaczyć wzrost aktywności wody w trakcie przechowywania. Bakier [2007] przeprowadził badania wpływu krystalizacji glukozy w miodach na wzrost aktywności wody. Stwierdził, że powstawaniu fazy krystalicznej glukozy w miodzie towarzyszą oddziaływania powierzchniowe, które powodują wzrost a_w . Aktywność wody po krystalizacji zależy od pochodzenia miodu, a przyrost a_w wynosi od 0,03 do 0,05. Wykazano również,

że nie ma korelacji między wzrostem a_w po krystalizacji, a zawartością wody w produkcie.

Ostatnim badanym produktem było Kakao MT alkalizowane. W czasie przechowywania w produkcie stopniowo następowała adsorpcja wody powodująca wzrost aktywności wody. Kowalska i in. [2005] badając właściwości sorpcyjne mieszanin proszków spożywczych stwierdzili, że im większa była aktywność wody środowiska, w którym przetrzymywano próbki, tym większa była zdolność chłonięcia przez nie wody. Z ich pracy wynika, że przy a_w ok. 0,3 siła wiązania cząsteczek wody uzależniona jest od rozmieszczenia grup hydrofilowych na powierzchni adsorbentu. Proszek kakaowy bez dodatków tylko częściowo się rozpuszcza w wodzie, a nadanie charakteru bardziej hydrofilowego można osiągnąć np. poprzez dodanie emulgatorów [Kowalska i in., 2006]. W innych badaniach zespołu [Kowalska i in., 2011] autorzy stwierdzili, że proszki spożywcze należą do grupy produktów, które cechują się niską początkową aktywnością wody, na poziomie 0,15 - 0,40, co znajduje potwierdzenie w niniejszych badaniach. Jednocześnie charakteryzują się wysoką higroskopijnością i łatwo chłoną wodę z otoczenia, co z kolei ma wpływ na ich jakość i trwałość.

Na początku badań i na koniec okresu trwałości wykonano analizy mikrobiologiczne. W żadnych badanych próbkach wyrobu nie wykryto obecności pałeczek *Salmonella sp.* w 25 g produktu, a liczba bakterii z grupy *coli* oraz pleśni i drożdży była mniejsza niż 10 w 1 g. Liczba drobnoustrojów mezofilnych tlenowych (OLD) była zróżnicowana w zależności od asortymentu i warstwy poszczególnych wyrobów cukierniczych. W interpretacji wyników posłużono się Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z 2003 roku zał. 7 (aktualnym Rozporządzeniem jest rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007, w którym wyroby cukiernicze jako bezpieczna mikrobiologicznie żywność nie zostały ujęte), norm przedmiotowych i danych literaturowych [Maziąg, 1999; Meursing, 1999]. W momencie rozpoczęcia badań wszystkie wyroby spełniały powyższe wymagania mikrobiologiczne. Brak bakterii patogennych, bakterii wskaźnikowych – grupy *coli*, pleśni i drożdży wskazuje na prawidłowo przeprowadzony proces produkcyjny i użycie dobrej jakości surowca wyjściowego. Największą ilość drobnoustrojów mezofilnych tlenowych (OLD) wykryto w korpusie Michałków Białych, co może być związane ze składem surowcowym oraz technologicznym procesem produkcji (niskie temperatury). Natomiast nie wykryto bakterii w śliwce kandyzowanej i nadzieniu żelowym czekolady cytrynowej (mniej niż 10 jtk/g), co z kolei może być spowodowane wysoką temperaturą procesu produkcyjnego, Również w Mieszance Krakowskiej w korpusie liczba bakterii jest znamienne niska (10 jtk/g). Biorąc pod uwagę całe wyroby (Mieszanka Krakowska, Krówka mleczna, Śliwka w czekoladzie, Malaga, Czekolada cytrynowa oraz Michałki Białe) OLD była niska i wynosiła od $4,0 \cdot 10^1$ do $1,9 \cdot 10^2$ jtk/g, OLD dla Kakao ($4,2 \cdot 10^2$ jtk/g) było

najwyższe spośród wszystkich badanych produktów, lecz mieści się w zakresie zgodnym z normą PN-A-88113:1998 (max. $1,5 \cdot 10^4$ jtk/g).

Na podstawie wyników badań OLD w wyrobie pod koniec okresu trwałości stwierdzono, że w trakcie przechowywania bakterie nie namnożyły się i nie nastąpiła również ich redukcja. Potwierdzają to dane literaturowe, zgodnie z którymi wyroby czekoladowe pomimo niskiej aktywności wody są doskonałym środowiskiem dla bakterii do przetrwania w stanie anabiozy w trakcie długiego okresu przechowywania [Mazigh, 1999].

Wnioski:

1. We wszystkich badanych wyrobach cukierniczych aktywność wody na początku badań nie przekroczyła 0,80, a w Michałkach Białych i Kakao wartość ta wynosiła poniżej 0,4.
2. W wyrobach składających się z kilku warstw o znacznie różniącej się aktywności wody, w trakcie przechowywania następowało wyrównanie tego parametru dla całego wyrobu, a następnie desorpcja wody do otoczenia. Przykładem może być Czekolada cytrynowa, w której końcowa wartość aktywności wody nie zmieniła się znacznie, pomimo istotnych zmian pomiędzy nadzieniami i kuwerturą.
3. W trakcie przechowywania aktywność wody obniżyła się w większości wyrobów, natomiast w przypadku Krówki mlecznej nastąpiła przemiana fazowa prowadząca do krystalizacji cukrów, co wpłynęło na wzrost aktywności wody, podobnie jak w przypadku Kakao MT w proszku, gdzie nastąpił wzrost, prawdopodobnie w wyniku adsorpcji wody.
4. Analizowane wyroby cukiernicze spełniały wymagania mikrobiologiczne. Brak *Salmonelli*, bakterii coli oraz pleśni i drożdży świadczy o właściwie przeprowadzonym procesie produkcyjnym i użyciu dobrej jakości surowca. Liczba drobnoustrojów mezofilnych tlenowych spełniała również kryteria mikrobiologiczne, a w trakcie przechowywania bakterie te nie namnożyły się i nie nastąpiła również ich redukcja.

Literatura

1. Bakier S. Influence of glucose changes on water activity In selected honeys. Acta Agrophysica, 2007, 9(1), 7-19.
2. Cordier J. HACCP in the chocolate industry. Food Control, 1994, 5(3), 171-174,
3. Ćwiertniewski K., Polak E., Egierski K. Aktywność wody parametr trwałości produktów spożywczych. Przemysł Spożywczy, 2005, 11, 16-19.
4. Gondek E., Lewicki P. Izotermy sorpcji pary wodnej suszonych i kandyzowanych owoców. ACTA Scientiarum Polonorum, Technol. Aliment, 2005, 4(1) 63-71.

5. Kita A., Malicki A., Bruzewicz S. Porównanie aktywności wodnej i trwałości mikrobiologicznej wybranych wyrobów czekoladowych przechowywanych w różnych temperaturach. *ACTA Scientiarum Polonorum, Medicina Veterinaria*, 2004, 3(2), 19-24.
6. Kowal K. Wpływ aktywności wody na wzrost drobnoustrojów. *Przemysł Spożywczy*, 2012, 66, 50-52.
7. Kowalska H., Domian E., Janowicz M., Lenart A. Właściwości sorpcyjne wybranych mieszanin proszków spożywczych o składzie białkowo-węglowodanowym. *Inżynieria Rolnicza*, 2005, 11(71), 259-265.
8. Kowalska J., Lenart A., Dobrowolska J. Wpływ czasu przechowywania na właściwości fizyczne i stabilność kakao z dodatkiem kwasu l-askorbionowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2006, 1(46), 83-90
9. Kowalska J., Majewska E., Lenart A. Aktywność wody napoju kakaowego w proszku o zmodyfikowanym składzie surowcowym *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2011, 4(77), 57-65.
10. Lewicki P. Woda jako składnik żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2003, 5, 8-14.
11. Mazihg E., Zijdrveld J. *Cocoa Mass, Cocoa Butter and Cocoa powder: w Industrial Chocolate manufacture and Use*, Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing Company Editorial Offices 1999, 381-386.
12. Meursing E., Zijdrveld J. *Cocoa Mass, Cocoa Butter and Cocoa powder, w Industrial Chocolate manufacture and Use*, Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing Company Editorial Offices 1999, 112.
13. Pałacha Z. Aktywność wody ważny parametr trwałości żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2008, 4, 22-27.
14. PN-A-88113:1998 Półprodukty cukiernicze. Półprodukty z ziarna kakaowego.
15. PN-EN ISO 4833:2004/Ap1 2005 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C.
16. PN-EN ISO 6579:2003 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.
17. PN-EN 4832:2007 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby bakterii z grupy coli. Metoda płytkowa.
18. PN-ISO 21527-2:2009 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95.
19. PN-ISO 21807:2005 Mikrobiologia żywności i pasz. Określanie aktywności wody.
20. Roberts T.A., Cordier J., Gram L., Tompkin R.B., Pitt J.I. *Microbiology of foods 6 Microbial ecology of food commodities. Cocoa, chocolate and confectionery*, Kluwer Academic/Plenum Publishers 2005, 468-475.

21. Roos Y.H. Water Activity and Glass Transition, Wiley-Blacwell 2008, 41-43.
22. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 stycznia 2003 r. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności, Dz.U. 2003 nr 37 poz. 326.
23. Roudaut G. Water Activity and Physical Stability, Wiley-Blacwell 2008, 208.
24. Tapia S.M., Alzamora S.M., Chirife J. Effects of Water Activity (a_w) on Microbial Stability: As a Hurdle in Food Preservation, Wiley-Blacwell 2008, 239-256.
25. Tamminga S.K., Beumer R.R., Kampelmacher E.H., van Leusden F.M. Survival of Salmonella eatbourne and Salmonella typhimurium in milk chocolate prepared with artificially contaminated milk powder. Journal of Hygiene, 1977, 79, 333-337.
26. Wyczański S. Cukiernictwo, Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne, Warszawa 1981, 151-159.



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: audytorzy, 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.



Konica Minolta Sensing Europe B.V. Sp. z o.o.
Oddział w Polsce
53-025 Wrocław, ul. Skarbowców 23a
Tel: 71 734 52 11
e-mail: info.poland@seu.konicaminolta.eu
www.konicaminolta.pl

Oferujemy precyzyjne instrumenty pomiarowe Konica Minolta dla przemysłu i nauki:

- Do kontroli jakości oraz recepturowania barwy rozmaitych produktów, oferujemy wiele modeli laboratoryjnych oraz przenośnych **kolorymetrów**, **spektrofotometrów** i **spektrodensytmetrów**, wraz z oprogramowaniem. Mamy także **komory świetlne** do wizualnego porównywania barw oraz przenośne **mierniki połysku** powierzchni.
- Lekkie, poręczne **mierniki światła** mierzą luminancję źródeł światła, temperaturę barwową i chromatyczność, natężenie oświetlenia i widmo światła.
- Do regulacji monitorów komputerowych, wyświetlaczy LCD oraz ekranów plazmowych TV oferujemy przemysłowe **analizatory barw**.
- Przenośne, bezdotykowe **skanery laserowe 3D** potrafią w ciągu 0,3 sekundy stworzyć komputerowy, barwny model przestrzenny dowolnego przedmiotu.
- Do testowania **ogniw fotowoltaicznych** oferujemy fotoogniwa wzorcowe, symulatory słoneczne i spektrometry słoneczne.

- Chromatografia: GC, HPLC, UHPLC, LCxLC(MS), GCxGC(MS)
- Spektrometria mas: LC/MS, LC/MS-IT-TOF, GC/MS/MS, LC/MS/MS
- Analizatory biotechnologiczne, MALDI TOF-TOF
- Spektrofotometria: UV-VIS, FTIR, RF, AAS, ICP
- Analiza węgla organicznego: TOC
- Analiza powierzchni: XPS, Auger, ISS, SIMS
- Uniwersalne urządzenia testujące
- Maszyny wytrzymałościowe, twardościomierze
- Analizatory fluorescencyjne i rentgenowskie: EDX
- Analizatory wielkości cząstek



Gas Chromatograph Mass Spectrometer
GCMS-TQ8040



Liquid Chromatograph Mass Spectrometer
Nexera X2 LCMS-8050



Grand Prix Prezesa PAN
EuroLab Crime Lab
Warszawa 2014



- Kolumny do chromatografii cieczowej
- Kolumny do UHPLC
- Kolumny do chromatografii gazowej
- Kolumniki do ekstrakcji na fazie stałej (SPE)
- Zestawy do szybkiej analizy aminokwasów
- Zestawy do oczyszczania oligonukleotydów



PREPARE FOR BETTER RESULTS

- Systemy do zateżania i odparowania próbek
- Systemy do automatycznej ekstrakcji SPE na dyskach i kolumnkach



- Wysokosprawna chromatografia przeciwwprądowa HPLC



- Ekstraktory cieczą w stanie nadkrytycznym