

BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOSCI W ŁAŃCUCHU ŻYWNOSCIOWYM



POD REDAKCJĄ
GRAŻYNY LEWANDOWICZ
AGNIESZKI MAKOWSKIEJ

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Poznań, 2016

BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOSTCI W ŁAŃCUCHU ŻYWNOSTCIOWYM



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu



SPONSORZY



Colian™



Zeelandia

stwarzamy możliwości

BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOŚCI W ŁAŃCUCHU ŻYWNOŚCIOWYM

Redakcja naukowa

Grażyna Lewandowicz
Agnieszka Makowska

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Poznań 2016

Redakcja naukowa

Prof. dr hab. inż. Grażyna Lewandowicz
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr inż. Agnieszka Makowska
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

©Copyright by
Polskie Towarzystwo Technologów Żywności Oddział Wielkopolski
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Poznań 2016

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany ani rozpowszechniany za pomocą urządzeń elektronicznych, kopiujących, nagrywających i innych bez pisemnej zgody Wydawcy.

ISBN 978-83-7160-833-9

Redakcja

Joanna Le Thanh-Blicharz

Jacek Lewandowicz

Projekt okładki

Przemysław Kowalczewski

Wydawca

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań

Ark. wyd. 8,37

Wydanie I
Poznań 2016

Recenzenci

Dr hab. Hanna Maria Baranowska

Katedra Fizyki i Biofizyki

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr hab. Renata Cegielska-Radziejewska

Katedra Zarządzania Jakością Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Prof. dr hab. inż. Danuta Górecka

Katedra Technologii Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr inż. Joanna Le Thanh-Blicharz

Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

Prof. dr hab. inż. Grażyna Lewandowicz

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr inż. Agnieszka Makowska

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr hab. inż. Krzysztof Melski

Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości

Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr inż. Michał Piątek

Instytut Technologii Mięsa

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Prof. dr hab. inż. Edward Pospiech

Instytut Technologii Mięsa

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr hab. inż. Dorota Walkowiak-Tomczak

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Autorzy

Róża Biegańska-Marecik

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dawid Biskup

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Barbara Cania

Instytut Technologii Mikrobiologicznych w Turku

Renata Cegielska-Radziejewska

Katedra Zarządzania Jakością Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ryszard Cierpiszewski

Katedra Towaroznawstwa i Ekologii Produktów Przemysłowych

Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Krzysztof Dwiecki

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wojciech Juzwa

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Marcin Kidoń

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Agata Lasik

Katedra Zarządzania Jakością Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Halina Makała

Zakład Technologii Mięsa i Tłuszczu

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

Sylvia Mildner-Szkudlarz

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Karolina Młynarczyk

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Jan Nawrot

Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu

Małgorzata Nogala-Kałucka

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Przemysław Piotr Olejnik
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Tomasz Pawłowski
Katedra Towaroznawstwa Żywności
Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Dorota Piasecka-Kwiatkowska
Katedra Biochemii i Analizy Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Juliusz Pijacki
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Szymon Powałowski
Wyższa Szkoła im. Stanisława Leszczyńskiego w Lesznie

Natalia Radomska
Katedra Towaroznawstwa i Ekologii Produktów Przemysłowych
Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Elżbieta Radziejewska-Kubzdela
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

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

Olga Stefko
Katedra Ekonomiki Przedsiębiorstw Agrobiznesu
Wydział Ekonomiczno-Społeczny, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Kinga Stuper-Szablewska
Wydział Technologii Drewna, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Tomasz Szablewski
Katedra Zarządzania Jakością Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Daria Szymanowska-Powałowska
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Michał Świątek
Instytut Technologii Mikrobiologicznych w Turku

Mariusz Tichoniuk
Katedra Towaroznawstwa i Ekologii Produktów Przemysłowych
Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Łukasz Tomczyk
Katedra Zarządzania Jakością Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dorota Walkowiak-Tomczak
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Iwona Wrześniewska-Wal
Zakład Ekonomiki Prawa i Zarządzania
Szkoła Zdrowia Publicznego, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego

Jan Zabielski
Katedra Zarządzania Jakością Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Magdalena Zielińska-Dawidziak
Katedra Biochemii i Analizy Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wojciech Zmudziński
Katedra Towaroznawstwa Żywności
Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

SPIS TREŚCI

Streszczenie.....	11
Wstęp	13
<i>Iwona Wrześniewska-Wal</i>	
Bezpieczeństwo żywności GMO po wprowadzeniu klauzuli opt-out.....	14
<i>Dorota Piasecka-Kwiatkowska, Olga Stefko</i>	
Bezpieczeństwo produktów przeznaczonych dla osób z alergią pokarmową - aspekty analityczne i ekonomiczne wprowadzania innowacji w przedsiębiorstwie	24
<i>Dorota Piasecka-Kwiatkowska, Jan Nawrot, Magdalena Zielińska-Dawidziak</i>	
Elektroforetyczna metoda wczesnego wykrywania ukrytego porażenia ziarna zbóż wołkiem zbożowym	32
<i>Agata Lasik, Tomasz Szablewski, Renata Cegielska-Radziejewska, Łukasz Tomczyk, Jan Zabielski</i>	
Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej do oceny bezpieczeństwa żywności	41
<i>Tomasz Szablewski, Kinga Stuper-Szablewska, Renata Cegielska-Radziejewska, Łukasz Tomczyk, Agata Lasik</i>	
Drobnoustroje i produkty ich metabolizmu w środowisku kurnika, a jakość i bezpieczeństwo jaj	50
<i>Łukasz Tomczyk, Tomasz Szablewski, Renata Cegielska-Radziejewska, Agata Lasik</i>	
Jakość jaj pozyskanych z klatkowego systemu utrzymania kur niosek	57
<i>Juliusz Pijacki, Przemysław Piotr Olejnik, Wojciech Juzwa</i>	
Kontrola zanieczyszczeń bakteryjnych w procesie fermentacji etanolowej.....	65
<i>Michał Świątek, Daria Szymanowska-Powałowska, Barbara Cania, Szymon Powalowski</i>	
Izolacja, selekcja i identyfikacja drobnoustrojów o potencjale biotechnologicznym.....	73
<i>Natalia Radomska, Mariusz Tichoniuk, Ryszard Cierpiszewski</i>	
Konstrukcja wskaźnika świeżości żywności przeznaczonego do wykorzystania w opakowaniach inteligentnych	93
<i>Elżbieta Radziejewska-Kubzdela, Róża Biegańska-Marecik, Marcin Kidoń, Dorota Walkowiak-Tomczak, Karolina Młynarczyk</i>	
Wpływ atmosfery o wysokiej zawartości tlenu na jakość minimalnie przetworzonej sałaty masłowej	102
<i>Tomasz Pawłowski, Wojciech Zmudziński</i>	
Wskaźniki obecności tlenu aktywowane promieniowaniem UV. Ocena możliwości zastosowania zieleni metylenowej i czerwieni metylenowej	112
<i>Sylvia Mildner-Szkudlarz, Aleksander Siger, Krzysztof Dwiecki, Dawid Biskup, Małgorzata Nogala-Kałucka</i>	
Optymalizacja i walidacja oznaczania n ^e -karboksymetylolizyny w skórce pieczywa metodą RP-HPLC-FLD	121
<i>Halina Makala</i>	
Porównanie metod oznaczania zawartości chlorku sodu w przetworach mięsnych.....	131

STRESZCZENIE

Celem polityki w zakresie bezpieczeństwa żywności jest ochrona konsumentów realizowana zarówno przez odpowiedni system prawny regulujący wytwarzanie i obrót żywnością, ale przede wszystkim poprzez kontrolę i postępowanie zgodnie ze standardami bezpieczeństwa na każdym etapie produkcji żywności - poczynając od surowców, poprzez proces technologiczny, a kończąc na przechowywaniu gotowych produktów. Niniejsza monografia poświęcona jest problemowi bezpieczeństwa żywności i różnym aspektom tego zagadnienia występującym we wszystkich ogniwach łańcucha żywnościowego.

Wszystkie jednostki tworzące łańcuch żywnościowy działają w określonym systemie prawnym, zatem nie można w zakresie gospodarki żywnościowej abstrahować od obowiązujących uwarunkowań legislacyjnych. Szczególnie odnosi się to do żywności zmodyfikowanej genetycznie, w stosunku do której znaczna część konsumentów na terenie Polski i całej Unii Europejskiej wykazuje daleko posuniętą rezerwę. We wrześniu 2015 roku wprowadzono tzw. klauzulę opt-out, która jest początkiem znaczących zmian legislacyjnych w UE. Nowa regulacja daje państwom członkowskim możliwość podjęcia samodzielnej decyzji o uprawach konkretnych roślin genetycznie modyfikowanych, już autoryzowanych w UE. W rozdziale pierwszym niniejszej monografii przedyskutowano to zagadnienie, stawiając jednocześnie pytanie o kierunek dalszych zmian legislacyjnych w całej UE, a także w Polsce.

Kolejne rozdziały poświęcone zostały zagadnieniom kontroli substancji szkodliwych w żywności, jakie mogą się w niej znaleźć m. in. z powodu żerowania owadów szkodników. W rozdziale drugim przedstawiono metodę detekcji wołka zbożowego, która umożliwia stwierdzenie obecności jednego owada w masie 30 kg ziarna, a jej zaletami są prostota, krótki czas wykonania oraz niski koszt analizy. Dzięki tym zaletom może ona być powszechnie stosowana w branżowych laboratoriach diagnostycznych oraz kontroli celnej zbóż. Konieczność stosowania tak czułych metod detekcji wynika z faktu, iż odchody owadów bardzo często wykazują działanie alergizujące. Tej tematyce poświęcony jest też kolejny rozdział, w którym zanalizowano zagrożenia produkcyjne mogące wpływać na bezpieczeństwo produktów dla alergików. Zaproponowano stworzenie systemu nadzoru laboratoryjnego bezpośrednio na terenie przedsiębiorstwa i opracowano założenia funkcjonowania takiego laboratorium wraz z analizą ekonomiczną przedsięwzięcia.

Za zagrożenia niosące największe ryzyko dla zdrowia i życia konsumenta uważa się zagrożenia mikrobiologiczne. Tej problematyce poświęcone są kolejne trzy rozdziały. W rozdziale trzecim przedstawiono modele matematyczne charakteryzujące reakcję drobnoustrojów na określone warunki środowiska oraz zweryfikowano możliwość ich zastosowania do przewidywania wzrostu, przeżywalności i inaktywacji mikroorganizmów w żywności. Jakość mikrobiologiczna żywności zależy także od pomieszczenia produkcyjnego. W przypadku jaj jest to kurnik. W aspekcie bezpieczeństwa jaj przedstawiono mikroorganizmy i ich metabolity, które najczęściej bytują w kurnikach. Omówiono także zanieczyszczenia występujące w środowisku kurnika mogące potencjalnie wpłynąć na jakość jaj konsumpcyjnych. Znajomość potencjalnych zagrożeń występujących podczas hodowli kur daje możliwość podejmowania decyzji, które pozwolą ograniczyć niepożądane zmiany w kształtowaniu jakości jaj. Ponadto w związku z częstymi skażeniami

bakteryjnymi istnieje potrzeba opracowania i wprowadzenia do praktyki przemysłowej szybkich i wysokowydajnych metod pozwalających na wykrywanie skażeń. W kolejnym rozdziale przedstawiono szereg metod (HPLC, PCR, q-PCR, cytometria przepływowa) pozwalających na kontrolę wzrostu bakterii w trakcie procesu fermentacji etanolowej.

Drobnoustroje, które najczęściej postrzegane są jako zagrożenie, mogą spełniać pozytywną rolę w technologii i to nie tylko jako katalizatory procesów fermentacji lub kiszenia. Od lat poszukuje się szczepów bakterii o potencjale biotechnologicznym, które charakteryzują się cennymi właściwościami metabolicznymi. W kolejnym rozdziale przedstawiono charakterystykę mikroorganizmów o wysokim potencjale biotechnologicznym, wyselekcjonowanych z kału noworodka, kiszonej kapusty i ogórków.

Kolejne trzy rozdziały dotyczą problemu przechowywania żywności. Opisano w nich różne ostatnio opracowane metody pakowania produktów spożywczych. Celem ich stosowania jest przedłużenie świeżości żywności. W tym celu szczególnie efektywna okazuje się atmosfera modyfikowana i tzw. opakowania inteligentne.

Ostatnie dwa rozdziały poświęcono analizie substancji (nie zawsze pożądaných) pojawiających się w wyniku zastosowanego procesu produkcyjnego. W reakcji Maillarda powstaje grupa związków (np. Nε-karboksymetylolizyna - CML), uznana za kancerogenną lub mutagenną. W pierwszym z ww. rozdziałów przedstawiono zoptymalizowane warunki analizy chromatograficznej wykorzystującej odwrócony układ faz z detekcją fluorymetryczną. Jest to technika, którą z powodzeniem można zastosować do ilościowej analizy CML w produktach zbożowych. W ostatnim rozdziale podjęto temat rutynowej kontroli zawartości chlorku sodu w mięsie i przetworach mięsnych. Wykazano, że do tego celu można stosować zarówno metodę potencjometryczną, jak ICP – AES. Nie są one obciążone błędem systematycznym stałym, nie są skomplikowane, są natomiast szybkie w wykonaniu i charakteryzują się dużą czułością i precyzją oznaczania.

Słowa kluczowe: GMO, alergeny, zanieczyszczenia drobnoustrojowe, opakowania, detekcja substancji szkodliwych

WSTĘP

Niniejsza monografia jest pokłosiem II Wielkopolskiej Konferencji Nauka Gospodarce Żywnościowej „25 lat technologii żywności w warunkach gospodarki rynkowej”. Spotkanie to zostało zorganizowane z okazji 25 lat istnienia Oddziału Wielkopolskiego Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, a jego celem było zaprezentowanie tematyki badawczej jednostek naukowych, które mogą być propozycją dla partnerów przemysłowych. Nawiązanie współpracy pomiędzy jednostkami naukowymi a przemysłem jest koniecznością i może przynieść korzyści obu stronom.

Łańcuch żywnościowy według normy ISO 22000 definiuje się jako sekwencję etapów i procesów mających miejsce w produkcji, przetwórstwie, dystrybucji, magazynowaniu i postępowaniu z żywnością oraz jej składnikami, poczynwszy od produkcji pierwotnej aż do konsumpcji. Ogniwami tego łańcucha są producenci płodów rolnych i pasz, producenci pierwotni i przetwórcy żywności, sprzedawcy hurtowi i detaliczni oraz firmy świadczące usługi żywieniowe. Wszyscy oni działają w określonym systemie prawnym, zatem nie można abstrahować od obowiązujących uwarunkowań legislacyjnych w zakresie gospodarki żywnościowej.

Dla wszystkich uczestników łańcucha żywnościowego znajomość i eliminacja zagrożeń biologicznych, chemicznych, czy też fizycznych jest kluczowa. Postępowanie zgodnie z systemami bezpieczeństwa i kontrola zagrożeń są ważne na każdym etapie produkcji żywności- poczynając od surowców, poprzez proces technologiczny, a kończąc na przechowywaniu gotowych produktów. Ze względu na ciągły postęp technologiczny istnieje potrzeba doskonalenia systemu kontroli i metod analitycznych, które są w stanie te zagrożenia identyfikować nie tylko w laboratorium naukowym, ale przede wszystkim na linii produkcyjnej.

Celem polityki w zakresie bezpieczeństwa żywności jest ochrona konsumentów przy równoczesnym zagwarantowaniu niezakłóconego działania rynku. Jest ona realizowana m.in. przez odpowiedni system prawny regulujący wytwarzanie i obrót żywnością. Dlatego też w niniejszej monografii nie ograniczono się tylko do zagadnień technologicznych i analitycznych, ale przedstawiono również najnowsze zmiany legislacyjne w aspekcie ich wpływu na bezpieczeństwo żywności. Książka kierowana jest głównie do kadry naukowej i technicznej pracującej na rzecz gospodarki żywnościowej, ale może być przydatna również dla studentów wydziałów technologii żywności oraz wszystkich zainteresowanych bezpieczeństwem żywności.

Grażyna Lewandowicz, Agnieszka Makowska

IWONA WRZEŚNIEWSKA-WAL

*Zakład Ekonomiki Prawa i Zarządzania Szkoły Zdrowia Publicznego
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie
idrwal@yahoo.com*

BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOŚCI GMO PO WPROWADZENIU KLAUZULI OPT-OUT

Streszczenie

Nieodłącznym elementem wprowadzania żywności GMO na rynek jest ryzyko. Stanowi to wystarczający argument przemawiający za wprowadzeniem szczególnego reżimu prawnego w tym zakresie, który został poddany analizie w niniejszej pracy. Artykuł zwraca także uwagę na bezpieczeństwo ekologiczne i zdrowotne. Opisuje wprowadzoną we wrześniu 2015 r. klauzulę opt-out, która jest początkiem znaczących zmian, legislacyjnych w UE. Nowa regulacja daje państwom członkowskim możliwość podjęcia samodzielnej decyzji o uprawach konkretnych roślin genetycznie modyfikowanych, już autoryzowanych w UE. Na tym tle autorka stawia sobie pytanie o kierunek dalszych zmian legislacyjnych w całej UE, a także w Polsce.

Słowa kluczowe: żywność GMO, klauzula opt-out, dyrektywa UE

Wstęp

Rozwój nowoczesnych technik, w tym biotechnologii stawia współczesnego człowieka przed pytaniami, które nie mogłyby się zrodzić jeszcze kilkadziesiąt lat temu. Powstaje dylemat między dążeniem do poznania, ulepszania, innowacji a ochroną podstawowych praw człowieka. Opinie, że stawką w tej grze jest przyszły kształt naszej cywilizacji, nie wydają się przesadzone. Konsekwencje ingerencji w mechanizmy genetyki są tak poważne, że nie mogą pozostać jedynie problemem naukowców [Przyłuska-Fischer, 1999]. Spożywaniu żywności zawsze towarzyszyła niepewność zarówno co do jej korzystnego wpływu na zdrowie, jak i pogorszenia jego stanu [Paliwoda, 1993]. Z tego względu są prowadzone i publikowane badania aspektów bezpieczeństwa żywieniowego GMO [Wawrzyniak, 2015]. Należy podkreślić, że takie badania prowadzone są również w Polsce, [Górecka, 2007; Kotłowski, 2013; Lisowska, 2013; Dąbrowski, 2014].

Przeciwnicy i zwolennicy GMO ponoszą wiele argumentów natury politycznej, ekonomicznej, religijnej i etycznej. Bardzo ważne są również aspekty ekologiczne uwolnienia GMO do środowiska [Skubała, 2014]. Do tej pory brakuje przejrzystych standardów oceny zagrożeń ekologicznych. Nie można obecnie ustalić długoterminowych konsekwencji uwolnienia GMO do środowiska [Rembiałkowska, 2013].

Po to, aby rozwój biotechnologii w pełni odpowiadał nowoczesnemu prawu w zakresie ochrony zdrowia ludzi i bezpieczeństwa środowiska Unia Europejska ustanowiła regulacje prawne wprowadzające surowe procedury postępowania z GMO. Komisja Europejska przekonuje, że dzięki procedurze autoryzacji, na rynek UE są dopuszczane tylko te produkty i uprawy GMO, które nie stanowią zagrożenia dla ludzi, zwierząt i środowiska.

Czy jest tak naprawdę, skoro z raportu Światowej Organizacji ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) [Steady increase, 2016] wynika, że na rynku UE są produkty nieautoryzowane? Ponadto na początku września 2015r. weszła w życie nowelizacja dyrektywy UE, dzięki której kraje członkowskie zyskały większą swobodę w podejmowaniu decyzji dotyczącej upraw GMO. Dotychczas, aby zakazać uprawy roślin GMO, należało w sposób naukowy wykazać szkodliwość ich działania na ludzi czy środowisko. Do tej pory żadne z państw należących do UE takiego wpływu nie było w stanie udowodnić [Wrześniewska-Wal, 2008]. Teraz dano im nowe narzędzie – klauzula op-out, która pozwala wprowadzać zakaz bez poparcia jakimikolwiek dowodami naukowymi, w związku z tym decyzje mogą być podejmowane pod wpływem nacisków ugrupowań społecznych, czy politycznych. Dzięki nowym regulacjom poszczególne kraje mogą samodzielnie zakazać uprawy roślin GMO na swoim obszarze. Jak będzie wyglądało bezpieczeństwo upraw GMO po wprowadzeniu klauzuli opt-out? W tym kontekście powstaje jeszcze jedno pytanie:, w jaki sposób zapobiec możliwym skażeniom transgranicznym między państwem członkowskim, w którym uprawa jest dozwolona, a sąsiednim państwem członkowskim, w którym jest ona zakazana?

Regulacje prawne

Wprowadzając do obrotu żywność GMO producenci korzystają z wolności gospodarczej zagwarantowanej w regulacjach prawa międzynarodowego (np. w przepisach Światowej Organizacji Handlu - WTO), w prawie Unii Europejskiej (m.in. traktowa zasada swobodnego przepływu towarów) oraz w konstytucjach poszczególnych państw. W Polsce jest to art. 22 Konstytucji [Konstytucja RP, 1997], który stanowi, że ograniczenie wolności działalności gospodarczej jest dopuszczalne tylko w drodze ustawy i tylko ze względu na ważny interes publiczny. Jednak korzystanie z tych praw i wolności nie może mieć charakteru absolutnego. Wyjątkowość produktu, jakim jest żywność GMO, i związane z jego wprowadzeniem do obrotu ryzyko wymaga ustanowienia szczególnej regulacji prawnej w zakresie bezpiecznego obchodzenia się z nim.

Tym niemniej żywność GMO tak jak i każdy inny rodzaj żywności musi spełniać podstawowe zasady bezpieczeństwa zawarte w rozporządzeniu nr 178/2002 ustanawiającym ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego [Rozporządzenie nr 178/2002, 2002]. Rozporządzenie to ma podwójny cel: zapewnienie swobodnego przepływu żywności oraz wysokiego poziomu ochrony zdrowia konsumentów. Nie zawsze są one zbieżne. Ze względu na specyfikę przedmiotu ochrony prawnej, którym jest żywność GMO wspólnotowy model ochrony prawnej opiera się na regulacjach o charakterze zarówno horyzontalnym, jak i wertykalnym [Iwańska 2000a, Iwańska 2000b]. Kryterium wyróżnienia obu koncepcji jest przedmiot regulacji. Koncepcja horyzontalna jest zorientowana na metodę postępowania (np. technika modyfikacji), a koncepcja wertykalna na produkt (np. żywność). Przykładem regulacji horyzontalnych w dziedzinie biotechnologii jest dyrektywa nr 2001/18 w sprawie uwolnienia do środowiska organizmów GMO [Dyrekrywa nr 2001/18, 2001] a regulacje wertykalne dotyczące żywności GMO to: rozporządzenie nr 1829/2003 w sprawie żywności GMO [Rozporządzenie nr 1829/2003, 2003] i rozporządzenie nr 1830/2003 dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie, żywności GMO i paszy [Rozporządzenie 1829/2003, 2003]. Takie rozwiązanie ma stanowić skuteczny

instrument ochrony takich praw człowieka jak życie, zdrowie, prawo do ochrony środowiska i prawo do informacji.

Wprowadzenie na rynek żywności GMO poprzedzone jest długotrwałą i restrykcyjną procedurą, podzieloną na etapy: oceny administracyjnej, oceny naukowej oraz konsultacji zarówno na poziomie instytucji Unii Europejskiej, jak również na poziomie państw członkowskich. Każdy przedsiębiorca, który chce wprowadzenie do obrotu żywność GMO musi posiadać zezwolenie. Procedura otrzymania zezwolenia, ujęta w rozporządzeniu nr 1829/2003 w sprawie żywności GMO stanowi, że przedsiębiorca składa wniosek składa do kompetentnego organu w państwie członkowskim, w którym dany produkt GMO ma być po raz pierwszy wprowadzony do obrotu. W Polsce jest to Główny Inspektor Sanitarny. Następnie streszczenie zawartości akt złożonych przez wnioskodawcę (firmę) jest bezzwłocznie przekazane do Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). EFSA informuje o wniosku Komisję i pozostałe państwa członkowskie udostępniając im wniosek oraz wszelkie inne informacje przekazane przez wnioskodawcę. Kolejny etap tej procedury obejmuje wydanie przez EFSA opinii naukowej dotyczącej oceny ryzyka dotyczącej wprowadzanego na rynek GMO. Wydając opinię, EFSA powinna zachować termin 6 miesięcy od daty otrzymania kompletnego wniosku. Opinia naukowa EFSA jest również dostępna dla społeczeństwa. W tym celu Komisja stworzyła specjalną stronę internetową, dzięki której jest możliwe zgłaszanie uwag i zastrzeżeń. Jednak pomimo tylu informacji dotyczących możliwości zgłaszania uwag przez opinie publiczną przepisy rozporządzenia nr 1829/2003 nie regulują podstawowej kwestii, w jaki sposób owe opinie wpłyną na podejmowaną przez Komisję decyzję, czy mają być publikowane, wzięte pod uwagę czy też ujęte w decyzji dotyczącej zezwolenia na wprowadzenie żywności GMO [Dąbrowska, 2003]. Należy podkreślić, że EFSA odgrywa kluczową rolę w na tym etapie procedury, ponieważ opinie naukowe EFSA dotyczące wprowadzanej na rynek żywności GMO mogą wywołać bezpośrednie skutki prawne dla wnioskodawców związane z wydaniem bądź nie wydaniem zezwolenia. Z tego względu przepisy ww. rozporządzenia przewidują możliwości administracyjnego przeglądu działań (lub zaniechań) EFSA, w tym również wydawanych opinii. Przeglądu może dokonać Komisja z własnej inicjatywy lub w odpowiedzi na wniosek państwa członkowskiego, lub innej bezpośrednio zainteresowanej osoby. Przepis ten jest krytykowany ze względu na znaczne ograniczenie niezależności EFSA [Kańska, 2004]. Ostatnim krokiem tej procedury jest przygotowanie i przyjęcie decyzji dotyczącej wniosku. W terminie trzech miesięcy od otrzymania opinii EFSA, Komisja składa do Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt projekt decyzji, którą zamierza podjąć w odniesieniu do wniosku. Formując projekt Komisja jest zobowiązana do kierowania się wskazaniem zawartymi w opinii EFSA, ale projekt decyzji nie musi być z nią zgodny. W przypadku wystąpienia różnic pomiędzy opinią EFSA a przygotowanym przez Komisję projektem decyzji, Komisja przedstawia i wyjaśnienia rozbieżności. W niektórych przypadkach uznaje się, że sama naukowa ocena ryzyka może nie dostarczyć wszystkich informacji, na których powinna się opierać decyzja dotycząca zarządzania ryzykiem oraz, że można uwzględnić inne czynniki istotne dla przedmiotowej sprawy [Preambuła, 2003]. Jakże są to czynniki wskazuje nam rozporządzenie nr 178/2002, podkreślając, iż te inne czynniki związane z rozpatrywaną sprawą powinny być brane pod uwagę w sposób prawnie uzasadniony, łącznie z czynnikami społecznymi, gospodarczymi,

związanymi z tradycją, etycznymi i środowiskowymi oraz możliwością ich kontroli. Następnie projekt decyzji jest głosowany, zgodnie z procedurą określoną w rozporządzeniu nr 182/2011 (procedura komitetowa) [Rozporządzenie nr 182/2011, 2011]. W procedurze tej państwa członkowskie głosują większością kwalifikowaną określoną w Traktacie. Jeżeli w Stałym Komitecie państwa członkowskie zgłoszą za projektem, Komisja przyjmuje decyzję. Jeżeli państwa zgłoszą przeciwko lub w wyniku głosowania nie zostanie przyjęta żadna opinia (wobec braku większości kwalifikowanej za projektem ani przeciwko niemu), Komisja może przekazać projekt decyzji innemu ciału reprezentującemu państwa członkowskie na wyższym szczeblu: komitetowi odwoławczemu. W Komitecie odwoławczym państwa członkowskie głosują ponownie nad projektem decyzji przedłożonym przez Komisję. Tak jak w pierwszym przypadku, jeżeli państwa członkowskie zgłoszą za projektem, Komisja przyjmuje decyzję. Jeżeli zgłoszą przeciwko, Komisja nie może jej przyjąć. Jeżeli w wyniku głosowania nie zostanie przyjęta żadna opinia, zgodnie z ramami prawnymi dotyczącymi GMO i z Kartą praw podstawowych Komisja musi przyjąć decyzję w sprawie wniosku. W rezultacie na koniec tej procedury ostateczna decyzja o zatwierdzeniu GMO pozostaje zawsze w rękach Komisji. Wydanie zezwolenia na wprowadzenie produktu GMO na rynek jest równoznaczne ze stwierdzeniem, iż stan nauki i techniki obecnie nie pozwala na stwierdzenie istnienia wad tego produktu [Korzycka-Iwanow, 2007]. Decyzja wydawana jest na 10 lat. Czas jej obowiązywania może być przedłużony na wniosek posiadacza zezwolenia, złożony nie później niż rok przed wygaśnięciem pierwotnego terminu obowiązywania decyzji.

Nowa regulacja - klauzula opt-out

Wprowadzając na rynek produktów GMO należy zwrócić uwagę nie tylko na bezpieczeństwo ludzi spożywających takie pokarmy, ale również na ekologiczne aspekty wprowadzania do obrotu żywności GMO. Organizmy te, zwłaszcza LMO (*Living Modified Organism*) uwolnione do środowiska naturalnego jako produkty dostępne w handlu, mogą rozmnażać się w środowisku naturalnym i przekraczać granice państwowe, a skutki takiego uwolnienia mogą być nieodwracalne [Żarski, 2009]. Istnieje zatem ryzyko ekspansji organizmów modyfikowanych i zajmowania przez nie biotopów właściwych organizmom naturalnym [Anoł, 2000]. Jest to niekorzystne szczególnie w odniesieniu opóźnionych skutków uwalniania GMO do środowiska, które mogą ujawnić się w następnych pokoleniach [Sznelewski, 2009]. Ocena ryzyka powinna być podejmowana w sposób niezależny, obiektywny i zrozumiały oraz opierać się na dostępnych dowodach naukowych. Podobnie jest w innych procedurach związanych z ryzykiem, np. przy rejestracji urządzeń medycznych, lub przy autoryzacji nowych testów toksykologicznych, gdzie nauka ma ostateczne zdanie. Z tego względu wspomniana już dyrektywa nr 2001/18 oraz rozporządzenie nr 1829/2003 w sprawie żywności GMO zawierają prawne procedury szacowania ryzyka, które w połączeniu z procesem zarządzania pozwalają na podejmowanie środków przeciwdziałających oraz ograniczających możliwość wystąpienia niekorzystnych skutków zdrowotnych i środowiskowych. Powyższe ramy prawne w pełni stosują się też do uprawy GMO do celów produkcji żywności i pasz. Do tej pory w celu ograniczenia lub zakazu uprawy GMO niektóre państwa członkowskie zastosowały klauzule ochronne i środki nadzwyczajne zgodnie z art. 23 dyrektywy 2001/18 oraz z art. 34 rozporządzenia

nr 1829/2003 w wyniku uzyskania po wydaniu zezwolenia nowych lub dodatkowych informacji mających wpływ na ocenę ryzyka dla środowiska naturalnego lub w wyniku ponownej oceny posiadanych wcześniej informacji [Opinion, 2004; Opinion, 2005]. Inne państwa członkowskie zastosowały procedurę notyfikacji określoną w art. 114 ust. 5 i 6 Traktatu o funkcjonowaniu Unii Europejskiej (TFUE) [Traktat, 2010], która wymaga przedstawienia nowych dowodów naukowych dotyczących ochrony środowiska lub środowiska pracy. Jednak do tej pory żadne z państw należących do UE takiego wpływu nie było w stanie udowodnić. Obecnie jest nowe narzędzie prawne - klauzula opt-out, które pozwala wprowadzać zakaz bez poparcia jakimikolwiek dowodami naukowymi. Dzięki tym regulacjom poszczególne kraje mogą samodzielnie decydować o uprawach roślin GMO na swoim obszarze. W marcu 2015 r. Rada i Parlament uzgodniły zmianę ram prawnych dotyczących GMO, umożliwiającą państwom członkowskim ograniczenie lub zakazanie uprawy zatwierdzonych GMO. Jest to dyrektywa nr 2015/412/UE [Dyrektywa nr 2015/412, 2015].

Nowa regulacja daje państwom członkowskim możliwość skorzystania z tzw. klauzuli opt-out w stosunku do uprawy konkretnych roślin genetycznie modyfikowanych, już autoryzowanych w UE. To znaczy, że konkretna roślina GMO będzie mogła być uprawiana tylko na terenie tych państw, które tego sobie życzą. Deklarację skorzystania z klauzuli ogłosiło łącznie 19 państw członkowskich. Polska również zamierza skorzystać z klauzuli opt-out w odniesieniu do 9 GMO [Restrictions, 2016]. Jednak ostatnie genetycznie modyfikowane uprawy autoryzowane przez UE to ziemniaki Amflora, w 2010 roku, które zostały wycofane z rynku w grudniu 2013 roku, zgodnie z nakazem sądu będącego częścią Europejskiego Trybunału Sprawiedliwości. Obecnie jedyną genetycznie modyfikowaną uprawą, autoryzowaną na terenie UE jest kukurydza MON 810 uprawiana głównie w Hiszpanii, a na znacznie mniejszą skalę także w Portugalii, Czechach, na Słowacji i w Rumunii. W przypadku naszego kraju nowa regulacja tak naprawdę niczego nie zmienia, ponieważ uprawa kukurydzy MON 810 jest zakazana.

Szansa na istotną zmianę była 22 kwietnia 2015 roku, kiedy to Komisja Europejska złożyła państwom członkowskim projekt, który zmieniłyby istniejące obecnie prawo w UE, umożliwiając państwom członkowskim na ograniczanie lub całkowity zakaz sprzedaży i używania genetycznie modyfikowanej żywności i paszy na własnym terytorium, nawet, jeśli produkty te zostały autoryzowane na poziomie UE. W tym celu Komisja przedłożyła Parlamentowi Europejskiemu i Radzie wniosek w sprawie zmiany omawianego wcześniej rozporządzenia nr 1829/2003 w sprawie żywności GMO. Według tej propozycji proces zatwierdzania GMO pozostanie bez zmian, ale państwa członkowskie uzyskają możliwość zdecydowania, czy genetycznie zmodyfikowana żywność lub pasza mogą być stosowane na ich terytoriach. Jednak powyższy projekt został odrzucony podczas głosowania w Parlamencie Europejskim w dniu 28 października 2015 r. Parlament odrzucił ten projekt, z powodu obaw, że przepisy będą niewykonalne i doprowadzą do kontroli granicznych pomiędzy krajami pro i anty-GMO. Posłowie PE wezwali KE do przygotowania nowego wniosku w tej sprawie, bo ich zdaniem nie ma realnego sposobu na to, aby państwa członkowskie nie dopuściły autoryzowanych przez UE GMO na swoje terytorium [Sesja PE, 2015].

Znakowanie żywności GMO

Oprócz aspektów zdrowotnych o uprawach GMO decydują również względy ekonomiczne, gdyż żywność wyprodukowana z takich roślin staje się tańsza, co może skłaniać konsumentów do ich zakupu. Podnoszą się głosy, że suwerenność żywnościowa to prawo ludzi, krajów i związków państw do definiowania własnej polityki rolnej i żywnościowej. Mieszkańcy swojego kraju mają możliwość wyboru swojego systemu żywnościowego. Prawo wyboru to prawo człowieka [Kud, 2014]. Z tego względu zgodnie z obowiązującymi przepisami wprowadzona na rynek żywność GMO musi być oznakowana. Natomiast w rozporządzeniu nr 1830/2003 określona została procentowa wartość progowa, poniżej której znakowanie materiału genetycznie modyfikowanego nie jest obowiązkowe. Zgodnie z tymi regulacjami przypadkowa i technicznie nieunikniona obecność genetycznie modyfikowanych składników w żywności i paszy do poziomu 0,9 % jest zwolniona z wymogów znakowania w UE.

Oprócz znakowania producenci, którzy otrzymali zezwolenie i wprowadzają produkty GMO na rynek, muszą je monitorować w środowisku. Monitoring ma odpowiedzieć na pytanie, czy GMO nie powodują jakiś potencjalnych zagrożeń dla innych organizmów. Wymagania te są również opisane w decyzji zezwalającej na wprowadzenie do obrotu. Rejestr autoryzowanego GMO prowadzi rozporządzenie to stanowi podstawę prawną do prowadzenia „Wspólnotowego rejestru genetycznie zmodyfikowanej żywności i pasz”. Rejestr ten ma formę elektroniczną, administrowany jest przez Komisję Europejską [EU register, 2016]. W UE jest 58 różnych GMO autoryzowanych jako żywność i pasze. Pojawia się jednak problem nieautoryzowanych a tym samym i nieoznakowanych produktów GMO na terenie Unii. Pierwsza sytuacja dotyczy produktów GMO nieautoryzowanych w żadnym kraju np. przypadkowe zanieczyszczenia produktu nieautoryzowanym GMO. W innych sytuacjach możemy spotkać się z autoryzacją asymetryczną, gdy na teren UE trafiają produkty, które są dopuszczone do obrotu w innych krajach, np. w Stanach Zjednoczonych czy Chinach, ale nie są dopuszczone do obrotu w Unii Europejskiej np. owoc papai. Trzecia sytuacja wiąże się z niesynchroniczną autoryzacją, kiedy to produkt GMO uzyskał już zezwolenie na wprowadzenie do obrotu w kraju trzecim, ale w UE jest dopiero zgłoszony do autoryzacji [Linkiewicz, 2014]. W marcu 2014 r. pojawił się raport Światowej Organizacji ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO). Badanie FAO, w którym brało udział 75 ze 193 krajów należących do FAO, wykazało wzrost ilości zakłóceń w handlu, związanych z wykryciem domieszek nieautoryzowanych GMO w kontrolowanych produktach. Pomiędzy 2009, a 2012 zostało zgłoszonych 138 z 198 przypadków występowania domieszek nieautoryzowanego GMO w produktach nie-GM. Głównie przypadki nieautoryzowanego GMO dotyczyły produktach pochodzących z USA, Kanady i Chin, w mniejszym stopniu również innych krajów. Po wykryciu większość towarów została zniszczona lub zwrócona do kraju pochodzenia. Najczęściej nieautoryzowanego GMO dotyczyło siemienia lnianego, ryżu, kukurydzy i papai. Z raportu wynika, że Chociaż techniki kontroli są coraz lepsze, 37 z 75 państw, które brały udział w badaniu stwierdziły, że nie posiadają wystarczających środków do wykrywania GMO (przede wszystkim: brak laboratoriów, techników i sprzętu) [Steady increase, 2016].

Podsumowanie

Wprowadzenia na rynek nowej technologii modyfikacji genetycznej ciągle wymusza powstanie nowych aktów prawnych dotyczących żywności i upraw GMO. Niewątpliwie przepisy te mają stwarzać podstawy do niezależnej naukowej oceny ryzyka tych produktów dla środowiska i zdrowia ludzi. Najprawdopodobniej wprowadzenie klauzuli opt-out jest początkiem znaczących zmian, również legislacyjnych w UE. W końcu osiągnięto kompromis, który da większą elastyczność państwom członkowskim odnośnie decyzji dotyczącej upraw roślin GMO. Jeżeli teraz możemy korzystać z klauzuli opt-out i nie uprawiać roślin GMO to wcale nie oznacza, że nie mamy prowadzić badań [Woźniak, 2015]. Art 14 ust. 4 rozporządzenia nr 178/2002 stanowi, że podczas podejmowania decyzji, że środek spożywczy jest szkodliwy dla zdrowia należy mieć na względzie nie tylko prawdopodobne i/ lub krótkotrwałe ale i długofalowe skutki tej żywności dla zdrowia spożywających ją osób a także dla następnych pokoleń. Raport WHO pokazuje nam nowe zagrożenie. Na rynku europejskim znajdują się nieautoryzowane a tym samym nieoznakowane produkty GMO. Oczywiście nie bez znaczenia jest czynnik ekonomiczny. Paradoksalnie ta sytuacja może przyczynić się do wprowadzania do obrotu większej ilości produktów GMO, ponieważ, aby zwiększyć konkurencję pomiędzy rolnikami na rynku wewnętrznym i wykluczyć przypadki występowania na rynku nieautoryzowanego GMO, państwa członkowskie będą dopuszczały nowe odmiany GMO na rynek europejski.

Literatura

Anioł A, Ocena ryzyka i metody zapobiegania zagrożeniom związanym z wprowadzeniem GMO do środowiska, konferencja, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Radzików, 27 maj 2000.

Dąbrowska P, Recent developments of the GMO regime in the EU: Drawbacks and improvements in relation to food safety [w:] Genetically Modified Organisms and EU Law materiały konferencyjne Food security in Europe and in the world. Second international workshop for young scholars (wish) 26 wrzesień 2003.

Dąbrowski T, Porównanie metod oceny wpływu roślin modyfikowanych genetycznie na układy troficzne w warunkach polowych, III konferencja Mity i rzeczywistość XXI wieku – Żywność Genetycznie Modyfikowana GMO, Warszawa 30 października 2014.

Dyrektywa nr 2001/18 Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) z dnia 12 marca 2001 r. w sprawie zamierzonego uwalniania do środowiska naturalnego organizmów zmodyfikowanych genetycznie Dz. Urz. UE L 106 z 17 kwietnia 2001, 1; ze zm.

Dyrektywa nr 2015/412 Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) z dnia 11 marca 2015 r. w sprawie zmiany dyrektywy 2001/18/WE w zakresie umożliwienia państwom członkowskim ograniczenia lub zakazu uprawy organizmów zmodyfikowanych genetycznie (GMO) na swoim terytorium Dz.U. L 68 z 13.3.2015, str. 1—8.

EU register of GM food and feed. Dostęp w Internecie [8.01.2016]

http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm,

Iwańska B, Podstawy prawne działania Wspólnoty Europejskiej w prawie techniki genetycznej, [w:] red. St. Biernat *Studia z Prawa Unii Europejskiej*, Wyd. UJ Kraków 2000, 527-528.

Górecka J, Zasady analizy ryzyka dla fauny pożytecznej przy wprowadzaniu odmian zmodyfikowanych genetycznie, *Kosmos- Problemy Nauk Biologicznych*, 2007, nr 3-4.

Iwańska B, Prawo techniki genetycznej – koncepcja horyzontalna a koncepcja wertykalna – wybór metody regulacji, *Prawo i Środowisko*, 2000, 1, 64-74.

Kańska K, Wolves In Clothing of Scheep? The case of the European Food Safety Authority, *European Law Review* 2004, 5 (29).

Konstytucja RP z dnia 2 kwietnia 1997 r. Dz.U. Nr 78, poz. 483 ze zm.

Korzycka-Iwanow M, Prawo żywnościowe. Zarys prawa polskiego i wspólnotowego, *WydLexisNexis 5 Warszawa* 2007, 181.

Kotłowski T, Wpływ roślin genetycznie modyfikowanych na pszczoły. Pożytek pszczeł z roślin genetycznie modyfikowanych – ocena ryzyka, konferencja: *Żywność genetycznie zmodyfikowana*, Warszawa, 20-21 czerwca 2013.

Kud K, GMO w rolnictwie, II Ogólnopolska Konferencja GMO - szanse czy zagrożenia?, Warszawa 24-26 październik 2014.

Linkiewicz A, Wyzwania związane z wykrywaniem autoryzowanych i niezautoryzowanych GMO, III konferencja *Mity i rzeczywistość XXI wieku – Żywność Genetycznie Modyfikowana GMO*, 30 października 2014 r.

Lisowska K, Najnowsze badania dotyczące wpływu spożywania paszy modyfikowanej genetycznie przez zwierzęta doświadczalne, konferencja: *Żywność genetycznie zmodyfikowana*, Warszawa 20-21 czerwca 2013.

Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Austrian invoke of Article 23 of Directive 2001/18/EC1 (Question No EFSA-Q-2004-062) z 22 lipca 2004. Dostęp w Internecie [8.01.2016]

www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/507_en.html.

Opinion of the GMO Panel related to the safeguard clause invoked by Hungary according to Article 23 of Directive 2001/18/EC (Question No EFSA-Q-2005-055) z 25 lipca 2005. Dostęp w Internecie [8.01.2016].

http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/1046_en.html.

Paliwoda J, Uwagi o prawie żywnościowym; Fundacja programów pomocy dla rolnictwa Warszawa 1997, 38.

Preambuła pkt. 32 rozporządzenia nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy Dz. Urz. WE L 268 z 18 października 2003 r.

Przyłuska-Fischer A, *Praktyczne problemy genetyki - zarys problematyki*, Prawo i Medycyna 1999, 4, 38-48.

Rembiałkowska E, Czy Polska potrzebuje genetycznie modyfikowanych roślin w rolnictwie i produkcji żywności ?konferencja: Żywność genetycznie zmodyfikowana Warszawa, 20-21 czerwca 2013.

Restrictions of geographical scope of GMO applications/authorisations: Member States demands and outcomes Dostęp w Internecie [8.01.2016]
http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/authorisation/cultivation/geographical_scope_en.htm.

Rozporządzenie nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w sprawie bezpieczeństwa żywności Dz. Urz. WE L 31 z 1 lutego 2002, s.1.

Rozporządzenie nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy Dz. Urz. WE L 268 z 18 października 2003 r.

Rozporządzenia nr 1830/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) z dnia 22 września 2003 r. dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie i zmieniających dyrektywę 2001/18/WE Dz. Urz. WE L 268 z 18 października 2003 r.

Rozporządzenie nr 182/2011 Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) z dnia 16 lutego 2011 r. ustanawiające przepisy i zasady ogólne dotyczące trybu kontroli przez państwa członkowskie wykonywania uprawnień wykonawczych przez Komisję Dz.U. L 55 z 28.2.2011, s. 13.

Sesja Parlament Europejskiego, Strasburg, 26-29 października 2015 r., sprawozdanie nr 3/2015, Bruksela, 30 października 2015 r. Dostęp w Internecie [8.01.2016].

<http://www.senat.gov.pl/download/gfx/senat/pl/defaultopisy/294/7/1/003.pdf>.

Skubała P, Dlaczego nie akceptuje żywności GMO ? Spojrzenie ekologa, konferencja: II Ogólnopolska Konferencja GMO - szanse czy zagrożenia?, Warszawa 25-26 październik 2014.

Steady increase in incidents of low levels of GM crops in traded food and feed Dostęp w Internecie [8.01.2016]

<http://www.fao.org/news/story/en/item/216311/icode/>.

Sznelewski P, Wpływ GMO na życie i zdrowie ludzi, konferencja Genetycznie zmodyfikowane organizmy z środowisko przyrodnicze, Warszawa 27 luty 2009.

Traktat o Funkcjonowaniu Unii Europejskiej, wersja skonsolidowana Dz.Urz. UE C 83 z 30 marca 2010, 47.

Wawrzyniak, A.: GMO – wpływa na zdrowie ludzi i zwierząt; wykład 16 października 2015, <http://pttzow.up.poznan.pl/gmo/> Dostęp w Internecie [13.01.2016].

Woźniak L, Społeczne, ekonomiczne i środowiskowe skutki wykorzystania w rolnictwie GMO, IV konferencja Mity i rzeczywistość XXI wieku – Żywność Genetycznie Modyfikowana GMO, 7 listopada 2015.

Wrześniewska-Wal I, Żywność genetycznie zmodyfikowana. Aspekty prawne. Wyd. UW Warszawa 2008, 59-60.

Żarski P, GMO - fakty i mity, konferencja Genetycznie zmodyfikowane organizmy a środowisko przyrodnicze, Warszawa 27 luty 2009.

DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OLGA STEFKO

Katedra Ekonomiki Przedsiębiorstw Agrobiznesu

Wydział Ekonomiczno-Społeczny

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

BEZPIECZEŃSTWO PRODUKTÓW PRZEZNACZONYCH DLA OSÓB Z ALERGIĄ POKARMOWĄ - ASPEKTY ANALITYCZNE I EKONOMICZNE WPROWADZANIA INNOWACJI W PRZEDSIĘBIORSTWIE

Streszczenie

Starzenie się społeczeństwa, choroby cywilizacyjne, ale także rosnąca świadomość powodują, że ludzie zwracają większą uwagę na cechy prozdrowotne artykułów żywnościowych. Szczególne wymagania mają konsumenci z alergią pokarmową, dla których istotną kwestią jest gwarantowany brak uczulającego składnika w produkcie.

Odpowiednim miejscem do wytwarzania żywności przeznaczonej dla alergików są małe i średnie przedsiębiorstwa o sprofilowanej produkcji dedykowanej osobom z alergią. Z tego względu postanowiono przeanalizować wybrane aspekty analityczne i ekonomiczne wprowadzania innowacji podnoszące bezpieczeństwo dwóch produktów wytwarzanych w firmie CELIKO S.A. Przeprowadzono analizę zagrożeń produkcyjnych mogących wpływać na zmniejszenie ich bezpieczeństwa dla alergików. Wskazano na potrzebę zwiększenia częstotliwości kontroli przypadkowej obecności alergenów na liniach i w pomieszczeniach, w których wytwarza się produkty bezpieczne dla alergików. Zaproponowano innowacyjne rozwiązanie polegające na stworzeniu systemu nadzoru laboratoryjnego bezpośrednio na terenie przedsiębiorstwa. Opracowano założenia funkcjonowania laboratorium, przeprowadzono analizę ekonomiczną i oceniono możliwości wdrożenia takiego rozwiązania.

Największy problem przy wdrażaniu innowacji związany był ze sposobem jej finansowania. W raporcie końcowym sugerowano aby niezbędne zmiany innowacyjne sfinansować ze środków własnych. Jednak przy obecnych możliwościach wsparcia finansowego ze strony UE przewidzianego na lata 2014 – 2020 wskazano również na inne, alternatywne rozwiązania, które mogą się okazać bardziej korzystne dla przedsiębiorstwa niż zamrażanie w inwestycjach długoterminowych środków własnych.

Słowa kluczowe: żywność bezpieczna, alergologia pokarmowa, innowacje w przedsiębiorstwie

Wprowadzenie

Alergie pokarmowe stanowią istotny problem współczesnego społeczeństwa, dotykają one około 2% dorosłych oraz około 4 – 8% dzieci [Rona i in., 2007; Sicherer i Sampson, 2010]. U ich podłoża leży nadwrażliwość ze strony układu immunologicznego na

różne składniki naturalnie występujące w żywności. Choć wszystkie składniki mogą potencjalnie wywołać uczulenie, jednak uważa się, że w Europie ryzyko wystąpienia alergii pokarmowej odnosi się przede wszystkim do 14 składników [Gendel, 2012].

Skutki spożycia żywności zawierającej uczulające składniki przez osoby na nie nadwrażliwe mogą być różne. Najczęściej występujące to: reakcje zapalne skóry, reakcja ze strony układu pokarmowego, oddechowego, krążenia i zagrażający życiu wstrząs anafilaktyczny. Dieta eliminacyjna polegająca na całkowitym wykluczeniu alergizującego składnika jest jedynym pewnym sposobem zapobiegania objawom choroby. Osoby cierpiące na to schorzenie poszukują żywności o gwarantowanej jakości, nie zawierającej uczulającego składnika. Informacje na temat braku alergenu w produkcie zainteresowani czerpią z danych zamieszczonych na etykiecie.

Zgodnie z obecnym prawem europejskim [Rozporządzenie UE 1169/2011 z dn. 25.11.2011], od grudnia 2014 roku wymagane jest jednoznaczne informowanie o stosowaniu któregośkolwiek z 14 alergennych składników wymienionych w załączniku do rozporządzenia. Od grudnia 2016 roku to samo dotyczyć będzie również żywności nieopakowanej, np. w zakładach żywienia zbiorowego.

Deklaracje umieszczane na opakowaniach najczęściej podawane są przez producentów na podstawie informacji uzyskanych od dostawców surowców podstawowych i pomocniczych stosowanych w przedsiębiorstwie. Uwzględniane są zarówno surowce stosowane do wytwarzania produktu, którego dotyczy etykieta, jak również inne stosowane na terenie przedsiębiorstwa, które mogą być przyczyną przypadkowej kontaminacji na skutek krzyżowania się ciągów technologicznych. Odpowiedzialność za umieszczane na etykietach informacje ponosi w całości producent wprowadzający do obrotu produkt. Ponieważ koszty zlecania kontroli produktów pod kątem zawartości alergenów w zewnętrznych laboratoriach są wysokie, nie mając pewności co do braku składników alergennych, producenci wolą zadeklarować ich obecność. Zdarza się, że wprowadza to w błąd konsumentów i ogranicza ich zaufanie do producentów żywności.

Odpowiednim miejscem do wytwarzania żywności przeznaczonej dla alergików są małe i średnie przedsiębiorstwa o sprofilowanej produkcji dedykowanej dla osób z alergią. W takich przedsiębiorstwach, o ograniczonym asortymencie produkcji, łatwiej jest całkowicie wyeliminować składniki alergenne, ograniczając możliwość przypadkowej kontaminacji, co podnosi bezpieczeństwo wytwarzanych tam produktów.

Z tego względu postanowiono przeanalizować wybrane aspekty technologiczne, analityczne i ekonomiczne konieczne aby przedsiębiorstwo mogło wprowadzić innowacje podnoszące bezpieczeństwo produktu spożywanego przez osoby z alergią. Jest to również istotne ze względu na utrzymanie jednorodności poszczególnych partii produkowanych w zakładzie.

Produkcja żywności dla osób z alergią pokarmową

Jedną z podstawowych cech gospodarki rynkowej jest ciągle dostosowywanie kwestii technicznych i technologicznych produkcji żywności pod zmieniające się potrzeby i preferencje klientów. A ci, zwłaszcza na przestrzeni ostatnich lat, coraz częściej, jako cechę determinującą zakupy, podają nie tylko cenę czy właściwości sensoryczne ale także wartość odżywczą. Starzenie się społeczeństwa, choroby cywilizacyjne ale przede wszystkim wzrost

świadomości powodują, że ludzie zwracają coraz większą uwagę na cechy prozdrowotne artykułów żywnościowych. W Stanach Zjednoczonych od 2007 roku zaobserwowano systematyczny wzrost popytu na żywność prozdrowotną. Od roku 2007 zwiększył się o 6%. Analitycy rynku przewidują, że zainteresowanie tym typem żywności będzie wzrastać [Evani, 2010; Nestorowicz i Nowak, 2011; Stefko i Zielińska – Dawidziak, 2016].

Dla osób z alergią pokarmową najistotniejszą kwestią jest brak uczulającego składnika w produkcie, dodatkowe właściwości prozdrowotne schodzą w tym wypadku na drugi plan. Obecność alergenów w finalnym produkcie może wynikać nie tylko ze świadomego stosowania surowców alergennych, ale także z używania surowców pomocniczych, często dostarczanych do zakładu nie przez bezpośrednich producentów lecz poprzez niekiedy kilku pośredników.

W związku z tym, w procesie produkcji ważna jest częsta kontrola laboratoryjna pod kątem obecności alergenów. Pomocne w tym względzie stają się metody immunochemiczne wykorzystujące wysoce specyficzne narzędzie badawcze jakim są przeciwciała. Zastosowanie tych metod pozwala na identyfikację alergennych substancji występujących nawet w śladowych ilościach [Kirsch i in., 2009; Stefko i in., 2013; Immer i Lacorn, 2015].

Kontrolę, między innymi w tym zakresie narzucają i zapewniają systemy GMP oraz system zarządzania HACCP. Przedsiębiorstwa świadome zagrożeń związanych z zanieczyszczeniem wyrobów nawet śladowymi ilościami alergenów, w bardzo restrykcyjny sposób przestrzegają procedur, by zapewnić bezpieczeństwo finalnego produktu [Ward i in., 2010].

W związku z zapotrzebowaniem, na rynku występuje obecnie wysoka podaż produktów zwanych prozdrowotnych produktów oraz przeznaczonych dla osób z alergią pokarmową. Powoduje to nasilenie konkurencji między przedsiębiorstwami i potrzebę znalezienia określonych przewag, gwarantujących wyprzedzenie rywali w grze rynkowej. Jest to zjawisko normalne, charakterystyczne dla gospodarki rynkowej. Zostało też szeroko opisane w literaturze przedmiotu [m. in. Gorynia i Łaźniewska, 2001; Jeznacha, 2003; Jeżewska-Zychowicz i in., 2009; Michalczyk, 2011; Stefko, 2013]. Podejmowanie określonych decyzji, w tym o podjęciu na przykład działań inwestycyjnych o charakterze innowacyjnym determinuje rozwój przedsiębiorstw. W tym samym czasie brak, bądź obniżająca się innowacyjność innych skutkuje najczęściej ich upadkiem i eliminacją z rynku. Poza innowacyjnością, na którą tak duży nacisk kładzie się w projektach unijnych na lata 2014 – 2020, bacznie poszukiwane są rozwiązania mogące obniżyć ryzyko niepowodzenia i zapewnić określoną przewagę konkurencyjną na rynku. Jednym z nich jest nawiązanie współpracy nauki z praktyką.

Charakterystyka przedsiębiorstwa i wprowadzanej innowacji

Przedsiębiorstwem doskonale wpisującym się w możliwość wytwarzania żywności bezpiecznej dla osób z alergią pokarmową jest działające na terenie Poznania od ponad 30 lat, średniej wielkości przedsiębiorstwo branży spożywczej CELIKO S.A. Od początku swojej działalności profil CELIKO S.A. był odpowiedzią na zapotrzebowanie rynku na produkty specjalnego przeznaczenia, dedykowane grupie konsumentów o zwiększonych wymaganiach żywieniowych. Do takiej grupy należą osoby cierpiące na celiakię, chorobę związaną z nietolerancją frakcji prolaminowych zbóż.

W zakresie produkcji żywności dedykowanej tej grupie konsumentów CELIKO S.A. jest pionierem na terenie Wielkopolski i kraju. CELIKO posiada trzy odrębne zakłady, z których jeden z nich jest dedykowany tylko produkcji bezglutenowej. W przedsiębiorstwie jest wdrożony Zintegrowany System Zarządzania Jakością (HACCP) zgodny z wymaganiami certyfikacji FSSC, co stwarza odpowiednie warunki dla produkcji bezpiecznej żywności. Przedsiębiorstwo dodatkowo w zakresie alergenów wprowadziło procedury postępowania od momentu wprowadzenia ich z surowcem do zakładu, poprzez proces produkcyjny, aż do opuszczenia z wyrobem gotowym. Ponadto przedsiębiorstwo to dowiodło, że jest otwarte na rozwój: aż trzykrotnie, w roku 2010, 2011 i 2012, zostało laureatem konkursu Gazele Biznesu ogłaszanego przez Puls Biznesu wyłaniającego najbardziej dynamicznie rozwijające się małe i średnie firmy. Potwierdzeniem wartości firmy i wysokiej jakości jej wyrobów jest przyznanie w 2015 roku prestiżowego godła „Teraz Polska” na produkowane owoce liofilizowane w formie batonu FRUPP oraz Złotego Medalu Targów Polagra 2015 dla batonu FRUPP BIO.

Świadome zagrożenie, wychodząc naprzeciw oczekiwaniom konsumentów cierpiących na alergię pokarmową przedsiębiorstwo CELIKO S.A. postanowiło zapoznać się z możliwością wprowadzenia na jego terenie innowacyjnego rozwiązania jakim jest unowocześnienie systemu nadzoru laboratoryjnego obecności alergenów bezpośrednio na terenie przedsiębiorstwa. Projekt został wykonany w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Priorytet VIII: Regionalne kadry gospodarki, Działanie 8.2. Transfer wiedzy, Poddziałanie: 8.2.1: Wsparcie dla współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw w ramach projektu „Wsparcie współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw w Wielkopolsce” realizowany przez Urząd Marszałkowski Województwa Wielkopolskiego. W opracowaniu projektu uczestniczyły dwie pracownice naukowo-dydaktyczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu mające doświadczenie w badaniu alergenności produktów spożywczych, aplikacji metod immunodiagnostycznych (dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska) i analizy ekonomicznej i finansowej przedsiębiorstw (dr Olga Stefko).

Przy stale zmieniającej się sytuacji rynkowej i gospodarczej, zarówno w skali kraju, jak i w perspektywie międzynarodowej, przedsiębiorstwa stale poszukiwać muszą źródeł pozyskania własnej przewagi konkurencyjnej i analizować potrzeby swoich klientów. Wspomagając te działania przeprowadzają szereg inwestycji, nie zawsze bezpośrednio produkcyjnych, które wiążą się jednak ze spełnieniem określonych uwarunkowań technicznych i technologicznych. Dzięki temu możliwa jest np. poprawa jakości oferowanych produktów, atrakcyjniejsze opakowanie czy ostatecznie – uzyskanie lepszej ceny na rynku.

Wprowadzenie przez CELIKO S.A. zaproponowanej innowacji miało na celu zwiększenie konkurencyjności firmy na rynku poprzez zagwarantowanie wysokiej jakości produktów dla osób z alergią pokarmową. Planowane do wprowadzenie przedsięwzięcie inwestycyjne, oprócz realizacji potrzeb społecznych i organizacyjnych przynieść miało przedsiębiorstwu również wymierne korzyści finansowe w postaci ograniczenia kosztów związanych ze zlecaniem oznaczania alergenów w laboratoriach zewnętrznych.

Aspekty analityczne

W pierwszym etapie realizacji projektu zapoznano się z technologią i organizacją produkcji stosowaną w przedsiębiorstwie CELIKO S.A., zwracając szczególną uwagę na możliwość produkcji żywności wolnej od składników alergennych.

Do przygotowania rozwiązań podnoszących bezpieczeństwo konsumentów z alergią pokarmową wybrano dwa produkty, tj. liofilizowane batony owocowe FRUPP i granulowane herbatki ziołowo-owocowe. Zostały one wybrane ze względu na fakt, że używane do ich produkcji składniki nie zawierają składników alergennych. Zapewnienie więc odpowiedniego bezpieczeństwa w czasie ich wytwarzania, jak również kontrola pod kątem zawartości alergenów może stanowić gwarancję ich bezpieczeństwa. Ponadto batony owocowe FRUPP pakowane są w opakowania jednostkowe przeznaczone do jednorazowego spożycia przez jedną osobę i stąd ograniczona jest możliwość ich wtórnego zanieczyszczenia po opuszczeniu zakładu, a jeszcze przed konsumpcją.

W czasie produkcji herbatek owocowo-ziołowych możliwa jest obecność następujących składników alergennych: białka zbóż (kawa zbożowa), soja (lecytyna sojowa), białka mleka (serwatka, mleko w proszku, zabielaacz do napojów), orzechy (mączka orzechowa). Natomiast przy produkcji batona FRUPP mogą wystąpić białka mleka i mączka orzechów. Przypadkowa kontaminacja mogła by nastąpić magazynie surowca lub poprzez odzież personelu, gdyż na liniach produkcyjnych w/w wyrobów składniki alergenne nie występują. Ze względu na możliwość przypadkowej kontaminacji szczególnie na te składniki trzeba zwrócić uwagę podczas produkcji żywności przeznaczonej dla alergików.

Przeprowadzono analizę zagrożeń produkcyjnych, które mogą wpłynąć na zmniejszenie bezpieczeństwa analizowanych produktów dla osób z alergią pokarmową. Wyodrębniono obszary w ramach, których należałoby przeprowadzić zmiany organizacyjne, które pozwoliłyby ograniczyć możliwość przypadkowej kontaminacji składnikami alergennymi podczas produkcji wybranych produktów. Zmiany te dotyczyły:

modernizacji ciągów technologicznych polegające na zmianie układu maszyn wybranych wyrobów.

wyraźne rozdzielenie, np. za pomocą ścian działowych, magazynu surowców zawierających alergenne składniki od ich nie zawierających.

Ponadto w związku z wspomnianym wcześniej występowaniem na terenie przedsiębiorstwa surowców zawierających składniki alergenne zalecono zwiększenie częstotliwości ich kontroli na liniach i w pomieszczeniach, w których wytwarza się wskazane do analizy produkty przeznaczone dla osób z alergią.

W związku z tym zaproponowano rozwiązanie polegające na ulepszeniu istniejącego systemu nadzoru laboratoryjnego bezpośrednio na terenie przedsiębiorstwa. Dzięki temu możliwa będzie częstsza kontrola i szybka eliminacja ewentualnych zagrożeń, co z całą pewnością zwiększy bezpieczeństwo nie tylko produktu ale także poszczególnych jego partii produkcyjnych.

Uwzględniając organizację produkcji, aspekty technologiczne oraz infrastrukturę zaproponowano na terenie przedsiębiorstwa najdogodniejszą lokalizację laboratorium wykonującego analizy immunochemiczne zalecane do detekcji alergenów. Następnie opracowano i przedstawiono założenia organizacji, wyposażenia i funkcjonowania tego laboratorium uwzględniając potrzeby przedsiębiorstwa.

Aspekty ekonomiczne

W ramach prowadzonych działań przeprowadzono analizę ekonomiczną takiego przedsięwzięcia. Oceniono całkowity koszt utworzenia laboratorium na terenie przedsiębiorstwa CELIKO S.A., uwzględniający koszty przeprowadzenia niezbędnych remontów, wyposażenia w niezbędny sprzęt i urządzenia, materiały i środki, a także koszty osobowe, który wyniósł 157 144 zł brutto. Koszt oznaczenia jednego alergenu, w jednej próbce, w tym laboratorium wynosi w zależności od ilości jednorazowo analizowanych próbek od 51zł, gdy analizowane będą 44 próbki, do 99 zł gdy analizowane będą tylko 4 próbki. Koszt ten jest znacznie niższy od kosztów, jakie przedsiębiorstwo ponosi zlecając oznaczenia w zewnętrznych laboratoriach (250-300zł/próbkę). W celu szybszego zwrotu nakładów poniesionych na utworzenie laboratorium oraz pełne wykorzystania możliwości analitycznych laboratorium immunochemicznego wskazano na możliwość świadczenia płatnych usług oznaczenia alergenów dla innych podmiotów na terenie Wielkopolski.

Analizując pulę możliwych źródeł finansowania planowanej inwestycji stwierdzono, że w momencie wykonywania raportu końcowego nie istniał projekt unijny odpowiadający potrzebom i wymaganiom CELIKO S.A. (kończyła się właśnie pula programów finansujących rozwój na lata 2007 – 2013). Sytuacja uległa zmianie po wejściu w życie rozwiązań przewidzianych na lata 2014 – 2020 (tabela 1).

Tabela 1. Układ programów operacyjnych w dwóch, kolejnych okresach finansowania ze środków UE

Okres 2007 – 2013	Okres 2014 – 2020
Infrastruktura i Środowisko	Infrastruktura i Środowisko
Innowacyjne Gospodarka	Infrastruktura i Środowisko
	Inteligentny Rozwój
Regionalne Programy Operacyjne	Regionalne Programy Operacyjne
	Regionalne Programy Operacyjne
Kapitał Ludzki	Regionalne Programy Operacyjne
	Wiedza Edukacja Rozwój
Europejska Współpraca Terytorialne	Europejska Współpraca Terytorialne i Europejski Instrument Sąsiedztwa
Pomoc Techniczna	Pomoc Techniczna

Źródło: opracowanie własne

Jak zaprezentowano w tabeli 1 ilość i rodzaj programów oferujących wsparcie finansowe w ramach dostępnych środków z UE zmieniła się znacząco w okresie 2014 – 2020 w stosunku do okresu go poprzedzającego. Najbardziej rozbudowany został program „Innowacyjna gospodarka”. To w ramach niego właśnie zaleca się szukać źródeł finansowania innowacyjnych rozwiązań produkcyjnych w przedsiębiorstwie. Na niektóre, takie jak np. kredyt na innowacje technologiczne (poddziałanie 3.2.2. w ramach Programu Operacyjnego „Inteligentny Rozwój”) nabór nadal trwa. Nie ma zatem obaw, że zabraknie

możliwości sfinansowania planowanych do wprowadzenia w przedsiębiorstwie rozwiązań innowacyjnych zapewniających bezpieczeństwo produktów skierowanych do określonych grup odbiorców, w tym z alergią pokarmową.

Podsumowanie

Zmieniające się potrzeby klientów, niestabilna sytuacja rynkowa, a także szereg chorób cywilizacyjnych skutkujących m. in. alergiami pokarmowymi przyczyniają się do konieczności podejmowania przez przedsiębiorstwa określonych działań innowacyjnych. Wprowadzanie innowacji jest zatem nie tylko potrzebą, ale wręcz koniecznością, warunkującą częstokroć przetrwanie i rozwój przedsiębiorstwa. Przygotowanie i wdrożenie określonych rozwiązań jest jednak sprawą złożoną i wieloaspektową. Trzeba wziąć pod uwagę zarówno kwestie techniczne, technologiczne jak i ekonomiczne. Wszystkie są tak samo ważne, bo istotna jest zarówno sama zmiana o charakterze innowacyjnym, sposób jej wdrożenia jak również finansowanie całości przeprowadzanej operacji.

W artykule wyodrębniono i przedstawiono aspekty analityczne i ekonomiczne innowacji związanej z otwarciem linii technologicznej i wprowadzeniem na rynek nowego produktu przez poznańską firmę CELIKO S.A. zajmującą się zaspokajaniem zapotrzebowania rynku na produkty specjalnego przeznaczenia, dedykowane grupie konsumentów o zwiększonych wymaganiach żywieniowych. Jak się okazało, największym problemem dla przedsiębiorstwa nie były kwestie techniczne czy technologiczne, ale ekonomiczne, związane z pozyskaniem źródeł finansowania planowanych do wdrożenia zmian innowacyjnych. Ostatecznie wykazano jednak, że przy zachowaniu określonych procedur i podjęciu właściwych działań modernizacyjnych w ramach istniejącego już zakładu oraz przy wykorzystaniu dostępnych obecnie źródeł finansowania możliwe jest nie tylko wdrożenie opracowanej, ale również szeregu innych, nowych innowacji.

Opracowano w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Priorytet VIII: Regionalne kadry gospodarki, Działanie 8.2. Transfer wiedzy, Poddziałanie: 8.2.1: Wsparcie dla współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw w Wielkopolsce” realizowany przez PAIP i Urząd Marszałkowski Województwa Wielkopolskiego.

Literatura

Gendel S.M., Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2012, 63, 279-285.

Gorynia M., Łaźniewska E., *Kompendium wiedzy o konkurencyjności*, PWN, Warszawa. 2001.

Immer U., Lacorn M., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs for detecting allergens in food. W: Flanagan S. *Handbook of Food Allergen Detection and Control*. Elsevier 2015, 199-217.

Jeznach M., *Stan i perspektywy rozwoju rynku żywności funkcjonalnej*, Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2003.

Jeżewska-Zychowicz M., Babicz-Zielińska E., Laskowski W., Konsument na rynku nowej żywności. Wybrane uwarunkowania spożycia, Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2009.

Kirsch S., Fourdrilis S., Dobson R., Scippo M.R., Maughin-Rogister G., De Pauw E., 2009, Quantitative methods for food allergens: a review. *Analitical and Bioanalitical Chemistry*, 395 (1): 57-67.

Michalczyk L., Żywność i żywienie w XXI w. Scenariusze rozwoju polskiego sektora rolno-spożywczego, Wyd. Społeczna Wyższa Szkoła Przedsiębiorczości i Zarządzania w Łodzi, Łódź, 2011.

Rona R.J., Keil T., Summers C., Gislason D., Zuidmeer L., Sodergren E., Sigurdardottir S.T., Lindtner T., Goldhahn K., Dahlstrom J., McBride D., Madsen C., The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, 120 (3) 638-646.

Rozporządzenie UE 1169/2011 z dn. 25.11.2011r.

Sicherer A.H., Sampson H.A., Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 2 (125), 116 - 125.

Stefko O., Czynniki warunkujące rozwój przedsiębiorstw przemysłu spożywczego w Polsce, *Problemy rolnictwa światowego*, Zesz. Nauk. SGGW w Warszawie, *Problemy Rolnictwa Światowego*, 2013, 2 (13), 89-98.

Stefko O., Lipińska I., Piasecka – Kwiatkowska D., Factors conditioning the development of safe production in Poland, *Journal of Agribusiness and Rural Development*, 2013, 29 (3), 169-178.

Stefko O., Zielińska – Dawidziak M., Wybrane aspekty ekonomiczne opracowania nowych technologii produkcji żywności bioaktywnej, *Journal of Agribusiness and Rural Development*, 2016 (w druku).

Ward R., Crevel R., Bell I., Khandke N., Ramsay C., Paine S., A vision for food allergen management best practice in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 2010, 21, 619-625.

DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA¹, JAN NAWROT²,
MAGDALENA ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK¹

¹*Katedra Biochemii i Analizy Żywności*

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

dorotapk@up.poznan.pl

²*Instytut Ochrony Roślin*

Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu

ELEKTROFORETYCZNA METODA WCZESNEGO WYKRYWANIA UKRYTEGO PORAŻENIA ZIARNA ZBÓŻ WÓLKIEM ZBOŻOWYM

Streszczenie

Opracowane dotąd metody wykrywania wółka zbożowego w masie ziarna nie są wystarczająco wiarygodne, proste lub czułe, aby możliwe było ich powszechne stosowanie, dlatego ciągle poszukuje się nowych, prostszych i jednocześnie bardzo skutecznych metod jego detekcji.

W Katedrze Biochemii i Analizy Żywności UP w Poznaniu, przy współpracy z Instytutem Ochrony Roślin - PIB w Poznaniu, opracowano metodę elektroforezy natywnej z zymogramami α -amylaz do detekcji wółka zbożowego. W metodzie tej jako wskaźnik obecności owada wykorzystuje się podstawowy enzym trawienny owada, dla którego skrobia stanowi główne źródło pożywienia. Enzym ten istotnie różni się swoimi właściwościami, w tym ruchliwością elektroforetyczną, od amylaz zbożowych, także tych obecnych w zbożu porośniętym. Aktywności enzymów w żelu obrazują zymogramy, które umożliwiają śledzenie skuteczności ich hydrolitycznego działania na dekstrynę graniczną w prostej reakcji z jodem. Reakcja ta pozwala na wykrycie nie tylko obecności owadów, ale także pozostawionych przez nie na powierzchni ziarna śladów żerowania.

Wykazano dużą czułość opracowanej metody - umożliwia ona stwierdzenie obecności jednego owada w masie 30 kg ziarna. Potwierdzono jej skuteczność w detekcji wółka zbożowego w masie ziarna różnych gatunków zbóż (pszenicy, żyta i pszenżyta). Metoda ta nie daje też wyników fałszywie pozytywnych.

Dodatkowymi zaletami są prostota, krótki czas wykonania oraz niski koszt analizy. Dzięki tym zaletom metoda elektroforetyczna może z powodzeniem być powszechnie stosowana w branżowych laboratoriach diagnostycznych oraz kontroli celnej zbóż.

Słowa kluczowe: wólek zbożowy, α -amylazy, detekcja, zymogramy

Wprowadzenie

Żerowanie chrząszczy wółka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.) w magazynowanym ziarnie zbóż jest problemem, z którym człowiek boryka się już od tysięcy lat. Szczątki tego owada odnaleziono w grobowcu egipskiej królowej Ichetis z 2585 roku p.n.e. [Levinson i Levinson, 1985]. Owad ten powoduje zarówno jakościowe, jak i ilościowe zmiany w magazynowanym ziarnie, wywołując znaczne straty ekonomiczne

[Olejarski, 2005; Keskin i Ozkaya, 2015; Piasecka-Kwiatkowska i in., 2011]. Porażenie ziarna zbóż przez owady związane jest nie tylko z ich bezpośrednią obecnością w masie ziarna, ale także z pozostałymi po ich żerowaniu produktami przemiany materii, które mogą być źródłem ukrytych alergenów [Brewczyński, 2006].

W krajach rozwiniętych szacuje się, że ubytki masy ziarna spowodowane tylko żerowaniem wołka zbożowego wynoszą około 2-5%, a w krajach o klimacie tropikalnym mogą sięgać nawet 50% [Warchalewski i in. 2000]. W 2014 roku roczna produkcja zbóż w Polsce wynosiła około 32 mln ton, w tym około 12 mln ton stanowiło ziarno pszenicy najchętniej atakowane przez chrząszcze wołka zbożowego. Szacunkowo straty masy ziarna pszenicy w czasie jej magazynowania spowodowane żerowaniem wołka zbożowego mogły wynieść nawet ponad 250 000 ton. Straty te są tak duże, gdyż owady bardzo szybko się rozmnażają i rozprzestrzeniają w składowanym ziarnie.

Częsta kontrola magazynowanego ziarna pod kątem sprawdzania obecności owadów w jego masie jest podstawowym sposobem zapobiegania stratom. Takie działania pozwalają na odpowiednio wczesną izolację partii ziarna porażonego od nieporażonego, co zapobiega rozprzestrzenianiu się owadów [Nawrot i Gawlak, 2009]. Istotne jest jednak, by osoby zajmujące się kontrolą magazynowanego ziarna miały do dyspozycji niedrogie, proste metody analityczne, które w wiarygodny i jednoznaczny sposób identyfikowałyby owady w masie ziarna.

Ze względu na bardzo małe rozmiary owadów w stosunku do masy przechowywanego surowca wykluczone muszą zostać metody mechaniczne ich usuwania (masa jednego owada to ok. 0,00328g).

Możliwe jest jednak zastosowanie metody flotacyjnej, która wykorzystuje zjawisko zmniejszania się gęstości ziarna zaatakowanego przez owada do identyfikacji porażonego ziarna. Badania przeprowadza się przez zanurzenie próbki w cieczy o gęstości mniejszej niż zdrowe ziarno, a większej niż ziarno zasiedlone przez owada. Porażone ziarno wypływa na powierzchnię, zdrowe opada na dno. Metoda jest tym pewniejsza, im większy jest stopień zaatakowania ziarna; jej wiarygodność nie przekracza jednak 70% [Rajendran, 2005].

Inną metodą wykrywania porażenia są oględziny mikroskopowe przeciętych ziarniaków. Metoda jest jednak obciążona dużym ryzykiem błędu, poza tym jest czasochłonna i pracochłonna.

Wśród metod instrumentalnych stosuje się metody wykorzystujące promieniowanie rentgenowskie [Fornal i in., 2007; AACC International, 2011; Nawrocka i in., 2010] lub podczerwone [Olejarski i in., 2005; Perez-Mendoza i in., 2005; Singh i in., 2009], w tym takie metody jak tomografia komputerowa [Toews i in., 2006], lub spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego [Chambers i in., 1984]. Metody te wymagają jednak specjalistycznego sprzętu i odpowiedniego laboratorium.

W detekcji ukrytego porażenia szkodnikami znalazły także zastosowanie metody immunochemiczne [Kitto i in., 1992; Piasecka-Kwiatkowska i in., 2005; Piasecka-Kwiatkowska, 2011] oraz metody wykorzystujące markery genetyczne [Blaśubramanian i in., 2007; Obrepalska-Stęplowska i in., 2008].

Pomimo różnorodności metod, które próbowano aplikować w rutynowej kontroli obecności owadów w ziarnie, każda z nich ma ograniczenia w stosowaniu: zbyt mała czułość i specyficzność, brak możliwości wykrywania jaj, błędy w detekcji larw we wczesnych

stadiach rozwojowych, czasochłonność, pracochłonność, duży koszt aparatury i potrzeba zatrudnienia personelu o wysokich kwalifikacjach, konieczność wydzielenia specjalnych pomieszczeń ograniczających szkodliwe promieniowanie. Dlatego nadal poszukuje się doskonalszych metod analitycznych. W Katedrze Biochemii i Analizy Żywności UP w Poznaniu przy współpracy z Instytutem Ochrony Roślin PIB w Poznaniu podejmowano liczne prace mające na celu opracowanie nowych metod detekcji *S. granarius* [Piasecka-Kwiatkowska, 2011]. Wymiernym efektem tych działań jest opracowanie elektroforetycznej metody wykrywania wołka zbożowego z zymogramami amylaz.

Charakterystyka wołka zbożowego

Wołek zbożowy jest to niewielki chrząszcz należący do rodziny ryjkowcowatych (*Curculionidae*) o długości ciała od 2 do 5 mm. Ciało jego pokryte jest twardym, brązowym pancerzem chitynowym. Cechą charakterystyczną dorosłego chrząszcza jest wydłużona głowa zakończona wygiętym ku dołowi rykiem, którym samica wygryza w ziarnie otwór przed złożeniem do wnętrza ziarniaka jaj. Sposób żerowania wołka zbożowego powoduje, tzw. ukryte porażenie ziarna. Cały rozwój owada przebiega wewnątrz ziarniaka, bez wyraźnych oznak jego bytności. Samica owada wygryza otwór w ziarniaku, składa w nim jajo i zasklepia otwór szybkowiązącą substancją, utrudniającą zauważenie naruszenia powierzchni. W ciągu jednego dnia samica może złożyć do 9 jaj, po jednym w ziarniaku. W optymalnych warunkach, w ogrzewanych pomieszczeniach magazynowych, rozwinać się może do 10 pokoleń owadów w ciągu roku [Nawrot i Klejdysz, 2009]. Tak więc już po 6 pokoleniach ilość potomków jednej pary owadów sięga 8 milionów osobników, które zjadają łącznie w ciągu całego swojego życia około 600 kg ziarna.

Podstawowym enzymem trawiennym wołka są amylazy, więc najchętniej żeruje na ziarnie zbóż, którego głównym składnikiem jest skrobia. Amylazy, wydzielane głównie przez gruczoły ślinowe, to niezwykle aktywne endoenzymy (E.C.3.2.1) hydrolizujące wiązanie α -D-(1,4)-glikozydowe skrobi, glikogenu i innych pokrewnych sacharydów. Wielokrotnie mniej aktywne enzymy proteolityczne są wydzielane do światła jelita przez komórki nabłonka [Baker, 1986].

We wcześniejszych badaniach wykazano obecność dominującego izoenzymu amylaz w przewodzie pokarmowym wołka zbożowego o masie cząsteczkowej 56 kDa i punkcie izoelektrycznym w pH 3,76 [Baker i Woo, 1985]. Stwierdzono także, że ten sam izoenzym występuje we wszystkich stadiach rozwojowych owada (cztery stadia larwalne, poczwarka i imago), przy czym największą, szczególnie dużą aktywność właściwą wykazują owady we wczesnych stadiach rozwojowych [Rosiński i in., 2007]. Znaczna aktywność we wczesnych stadiach rozwojowych owada może być związana z większym zapotrzebowaniem na energię, gdy następują największe przyrosty masy owadów. Na tym etapie ontogenezy przeważa metabolizm sacharydowy dostarczający energii do szybkiego wzrostu, w którym istotna rola przypada enzymom rozkładającym skrobię do cukrów podlegających przemianom katabolicznym [Cambell i in., 1976].

Wykazano, że optimum pH dla tej dominującej amylazy wołka zbożowego wynosi 5,0 [Baker, 1983]. Enzym ten, podobnie jak większość amylaz, jest aktywowany jonami Cl^- , a stabilizowany przed inaktywacją termiczną przez jony Ca^{+2} [Baker i Woo, 1985]. Temperatura optymalna działania tego enzymu to 25°C, a maksymalna 30°C. Wyższe temperatury powodują znaczne ograniczenie jego aktywności: w 40°C aktywność spada niemal o 60%, a w 60°C następuje całkowita inaktywacja.

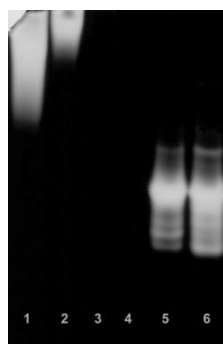
Zastosowanie zymogramów do detekcji α -amylaz wołka zbożowego

Jak wspomniano, w przewodzie pokarmowym wołka zbożowego wydzielana jest α -amylaza doskonale dostosowana do trawienia natywnej skrobi. W zasiedlanym przez wołka ziarnie zbóż również występują enzymy amylolityczne. Jednak w czasie magazynowania ziarna po zbiorze, gdy może dojść do jego porażenia, aktywna jest głównie β -amylaza (maltohydrolaza- α -1,4-glukanu). Aktywność α -amylazy w dojrzałym ziarnie jest śladowa. Aktywne α -amylazy występują w czasie dojrzewania ziarniaków i podczas ich kiełkowania [Daussant i Corvazier, 1970; Ziegler, 1999].

α -Amylasy zawarte w ziarnie różnią się jednak właściwościami od α -amylaz wołka zbożowego. Ich punkt izoelektryczny mieści się w zakresie od 4,6 do 6,4 podczas gdy dla amylazy wołka zbożowego wynosi 3,76 [Muralikrishna i Nirmala, 2005]. Różnice pomiędzy właściwościami enzymów wydzielanych przez wołka zbożowego i enzymów zasiedlanych przez niego zbóż, wskazywały, że identyfikacja enzymów poprzez zastosowanie elektroforezy z zymogramami α -amylaz pozwoli na detekcję białek owadzych wśród enzymów zbożowych.

Na rys.1.przedstawiono zymogramy α -amylaz ekstraktów zbóż i słodów oraz larw i chrząszczy wołka zbożowego z dekstryną graniczną po elektroforezie natywnej w żelu poliakrylamidowym. Użyta do wywołania zymogramów dekstryna graniczna pozwoliła oznaczyć wyłącznie aktywność α -amylaz, gdyż β -amylazy zbóż nie potrafią takiej cząsteczki rozkładać.

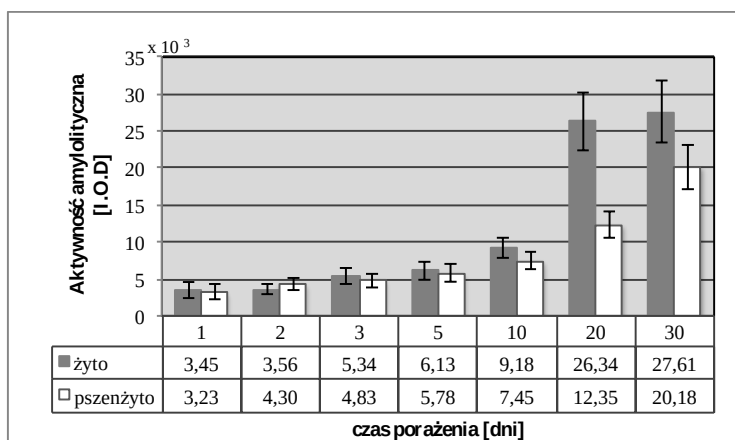
Aktywność omawianych enzymów stwierdzono w ekstraktach ze skiełkowanych ziaren pszenicy, w słodzie jęczmiennym oraz ekstraktach z larw i chrząszczy wołka zbożowego. Podobnie jak w innych pracach nie odnotowano aktywności α -amylolitycznej w ziarnie żyta i pszenicy [Daussant i Curvazier, 1970; Masojć, 1987; Daussant i Lauriere, 1990]. Uzyskane obrazy dokumentują też większą ruchliwość elektroforetyczną w środowisku alkalicznym α -amylazy wołka zbożowego w porównaniu z α -amylazami skiełkowanego ziarna pszenicy i słodu (rys. 1). Uzyskane rezultaty potwierdziły, że na podstawie elektroforezy natywnej z zymogramami można wskazać aktywność α -amylazy wołka zbożowego w ekstraktach z porażonego ziarna. Metodę tę z powodzeniem zastosowano do detekcji ukrytego porażenia ziarna pszenicy wołkiem zbożowym [Piasecka-Kwiatkowska i in., 2014], jak i śladów jego żerowania na niezasiedlonym ziarnie [Piasecka-Kwiatkowska i in., 2013].



- 1 – sól jęczmienny
- 2 – sól pszenicy
- 3 – ziarno żyta
- 4 – ziarno pszenicy
- 5 – larwy wołka zbożowego
- 6 – imago wołka zbożowego

Rysunek 1. Zymogram α -amylaz ziarna zbóż i wołka zbożowego z dekstryną graniczną

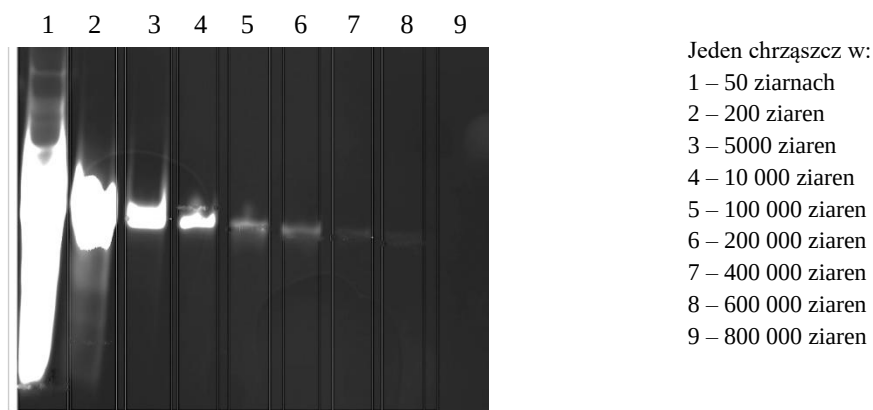
W celu sprawdzenia specyficzności metody zastosowano ją z powodzeniem do ilościowej detekcji wołka zbożowego na ziarnie żyta i pszenżyta, na którym przez różny czas żerowały chrząszcze wołka zbożowego. Na podstawie analizy densytometrycznej zymogramów określono gęstość optyczną (I.O.D) przejaśnień pojawiających się na żelu, które wyrażały aktywność α -amylaz wołka. Wartość ta była równoznaczna z oceną intensywności porażenia ziarna przez owady. We wszystkich analizowanych próbkach, podobnie jak w przypadku porażonego ziarna pszenicy, wykryto enzymy pozostawione przez żerujące owady (rys. 2). Ich aktywność była tym większa, im dłużej owady przebywały na ziarnie. Przedstawione wyniki potwierdziły, że proponowana elektroforetyczna metoda wczesnego wykrywania wołka zbożowego umożliwia wskazanie próbek ziarna różnych gatunków zbóż, na którym żerowały chrząszcze wołka zbożowego, nawet wówczas, gdy owady przebywały na nim przez jeden dzień.



Rysunek 2. Wyniki oceny ilościowej porażenia ziarna żyta i pszenżyta wołkiem zbożowym metodą elektroforezy

Istotnym parametrem charakteryzującym przydatność metod analitycznych stosowanych do detekcji wołka zbożowego jest ich czułość. Miarą czułości metody analitycznej jest najmniejsza ilość analitu, który daje mierzalny sygnał. W przypadku metody elektroforetycznej miarą czułości metody jest ilość ziarna, w której można wykryć α -amylazy pozostawione przez jednego chrząszcza wołka zbożowego.

Badania przeprowadzono w układzie modelowym przygotowując rozcieńczenia seryjne ekstraktów α -amylaz wołka zbożowego odpowiadające, zgodnie z opracowaną procedurą elektroforetycznej metody detekcji wołka zbożowego [Piasecka-Kwiatkowska, 2011; Piasecka-Kwiatkowska i in., 2014], obecności jednego owada odpowiednio w masie od 50 do 800 000 ziarniaków. Uzyskany zymogram przedstawiono na rys. 3.



Rysunek 3. Zymogram α -amylaz jednego chrząszcza wołka zbożowego wykrytego w masie 50 - 800 000 ziaren

Na przedstawionym zymogramie można zauważyć wystąpienie przebarwień świadczących o obecności α -amylaz w prawie wszystkich nałożonych na żel próbach. Brak jest widocznych przejaśnień jedynie w próbie odpowiadającej obecności jednego chrząszcza w masie 800 000 ziaren. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że elektroforetyczną metodą można wykryć ślady żerowania jednego owada w masie 600 000 ziarniaków, co odpowiada około 30 kg ziarna pszenicy.

Podsumowanie

Wykrycie wołka zbożowego w przechowywanym ziarnie jest bardzo trudne. Bardzo ważne jest, aby zastosowana metoda identyfikacji owadów w magazynowanym ziarnie pozwalała na wykrycie skutków działania tego szkodnika w łatwy sposób w próbce odpowiadającej jak największej masie zboża.

Zaprezentowana elektroforetyczna metoda wykrywania ukrytego porażenia ziarna wołkiem zbożowym pozwala na wiarygodne wykrycie śladów żerowania wołka na ziarnie nawet już po jednym dniu przebywania chrząszczy na ziarnie. Jest metodą specyficzną, czułą i bardzo szybką. Czas wykonania analizy od momentu pobrania próbek do uzyskania wyników wynosi 120 minut. Do jej wykonania potrzebny jest niedrogi sprzęt, a uzyskane wyniki są jednoznaczne, pozbawione subiektywizmu. Procedura wykonania oznaczenia oraz

interpretacja wyników nie wymagają zatrudnienia personelu o wysokich kwalifikacjach i można ją stosować praktycznie w każdym laboratorium.

Badania częściowo finansowane przez MNiSW N N312 211036

Literatura

AACC International, X-Ray examination for internal insect infestation, AACC method 28-21.02 In Approved methods of the American Association of Cereal Chemist, 11th ed., St Paul, MN, USA 2011.

Baker J.E., Properties of amylases from midguts larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granarius*. Insect Biochemistry, 1983, 13, 421-428.

Baker J.E., Woo S.M., Purification, partial characterization, and postembryonic levels of amylases from *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. Archives of Insect Biochemistry Physiology, 1985, 2, 415-428.

Baker J.E., Amylase/proteinase ratios in larval midguts of ten stored-product insects. Entomologia Experimentalis et Applicata., 1986, 40, 41-46.

Balasubramanian D., Li G., White N.D.G., A., Jayas D.S., Fernando W.G., Sensitivity analysis of DNA fingerprinting technique for detecting insect fragments in wheat flour. Canadian Biosystems Engineering, 2007, 49: 41-45.

Brewczyński P., Uczulenia na owady. Cz.1. Alergia, 2006, 3, 35-42.

Campbell A., Singh N.B., Sinha R.N., Bioenergetics of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Canadian Journal of Zoology, 1976, 54, 786-798.

Chambers J., McKevitt N.J., Stubbs M.R., Nuclear magnetic resonance spectroscopy for studying the development and detection of the grain weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), within wheat kernels. Bulletin of Entomological Research, 1984, 74, 707-724.

Daussant J., Corvazier P., Biosynthesis and modification of α - and β -amylases in germinating wheat seeds. FEBS Lett., 1970, 7, 2, 191-194.

Daussant J., Lauriere C., Detection and partial characterization of two antigenically distinct β -amylases in developing kernels of wheat. Planta, 1990, 181, 505-511.

Fornal J., Jeliński T., Sadowska J., Grundas S., Nawrot J., Niewiada A., Warchalewski J.R., Błaszczak W., Detection of granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) eggs and internal stages in wheat grain using soft X-ray and image analysis. Journal of Stored Product Research, 2007, 43, 142-148.

Keskin S., Ozkaya H., Effect of storage and insect infestation on the technological properties of wheat. CyTa Journal of Food, 2015, 13 (1) 134-139.

Kitto G.B., Quinn F.A., Burkholder W.E., Techniques for detecting insect contamination of foodstuffs. US Patent Publication 5118610, 1992.

- Levinson H.Z., Levinson A.R., Storage and insect species of stored grain and tombs in ancient Egypt. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 1985, 100, 321-339.
- Mosoć P., Genetic of α -amylases from rye endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*. 1987, 73, 440-444.
- Muralikrishna G., Nirmala M, Cereal α -amylases – an overview. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 60, 163-173.
- Nawrocka A., Grundas S., Grodek J., Losses caused by granary weevil larva in wheat grain using digital analysis of X-ray images. *International Agrophysics*, 2010, 24, 63-68.
- Nawrot J., Klejdysz T., Atlas owadów szkodników żywności. Wyd. PSPDDD, Olsztyn, 2009, 112.
- Nawrot J., Gawlak M., Zanieczyszczenia biologiczne jako problem bezpieczeństwa żywności. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 2009, 49, 1, 445-500.
- Obrepalska-Stęplowska A., Nowaczyk K., Hołysz, Nawrot J., Gawlak M., Molecular techniques for the detection of granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) in wheat flour. *Food Additives and Contamination*, 2008, 25, 10, 1179-1188.
- Olejarski P., Nawrot J., Michalski K., Wykorzystanie zjawiska bliskiej podczerwieni NIR do wykrywania ukrytego porażenia ziarna. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 2005, 45 (2) 961-965.
- Olejarski P., Zwalczenie szkodników w zmagazynowanych zbożach. *Ochrona Roślin*, 2005, 11, 15-19.
- Perez-Mendoza J., Throne J.E., Magihrang E.B., Dowell F.E., Baker J.E, Insect fragments in flour: relationship to lesser grain borer (Coleoptera:Bostrichidae) infestation level in wheat and rapid detection using near-infrared spectroscopy. *Journal of Economic Entomology*, 2005, 98 (6) 2282-2291.
- Piasecka-Kwiatkowska D., Biochemiczne metody detekcji ukrytego porażenia ziarna pszenicy wołkiem zbożowym (*Sitophilus granarius* L.). *Rozprawy naukowe* 427. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 2011.
- Piasecka-Kwiatkowska D., Nawrot J., Gawlak M., Zielińska-Dawidziak M., Możliwość zastosowania zymogramów do detekcji α -amylaz wołka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.) pozostałych na ziarnie po żerowaniu owadów. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 2013, 53 (1), 70-73.
- Piasecka-Kwiatkowska D., Nawrot J., Zielińska-Dawidziak M., Gawlak M., Michalak M., Detection of grain infestation caused by the granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) using zymography for α -amylase activity. *Journal of Stored Product Research*, 2014, 56, 43-48.
- Piasecka-Kwiatkowska D., Rosiński M., Warchalewski J.R., Zastosowanie metod immunochemicznych do wykrywania skażenia ziarna zbóż wołkiem zbożowym. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 2005, 45 (1), 369-374.

Piasecka-Kwiatkowska D., Zielińska-Dawidziak M., Nawrot J., Gawlak M., Wpływ czasu żerowania chrząszczy wołka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.) na ziarnie pszenicy na masę ziaren i zawartość wyekstrahowanego białka. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 2011, 51 (2), 1000-1005.

Rajendran S., Detection of insect infestation of stored commodities. *Advanced Food Nutrition Research*, 2005, 49, 163-232.

Rosiński M., Piasecka-Kwiatkowska D., Warchalewski J.R., Określenie liczby izoenzymów α -amylazy wołka zbożowego w różnych stadiach rozwojowych. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 2007, 47 (1), 359-362.

Singh C.B., Jayas D.S., Paliwal J., White N.D.G., Detection of insect-damaged wheat kernels using near-infrared hyperspectral imaging. *Journal of Stored Product Research*, 2009, 45, 151-158.

Toews M.D., Pearson T.C., Campbell J.F., Imaging and automated detection of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) pupae in hard red winter wheat. *Journal of Economic Entomology*, 2006, 99 (2), 583-592.

Warchalewski J.R., Gralik J., Nawrot J., Możliwości zmniejszania powodowanych przez szkodniki owadzie strat magazynowanego ziarna zbóż. *Postępy Nauk Rolniczych*, 2000, 6, 85-96.

Ziegler P., Cereal beta-amylase, *Journal of Cereal Science*, 1999, 29 (3), 195-204.

AGATA LASIK, TOMASZ SZABLEWSKI, RENATA CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA,
ŁUKASZ TOMCZYK, JAN ZABIELSKI

Katedra Zarządzania Jakością Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,

alasik@up.poznan.pl

ZASTOSOWANIE MIKROBIOLOGII PROGNOSTYCZNEJ DO OCENY BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOŚCI

Streszczenie

Intensywny rozwój przemysłu spożywczego spowodował wzrost zainteresowania bezpieczeństwem żywności. Zagrożenia dla konsumenta ze strony żywności powiązane są z czynnikami fizycznymi, chemicznymi oraz biologicznymi. Za zagrożenia niosące największe ryzyko dla zdrowia i życia konsumenta uważa się zagrożenia mikrobiologiczne. Rozwój mikroorganizmów w żywności determinowany jest przez fizyko-chemiczne cechy produktu spożywczego (aktywność wody, kwasowość, potencjał oksydo-redukcyjny, rodzaj obróbki termicznej, obecność substancji konserwujących) oraz czynniki zewnętrzne (temperatura przechowywania, wilgotność). Wykorzystanie modeli matematycznych charakteryzujących reakcję drobnoustrojów na określone warunki środowiska oraz weryfikacja ich zastosowania do przewidywania wzrostu, przeżywalności i inaktywacji mikroorganizmów w żywności jest narzędziem umożliwiającym przeprowadzenie analizy zagrożeń. Pozwala ono także na prognozowanie terminu przydatności do spożycia danego produktu bez konieczności wykonywania długotrwałych i kosztownych doświadczeń opartych na mikrobiologii klasycznej.

Słowa kluczowe: bezpieczeństwo, mikrobiologia, prognozowanie, żywność

Wprowadzenie

Jakość, a co z tym idzie bezpieczeństwo zdrowotne żywności warunkowane są przez czynniki biologiczne, mikrobiologiczne, chemiczne, fizyczne i żywieniowe. Metale ciężkie, pozostałości środków ochrony roślin, antybiotyków i inne zanieczyszczenia chemiczne oraz fizyczne są traktowane jako potencjalne zagrożenie zdrowia. Istnieje całkowita zgodność, że największe niebezpieczeństwo na jakie człowiek narażony jest ze strony żywności to źle zbilansowane żywienie oraz zakażenia mikrobiologiczne [Baryłko-Pikielna, 1995; McDonald i Da-Wen, 1999; Kothary i Babu, 2001; Hong i in., 2016].

Wzrost drobnoustrojów warunkuje dostępność składników odżywczych oraz warunki panujące w żywności. W produktach spożywczych rozwój mikroorganizmów determinowany jest przez wiele czynników wewnętrznych (aktywność wody, kwasowość czynna, potencjał oksydo-redukcyjny), zewnętrznych (temperatura przechowywania, atmosfera gazów, wilgotność względna) i technologicznych (procesy termiczne, dodatek substancji konserwujących) [Untermann, 1989; Walker, 1990; Zubeldia i in., 2016].

Przeprowadzone dotychczas badania dotyczące dynamiki wzrostu, przeżywalności oraz inaktywacji drobnoustrojów chorobotwórczych i saprofitycznych pochodzących z żywności dostarczyły wielu wyników pozwalających na identyfikację potencjalnego zagrożenia mikrobiologicznego w poszczególnych produktach żywnościowych [Aggelis i in., 1998; Hong i in., 2016]. Analiza rezultatów badań prowadzonych metodą tradycyjną pozwoliła na skonstruowanie modeli matematycznych odzwierciedlającego dynamikę wzrostu drobnoustrojów w produktach żywnościowych. Przyczyniło się to do rozwoju mikrobiologii prognostycznej - nowego narzędzia stosowanego coraz częściej w kontroli bezpieczeństwa zdrowotnego żywności. Mikrobiologia prognostyczna zajmuje się opracowaniem modeli matematycznych charakteryzujących reakcję drobnoustrojów na określone warunki środowiska oraz weryfikacją ich zastosowania do przewidywania wzrostu, przeżywalności i inaktywacji mikroorganizmów w żywności [Rosiak i Kołożyn-Krajewska, 2003; Esser i in., 2015]. Modele uwzględniają takie czynniki jak: temperatura, kwasowość, aktywność wody, zawartość azotynu sodu, zawartość kwasów organicznych oraz skład atmosfery [Buchanan, 1993; Ross i McMeekin, 1994]. Pozwala to na prognozowanie rozwoju mikroorganizmów w żywności, a przez monitorowanie wymienionych parametrów możliwe stało się określenie jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktu [Hong i in., 2016].

Zrozumienie zachowania się populacji drobnoustrojów podczas procesu produkcyjnego i magazynowania, dzięki wykorzystaniu odpowiednich zależności matematycznych pomiędzy wzrostem drobnoustrojów a warunkami zewnętrznymi, umożliwia precyzyjne określenie ich przeżywalności i wzrostu [Buchanan, 1993; Ilnicka-Olejniczak i Hornecka, 1995; Kołożyn-Krajewska, 1995; Zubeldia i in., 2016].

Przyczyn zainteresowania się mikrobiologią prognostyczną jest wiele, biorąc jednak pod uwagę bezpieczeństwo żywności należy wymienić: preferencje konsumentów do świeżych, mniej przetworzonych produktów spożywczych, stosowanie systemu HACCP, konieczność określenia bezpiecznego okresu przechowywania różnych rodzajów produktów spożywczych, zmiana epidemiologii zatruć i zakażeń pokarmowych, konieczność szacowania ryzyka mikrobiologicznego w całym łańcuchu żywnościowym, rozwój kombinowanych metod utrwalania żywności oraz powszechna dostępność programów komputerowych ułatwiających prognozowanie [Labuza i in., 1992; Reichart i Mohacsi-Farks, 1994; Kołożyn-Krajewska, 1995; Zubeldia i in., 2016]. Ważnym aspektem jest także obniżenie czasochłonności i pracochłonności badań mających na celu ocenę bezpieczeństwa mikrobiologicznego danego produktu. Wykorzystanie metod mikrobiologii klasycznej i prowadzenie badań na szeroką skalę wiąże się także ze znacznym zwiększeniem kosztów i wydłużeniem czasu niezbędnego do otrzymania wyników pozwalających na szacowanie ryzyka.

Modele prognostyczne w mikrobiologicznej analizie żywności

Mikrobiologia prognostyczna jako subdyscyplina mikrobiologii żywności wykorzystuje szereg zależności ujętych w modele matematyczne. Mając na uwadze informacje jakich uzyskanie możliwe jest dzięki prognozowaniu mikrobiologicznemu, wykorzystywane modele można podzielić na trzy grupy [Shimoni i Labuza, 2000; Juneja i Marks, 2005; Meekin, 2007]:

- modele wzrostu mikroorganizmów,
- modele inaktywacji mikroorganizmów,
- modele zbiorcze.

Modele wzrostu drobnoustrojów

Drobnoustroje rozwijają się w środowisku zgodnie z krzywą wzrostu, w której po fazie przygotowawczej (lag faza), następuje faza wzrostu logarytmicznego, a następnie faza wzrostu stacjonarnego [Ilnicka-Olejniczak i Hornecka, 1995].

Uwzględniając potrzeby mikrobiologii prognostycznej, reakcja populacji drobnoustrojów określana jest jako zmiana: czasu trwania lag fazy, czasu generacji, czasu potrzebnego do osiągnięcia danej gęstości lub jako współczynnik szybkości właściwej wzrostu [Aggelis i in., 1998; Hong i in., 2016].

Równanie Gompertza jest najczęściej używanym modelem pierwszorzędowym dla opisu wzrostu mikroorganizmów. Jest on czteroparametrową funkcją opisującą asymetryczną krzywą sigmoidalną [Buchanan, 1993].

$$L_T = A + Ce^{-e^{[-B(t-M)]}}$$

L_T - log liczby bakterii w czasie t [$\log(\text{jtk}/\text{cm}^3)$]

A – asymptotyczny log liczby bakterii przy nieoznaczonym spadku czasu [$\log(\text{jtk}/\text{cm}^3)$]

C – ilość logarytmicznych cykli wzrostu [$\log/(\text{jtk}/\text{cm}^3)$]

M – czas, w którym absolutna szybkość wzrostu jest maksymalna [h]

B – relatywna szybkość wzrostu w czasie M [$(\log(\text{jtk}/\text{cm}^3)/\text{h})$]

Cztery parametry wzrostu mikroorganizmów ujęte w równaniu Gompertza mogą zostać matematycznie przyrównane do charakterystyk kultur mikrobiologicznych znanych mikrobiologom:

- wykładnicza szybkość wzrostu
 $\mu = BC/e [(\log(\text{jtk}/\text{cm}^3)/\text{h})]$
- czas generacji
 $GT = (\log 2)e/BC [\text{h}]$
- czas trwania lag fazy
 $\lambda = M - (1/B) [\text{h}]$
- maksymalna gęstość populacji
 $MPD = A + C [\log(\text{jtk}/\text{cm}^3)]$

W związku z tym, wzór Gompertz'a można przekształcać używając parametrów szybkości wzrostu i czasu trwania lag fazy, gdzie właśnie czas trwania lag fazy jest bardzo ważny dla całego cyklu życia komórki, ponieważ jest to proces przemian adaptacyjnych komórki bakteryjnej przystosowującej się do nowych warunków środowiska. Wzór Gompertz'a może być stosowany we współpracy z odpowiednim, przystosowanym do krzywych oprogramowaniem (np. Patogen Modeling Program) [Kołożyn-Krajewska, 1995; Esser i in., 2015].

Znacznie trudniej jest prognozować wzrost mikroorganizmów w rzeczywistych produktach spożywczych, ponieważ jego dynamika determinowana jest przez wiele zmiennych, takich jak: charakter jakościowy i ilościowy początkowej mikroflory produktu, temperatura, kwasowość czynna, aktywność wody, dostępność tlenu, poziom ditlenku węgla, stężenie substancji konserwujących, zawartość witamin i aminokwasów egzogennych, obecność substancji przeciwdrobnoustrojowych [Buchanan, 1993; Kajak i Kołożyn-Krajewska, 2005; Esser i in., 2015]. Różnorodne modele, opracowane dla opisu wzrostu bakterii pochodzących z żywności, mogą być sklasyfikowane w dwóch głównych grupach: modele oparte na prawdopodobieństwie i modele kinetyczne [Zubeldia i in., 2016].

Modele oparte na prawdopodobieństwie (probablistyczne) stosowane są głównie w mikrobiologicznej analizie bakterii przetrwalnikujących, w przypadku których, nawet najmniejszy wzrost jest niebezpieczny [Scott i Tan, 1990]. Większość tych modeli oparta jest na założeniach Hauschild'a, który oszacował prawdopodobieństwo rozwoju i produkcji toksyny w żywności przez przetrwalniki *Clostridium botulinum* [Buchanan, 1993; Jeppesen i Huss, 1993; Luo i in., 2015; Hong i in., 2016].

Modele kinetyczne opracowano do nieprzetrwalnikujących patogenów, które stają się zagrożeniem w momencie przekroczenia pewnego progu wzrostu. Stanowią one matematyczny opis wpływu stanu kultury bakteryjnej i warunków środowiska na kinetykę wzrostu mikroorganizmów [Buchanan, 1993; Devlieghere i in., 2000]. Wyróżniamy cztery główne rodzaje modeli kinetycznych: modele „pierwiastka kwadratowego”, modele Arrhenius'a, modele Davey'ego oraz modele wielomianowe.

Przykładem modelu „pierwiastka kwadratowego” jest zależność Ratkowsky'ego, w której wzrost mikroorganizmów uzależniony jest od temperatury [Buchanan, 1993]:

$$(k)^{0,5} = b(T - T_{\min})$$

gdzie:

- k – współczynnik szybkości wzrostu mikroorganizmów,
- b – współczynnik estymowany (nachylenie linii regresji),
- T – temperatura inkubacji [K],
- T_{min} – zanotowana minimalna temperatura wzrostu [K].

Klasyczny wzór Arrhenius'a stosowany jest w mikrobiologii prognostycznej żywności dla modelowania wpływu temperatury, mieszczącej się w zakresie temperatur wzrostu drobnoustrojów, na dynamikę wzrostu mikroflory [Buchanan, 1993]

$$\ln k = \ln A - E_a/RT$$

gdzie:

k – współczynnik szybkości wzrostu mikroorganizmów,

A – parametr do określania,

R – stała gazowa,

T – temperatura inkubacji [K],

E_a – energia aktywacji.

Model Davey'a jest oparty na klasycznym wzorze Arrhenius'a i uwzględnia łączny wpływ temperatury i aktywności wody na wzrost drobnoustrojów [Davey, 1994].

$$\ln(k) = C_0 + C_1/T + C_2/T^2 + C_3 a_w + C_4 a_w^2$$

gdzie:

k – współczynnik szybkości wzrostu mikroorganizmów,

T – temperatura inkubacji [K],

a_w – aktywność wody,

C₀, C₁, C₂, C₃, C₄ – współczynniki do wyznaczenia.

Do opisania bardziej skomplikowanych zależności większej liczby parametrów stosowane są modele wielomianowe [Buchanan, 1993].

Modele inaktywacji drobnoustrojów

Ciepłota inaktywacji drobnoustrojów jest procesem dość dobrze poznanym i opisanym, także w postaci modeli matematycznych. Niszczenie populacji komórek pod wpływem wysokiej temperatury jest uzależnione od czasu ogrzewania. W czasie działania stałej, letalnej temperatury następuje ich obumieranie, w dużym zakresie według reakcji pierwszego rzędu, zaproponowanej przez Chick'a [Reichert i Mohacsi-Farks, 1994]:

$$dN/dt = -kN$$

gdzie:

N – liczba komórek przeżywających ogrzewanie w czasie t,

k – współczynnik proporcjonalności,

-dN/dt – szybkość inaktywacji

Oznacza to, że w jednakowych jednostkach czasu inaktywacji ulegnie ta sama część pozostałych przy życiu komórek. Nazwane jest to zwykle logarytmicznym porządkiem obumierania [Stumbo, 1973]. Na tych założeniach opierają się modele cieplnej inaktywacji mikroorganizmów. Obok dość dużej liczby opracowań dotyczących modeli cieplnej inaktywacji istnieją modele związane z inaktywacją nietermiczną. Dotyczą one wpływu np. kwasowości czynnej i aktywności wody.

Modele zbiorcze

W mikrobiologii żywności największego znaczenia nabierają modele zbiorcze, zawierające trzy rodzaje dynamiki populacji: wzrost, przeżywalność i śmierć. Szeroko zakrojone prace nad tego typu modelami przyczyniły się do powstania w USA Patogen Modeling Program oraz ComBase Predictor. Programy te zawierają modele wzrostu kilkunastu bakterii patogennych, modele czasu trwania lag fazy oraz modele inaktywacji i przeżywalności podczas przechowywania.

Zastosowanie mikrobiologicznych modeli zbiorczych jest bardzo szerokie, jednak do najważniejszych należą: przewidywanie okresu przydatności do spożycia, prognozowanie bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów przy zmianie składu lub technologii produkcji, obiektywna ocena konsekwencji ewentualnych niezgodności w procesie produkcyjnym oraz przechowywaniu i transporcie żywności, tworzenie bazy do opracowywania przewodników, norm, kryteriów, wyznaczanie limitów krytycznych parametrów w krytycznych punktach kontrolnych w systemie HACCP [Labuza i in., 1992; Ross i McMeekin, 1994; Zubeldia i in., 2016].

Nowoczesne narzędzia stosowane w systemach kształtowania gwarantowanej jakości nie tylko mogą zastąpić końcową kontrolę wyrobów gotowych, ale także przyczyniają się do wyeliminowania długotrwałych badań przechowalniczych, zwłaszcza nowo zaprojektowanych produktów [Zubeldia i in., 2016].

Podsumowanie

Dynamicznie rozwijający się przemysł spożywczy stawia przed producentami żywności priorytet jakim jest bezpieczeństwo konsumentów. Jednym z najważniejszych aspektów jest poprawa jakości mikrobiologicznej żywności będącej następstwem wdrażania i utrzymywania systemów zapewnienia bezpieczeństwa żywności na każdym etapie jej wytwarzania i dystrybucji [Cayré i in., 2003; Lebert i in., 2005; Carrasco i in., 2007]. Producenci żywności zobligowani są do ciągłego monitorowania jakości wytwarzanych przez nich produktów [Esser i in., 2015]. Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej pozwala na przewidzenie rozwoju, przeżywalności i inaktywacji mikroorganizmów w żywności. Wykorzystanie modeli matematycznych stwarza możliwość dokładnego opisu zmian zachodzących w produkcji podczas jego wytwarzania i przechowywania co ma szczególnie istotne znaczenie przy określaniu terminu przydatności do spożycia żywności [Panisello i Quantick, 1998]. Mikrobiologia prognostyczna jest przydatnym narzędziem podczas wdrażania, obligatoryjnego dla łańcucha spożywczego, systemu HACCP na etapach analizy zagrożeń, określania limitów krytycznych w krytycznych punktach kontrolnych (CCP), określania środków kontrolnych oraz definiowania procedur weryfikacji i monitorowania.

Przyszłość mikrobiologii prognostycznej upatruje się w tworzeniu programów komputerowych prognozujących wzrost nie tylko bakterii, ale także pozostałych mikroorganizmów, których obecność w żywności stanowi zagrożenie dla konsumenta. Danymi wejściowymi do tworzenia narzędzi umożliwiających analizę ryzyka są badania prowadzone w rzeczywistych produktach spożywczych, uwzględniające skład produktu oraz mikroflorę charakterystyczną dla poszczególnych rodzajów żywności.

Literatura

- Aggelis G., Samelis J., Metaxopolus J. A novel modeling approach for predicting microbial growth in a raw cured meat product stored at 3°C and 12°C in air. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 43, 39.
- Baryłko – Pikielna N. Bezpieczeństwo i wartość odżywcza żywności: opinie konsumentów a opinie przedstawicieli nauki. *Przemysł Spożywczy*, 1995, 49, 4, 111.
- Buchanan R. L. Food Safety Assessment American Chemistry Society Washington DC, 1993, 250.
- Buchanan R. L. Predictive food microbiology. *Trends in Food Science and Technology*, 1993, 4, 1, 6.
- Buchanan R. L. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *Journal of Food Safety*, 1991, 11, 123.
- Carrasco E., Valero A., Perez-Rodriguez F., Garcia-Gimeno R. M., Zurera G. Management of microbiological safety of ready-to-eat meat products by mathematical modeling: *Listeria monocytogenes* an example. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 114, 221-226.
- Cayré M. E., Vignolo G., Garro O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-package cooked meat emulsion stored at three temperatures. *Journal of Food Microbiology*, 2003, 20, 561-566.
- Davey K. R. Applicability of the Davey linear Arrhenius predictive model to the lag phase of microbial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, 23, 295.
- Devlieghere F., Geeraerd A. H., Versyck K. J., Bernaert H., Impe J. F., Debevere J. Growth of *Aeromonas hydrophila* in modified – atmosphere- packed cooked meat products. *Journal of Food Microbiology*, 2000, 17, 185- 196.
- Esser D. S., Leveau J. H. J., Meyer K. M. Modeling microbial growth and dynamics. *Applied microbiology and biotechnology* 2015, 99, 8831-8846.
- Hong Y. K., Huang L., Yoon Y. B. Mathematical modeling and growth kinetics of *Clostridium sporogenes* in cooked beef. *Food Control* 2016, 60, 471-477.
- Ilnicka – Olejniczak O., Hornecka D. Prognozowanie w mikrobiologii żywności; *Ford Produkt Development. Opracowywanie nowych produktów żywnościowych*. Wyd. AR Poznań, 1995, 149-168.
- Jeppesen V. F., Huss H. H. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, 19, 179.
- Juneja V. K., Huang L., Thippareddi H. H. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meat. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 21, 85-92.

- Juneja V. K., Marks H. M. Predictive models for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked cured chicken. *Journal of Food Microbiology*, 2002, 19, 313-327.
- Kajak K., Kołożyn – Krajewska D. Construction of predictive models of growth of microorganisms in salted cured meat products. Wyd. SGGW Warszawa, 2005.
- Kołożyn – Krajewska D. Ogólne zasady prognozowania w mikrobiologii żywności. Cz. I. Matematyczne modelowania wzrostu mikroorganizmów w żywności. *Przemysł Spożywczy*, 1995, 49, 11, 362.
- Kothary H. M., Babu U. S. Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. U.S. Food and Drug Administration Division of Virulence, 2001.
- Labuza T. P., Belina D., Diez F. Prediction for shelf life and safety of minimally processed CAP/ MAP chilled foods. *Journal of Food Protection*, 1992, 55, 741.
- Lebert I., Baucour P., Lebert A., Daudin J. D. Assessment of bacterial growth on the surface of meat under common processing conditions by combining biological and physical models. *Journal of Food Engineering* 2005, 68, 89-98.
- Lebert I., Robles-Olvera V., Lebert A. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology* 2000, 61, 27 -39.
- Luo K., Hong S. S., Oh D.H. Modeling the effect of storage temperatures on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat ham and sausage. *Journal of food protection*, 2015, 78, 1675-1681.
- McDonald K., Da-Wen S. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 1999, 52, 1-27.
- Meekin T. Predictive microbiology: Quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat science* 2007, 77, 17-27.
- Meekin T. Mc. A., Ross T. Shelf life prediction: status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33, 65-83.
- Panisello J. P., Quantick P. C. Application of Food MikroModel predictive software in the development of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) systems. *Journal of Food Microbiology* 1998, 15, 425- 439.
- Reichart O., Mohacsi – Farks O. Mathematical modeling of the combined effect of water activity, pH, redox potential on the heat destruction. *International Journal of Food Microbiology* 1994, 24, 103.
- Rosiak E., Kołożyn - Krajewska D. Zastosowanie metod prognozowania mikrobiologicznego do określania rozwoju mikroflory saprofitycznej w produktach mięsnych utrwalonych lizozymem w formie monomeru. *Żywność: nauka, technologia, jakość* 2003, 3(36).
- Ross T., McMeekin T. A. Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 1994, 23, 3-4, 241.

Scott R. B., Tan T. D. M. Specific effect of infection and malnutrition on intestinal longitudinal smooth muscle response in *Yersinia enterocolitica* enteritis in rabbit. Department of Pediatrics and Gastroenterology Research Group University of Calgary Calgary, Alberta Canada 1990.

Shimoni E., Labuza T. Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. Trends in Food Science and Technology, 2000, 11, 394-402.

Stumbo C. R. Thermobacteriology in food processing, Academic Press, 1973.

Untermann F. Hygiene In meat production and processing. Fleischwirtschaft, 1989, 69, 6.

Walker S. J. Organisms of emerging significance, in: Microbiological and Environmental Health Issues relevant to the Food and Catering Industries, Symposium Proceeding, Campden Food and Drink Research Association, Chipping Campden, UK, 1990.

Zubeldia B. B., Jimenez M. N., Claros M. T. V., Andres J. L. M., Martin-Olmedo P. Effectiveness of the cold chain control procedure in retail sector in Southern Spain. Food Control 2016, 59, 614-618.

TOMASZ SZABLEWSKI¹, KINGA STUPER-SZABLEWSKA²,
RENATA CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA¹, ŁUKASZ TOMCZYK¹, AGATA LASIK¹

¹*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

tszablew@up.poznan.pl

²*Wydział Technologii DREWNA*

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

DROBNOUSTROJE I PRODUKTY ICH METABOLIZMU WŚRODOWISKU KURNIKA, A JAKOŚĆ I BEZPIECZEŃSTWO JAJ

Streszczenie

Wnętrze kurnika ze względu na swoją specyfikę jest jednym z bogatszych ekosystemów stworzonych przez człowieka. Występujące tam dogodne warunki, tj. podwyższona wilgotność, temperatura oraz stały dostęp do składników pokarmowych sprawiają, iż jest ono doskonałym miejscem do bytowania i rozwoju mikroorganizmów. Drobnoustroje te - nierzadko patogenne, zanieczyszczają powierzchnię skorupy jaj, stwarzając realne zagrożenie dla zdrowia potencjalnych konsumentów. Dodatkowym zagrożeniem, związanym z ich występowaniem jest fakt, iż produkowane przez nie związki chemiczne, zarówno toksyczne metabolity wtórne, jak i związki lotne, mają niekorzystny wpływ nie tylko na produkowany surowiec, ale również na nioski oraz pracowników zatrudnionych w kurnikach i sortowniach jaj.

Słowa kluczowe: jakość, bezpieczeństwo, jaja konsumpcyjne, mikroorganizmy

Wprowadzenie

Spożywanie jaj jest nierozłącznym elementem historii człowieka. Szacuje się, iż kury zostały udomowione już około 6 tysięcy lat temu. Statystyczny Polak zjada rocznie około 160 jaj, w głównej mierze kurzych. Ze względu na dużą popularność jaj na całym świecie prowadzi się badania mające na celu lepsze poznanie tego surowca i eliminację ewentualnych czynników, wpływających na bezpieczeństwo zdrowotne konsumentów.

Jakość jaj determinowana jest przez wiele czynników. Jednym z istotnych elementów wpływających na zdrowotność jaj jest sposób utrzymania kur niosek, który warunkuje odpowiedni mikroklimat. Mikroklimat jest to zbiór czynników środowiskowych oddziałujących na zwierzęta w ich najbliższym otoczeniu. W budynkach inwentarskich, w których utrzymuje się kury, mikroklimat jest ważnym elementem zarówno dla zdrowia zwierząt, ich produktywności, jakości produkowanego surowca, a także dla osób tam pracujących [Wilczak-Jagiello, 2012].

Kontrola mikroklimatu jest bardzo ważnym elementem, pozwalającym na ograniczanie wzrostu mikroorganizmów, a tym samym na poprawę bezpieczeństwa produkowanego surowca [Malicki, 2000]. Skorupa, wbrew pozorom nie jest środowiskiem abiotycznym. Resztki organiczne, kutikula i odparowująca z wnętrza jaja woda, przyczyniają się do tego, że skorupa staje się dobrym siedliskiem do rozwoju bakterii psujących jaja oraz

patogennych dla człowieka. Mikroorganizmy, które przyczyniają się do powstawania zatruć, nie powodują większych zmian organoleptycznych, dlatego tak łatwo mogą wywołać negatywny skutek w organizmie człowieka [Trojanowska, 2009].

Czynniki ogólno-środowiskowe mające wpływ na stan mikrobiologiczny jaj

Człowiek. Tkanki zdrowego człowieka są wolne od bakterii, pojawiają się one jednak na skórze, we włosach, w przewodzie pokarmowym i jamie nosowo-gardłowej. Na powierzchni ciała człowieka, przede wszystkim rąk, znajdują się Gram-dodatnie ziarniaki i pałeczki dyfteroidalne [Zaleski, 1985]. U pewnej ilości osób mogą wystąpić także bakterie Gram-ujemne i drożdże. Najważniejszą rolę w przenoszeniu drobnoustrojów odgrywają ręce. Mikroflorę rąk dzieli się na przejściową i stałą. Flora przejściowa, to drobnoustroje pojawiające się na dłoniach, mające z nimi luźny i tymczasowy kontakt. Pochodzą ze środowiska i są łatwe do usunięcia, wystarczy umyć ręce środkami zmywającymi i antyseptycznymi. W skład mikroflory przejściowej wchodzi głównie pałeczki kolipodobne, paciorkowce kałowe i gronkowce koagulazo-ujemne. Mikroflora stała rozmnaża się w skórze, w szczelinach, w gruczołach łojowych i potowych. Najliczniejszą grupą bakterii są ziarniaki i gronkowce koagulazo-dodatnie. Najprostszą metodą usunięcia mikroflory jest mycie i szczotkowanie dłoni przez co najmniej kilka minut i używanie specjalnych środków czyszczących [Nowiak i in., 2009].

Pomieszczenia produkcyjne. Stan mikrobiologiczny pomieszczeń produkcyjnych jest odwzorowaniem poziomu ich czystości oraz warunków mikroklimatycznych. Wilgotne ściany i ściółka powodują korzystne warunki rozwoju pleśni [Malicki, 2000], dlatego ściany powinny być gładkie i posiadać czystą powierzchnię, bez odprysków, a kąty hali powinny być zaokrąglone. W miejscach gdzie utrzymuje się duża wilgotność względna powietrza, trudno uzyskać odpowiednią czystość. Skutkiem jest osiadanie wilgoci na ścianach i sufitach, która następnie może się skraplać i opadać na powierzchnię ściółki. Wzrastająca warstwa pleśni produkuje enzymy, dzięki którym pleśnie te wykorzystują substancje organiczne pojawiające się wewnątrz muru i na ścianach, co powoduje przedwczesne niszczenie zaatakowanych materiałów. Przy odpowiednio długim czasie wzrostu pleśnie atakują głębsze warstwy elewacji. Metodą zabezpieczania przed pleśnieniem jest wprowadzenie farb, które służą do malowania ścian i sufitów oraz pleśniobójczych związków chemicznych, nietoksycznych dla ludzi [Zaleski, 1985].

Wśród mikroflory pojawiającej się w ściółce dominują *E. coli*, bakterie z rodzaju *Lactobacillaceae* i *Enterococcus*. Pośród grzybów mikroskopowych przeważnie występują *Penicillium*, *Aspergillus* i *Fusarium*. Zasadniczo pleśnie występują nielicznie i nie powodują chorób, zależy to głównie od utrzymywania ściółki. W podłożu suchym są one niszczone przez liczne antagonistyczne drobnoustroje saprofityczne, głównie bakterie z rodzaju *Lactobacillaceae*, bądź pleśnie z rodzaju *Trichoderma*. Na rozwój chorób u ptactwa wpływa wiele czynników m.in. duża wilgotność, niska temperatura, wysoki poziom białka w paszy, podawanie antybiotyków. Podawanie antybiotyków, jako stymulatorów wzrostu, powoduje rozregulowanie równowagi flory bakteryjnej przewodu pokarmowego i oddechowego ptaków. Przyczyną są zabrudzenia ptaków i tym samym skorupy jaj. Ściółka nieodpowiedniej jakości pogarsza zdrowie ptaków, stanowi ogromne zagrożenie

mikotoksynami, zagrożenie zapaleniem jelit poprzez obecność *Clostridium perfringens* i *Escherichia coli* oraz wpływa na stan zabrudzenia powierzchni skorupy [Korytkowski, 2012].

Opakowania jajczarskie. Zasadniczy wpływ na mikroflorę żywności mają opakowania bezpośrednie. Aktualnie są to opakowania jednorazowego użytku, co wyklucza zanieczyszczenia pochodzące z poprzedniego wsadu [Malicki, 2000].

Pasza. Karmienie kur paszami i dodatkami paszowymi istotnie wpływa na stan mikrobiologiczny jaj. Do najbardziej powszechnych i niebezpiecznych zanieczyszczeń pasz należą pleśnie i ich metabolity, czyli mikotoksyny. Rozwijają się one nie tylko w zbożach, ale również w komponentach pasz, które są długo przechowywane w podwyższonej temperaturze i przy wysokiej wilgotności otoczenia. W pokarmie nie powinny się pojawiać ciała obce np. opiłki metalu, również nie mogą się w nim znajdować środki ochrony roślin i nawozy. Poprzez pasze wprowadzane mogą być również pałeczki *Salmonella* spp., które zasiedlają przewód pokarmowy, a następnie są wydalone do środowiska i tak mogą zanieczyszczać powierzchnie skorup jaj konsumpcyjnych [Malicki, 2000].

Czynniki zewnętrzne i wewnętrzne środowiskowe mające znaczący wpływ na stan mikrobiologiczny jaj

Temperatura powietrza. Temperatura w pomieszczeniach inwentarskich jest ważnym aspektem w odchowie kur, co ma wpływ na jakość jaj. Nieśność i spożycie paszy zależą od temperatury w kurniku. Odpowiedni zakres temperatury to 15-20°C. Gdy temperatura jest niższa, to zwiększa się konsumpcja paszy, ponieważ zwierzęta muszą wyrównać stracone ciepło. Jednak kiedy temperatura jest za wysoka, spożycie paszy przez drób jest mniejsze, kury znoszą mniej jaj, co również skutkuje cieńszą skorupą. Do kontrolowania temperatury w kurniku pośrednio, służą wentylatory. Pozytywnym aspektem wentylacji jest dostarczenie świeżego powietrza, zasobnego w tlen i pozbycie się pary wodnej. Ma to wielkie znaczenie dla zdrowia i nieśności kur [Niemczak, 1986].

W powietrzu kurnika często obecne są bakterie gnilne i chorobotwórcze. Przenoszą się one w wyniku naturalnej cyrkulacji powietrza np. poprzez działanie maszyn, wiatru, czy dzięki przemieszczaniu się ludzi. W okolicach większych aglomeracji w mikroflorze powietrza około 70% wszystkich mikroorganizmów stanowią pleśnie. Ilość bakterii stanowi od 19-26%, w tym gronkowce (10%) i ziarniaki (około 50%) [Zaleski, 1985].

W produkcji i przechowywaniu jaj największą rolę odgrywają bakterie mezofilne i psychrofilne, a produkowanie enzymów psujących treść jaj czy egzotoksyn, przez ten sam szczep jest różne i głównie zależy od temperatury [Malicki, 2000].

Wilgotność powietrza. Z temperaturą mocno powiązana jest wilgotność względna powietrza w pomieszczeniu. Wilgotność względna w kurniku powinna wynosić 65-75%. Gdy temperatura wynosi 13-15°C, to wilgotność osiąga 75%, zaś przy wyższych temperaturach wynosi 60-65% [Niemczak, 1986].

Wzrost wilgotności powoduje osłabienie systemu immunologicznego kur, następujące zwiększenie ich zachorowalności i ubytków. Wtedy drobnoustroje znajdują odpowiednie

warunki do rozwoju. Podwyższona wilgotność powoduje słabszy apetyt u kur, obniżoną produktywność i mniejszą przyswajalność paszy [Starczikow, 1982]. Ważnym czynnikiem decydującym o wzroście mikroorganizmów w pomieszczeniach produkcyjnych i przetwórczych jest układ kondensacji i parowania. Przy zbyt dużej wilgotności następuje gromadzenie się pary wodnej na ścianach pomieszczenia i jest to idealne siedlisko dla bakterii chorobotwórczych i grzybów. Gdy wilgotność wynosi 80% lub więcej namnaża się flora bakteryjna, zaś poniżej 80% wzrost drobnoustrojów jest hamowany. Duży wpływ na przeżycie mikroorganizmów opadłych z powietrza ma temperatura. Przeżywają one między 29-49°C. Bakterie wraz z kurzem przy dużej wilgotności względnej powietrza potrafią przeżyć 2,5 roku, np. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* [Malicki, 2000].

Drobnoustroje powierzchni skorupy i treści jaj

Drobnoustroje ze względu na ogromne zdolności przystosowawcze, do niemal każdego środowiska, występują powszechnie w otoczeniu. Stanowią poważne zanieczyszczenie żywności, w tym jaj i przetworów jajowych. Występowanie mikroorganizmów powoduje liczne skutki m.in. ryzyko zdrowotne dla konsumenta i zmiany jakości jaj [Malicki, 2000]. Duży wpływ na zdrowie człowieka mają drobnoustroje chorobotwórcze lub względnie chorobotwórcze, które wywołują zatrucia i zakażenia pokarmowe, będące najczęściej przenoszone drogą pokarmową [Sitarz i Janczar-Smuga, 2012].

Jaja są odpowiednim podłożem dla rozwoju mikroorganizmów, co powiązane jest z łatwością psucia się produktu podczas przechowywania przez długi okres czasu. Zewnętrzna część jaja, czyli skorupa jest najbardziej zanieczyszczona. Na powierzchni wizualnie czystej skorupy jajowej znajduje się ok. 130 000 bakterii i około 300 zarodników pleśni. Zanieczyszczenie powierzchni skorupy jaj przeważnie jest odbiciem użytkowania kur niosek, stanu higieny panującej podczas chowu i przechowywania jaj. Treść świeżych jaj, które pochodzą od zdrowych kur jest wolna od drobnoustrojów, jednak mikroflora z powierzchni skorupy lub treści jaj, może powodować silne zakażenia [Malicki, 2000].

Drobnoustroje obecne w treści jaj można podzielić na dwie kategorie: wywołujące choroby zwierząt i ludzi, ale nie wpływające na jakość jaj, do której należą np. *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia* oraz powodujące psucie się jaj, do której należą, np. *Aerobacter* czy *Serratia*. Do głównych rodzajów pleśni znajdujących się na powierzchni jaj i w ich przetworach zalicza się: *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* i *Botrytis* [Gondek i in., 2013].

Bakterie z rodzaju *Salmonella*. Gram – ujemne pałeczki, występują zarówno w przypadku ptactwa udomowionego, jak i nieudomowionego. Najczęściej ich obecność stwierdza się u kur oraz kaczek. Główną przyczyną wnikania tych bakterii do przewodu pokarmowego zwierząt jest zanieczyszczona woda, pasza, gleba, odchody zwierzęce, owady oraz rośliny [Malicki, 2000].

Pałeczki z rodzaju *Salmonella* posiadają również zdolność do przeżywania oraz namnażania się poza organizmem zwierząt lub ludzi. Czynnikiem, który sprzyja ich rozwojowi w środowisku zewnętrznym może być obecność w nim substancji białkowych lub podwyższona temperatura, stąd też kurniki są idealnym środowiskiem dla ich wzrostu.

Najczęściej występującymi typami pałeczek *Salmonella* w pomiole kurzym są: *Salmonella Gallinarum* – pullorum, *Salmonella Manchester*, *Salmonella Typhimurium* oraz *Salmonella Anatum*, która cechuje się najwyższą przeżywalnością (ok. 57 dni) [Dobrzański i Kołacz, 2006]. Dodatkowo w przypadku niosek zakażenie może przenosić się do narządów rozrodczych, czego konsekwencją jest endogenne zakażenie jaj wylęgowych i konsumpcyjnych. Bakterie te mogą również występować w mięsie drobiowym i jego przetworach, stanowiąc istotne zagrożenie dla człowieka [Mazurkiewicz, 2005].

***Escherichia coli*.** Gram – ujemna pałeczka, która bardzo często występuje w środowisku naturalnym ptaków [Pijarska, 2008]. *Escherichia coli* jest bakterią wyjątkowo oporną na niekorzystne warunki środowiskowe. Charakteryzują się wysokim stopniem przeżywalności w trudnych warunkach, takich jak kurz czy duże zapylenie pomieszczeń. Ich chorobotwórczość zależy głównie od stopnia inwazyjności oraz zdolności niektórych serotypów do wytwarzania szkodliwych toksyn, mogących być przyczyną zatrucia organizmu [Mazurkiewicz, 2005].

U ludzi zakażenie pałeczkami okrężnicy spowodowane jest najczęściej spożywaniem zakażonego mięsa drobiowego i jego przetworów, powodując czasami bardzo poważne zatrucia pokarmowe [Dobrzański i Kołacz, 2006].

***Mycobiota*.** Analizując rodzaje grzybów mikroskopowych w kurnikach można stwierdzić, iż najczęściej występują: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* i *Cladosporium*. Najnowsze badania wskazują, że obecność powyższych pleśni obserwuje się również w treści jaj [Szablewski i in., 2010; Nowaczewski i in., 2011]. Najbardziej niebezpieczne jednak nie są same grzyby pleśniowe, a wytwarzane przez niemikotoksyny, które mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla życia lub zdrowia ptaków [Mituniewicz, 2013].

Mikotoksyny to wtórne metabolity grzybów pleśniowych. Mogą być one magazynowane wewnątrz grzybni, wówczas mówimy o endotoksynach lub wydzielane do środowiska zewnętrznego w postaci egzotoksyn, stanowiąc zagrożenie dla powietrza, gleby lub produktów spożywczych. Toksyny wytwarzane przez grzyby pleśniowe powszechnie występują w środowisku, co jest skutkiem łatwej ich rozsiewalności. Zarodniki grzybów pleśniowych oraz fragmenty strzępeków ich grzybni występują głównie w powietrzu wchodząc w skład bioaerozolu. Duże stężenie tych metabolitów może w niekorzystny sposób oddziaływać na zdrowie człowieka lub zwierząt, wywołując choroby nazywane mikotoksykozami [Krska i in., 2007].

Początkowo mikotoksyny wywołują u ludzi łagodne objawy takie jak: alergie, katar, łzawienie oczu, zapalenie spojówek, aczkolwiek oddziaływanie toksyn wytwarzanych przez grzyby pleśniowe może mieć również ostry oraz przewlekły charakter. Jest to związane z czasem narażenia organizmu na ich oddziaływanie, a także dawką oddziałujących mikotoksyn [Jarzynka i in., 2010]. Mikotoksyny po dostaniu się do organizmu człowieka mogą spowodować natychmiastowe skutki w postaci ciężkich obrażeń narządów wewnętrznych, albo (jeśli były pobierane w subtoksycznych dawkach) mogą również działać po pewnym czasie i prowadzić do zmian nowotworowych lub chronicznych, złożonych chorób [Popowski, 2000]. Mikotoksyny nie są metabolizowane przez organizm ludzki. Nie

mają też właściwości antygenowych, przez co nie wzbudzają obronnego działania systemu odpornościowego. Trwałe kompleksy, które tworzą z DNA są przyczyną zaburzeń w syntezie białek i przekazywania informacji z DNA na mRNA. Zakłócają również rozwój płodu. Do organizmu człowieka mogą dostawać się poprzez pożywienie i drogą wziewną [Grajewski, 2006]. Do dziś opisano ok. 400 mikotoksyn, z których 6 związków otrzymało ocenę toksykologiczną: alfatoksyny, patulina, ochratoksyna A, patulina, zearalenon, fumiozyny oraz część trichotecenów. W przyrodzie są one wytwarzane nie tylko przez rodzaj *Fusarium*, ale także *Aspergillus* i *Penicillium* [Gulbicka, 2012]. W zależności od tego na jaki narząd w niekorzystny sposób wpływają, mikotoksyny można podzielić na: hepatotoksyny, pulmotoksyny, kardiotoksyny, nefrotoksyny, neurotoksyny [Krska i in., 2007].

Podsumowanie

Stosowanie się do norm sanitarno - weterynaryjnych w budynkach inwentarskich pozwala na utrzymanie odpowiednich warunków środowiskowych dla chowu kur niosek. Ważna jest kontrola mikroklimatu w kurniku, dzięki czemu można zapanować nad utrzymaniem optymalnego klimatu. Oceny jego stanu można dokonywać po przez obserwację np. wyglądu podłóg, ścian, zmieniającego się zapachu w pomieszczeniu lub poprzez zachowanie zwierząt. Utrzymanie właściwego dobrostanu zwiększa odporność kur na choroby, ich produktywność oraz ogranicza wzrost mikroorganizmów. Cennym elementem jest odpowiedni zakup ściółki i paszy o dobrej jakości, co przyczynia się do ograniczenia rozwoju mikroorganizmów, a tym samym poprawy bezpieczeństwa produkowanych jaj.

Literatura

- Dobrzański Z., Kołacz R., Higiena i dobrostan zwierząt gospodarskich. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, 2006, 75-296.
- Gondek A., Wnuk A., Mroczek- Sosnowska N., Łukasiewicz M., Psucie się jaj i metody zapobiegania. Polskie Drobiarstwo, 2013, 1, 8-12.
- Grajewski J., Mikotoksyny i grzyby pleśniowe, zagrożenia dla człowieka i zwierząt. Wydawnictwo Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Bydgoszcz, 2006.
- Gulbicka B., Zanieczyszczenia biologiczne i chemiczne jako problem bezpieczeństwa żywności. Dział Wydawnictw IERiGŻ-PIB, Warszawa, 2012.
- Jarzynka S., Dąbkowska M., Netsvyetayeva I., Swoboda – Kopeć E., Medycyna Rodzinna, 2010, 4, 113 – 119.
- Korytkowski B., Ściółka jako element zagrożenia epizootycznego. Hodowca drobiu, 2012, 7, 20-22.
- Krska, R., Welzig, E., Boudr, H., Analysis of *Fusarium* toxins in feed. W: Morgavi, D.P., Riley, R.T. (red.), *Fusarium and their toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact*. Animal Feed Science and Technology, 2007, 137, 241–264.

- Malicki A., Mikrobiologia jaj i przetworów jajowych. W: Trziszka T. (red.), Jajczarstwo, Nauka, Technologia, Praktyka. Wydawnictwo AR we Wrocławiu, Wrocław, 2000, 461-519.
- Mazurkiewicz M., Choroby drobiu. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław, 2005, 166-267.
- Mituniewicz T., Mikroklimat w pomieszczeniach dla drobiu. Ogólnopolski informator drobiarski, 2013, 12, 28-29.
- Niemczak H., Poradnik drobiarski, Wydawnictwo Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa, 1986, 18.
- Nowaczewski S., Stuper K., Szablewski T., Kontecka H., Microscopic fungi in eggs of ring-necked pheasants kept in aviaries. Poultry Science, 2011, 11 (90), 2467-2470.
- Nowak A., Ołtuszek-Walczak E., Świtoniak T., Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności. W: Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., (red.) Mikrobiologia techniczna tom 2. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008, 267-278.
- Pijarska I., Kolibakterioza niosek. Polskie Drobiarstwo, 2008, 3, 16-18.
- Popowski J., Pleśnie i ich toksyny a bezpieczeństwo żywności. Żywność, żywienie, prawo a zdrowie, 2000, 1, 109-114.
- Sitarz S., Janczar-Smuga M., Współczesne zagrożenia bezpieczeństwa żywności, możliwości ich kontroli oraz eliminacji. Nauki Inżynierskie i Technologie, 2012, 2(5), 68-93.
- Starczikow N. J., Produkcja jaj na zasadach przemysłowych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1982.
- 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, 11, (89), 2491-2493.
- Trojanowska K., Giebel H., Gołębiowska B., Mikrobiologia żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 2009.
- Wilczek-Jagiello A., Zadbaj o prawidłowy mikroklimat w kurniku. Hodowca drobiu, 2012, 11, 26-29.
- Zaleski J.S., Mikrobiologia żywności pochodzenia zwierzęcego. Wydawnictwo Naukowo – Techniczne. Warszawa, 1985, 122-152.

ŁUKASZ TOMCZYK, TOMASZ SZABLEWSKI,
RENATA CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, AGATA LASIK
Katedra Zarządzania Jakością Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
tomczyk@up.poznan.pl

JAKOŚĆ JAJ POZYSKANYCH Z KLATKOWEGO SYSTEMU UTRZYMANIA KUR NIOSEK

Streszczenie

Początek hodowli kur niosek na świecie w klatkach sięga roku 1920 roku, jednak w Europie dopiero w roku 1999 opowiedziano się za wzbogaceniem klatek na rzecz poprawy dobrostanu. Klatki tzw. „umeblowane” zmieniają środowisko kur niosek przez co mogą prowadzić do zmian jakości jaj. Warunki chowu wpływają na kształtowanie się cech jakościowych jaj. Znając potencjalne zagrożenia występujące podczas hodowli niosek, istnieje możliwość podejmowania decyzji, które pozwolą ograniczyć niepożądane zmiany w kształtowaniu się jakości jaj. W opracowaniu omówiono zanieczyszczenia występujące w środowisku kurnika mogące potencjalnie wpłynąć na jakość jaj konsumpcyjnych. Ponadto przedstawiono profil wybranych cech jakościowych jaj po wprowadzeniu klatek umeblowanych.

Słowa kluczowe: jaja, klatki umeblowane, zanieczyszczenia kurnika

Wprowadzenie

Rosnące w ostatnich latach zainteresowanie konsumentów jakością produktów spożywczych w tym jaj, skłania do opracowania ciągle opłacalnych systemów hodowli ale mniej intensywnych - bardziej przyjaznych dla zwierząt z jednoczesnym uwzględnieniem wymagań konsumentów. Wysokość dochodów producentów determinowana jest głównie od dostarczania odpowiedniej jakości jaj [Sobczak, 2007]. Na kształtowanie się cech jakościowych skorupy i treści jaj wpływają czynniki genetyczne, głównie pochodzenie kur niosek oraz czynniki środowiskowe takie jak: żywienie, światło, temperatura, warunki higieniczne w kurniku, wiek kur niosek, ich stan fizjologiczny itp.

Wyróżnia się cztery główne systemy utrzymania niosek: klatkowy, ściółkowy, wolno wybiegowy oraz ekologiczny. Zdecydowana większość światowej populacji kur niosek jest utrzymana w klatkach. Zapewniają dobre wyniki ekonomiczne i ograniczenie problemów sanitarnych. Z drugiej strony system ten ogranicza przestrzeń do poruszania się ptaków w negatywny sposób wpływając na dobrostan niosek. Kontrowersje nad systemem klatkowym kur niosek przyczyniły się wprowadzenia przez Unię Europejską zarządzeń związanych z poprawą dobrostanu. W 1999 roku UE wydała dyrektywę, która zakazuje chowu kur niosek w konwencjonalnych klatkach od 1 stycznia 2012. Dopuszczony jest system klatkowy jeśli klatka będzie wyposażona w grzędę, gniazdo, kąpielisko pyłowe (piaskowe), grzebalisko oraz urządzenie do ścierania pazurów, a na jedną niosek będzie

przypadać 750 cm² powierzchni. Celem wprowadzonych zmian było zapewnienie dobrostanu i poprawy warunków hodowli kur niosek [Guesdon, 2004].

Charakterystyka zanieczyszczeń pochodzących z kurnika

Charakterystyczny mikroklimat środowiska kurnika tworzy: wysoka wilgotność powietrza, wysoka temperatura, obniżona wielkość wymiany powietrza oraz elementy stałe takie jak: poidła, karmidła, paszociągi, grzędę, gniazda, ściółka, pasza oraz zwierzęta. Każdy z wyżej wymienionych elementów stałych może stanowić źródło zanieczyszczenia środowiska kurnika. Na poziom zapylenia powietrza kurnika wpływa głównie ściółka oraz pasza, natomiast za rozwój mikroorganizmów zarówno tych natywnych jak i tych zawleczonych z zewnątrz wpływa temperatura oraz wilgotność.

Tabela 1. Zawartość bioaerozoli w budynkach inwentarskich [Hartung i Schulz, 2007]

	Bydło	Trzoda chlewna	Drób
Bakterie ogółem	$4,4 \times 10^0$ JTK/m ³	$5,2 \times 10^0$ JTK/m ³	$5,8 \times 10^0$ JTK/m ³
Grzyby ogółem	$3,8 \times 10^0$ JTK/m ³	$3,8 \times 10^0$ JTK/m ³	$4,1 \times 10^0$ JTK/m ³

Największe zawartości bioaerozoli w budynkach inwentarskich odnotowywano w kurnikach (Tabela 1).

Zanieczyszczenia fizyczne kurnika są problemem nierozzerwalnie związanym z produkcją zwierzęcą. Na intensywność wytwarzanych zanieczyszczeń wpływa: obsada ptaków oraz rodzaj stosowanej ściółki. Na podstawie charakterystyki mikroklimatu kurników [Wilkanowska, 2012] szczególnym czynnikiem wpływającym na zawartość pyłów w powietrzu jest hodowla drobiu na ściółce.

Tabela 2. Zawartość zanieczyszczeń powietrza w różnych systemach chowu drobiu [Nimmermark i in., 2009]

System chowu	Rodzaj zanieczyszczenia	Zawartość
Podłogowy (ściółkowy)	Pył	12 mg/m ³
Podłogowy wielopoziomowy		1,8 mg/m ³
Klatki wzbogacane		2,3 mg/m ³
Podłogowy (ściółkowy)	Bakterie	$8,8 \times 10^7$ JTK/m ³
Wielopoziomowy		$2,8 \times 10^7$ JTK/m ³
Klatki wzbogacane		$1,6 \times 10^7$ JTK/m ³

Zanieczyszczenia mikrobiologiczne powszechnie występują w kurniku a panujące warunki korzystnie wpływają na rozwój mikroorganizmów. Ponadto w większości kurników wielkotowarowych ograniczony jest dostęp naturalnego promieniowania słonecznego, które mogłoby działać niszcząco na mikroflorę wewnątrz budynków inwentarskich. Czynnikiem neutralizującym występowanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych są także opady

atmosferyczne, które oczyszczają powietrze z cząstek koloidalnych. Podczas wyładowań atmosferycznych wytwarza się ozon, który ma działanie zabójcze na drobnoustroje [Szykiewicz, 1975]. Źródłem zanieczyszczeń mikrobiologicznych jest: ściółka, pasza, pomiot drobiowy, człowiek i inne zwierzęta, które mają dostęp do kurnika oraz drobnoustroje zawarte we wprowadzanym przez wentylatory powietrzu.

Wśród drobnoustrojów występujących w środowisku kurnika najbardziej charakterystyczne są: ziarniaki (*Micrococcus*, *Sarcinia*, *Staphylococcus*), pałeczki i laseczki, a także drobnoustroje chorobotwórcze takie jak *Streptococcus*, *Bacillus* i *Clostridium*. Największym skupiskiem rozwijającej się mikroflory jest obornik, który powstaje na ściółce wraz z odchodami i moczem ptaków [Szykiewicz, 1975].

Badania mikroflory powietrza otaczającego budynki inwentarskie dla różnych gatunków zwierząt wykazały, że to właśnie kurniki emitują największą ilość drobnoustrojów. Rozpatrując spektrum rodzajowe mikroorganizmów wszystkich budynków inwentarskich stwierdza się, iż wśród grzybów mikroskopowych stanowiących nawet 35% całej mikroflory, dominują: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* i *Rhizopus* [Karwowska, 2005]. W poszczególnych budynkach inwentarskich najczęściej identyfikuje się następujące rodzaje i gatunki pleśni:

w oborach – *Penicillium* sp., *Penicillium piceum*, *Alternaria* sp., *Monilia* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavipes*, *A. nidulans*, *A. versicolor*)

w chlewach – *Penicillium* sp., *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp.

w kurnikach – *Aspergillus* (*A. niger*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*), *Penicillium natatum*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp.

Drożdże są grzybami mikroskopowymi i wraz z pleśniami stanowią pomost między organizmami roślinnymi i zwierzęcymi. Komórki drożdży nie zawierają chlorofilu, są więc organizmami cudzożywymi. Wśród identyfikowanych w środowisku kurnika dominują drożdże z rodzaju: *Rhodotorula* i *Candida*. Powszechnie występują one w glebie, na roślinach i zwierzętach, drożdże z rodzaju *Rhodotorula*, to tzw. czerwone drożdże. Choroby z ich udziałem były opisywane od pocz. XVIII w. Powodują one głównie zaburzenia jelitowe. Badania kliniczne wykazały, iż są one przyczyną występowania fungemii (np.: kandydemia) i zakażeń ogólnych. Często dochodzi do zakażenia oczu, które powodują: *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* oraz *R. miruta*. Inne zakażenia wywoływane przez niniejsze drożdże to np. wodniak jajowaty, zmiany skórne w pachwinach, owrzodzenia jamy ustnej, grzybica paznokci itd. [Barnett, 2004]. Drożdże z rodzaju *Candida* wywołują głównie zespoły chorobowe zwane kandydozami. Dotykają one zarówno ludzi jak i zwierzęta [Ledwoń i Szeleszczuk, 2008].

Zanieczyszczenia chemiczne mogą występować w kurnikach ze względu na celowe ich wprowadzenie do budynku np. jako leki i antybiotyki podawane ptakom lub w wyniku reakcji chemicznych zachodzących w środowisku kurnika jak również metabolizmu mikroorganizmów. Intensywna produkcja zwierzęca jest jednym z głównych źródeł amoniaku (42%) emitowanych do atmosfery. Fermy drobiu emitują amoniak, który zawiera największą ilość azotu pochodzącego z rozkładu przeprowadzonego przez drobnoustroje,

związków organicznych zawierających azot, zawartych głównie w pomociu drobiowym [Gorzka i in., 2012; Radon i in., 2004].

Grupy związków wytwarzanych przez różne mikroorganizmy jako drugorzędowe metabolity wtórne mają różne formy działania w środowisku, w którym występują. Możemy wyróżnić wśród nich mikotoksyny, endotoksyny oraz egzotoksyny.

Mikotoksyny to związki chemiczne wytwarzane przez grzyby pleśniowe takie jak *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Candida*, *Cladosporium*. Charakterystycznymi mikotoksynami produkowanymi przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* są aflatoksyny, do których zaliczana się 20 heterocyklicznych difurokumarynowych pochodnych. Związki te są odporne na szkodliwe działanie wysokich temperatur, jednak rozkładają się pod wpływem promieniowania ultrafioletowego i widzialnego. Źródłem aflatoksyn są tylko niektóre szczepy z rodzaju *Aspergillus*, a na ich produkcję ma znaczny wpływ temperatura oraz wilgotność określana za pomocą współczynnika dostępności wody (a_w). Dla *Aspergillus flavus* procentowy udział szczepów toksynotwórczych wynosi 20-98%. Następnymi mikotoksynami produkowanymi przez *Penicillium* i *Aspergillus* to ochratoksyny. Związki te są szczególnie odporne na działanie temperatury. *Fusarium spp.* Wytwarza natomiast zearalenon, który niekorzystnie wpływa na funkcjonowanie układu hormonalnego i przyczynia się do spadku płodności. Zarówno aflatoksyny, ochratoksyny jak też zearaleon wytwarzane są głównie na roślinach zbożowych, które uległy zapleśnieniu. Na ścianach budynków rozwijać się mogą *Stachybotrys chartarum*, które wytwarzają satratoksyny, które wpływają niekorzystnie na układ oddechowy [Soroka i in., 2008]. Trichoceny wytwarzane są m.in. przez *Fusarium*, *Myrothecium* lub *Trichoterma*. Ze względu na różną budowę trichoceny podzielono na 4 grupy: A, B, C i D. W otaczającym środowisku często występują związki z grupy A oraz B (deoksyniwalenol, niwalenol, fusaryna X). Powszechne występowanie trichocenów z grupy B w produktach pochodzenia roślinnego sprawia, iż są uważane za ważny czynnik wpływający na człowieka i środowisko [Suchorzyńska i Misiewicz, 2009]. Za najważniejsze trichoceny uważa się deoksyniwalenol (DON) i jego pochodne, a także niwalenol (NIV).

Grzyby mikroskopowe stwierdza się na powierzchni skorup, natomiast niewiele jest danych dotyczących zanieczyszczenia pleśniami treści jaj konsumpcyjnych. W badaniach [Szablewski i in., 2010] analizowano stężenie ergosterolu jako wskaźnika biomasy grzybowej. Materiał badany stanowiło odwodnione białko jaja kurzego przygotowane z treści jaj, pochodzących z hodowli ściółkowej. W analizowanym materiale stwierdzono obecność pleśni, podobnie rezultaty uzyskano w badaniach [Nowaczewski i in., 2011] przeprowadzonych na jajach bażancich.

Drugą grupą toksyn z którą mamy do czynienia w środowisku kurnika są endotoksyny. Te toksyczne związki znajdują się w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Endotoksyny to głównie liposacharydy, które są uwalniane po rozpadzie komórki. Zawartość endotoksyny w powietrzu wiejskim jest zmienna w zależności od pory roku [Schulze i in., 2006].

Klatkowy system utrzymania a bezpieczeństwo jaj

Wielkotowarowe system utrzymania kur niosek charakteryzują się dużą koncentracją jednego gatunku ptaków w specjalistycznych pomieszczeniach. Występuje zmechanizowane podawanie paszy i wody oraz zautomatyzowana wentylacja. W systemie klatkowym lepiej jest wykorzystana pasza i mniejsze jej zużycie na 1 kilogram masy ciała. Przy projektowaniu klatek umeblowanych, nacisk głównie położono na naturalne preferencje niosek oraz na możliwość zapewnienia bezpieczeństwa produkowanych jaj.

Kluczowe warunki zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego jaj przeznaczonych do spożycia przez człowieka dotyczą możliwości ich zanieczyszczenia mikrobiologicznego i chemicznego [Holt i in., 2011]. Mikrobiologiczna jakość jaj zależy od: systemu utrzymania kur niosek, zanieczyszczenia mikrobiologicznego paszy i pomieszczeń oraz postępowania z jajami bezpośrednio po zniesieniu [Szablewski i in., 2012]. Z kolei prewencja dotycząca zanieczyszczeń chemicznych obejmuje głównie zanieczyszczenia organiczne, takie jak: dioksyny i polichlorowane bifenyle, pestycydyczymetale ciężkie [Schulze i in., 2006].

Jaja utrzymane w systemie klatkowym zaraz po zniesieniu staczają się do rynienki zbiorczej bądź na taśmę zbiorczą i transportowane są do innego pomieszczenia. W przypadku chowu ściółkowego lub ekologicznego czas, jaki mija od chwili zniesienia jaja do jego zabrania jest dłuższy, a tym samym większe jest ryzyko zabrudzenia skorupy odchodami [Braun i in., 1999]. W przeprowadzonym doświadczeniu [De Reui in., 2003] odnotowano podobne zanieczyszczenie powierzchni jaj mikroflorą bakteryjną pomiędzy utrzymaniem kur niosek w standardowych, a umeblowanych klatkach. Jednak w innych badaniach wykazano, że odpowiednie materiały i wykończenia użyte podczas projektowania klatek stanowią elementy zachęcające kury do składania jaj w gniazdach [Abrahamsoni in. 1995]. Z higienicznego punktu widzenia, optymalne materiały do budowy gniazd to takie które pozwalają w skuteczny sposób przeprowadzić proces mycia i dezynfekcji. Jednak wiele badań wykazało, że podłogi wykonane z tworzyw sztucznych lub z siatki nie skłaniają do składania jaj w gniazdach [Abrahamsson i in., 1997]. Z kolei w badaniach [Malleti in., 2006] wykazano zmniejszenie liczby jaj znoszonych poza gniazdem co pociąga sobą redukcję zanieczyszczenia bakteryjnego jaj pozyskanych w klatkach umeblowanych w których poprawiono wygląd gniazda.

Klatkowy system utrzymania a bezpieczeństwo jaj

Jakość handlowa jaj może także się różnić w zależności od systemach chowu. Istotnym czynnikiem stanowiącym o ekonomicznym aspekcie produkcji i obrotu handlowego jaj to stopień uszkodzenia skorupy, indeks kształtu, wielkość komory powietrznej oraz barwa żółtka. Do handlu detalicznego dopuszczone są jaja klasy „A” charakteryzujące się nieuszkodzoną oraz czystą skorupą, nieruchomą komorą powietrzną o wysokości ≤ 6 mm, a w przypadku jaj klasy „ekstra” nie wyższą niż 4 mm, żółtko powinno być centralnie położone w jajku, delikatnie ruchome podczas obracania jajem, przejrzystym białkiem, bez obcego zapachu oraz ciał obcych.

W badaniach odnotowano wyższy odsetek pękniętych jaj pozyskanych w klatkach umeblowanych niż w klatkach konwencjonalnych [Abrahamsoni in., 1995; Abrahamsson i in., 1997]. Wynikać to mogło ze zbyt dużej kumulacji jaj w rynienkach zbiorczych.

W innych badaniach stwierdzono, że w jajach o wysokim indeksie kształtu, może wystąpić większe ryzyko pęknięcia skorupy podczas toczenia się w dół do rynienki zbiorczej, ze względu na możliwość uzyskania wyższej prędkości. W większości modeli klatek umebrowanych, składanie jaj ma miejsce w ograniczonym obszarze porównaniu do konwencjonalnych klatek bez gniazd. W typach klatek gdzie zastosowano tzw. spowalniacze jaj oraz odpowiednie zasłony w gnieździe zminimalizowano możliwość pęknięcia skorupy jaj [Wall i in., 2002].

Podsumowanie

Chcąc zapewnić produkt o wysokiej jakości, ale przede wszystkim bezpieczny dla zdrowia konsumenta należy mieć na uwadze systemy zapewniania jakości. Zgodnie z GAP (Dobrą Praktyką Rolniczą), w którym zawarte są zalecenia dla producentów żywności oraz GMP (Dobrą Praktyką Produkcyjną), gdzie uwagę zwraca się na sposób produkcji środków spożywczych możemy uzyskać produkt o wysokich walorach jakościowych, a także pozyskany w sposób bezpieczny.

W celu minimalizowania zagrożeń przenoszonych przez jaja powstałych podczas ich pozyskiwania, ważna jest systematyczna kontrola panujących warunków. Monitorowanie zanieczyszczeń pochodzących z paszy, ściółki oraz pozostałych komponentów pod względem mikrobiologicznym oraz chemicznym może pomóc w minimalizowaniu negatywnych skutków ich występowania.

Literatura

Abrahamsson P., Tauson R., Appleby M. C., Performance of four hybrids of laying hens in modified and conventional cages. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A- Animal Science*, 1995, 45, 286–296.

Abrahamsson, P., Tauson R., Effects of group size on performance, health and birds' use of facilities in furnished cages for laying hens. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A- Animal Science*, 1997, 47, 254–260.

Barnett J.A., A history of research on yeast and taxonomy. *Yeast*, 2004, 21, 1141–1193.

Braun P., Fehlhaber K., Wicke A., Salmonella enteritidis invades the egg through the shell. *World Poultry*, 1999, 23–24.

De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Herman, L., Bacterial eggshell contamination in different housing systems. *Proceedings of 16th European symposium on the quality of poultry meat and 10th European symposium on the quality of eggs and egg products*, 2003, 3, 180–185.

Gorzka Z., Zaborowski M., Kaźmierczak M., Żarczyński A., Paryczak T., Kędziora A., Ciesielewski R., Pisarek M., Determination of ammonia and other pollutants in air the area of poultry and milker cows keeping farms. *Ecological Chemistry and Engineering*, 2012, 19 (6), 609–617.

- Guesdon V., Faure J. M., Laying performance and egg quality in hens kept in standard or furnished cages. *Animal Research*, 2004, 03, 45-57.
- Hartung J., Schulz J. Occupational and environmental risks caused by bio-aerosols in and from farm animal houses. *Agricultural Engineering International: the CIGR Journal*, 2011, Manuscript No. 1173,13, Issue 2.
- Holt P. S., Davies R. H., Dewulf J., Gast R. K., Huwe J. K., Jones D. R., Waltman D., Willian K. R., The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poultry Science*, 2011, 90 (1), 251-262.
- Karwowska E., Microbiological air contamination in farming environment. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2005, 14 (4), 445-449.
- Ledwoń A., Szeleszczuk P., Grzybice u ptaków. *Mikologia Lekarska*, 2008, 15 (3), 172-175.
- Mallet S., Guesdon V., Ahmed A.M.H., Comparison of eggshell hygiene in two housing systems: Standard and furnished cages. *British Poultry Science*, 2006, 47, 30-35.
- Nimmermark S., Lund V., Gustafss G., Eduard W., Ammonia, dust and bacteria in welfare-oriented systems for laying hens. *Ann Agric Environ Med*, 2009, 16, 103-113.
- 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.
- Schulze A., Strien R., Ehrenstein V., Schierl R., Kuchenhoff H., Radon K., Ambient endotoxin level in an area with intensive livestock production. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2006, 13, 87-91.
- Saleh M., Seedorf J., Hartung J., (2004). Inhalable and respirable dust in work place atmospheres of laying hen houses. *International Society for Animal Hygiene*, s. 211-212.
- Sobczak J., Zmiany w produkcji jaj spożywczych w Polsce po przystąpieniu do UE. *Problemy Inżynierii Rolniczej*, 2007, 4/2007.
- Soroka P., Cyprowski M., Szadkowska-Stańczyk I., Narażenie zawodowe na mykotoksyny w różnych gałęziach przemysłu. *Medycyna Pracy*, 2008, 59 (4), 333-345.
- Suchorzyńska M., Misiewicz A., Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Postępy Mikrobiologii*, 2009, 43 (3), 221-230.
- Szablewski T., Cegielska-Radziejewska R., Kaczmarek A., Kijowski J. Konkurencyjne oddziaływanie mikroorganizmów na powierzchni skorup jaj konsumpcyjnych, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, 2 (81), 119-130.
- 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 (11), 2491-3.
- Radon K., Danser B., Iversen M., Monso E., Weber C., Hartung J., Donham K., Palmgren U., Nowak D., Air contaminants in different European farming environments. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2009, 41-48.

Szynkiewicz Z. Mikrobiologia. Wydawnictwo PWN, 1975, Warszawa, 1975.

Wall H., Tauson R. Egg Quality in Furnished Cages for Laying Hens-Effects of Crack Reduction Measures and Hybrid., Poultry Science, 2002, 81:340-348.

Wilkanowska A., Cechy dobrego mikroklimatu na fermach drobiu. Hodowca Drobiu 7, 2012, cz. II.

JULIUSZ PIJACKI^{1,2}, PRZEMYSŁAW PIOTR OLEJNIK^{1,2}, WOJCIECH JUZWA²

¹*Koło Naukowe Studentów Biotechnologii "Operon"*

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²*Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności*

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

juliuszpijacki@gmail.com

KONTROLA ZANIECZYSZCZEŃ BAKTERYJNYCH W PROCESIE FERMENTACJI ETANOLOWEJ

Streszczenie

W związku z częstymi skażeniami bakteryjnymi istnieje potrzeba opracowania i wprowadzenia do praktyki przemysłowej szybkich i wysokowydajnych metod pozwalających na wykrywanie skażeń. Tradycyjne metody mikrobiologiczne, takie jak metoda seryjnych rozcieńczeń, zwykle są zbyt pracochłonne, mało dokładne, a wynik analizy znany jest po stosunkowo długim czasie. W ostatnim czasie zaproponowano szereg metod pozwalających na kontrolę wzrostu bakterii w trakcie procesu fermentacji etanolowej. Są to między innymi wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), techniki biologii molekularnej, takie jak reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) czy reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (q-PCR), a także cytometria przepływowa. Wszystkie wymienione metody pozwalają na szybką analizę prób i otrzymanie wiarygodnych wyników. W przypadku niektórych z nich konieczna wydaje się pracochłonna standaryzacja, jak na przykład optymalizacja warunków przeprowadzania reakcji PCR i qPCR. Koniecznym wydaje się przeprowadzanie szeregu testów, pozwalających na wdrożenie tych technik do praktyki przemysłowej.

Słowa kluczowe: fermentacja etanolowa, kontrola zanieczyszczeń bakteryjnych

Wprowadzenie

W ostatnim czasie szerokie zainteresowanie w nauce i gospodarce budzi wykorzystanie odnawialnych źródeł energii. Jednym z nich jest bioetanol, który w Europie jest produkowany głównie z wykorzystaniem drożdży. Rosnąca produkcja etanolu wiąże się z wytycznymi, między innymi Unii Europejskiej, której polityka kładzie nacisk na wykorzystanie odnawialnych źródeł energii. Obecnie dużą uwagę skupia się na usprawnieniu procesu fermentacji, a także opracowanie nowych technologii, pozwalających na przykład na hydrolizę skrobi w niskich temperaturach, bez konieczności kleikowania. Wyeliminowanie z tych procesów etapów przeprowadzanych w wysokich temperaturach oraz przeprowadzanie ich w coraz większej skali wiąże się z powszechnymi zakażeniami bakteryjnymi, głównie przez bakterie kwasu mlekowego. Kontaminacja fermentacji etanolowej często wiąże się ze zmniejszeniem produktywności procesu [Skinner i Leathers, 2004].

W związku z częstymi skażeniami bakteryjnymi istnieje potrzeba opracowania i wprowadzenia do praktyki przemysłowej szybkich i wysokowydajnych metod pozwalających na wykrywanie skażeń. Tradycyjne metody mikrobiologiczne, takie jak metoda seryjnych rozcieńczeń, zwykle są zbyt pracochłonne, mało dokładne, a wynik analizy znany jest po stosunkowo długim czasie.

Skażenia bakteryjne

Zanieczyszczenie można sklasyfikować na pośrednie oraz bezpośrednie. Zanieczyszczenia bezpośrednie pochodzą zwykle z surowców używanych do fermentacji na przykład wody, skrobi, kukurydzy, inokulum czy enzymów, natomiast źródłem skażeń pośrednich może być infrastruktura wykorzystywana w procesie produkcyjnym [Schell i in., 2007].

Z uwagi na beztlenowe warunki panujące w trakcie fermentacji etanolowej, bakteriami najczęściej wzrastającymi w fermentorach są bakterie beztlenowe i fakultatywnie beztlenowe. Wykazują one zdolność do przetrwania w środowisku o znacznie niższym pH (nawet poniżej pH 5) niż inne bakterie [Bely i in., 1991]. Drożdże przeprowadzające proces fermentacji etanolowej konkurują z bakteriami o składniki pokarmowe, głównie cukry, a efektem jest obniżenie produktywności procesu [Chaney i in., 2006].

Najczęściej skażenie procesu fermentacji etanolowej powodowane są przez Gram-dodatnie bakterie kwasu mlekowego z rodzin *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc*, a także rodziny *Weissella* oraz *Acetobacter*. Z prób pozyskanych z procesów przemysłowych wyizolowano także bakterie z rodzin *Clostridium*, *Propionibacterium* i *Fusobacterium*. Skinner i Leathers [2008] w trakcie swoich badań stwierdzili, że ponad 50% liczby komórek bakterii skażających proces produkcji etanolu należało do rodziny *Lactobacillus*.

Metody ograniczające ryzyko wystąpienia skażeń

Skażenie procesu może nastąpić na każdym jego etapie. Ważnym jest właściwie przygotowanie infrastruktury produkcyjnej poprzez skuteczne mycie i dezynfekcję. Problemem są biofilmy, które są trudne do usunięcia i stanowią źródło skażeń. Bakterie w formie biofilmu są dużo odporniejsze na mycie i sterylizację, a także na stosowanie takich środków jak antybiotyki i bakteriocyny [La Duc i in., 2007]. Zwykle niemożliwym jest usunięcie wszystkich zanieczyszczeń po procesie fermentacyjnym, szczególnie prowadzonym w wielkoskalowych warunkach przemysłowych [Bischoff i in., 2009]. Dlatego uzasadnione jest wykorzystywanie środków pozwalających na ograniczenie wzrostu bakterii, a nie wpływających na szybkość wzrostu i produktywność drożdży [Stewart i in., 2004].

Najpopularniejszymi substancjami używanymi do inhibicji wzrostu bakterii są antybiotyki. Mogą być one wykorzystywane również jako mieszaniny. Do powszechnie stosowanych należą penicyliny (głównie penicylina G), streptomycyna, tetracyklina, monenzyna i wirginiamicyna. Dużym problemem jest nabywanie przez mikroorganizmy tak zwanej antybiotykooporności, co uniemożliwia lub ogranicza skuteczne ich stosowanie [Nyström, 2003]. Zagrożenie stanowi również przedostawanie się antybiotyków

do środowiska, wraz z odpadami produkcyjnymi. Wiąże się to z ryzykiem pojawienia się w środowisku szczepów bakterii odpornych na działanie antybiotyków i mogących powodować choroby ludzi i zwierząt [Earnshaw i in., 2009].

Alternatywnymi środkami ograniczającymi wzrost bakterii są między innymi nadtlenuk karbamidu, disiarczyny potasu i ditlenek chloru. Niezwykle interesującymi substancjami są bakteriocyny, czyli substancje białkowe, wytwarzane przez różne gatunki bakterii, które zdolne są do ograniczania wzrostu lub zabicia komórek innych bakterii. Najczęściej używaną bakteriocyną jest nizinina. Wykazuje ona właściwości inhibujące wzrost wobec bakterii Gram-dodatnich, które są najczęstszą przyczyną skażeń. Powoduje ona przerywanie błony komórkowej wrażliwych bakterii i śmierć komórek.

Metody służące do kontroli zanieczyszczeń bakteryjnych

Metoda płytkowa. Technika ta polega na wykonaniu serii rozcieńczeń dziesiętnych i ich posiew na szalkach Petriego zawierających odpowiednią pożywkę zestaloną agarosem. Do hodowli i zliczania bakterii kwasu mlekowego wykorzystywane jest podłoże MRS (de Man Rogosa Sharpe medium). Pożywka MRS zawiera w swoim składzie antybiotyki o działaniu grzybobójczym takie jak cykloheksymid, a także czynnik redukcyjny cysteinę, w stężeniu 0,05%, substancja ta wpływa na poprawienie specyficzności wzrostu bakterii kwasu mlekowego [Shapiro, 2000].

Jest to metoda stosunkowo tania, lecz czasochłonna. Inkubacja płytek trwa zwykle od 24 do 48 godzin i dopiero po tym czasie możliwe jest policzenie wszystkich powstałych kolonii bakteryjnych. Na skutek długiej inkubacji, otrzymane wyniki nie pozwalają na użycie substancji ograniczających wzrost bakterii we właściwym czasie. Stąd metoda ta jest używana jako kontrola dla innych, lub nie jest stosowana w ogóle.

Wysokosprawna chromatografia ciekłowa (HPLC). HPLC jest rodzajem chromatografii kolumnowej, która wykorzystywana jest do oznaczania jakościowego i ilościowego składu mieszanin. W metodzie tej przez upakowane w kolumnie chromatograficznej złożone (fazę stacjonarną) przepływa pod wysokim ciśnieniem faza ruchoma, do której wprowadzana jest niewielka ilość badanej próby. Substancje obecne w próbce przechodzą przez kolumnę w różnym czasie, a zależne to jest od wielkości cząsteczek i powinowactwa związków do fazy ruchomej i stacjonarnej. Wpływ substancji z układu rejestrowany jest przez detektor, którym jest zwykle spektrofotometr UV-Vis [Swadesh, 2001]. Dzięki przygotowanym wcześniej wzorcom, możliwa jest identyfikacja substancji, na podstawie czasu retencji, czyli czasu przebywania związku w układzie. Po przygotowaniu krzywej wzorcowej, możliwe jest oznaczenie stężenia danego związku, które koreluje z poziomem sygnału z detektora. Jest to jedna z najczęściej stosowanych technik do wykrywania skażeń bakteryjnych podczas procesu fermentacji etanolowej. HPLC wykorzystywane jest do wykrywania kwasów organicznych, takich jak kwas mlekowy czy octowy, które są wytwarzane przez bakterie skażające proces, a przez drożdże bardzo rzadko. Dlatego wykrycie tych kwasów świadczy zazwyczaj o występowaniu bakterii, a ich ilość powiązać można ze stopniem skażenia. Zazwyczaj próbki pobierane są w równych odstępach czasu przez cały okres trwania procesu. Obecnie oferowane przez producentów chromatografy pozwalają na ciągłą pracę urządzenia z wykorzystaniem układów do automatycznego nastrzykiwania prób do układu [Raddler, 1990].

Jest to metoda pośrednia wykrywania skażenia bakteryjnego, ponieważ opiera się ona na wykrywaniu metabolitów bakteryjnych. W związku z tym wykrycie zanieczyszczeń możliwe jest tylko w późniejszym okresie zakażenia, co ogranicza możliwości zapobiegnięcia nadmiernemu wzrostowi bakterii [Valli i in., 2006]. Metoda ta nie pozwala na określenie rodzaju oraz gatunku bakterii przez co nie jest możliwa precyzyjna walka z zanieczyszczeniami, dlatego HPLC może być wykorzystywane tylko do ogólnego monitoringu procesu fermentacji.

Spektroskopia fluorescencyjna. Technika ta w przeciwieństwie do metod mikrobiologicznych oferuje wyjątkowo krótki czas analizy. Fluorymetria z powrotem została zastosowana do rozróżnienia różnych typów drożdży browarniczych i gorzelnianych oraz bakterii kwasu mlekowego. Analiza ta polega na pomiarze intensywności fluorescencji w zakresie 325 i 328 nm po wzbudzeniu prób światłem UV [Joux i Lebaron, 2000]. Długości tych fal odpowiadają maksimum emisji światła emitowanego przez tryptofan. Emisja światła o długości fali 325 nm odpowiada fluorescencji tryptofanu w komórkach bakterii, a 328 nm w komórkach drożdży. Wykonanie wcześniejszej optymalizacji i wykonania pomiarów w trakcie procesu fermentacji etanolowej pozwala na wykrycie skażeń bakteryjnych [Ammor, 2007].

Wadami tej techniki jest konieczność pomiaru prób o odpowiednim zagęszczeniu komórek, stąd możliwy jest on zwykle po 24-48 godzinach prowadzenia hodowli. Ponadto przesunięcie widma emisji światła wynosi tylko 3 nm, stąd dokładność tej metody jest stosunkowo niska i wymaga aparatury pozwalającej na bardzo dokładne pomiary, także dobrze przeszkolonego personelu. Wcześniejsze optymalizacje metody na szczepach referencyjnych odbiegać mogą znacząco od wyników pozyskiwanych z procesu przemysłowego, z czego wynika trudność w interpretacji danych [Bunthof i in., 1999].

Metody molekularne. Techniki biologii molekularnej są z powodzeniem wykorzystywane do wykrywania i identyfikacji mikroorganizmów. Podstawową metodą jest reakcja łańcuchowa polimerazy DNA (PCR) pozwalająca na amplifikację określonego fragmentu DNA. Sekwencja ulegająca powieleniu wybierana jest przez zaprojektowanie odpowiednich starterów oligonukleotydowych specyficznych do sekwencji flankujących wybrany fragment DNA [Yost i Nattress, 2002]. W standardowej technice PCR, amplifikowany fragment DNA jest wykrywany z wykorzystaniem techniki elektroforezy żelowej. PCR pozwala na wykrycie specyficznego fragmentu DNA, który może być unikatowy dla danego organizmu lub grupy organizmów [Fratamico, 2001]. Dotychczas opracowano szereg starterów DNA pozwalających na selektywną amplifikację fragmentów DNA specyficznych dla określonych organizmów [Lee i in., 2000]. Możliwe jest wykrycie obecności różnych gatunków bakterii, w tym bakterii kwasu mlekowego i innych mikroorganizmów skażających proces fermentacji etanolowej. Produkt reakcji PCR może zostać również zsekwencjonowany w celu potwierdzenia dokładności metody i prawidłowego jej przygotowania. Reakcja ta w porównaniu do innych jest wyjątkowo szybka oraz dokładna, jednak nie pozwala ona na dokładne określenie poziomu skażenia. Metoda jest wyjątkowo czuła, do amplifikacji fragmentu DNA wystarcza kilka, a nawet jedna kopia nici matrycowej [Mullis, 1990].

Odmianą techniki PCR jest reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (q-PCR). Pozwala ona na pomiar ilości DNA amplifikowanego w trakcie reakcji [Neeley

i in., 2005]. Wykorzystuje się zwykle barwniki fluorescencyjne, na przykład SYBR Green, który wykazuje zieloną fluorescencję po związaniu się z dwuniciową strukturą DNA. Poziom fluorescencji świadczy o ilości dwuniciowego DNA obecnego w mieszaninie reakcyjnej [Haakensen i in., 2007]. W sposób zautomatyzowany wykreślana jest krzywa przedstawiająca zależność intensywności fluorescencji od liczby kolejnych cykli reakcji. Wcześniejsze wykonanie krzywych wzorcowych pozwala na określenie liczby kopii matrycowej nici DNA użytej do przeprowadzenia reakcji, a tym samym określenie poziomu skażenia procesu.

Cytometria przepływowa. Technika ta pozwala na analizę pojedynczych komórek zawieszonych w próbce i określenie parametrów morfologicznych z wykorzystaniem pomiaru poziomu rozproszenia światła lasera padającego na badane komórki [Hutter, 2002]. Możliwe jest także wykorzystanie barwników fluorescencyjnych, pozwalających między innymi na ocenę zawartości kwasów nukleinowych czy tłuszczu [Nebe-von-Caron i in., 2000]. Z użyciem znakowanych fluorescencyjnie sond molekularnych możliwa jest identyfikacja specyficznych sekwencji w obrębie genomowego DNA lub rybosomalnego RNA czy obecność określonych białek [Bouchez i in., 2004].

Cytometria przepływowa z powodzeniem została wykorzystana do wykrywania skażeń bakteryjnych w winiarstwie. Na podstawie pomiarów rozproszenia światła możliwa stała się identyfikacja dwóch populacji komórek: drożdży prowadzących proces fermentacyjny i skażających je bakterii [Budde i Rasch, 2001]. Cytometria przepływowa jest szybką metodą pozwalającą na ilościową ocenę skażenia bakteryjnego procesu fermentacji etanolowej [Malacrino i in., 2001]. Możliwa jest automatyzacja pomiaru i prowadzenie go w sposób ciągły [Pina-Vaz i in., 2005]. Pozwala to na ścisłą kontrolę prowadzenia procesu i wczesną detekcję rozwoju skażeń bakteryjnych [Katsuragi i Tani, 2000].

Podsumowanie

Skażenia bakteryjne procesu fermentacji etanolowej prowadzą do znacznych strat, poprzez obniżenie wydajności procesu. Pojawiające się w procesie bakterie konkurują z drożdżami o składniki pokarmowe, a także wytwarzają substancje inhibujące wzrost drożdży.

Istnieje duża potrzeba optymalizacji stosowanych dotychczas metod i opracowania nowych pozwalających na jak najszybszą detekcję skażeń bakteryjnych w procesie fermentacji etanolowej i kontrolę ich rozwoju.

Wczesna detekcja niepożądanych mikroorganizmów pozwala na podjęcie decyzji o zastosowaniu środków przeciwbakteryjnych w odpowiednim czasie i odpowiedniej dawce, a także ograniczenie stosowania takich środków, w przypadku braku skażeń. Wszystkie te czynniki powodować mogą wzrost opłacalności prowadzenia procesu fermentacji etanolowej.

Z opisanych technik metody molekularne i cytometria przepływowa wydają się być tymi, które pozwalają na jak najszybszą analizę zarówno jakościową jak i ilościową bioprocesu. Dodatkowo cytometria przepływowa pozwala na ciągły pomiar i analizę wyników w bardzo krótkim czasie. Minusem tych technik jest stosunkowo wysoki koszt zakupu niezbędnej aparatury, a także zatrudnienie wysoko wykwalifikowanego personelu,

który w sposób prawidłowy wykona niezbędne pomiary i właściwie zinterpretuje otrzymane wyniki.

Literatura

Ammor M.S., Recent advances in the use of intrinsic fluorescence for bacterial identification and characterization, *Journal of Fluorescence*, 2007, 17, 455-459.

Bely M., Sablayrolles J. M., Barre P., Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological condition, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991, 70, 246-252.

Bischoff K.M., Liu S., Leathers T.D., Worthington R.E., Rich J.O., Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103, 117-122.

Bouchez J.C., Cornu M., Danzart M., Leveau J.Y., Duchiron F., Bouix M., Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeast after viability staining, *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 86, 520-530.

Budde B.B., Rasch M., A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins, *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 63, 65-72.

Bunthof C.J., vanden Braak S., Breeuwer P., Rombouts F.M., Abee T., Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*., *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65, 3681-3689.

Chaney D., Rodríguez S., Fugelsang K., Thornton R., Managing high-density commercial scale wine fermentations, *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100, 689-698.

Earnshaw S., Monnet D.L., Duncan B., O'Toole J., Ekdahl K., Goossens H., European Antibiotic Awareness Day, 2008 – the first Europe-wide public information campaign on prudent antibiotic use: methods and survey of activities in participating countries., *Eurosurveillance*, 2009, 14, 19280.

Fratamico P.M., Applications of the polymerase chain reaction for detection, identification, and typing of foodborne microorganisms., In: Wilson C.L., Droby S. (Eds.), *Microbial Food Contamination*, CRC Press, New York, 2001, 95-99.

Haakensen M.C., Butt L., Chaban B., Deneer H., Ziola B., Dowgiert T., HorA specific real-time PCR for detection of beer-spoilage lactic acid bacteria., *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2007, 65, 157-165.

Hutter K.J., Flow cytometry: a new tool for direct control of fermentation processes, *Journal of the Institute of Brewing*, 2002, 108, 48-51.

Joux F., Lebaron P., Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level, *Microbes and Infection*, 2000, 2, 1523-1535.

- Katsuragi T., Tani Y., Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89, 217-222.
- La Duc M.T., Dekas A., Osman S., Moissl C., Newcombe D., Venkateswaran K., Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments, *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73, 2600-2611.
- Lee H.J., Park S.Y., Kim J., Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species., *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 193, 243-247.
- Malacrino P., Zapparoli G., Torriani S., Dellaglio F., Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry, *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45, 127-134.
- Mullis, K.B., The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Scientific American*, 1990, 262, 56-65.
- Nebe-von-Caron G., Stephens P.J., Hewitt C.J., Powell J.R., Badley R.A., Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting, *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 42, 97-114.
- Neeley E.T., Phister T.G., Mills D.A., Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine, *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71, 8954-8957.
- Nyström T., Conditional senescence in bacteria: death of the immortals, *Molecular Microbiology*, 2003, 48, 17-23.
- Pina-Vaz C., Costa-de-Oliveira S., Rodrigues A.G., Safe susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16, *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54, 77-81.
- Raddler F., Possible use of nisin in wine making. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1990, 41, 1-6.
- Schell D., Dowe N., Ibsen K.N., Riley C.J., Ruth M.F., Lumpkin R.E., Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process., *Bioresource Technology*, 2007, 98, 2942-2948.
- Shapiro H.M., Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques, *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 42, 3-16.
- Skinner K.A., Leathers T.D., Bacterial contaminants of fuel ethanol production, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2004, 31, 401-408.
- Stewart P.S., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A., Biofilm antimicrobial resistance. In: Ghannoum M., O'Toole G.A. (Eds.), *Microbial Biofilms*, ASM Press, Washington, 2004, 250-268.
- Swadesh J.K., *HPLC: practical and industrial applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2001.

Valli M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D., Mattanovich D., Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH, *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72, 5492-5499.

Yost C.K., Nattress F.M., Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef, *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 72, 97-105.

MICHAŁ ŚWIĄTEK¹, DARIA SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA²,
BARBARA CANIA¹, SZYMON POWAŁOWSKI³

¹*Instytut Technologii Mikrobiologicznych w Turku*

michal.swiatek@itm.turek.pl

²*Wydział Nauk o Żywności*

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

³*Wyższa Szkoła Humanistyczna im. Stanisława Leszczyńskiego w Lesznie*

IZOLACJA, SELEKCJA I IDENTYFIKACJA DROBNOUSTROJÓW O POTENCJALE BIOTECHNOLOGICZNYM

Streszczenie

W odpowiedzi na zapotrzebowanie przemysłu na mikroorganizmy o potencjale biotechnologicznym trwają poszukiwania szczepów, które charakteryzują się cennymi właściwościami metabolicznymi. Celem przeprowadzonych eksperymentów było wyselekcjonowanie szczepów o potencjale biotechnologicznym z kału noworodka karmionego wyłącznie mlekiem matki, a także z zalewy z kiszonej spontanicznie ogórków i kapusty. Izolaty pochodzące z kału noworodka charakteryzowały się stosunkowo dobrym wzrostem na 4% roztworze melasy. Gram-dodatnie pałeczki izolowane z zalewy po kiszeniu kapusty charakteryzowały się bardzo silnymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Izolaty poddano analizie RAPD, a następnie wybrane monokultury poddano identyfikacji gatunkowej. Szczepy charakteryzujące się najwyższym potencjałem biotechnologicznym należały do gatunku *Lactobacillus plantarum*, którego szczepy izolowano z zalewy po zakiszaniu warzyw, lub ekotypy *Enterococcus faecalis* z kału noworodka.

Słowa kluczowe: aktywność przeciwdrobnoustrojowa, drobnoustroje przemysłowe, melasa trzcinowa, różnicowanie molekularne.

Wprowadzenie

Mikroorganizmy towarzyszą ludziom od zarania dziejów, a powszechnie wykorzystywane są m.in. w przemyśle spożywczym. Gdyby nie mikroorganizmy, a w szczególności bakterie fermentacji mlekowej (LAB) rynek produktów spożywczych byłby znacznie uboższy, a możliwości przemysłu spożywczego ograniczone [Babuchowski i Wzorek, 2003; Chabłowska i in., 2009; Trojanowska i in., 2009]. Ważną grupą drobnoustrojów są te wykazujące potencjał probiotyczny a spożycie produktów zawierających szczepy probiotyczne cały czas wzrasta [Grajeta, 2004; Nowak i in., 2007; Lutyńska i in., 2012], w związku z tym bardzo istotne jest poszukiwanie nowych drobnoustrojów o cennym potencjale biotechnologicznym. W tym celu prowadzi się izolację, selekcję i hodowlę szczepów a także bada ich właściwości, szukając bakterii o pożądanym cechach. Bakterie w zależności od ich późniejszego przeznaczenia muszą być izolowane z konkretnego środowiska. I tak, aby szczepy mogły być stosowane w żywieniu ludzi powinny pochodzić z organizmu człowieka. Ponadto konieczne jest spełnienie przez

nie szeregu innych wymogów, aby potwierdzić ich korzystne oddziaływanie [Reps, 2003; Jach i in., 2013].

Celem przeprowadzonych eksperymentów była izolacja i selekcja szczepów o potencjale biotechnologicznym, w tym także tych posiadających cechy typowe dla szczepów zaliczanych do probiotycznych. Zrealizowane badania obejmowały izolację mikroorganizmów ze środowisk typowych dla występowania LAB, a także ocenę ich potencjału biotechnologicznego, w tym zdolność do wzrostu na podłożach hodowlanych, właściwości metaboliczne oraz aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Materialy i metody

Drobnoustroje izolowano z zalewy z kiszonych kapusty i ogórków poddanych spontanicznie przebiegającemu procesowi fermentacji oraz kału pobranego od 2-tygodniowego noworodka karmionego wyłącznie mlekiem matki. Do izolacji drobnoustrojów zastosowano podłoża: De Man Rogosa Sharpe (MRS, BTL Sp.z o.o.), M-17 (BTL Sp. z o.o.) i Smith-Lorentza (BTL Sp. z o.o.). Pierwsze etapy izolacji szczepów przeprowadzono w warunkach beztlenowych. W celu namnożenia wyizolowanych szczepów zastosowano pożywkę bulion MRS.

W celu określenia zdolności wyizolowanych szczepów do wzrostu w warunkach produkcyjnych przeprowadzono hodowlę w 4% roztworze melasy trzcinowej. Szczepy wstępnie namnożone w bulionie MRS (24 h, 37°C), odwirowano i zawieszono w 0,9% roztworze soli fizjologicznej tak, aby gęstość optyczna zawiesiny (OD_{605}) była równa 0,2. Tak przygotowane inokulum dodawano do pożywek hodowlanych (5% v/v). Próby inkubowano w temperaturze 37°C, 48 h. Bezpośrednio po zaszczepieniu pożywki, a także w trakcie prowadzenia hodowli, po upływie 24 i 48 h, mierzono OD_{605} i pH hodowli w celu oszacowania zdolności izolatów do wzrostu na badanych podłożach. Jako kontrolę zastosowano bulion MRS.

Badając zdolności metaboliczne pozyskanych szczepów zastosowano pożywkę bulion wzbogacony (BTL Sp. z o.o.) z 2% dodatkiem jednego z następujących źródeł węgla: L-arabinoza, L-arabitol, dekstryna, D-fruktoza, D-ksyloza, laktoza, D-mannitol, D-rafinioza, sacharoza, trehaloza. Hodowlę inokulacyjną i procedurę postępowania zastosowano jak zostało opisane w przypadku badania wzrostu na podłożu produkcyjnym.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową badano wobec mikroorganizmów wskaźnikowych z gatunków: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 oraz *Clostridium butyricum* ATCC 860 stosując metodę studzienkowo-dyfuzyjną.

Izolację DNA przeprowadzano za pomocą zestawu Bacteria SPIN+ (A&A Biotechnology). Zróżnicowanie wyizolowanych szczepów określano przeprowadzając reakcję losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD). Do reakcji PCR użyto primera M13 (Genomed Sp. z o.o.) [Tynkkynen i in., 1999] oraz polimerazę Phire (Thermo Scientific). Mieszanina reakcyjna o objętości 20 μ l zawierała 1 μ M primera, 6,5 mM Mg^{2+} , po 0,8 mM każdego dNTP (A&A Biotechnology) oraz 30 ng matrycowego DNA.

Amplifikacja obejmowała 40 cykli denaturacji 98°C przez 15 s, anilingu 45°C przez 40 s i elongacji 72°C przez 60 s.

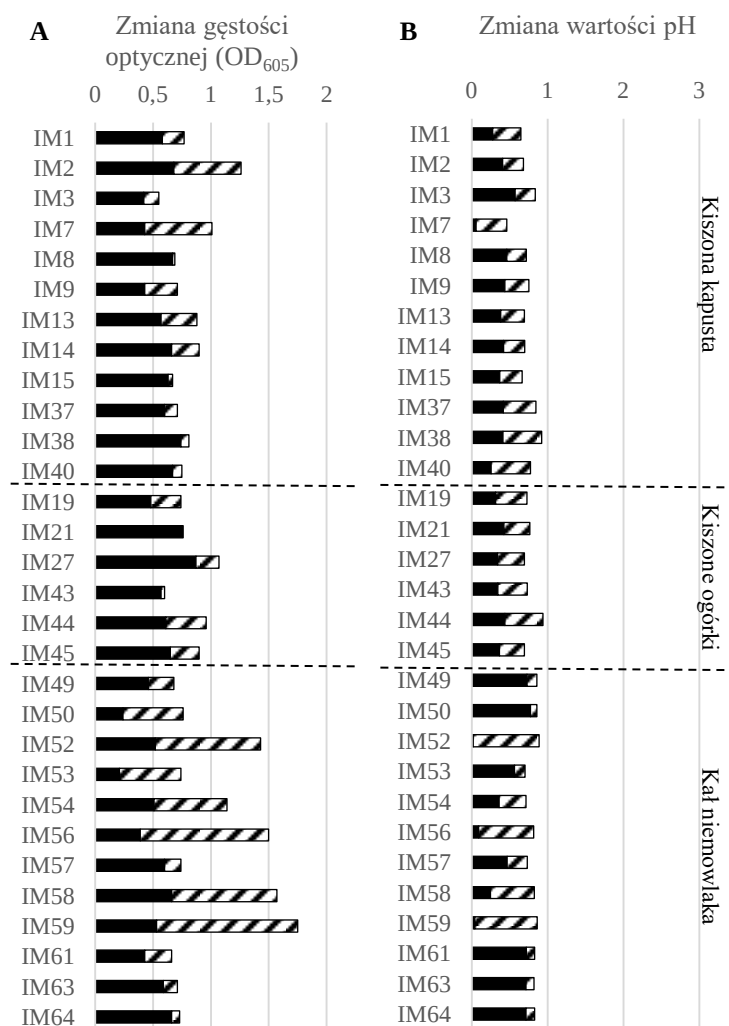
Przynależność gatunkową wyizolowanych szczepów bakterii ustalono poprzez analizę sekwencji genu 16S rDNA. Do reakcji PCR użyto primery 16SF i 16SR [Zawadzka-Skomił i in., 2009]. Mieszanina reakcyjna o objętości 50 µl zawierała po 0,5 µM każdego z primerów, 0,2 mM każdego dNTP (A&A Biotechnology) oraz 60 ng matrycowego DNA. Amplifikację przeprowadzano w obecności polimerazy Phire (Thermo Scientific) i obejmowała 30 cykli denaturacji 98°C przez 5 s, anilingu 55°C przez 5 s i elongacji 72°C przez 30 s. Sekwencje produktów odczytywano przy pomocy automatycznego sekwenatora kapilarnego 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) w Genomed Sp. z o.o. Odczytane sekwencje składano w kontigi, a następnie poddawano analizie porównawczej w bazie GenBank przy zastosowaniu programu BLAST [Zhang i in., 2000].

Wyniki i dyskusja

W trakcie badań wyizolowano łącznie 36 szczepów. W wyniku barwienia metodą Grama określono czystość i morfologię wyizolowanych kultur drobnoustrojów. Wszystkie izolaty należały do bakterii Gram-dodatnich. Wśród izolatów z zalewy po kiszeniu kapusty i ogórków przeważały pałeczki. Wszystkie izolaty z kału niemowlęcia to ziarniaki. Sześć izolatów nie było monokulturami i ostatecznie zostały wykluczone z dalszych badań.

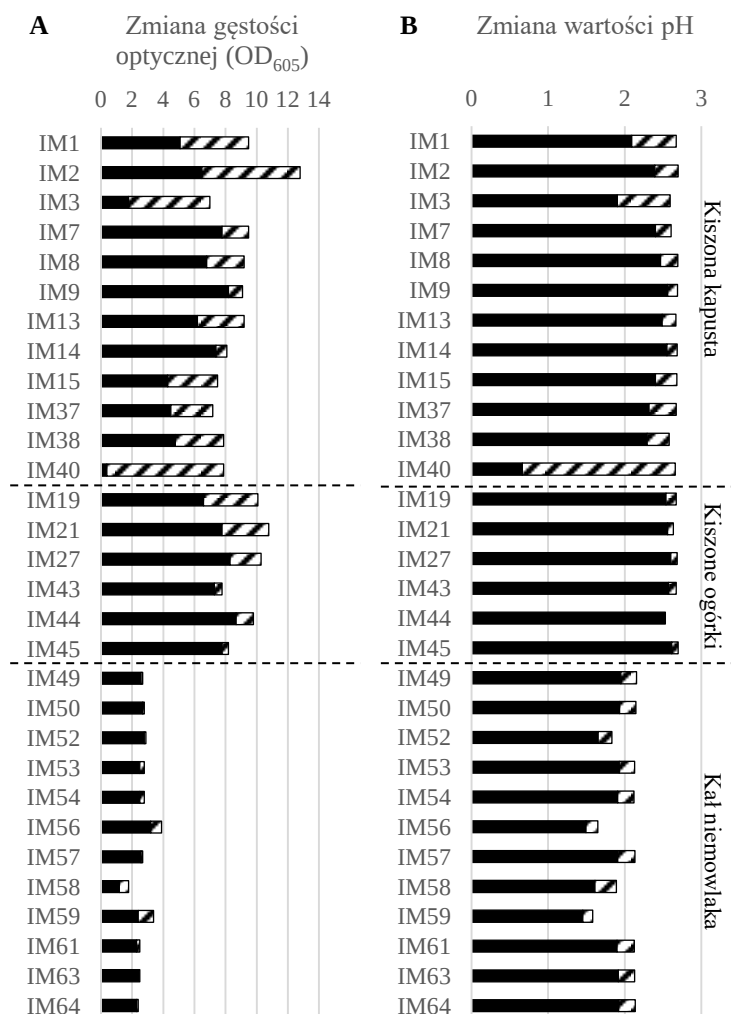
Melasa, jako produkt odpadowy po przetwórstwie trzciny cukrowej w przemyśle cukrowniczym, jest tanim składnikiem podłoży produkcyjnych wykorzystywanym w procesach namnażania biomoasy bakteryjnej lub w procesach syntezy cennych substancji w skali przemysłowej [Badal, 2006; Rodrigues i in., 2006; Gomaa i Rushdy, 2014]. Sacharoza oraz glukoza i fruktoza to główne źródła węgla dostarczane razem z melasą, a jej częste wykorzystanie w biotechnologii wynika również z obecności witamin i składników mineralnych wspomagających rozwój drobnoustrojów [Badal, 2006].

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że wszystkie izolaty są zdolne do wzrostu na 4% roztworze melasy. Wzrost wszystkich izolatów na 4% roztworze melasy, stanowiącej podłoże przemysłowe był nawet dziesięciokrotnie słabszy w porównaniu do rejestrowanego na podłożu MRS. Najmniejsze różnice pod tym względem wykazywały izolaty pozyskane z kału niemowlęcia. One również charakteryzowały się najlepszym wzrostem na tym podłożu, zwłaszcza IM58 i IM59. Izolat IM2, który wykazywał bardzo dobry wzrost na pożywce MRS, namnażał się dobrze na 4% roztworze melasy (Rys.1 i Rys. 2). Zakwaszanie podłoża składającego się z 4% roztworu melasy przez badane izolaty zachodziło mniej intensywnie niż w przypadku pożywki MRS (Rys. 1).



Rysunek 1. Porównanie zdolności szczepów izolowanych z różnych środowisk do wzrostu na 4% roztworze melasy trzcinowej (A) i jego zakwaszania (B)

Zmiany wartości po 24 godzinach oznaczono czarnymi słupkami; słupki pokryte deseniem przedstawiają dalszą zmianę wartości po 48 godzinach hodowli



Rysunek 2. Porównanie zdolności szczepów izolowanych z różnych środowisk do wzrostu na pożywce MRS (A) i jej zakwaszenia (B)

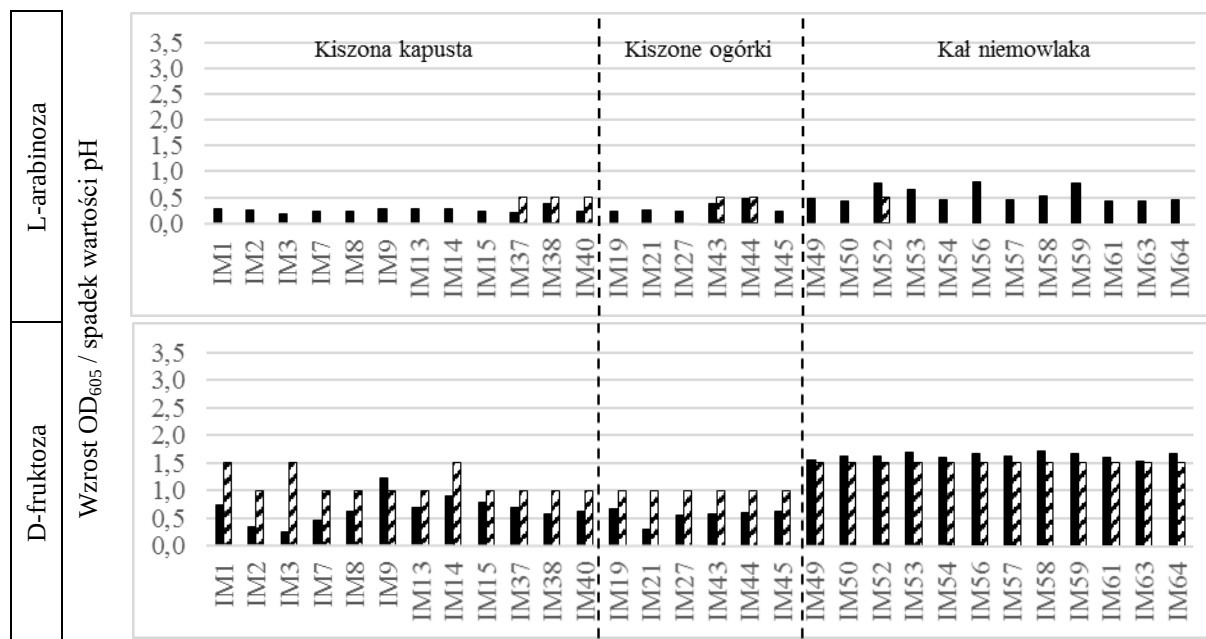
Zmiany wartości po 24 godzinach oznaczono czarnymi słupkami; słupki pokryte deseniem przedstawiają dalszą zmianę wartości po 48 godzinach hodowli

Pozyskane izolaty są zdolne do metabolizowania większości wybranych do badań źródeł węgla. Obserwowano brak zdolności szczepów izolowanych z kiszonek warzyw do wykorzystywania arabinozy i ksylozy. Są to cukry stanowiące składniki ścian komórkowych roślin [Ojima i Isawa, 1968]. Brak właściwości metabolicznych względem tych związków współgra z oceną kiszonek warzyw jako prawidłowo ukiszonych, czyli m. in. nie stwierdzono miękkości miąższu. Z wysokiego powinowactwa do testowanych tutaj składników hemicelulozowych znane są szczepy *Lactobacillus buchnerii*, których obecność w kiszonek warzywach może być przyczyną ich psucia [Franco i in., 2012].

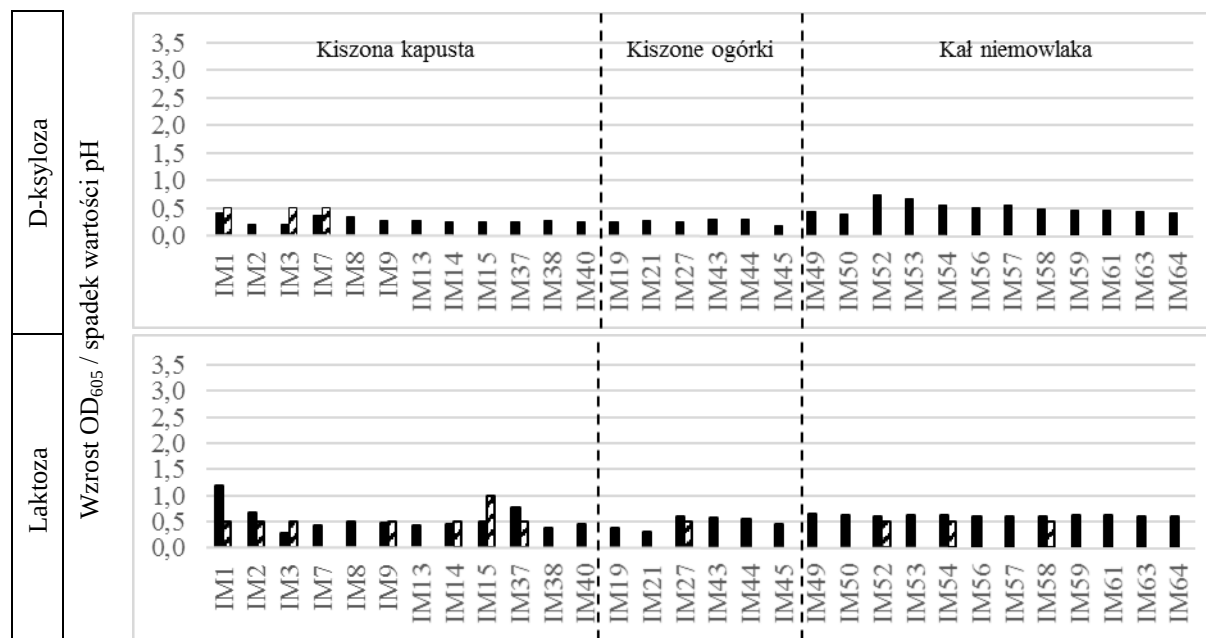
Najlepszym wzrostem na pożywkach zawierających różne źródła węgla charakteryzowały się izolaty pozyskane z kału niemowlęcia (Rys. 3). Pomimo efektywnego wzrostu na pożywkach zawierających różne źródła węgla, izolaty pozyskane z kału niemowlęcia nie wykazały równie uniwersalnej zdolności do syntezy kwasów, co pokazują wyniki pomiaru pH pożywki hodowlanej. Spośród pozostałych izolatów dobrym wzrostem wyróżniał się izolat IM1 (Rys. 3).

Zdolność szczepów izolowanych z kału niemowlęcia do metabolizowania D-fruktozy i sacharozy (Rys. 3a i 3c) korelują z obserwowaną zdolnością tych szczepów do wzrostu na podłożu produkcyjnym (Rys. 1), wyróżniając je od pozostałych szczepów, które nie wykazywały równie wydajnego metabolizmu cukrów typowych dla melasy trzcinowej.

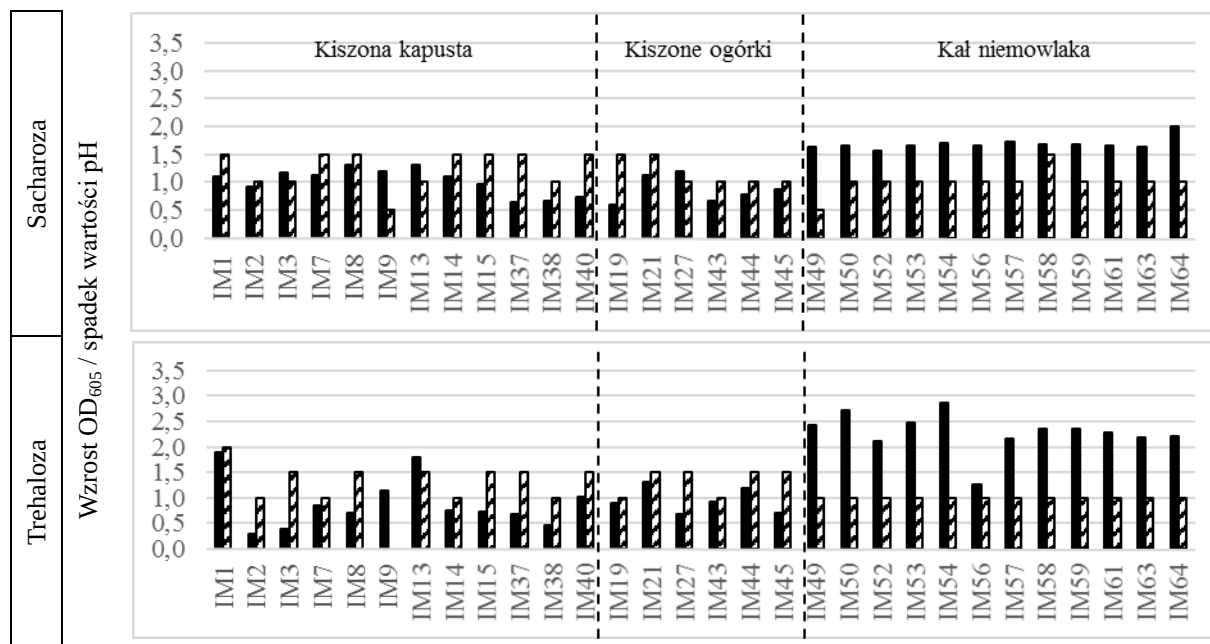
Większość szczepów LAB syntetyzuje substancje wykazujące działanie antagonistyczne względem bakterii chorobotwórczych i/lub grzybów pozwalające na zastosowanie ich jako naturalne konserwanty żywności, co z kolei przyczynia się nie tylko do zwiększenia trwałości artykułów spożywczych, ale przede wszystkim do poprawy bezpieczeństwa ich spożycia [Enan i in., 1996; Messnes i De Vuyst, 2002; Piasecka-Jóźwiak i in., 2014]. Najbardziej znanym metabolitem szczepów LAB jest kwas mlekowy. Obniża on pH środowiska ograniczając tym samym rozwój niekorzystnych drobnoustrojów [Gonzalez i in., 2007; Fiedurek, 2014]. Działanie przeciwbakteryjne przypisuje się także innym metabolitom LAB, takim jak kwas octowy, ditlenek węgla, nadtlenuk wodoru, diacetyl czy etanol [De Vuyst i Vandamme, 1994; Kraszevska i in., 2005; Trafalska i Grzybowska, 2009; Fiedurek, 2014]. Liczne badania wskazują również na zdolność pewnych szczepów LAB do syntezy bakteriocyn oraz ich antybakteryjny charakter [Ammor i in., 2006; Corsetti i in., 2008; Sip i in., 2012], w szczególności wobec gatunków *L. monocytogenes*, *S. aureus* czy bakterii należących do rodzaju *Clostridium* [Messens i De Vuyst, 2002; Gwiazdowska i Trojanowska, 2005].



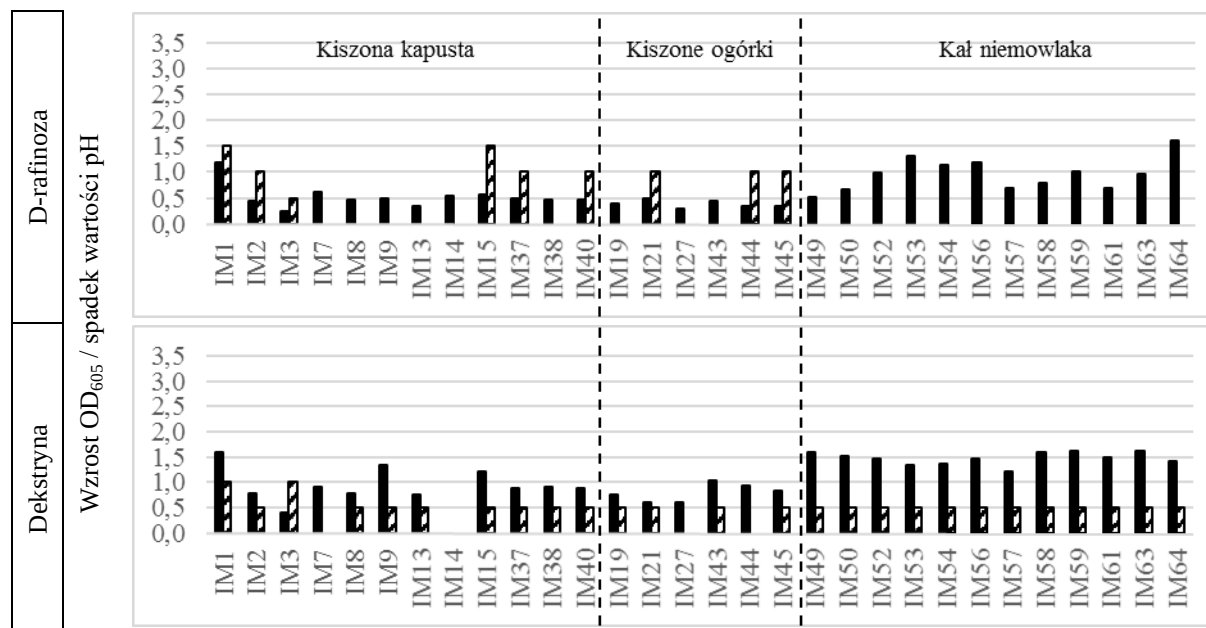
Rysunek 3a. Porównanie zdolności szczepów izolowanych z różnych środowisk do wykorzystywania różnych źródeł węgla
Czarne słupki – zdolność do wzrostu (wzrost wartości OD_{605}); słupki pokryte deseniem – zdolność do syntezy kwasów organicznych (spadek wartości pH)



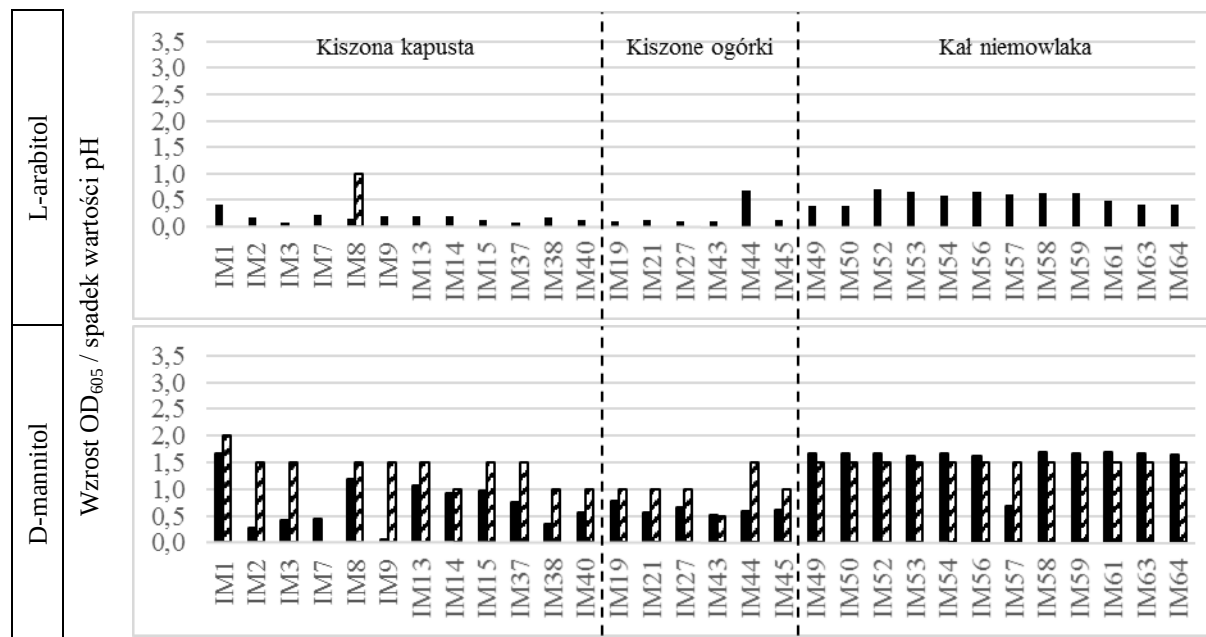
Rysunek 3b. Porównanie zdolności szczepów izolowanych z różnych środowisk do wykorzystywania różnych źródeł węgla
Czarne słupki – zdolność do wzrostu (wzrost wartości OD₆₀₅); słupki pokryte deseniem – zdolność do syntezy kwasów organicznych (spadek wartości pH)



Rysunek. 3c. Porównanie zdolności szczepów izolowanych z różnych środowisk do wykorzystywania różnych źródeł węgla
Czarne słupki – zdolność do wzrostu (wzrost wartości OD₆₀₅); słupki pokryte deseniem – zdolność do syntezy kwasów organicznych (spadek wartości pH)



Rysunek 3d. Porównanie zdolności szczepów izolowanych z różnych środowisk do wykorzystywania różnych źródeł węgla
Czarne słupki – zdolność do wzrostu (wzrost wartości OD₆₀₅); słupki pokryte deseniem – zdolność do syntezy kwasów organicznych (spadek wartości pH)



Rysunek 3e. Porównanie zdolności szczepów izolowanych z różnych środowisk do wykorzystywania różnych źródeł węgla
Czarne słupki – zdolność do wzrostu (wzrost wartości OD₆₀₅); słupki pokryte deseniem – zdolność do syntezy kwasów organicznych (spadek wartości pH)

Do oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybrano szczepy reprezentujące siedem gatunków bakterii, cztery należące do Gram-dodatnich (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. butyricum*, *E. faecalis*) i trzy Gram-ujemne (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*). W efekcie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że większość izolatów wykazywała aktywność względem przynajmniej jednego z wybranych do badań szczepów bakterii patogennych (Rys. 4). Jest to stosunkowo dobry wynik zważywszy na częstotliwość izolacji szczepów LAB o szerokim zakresie aktywności wobec zróżnicowanych gatunkowo szczepów stanowiących czynniki chorobotwórcze lub przyczyniających się do psucia żywności. Przykładowo Albano i in. [2007] na 226 izolatów, tylko dla 14 z nich wykazali zdolność do hamowania wzrostu *L. monocytogenes*. Natomiast żaden ze zbadanych przez autorów izolatów nie hamował wzrostu bakterii Gram-ujemnych. Gonzalez i in. [2007] przetestowali 24 izolaty LAB, z których tylko cztery hamowały wzrost *L. monocytogenes*, a osiem z nich wykazywało aktywność skierowaną przeciwko *S. aureus*.

W badaniach stanowiących przedmiot tej pracy najlepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazano dla izolatów IM7, IM9, IM14, IM27, IM37, IM43 i IM44. Najslabsze właściwości przeciwko wybranym patogenom wykazano natomiast dla izolatów IM1, IM3, IM15, IM40 oraz wszystkich szczepów wyizolowanych z kału niemowlęcia. Patogenem, którego wzrost był hamowany przez największą liczbę izolatów był gatunek *L. monocytogenes*, a patogenem, wobec którego antagonistyczny wpływ miała najmniejsza liczba izolatów był gatunek *C. butyricum*. Wzrost *C. butyricum* był hamowany wyłącznie przez izolaty oznaczone IM9 i IM43.

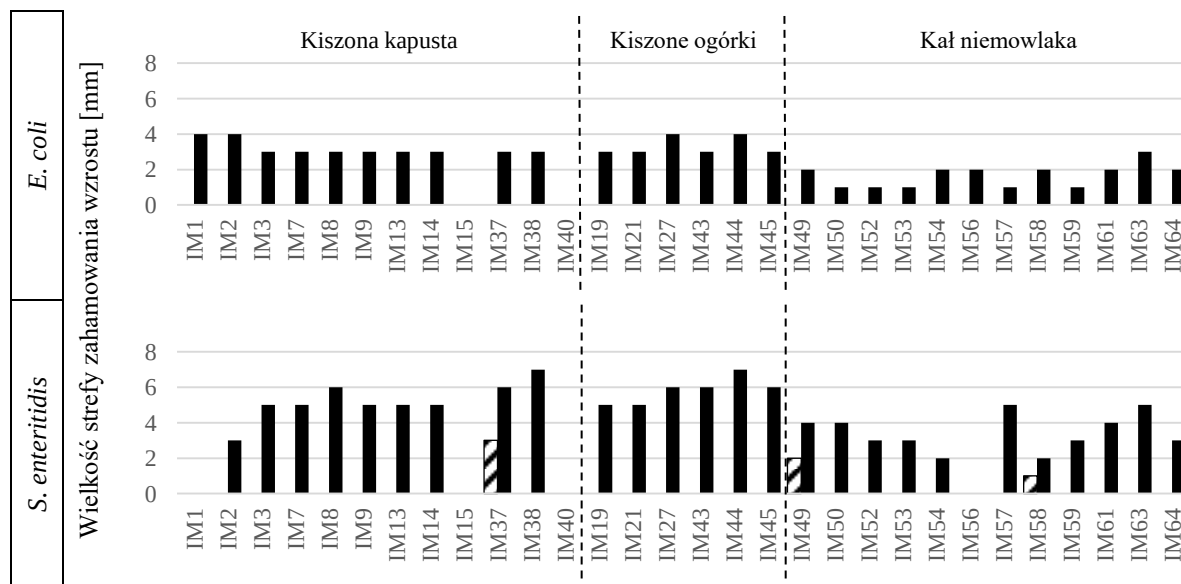
Udokumentowane tutaj działanie bakteriostatyczne wobec bakterii Gram-ujemnych przez szczepy LAB jest zjawiskiem stosunkowo rzadko opisywanym w literaturze [Albano i in., 2007]. Messnes i De Vuyst [2002] stwierdzili, że szczepy LAB częściej wykazują antagonizm wobec bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych, co wynika z posiadania przez te ostatnie zewnętrznej błony komórkowej. Alakomii i in. [2000] w swojej pracy sugerują, że za działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych odpowiedzialny jest między innymi kwas mlekowy, natomiast rzadziej są to bakteriocyny.

Spośród analizowanych izolatów wytypowano 15 reprezentantów każdego środowiska izolacji, jednocześnie wyróżniających się zestawem najbardziej korzystnych cech. Szczepy te zostały poddane różnicowaniu molekularnemu, a uzyskane w ten sposób wzory RAPD wskazywały na małe zróżnicowanie wyselekcjonowanych szczepów. Porównując otrzymane fingerprinty wyodrębniono sześć grup różnych wzorów RAPD: wzór I (IM1, IM9, IM21, IM27); wzór II (IM2, IM14); wzór III (IM43); wzór IV (IM44); wzór V (IM7); wzór VI (IM50, IM53, IM58, IM59, IM63). Należy jednak zwrócić uwagę, że pomiędzy wzorami I, II i IV występują stosunkowo małe różnice.

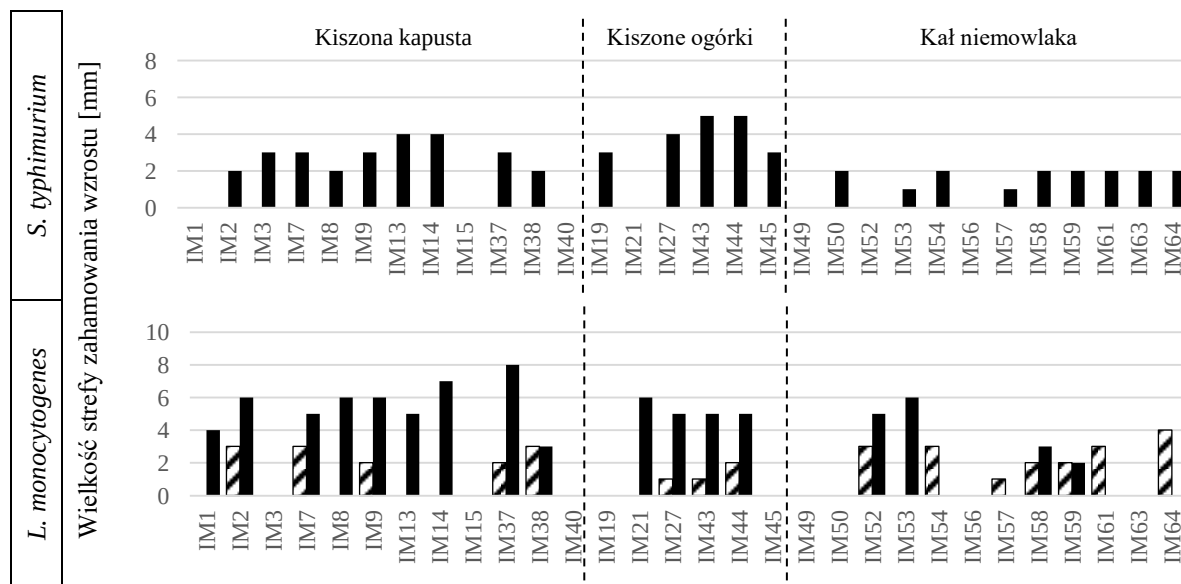
Warto również zwrócić uwagę na podobieństwo RAPD-wzorów między szczepami IM1/9 i IM21/27, które były izolowane odpowiednio z kiszzonej kapusty i kiszonych ogórków, co wskazuje, że oba produkty mogły zostać poddane fermentacji w tym samym miejscu, a omawiane drobnoustroje charakteryzują się zdolnością do ukierunkowywania procesu zakiszania różnych surowców. Szczep IM43 charakteryzuje się zupełnie odmiennym profilem prążków. Szczep IM7 również generuje unikatowy wzór.

Analiza szczepów izolowanych z kału wskazuje na zupełną ich homologię genomową, co jest podstawą do wysnucia wniosku o jednakowej przynależności gatunkowej tych mikroorganizmów. Ponieważ omawiane szczepy charakteryzowały się różnym zakresem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, można przypuszczać, że są to różne szczepy jednego gatunku.

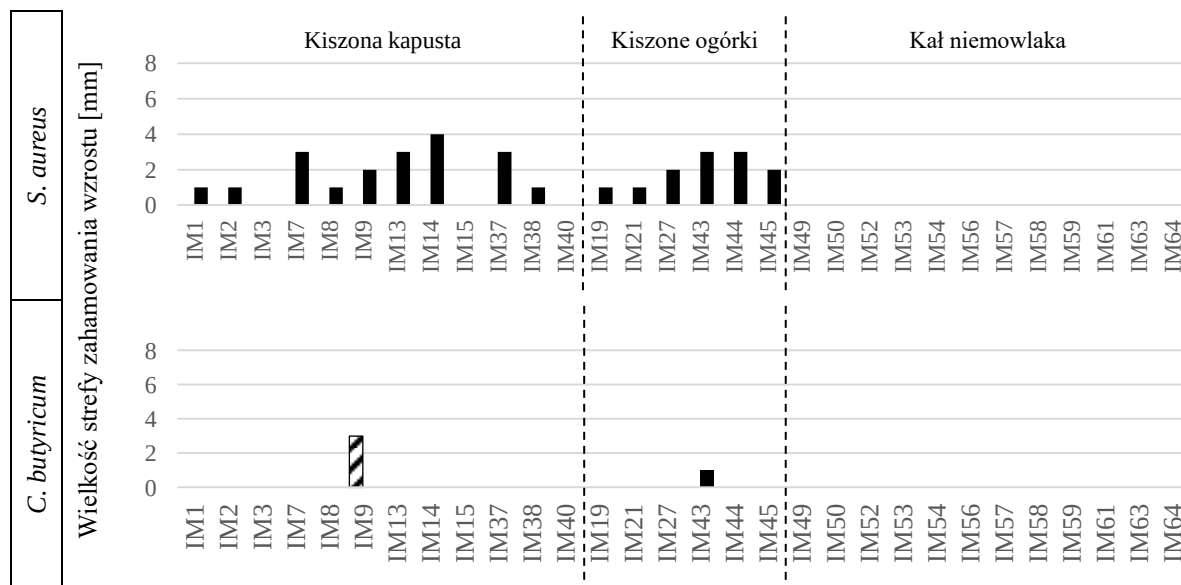
Identyfikacja gatunkowa oparta o analizę porównawczą sekwencji genu 16S rDNA doprowadziła do zaklasyfikowania szczepów wzoru VI do gatunku *Enterococcus faecalis*, a szczep IM7 do gatunku *Pediococcus pentosaceus*. Pozostałe szczepy zostały wstępnie zidentyfikowane jako *Lactobacillus plantarum*, co zostało również potwierdzone wynikami reakcji wykrywającej swoisty DNA w obrębie genu *recA* (dane niepublikowane). Szczepy *L. plantarum* stanowią jeden z częściej obecnych gatunków LAB w fermentowanych produktach spożywczych [Cocolin i in., 2006; Zawadzka i in., 2009]. Zjawisko to jest niewątpliwie związane z wysoką zdolnością adaptacyjną bakterii tego gatunku do warunków środowiskowych oraz ich kluczową rolą w procesie fermentacji mlekowej. Szczepy z rodzaju *Enterococcus*, obok bifidobakterii, są najczęściej izolowaną grupą mikroorganizmów z kału niemowlęcia nawet do trzeciego miesiąca życia [Fanaro i in., 2003].



Rysunek 4a. Porównanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych szczepów izolowanych z różnych środowisk
Czarne słupki – aktywność zawiesiny szczepów (pożywka+biomasa); słupki pokryte deseniem – aktywność supernatantu

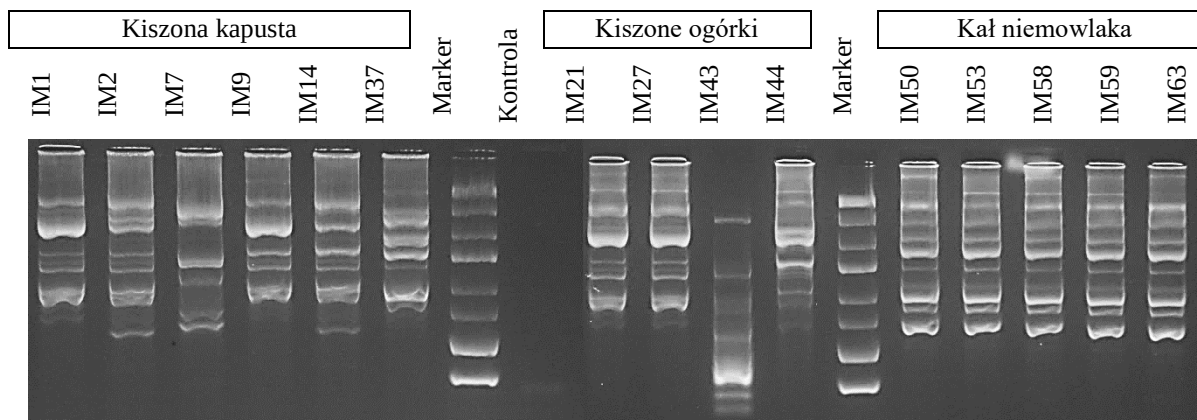


Rysunek 4b. Porównanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych szczepów izolowanych z różnych środowisk
Czarne słupki – aktywność zawiesiny szczepów (pożywka+biomasa); słupki pokryte deseniem – aktywność supernatantu



Rysunek 4c. Porównanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych szczepów izolowanych z różnych środowisk

Czarne słupki – aktywność zawiesiny szczepów (pożywka+biomasa); słupki pokryte deseniem – aktywność supernatantu



Rysunek 5. RAPD-wzory szczepów izolowanych z różnych środowisk

Opis prążków w markerze (od góry) [pz]: 5000, 3000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300

Wnioski

Zalewa z prawidłowo ukiszonych warzyw lub kał niemowlęcy są dobrymi środowiskami izolacji szczepów o potencjale biotechnologicznym. Wśród szczepów wyizolowanych w toku opisanych badań, wyselekcjonowane zostały szczepy wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową o szerokim spektrum oddziaływania oraz szczepy zdolne o potencjalnie dużych zdolnościach adaptacyjnych dzięki umiejętności wykorzystywania różnych źródeł węgla. Na szczególną uwagę zasługuje *L. plantarum* IM9 wyizolowany z zalewy po kiszeniu kapusty, który charakteryzował się dobrym wzrostem na melasie oraz bardzo dobrymi zdolnościami bakteriostatycznymi ukierunkowanymi wobec wszystkich przebadanych patogenów łącznie z *C. butyricum*. Szczep *L. plantarum* IM2, poza aktywnością przeciwdrobnoustrojową, wydajnie namnaża się na pożywce 4% roztworze melasy trzcinowej.

Literatura

- Albano H., Oliveira M., Aroso R., Cubero N., Hogg T., Teixeira P., Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from 'Alheiras' (traditional Portuguese fermented sausages): *In situ* assays. *Meat Science*, 2007, 76, 796-800.
- Alakomii H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandolm T., Latva-Kala K., Helander I.M., Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66, 2001-2005.
- Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I., Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 2—Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, 2006, 17 (6), 462-468.
- Babuchowski A., Wzorek W., Technologie fermentacyjne. W: Bednarski W., Reps A., *Biotechnologia żywności*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2003.
- Badal C.S., A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72, 676-680.
- Chabłowska B., Piasecka-Joźwiak K., Stecka K., Rola drobnoustrojów w produkcji żywności. Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa, 2009.
- Cocolin L., Urso R., Rantsiou K., Cantoni C., Comi G., Multiphasic approach to study the bacterial ecology of fermented sausages inoculated with a commercial starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72, 942-945.
- Corsetti A., Settanni L., Braga T.M., de Fatima Silva Lopes M., Suzzia G., An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. *LWT - Food Science and Technology*, 2008, 41 (7), 1173-1182.

- De Vuyst L., Vandamme E.J., Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst L., Vandamme E.J. (red.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, Wydanie I, Blackie Academic and Professional, London, 1994.
- Enan G., El-Essawy A.A., Uyttendaele M., Debevere J., Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UGI isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG 1. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 30, 189-215.
- Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V., Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica*, 2003, 441, 48-55.
- Fiedurek J., *Mikrobiom a zdrowie człowieka*, Wydanie I, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, 2014.
- Franco W., Pérez-Díaz I.M., Johanningsmeier S.D., McFeeters R.F., Characteristics of Spoilage-Associated Secondary Cucumber Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (4), 1273–1284.
- Gomaa E.Z., Rushdy A.A., Improvement of *Lactobacillus brevis* NM101-1 grown on sugarcane molasses for mannitol, lactic and acetic acid production. *Annals of Microbiology*, 2014, 64, 983–990.
- Gonzalez L., Sandoval H., Sacristan N., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E., Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 2007, 18, 716-722.
- Grajeta H., Żywność funkcjonalna w profilaktyce chorób układu krążenia. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2004, 13 (3), 503-510.
- Gwiazdowska D., Trojanowska K., Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, 2005, 1 (68), 114-130.
- Jach M., Łoś R., Maj M., Malm A., Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Postępy Mikrobiologii*, 2013, 52 (2), 161-170.
- Kraszewska J., Wzorek W., Sztando E., Wybrane właściwości probiotyczne szczepów *Lactobacillus plantarum* i możliwości ich wykorzystania w produkcji bioaktywnych napojów słodowych. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 4 (1), 27-38.
- Trafalska E., Grzybowska K., Probiotyki - alternatywa dla antybiotyków? *Wiadomości Lekarskie*, 2004, 57 (9/10), 491-498.
- Lutyńska A., Augustynowicz E., Wiatrzyk A., Problemy stosowania suplementów diety zawierających probiotyki. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2012, 93 (3), 493-498.
- Messens W., De Vuyst L., Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 72, 31-43.
- Nowak M., Trziszka T., Szołtysik M., Preferencje konsumentów mlecznych napojów fermentowanych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2007, 50 (1), 77-83.

Ojima K., Isawa T., The variation of carbohydrates in various species of grasses and legumes. *Canadian Journal of Botany*, 1968, 46 (12), 1507-1511.

Piasecka-Józwiak K., Świątek M., Chabłowska B., Wykorzystanie przeciwgrzybowych właściwości szczepów bakterii fermentacji mlekowej do biokonserwacji żywności. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 2014, 47, 64-71.

Reps A., *Biotechnologia składników żywności*. W: Bednarski W., Reps A., *Biotechnologia żywności*, Wydanie I, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2003.

Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Oliveira R., Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 32, 135–142.

Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W., Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*, 2012, 26 (1), 117-124.

Trojanowska K., Giebel H., Gołębiowska B., *Mikrobiologia żywności*, Wydanie IV, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2009.

Tynkkynen S., Satokari R., Saarela M., Mattila-Sandholm M., Saxelin M., Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65, 3908–3914.

Vishnu C., Seenayya G., Reddy G., Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, 18, 429-433.

Zawadzka-Skomiał J., Piasecka-Józwiak K., Kotyrba D., Chabłowska B., The application of molecular methods to identification and differentiation lactic acid bacteria strains with the practical significance. *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, 2009, 64, 13-28.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W., A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 2000, 7, 203-14.

NATALIA RADOMSKA, MARIUSZ TICHONIUK, RYSZARD CIERPISZEWSKI

Katedra Towaroznawstwa i Ekologii Produktów Przemysłowych

Wydział Towaroznawstwa

Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

natalia.krysinska@ue.poznan.pl

KONSTRUKCJA WSKAŹNIKA ŚWIEŻOŚCI ŻYWNOŚCI PRZEZNACZONEGO DO WYKORZYSTANIA W OPAKOWANIACH INTELIGENTNYCH

Streszczenie

Stale rosnąca potrzeba zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności przyczynia się do pojawiania się innowacyjnych technologii pakowania produktów spożywczych i nowych sposobów przedłużania ich trwałości. Do tego rodzaju rozwiązań zaliczane są opakowania inteligentne. Opakowania te cechują się zdolnością do monitorowania stanu zapakowanej żywności lub środowiska, w którym się ona znajduje, poprzez dostarczanie informacji na temat różnych czynników obecnych w jej bezpośrednim otoczeniu. Stosowane w opakowaniach inteligentnych wskaźniki umożliwiają między innymi monitorowanie świeżości zapakowanego artykułu spożywczego. Prowadzone badania mają na celu skonstruowanie wskaźnika świeżości żywności, który mógłby zostać wykorzystany w opakowaniach inteligentnych. W pracy oceniono działanie poszczególnych elementów konstrukcji wskaźnika świeżości żywności, opartego na chemicznych wskaźnikach pH, który może być zastosowany w nowoczesnych opakowaniach do produktów spożywczych. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż opracowany wskaźnik poprzez zmianę swojego zabarwienia jest w stanie informować o stopniu świeżości produktów, które podczas psucia wydzielają lotne związki aminowe (np. amoniak, trimetyloaminę, dimetyloaminę).

Słowa kluczowe: wskaźniki świeżości, bezpieczeństwo, jakość, żywność

Wprowadzenie

Bezpieczeństwo żywności stanowi jedno z ważniejszych zagadnień przemysłu spożywczego zarówno dla producentów, dystrybutorów, jak i konsumentów. Produkty spożywcze są szczególnie podatne na psucie się w wyniku niewłaściwie prowadzonych procesów dystrybucji oraz przechowywania [Nychas i in., 2008; Kodogiannis i in., 2014]. Zmiany w produkcie mogą zachodzić w wyniku reakcji chemicznych, fizycznych oraz być spowodowane rozwojem niepożądanych mikroorganizmów. Obecność niekorzystnych drobnoustrojów prowadzi do powstawania lotnych związków takich jak: aminy, amoniak, ditlenek węgla, kwas octowy oraz siarkowodór, co często wiąże się z pogorszeniem właściwości sensorycznych i odżywczych przechowywanego produktu [Dilbaghi i Sharma, 2007; Pacquit i in., 2007]. Wspomniane substancje mogą być wykorzystane do monitorowania jakości żywności za pomocą tzw. opakowań inteligentnych. Nowy rodzaj opakowań jest wyposażony w wskaźniki reagujące z wyżej wymienionymi związkami zmieniając zabarwienie (rys.1).



Rysunek 1. Zastosowanie wskaźnika świeżości z wykorzystaniem filmu z polianiliny (PANI) w opakowaniach inteligentnych [Kuswandii in., 2012]

Wskaźnik w opakowaniu może być zastosowany w postaci małej saszetki lub wkładki umieszczonej w takim miejscu, aby był dobrze widoczny dla konsumenta z zewnątrz oraz by miał kontakt z wytwarzającą się atmosferą wewnątrz opakowania. W celu zapewnienia skuteczności działania wskaźnika powinien składać się on z kilku podstawowych elementów [Pereira de Abreu i in., 2012]. Wskaźnik zbudowany jest przede wszystkim z substancji, która będzie reagowała na uwalnianie produktów powstające w procesie psucia się żywności (wskaźnik, indykator chemiczny pH), matrycy (w której wszystkie elementy są umieszczone), rozpuszczalnika oraz substancji dodatkowych takich, jak związki podwyższające lub obniżające poziom pH oraz humektanty mające za zadanie zapewnienie odpowiedniej wilgotności. Indykator chemiczny pH powinien być dobrany w taki sposób, aby pozwolił na zaobserwowanie reakcji barwnych zachodzących w wyniku zmian pH, które są spowodowane przedostawaniem się do jego wnętrza lotnych związków rozkładu żywności. Jako wskaźniki chemiczne wykorzystywane są najczęściej związki takie jak błękit bromotymolowy, czerwień metylowa, zieleń bromokrezolowa, purpura bromokrezolowa, [Nopwinyuwong i in., 2010; Kuswandi i in., 2013a]. Dobór nośnika uzależniony jest również od rodzaju wykrywanych produktów rozkładu żywności. W tym celu najczęściej wykorzystywane są chemicznie modyfikowane celulozy oraz matryce poliamidowe [Kuswandi i in., 2013a]. Jako rozpuszczalnik najczęściej wykorzystywana jest woda lub alkohol (np. alkohol etylowy). Odpowiedni poziom pH środowiska reakcji wewnątrz wskaźnika może zostać osiągnięty poprzez dodatek związków alkalizujących (np. wodorotlenki) lub zakwaszających (np. mocne kwasy). Poziom pH środowiska powinien być dobrany w taki sposób, aby ułatwiał on obserwację pochłaniania przez wskaźnik świeżości docelowych lotnych produktów rozkładu żywności, co może być sygnalizowane przez zmianę barwy użytego w kompozycji chemicznego wskaźnika pH [Patent US 2010/0224508]. Zmiana zabarwienia wskaźnika powinna być widoczna i jednocześnie skorelowana ze zmianami jakości opakowanego produktu [Kuswandi i in., 2011]. Aby zachować wysoką sprawność całego układu należy utrzymać odpowiedni poziom wilgotności wskaźnika. W tym celu do wskaźnika wprowadzane są tzw. humektanty, czyli substancje silnie higroskopijne pozwalające utrzymać wysoką zawartość wody we wskaźniku. W tym celu stosowane mogą być m.in. glikole lub gliceryna. Wskaźnik świeżości żywności reagujący na zmiany pH spowodowane wydzielaniem się lotnych metabolitów rozkładu żywności powinien być odpowiednio dopasowany do rodzaju

produktu, z jakim będzie on zapakowany. Powinno się uwzględniać naturalne pH produktu oraz charakterystyczne związki wydzielane w procesie psucia [Kuswandi i in., 2013a].

Konsumenci wybierając produkt spożywczy kierują się nie tylko jego ceną, ale również jego świeżością i jakością. Coraz większa świadomość konsumentów oraz rosnące wymagania dotyczące bezpieczeństwa żywności przyczyniają się do prób opracowania praktycznych wskaźników, które pozwolą określić jakość i świeżość produktów żywnościowych oraz będą wskazywać realny okres przydatności produktów do spożycia [Nychas i in., 2008]. Informacja o stanie, w jakim znajduje się produkt podawana jest najczęściej na jego opakowaniu w postaci zamieszczenia daty przydatności do spożycia. Zdarzają się czasem sytuacje, iż żywność psuje się, mimo że data trwałości jeszcze tego nie wskazuje. Sytuacja taka może mieć miejsce w wyniku niewłaściwego przechowywania produktu. Z prowadzonych badań wynika, że w krajach południowej części Europy aż 20% mrożonej żywności jest przechowywana w domach w temperaturze 10°C [Kennedy i in., 2005; Gawęcki i Mossor–Pietraszewska, 2008]. Aby temu zapobiec można wykorzystać opakowania wyposażone we wskaźniki świeżości żywności, które mogą w aktywny sposób monitorować stan zapakowanej żywności i jej świeżość.

Celem prowadzonych badań było skonstruowanie wskaźnika świeżości żywności, który może być wykorzystany w nowoczesnych opakowaniach produktów spożywczych (w opakowaniach inteligentnych). Wskaźnik powinien umożliwić określenie jakości i świeżości, a co za tym idzie bezpieczeństwa produktów żywnościowych oraz wskazania realnego okresu przydatności produktów do spożycia. Opracowany układ wskaźnika świeżości, poprzez zmianę swojego zabarwienia pozwala na szybką wizualną ocenę stanu zapakowanych produktów spożywczych.

Material i metody

W ramach prowadzonych badań wykorzystane zostały następujące odczynniki chemiczne: hydroksyetyloceluloza (średnia masa cząsteczkowa ok. 250000 g/mol), polioksyetylenoglikol - polikol 400 (PEG9), polioksyetylenoglikol - polikol 1500 (PEG34), gliceryna bezwodna (Gli), czerwień metylowa (MR), błękit bromotymolowy (BR), kwas solny (0,1 M wodny roztwór), alkohol etylowy (96% (v/v) wodny roztwór), woda destylowana, amoniak (5% (v/v) wodny roztwór).

W celu opracowania wyników badań zastosowano następujące oprogramowanie: GIMP 2.8 (GNU Image Manipulation Program), ColorMine RGB-Lab calculator, OriginLab 8, MsWord i MsExcel (MsOffice 2007).

W badaniach oddziaływania wskaźnika z lotnymi aminami powstającymi w trakcie psucia się żywności wykorzystano układ modelowy jednej z reakcji zachodzących podczas rozkładu wysokobiałkowych produktów spożywczych tj. oceniano działanie lotnych par 5% roztworu amoniaku na skonstruowany wskaźnik. Wyniki oddziaływania tj. zmiany zabarwienia wskaźnika utrwalano przy użyciu aparatu cyfrowego Canon PowerShot G10. Oznaczenie odbywało się w specjalnie przygotowanej w tym celu komorze oświetlonej rozproszonym sztucznym światłem przy zachowaniu powtarzalnych warunków wykonywania fotografii płytek z próbkami wskaźnika.

Zdjęcia próbek wskaźników opracowywano za pomocą programu graficznego GIMP 2.8. Uśredniona barwa wskaźnika przedstawiana była w systemie barw RGB i następnie była

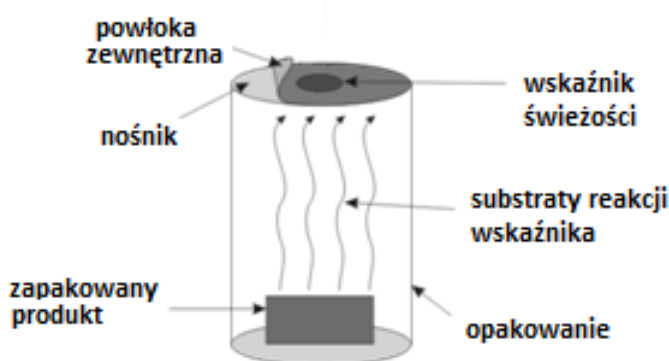
przeliczana na wartości w przestrzeni barw systemu Lab (za pomocą programu ColorMine). W przestrzeni barw Lab, wartość L określa jasność barwy w zakresie od 0 (barwa czarna) do 100 (barwa biała). Wartości a i b określają ton oraz nasycenie barwy [Oszmiański, 2002]. W celu określenia zmian, jakie zachodziły podczas reakcji wskaźnika świeżości z oparami amoniaku, posłużono się opracowanym przez Roberta W.G. Hunta parametrem różnicy barw TCD (ang. *Total Colour Difference*). Zmiana barwy, obliczana była na podstawie poniższego wzoru [Hunt, 1991]:

$$TCD = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

gdzie: ΔL , Δa i Δb - zmiany parametru barwy (Lab) ocenianej względem parametrów barwy (Lab) odniesienia

Zachodzące zmiany barwy, które odpowiadają wartościom parametru TCD większym niż 5,0 są dostrzegalne dla nieuzbrojonego oka. Wyraźnym zmianom barwy z jednej w drugą odpowiadają wartości parametru TCD przekraczające wartość 12,0 [Nopwinyuwong i in., 2010]. Oznaczenia były trzykrotnie powtarzane, a otrzymane wartości TCD odznaczały się współczynnikiem zmienności (RSD) nieprzekraczającym 5%.

Konstrukcja wskaźnika świeżości żywności opiera się głównie na wskaźniku pH unieruchomionym w opakowaniu, który może oddziaływać ze związkami uwalnianymi podczas trwającego procesu psucia się produktu. Główna warstwa powłoki chroni przed czynnikami zewnętrznymi (rys. 2).



Rysunek 2. Schemat wskaźnika świeżości żywności w opakowaniu inteligentnym [opracowanie własne]

Wskaźnik ten składa się z elementu rozpoznającego (barwnik pH - czerwień metylowa [MR], błękit bromotymolowy [BB] bądź ich mieszanina [MR/BB]), nośnika (hydroksyetyloceluloza), rozpuszczalnika (woda destylowana), substancji optymalizującej wartość pH (0,5 M wodny roztwór HCl), humektantu (PEG9, PEG34 lub gliceryna) [Krysińska i in., 2013].

Wyniki i dyskusja

Zrealizowane badania wstępne dotyczyły wyboru oraz oceny działania podstawowych elementów składowych wskaźnika świeżości żywności opartego na chemicznych indykatorach pH.

Badany układ przygotowano na podstawie zebranych danych literaturowych oraz wcześniejszych badań wstępnych jego przydatności do wykorzystania we wskaźnikach świeżości opartych na zmianach pH wywołanych lotnymi aminami powstającymi podczas psucia się produktów żywnościowych, takich jak np. drób, mięso, ryby i owoce morza [Heising i in., 2012; Krysińska i in., 2013; Kuswandi i in., 2013b]. Ocenione zostały wybrane składniki wskaźnika takie, jak barwniki (czerwień metylowa, błękit bromotymolowy oraz ich mieszanina), humektanty (poliglikol 400, poliglikol 1500 i gliceryna) oraz różny dodatek roztworu HCl obniżającego poziom pH roztworu mieszaniny reakcyjnej wskaźnika. Oceniano wpływ 2,6 mM, 2,75 mM, 3,0 mM oraz 3,5 mM roztworu HCl w mieszaninie wskaźnika. Badania przeprowadzono w warunkach modelowych, gdzie ulatniające się produkty rozkładu żywności bogatej w białko imitował 5% wodny roztwór amoniaku. W ten sposób zapewnione zostały powtarzalne warunki działania wskaźnika, skupiając się na wpływie jego kompozycji na mechanizm działania.

Biorąc pod uwagę wpływ dodatku HCl na działanie wskaźnika wyniki przedstawiono w tabelach poniżej.

Tabela 1. Wyniki pomiaru barwy dla wskaźnika zawierającego czerwień metylową MR, humektant PEG9, bez dodatku HCl

Pomiar barwy	Wyschnięte próbki	Początek	1 minuta	3 minuty	5 minut	7 minut	10 minut	15 minut
L	61,85	68,33	67,21	67,08	67,57	68,17	69,55	71,46
a	18,05	7,2	5,74	5,15	5,63	4,89	4,42	4,52
b	38,21	42,5	41,01	41,85	41,47	42,72	41,93	41,93
TCD	-	13,3	13,7	14,4	14,1	15,3	16,1	16,1

Tabela 2. Wyniki pomiaru barwy dla wskaźnika zawierającego czerwień metylową MR, humektant PEG9 oraz 2,6 mM roztworu HCl w mieszaninie wskaźnika

Pomiar barwy	Wyschnięte próbki	Początek	1 minuta	3 minuty	5 minut	7 minut	10 minut	15 minut	20 minut	30 minut
L	63,07	52,42	66,19	70,25	63,87	68,2	65,63	64,41	70,99	74,02
a	30,70	26,5	20,35	10,92	8,07	7,09	7,49	7,16	6,07	6,37
b	29,43	29,93	31,7	35,78	35,17	35,56	34,82	34,79	37,13	36,47
TCD	-	11,5	11,0	22,0	23,4	24,9	24,0	24,2	27,0	27,6

Tabela 3. Wyniki pomiaru barwy dla wskaźnika zawierającego czerwień metylową MR, humektant PEG9 oraz 3,0 mM roztworu HCl w mieszaninie wskaźnika

Pomiar barwy	Wyschnięte próbki	Początek	1 minuta	3 minuty	5 minut	7 minut	10 minut	15 minut	20 minut	30 minut
L	50,26	42,12	53,51	62,16	63,31	61,54	61,1	62,53	70,52	60,83
a	60,66	55,01	46,08	20,23	11,39	8,93	7,11	5,13	4,96	7,60
b	33,79	35,61	38,97	45,41	46,9	46,1	45,97	47,4	49,13	64,16
TCD	-	10,1	15,8	43,7	52,6	54,4	56,0	58,5	61,2	62,0

W przypadku kompozycji wskaźnika świeżości opartej na czerwieni metylowej (MR) i humektancie polikolu 400 (PEG9) zaobserwowano wyraźnie, iż zwiększający się dodatek 0,5 M roztworu HCl, a co za tym idzie coraz niższy poziom pH mieszaniny powodował coraz większe różnice w barwie wskaźnika w wyniku jego kontaktu z parami amoniaku. Najmniejszy (2,6 mM) dodatek roztworu kwasu zapewniał wysoką wartość wyznaczanego parametru TCD charakteryzującego działanie wskaźnika świeżości. Już po 3 minutach oddziaływania z parami NH_3 parametr ten przekraczał wartość 20 (tab. 2). Wartość TCD w wariancie z dodatkiem 3,0 mM roztworu HCl w mieszaninie wskaźnika po 3 minutach wynosiła prawie 44 (tab. 3). Brak dodatku roztworu kwasu solnego powodował znaczenie mniejsze zmiany barwy nawet po 15 minutach oddziaływania wskaźnika z parami 5% roztworu amoniaku. Po tym czasie wartość parametru TCD wynosiła 16,1 (tab. 1).

W kolejnym etapie badań sprawdzona została reakcja wskaźnika świeżości, opartego na związkach chemicznych wrażliwych na zmianę pH, wywołana lotnymi produktami rozkładu mięsa ryb. Ocenie została poddana zdolność opracowanego wskaźnika do sygnalizowania zachodzących zmian w psującym się mięsie ryby (w tym przypadku

w świeżym filecie śledzia). Poniżej w tabeli 4 przedstawione zostały wyniki dla jednej z bardziej obiecujących mieszanin wskaźnika świeżości. Tabela zawiera wyniki pomiaru barwy dla wskaźnika zawierającego mieszaninę czerwieni metylowej (MR) i błękitu bromotymolowego (BB), humektant PEG9 oraz dodatek roztworu HCl (o stężeniu końcowym 3,5 mM). Wskaźnik z próbką ryby przechowywano w warunkach chłodniczych w temperaturze 1°C.

Tabela 4. Wartości parametru TCD opisujące zmiany barwy wskaźników w wyniku oddziaływania z mięsem ryby przechowywanych w temperaturze 1°C

Pomiar barwy	BB+MR, 3,5 mM HCl								
	Start	Po 5 godzinach	Po 24 godzinach	Po 30 godzinach	Po 48 godzinach	Po 54 godzinach	Po 70 godzinach	Po 72 godzinach	Po 74 godzinach
L	55,77	57,26	47,27	58,55	54,19	59,21	61,28	53,76	59,04
a	55,63	58,95	56,95	58,67	59,2	58,6	52,96	48,32	29,31
b	28,81	38,44	39,42	39,57	35,51	39,34	37,92	41,05	44,52
TCD	-	10,3	13,7	11,5	7,8	11,5	11,0	14,4	30,8

Pierwsze zmiany barwy wskaźnika następowały po 24 godzinach przechowywania. Wiązało się to najprawdopodobniej ze wzrostem wilgotności otoczenia, w jakim była przechowywana próbka ryby. Po 48 godzinach zmiana barwy ocenianych wskaźników wykazywała pewien regres, co także można zaobserwować porównując odpowiadające ww. warunkom wartości TCD dla wskaźników. Próbką ryby nie wykazywała objawów zepsucia (nieprzyjemnego zapachu, zmiany struktury). Po 72 godzinach eksperymentu wskaźnik uległ wyraźnemu przebarwieniu (z koloru czerwonego na zielony), a wartość parametru TCD zaczęła od tego momentu zdecydowanie rosnąć (tu wynosiła 14,4). Pojawił się też intensywny zapach zepsutej ryby, próbka stała się mało zwarta oraz zauważono wyciek.

Wraz z badaniami wskaźnika przeprowadzono także badania dotyczące całkowitej liczby bakterii mezofilnych i psychrofilnych, które przyczyniają się do przyspieszenia procesów psucia się mięsa ryb. Badano obecność bakterii psychrofilnych (takich jak *Pseudomonas aeruginosa* i *Aeromonas hydrophila*), typowych dla psujących się ryb. Liczba drobnoustrojów obecnych w próbkach ryb była skorelowana ze zmianami właściwości organoleptycznych (np. zapach i konsystencja), pH mięsa ryb i zmianą barwy wskaźników. Świeże mięso ryby miało pH około 6,5. Po 18 godzinach przechowywania w temperaturze pokojowej, kiedy w rybie zachodziły wyraźne procesy psucia, następował wzrost pH do poziomu powyżej 7,2. W tym samym przedziale czasu zauważalna była wyraźna zmiana barwy wskaźnika. Wartość parametru TCD wynosiła odpowiednio 28. Po tym czasie wzrastała również ilość drobnoustrojów psychrofilnych występujących w badanym mięsie ryby. Początkowo ilość psychrofili kształtowała się na poziomie $2 \cdot 10^4$ jtk/ml zawiesiny rozdrobnionego mięsa w soli fizjologicznej. Wartość ta powoli wzrastała wraz

z postępującym zepsuciem mięsa. Po 18 godzinach przechowywania ilość mikroorganizmów psychrofilnych wynosiła $2,3 \cdot 10^8$ jtk/ml i odpowiadała wartościom zakażenia mikrobiologicznego typowym dla zepsutego mięsa ryb [Pacquit i in., 2006].

Wnioski

Wstępne wyniki badań pozwalają stwierdzić, iż opracowany układ wskaźnika świeżości żywności, poprzez zmianę swojego zabarwienia umożliwia szybką wizualną ocenę stanu zapakowanych produktów spożywczych. Sprawdzone warianty mieszanin czerwieni metylowej, błękitu bromotymolowego, humektantów oraz różnego dodatku roztworu HCl umożliwiają obserwację zmiany stężenia wykrywanych produktów rozkładu żywności. Zadowalająca reakcja wskaźnika została uzyskana zarówno dla próbek przechowywanych w temperaturze pokojowej (w badaniach z 5% roztworem amoniaku i próbkami ryby) oraz w temperaturze 1°C (badania z próbkami ryby). Reakcja ocenianych wskaźników świeżości była skorelowana z rozwojem mikroorganizmów psychrofilnych występujących w mięsie ryb, z pogorszeniem się właściwości sensorycznych żywności (zapach, barwa, konsystencja) oraz ze wzrostem pH mięsa.

Literatura

Dilbaghi N., Sharma S., Food spoilage, food infections and intoxications caused by microorganisms and methods for their detection. Guru Jambheshwar University of Science and Technology Hisar-Haryana (India), 2007.

Gawęcki J., Mossor-Pietraszewska T. [Red.], Kompendium wiedzy o żywności, żywieniu i zdrowiu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008.

Heising J.K., Dekker M., Bartels P.V., Boekel van M.A.J.S., A Non-Destructive Ammonium Detection Method As Indicator for Freshness for Packed Fish: Application on cod. Journal of Food Engineering, 2012, 110, 2, 254-261.

Hunt R.W.G., Measuring Colour, 2nd ed., Ellis Horwood Ltd, Chichester, UK, 1991.

Kennedy J., Jackson V., Blair I. S., McDowell D. A., Cowan C., Bolton D. J., Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerator. Journal of Food Protection, 2005, 68, 1421-1430.

Kodogiannis V. S., Pachidis T., Kontogianni E., An intelligent based decision support system for the detection of meat spoilage. Engineering Applications of Artificial Intelligence, 2014, 34, 23-36.

Krysińska N., Tichoniuk M., Cierpiszewski R., Volatile Amines as a Food Product Freshness Indicator in Smart Packaging. Current Trends in Commodity Science, Packaging and Ecology, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań, 2013, 51-66.

Kuswandi B., Wicaksono Y., Jayus, Abdullah A., Heng L.Y., Ahmad M., Smart Packaging: sensors for monitoring of food quality and safety. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety, 2011, 5, 137-146.

Kuswandi B., Jayus, Restyana A., Abdullah A., Heng L.Y., Ahmad M., A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. *Food Control*, 2012, 25, 184-189.

Kuswandi B., Maryska C., Jayus, Abdullah A., Heng L.Y., Real time on-package freshness indicator for guavas packaging. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2013a, 7, 29-39.

Kuswandi B., Jayus, Oktaviana R., Abdullah A., Heng Y.L., A Novel on-Package Sticker Sensor Based on Methyl Red for Real-Time Monitoring of Broiler Chicken Cut Freshness. *Packaging Technology and Science*, 2013b, 27, 69-81.

Nopwinyuwong A., Trevanich S., Suppakul P., Development of a Novel Colorimetric Indicator Label for Monitoring Freshness of Intermediate-moisture Dessert Spoilage. *Talanta*, 2010, 81, 1126-1132.

Nychas G.-J. E., Skandamis P. N., Tassou C., Koutsoumanis K.P., Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 2008, 78, 77-89.

Oszmiański J., Technologia i analiza produktów z owoców i warzyw. *Instrumentalne Metody Pomiaru Barwy Produktów z Owoców i Warzyw*, 2002, 10-14.

Pacquit A., Lau K.T., McLughlin H., Frisby J., Quilty B., Diamond D., Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage, *Talanta*, 2006, 69, 515-520.

Pacquit A., Frisby J., Diamond D., Tong Lau K., Farrell A., Quilty B., Diamond D., Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry*, 2007, 102, 466-470.

Patent US 2010/0224508, Yuyama K., Oka M., Honda H., Hamazaki S., Ochiai S., Obinanta N., Mizuna H. Ink composition for sensing carbon dioxide gas, carbon dioxide indicator using the same, package provided with the carbon dioxide indicator, and method for sensing pinhole using the same, 2010.

Pereira de Abreu D.A., Cruz J.M., Paseiro Losada P., Active and intelligent packaging for the food industry. *Food Reviews International*, 2012, 4, 146-187.

ELŻBIETA RADZIEJEWSKA-KUBZDELA, RÓŻA BIEGAŃSKA-MARECIK,
MARCIN KIDOŃ, DOROTA WALKOWIAK-TOMCZAK, KAROLINA MŁYNARCZYK
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
elarad@up.poznan.pl

WPLYW ATMOSFERY O WYSOKIEJ ZAWARTOŚCI TLENU NA JAKOŚĆ MINIMALNIE PRZETWORZONEJ SAŁATY MASŁOWEJ

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu atmosfery o wysokiej zawartości tlenu na wybrane cechy fizykochemiczne, jakość sensoryczną oraz zawartość związków fenolowych w minimalnie przetworzonej sałacie masłowej przechowywanej przez 9 dni w temperaturze 4°C. Próby zapakowano w powietrzu lub w atmosferze modyfikowanej o składzie: 3/10/87; 50/30/20; 80/20/0 lub 100/0/0 (%O₂/%CO₂/%N₂). Sałatę zapakowaną w powietrzu lub w atmosferze zawierającej 3% tlenu zamknięto folią o przepuszczalności tlenu 3000 cm³/m²/24h x bar, natomiast zapakowane w atmosferze o wysokiej zawartości tlenu -folią o przepuszczalności tlenu 35 cm³/m²/24h x bar.

W próbach zapakowanych w powietrzu oraz atmosferze o składzie 3/10/87 lub 100/0/0 (%O₂/%CO₂/%N₂) typowe cechy sensoryczne utrzymywały się przez cały okres przechowywania. W badanym produkcie stwierdzono obecność pochodnych kwasu hydroksycynamonowego oraz flawonoidów, przy czym dominująca była frakcja kwasowa. Po założonym czasie przechowywania w próbach zapakowanych w atmosferze powietrza oraz w atmosferze o składzie 3/10/87; 50/30/20; 80/20/0 (%O₂/%CO₂/%N₂) zawartość pochodnych kwasu hydroksycynamonowego była na poziomie ich zawartości w sałacie świeżej. Natomiast w próbce zapakowanej w atmosferze o 100% udziale tlenu zawartość tych związków była istotnie wyższa niż w surowcu.

Słowa kluczowe:atmosfera modyfikowana, minimalne przetwarzanie,sałata masłowa

Wprowadzenie

Warzywa i owoce minimalnie przetworzone otrzymuje się w wyniku oczyszczenia surowca, pozbawienia go części niejadalnych, a następnie rozdrobnienia. Przedłużenie trwałości tego typu produktów można uzyskać poprzez wykorzystanie łagodnych czynników utrwalających z pominięciem intensywnej obróbki jednym z nich. Produkty minimalnie przetworzone należą do segmentu żywności wygodnej. Mogą być spożywane bezpośrednio lub wymagają niewielkiej obróbki kulinarnej. Ich jakość kojarzy się z cechami świeżego surowca [Czapski i Radziejewska, 2001].

Jednym z częściej wykorzystywanych warzyw w technologii minimalnego przetwarzania jest sałata masłowa. Jest ona bogata w naturalne antyoksydanty, w tym między innymi w związki fenolowe [Llorach i in., 2008]. Należą one do wtórnych metabolitów roślin, które chronią łatwo utleniające się składniki żywności, takie jak: witaminę C,

karotenoidy oraz nienasycone kwasy tłuszczowe [Oszmiański, 1995; Miller i Rice-Evans, 1997]. Wraz z pożywieniem roślinnym związki te trafiają do organizmu ludzkiego, zabezpieczając go przed szkodliwym działaniem nadtlenków i rodników inicjujących procesy oksydacyjne. W produkcie minimalnie przetworzonym ilość związków fenolowych ulega zmianie w wyniku zachodzącej w rozdrobnionej tkance reakcji utleniania lub syntezy w warunkach stresu fizjologicznego [López-Gálvez i in., 1996]. W przypadku sałaty, procesy utleniania związane z brązowieniem enzymatycznym, są jedną z głównych przyczyn pogorszenia jakości zarówno funkcjonalnej, jak i sensorycznej, poprzez ciemnienie tkanki surowca [Altunkaya i Gökmen, 2008].

Jedną z metod przedłużenia trwałości produktu minimalnie przetworzonego jest pakowanie w atmosferze modyfikowanej. Najczęściej rekomendowana dla warzyw jest atmosfera zawierająca 1 – 5% tlenu oraz 5 – 10% ditlenku węgla (zrównoważona azotem) [Radziejewska-Kubzdela i in., 2014]. Nowym trendem jest zastosowanie atmosfery o wysokiej zawartości tlenu (80–85% O₂) i ditlenku węgla (15–20%) [Zheng i in., 2008]. Z danych literaturowych wynika, że wysoka zawartość tlenu w atmosferze otaczającej produkt może przyczyniać się m. in. do hamowania brązowienia enzymatycznego [Jacxens i in., 2001].

Celem pracy było określenie wpływu atmosfery o wysokiej zawartości tlenu na wybrane cechy fizykochemiczne, jakość sensoryczną oraz zawartość związków fenolowych w minimalnie przetworzonej sałacie masłowej przechowywanej przez 9 dni w temperaturze 4°C.

Material i metody

Surowcem do badań była sałata masłowa, pochodząca z handlu detalicznego.

Proces technologiczny obejmował przebieganie, rozdzielanie główki na pojedyncze liście, mycie w wodzie kranowej oraz usunięcie nadmiaru wody poprzez wirowanie za pomocą wirówki ręcznej do warzyw(Zepter, Viersen, Germany). Następnie sałatę pakowano po 50 g do tacek polipropylenowych o wymiarach 205x160x60 mm i przepuszczalności tlenu 7-8 cm³/m²/24h x bar. Próby pakowano w powietrzu lub w atmosferze modyfikowanej o procentowym udziale O₂/CO₂/N₂: 3/10/87; 50/30/20; 80/20/0; 100/0/0 przy zastosowaniu miksera gazów WITT KM 100/200-3MEM (Witt-Gasetechnik, Witten, Germany) i maszyny pakującej Multivac T 200 (Wolfertschwenden, Germany). Sałatę zapakowaną w powietrzu lub w atmosferze zawierającej 3% tlenu zamknęto folią o przepuszczalności tlenu 3000 cm³/m²/24h x bar, natomiast próby zapakowane w atmosferze o wysokiej zawartości tlenu - folią o przepuszczalności tlenu 35 cm³/m²/24h x bar.

Oznaczenie składu atmosfery wewnątrz opakowania wykonano przy użyciu aparatu do pomiaru gazów OXYBABY®V (Witt-Gasetechnik, Witten, Germany).

Oznaczenie zawartości związków fenolowych wykonano metodą wysokosprawną chromatografii cieczowej HPLC. Do analizy pobrano 1 g liofilizatu sałaty. Związki fenolowe ekstrahowano 50 mL 70% metanolu. Próby homogenizowano przez 5 minut za pomocą homogenizatora T-25 (IKA, Staufen, Niemcy), po czym wytrząsano przez 15 min na wytrząsarce Water Bath Shaker type 357 (Elpin, Lubawa, Polska). Ekstrakt przefiltrowano. Pozostałość z sącza zebrano i ponownie ekstrahowano 25 mL mieszaniny

ekstrakcyjnej. Otrzymane ekstrakty połączono i odwirowano na wirówce MPW-351R (Warszawa, Polska) przez 20 min z prędkością 3 000 x g. Supernatant odparowano na wyparce próżniowej R-205 (Büchi, Flawil, Szwajcaria) w temperaturze 40°C. Pozostałość rozpuszczono w 25 mL wody destylowanej [Vallejo i in., 2002]. Analiza chromatograficzna została przeprowadzona za pomocą systemu LC Agilent Technologies 1200 Rapid Resolution, (Waldbronn, Germany) składającego się z mikro-odgazowywacza 1260 Infinity, binarnej pompy SL 1260 Infinity, dozownika próbek 1260 ALS oraz detektora DAD 1260. Rozdział związków dokonano w odwróconym układzie faz, stosując elucję gradientową, za pomocą kolumny Poroshell 120 SB-C18, o wielkości uziarnienia 2.7 µm oraz wymiarach 4.6x150 mm. Jako fazę nośną zastosowano 100% acetonitryl (faza A) oraz 6% kwas octowy z 2 mmol/L octanem sodu (faza B). Czas rozdziału wynosił 35 minut, przy przepływie 1 mL/min. Rozdział prowadzono stosując następujący gradient: 0–15% faza B przez 15 min, 15–30% faza B przez 25 min, 30–50% faza B przez 5 min oraz 50–100% faza B przez 5 min. Jako standard zewnętrzny wykorzystano kwas galusowy [Tsao i Yang, 2003].

Ocenę sensoryczną w skali 5-cio punktowej przeprowadzono bezpośrednio po otwarciu opakowania [Baryłko-Pikielna i Matuszewska, 2014]. W badanych próbach oceniono barwę, zapach, smak oraz teksturę. Noty ≤ 3.0 pkt. uznano za granice akceptowalności sensorycznej.

W badanym produkcie oznaczono kwasowość czynną [PN-90/A-75101/06] oraz zawartość ekstraktu [PN-90/A-751901/02].

Analizę statyczną wyników przeprowadzono na podstawie wieloczynnikowej analizy wariacji. Do obliczeń wykorzystano program Statistica wersję 10.0. Istotność różnic określono na podstawie testu NIR przy poziomie istotności $p = 0.05$.

Wyniki i dyskusja

W próbach zapakowanych w powietrzu oraz w atmosferze o wysokim udziale tlenu stwierdzono istotny ($p=0.5$) spadek zawartości tego gazu oraz wzrost ditlenku węgla w czasie przechowywania. Odwrotny efekt stwierdzono w próbach zapakowanych w atmosferze o składzie 3/10/87 %O₂/%CO₂/%N₂. Zastosowanie folii barierowej w próbach zamkniętych przy początkowej zawartości tlenu 50%, 80% lub 100% przyczyniło się utrzymania wysokiego stężenia tego gazu w atmosferze w czasie przechowywania. Jednocześnie skutkowało zachowaniem ditlenku węgla na poziomie 24,1 i 31%, zwłaszcza w próbach zapakowanych przy 20% lub 30% jego zawartości (Tab. 1). Skład atmosfery wewnątrz opakowania z produktem kształtowany jest przez intensywność oddychania tkanki oraz przepuszczalność folii opakowaniowej. Dlatego też produkty oddychające (roślinne) pakowane są zwykle w folie przepuszczalne dla gazów, co zapobiega nagromadzeniu się ditlenku węgla oraz gwarantuje utrzymanie tlenu w atmosferze wewnątrz opakowania w czasie przechowywania. Przy stosowaniu atmosfery o wysokiej zawartości tlenu do pakowania owoców i warzyw zalecane jest stosowanie folii barierowych pozwalających utrzymać wysoką zawartość tego gazu w atmosferze w czasie przechowywania produktu. Choć z badań Jacxsens [2001] wynika, że zapakowanie produktów minimalnie przetworzonych (rozdrobnionego selera czy grzybów) w atmosferze modyfikowanej zawierającej 95% tlenu w folię barierową spowodowało znaczny spadek zawartości tego gazu (odpowiednio do 19.9 i 6.8%) w atmosferze otaczającej produkt w czasie 7 dni

przechowywania. Było to związane z intensywnym oddychaniem tkanki, co potwierdzała wysoka zawartość ditlenku węgla w atmosferze otaczającej produkt (45.5% dla selera i 47.5% dla grzybów). W przypadku badanych prób tempo procesów oddechowych było zdecydowanie niższe, co mogło wynikać między innymi z mniejszego rozdrobnienia tkanki. W próbach tych jednak utrzymywał się początkowy, wysoki poziom ditlenku węgla. Dane literaturowe wskazują, iż zbyt wysoka zawartość ditlenku węgla w atmosferze otaczającej produkt (powyżej 30%) może mieć niekorzystny wpływ na tkankę roślinną powodując jej uszkodzenie [Watkins, 2000]. Granice tolerancji tkanki względem wysokiego stężenia ditlenku węgla w dużej mierze uzależnione są od gatunku. Dlatego zawartość zarówno ditlenku węgla, jak i tlenu w atmosferze otaczającej produkt, powinna być ustalana indywidualnie [Fonseca i in., 2005].

Przy zastosowaniu folii o przepuszczalności tlenu $3000 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h} \times \text{bar}$ stwierdzono spadek zawartości ditlenku węgla w próbach zapakowanych przy podwyższonej do 10% jego zawartości oraz wzrost w przypadku prób zapakowanych w powietrzu. Zamknięcie badanych prób w powietrzu lub w atmosferze o składzie 3/10/87 % O_2 /% CO_2 /% N_2 w folię o przepuszczalności tlenu $3000 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h} \times \text{bar}$ pozwoliło na zachowanie atmosfery zawierającej tlen (odpowiednio 14.5 i 4.2% po 9 dniach przechowywania) oraz stosunkowo niski poziom ditlenku węgla (odpowiednio 3.9 i 7.0%). W przypadku próby zapakowanej w atmosferze o składzie 100/0/0 % O_2 /% CO_2 /% N_2 w folię barierową, również po założonym czasie przechowywania poziom ditlenku węgla nie był wysoki (5.7%) przy wysokiej zawartości tlenu (87.8%) (Tab. 1).

Tabela 1. Zmiany zawartości tlenu i ditlenku węgla w atmosferze wewnątrz opakowania z sałatą w czasie przechowywania

Próby	Czas przechowywania [dni]	Zawartość tlenu [%]	Zawartość ditlenku węgla [%]
powietrze	1	16.5 e	2.0 a
	3	16.0 de	3.2 ab
	6	15.1 cd	4.4 bcd
	9	14.5 c	3.9 bc
3/10/87*	1	3.1 a	7.9 f
	3	3.4 ab	8.3 f
	6	4.2 b	7.8 f
	9	4.2 b	7.0 ef
50/30/20*	1	48.0 i	26.7 i
	3	45.4 h	27.9 i
	6	42.6 g	30.6 j
	9	40.8 f	31.0 j
80/20/0*	1	75.5 m	19.7 g
	3	73.4 l	20.8 g
	6	70.7 k	22.7 h
	9	68.1 j	24.1 h
100/0/0*	1	95.6 r	2.5 a
	3	94.4 p	4.3 bc
	6	91.1 o	5.0 cd
	9	87.8 n	5.7 de

średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie od siebie, pomiędzy średnimi oznaczonymi tymi samymi literami brak istotnych statystycznie różnic ($p=0.05$)

* %O₂/%CO₂/%N₂

We wszystkich badanych próbach stwierdzono istotne pogorszenie cech sensorycznych w czasie przechowywania. Przy czym najlepszą barwą charakteryzowały się próby zapakowane w atmosferze powietrza (4.5 pkt). Pożądaną barwę odnotowano również dla prób zapakowanych przy 3 lub 100% zawartości tlenu (4.0 pkt). W przypadku sałaty zamkniętej w atmosferze o podwyższonej do 20 lub 30% zawartości ditlenku węgla noty oceny barwy były istotnie niższe i wynosiły 3.2 pkt. Dla sałaty zapakowanej w powietrzu oraz przy 3 lub 100% zawartości tlenu, noty oceny smaku, zapachu i konsystencji były istotnie wyższe niż w pozostałych próbach. Przy czym istotnie lepszą teksturą charakteryzowały się próby zapakowane przy 3 lub 100% zawartości tlenu (4.1 pkt) niż zapakowane w powietrzu (3.8 pkt) (Tab. 2). Wysoka zawartość ditlenku węgla w atmosferze wewnątrz opakowania mogła przyczynić się do uszkodzenia błon komórkowych, a tym samym do pogorszenia jakości sensorycznej badanych prób. Efekt pogorszenia jakości sensorycznej sałaty zapakowanej w atmosferze modyfikowanej przy wysokim stężeniu CO₂ odnotowali również Barry-Ryan i O'Beirne [1999]. Według Gorny [2001] najlepszy efekt przedłużenia trwałości dla minimalnie przetworzonej sałaty można uzyskać przy zastosowaniu atmosfery zawierającej od 0.5 do 3.0% O₂ oraz 5.0 do 10.0% CO₂.

W przeprowadzonych badaniach podobny efekt odnośnie jakości sensorycznej uzyskano również dla prób pakowanych w powietrzu lub w atmosferze o składzie 100/0/0 %O₂/%CO₂/%N₂.

We wszystkich badanych próbach po 1 dniu przechowywania stwierdzono istotny statystycznie ($p=0.05$) wzrost wartości pH (6.09 – 6.25) w porównaniu do surowca (5.93). Nie stwierdzono natomiast spadku zawartości ekstraktu, który wynosił (4.1 – 4.3%). Po założonym okresie przechowywania największy wzrost wartości pH (6.40– 6.51) oraz spadek zawartości ekstraktu (3.2 – 3.5%) odnotowano w próbach zapakowanych w atmosferze z 20 lub 30% udziałem ditlenku węgla. Wartość pH w pozostałych próbach utrzymywała się na poziomie od 6.00 do 6.08. Natomiast zawartość ekstraktu była na poziomie zawartości ekstraktu w świeżym surowcu (od 4.1% do 4.3%). Można przypuszczać, że wysokie stężenie ditlenku węgla w atmosferze otaczającej produkt przyczyniło się do uszkodzenia błon komórkowych i zwiększenia tempa procesów biochemicznych. Mogło to skutkować m.in. spadkiem zawartości ekstraktu w tkance.

Tabela 2. Wpływ składu atmosfery na cechy sensoryczne sałaty w czasie przechowywania

Próby	Czas przechowywania [dni]	Barwa [pkt]	Zapach [pkt]	Smak [pkt]	Tekstura [pkt]
powietrze	0	5.0 f	5.0 e	5.0 e	5.0 f
	1	5.0 f	5.0 e	5.0 e	5.0 f
	3	5.0 f	5.0 e	4.6 c	4.6 e
	6	4.7 e	4.7 cd	4.9 d	4.2 c
	9	4.5 d	4.7 cd	4.4 b	3.8 b
3/10/87*	1	5.0 f	4.8 d	5.0 e	4.9 f
	3	5.0 f	5.0 e	4.8 d	5.0 f
	6	4.7 e	4.6 c	4.8 d	4.4 d
	9	4.0 c	4.6 c	4.3 b	4.1 c
50/30/20*	1	5.0 f	5.0 e	5.0 e	5.0 f
	3	5.0 f	5.0 e	4.9 de	5.0 f
	6	3.8 b	4.2 b	4.4 b	3.9 b
	9	3.2 a	3.2 a	3.6 a	3.3 a
80/20/0*	1	5.0 f	5.0 e	5.0 e	5.0 f
	3	5.0 f	5.0 e	5.0 e	5.0 f
	6	4.6 de	4.7 cd	4.4 b	4.6 b
	9	3.2 a	2.6 a	3.8 a	3.7 a
100/0/0*	1	5.0 f	5.0 e	4.9 de	5.0 f
	3	5.0 f	5.0 e	4.8 d	5.0 f
	6	4.1 c	4.6 c	4.4 b	4.4 d
	9	4.0 c	4.6 c	4.3 b	4.1 c

średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie od siebie, pomiędzy średnimi oznaczonymi tymi samymi literami brak istotnych statystycznie różnic ($p=0.05$)

* %O₂/%CO₂/%N₂

Zawartość związków fenolowych w sałacie wynosiła 29.77 mg/100g. W badanych próbach stwierdzono obecność pochodnych kwasu hydroksycynamonowego (głównie pochodnych kwasu kawowego) oraz flawonoidów. Przy czym dominująca była frakcja kwasowa (około 99%) (Tab. 3). Llorach i in. [2008] oraz Galieni i in. [2015] również w swoich badaniach wskazują na podobny profil związków fenolowych w sałacie.

W próbach zapakowanych w atmosferze modyfikowanej o 30% udziale ditlenku węgla istotny wzrost zawartości pochodnych kwasu hydroksycynamonowego stwierdzono po pierwszym dniu przechowywania. W czasie dalszego przechowywania odnotowano jednak ich spadek. W przypadku sałaty zapakowanej w atmosferze o składzie 100/0/0 (%O₂/%CO₂/%N₂), istotny ($p=0.05$) wzrost zawartości wyżej wymienionych związków stwierdzono po 6 dniach przechowywania. Po założonym czasie przechowywania w próbach zapakowanych w atmosferze powietrza oraz w atmosferze o składzie 3/10/87; 50/30/20; 80/20/0 (%O₂/%CO₂/%N₂) zawartość pochodnych kwasu hydroksycynamonowego była na poziomie ich zawartości w sałacie świeżej. Natomiast w próbie zapakowanej w atmosferze o 100% udziale tlenu, zawartość tych związków była istotnie wyższa niż w surowcu (Tab. 3). Z danych literaturowych wynika, że zastosowanie atmosfery o podwyższonej do 20 lub 30% zawartości ditlenku do pakowania marchwi wpływa na hamowanie syntezy związków fenolowych w porównaniu z atmosferą powietrza [Amanatidou i in., 2000]. Dla truskawek nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy zawartością wyżej wymienionych związków i aktywnością przeciwutleniającą dla prób zapakowanych w powietrzu lub w atmosferze o podwyższonej zawartości tlenu [Zheng i in., 2007]. W przypadku badanej sałaty odnotowano natomiast syntezę badanych związków przy zastosowaniu do pakowania atmosfery o 30% zawartości ditlenku węgla lub 100% tlenu, co może być związane ze stresem fizjologicznym tkanki, wynikającym z wysokiego udziału wyżej wymienionych gazów w atmosferze otaczającej produkt. Z danych literaturowych wynika, że reakcja tkanki na wysoki poziom zawartości tlenu i ditlenku węgla w atmosferze jest cechą gatunkową [López-Gálvez i in., 1996].

Tabela 3. Wpływ składu atmosfery na zawartość związków fenolowych w sałacie w czasie przechowywania

Próby	Czas przechowywania [dni]	Pochodne kwasów hydroksycynamonowych [mg/100 g]	Flawonoidy [mg/100g]	Ogólna zawartość związków fenolowych [mg/100g]
powietrze	0	29.7 bcd	0.07 ab	29.77 abcd
	1	29.6 bcd	0.10 ab	29.70 abcd
	3	23.7 ab	0.10 ab	23.80 ab
	6	37.3 def	-	37.30 def
	9	30.0 bcd	-	30.00 bcd
3/10/87*	1	26.5 abc	0.35 c	26.85 abc
	3	28.5 abcd	0.15 b	28.65 abcd
	6	34.6 cde	0.02 ab	34.62 cde
	9	31.6 bcd	-	31.60 bcd
50/30/20*	1	51.6 g	0.10 ab	51.70 g
	3	43.0 efg	-	43.00 efg
	6	29.3 abcd	-	29.30 abcd
	9	24.6 ab	-	24.60 ab
80/20/0*	1	20.3 a	0.62 d	20.92 a
	3	27.2 abc	-	27.20 abc
	6	29.4 abcd	-	29.40 abcd
	9	35.5 cde	-	35.50 cde
100/0/0*	1	28.7 abcd	0.06 ab	28.76 abcd
	3	24.4 ab	0.04 ab	24.44 ab
	6	44.6 fg	0.02 a	44.62 fg
	9	48.6 g	0.08 ab	48.68 g

średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie od siebie, pomiędzy średnimi oznaczonymi tymi samymi literami brak istotnych statystycznie różnic (p=0.05)

* %O₂/%CO₂/%N₂

Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowanie wysokiej zawartości ditlenku węgla w atmosferze otaczającej minimalnie przetworzoną sałatę masłową przyczyniło się do pogorszenia jakości sensorycznej, spadku zawartości ekstraktu oraz wzrostu wartości pH w czasie przechowywania. Dobrą jakość sensoryczną oraz najwyższą zawartość związków fenolowych charakteryzowały się próby zapakowane w atmosferze o składzie 100/0/0 %O₂/%CO₂/%N₂. Takie warunki pakowania sałaty mogą stanowić alternatywę dla powietrza oraz atmosfery o składzie 3/10/87 %O₂/%CO₂/%N₂.

Literatura

- Altunkaya A., Gökmen V., Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). Food Chemistry, 2008, 107 (3), 1173-1179.
- Amanatidou A., Slump R.A., Gorris L.G., Smid E.J., High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally processed carrots. Journal of Food Science, 2000, 65 (1), 61-66.
- Barry-Ryan C., O'Beirne D., Ascorbic acid retention in shredded iceberg lettuce as affected by minimal processing. Journal of Food Science, 1999, 64 (3), 498-500.
- Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I., Sensoryczne badania żywności: podstawy, metody, zastosowania, Wydawnictwo Naukowe PTTŻ, Kraków, 2014.
- Czapski J., Radziejewska E., Metody przedłużania trwałości warzyw i owoców mało przetworzonych. Przemysł Spożywczy, 2001, 55 (1), 16-19.
- Fonseca S.C., Oliveira F.A., Brecht J.K., Chau K.V., Influence of low oxygen and high carbon dioxide on shredded Galega kale quality for development of modified atmosphere packages. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35 (3), 279-292.
- Galieni A., Di Mattia C., De Gregorio M., Specia S., Mastrocola D., Pisante M., Stagnari F., Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Scientia Horticulturae, 2015, 187, 93-101.
- Gorny J.R., A summary of CA and MA requirements and recommendations for fresh-cut (minimally processed) fruits and vegetables. In VIII International Controlled Atmosphere Research Conference, 2001, 609-614.
- Jacxsens L., Devlieghere F., Van der Steen C., Debevere J., Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71 (2), 197-210.
- Llorach R., Martínez-Sánchez A., Tomás-Barberán F.A., Gil M.I., Ferreres F., Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. Food Chemistry, 2008, 108 (3), 1028-1038.
- López-Gálvez G., Saltveit M., Cantwell M., Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. Postharvest Biology and Technology, 1996, 9 (2), 223-233.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. Food Chemistry, 1997, 60 (3), 331-337.
- Oszmiański J., Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze w żywności. Przemysł Spożywczy, 1995, 3 (49), 94-96.

PN-90/A-75101/02. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości ekstraktu ogólnego.

PN-90/A-75101/06. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie pH metodą potencjometryczną.

Radziejewska-Kubzdela E., Czapski J., Czaczyk K., Biegańska-Marecik R., The effect of pre-treatment and modified atmosphere packaging on contents of phenolic compounds and sensory and microbiological quality of shredded celeriac. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94 (6), 1140-1148.

Tsao R., Yang R., Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1018 (1), 29-40.

Vallejo F., Tomás-Barberán F.A., García-Viguera C., Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82 (11), 1293-1297.

Watkins C.B., Responses of horticultural commodities to high carbon dioxide as related to modified atmosphere packaging. *HortTechnology*, 2000, 10 (3), 501-506.

Zheng Y., Yang Z., Chen X., Effect of high oxygen atmospheres on fruit decay and quality in Chinese bayberries, strawberries and blueberries. *Food Control*, 2008, 19 (5), 470-474.

TOMASZ PAWŁOWSKI, WOJCIECH ZMUDZIŃSKI

Katedra Towaroznawstwa Żywności

Wydział Towaroznawstwa

Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

tomasz.pawlowski@ue.poznan.pl

WSKAŹNIKI OBECNOŚCI TLENU AKTYWOWANE PROMIENIOWANIEM UV OCENA MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA ZIELENI METYLENOWEJ I CZERWIENI METYLOWEJ

Streszczenie

Obecnie trwają intensywne badania nad opracowaniem uniwersalnych i prostych w zastosowaniu optycznych wskaźników zmian składu atmosfery wewnątrz opakowania produktów spożywczych oraz przemysłowych. Wskaźniki takie, w formie etykiety lub pastylki, w łatwy sposób pozwoliłyby na dostrzeżenie nieuzbrojonym okiem niekorzystnej zmiany składu atmosfery (np. wzrostu stężenia tlenu) na każdym etapie łańcucha dostaw. Idealny wskaźnik powinien cechować się przede wszystkim szybkością odpowiednią czułością wskazań, niskim kosztem wytworzenia oraz być łatwy w interpretacji. W opracowywaniu kolorymetrycznych wskaźników coraz częściej wykorzystywane są fotokatalityczne właściwości półprzewodników, głównie ditlenku tytanu.

Celem prezentowanych badań była ocena możliwości zastosowania czerwieni metylowej i zieleni metylenowej w kolorymetrycznych wskaźnikach obecności tlenu aktywowanych promieniowaniem UV. Ponadto, określono wpływ zastosowanego selektywnego donora elektronów na czas redukcji i utleniania zastosowanych barwników redoks.

Badania prowadzono w układach modelowych, które stanowiły odpowiednio przygotowane wodne mieszaniny fotokatalizatora (TiO_2), selektywnego donora elektronów (metanol, etanol, glicerol) oraz barwnika redoks (czerwień metylowej lub zieleni metylenowej). Barwnik wchodzący w skład analizowanej mieszaniny poddawano procesowi redukcji, zachodzącej na powierzchni naświetlanego TiO_2 (w wyniku oddziaływania na barwnik fotogenerowanych elektronów) w atmosferze argonu, a następnie procesowi utleniania w obecności powietrza.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że zarówno czerwień metylowa, jak i zielen metylenowa mogą być wykorzystane w opracowaniu kolorymetrycznych wskaźników obecności tlenu. Na czas redukcji i utleniania analizowanych mieszanin wpływały: rodzaj użytego barwnika, jego stężenie w mieszaninie oraz zastosowany selektywny donor elektronów.

Słowa kluczowe: czerwień metylowa, selektywny donor elektronów, TiO_2 , wskaźniki obecności tlenu, zielen metylenowa

Wprowadzenie

Jedną z najważniejszych składowych branych pod uwagę podczas oceny jakości produktów spożywczych jest trwałość, na którą znacząco wpływa skład atmosfery otaczającej produkt w trakcie jego przechowywania. Większość niekorzystnych zmian zachodzących w żywności spowodowana jest oddziaływaniem tlenu na jej składniki [Rooney, 1995]. Obecność O_2 sprzyja rozwojowi niepożądanych mikroorganizmów tlenowych. Ponadto, przyczynia się do zachodzenia wielu zmian o podłożu enzymatycznym, jak enzymatyczne brązowienie warzyw i owoców oraz rozkład kwasu L-askorbinowego. Obniżenie jakości żywności może być również skutkiem zachodzących przy udziale tlenu reakcji nieenzymatycznych, np. utlenianie kwasów tłuszczowych lub związków lotnych.

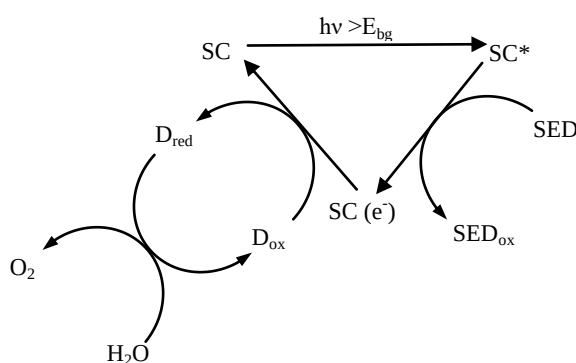
Wśród licznych metod przedłużania trwałości żywności najbardziej korzystne wydaje się być pakowanie produktów w atmosferze modyfikowanej (MAP). Polega ona na dobraniu dla każdego produktu optymalnej mieszaniny gazów, która umożliwia jak najdłuższe zachowanie świeżości oraz bezpieczeństwo opakowanego produktu. Usunięcie z atmosfery opakowanego produktu tlenu do poziomu 0,5-2,0% oraz zastąpienie go innym gazem m.in. ditlenkiem węgla, azotem, lub argonem, skutecznie przedłuża trwałość zapakowanego produktu [Brody i in., 2001]. Zastosowanie metody MAP może trzykrotnie wydłużyć okres świeżości mięsa lub chleba oraz ponad trzystukrotnie kawy [Mills, 2005]. Na skutek uszkodzenia opakowania, jego dehermetyzacji lub zachodzenia naturalnych procesów wewnątrz produktu, początkowy skład atmosfery w opakowaniu może ulec zmianie w konsekwencji inicjując niekorzystne procesy psucia się żywności. Istotne jest więc, aby umożliwić zarówno producentom, dystrybutorom, jak i konsumentom dostrzeżenie negatywnej zmiany składu atmosfery w opakowaniu.

Aktualnie trwają intensywne badania nad opracowaniem optycznego wskaźnika obecności tlenu, który stanowiłby integralną część opakowania produktu spożywczego. Takie rozwiązanie w prosty sposób umożliwiłoby stwierdzenie zmiany składu atmosfery wewnątrz opakowania. Idealny wskaźnik obecności tlenu, który mógłby znaleźć zastosowanie w opakowalnictwie żywności, powinien cechować się niskim (niewpływającym na cenę produktu) kosztem, dużą szybkością i czułością wskazań, trwałością oraz brakiem toksyczności. Natomiast sam pomiar powinien być nieinwazyjny, bez konieczności uszkodzenia opakowania i konieczności utylizacji jego zawartości. Istotna jest także łatwość interpretacji wskaźnika, która nie powinna wymagać specjalnego sprzętu lub szkolenia, a sam odczyt powinien opierać się na obserwacji zmian jego zabarwienia nieuzbrojonym okiem [Mills, 2005; Puligundla, 2012]. Umieszczenie takiego wskaźnika w formie nadruku na etykiecie, lub pastylki w widocznym miejscu opakowania, umożliwiłoby dostrzeżenie zmian składu atmosfery w całym łańcuchu dystrybucyjnym [Ahvenainen, 2003].

Aktualnie większość stosowanych wskaźników obecności tlenu opartych jest na zjawisku wygaszania luminescencji w obecności tlenu cząsteczkowego. Najczęściej wykorzystywanym luminoforem jest $[Ru(dpp)_3](ClO_4)_2$, czyli nadchloran tris(4,7-difenylo-1,10-fenantrolino)rutenu(II) [Mills, 1997] stosowany między innymi w produkcji wskaźnika o nazwie handlowej O2xyDot®. Pomimo bardzo wysokiej czułości i dokładności, do interpretacji wskazań konieczna jest specjalistyczna aparatura, co znacząco uniemożliwia stosowanie go, jako źródła informacji dla konsumentów, czy dystrybutorów.

Szeroką grupę stanowią wskaźniki, których wskazania są możliwe do interpretacji dzięki wizualnej zmianie zabarwienia. Należą do nich wskaźniki kolorymetryczne, których działanie opiera się na zmianie zabarwienia na skutek przyłączenia cząsteczki tlenu do związku barwnego, np. hemoglobiny czy mioglobiny [Zhujun i Seitz, 1986; Chung i in., 1995]. Wadą tych wskaźników jest odwracalny przebieg reakcji na skutek ponownej redukcji barwnika spowodowanej między innymi uszczelnieniem opakowania bądź zużyciem tlenu przez rozwijającą się mikroflorę aerobową. Ponadto, pewne trudności sprawia interpretacja wskazań (wąski zakres zmiany barwy), a sam wskaźnik cechuje niska trwałość. Kolejną grupą wskaźników stanowią indykatory zawierające w swoim składzie barwniki redoks. Przykładem takiego wskaźnika jest obecny na rynku AGELESS-EYE[®] produkowany przez firmę Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. Zawarta w nim glukoza, posiadająca właściwości redukujące, powoduje w warunkach beztlenowych redukcję błękitu metylenowego skutkującą jego odbarwieniem. W momencie, gdy wskaźnik wchodzi w kontakt z tlenem następuje reakcja utlenienia barwnika wraz z powrotem do niebieskiej barwy [Yoshikawa i in., 1979; Smolander i in., 1997; Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. 2016;]. Jako główną wadę wskazuje się odwracalność jego działania.

Ostatnia grupa wskaźników obecności tlenu bazuje również na zmianie zabarwienia barwnika redoks w obecności tlenu, ale jego aktywacja (do formy zredukowanej) ma miejsce na powierzchni naświetlanego promieniowaniem UV półprzewodnika (m.in. ditlenku tytanu lub tlenku cynku). Schemat działania takiego wskaźnika przedstawiono na rysunku 1. W wyniku aktywacji półprzewodnika (SC) promieniowaniem ultrafioletowym w warunkach beztlenowych następuje generowanie par elektron-dziura ($e^- - h^+$) na jego powierzchni. Fotowzbudzone elektrony powodują redukcję barwnika (D_{red}), co pociąga za sobą zmianę jego zabarwienia. Natomiast zastosowany we wskaźniku selektywny donor elektronów (SED), stanowi tzw. pułapkę dla dziur elektronowych zapobiegając ponownemu utlenianiu barwnika. W momencie kontaktu aktywowanego wskaźnika z tlenem następuje ponowne utlenienie barwnika (D_{ox}) wraz z powrotną zmianą zabarwienia użytego barwnika redoks.



Rysunek. 1. Schemat działania wskaźnika aktywowanego promieniowaniem ultrafioletowym [Mills, 2005]

W literaturze przedmiotu dostępnych jest szereg prac dotyczących badań nad wskaźnikiem, zawierającym w swoim składzie ditlenek tytanu oraz błękit metylenowy [Mills, 2005]. Opracowywane wskaźniki różnią się ostateczną formą. Można wyróżnić wskaźniki w formie cienkiego filmu, inteligentnego atramentu, czy tabletek [Lee i in., 2004; Mills, 2005; Mills i Hazafy, 2008; Lawrie i in. 2013; Vu i Won 2013; Ollis i in., 2016].

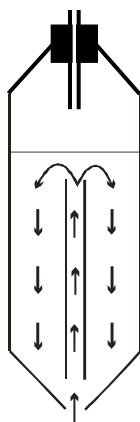
Celem niniejszej pracy było określenie możliwości zastosowania zieleni metylenowej oraz czerwieni metylowej jako związków barwnych wchodzących w skład kolorymetrycznego wskaźnika obecności tlenu aktywowanego promieniowaniem ultrafioletowym poprzez ocenę wpływu stężenia barwnika w badanych mieszaninach oraz określonych alkoholi (selektywnych donorów elektronów) na czas redukcji oraz utlenienia wskaźnika.

Material i metody

W badaniach nad możliwością opracowania nowych wskaźników obecności tlenu aktywowanych promieniowaniem UV zastosowano: TiO_2 (anataz, Aldrich), czerwień metylową, zieleń metylenową (Sigma-Aldrich), metanol, etanol (PPH STANLAB) oraz glicerynę (AKTYN). Do przygotowania mieszanin użyto wody poddanej dwukrotnej destylacji w destylarce ze szkła kwarcowego.

Analizowane wodne mieszaniny o objętości 200 cm^3 przygotowano poprzez zmieszanie $5 \cdot 10^{-2} \text{ g}$ TiO_2 , 1 cm^3 SED (metanol, etanol lub glicerol) oraz zieleni metylenowej lub czerwieni metylowej o stężeniach $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2} \text{ g}$. Tak przygotowane próbki umieszczano w łaźni ultradźwiękowej na okres 10 minut celem uzyskania jednorodnej mieszaniny.

Badania prowadzano w szklanym reaktorze (rysunek 2.) zaprojektowanym przez Sobczyńskiego i współpr. [Sobczyński i in., 1997], zbudowanego z płaszcza zewnętrznego oraz połączonej z nim krótkiej rurki wewnętrznej. Dolna część reaktora w kształcie stożka, zakończona była niewielkim otworem, przez który wprowadzano odpowiedni gaz (argon lub powietrze). Przepływ gazu poprzez rurkę wewnętrzną zapewniał ciągłe i niezakłócone mieszanie zawartości reaktora.



Rysunek 2. Szklany reaktor wykorzystany w badaniach

Celem określenia czasu koniecznego dla przeprowadzenia procesu redukcji barwnika, 200 cm³ mieszaniny wprowadzono do reaktora i poddawano nasycaniu argonem (uzyskanie warunków beztlenowych) o szybkości przepływu 50 dm³·h⁻¹ przez 15 min bez dostępu światła. Po upływie 15 minut wykonano fotografię mieszaniny reakcyjnej (dokumentacja badań), po czym rozpoczęto jej naświetlanie dwoma lampami UV (OSRAM) o mocy 300 W każda, znajdującymi się naprzeciwległe w odległości 20 cm od reaktora. Stałą temperaturę zawartości reaktora (około 25°C) utrzymywano na drodze chłodzenia zewnętrznym strumieniem powietrza. W momencie zaobserwowania nieuzbrojonym okiem zmiany barwy mieszaniny zanotowano czas redukcji (t_{red}).

W celu określenia czasu potrzebnego do ponownego utlenienia barwnika, mieszaninę reakcyjną poddano napowietrzaniu sprężonym powietrzem o szybkości przepływu 50 dm³·h⁻¹. W momencie powrotu pierwotnej barwy mieszaniny, zauważalnej nieuzbrojonym okiem, zanotowano czas utleniania (t_{ox}).

Każde doświadczenie wykonano w co najmniej dwóch powtórzeniach. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA 12. Dla zweryfikowania różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano test Tuckey'a. W przeprowadzonej analizie za poziom istotności przyjęto $\alpha=0,05$.

Wyniki i dyskusja

Zieleń metylenowa oraz czerwień metylowa w zależności od formy występowania (utlenionej bądź zredukowanej) cechują się odmienną barwą.

Mieszaniny reakcyjne zawierające zieleń metylową cechowały się barwą niebieskozieloną, a jej intensywność wzrastała wraz ze wzrostem zawartości barwnika. W wyniku procesu redukcji zachodzącej pod wpływem fotowzbudzonych elektronów generowanych na powierzchni naświetlanego promieniowaniem UV TiO₂ (w warunkach beztlenowych) zieleń metylenowa ulegała przekształceniu w bezbarwny leukozwiązek. Następową zmianą zabarwienia mieszaniny reakcyjnej z niebieskozielonej na białą, pochodzącą od zawartego w mieszaninie TiO₂. W warunkach beztlenowych biała barwa mieszaniny była trwała. Kontakt mieszaniny reakcyjnej z powietrzem spowodował ponowne utlenienie zieleni metylenowej oraz powrót pierwotnej niebieskozielonej barwy mieszaniny.

Na podstawie danych zaprezentowanych w tabeli 1. można stwierdzić, że zwiększanie zawartości zieleni metylenowej w badanych mieszaninach skutkowało wydłużeniem czasu jej redukcji. Zależność ta jest skutkiem zwiększania zawartości związku zredukowanego w badanych mieszaninach, przy jednoczesnym stałym udziale ditlenku tytanu oraz selektywnego donora elektronów.

Zaobserwowano, że na czasy redukcji naświetlanych mieszanin wpływ miało zastosowanie określonego donora elektronów. Najdłuższe czasy redukcji barwnika stwierdzono w obecności metanolu, najkrótsze natomiast w obecności glicerolu. Wyraźny wpływ na czas redukcji w przypadku mieszaniny reakcyjnej o stężeniu barwnika 50,0 mg·dm⁻³ ma zastosowany donor elektronów. Natomiast w przypadku dwóch najniższych stężeń obserwowane różnice w czasie redukcji są nieznaczne.

Tabela 1. Czasy redukcji i utleniania badanych mieszanin zawierających zieleni metylenową dla różnych stężeń barwnika i SED

	SED	stężenie zieleni metylenowej [g·dm ⁻³]			
		2,5	5,0	25,0	50,0
czas redukcji [min]	metanol	1,7±0,3 ^{a,A}	2,2±0,3 ^{a,A}	5,3±0,2 ^{b,A}	13,9±0,9 ^{c,B}
	etanol	1,8±0,3 ^{a,A}	3,0±0,0 ^{a,B}	6,3±0,3 ^{b,A,B}	18,0±1,0 ^{c,A}
	glicerol	2,3±0,7 ^{a,A}	2,6±0,2 ^{a,A,B}	7,5±0,5 ^{b,B}	19,4±1,6 ^{c,A}
czas utleniania [min]	metanol	13,7±3,2 ^{b,A}	19,0±1,0 ^{a,b,A}	24,0±0,0 ^{a,A}	25,0±0,0 ^{a,A}
	etanol	19,4±0,4 ^{a,B}	27,3±1,8 ^{b,B}	20,0±0,0 ^{a,A}	18,9±1,7 ^{a,A}
	glicerol	9,8±1,6 ^{a,A}	14,3±1,2 ^{a,b,A}	23,5±2,1 ^{a,b,A}	20,5±0,5 ^{b,A}

Wartości średnie w kolumnach oznaczone odmienną wielką literą oraz wartości średnie w wierszach oznaczone odmienną małą literą różnią się statystycznie istotnie ($\alpha=0,05$).

Analizując dane można stwierdzić brak korelacji pomiędzy zawartością zieleni metylenowej w mieszaninie reakcyjnej, a czasem jej utleniania (i powrotu do pierwotnej barwy). Zaobserwowano, że w obecności etanolu i glicerolu, zwiększenie stężenia barwnika z 2,5 do 5,0 g·dm⁻³ skutkuje wydłużeniem czasu jego utleniania w badanych mieszaninach, natomiast dalsze zwiększanie udziału czerwieni metylowej powoduje tylko nieznaczne skrócenie czasu utleniania. Najszybszy powrót do pierwotnej barwy zaobserwowano przy stężeniu czerwieni metylowej na poziomie 2,5 g·dm⁻³ w obecności glicerolu. Najdłużej, trwało ponowne utlenienie mieszaniny o stężeniu barwnika 5,0 g·dm⁻³ w obecności etanolu. W przeciwieństwie do procesu redukcji, zastosowanie określonych donorów elektronów nie wywierało istotnego wpływu na czas utleniania mieszanin reakcyjnych. Istotne wydłużenie czasu utleniania zaobserwowano jedynie w mieszaninach o dwóch najmniejszych stężeniach zawierających etanol. Biorąc pod uwagę czas utleniania, jako wyróżnik czułości i szybkości działania potencjalnego wskaźnika tlenu, nie można jednoznacznie określić, który z badanych donorów elektronów mógłby być wykorzystywany w dalszych badaniach.

Mieszaniny reakcyjne, w których związek barwny stanowiła czerwień metylowa cechowały się barwą żółtą (w przypadku stężeń 2,5 oraz 5,0 mg·dm⁻³) lub pomarańczoworóżową (w przypadku stężeń 10,0 oraz 50,0 mg·dm⁻³). Intensywność barwy, podobnie jak w przypadku mieszanin z zielenią metylenową, wzrastała wraz ze wzrostem zawartości barwnika w mieszaninie. Na skutek naświetlania mieszaniny promieniowaniem UV w warunkach beztlenowych nastąpiła redukcja czerwieni metylowej, skutkująca powstaniem bezbarwnego leukozwiązku. Tak jak w przypadku badań prowadzonych z wykorzystaniem zieleni metylenowej, barwa mieszaniny w wyniku redukcji czerwieni metylowej zmieniła się na białą i była trwała w warunkach beztlenowych. Kontakt mieszaniny z powietrzem spowodował ponowne utlenienie barwnika i przywrócenie pierwotnej barwy mieszaniny.

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 2., wzrost stężenia czerwieni metylowej w badanych mieszaninach powoduje istotne wydłużenie czasu redukcji mieszanin bez względu na zastosowany selektywnych donor elektronów.

Również w tym przypadku zastosowanie różnych donorów elektronów miało wpływ na czasy redukcji mieszaniny. Najdłuższy czas redukcji mieszaniny zaobserwowano przy obecności glicerolu, a najkrótszy przy obecności metanolu. Na podstawie analizy

otrzymanych danych stwierdzono, że istnieje negatywna zależność pomiędzy czasem ponownego utlenienia czerwieni metylowej, a jej stężeniem w mieszaninie reakcyjnej w przypadku zastosowania metanolu i etanolu, jako selektywnego donora elektronów. Najkrótszy czas powrotu do barwy na skutek utlenienia czerwieni metylenowej zaobserwowano w mieszaninie o stężeniu barwnika $25,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Najdłuższy proces ponownego utleniania zaobserwowano dla stężenia czerwieni metylowej $5,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w obecności metanolu. W przypadku mieszanin zawierających glicerol nie można jednoznacznie wskazać występowania określonych zależności, gdyż w próbkach o dwóch najniższych stężeniach ($2,5$ oraz $5,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) nie zaobserwowano powrotu do wyjściowej barwy. Mogło to być spowodowane bardzo niską intensywnością zabarwienia mieszaniny, niemożliwą do dostrzeżenia nieuzbrojonym okiem.

Tabela 2. Czasy redukcji i utleniania badanych mieszanin zawierających zielen metylenową dla różnych stężeń barwnika i SED

	SED	stężenie czerwieni metylowej [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]			
		2,5	5,0	25,0	50,0
czas redukcji [min]	metanol	$10,5 \pm 0,0^{a,A}$	$11,3 \pm 0,8^{a,A}$	$21,8 \pm 1,3^{b,A}$	$45,0 \pm 1,5^{c,A}$
	etanol	$8,3 \pm 0,8^{a,A}$	$12,0 \pm 1,0^{a,A}$	$26,0 \pm 2,5^{a,b,A}$	$47,8 \pm 7,8^{b,A}$
	glicerol	$20,3 \pm 0,3^{a,B}$	$18,8 \pm 0,3^{a,B}$	$28,3 \pm 2,3^{b,A}$	$54,3 \pm 0,8^{c,A}$
czas utleniania [min]	metanol	$22,5 \pm 0,0^{a,A}$	$26,5 \pm 3,5^{a,A}$	$12,0 \pm 4,0^{a,b,A}$	$4,8 \pm 0,8^{b,A}$
	etanol	$24,0 \pm 4,5^{a,A}$	$25,5 \pm 0,0^{a,A}$	$2,8 \pm 0,3^{b,A}$	$3,75 \pm 0,8^{b,A}$
	glicerol	brak	brak	$7,0 \pm 0,0^{a,A}$	$4,8 \pm 0,3^{b,A}$

Wartości średnie w kolumnach oznaczone odmienną wielką literą oraz wartości średnie w wierszach oznaczone odmienną małą literą różnią się statystycznie istotnie ($\alpha=0,05$).

Podobnie jak w przypadku badań mieszanin z zielenią metylenową, stwierdzono, że istnieje zależność pomiędzy czasem utleniania a zastosowanym selektywnym donorem elektronów. Najdłuższy czas utleniania zaobserwowano przy obecności metanolu, najkrótszy przy obecności glicerolu. Biorąc pod uwagę czasy utlenienia, pod kątem czułości i szybkości reakcji na obecność tlenu obecnego w opakowaniu, w dalszych badaniach nad opracowaniem wskaźnika w formie stałej należy zastosować glicerol jako SED.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zarówno zielen metylenowa, jak i czerwień metylowa mogą być barwnikami wchodzącymi w skład kolorymetrycznych wskaźników obecności tlenu aktywowanych promieniowaniem ultrafioletowym. Ich zabarwienie jest wyraźnie zależne od formy występowania (utlenionej, zredukowanej). W przypadku obu barwników wzrost ich stężenia w badanych mieszaninach skutkował wydłużeniem czasu ich redukcji. Zielen metylenowa ulegała redukcji w czasie od 3 do 18 min, czerwień metylowa ulegała redukcji w czasie od 9 do 57 min, w zależności od ich stężenia w mieszaninie i zastosowanego selektywnego donora elektronów. Na czas redukcji wpływał także, zastosowany jako pułapka dla dziur elektronowych, selektywny donor elektronów. Zielen metylenowa ulegała redukcji szybciej w obecności glicerolu, natomiast mieszaniny zawierające czerwień metylową szybciej ulegały odbarwieniu w obecności metanolu. Czas utlenienia także zależny był od zastosowanego barwnika oraz

od jego stężeń w badanych mieszaninach. W przypadku czerwieni metylowej można stwierdzić, że zwiększenie jego zawartości w mieszaninie reakcyjnej skutkowało skróceniem czasu jego utlenienia. Natomiast w mieszaninach zawierających zielen metylenową nie można stwierdzić istnienia zależności pomiędzy zawartością barwników w mieszaninie a czasem jego utlenienia. W przypadku obu barwników krótsze czasy utlenienia stwierdzono w mieszaninach zawierających jako selektywny donor elektronów glicerol.

Literatura

Ahvenainen R., *Novel food packaging techniques*, Elsevier, 2003.

Brody A.L., Strupinsky B.R., Kline L.R., *Active Packaging for Food Applications*, Technomic Publishing Co., Lancaster, 2001.

Chung K.E., Lan E.H., Davidson M.S., Dunn B.S., Valentine J.S., Zink J.I., *Measurement of Dissolved Oxygen in Water Using Glass Encapsulated Myoglobin*, *Analytical Chemistry*, 1995, 67, 1505-1509.

Lawrie K., Mills A., Hazafy D., *Simple inkjet-printed, UV-activated oxygen indicator*, *Sensors and Actuators B*, 2013, 176, 1154-1159.

Lee S-K., Mills A., Lepre A., *An intelligence ink for oxygen*, *Chemical Communicators*, 2004, 1912-1913.

Mills A., *Optical oxygen sensors*, *Platinum Metals Review*, 1997, 41 (3), 115-127.

Mills A., *Oxygen indicators and intelligent inks for packaging food*, *Chemical Society Reviews*, 2005, 34, 1003-1011.

Mills A., Hazafy D., *A solvent-based intelligence ink for oxygen*, 2008, 133, 213-218.

Mitsubishi Gas Chemical Company Inc., <http://www.mgc.co.jp/eng/products/abc/ageless/index.html> (dostęp 01.01.2016 r.).

Ollis D., Mills A., Lawrie K., *Kinetics of methylene blue (MB) photocatalyzed reduction and dark regeneration in colorimetric oxygen sensor*, *Applied Catalysis B: Environmental*, 2016, 184, 201-207.

Puligundla P., Jung J., Ko S., *Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications*, *Food Control*, 2012, 25 (1), 328-333.

Rooney M.L., *Active Food Packaging*, Blackie, London, 1995.

Sobczyński A., Gimenez J., Cervera-March S., *Photodecomposition of Phenol in a Flow Reactor: Adsorption and Kinetics*, *Monatshefte für Chemie*, 1997, 128, 1109-1118.

Smolander M., Hurme E., Ahvenainen R., *Leak indicators for modified-atmosphere packages*, *Trends in Food Science & Technology*, 1997, 3, 101-106.

Vu C.H.T., Won K., *Novel water-resistant UV-activated oxygen indicator for intelligent food packaging*, *Food Chemistry*, 2013, 140, 52-56.

Yoshikawa Y., Nawata T., Otto M., Fujii Y., *US Patent 4169811*, 1979.

Zhujun Z., Seitz W.R., Optical sensor for oxygen based on immobilized haemoglobin, Analytical Chemistry, 1986, 58, 220-222.

SYLWIA MILDNER-SZKUDLARZ¹, ALEKSANDER SIGER², KRZYSZTOF DWIECKI²,
DAWID BISKUP¹, MAŁGORZATA NOGAŁA-KAŁUCKA²

¹*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

mildners@up.poznan.pl

²*Katedra Biochemii i Analizy Żywności*

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OPTIMALIZACJA I WALIDACJA OZNACZANIA N^E-KARBOKSYMETYLOLIZYNY W SKÓRCIE PIECZYWA METODĄ RP-HPLC-FLD

Streszczenie

Badania ostatnich lat wykazały, że w reakcji Maillarda powstaje grupa związków uznana za kancerogenną lub mutagenną dla organizmów żywych. Zdaniem wielu ekspertów, niektóre związki powstałe w reakcji glikacji są jednym z czynników mogących brać udział w patogenezie zaburzeń gospodarki węglowodanowej, włączając neuropatię, nefropatię, retinopatię, zaćmę a nawet sprzyjają chorobie Alzheimera, arteriosklerozie, starzeniu i nowotworom. W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się N^E-karboksymetylolizynie (CML), której przypisuje się wyżej wymienione właściwości. Do ilościowego oznaczania CML wykorzystywane są głównie techniki chromatograficzne (RP-HPLC, LC-MS/MS, GC-MS)) oraz metody inimmunoenzymatyczne (ELISA).

Celem pracy było opracowanie procedury analitycznej pozwalającej oznaczyć CML w skórce pieczywa. Procedura analityczna została zoptymalizowana, a następnie poddana procesowi walidacji. W procedurze analitycznej zoptymalizowane zostały warunki redukcji, hydrolizy, derywatyzacji oraz parametry rozdziału chromatograficznego (RP-HPLC-FL).

Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) wynosiły odpowiednio: 0,42 ng/mL i 1,29 ng/mL. Średni odzysk metody wynosił ~ 100% (SD = 10,03%) a precyzja 3,65%. Stwierdzono, że metoda chromatograficzna wykorzystująca odwrócony układ faz z detekcją fluorymetryczną to technika, którą z powodzeniem można zastosować do ilościowej analizy CML w produktach zbożowych.

Słowa kluczowe: N^E-karboksymetylolizyna, produkty zbożowe, optymalizacja, walidacja

Wprowadzenie

Podczas obróbki termicznej początkowo formowane w reakcji Maillarda produkty przegrupowania Amadori mogą w zależności od czasu i temperatury procesu, ulegać dalszym reakcjom tworząc wczesne, pośrednie i zaawansowane produkty reakcji Maillarda [Maillard, 1912].

CML jest produktem reakcji Maillarda o stwierdzonym negatywnym wpływie na organizmy żywe i uznawany jest jako wskaźnik zmian zachodzących pod wpływem procesów technologicznych w żywności bogatej w sacharydy. Badania dowodzą, że poziom

CML znacząco wzrasta w tkankach ludzi cierpiących na hiperglikemię, będącą koronnym objawem cukrzycy typu 2 [Sugimoto i in., 1997]. Nawet w przypadku braku hiperglikemii i hiperlipidemii, CML występuje w wysokich stężeniach w granulach lipofuscyny w nadnerczach [Shimokawai in., 1998], w tkankach mózgowych w chorobie Alzheimera [Takeda i in., 2001], w białkach odkładanych w amyloidozie [Miyatai in., 1993], w kolagenie i w białkach osocza w mocznicy [Sebekova i in., 2001], a także w białkach wątroby u zwierząt narażonych na stres oksydacyjny przez karmienie paszą zawierającą bardzo duże stężenie żelaza [Ling i in., 2001]. CML jest także obecna w tkankach płodu [Omura i in., 1983], w wyniku wysokiego stężenia metabolitów rybozy, które są wykorzystywane do syntezy DNA i RNA.

N^ε-karboksymetylolizyna powstaje w wyniku degradacji produktów przegrupowania Amadorii, fruktozolizyny, która ulega utlenianiu do CML. Inną drogą powstawania CML jest połączenie związku α -dikarbonylowego jakim jest glioksal z lizyną [Ames, 2008].

N^ε-karboksymetylolizyna jest trwałym związkiem, co ułatwia analizę i jest wykorzystywana jako wskaźnik jakości odżywczej żywności poddawanej obróbce cieplnej. Do wykrywania i ilościowego oznaczania CML wykorzystywane są różne metody analityczne. Należą do nich metody immunoenzymatyczne (ELISA), chromatografia cieczowa (RP-HPLC, LC-MS/MS) oraz chromatografia gazowa (GC-MS). Metody immunoenzymatyczne są szybkie i stosunkowo tanie. Jednakże metody te, w których stosuje się przeciwciała lub antygeny znakowane enzymami nie są wolne od wad. Trudności i ograniczenia wynikają z obecności identycznych epitopów, tzn. miejsc w antygenach, do których przyłącza się przeciwciało, co wiąże się z koniecznością kontroli specyficzności antyserum (przeciwciała) przez oznaczanie poziomu reakcji krzyżowych. Inne metody analityczne do oznaczania zawartości CML w produktach spożywczych to głównie techniki chromatograficzne. Najczęściej stosowana jest chromatografia cieczowa połączona z detekcją fluorescencyjną lub spektrometrią mas. W analizie chromatograficznej z detekcją fluorymetryczną wymagane jest przeprowadzenie procesu derywatyzacji. Połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrem mas pozwala pominąć etap derywatyzacji, zwiększając czułość oraz selektywność metody [Kinter i Sherman, 2000].

Celem pracy było opracowanie procedury analitycznej pozwalającej oznaczyć CML w skórce pieczywa wykorzystując metodę chromatografii cieczowej z detekcją fluorymetryczną. Procedura analityczna została zoptymalizowana, a następnie poddana procesowi walidacji.

Material i metody

Material badany

Do badań użyto standardu N^ε-karboksymetylolizyny o czystości powyżej 95% (NeoMPS, Francja), 2-merkaptotanol, borowodorek sodu, kwas borowy, bezwodny tetraboran sodu, wodorotlenek sodu, kwas solny zakupione w firmie Sigma-Aldrich, oraz pieczywo pszenne przygotowane według metody opracowanej przez Mildner-Szkudlarz i in. [2011].

Wykonanie oznaczeń

Procedura przygotowania prób

Ze świeżo wypieczonego pieczywa oddzielono skórkę od miękkiszu i poddano liofilizacji (Heto Driwinner, DW 1 0-60 E, Dania). Po rozdrobnieniu w młynku laboratoryjnym IKA (M-20, IKA-Werke, Niemcy), zapakowano do woreczków z polietylenu i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analizy.

Redukcja

Do 200 mg próby dodano 4 mL buforu boranowego (0,2 M o pH 9,4) oraz 2 mL borowodoru sodu (1 M w 0,1 M NaOH). Proces redukcji prowadzono 4 lub 12 godzin w temperaturze pokojowej.

Hydroliza

Po upływie czasu redukcji do prób dodawano 10 M kwasu solnego w takiej ilości, aby końcowe stężenie HCl w objętości próby wynosiło 6 M. Kolby okrągłodenne z próbami połączono z chłodnicą zwrotną, przedmuchano gazem obojętnym (azotem), następnie prowadzono proces hydrolizy w temperaturze 110°C przez okres 10 lub 20 godzin.

Przygotowanie prób do derywatyzacji

Po upływie czasu hydrolizy próby odparowano do sucha przy użyciu rotacyjnej wyparki próżniowej Rotavapor R-210 (Büchi, Szwajcaria), przepłukano 10 mL dejonizowanej wody i przefiltrowano przy użyciu filtrów strzykawkowych. Następnie pobrano 2 mL filtratu, odparowano do sucha, a suchą pozostałość przeniesiono ilościowo przy użyciu buforu boranowego (0,2 M o pH 9,4) do kolb miarowych o pojemności 10 mL. Próby przechowywano w temperaturze 4°C do czasu derywatyzacji.

Derywatyzacja

10 mg OPA rozpuszczono w 2 mL metanolu. Następnie pobrano 1 mL mieszaniny, do której dodano 3992 μL buforu boranowego (0,2 M o pH 9,9) oraz 8 μL 2-merkaptotolanu. Aktywność odczynnika derywatyzującego uzyskano po upływie 90 minut (Hanczko i Molnar-Perl, 2003). Po upływie czasu potrzebnego do uzyskania pełnej aktywności odczynnika derywatyzującego pobierano 200 μL próby, do której dodawano 100 μL odczynnika OPA. Próby analizowano po upływie 3 min.

Analiza chromatograficzna

Jakościowe i ilościowe oznaczenie zawartości CML wykonano wysokosprawną chromatografią cieczową HPLC (Waters 600 Asc. Milord). Chromatograf wyposażony był w pompę gradientu fazy ruchomej (Waters 600), kolumnę Waters Sun Fire C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm) detektor fluorymetryczny (Waters 474) oraz komputerowy system sterowania Empower 3. Temperatura kolumny była stała (20°C), utrzymywana przy pomocy termostatu do kolumn typ Jetstream 2 Plus. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina buforu

octanowego z acetonitrylem [A] oraz acetonitryl [B]. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 mL/min. Rozdział miał charakter gradientowy. Pomiarów dokonano przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 340$ nm i emisji $\lambda = 455$ nm dla detektora fluorymetrycznego. Identyfikacji dokonano porównując czasy retencji piku CML-u na chromatogramach analizowanych prób i roztworu wzorcowego oraz poprzez użycie wzorca wewnętrznego.

Walidacja metody

Procedura analityczna została poddana procesowi walidacji, w której wyznaczono takie parametry jak liniowość, precyzję, dokładność oraz granicę wykrywalności i oznaczalności.

Do badań liniowości wykorzystano 10 roztworów o różnych stężeniach CML. Wyznaczono równanie regresji liniowej, współczynnik korelacji (R) oraz współczynnik determinacji (R^2), które są miarą tego parametru.

Korzystając z metody najmniejszych kwadratów wyznaczono także czułość zoptymalizowanej metody z nachylenia krzywej kalibracyjnej.

Precyzję określono poprzez wyznaczenie odchylenia standardowego (SD) oraz współczynnika zmienności (Wz):

$$W_z = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Dokładność przedstawiono jako % odzysku analitu, dodanego do znanej ilości próbki:

$$x = \frac{\bar{x}}{c} \times 100\%$$

gdzie: $\bar{x}$ – wartość średnia doświadczalna (stężenie)

c – stężenie przygotowanych roztworów

Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) wyliczono zgodnie z Irakli i in. [2012] wykorzystując do tego równanie regresji z krzywych wzorcowych. Granice wykrywalności wyznaczono ze wzoru $LOD = 3,3b/a$, a granice oznaczalności $LOQ = 10b/a$, gdzie a i b to współczynnik kierunkowy prostej i wyraz wolny.

Analiza statystyczna

Analizy statystycznej dokonano przy pomocy programu Statistica 10 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK., USA). W analizie sprawdzano rozkład normalny otrzymanych danych za pomocą testu Shapiro-Wilka. W przypadku gdy nie stwierdzono rozkładu normalnego – stosowano testy nieparametryczne. W przypadku istnienia rozkładu normalnego wykorzystano jednoczynnikową oraz wielowymiarową analizę wariancji (ANOVA). Sprawdzenie założenia jednorodności wariancji wykonano za pomocą testu Leavena. W przypadku wykazania istotnych różnic wykonano analizę post-hoc przy pomocy testu Tukey'a w celu wyznaczenia grup jednorodnych. Analizując zależności pomiędzy badanymi cechami wykorzystywano współczynnik korelacji liniowej Pearsona, a jego statystyczną istotność sprawdzono testem t-Studenta.

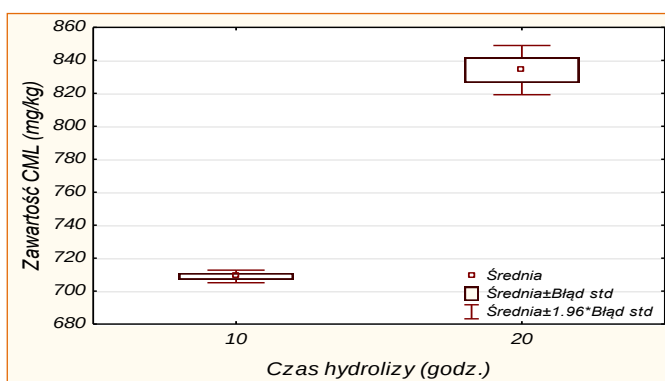
Wyniki i dyskusja

Optymalizacja procesu przygotowania prób

Z uwagi na rozbieżne dane literaturowe dotyczące procesu przygotowania prób, w tym czasu redukcji i hydrolizy, rodzaju stosowanych filtrów oraz procesu derywatywacji, podjęto próbę zoptymalizowania procedury analitycznej dla produktów zbożowych.

Pierwszym etapem przygotowania prób jest proces redukcji, pozwalający na otrzymanie z produktów przegrupowania Amadori odpowiednich form alkoholowych tych produktów, które są bardziej stabilne podczas przeprowadzania hydrolizy [Ames, 2008]. W literaturze dostępne są różne dane dotyczące czasu redukcji. Peng i in. [2010] oznaczając zawartość CML w skórce pieczywa pszennego zastosowali czterogodzinną redukcję borowodorkiem sodu w temperaturze pokojowej. Natomiast Assar i in. [2009] analizując różne produkty spożywcze, w tym masło, chleb, czy mleko, stosowali dwunastogodzinną redukcję borowodorkiem sodu. Podobnie Srey i in. [2010] przeprowadzali 12-godzinną redukcję w temperaturze 4°C. Dlatego też porównano wyniki zawartości CML w próbach poddanych 4- i 12-godzinnej redukcji. Analiza statystyczna wykazała brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wynikami uzyskanymi po cztero- i dwunastogodzinnej redukcji, dlatego ze względu na oszczędność czasu zdecydowano się na czterogodzinną redukcję.

Drugim etapem przygotowania prób jest proces hydrolizy kwasowej prowadzonej w temperaturze 110°C przy użyciu 6 M HCl, która ma na celu rozerwanie połączeń CML z białkami. Można także przeprowadzić hydrolizę enzymatyczną, jednak proces hydrolizy kwasowej uważany jest za niezawodny [Ames, 2008]. Dokonano analizy zawartości CML w skórce chleba po 4 godzinnej redukcji borowodorkiem sodu stosując hydrolizę kwasową prowadzoną przez 10 oraz 20 godzin. Tak jak w przypadku czasu redukcji, doboru czasu hydrolizy dokonano w oparciu o dane literaturowe [Assar i in., 2009; Srey i in., 2010]. Na rysunku 1 przedstawiono otrzymane zawartości CML w skórce pieczywa stosując różny czas hydrolizy kwasowej.

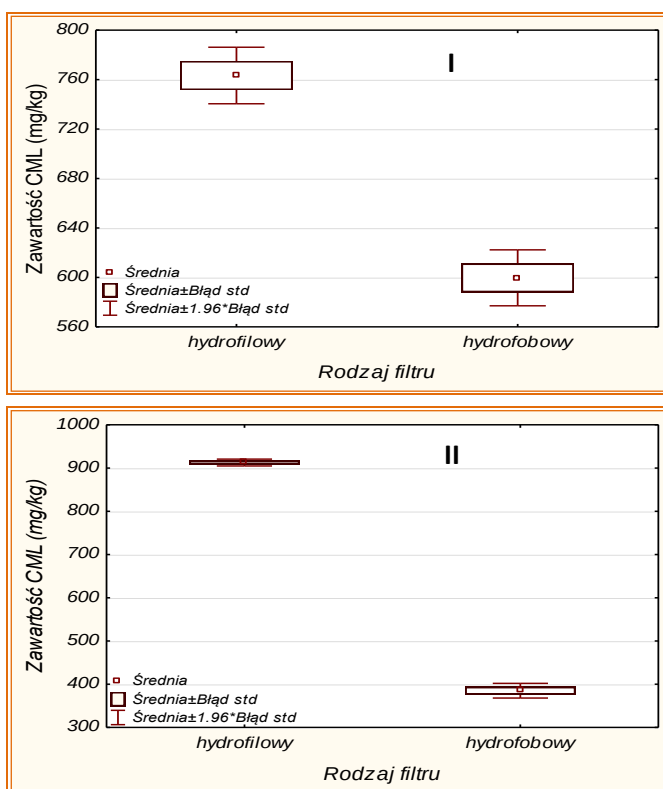


Rysunek 1. Zawartość CML po 10 i 20 godzinnej hydrolizie – analiza bez uwzględnienia rodzaju filtru

Analiza statystyczna wykazała, iż czas hydrolizy ma statystycznie istotny wpływ na zawartość badanego związku ($p < 0,001$). Po 20-godzinnej hydrolizie uzyskano około

13% większą zawartość CML w analizowanych próbkach w porównaniu z 10-godzinną, dlatego też do dalszych badań wybrano dłuższy czas tego etapu przygotowania prób.

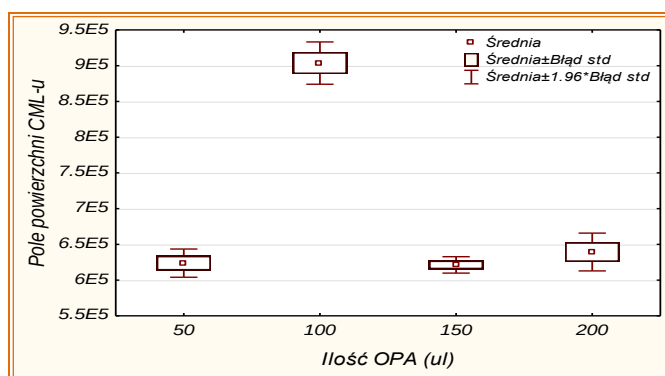
W kolejnym etapie badań podjęto się oceny wpływu zastosowanego filtra do oczyszczania prób na stężenie CML. W badaniach zastosowano filtry z membraną teflonową o charakterze hydrofilowym i hydrofobowym, a proces hydrolizy prowadzono 10 i 20 godzin. Na rysunku 2 przedstawiono zależność stężenia CML od zastosowanego filtra przy dziesięciogodzinnej (I) i dwudziestogodzinnej (II) hydrolizie. Odnotowano statystycznie istotnie ($p < 0,001$) wyższe stężenie CML stosując filtry hydrofilowe oraz dwudziestogodzinną hydrolizę prób.



Rysunek 2. Wpływ zastosowanego filtra na stężenie CML przy dziesięciogodzinnej (I) i dwudziestogodzinnej (II) hydrolizie

Produkty reakcji Maillarda powstające we wczesnej fazie tej reakcji tworzą bezbarwne produkty, które nie absorbują światła w zakresie UV przy długości fali 280 nm [Nursten 2005]. W takich przypadkach pomocna jest derywatywizacja analitów. Optymalizacji poddano czas derywatywizacji oraz ilość zastosowanego odczynnika derywatyzyngącego. W przypadku analizy czasu derywatywizacji przygotowano próby zgodnie z przyjętą i zoptymalizowaną metodyką, natomiast wszystkie próbki zostały połączone z odczynnikami derywatyzyngącym (OPA) i wstawione do autosamplera, który co 45 min. nastrzykiwał próbę na kolumnę. Tak więc czas derywatywizacji pierwszej próby wynosił 3 min, a w każdej kolejnej czas działania odczynnika zwiększał się o kolejne

45 min. Zaobserwowano, że im dłuższy czas derywatyzacji tym gorszy rozdział chromatograficzny. Ponadto, odnotowano brak stabilności czasu retencji i kształtu pików oraz powtarzalności powierzchni pików. Podsumowując wykazano, że należy bardzo dokładnie przestrzegać czasu od momentu dodatku odczynnika derywatyzującego do czasu wprowadzenia próbki na kolumnę chromatograficzną. Dobierając ilość odczynnika derywatyzującego, próby przygotowano z dodatkiem OPA w ilości 50, 100, 150 oraz 200 μL . Analiza statystyczna wykazała, że największe pola powierzchni pików CML odnotowuje się przy dodatku odczynnika derywatyzującego w ilości 100 μL (Rys. 3). Zastosowanie mniejszego lub większego dodatku odczynnika derywatyzującego powodowało statystycznie istotny ($p < 0,001$) spadek zawartości CML w analizowanych próbach.



Rysunek 3. Wpływ ilości odczynnika derywatyzującego na pole powierzchni pików CML

Walidacja chromatograficznej metody oznaczania zawartości CML

Parametry walidacji metody oznaczania CML w pieczywie przedstawiono w tabeli 1. Zoptymalizowana metoda RP-HPLC-FLD do analizy CMLw produktach zbożowych charakteryzowała się satysfakcjonującą liniowością w badanym zakresie stężeń. Krzywą kalibracyjną dla CML opisywało równanie: $y = 48327,36x + 280814,8$; $R = 0,998$; $R^2 = 0,996$. Wyniki mieszczą się w przyjętym kryterium ($R^2 \geq 0,995$) [Eurachem Guide, 2000].

Tabela 1. Parametry walidacji metody oznaczania CML w skórce pieczywa metodą RP-HPLC-FLD

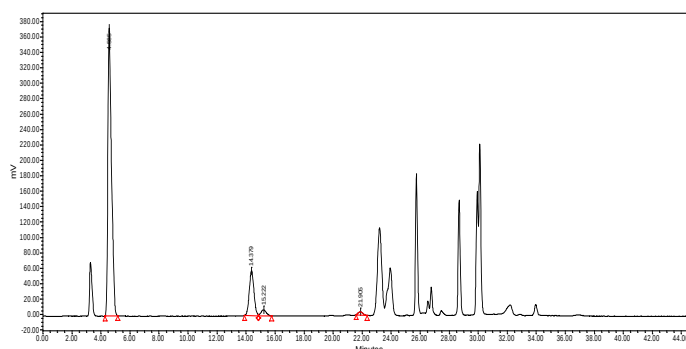
Równanie	$y = 48327,36x + 280814,8$
R^2	0,996
Czułość [pg/mL]	0,02
Granica wykrywalności (LOD) [ng/mL]	0,42
Granica oznaczalności (LOQ) [ng/mL]	1,29
Precyzja CV [%]	3,65
Odzysk [%]	102,4

Wykazano, że zakres roboczy opracowanej procedury analitycznej wynosi od 0 do 140 ng/mL. Przy wyznaczaniu parametru liniowości wyznaczono także czułość

metody analitycznej, czyli najmniejszą różnicę w zawartości analitu, jaka może być oznaczona za pomocą danej metody. Odnotowano, iż zastosowana metoda charakteryzuje się dużą czułością (0,02 pg/mL) (Tab. 1).

Wyznaczone wg Irakli i in. [2012] granice wykrywalności (LOD) i granice oznaczalności (LOQ) wynosiły odpowiednio 0,42 ng/mL, i 1,29 ng/mL (Tab. 1). Analizując precyzję metody wykonano 6 powtórzeń dla standardu CML. Precyzja oznaczeń była na bardzo wysokim poziomie, CV % wynosił 3,65%. Na badanym poziomie dopuszczalny współczynnik zmienności może osiągać wartość od 3,7 do 5,3% według normy [PN-EN ISO/IEC 17025]. W badanym zakresie stężeń aby metodę uznać za dokładną odzysk musi mieścić się w granicy 85-110%. Odzysk na poziomie 102,4% świadczy o satysfakcjonującej dokładności (Tab. 1).

Dokonując walidacji metody należy pamiętać o analizie próbek rzeczywistych, w których oprócz badanego związku występują inne substancje, posiadające grupy aminowe wchodzące w reakcje z odczynnikami derywatyzującym. W tym celu dokonano analizy selektywności metody na rzeczywistych próbach pieczywa. Na rysunku 4 przedstawiono przykładowy chromatogram dla analizowanej skórki pieczywa.



Rysunek 4. Przykładowy rozdział chromatograficzny próby rzeczywistej

Obliczone współczynniki opisujące sprawność i zdolność rozdzielczą kolumny przedstawiono w tabeli 2. Dowodzą one, że zoptymalizowana metoda analizy zawartości CML w skórce pieczywa jest selektywna. Wszystkie parametry mieszczą się w ogólnie przyjętych normach dotyczących procesów separacji. Uzyskany współczynnik retencji dla badanej substancji wynosił 3,2, a wartość zdolności rozdzielczej wynosiła 3,5.

Tabela 2. Parametry opisujące sprawność kolumny rozdziału próby rzeczywistej skórki pieczywa

Czas retencji	Prędkość migracji	Współczynnik retencji	Współczynnik rozdzielania	Zdolność rozdzielcza	Liczba pólak teoretycznych	Wysokość pólki [cm]
4,56	0,30	0,35	9,27	24,40	437,5	0,034
14,37	0,96	3,26	1,08	3,56	3589,5	0,004
15,22	1,02	3,51	1,56	16,30	4536,6	0,003

Wnioski

Przeprowadzone badania dowodzą że najbardziej istotnym (krytycznym) punktem procedury analitycznej oznaczania zawartości CML jest etap przygotowania prób przed analizą chromatograficzną (czas hydrolizy, zastosowany rodzaj filtru oraz proces derywatyzacji). Należy podkreślić, że zastosowana metoda RP-HPLC-FLD oznaczania zawartości CML w produktach zbożowych charakteryzuje się dobrą precyzją, dokładnością i odzyskiem, co zostało potwierdzone wynikami walidacji. Ponadto opisaną metodę cechują zadawalające parametry opisujące zdolność rozdzielczą układu chromatograficznego oraz możliwość oznaczania CML na bardzo niskim poziomie.

Badania realizowano w ramach grantu NCN (2013/09/B/NZ9/01626).

Literatura

- Ames J.M., Determination of N^ε-(carboxymethyl)lysine in foods and related systems, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1126, 20-24.
- Assar S.H., Moloney C., Lima M., Magee R., Ames J.M., Determination of N^ε-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Amino Acids*, 2009, 36, 317-329.
- Eurachem/Citac Guide CG 4 2000. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition.
- Irakli M.N., Samanidou V.F., Papadoyannis I.N., Optimization and validation of the reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection method for the separation of tocopherol and tocotrienol isomers in cereals, employing a novel sorbent material, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60 (9), 2076-2082.
- Kinter M., Sherman N.E., Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Wiley-Interscience, New York, USA, 2000.
- Ling X., Nagai R., Sakashita N., Takeya M., Horiuchi S., Takahashi K., Immunohistochemical distribution and quantitative biochemical detection of advanced glycation endproducts in fetal to adult rats and in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Laboratory investigation*, 2001, 81, 845-861.

Maillard L-C., Action des acides aminés sur les sucres. Formation des Mélanoidins par voieméthodique, *Comptes Rendus*, 1912, 154, 66-68.

Mildner-Szkudlarz S., Zawirska-Wojtasiak R., Szwengiel A., Pacyński M., Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread, *International Journal of Food Science & Technology*, 2011, 46, 1485-1493.

Miyata T., Oda O., Inagi R., Iida Y., Araki N., Yamada N., Horiuchi S., Taniguchi N., Maeda K., Kinoshita T., β 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis, *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 92, 1243-1252.

Nursten H., The Maillard reaction chemistry, biochemistry and implications, *The Royal Society of Chemistry*, UK, 2005.

Omura H., Jahan N., Shinohara K., Murakami Y., *The Maillard reaction in foods and nutrition*. American Chemical Society, Washington, DC, 1983.

Peng X., Ma J., Cheng K., The effect of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread, *Food Chemistry*, 2010, 119, 49-53.

PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.

Sebekova K., Blazicek P., Syrova D., Krivosikova Z., Spustova V., Heidland A., Schinzel R., Circulating advanced glycation endproduct levels in rats rapidly increase with acute renal failure, *Kidney International Supplements*, 2001, 78, 58-62.

Shimokawa I., Higami Y., Horiuchi S., Iwasaki M., Ikeda T., Advanced glycosylation end products in adrenal lipofuscin, *The Journals of Gerontology*, 1998, 53, 49-51.

Srey C., Hull G.L.J., Connolly L., Elliott C.Y., del Castillo M.D., Ames J.M., Effect of inhibitor compounds on N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) and N^ε-(carboxyethyl)lysine (CEL) formation in model foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 12036-12041.

Sugimoto K., Nishizawa Y., Horiuchi S., Yagihashi S., Localization in human diabetic peripheral nerve of N^ε-(carboxymethyl)lysine-protein adducts, an advanced glycation end product, *Diabetologia*, 1997, 40, 1380-1387.

Takeda A., Wakai M., Niwa H., Dei R., Yamamoto M., Li M., Goto Y., Yasuda T., Nakagomi Y., Watanabe M., Inagaki T., Yasuda Y., Miyata T., Sobue G., Neuronal and glial advanced glycation endproduct [N^ε-(carboxymethyl)lysine] in Alzheimer's disease brains, *Acta Neuropathologica*, 2001, 101, 27-35.

HALINA MAKALA

Zakład Technologii Mięsa i Tłuszczu

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

halina.makala@ibprs.pl

PORÓWNANIE METOD OZNACZANIA ZAWARTOŚCI CHLORKU SODU W PRZETWORACH MIĘSNYCH

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było porównanie wyników oznaczania zawartości chlorku sodu w przetworach mięsnych, uzyskanych dwiema metodami: metodą potencjometryczną i metodą techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES) oraz ocena przydatności tych metod dla potrzeb rutynowej kontroli towaroznawczej.

Materiał badawczy stanowiły przetwory mięsne o zróżnicowanej zawartości chlorku sodu. We wszystkich próbkach zawartość chlorku sodu oznaczano dwiema metodami: metodą potencjometryczną oraz techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie.

Zasada metody potencjometrycznej polegała na przygotowaniu zawiesiny oznaczanej próbki w wodzie a następnie potencjometrycznym miareczkowaniu roztworem azotanu (V) srebra za pomocą elektrody.

Metoda techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES) oznaczenia sodu polegała na zmineralizowaniu materiału biologicznego kwasem azotowym, a następnie pomiarze stężenia pierwiastka techniką emisyjnej spektrometrii z plazmą wzbudzoną indukcyjnie. Zawartość sodu wyznaczoną z krzywej kalibracyjnej przeliczano na zawartość chlorku sodu ze wzoru: zawartość NaCl = 2,5 x Na [g/100g]. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej na poziomie istotności $P \leq 0,05$, przy pomocy programu Statistica 6.0 PL.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż do rutynowej kontroli mięsa i przetworów mięsnych przydatne są obie metody. Nie są one obciążone błędem systematycznym stałym. Obie metody nie są nieskomplikowane, są szybkie w wykonaniu i charakteryzują się dużą czułością i precyzją oznaczania.

Słowa kluczowe: przetwory mięsne, oznaczanie zawartości soli, metodyka

Wprowadzenie

Sód dostarczany jest do organizmu człowieka głównie w postaci soli kuchennej (około 90%), która jest podstawowym dodatkiem do żywności, wspomagającym proces konserwowania. dodatek technologiczny lub substancja poprawiająca smak. Zaledwie 10% chlorku sodu pochodzi z nieprzetworzonych produktów spożywczych, gdzie występuje on w charakterze naturalnego składnika warzyw, mleka, mięsa czy ryb. Źródłem 50-60% soli w diecie jest jej dodatek w procesach kulinarnych i doprawiania żywności przy stole,

30-40% - stanowią produkty przetwarzane przemysłowo [Schlegel-Zawadzka i Kowalczyk, 2010; Jeżewska i in., 2011].

W przetwórstwie mięsa chlorek sodu jest substancją powszechnie stosowaną. Poza nadaniem charakterystycznego smaku i zapachu oraz zwiększeniem trwałości mikrobiologicznej, stosowanie soli kuchennej w przetwórstwie mięsa przysparza wielu innych korzyści technologicznych, jak np. zwiększenie wodochłonności oraz poprawienie właściwości żelujących i emulgujących [Krieger-Mettbach, 2004; Konieczny i in., 2005].

Zdaniem ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia codzienne spożycie nie powinno się przekraczać dawki 5 g soli (ok. 2 g sodu). Według najnowszych norm Instytutu Żywności i Żywienia wystarczające spożycie chlorku sodu wynosi 3,8 g/dzień [Jarosz, 2012, WHO 2012]. Dieta składająca się w większości z nieprzetworzonych produktów pochodzenia roślinnego (bez dodatku soli) dostarcza około 0,6 g sodu dziennie. Obserwowana w ostatnich latach zmiana sposobu żywienia, związana z ogólną zmianą stylu życia spowodowała, szczególnie w społeczeństwach krajów wysoko rozwiniętych, zwiększenie spożycia produktów wysoko przetworzonych, zawierających duże ilości dodatkowej soli. Z badań naukowych wynika, że pobranie soli z diety w Polsce i na świecie znacznie przekracza zalecenia. Spożycie chlorku sodu przez statystycznego Europejczyka szacowane jest na około 10 - 15 g na dobę. Na podstawie badań budżetów gospodarstw domowych, koordynowanych przez Główny Urząd Statystyczny łączne spożycie chlorku sodu (sól kuchenna + sól pochodzący ze spożytej żywności, przeliczony na sól) w polskich gospodarstwach domowych w 2007 r. wynosiło średnio 12 g na osobę dziennie, czyli było prawie 2, 5 razy wyższe od zaleceń WHO. W związku z tym coraz większą uwagę zwraca się na niekorzystne działanie soli, która zwiększa ryzyko nadciśnienia i chorób sercowo-naczyniowych [Szostak i Jarosz, 2010] jak i stymuluje tworzenie szkodliwych produktów utleniania lipidów. Niepożądane przemiany lipidów mogą ograniczać możliwości technologicznego i żywieniowego wykorzystania surowców, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego [Konieczny i in., 2005; Ruusunen i Puolanne, 2005; Desmond, 2006].

Jednym z ważniejszych powodów zaleceń ograniczenia spożycia mięsa i produktów mięsnych jest dość duża zawartość w nich tłuszczów, będących istotnym źródłem cholesterolu oraz kwasów tłuszczowych nasyconych. Zwraca się uwagę ponadto na dużą zawartość soli kuchennej w przetworach, a także na różnorodność substancji dodatkowych stosowanych przy przetwarzaniu mięsa. Powszechność konsumpcji produktów mięsnych w diecie stała się bodźcem do podjęcia działań w kierunku poprawy ich jakości żywieniowej. Obecnie działania producentów żywności zmierzają do modyfikacji składu i wartości odżywczej produktów mięsnych [Konieczny i Górecka, 2011; Kozan i in., 2012].

Na podstawie zaleceń żywieniowych oraz specjalistycznych programów i raportów dotyczących zagrożeń wynikających z nieprawidłowego żywienia prezentowanych przez różne instytucje i organizacje, zarówno krajowe jak i międzynarodowe, zmieniły się również preferencje w odniesieniu do zawartości soli w przetworach w opiniach świadomego konsumenta. Jednym z istotnych kierunków działań w celu obniżenia ilości soli spożywanej z produktami przemysłowo przetworzonymi może być zmniejszenie ich porcji. Pomocne w tym celu jest umieszczanie przez producenta wiarygodnej informacji odnośnie zawartości soli, chlorku sodu lub sodu w określonej ilości produktu. Od 13 grudnia 2014 r. stosowane jest w Polsce rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011

w sprawie przekazywania informacji dotyczących etykietowania żywności. W ramach tego rozporządzenia dopiero od 13 grudnia 2016 r. obowiązkowe będzie podawanie na opakowaniach informacji takich jak: wartość energetyczna, ilość tłuszczu, kwasów tłuszczowych nasyconych, węglowodanów, cukrów, białka jak również soli [Rozporządzenie (UE) 1169/2011; Majchrzak, 2014].

Obecnie producenci podają takie informacje dobrowolnie. Istotne jest także aktywne kształtowanie przyzwyczajeń konsumentów do mniej słonego smaku. Dlatego też dla producentów żywności, laboratoriów i służb kontrolnych istotne są stosowane metody do jej oznaczania, w sensie wiarygodności i dokładności uzyskiwanych wyników.

Wiedza na temat soli kuchennej, ilości chlorku sodu w rozmaitych produktach stosowanych na co dzień oraz racjonalne jej stosowanie mają kluczowe znaczenie dla życia człowieka. Poziom zawartości chlorku sodu w mięsie i przetworach mięsnych jest podstawowym wyznacznikiem jakości i podlega kontroli towaroznawczej. Powszechnie stosowaną metodą oznaczania zawartości chlorku sodu w mięsie i przetworach mięsnych jest metoda potencjometryczna PN ISO 1841-2:2002. W związku z wymaganym podawaniem na opakowaniu zawartości sodu do powszechnie stosowanych metod można zaliczyć metodę techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES).

Cel i zakres badań

Celem przeprowadzonych badań było porównanie wartości wyników oznaczania zawartości chlorku sodu w przetworach mięsnych, uzyskanych dwiema metodami: metodą potencjometryczną i techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES) oraz ocena przydatności tych metod dla potrzeb rutynowej kontroli towaroznawczej.

Materiał i metodyka

Materiał badawczy stanowiło 35 próbek rynkowych przetworów mięsnych o zróżnicowanej zawartości chlorku sodu, w tym: 22 kielbas, 8 szynki surowo dojrzewających, 1 wyrób garmażeryjny, 2 konserwy oraz 2 pasztety. We wszystkich próbkach zawartość chlorku sodu oznaczano równoległe dwiema metodami: metodą potencjometryczną oraz techniką emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie.

Zasada metody potencjometrycznej oznaczenia chlorku sodu polegała na przygotowaniu zawiesiny oznaczanej próbki w wodzie a następnie potencjometrycznym miareczkowaniu roztworem azotanu (V) srebra za pomocą elektrody. Ilość chlorków wyrażoną jako NaCl, obliczano z ilości azotanu (V) srebra zużytego do ich związania. Oznaczenie przeprowadzono na aparacie 785 TITRINO DMT firmy Methron.

Oznaczenie sodu techniką emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES) polega na zmineralizowaniu materiału biologicznego kwasem azotowym [PN-EN 13805], a następnie pomiarze stężenia pierwiastka techniką emisyjnej spektrometrii z plazmą wzbudzoną indukcyjnie ICP-AES z wykorzystaniem spektrometru firmy Jobin Yvon Emission typ JY 138 Ultrac. W metodzie ICP-AES źródłem wzbudzenia jest plazma argonowa, która osiąga temperaturę ok. 10000K. Analizowana próbka w postaci

roztworu, jest wprowadzana do rozpylacza, a utworzony w nim aerozol jest transportowany przez gaz nośny (argon) do rdzenia plazmy. W gorącej plazmie próbka jest rozbijana do atomów, które ulegają wzbudzeniu i emitują pochłoniętą energię w postaci promieniowania elektromagnetycznego, charakterystycznego dla danego pierwiastka. Wyemitowane promieniowanie trafia do spektrometru, gdzie w monochromatorze jest rozszczepiane i rozdzielane na poszczególne linie. Poszczególne linie widmowe są doprowadzane do fotopowielaczy, w których sygnał optyczny jest przetwarzany na sygnał cyfrowy. Długość fali linii Na 589.952 nm. Zawartość sodu wyznaczoną z krzywej kalibracyjnej przeliczano na zawartość chlorku sodu ze wzoru: zawartość NaCl = $2,5 \times \text{Na}$ [g/100g].

Wszystkie oznaczenia wykonano w co najmniej dwóch powtórzeniach a uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej na poziomie istotności $P \leq 0,05$, przy pomocy programu Statistica 6.0 PL.

Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki pomiaru zawartości chlorku sodu w poddanych ocenie przetworach mięsnych przedstawiono w Tab.1. Na podstawie przedstawionych danych można stwierdzić, że zawartość chlorku sodu w ocenianych próbkach mieściła się w szerokim zakresie od 1,33g/100g, dla wyrobu garmażeryjnego, skrzydełek kurzych w panierce do 5,34 g/100g dla szynki szwarcwaldzkiej, wyrobu regionalnego, surowo dojrzewającego. W większości, 21 na 35 badanych próbek, zawartość soli nie przekraczała 3g/100g produktu. Były to w kielbasy o różnym stopniu rozdrobnienia, konserwy mięsne i pasztety, dla których wg nieobligatoryjnej normy PN-A 82007:1996 zawartość soli nie powinna przekraczać 3%.

Poddane ocenie próbki o zawartości soli większej od 3g/100g stanowiły produkty surowe i surowo dojrzewające, te które nie podlegają procesowi obróbki termicznej i dla zahamowania rozwoju drobnoustrojów i bezpieczeństwa wymagają wyższego poziomu nasolenia. Dla tej grupy asortymentowej - szynki surowych, dojrzewających PN-A 82007:1996 dopuszczała zawartość soli do 7%.

Tendencje obniżania zawartości chlorku sodu w różnych grupach przetworów mięsnych, w tym w wędzonkach, obserwowano już we wcześniejszych badaniach [Kłosowska, 1999; Makała i in., 2007; Szymański i in., 2009]. Między innymi Makała i in. [2006] oceniając dostępne na rynku parówki na podstawie przeprowadzonych badań wykazali, iż w ocenianych sortymentach średnia zawartość soli kształtowała się na poziomie od 1,9% do 2,3% i była istotnie niższa niż wymagania zawarte w Normie Polskiej PN-A-82007/A1:1998. Szymański i in. [2009] oceniając rynkowe wędzonki oraz w kielbasy suszone średnio i drobno rozdrobnione w latach 2000 - 2008 stwierdzili dość zróżnicowaną zawartość chlorku sodu, z tendencją do obniżenia jego poziomu. Wykazali, iż zawartość chlorku sodu w wędzonkach uległa obniżeniu średnio o 0,52g/100g produktu.

Zachęca się także do stosowania ziół i przypraw oraz zamienników soli np.: chlorku potasu [Wojtasik i in., 2010]. Ruusunen i Puolanne [2005] przedstawili dobre efekty uzyskane podczas zastosowania przemysłowych mieszanek soli w których składzie znajdowało się 58% NaCl, 27% KCl, 12% MgCl₂ albo MgSO₄ (Pan-Salt) w czasie produkcji kielbas parzonych. Najczęściej w celu osiągnięcia pożądanego przez konsumentów smaku

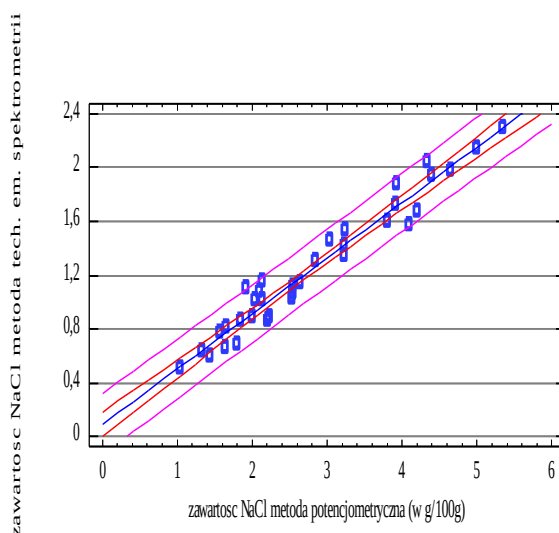
wykorzystywane są: czosnek, kminek, jałowiec, szafran, papryka, anyż, goździki, cynamon oraz ziele angielskie. Uwydatniają one walory smakowe i zapachowe produktów i potraw oraz wzmagają apetyt, stymulują wydzielanie soków trawiennych i poprawiają perystaltykę jelit [Broda i Mowszowicz, 2000]. Do przypraw zalecanych w leczniczych dietach niskosodowych można zaliczyć: gałkę muszkatołową, majeranek, tymianek, imbir, czosnek i słodką paprykę [Lutomski, 2002].

Tabela 1. Wyniki oznaczania porównywanymi metodami zawartości chlorku sodu (w g/100g)

Nr	Produkt	Metoda oznaczania	
		potencjometryczna	techniki emisyjnej spektrometrii atomowej
1	Frankfurterki parzone	2,54	2,68
2	Frankfurterki parzone	2,54	2,80
3	Frankfurterki parzone	2,53	2,58
4	Kabanosy wieprzowe	3,24	3,83
5	Kabanosy wieprzowe	3,04	3,65
6	Kabanosy wieprzowe	3,23	3,38
7	Kiełbasa śląska	2,14	2,90
8	Kiełbasa śląska	2,10	2,70
9	Kiełbasa gospodarza	2,00	2,23
10	Kiełbasa gospodarza	2,14	2,53
11	Kiełbasa myśliwska	2,64	2,85
12	Kiełbasa myśliwska	2,54	2,68
13	Kiełbasa parówkowa	1,80	1,73
14	Kiełbasa polska sur.długodojrz.	4,20	4,18
15	Kiełbasa polska sur.długodojrz.	4,40	4,85
16	Kiełbasa szynkowa	1,84	2,18
17	Kiełbasa szynkowa	2,23	2,23
18	Szynka szwarcwaldzka	5,34	5,73
19	Szynka brandenburska dojrzewająca	2,84	3,28
20	Szynka brandenburska dojrzewająca	3,93	4,70
21	Salami wieprz. z mięsem wołowym	3,23	3,55
22	Parówki wieprzowe	2,04	2,53
23	Parówki wieprzowe	1,92	2,78
24	Parówki wieprzowe	2,21	2,15
25	Kindziuk	4,34	5,10
26	Szynka delikatna łagodnie wędzona	5,00	5,35
27	Szynka szwarcwaldzka	4,65	4,95
28	Salami pieprzowe	4,10	3,95
29	Skrzydółka z kurczaka w panierce	1,33	1,60
30	Mięso po staropolsku	1,57	1,90
31	Mięsiwo w sosie własnym	1,65	2,02
32	Szynka serrano	3,80	4,00
33	Szynka prosciutto	3,92	4,30
34	Pasztet polski	1,44	1,50
35	Pasztet angielski	1,64	1,65

Zredukowanie ilości tego dodatku w produktach mięsnych tłumaczyć można m.in. zmianami jakie zaszły w technologii produkcji wędlin w Polsce. Duży wpływ na obniżenie zawartości chlorku sodu w produktach mięsnych ma zastosowanie w przetwórstwie mięsa dodatków funkcjonalnych, które podkreślają i uwypuklają smak i zapach gotowego wyrobu, m.in. substancji wzmacniających smak i zapach, głównie pochodnych kwasu glutaminowego, guanylowego i inozynowego oraz substancji, które mogą działać synergistycznie na odczucie słoności m.in. fosforanów. Istotne również, wydaje się być zastosowanie w przetwórstwie mięsa w szerszym zakresie aromatów, które dają możliwość nadania produktowi pożądanego profilu smakowo – zapachowego.

Dane zestawione w tabeli 1 posłużyły do przeprowadzenia analizy statystycznej. Zależność między porównywanymi metodami przedstawiono graficznie na Rys.1.



Rysunek 1. Porównanie zawartości soli oznaczanej dwiema metodami

Wyliczone równania regresji miały postać równania liniowego:

zawartość chlorku sodu wg metody potencjometrycznej =

- 0,08 + 2,31*NaCl wg metody analizy spektralnej ($R = 0,95$ dla $P \leq 0,05$).

zawartość chlorku sodu wg metody techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie =

0,09 + 0,41*NaCl wg metody potencjometrycznej ($R = 0,95$ dla $P \leq 0,05$).

Wartości współczynników korelacji w wyliczonych równaniach były wysokie, co świadczy o bardzo dobrej zgodności wyników porównywanymi metodami. Metody nie są obciążone błędem systematycznym stałym.

Metodą techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie oznaczano nieco wyższe zawartości chlorku sodu niż metodą potencjometryczną. Oceniając uzyskane wyniki należy uwzględnić specyfikę każdej z zastosowanych metod.

Metodą potencjometryczną oznaczany jest chlorek sodu, zaś metodą techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie zawartość sodu wyznaczona jest z krzywej kalibracyjnej a następnie przeliczana na zawartość chlorku sodu. Każda z ocenianych metod ma inną procedurę oznaczania i charakteryzuje się innymi zaletami i wadami.

Metoda potencjometryczna zaliczana jest do metod nieskomplikowanych, szybkich w wykonaniu i charakteryzuje się dużą czułością i precyzją oznaczania. Jest ona rekomendowana do oznaczania chlorku sodu w mięsie i przetworach mięsnych i drobiowych o zawartości już od 0,25%. Metodę tę można stosować również do oznaczeń w produktach barwnych z uwagi na to, iż punkt końcowy miareczkowania wyznaczany jest na podstawie przebiegu krzywej miareczkowania, a nie na podstawie ocenianej subiektywnie zmiany barwy miareczkowanego roztworu, co podkreśliła w swoich badaniach m.in. Kłossowska [2002].

Oznaczanie techniką emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES) pozwala na bezpośrednie oznaczenie sodu, które podawane jest na opakowaniu środków spożywczych. Nie wymaga dodatkowego przeliczania, jak to ma miejsce w przypadku stosowania metody potencjometrycznej. Podobnie jak metoda potencjometryczna, technika emisyjnej spektrometrii atomowej zaliczana jest ona do metod nieskomplikowanych, szybkich w wykonaniu i charakteryzuje się dużą czułością i precyzją oznaczania.

Obie metody będące przedmiotem badań i oceny, metoda potencjometryczna i techniką emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES) z uwagi na dużą czułość i precyzję oznaczania mogą być przydatne dla potrzeb rutynowej kontroli towaroznawczej oznaczania zawartości chlorku sodu w przetworach mięsnych.

Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych badań można stwierdzić, iż do rutynowej kontroli towaroznawczej oznaczania zawartości chlorku sodu w przetworach mięsnych przydatne są obie metody, metoda potencjometryczna i metoda techniką emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES).

Metoda techniki emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP - AES) pozwala na bezpośrednie oznaczenie sodu, które podawane jest na opakowaniu środków spożywczych. Nie wymaga dodatkowego przeliczania, jak to ma miejsce w przypadku stosowania metody potencjometrycznej.

Porównywane metody nie są obarczone błędem systematycznym stałym, są nieskomplikowane, szybkie w wykonaniu i charakteryzują się dużą czułością i precyzją oznaczania.

Wysokie wartości współczynników korelacji świadczą o bardzo dobrej zgodności wyników porównywanymi metodami. Wyliczone równania regresji mogą przyjąć postać równania liniowego.

Literatura

Broda B., Mowszowicz J., Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa, 2000.

Desmond E., Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 2006, 74, 188-198.

Jarosz M. Normy żywienia dla populacji polskiej - nowelizacja. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2012.

Jeżewska M., Kulczak M., Błasińska I., Zawartość soli w wybranych koncentratkach obiadowych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2011, 3, 585-590.

Kłossowska B., Zmiany zawartości soli, azotynu i azotanu oraz fosforanów w wybranych krajowych produktach mięsnych w latach 1994-1999. *Roczniki Instytutu Przememysłu Mięsnego i Tłuszczowego*, 1999, 36, 179-189.

Kłossowska B., Porównanie trzech metod oznaczania chlorku sodu w produktach mięsnych. *Roczniki Instytutu Przememysłu Mięsnego i Tłuszczowego*, 2002, 39, 203-209.

Konieczny P., Pospiech E., Politowska I., Wpływ soli morskiej na wybrane właściwości frakcji tłuszczowej mięsa bydlęcego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, 3 (44) Supl., 108 – 120.

Konieczny P., Górecka D., Mięso w żywieniu człowieka, aktualne kierunki w produkcji wyrobów mięsnych. *Przemysł Spożywczy*, 2011, 3, 28.

Kozań K., Guzek D., Lange E., Głabska D., Włodarek D., Wierzbicka A., Produkty mięsne należące do grupy żywności funkcjonalnej z uwzględnieniem potrzeb chorych na nieswoiste stany zapalne jelit. *Zdrowie Publiczne i Zarządzanie*, 2012, 10 (2), 65–71.

Krieger-Mettbach B., Das Salz in der Wurst , *Die Fleischerei*, 2004, 5,118-122.

Lutomski J., Znaczenie ziół w terapii i dietetyce. *Lek w Polsce*, 2002, 2, 142, 88-99.

Majchrzak B., Nowe wymagania dotyczące znakowania ważne od 13 grudnia 2014 r. *Przemysł Spożywczy*, 2014, 8 (68), 26-30.

Makała M., Tyszkiewicz S., Wawrzyniewicz M., Charakterystyka parówek rynkowych przetworów mięsnych. *Gosp. Mięs.*, 2006, 8, 20-26.

Makała H., Tyszkiewicz S., Wawrzyniewicz M., Jakość popularnych rynkowych kiełbas średnio rozdrobnionych. *Roczniki Instytutu Przememysłu Mięsnego i Tłuszczowego*, 2007, 45 (2), 137.

PN A – 82007.Przetwory mięsne. Wędliny.

PN ISO 1841-2:2002 Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości chlorków.

PN-EN 13805 Artykuły żywnościowe. Oznaczanie pierwiastków śladowych. Mineralizacja ciśnieniowa.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011.

Ruusunen M., Puolanne E., Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 2005, 70, 531-541.

Schlegel-Zawadzka M., Kowalczyk B., Wiedza na temat spożycia soli w różnych grupach narodowościowych. *Zeszyty Naukowe AM w Gdyni*, 2010, 65, 39-50.

Szostak W.B., Jarosz M., Wpływ spożycia soli na rozwój chorób układu krążenia. *Żywnie Człowieka i Metabolizm*, 2010, 37 (5-6), 374 - 380.

Szymański P., Wawrzyniewicz M., Moch P., Plaskota A., Kern-Jędrychowski J., Tendencje zmian jakościowych wybranych kiełbas suszonych i wędzonek obserwowane w latach 2000-2008 na podstawie wyników badań chemicznych produktów zgłaszanych na konkurs „Produkty najwyższej jakości w przemyśle mięsny”. *Roczniki Instytutu Przememysłu Mięsnego i Tłuszczowego*, 2009, XLVII (2), 116-133.

WHO: Guideline: Sodium intake for adults and children. World Health Organization (WHO), Geneva 2012.

Wojtasik A., Przygoda B., Kunachowicz H., Analiza zawartości soli w wybranych grupach produktów spożywczych w aspekcie możliwości zmniejszania jej spożycia z diety. *Żywnie Człowieka i Metabolizm*, 2010, 37 (5-6), 355-367.

SPONSORZY – PAKIET ZŁOTY



Unilever



Zeelandia

SPONSORZY – PAKIET SREBRNY



SPONSORZY – PAKIET BRĄZOWY

Colian™





9 788371 608339

