



Politechnika Łódzka



XLIV KONFERENCJA KOMITETU NAUK O ŻYWNOCI I ŻYWIENIU PAN

NAUKA, TECHNOLOGIA I INNOWACJE W ŻYWNOCI I ŻYWIENIU

**Praca zbiorowa pod redakcją
Grażyny Budryn
Katarzyny Ślizewskiej**



MONOGRAFIA NAUKOWA

Łódź, 3-4 lipca 2019 r.

**XLIV Konferencja Komitetu
Nauk o Żywności i Żywieniu PAN**

**NAUKA, TECHNOLOGIA
I INNOWACJE W ŻYWNOSĆCI
I ŻYWIENIU**

MONOGRAFIA NAUKOWA

Praca zbiorowa pod redakcją
**Grażyny Budryn
Katarzyny Śliżewskiej**

Łódź 2019

Redaktorzy: Budryn G., Śliżewska K.

Autorzy: Bartodziejska B., Bogucki M., Chachuła G., Chlebicz A., Chmiela M., Gajda E., Gajewska M., Harasimiuk W., Kaczmarska M., Klewicka E., Klewicki R., Kopczyńska K., Kowalska G., Kowalski R., Koziolkiewicz M., Król K., Królasik J., Kunicka-Styczyńska A., Latoch A., Łosiewicz A., Madaj M., Markowska J., Matusiak A., Mazurek A., Stasiak D., Misztal K., Nowak A., Oracz J., Pankiewicz U., Paziak-Domańska B., Plucińska A., Polak E., Ponder A., Sadłowska K., Sikorska A., Sujka M., Szosland-Fałtyn A., Śliżewska K., Tyfa Aa, Wieczorek J., Włodarczyk-Stasiak M., Wojciechowska A., Wrześniewska-Wal I., Wyka K., Żyżelewicz D.

Recenzenci: Budryn G., Diowksza A., Gendaszewska-Darmach E., Kalemba D., Klewicka E., Klewicki R., Kordialik-Bogacka E., Kunicka-Styczyńska A., Leszczyńska J., Mostowski R., Nowak Ag, Podśudek A., Śliżewska K., Żyżelewicz D.

Projekt graficzny okładki: Grzelczyk J., Klewicki R.

Skład: Oracz J.

Za treść zamieszczonych materiałów odpowiadają ich autorzy.

© Copyright by Politechnika Łódzka 2019

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ

90-924 Łódź, ul. Wólczańska 223

tel. 42-631-20-87, 42-631-29-52

fax 42-631-25-38

e-mail: zamowienia@info.p.lodz.pl

www.wydawnictwo.p.lodz.pl

ISBN 978-83-66287-14-3

DOI: 10.34658/9788366287143

<http://doi.org/10.34658/9788366287143>

Nakład 200 egz. Ark druk 7,5. Papier offset. 80 g 70 x 100

Wykonano w Drukarni Quick-Druk, 90-562 Łódź, ul. Łąkowa 11

Seria Monografie Politechniki Łódzkiej Nr 2309

SPIS TREŚCI

<i>MikroRNA – nowy gracz wśród bioaktywnych składników diety</i>	5
Maria KOZIOŁKIEWICZ	
<i>Metabolomika jako narzędzie badawcze w ocenie żywności</i>	14
Klaudia KOPCZYŃSKA, Alicja PONDER, Katarzyna KRÓL, Karolina MISZTAL	
<i>Owoce goji jako źródło substancji działających prozdrowotnie</i>	25
Aleksandra PLUCIŃSKA, Alina KUNICKA-STYCZYŃSKA	
<i>Właściwości czekolad Origin dostępnych na polskim rynku</i>	33
Dorota ŻYŻELEWICZ, Joanna ORACZ, Michał BOGUCKI, Gabriela CHACHUŁA, Milena KACZMARSKA, Weronika HARASIMIUK	
<i>Wpływ spiruliny i preparatów stabilizująco-emulgujących na jakość lodów</i>	45
Joanna MARKOWSKA, Elżbieta POLAK, Marta MADAJ, Karolina SADŁOWSKA	
<i>Wpływ temperatury dojrzewania na mikroflorę serów podpuszczkowych przygotowywanych z niepasteryzowanego mleka krowiego</i>	54
Anna SZOSLAND-FAŁTYN, Beata BARTODZIEJSKA, Aleksandra SIKORSKA, Agnieszka MATUSIAK, Magdalena CHMIELA	
<i>Wpływ parametrów technologii sous-vide na jakość mięsa wołowego</i>	64
Elżbieta POLAK, Joanna MARKOWSKA, Marta MADAJ, Karolina SADŁOWSKA	
<i>Jakość kielbas z mięsa daniela z dodatkiem serwatki kwasowej i inuliny</i>	75
Agnieszka LATOCH, Dariusz Mirosław STASIAK	
<i>Aktywność i stabilność kompleksu inkluzyjnego polifenoli z ekstraktu z proszku kakaowego Acticoa z β-cyklodekstryną</i>	89
Milena KACZMARSKA, Dorota ŻYŻELEWICZ, Joanna ORACZ, Anna WOJCIECHOWSKA, Edyta GAJDA, Agnieszka ŁOSIEWICZ	
<i>Zdolności adhezyjne szczepów <i>Campylobacter</i> spp. wyizolowanych z mięsa drobiowego</i>	99
Anna SZOSLAND-FAŁTYN, Beata BARTODZIEJSKA, Joanna KRÓLASIK, Beata PAZIAK-DOMAŃSKA	
<i>Ocena zdolności bakterii <i>Lactobacillus</i> spp. do ograniczenia wzrostu opornego na wankomycynę szczepu <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 - badania in vitro</i>	110
Elżbieta KLEWICKA, Robert KLEWICKI, Justyna WIECZOREK	
<i>Wpływ nowo opracowanych preparatów synbiotycznych na genotoksyczność wody kałowej prosiąt</i> ...	118
Agnieszka CHLEBICZ, Adriana NOWAK, Katarzyna ŚLIŻEWSKA	
<i>Grzyby pleśniowe, groźne zanieczyszczenie przypraw</i>	131
Magdalena GAJEWSKA, Katarzyna WYKA, Beata BARTODZIEJSKA, Anna SZOSLAND-FAŁTYN	
<i>Uwarunkowania środowiskowe acydotermofilnych bakterii <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i></i>	142
Alina KUNICKA-STYCZYŃSKA, Agnieszka TYFA	
<i>Oznaczanie aztoanów(III) i azotanów(V) w produktach garmażeryjnych</i>	154
Katarzyna WYKA, Magdalena GAJEWSKA, Beata BARTODZIEJSKA, Anna SZOSLAND-FAŁTYN	
<i>Znakowanie żywności żywność i pasze „wolne od GMO”</i>	164
Iwona WRZEŚNIEWSKA-WAL	
<i>Ocena zawartości olejku eterycznego w liściu mięty, ziele majeranku, ziele tymianku, i koszyczku rumianku przechowywanych w różnych warunkach</i>	172
Radosław KOWALSKI, Grażyna KOWALSKA, Artur MAZUREK, Urszula PANKIEWICZ, Monika SUJKA, Marzena WŁODARCZYK-STASIAK	

mikroRNA – NOWY GRACZ WŚRÓD BIOAKTYWNYCH SKŁADNIKÓW DIETY

Maria KOZIOŁKIEWICZ*

Institut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka

*maria.koziolekiewicz@p.lodz.pl

Streszczenie: Odkrycie cząsteczek mikroRNA i ich roli w procesie ekspresji genów ma fundamentalne znaczenie dla biologii molekularnej, diagnostyki medycznej, nutrigenomiki, a nawet, choć to wydaje się zaskakujące, dla technologii żywności i żywienia. Cząsteczki mikroRNA mają od 22 do 26 nukleotydów i wraz z białkowym kompleksem RISC odpowiadają za degradację określonych mRNA, obniżenie poziomu translacji i ostatecznie wyciszenie odpowiednich genów. Dotychczas zidentyfikowano ponad 1000 różnych sekwencji ludzkich mikroRNA. Spekuluje się, że ponad 30-60% genów znajduje się pod ich kontrolą. Poziom określonych miRNA człowieka może być regulowany przez bioaktywne składniki diety, takie jak: resweratrol, genisteina, kurkumina czy galusan epigallokatechiny. Wpływ różnych fitozwiązków na mikroRNA i wyciszenie genów jest już dobrze udokumentowany i nie budzi większych kontrowersji. Natomiast przedmiotem sporów i dyskusji jest aktywność biologiczna tzw. egzogennych mikroRNA, tzn. mikroRNA pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego (np. mikroRNA zawarte w mleku), które wraz z żywnością mogą dostać się do przewodu pokarmowego, a stamtąd do krwioobiegu i komórek-biorców. Wyniki najnowszych badań potwierdzają istnienie mechanizmu, według którego mikroRNA mleka hamują metylotransferazy DNA, a za ich pośrednictwem regulują ekspresję innych genów. O obecności tych mikroRNA w produktach spożywczych decydują m.in. procesy technologiczne oraz sposób utrwalania i przechowywania żywności.

Słowa kluczowe: egzogenne mikroRNA, metylotransferazy DNA, białko fto

1. Wprowadzenie

Nie będzie przesadą stwierdzenie, że odkrycie mikroRNA i mechanizmu ich działania otworzyło nową erę w biologii molekularnej, diagnostyce medycznej i, generalnie, w rozumieniu procesów regulacji ekspresji genów. Te niewielkie niekodujące cząsteczki RNA (ncRNA) są kodowane przez inter- lub intragenowe regiony genomu, powstają w procesie transkrypcji, następnie podlegają obróbce przez rybonukleazy Drosha (w jądrze komórkowym) i Dicer (w cytoplazmie), co prowadzi do powstania dojrzałych około 22-nukleotydowych cząsteczek mikroRNA, które ulegają inkorporacji do cząsteczek białkowego kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). Kompleks RISC ze względu na obecność jednego z białek Argonaute (Ago1, 2 lub 3) wykazuje aktywność nukleolityczną albo działa jako inhibitor procesu translacji: miRNA rozpoznaje komplementarną do siebie sekwencję w określonym mRNA (w obrębie ORF lub

w regionie 3'-UTR), RISC dokonuje degradacji mRNA w obrębie ORF lub hamuje proces translacji. W ten sposób miRNA wraz z kompleksem RISC powodują degradację określonych mRNA, obniżenie poziomu translacji i ostatecznie wyciszenie odpowiednich genów [1]. Dotychczas zidentyfikowano ponad 1000 różnych sekwencji ludzkich miRNA. Jak rozległy jest ich wpływ na ekspresję genów – nie wiadomo. Spekuluje się, że od 30 do 60% genów znajduje się pod kontrolą miRNA, co oznacza, iż te niewielkie fragmenty kwasu rybonukleinowego mają olbrzymi wpływ na zdrowie człowieka, ale nieprawidłowości dotyczące ich syntezy i funkcjonowania mają wpływ także na procesy chorobowe zaczynając od neurogenezy i rozwoju układu immunologicznego, a kończąc na wielu chorobach, w tym chorobach dietozależnych i nowotworach [2]. Poziom określonych cząsteczek mikroRNA zależy od wielu czynników: stylu życia, rodzaju diety, rodzaju przyjmowanych leków oraz aktywności fizycznej. Z punktu widzenia nutrigenomiki istotny jest fakt, że poziom określonych miRNA może być regulowany przez bioaktywne składniki diety. Potwierdzony wpływ na poziom niektórych endogennych mikroRNA mają m.in. resweratrol, genisteina, kwercetyna, kurkumina, galusan epigallokatechiny i wiele innych [3-4].

Duże zaskoczenie wywołały obserwacje wskazujące na znaczną stabilność mikroRNA w różnych płynach ustrojowych, m.in. w osoczu, krwi, moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym, łzach i mleku. Ich oporność na działanie specyficznych i niespecyficznych rybonukleaz zapewnia m.in. białko Ago-2 z rodziny Argonaute, z którym związane są wewnątrzkomórkowe mikroRNA. Z kolei stabilność mikroRNA obecnych w płynach ustrojowych i ich oporność na działanie nukleaz zapewniają tzw. eksosomy (ang. *exosomes*, *extracellular vesicles*) – lipidowe pęcherzyki o rozmiarach 30-100 nm, wydzielane przez komórki do przestrzeni międzykomórkowej. Zawierają one m. in. białka i różne rodzaje RNA, w tym mRNA, microRNA oraz krótkie i długie niekodujące RNA. Istnieje opinia, że o zawartości eksosomów (czyli o ich *cargo*) decyduje bliżej jeszcze niezidentyfikowana maszyna molekularna odpowiedzialna za proces sortowania. Innymi słowy: rodzaj cząsteczek RNA obecnych w cytoplazmie nie odzwierciedla rodzaju cząsteczek RNA stanowiących *cargo*. Sortowanie, jak się wydaje, ma kluczowe znaczenie dla określenia składu *cargo* eksosomów, ale mechanizm tego procesu nie został dotychczas wyjaśniony [5-6]. Uważa się, że rodzaj cząsteczek stanowiących *cargo* ma kluczowe znaczenie dla komunikacji pomiędzy komórkami oraz regulacji funkcji życiowych komórek-biorców. Co więcej, postuluje się istnienie na powierzchni tych komórek specyficznych białkowych receptorów, aktywowanych przez miRNA (tzw. miRceptory, ang. *miReceptors*), które w ten sposób inicjują nowe, nieznane wcześniej szlaki sygnałowe [7].

Fakt, że we krwi i osoczu obecne są eksosomy zawierające różne mikroRNA będące często efektem postępujących procesów chorobowych, stał się punktem wyjścia do badań nad identyfikacją tych cząsteczek RNA jako biomarkerów nowej generacji [8]. Z drugiej strony eksosomy przenoszące cząsteczki

mikroRNA umożliwiają ogólnoustrojowe (endokryjne) działanie niektórych tkankowo- i komórkowo-specyficznych miRNA, które są w stanie regulować ekspresję setek genów w komórkach, do których te eksosomy trafiły, czy to za pośrednictwem miRceptorów czy dzięki endocytozie.

2. Jak mikroRNA mleka regulują ekspresję genów?

Zasygnalizowane powyżej mechanizmy odnoszą się do endogennych miRNA – syntezowanych w organizmie ludzkim i działających w jego komórkach i tkankach. Natomiast od kilku lat, a dokładniej od roku 2012 trwa dyskusja nad ewentualną aktywnością biologiczną tzw. egzogennych miRNA, tzn. miRNA pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego (np. miRNA zawarte w mleku), które jako składniki żywności mogą dostać się do przewodu pokarmowego człowieka, a stamtąd do krwioobiegu i komórek-biorców. Pierwsza publikacja na ten temat ukazała się w 2012 roku w renomowanym czasopiśmie *Cell Research* i odbiła się szerokim echem w środowiskach naukowych zainteresowanych chemią i biologią kwasów nukleinowych, a także nutrigenomiką. Autorzy tej pracy opisali aktywność jednego z roślinnych microRNA (miR168a obecnego m.in. w ryżu) jako regulatora ekspresji genu LDLRAP1 kodującego jedno z białek wchodzących w skład receptora LDL (ang. *low-density lipoprotein receptor adapter protein 1*, LDLRAP1). miR168a obniża poziom mRNA kodowanego przez ten gen, a w konsekwencji obniża także poziom białka, co prowadzi do zmniejszenia poziomu receptora LDL i zwiększenia poziomu samego LDL (ang. *low density lipoprotein*). Co więcej, autorzy tej pracy postawili także hipotezę o możliwości „horyzontalnego transferu roślinnego miRNA do komórek organizmów zwierzęcych” [9]. Ostatnio wykazano, że roślinne miRNA, w tym znany już miR168a, mogą trafiać nie tylko do krwioobiegu i komórek jelita cienkiego ssaków, ale także do komórek ich gruczołów mlecznych oraz mleka, co może oznaczać, że niemowlęta mają kontakt z niektórymi roślinnymi miRNA zanim w ich diecie pojawi się ryż czy inne produkty roślinne [10].

Podczas gdy udział egzogennych roślinnych mikroRNA (ryżu, pomidorów, sałaty, itd.) w regulacji ekspresji genów ludzi i zwierząt budzi wiele wątpliwości i dyskusji naukowych, naukowcy dość zgodnie przyjmują, że taki mechanizm regulacji ekspresji genów jest możliwy w przypadku mikroRNA obecnego w mleku ssaków. Co więcej, charakterystyka miRNA mleka kobiecego i krowiego oraz ich rola w regulacji ekspresji genów, odpowiednio, w okresie niemowlęcym i w wieku późniejszym są obecnie obiektem wielu badań. W kobiecym mleku zidentyfikowano dotychczas od 300 do 800 różnych cząsteczek mikroRNA [11]. Na podstawie analiz *in silico* przyjmuje się, że mogą one regulować ekspresję ponad 9000 genów. Trzeba jednak dodać, że liczba różnych mikroRNA zidentyfikowanych za pomocą dostępnych obecnie metod w mleku różnych ssaków wynosi ok. 1400. Większość różnych sekwencji mikroRNA obecnych w mleku kobiecym, krowim, kozim, itd. wykazuje wysoki stopień podobieństwa, co wskazuje, że są to sekwencje wysoce konserwatywne ewolucyjnie [2].

Punktem wyjścia w formułowaniu hipotez na temat roli miRNA mleka (zarówno kobiecego jak i krowiego) jest fakt, iż niektóre z tych cząsteczek (miRNA-148a, miRNA-21 oraz miRNA-29s) wykazują komplementarność w stosunku do mRNA kodujących metylotransferazy DNA (DNMT) i mogą hamować proces syntezy tych enzymów, co ma kluczowe znaczenie dla ekspresji setek a może nawet tysięcy genów [11]. DNMT odpowiadają bowiem za metylację niektórych reszt cytozyny w DNA, co prowadzi do utworzenia 5-metylocytozyny w tzw. sekwencjach CpG (deoksycytodyna-fosforan-deoksyguanozyna). Generalnie, wzrost poziomu metylacji DNA w określonych genach prowadzi do kondensacji chromatyny i do zahamowania ekspresji tych genów. Fakt, że w/w mikroRNA mleka obniżają poziom enzymów DNMT, oznacza, że zmniejsza się poziom metylacji DNA, innymi słowy, mamy do czynienia z tzw. hipometylacją DNA. Efekt hipometylacji prowadzi do wzmożonej transkrypcji wielu genów, a to oznacza także wzmożoną biosyntezę wielu białek. Są to ważne białka regulatorowe, np. niektóre czynniki transkrypcyjne (np. Nrf2, Foxp3) i kinazy białkowe (np. Akt, mTOR, ang. mammalian target of rapamycin kinase). Jednak zdecydowana większość tych białek nie została jeszcze zidentyfikowana. Jedno z nich (produkt genu FTO, ang. *fat-mass and obesity gene*) zostało po raz pierwszy opisane w 2007 roku jako czynnik skorelowany z otyłością. Dalsze badania (2011r.) wykazały, że nie uczestniczy ono w sposób bezpośredni w metabolizmie lipidów, ale ma aktywność demetylazy N6-metyloadenozyny (m^6A) obecnej w cząsteczkach mRNA [12]. Melnik i Schmitz uważają, że mleko jest czynnikiem odpowiedzialnym za nadekspresję białka Fto oraz zwiększony poziom demetylacji m^6A w różnych cząsteczkach mRNA. Ponieważ metylacja DNA jest jednym ze sposobów tzw. epigenetycznej regulacji transkrypcji, Melnik i Schmitz określają mikroRNA mleka jako „epigenetyczne regulatory” [11-12].

Biorąc pod uwagę fakt, iż trzy rodzaje miRNA odpowiedzialne za hamowanie ekspresji DNMT (miRNA-148a, miRNA-21 oraz miRNA-29s) występują w mleku kobiecym oraz mleku innych ssaków w dużych ilościach, można przyjąć, że opisany wyżej mechanizm jest naturalnym, doskonałym przez miliony lat ewolucji ssaków sposobem epigenetycznej regulacji ekspresji genów w okresie niemowlęcym. Można przypuszczać, że zwiększony poziom określonych białek, w tym białka Fto, jest niezbędny na wczesnych etapach rozwoju osobniczego. Demetylacja N6-metyloadenozyny obecnej w cząsteczkach mRNA w jakiś sposób zmienia ich właściwości i reguluje ekspresję genów, co ma znaczenie dla rozwoju układu immunologicznego, a także w procesie neurogenezy [13].

Badania nad funkcją biologiczną białka Fto to, *nota bene*, fascynująca historia, która rozpoczęła się w roku 2007 odkryciem genu FTO oraz stwierdzeniem, że jego produkt ma związek z otyłością. Jednakże wraz z odkryciem aktywności Fto jako demetylazy N6-metyloadenozyny, przestało ono być tylko obiektem zainteresowania dietetyków i lekarzy, a stało się przedmiotem badań genetyków i zainicjowało rozwój *epitranskryptomiki* (ang. *epitranscriptomics*),

której zadaniem jest wyjaśnienie epigenetycznych modyfikacji RNA, głównie mRNA [14].

Chociaż miRNA-148a jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych mikroRNA mleka, to nie należy zapominać o kilku innych „mlecznych” miRNA istotnych z punktu widzenia regulacji ekspresji genów. Jednym z nich jest miR-21 postrzegany jako tzw. onkomiR (mikroRNA o onkogennym działaniu): stymuluje proliferację komórek, wywołuje zaburzenia apoptozy, niestabilność genomu, wzmacnia angiogenezę i stany zapalne. Wszystkie te procesy leżą u podstaw nowotworzenia. Nie można wykluczyć sytuacji, w której spożywanie mleka krowiego oraz kilka innych czynników ryzyka decydują o rozwoju czerniaka [15]. Jednocześnie tym samym dwóm wyżej wymienionym miRNA (148a oraz 21) przypisuje się udział w adipogenezie i etiologii cukrzycy typu 2.

Setki milionów ludzi spożywa mleko krowie i jego przetwory przez długie lata życia. W krowim mleku zidentyfikowano ponad 400 różnych miRNA i sekwencje nukleotydowe większości z nich są identyczne z sekwencjami miRNA mleka kobiecego. Wśród mikroRNA krowiego mleka są również miRNA komplementarne do mRNA kodującego metylotransferazy DNA człowieka. Może to oznaczać, że mRNA kodujące te enzymy podlega „nienaturalnej”, znacznie przedłużonej w czasie, regulacji prowadzącej do nadmiernie obniżonego poziomu tych enzymów, obniżonego poziomu metylacji promotorów oraz zaburzeń na poziomie ekspresji genów kodujących ważne białka regulatorowe, w tym białko Fto. Innymi słowy: z powodu wysokiego stopnia homologii pomiędzy niektórymi miRNA obecnymi w kobiecym i krowim mleku, te ostatnie (tzn. miRNA mleka krowiego) mogą regulować ekspresję ludzkich genów, znacznie dłużej niż „chciałaby tego Natura”, tzn. dłużej niż tylko w okresie wczesnego dzieciństwa, kiedy to karmienie mlekiem matki i oddziaływanie mikroRNA jest procesem fizjologicznym.

Wiadomo także, że w wielu wypadkach niemowlęta są karmione mieszankami na bazie mleka krowiego. Jednakże wskutek stosowanych technologii mieszanki te zawierają niewielkie lub śladowe ilości miRNA podobnych do miRNA mleka kobiecego. Najnowsze badania Golan-Gerstl i wsp. potwierdzają dane na temat niewielkiej zawartości miRNA-148a w mleku modyfikowanym w porównaniu do mleka kobiecego [16]. Może główną przyczyną zaburzeń i problemów zdrowotnych obserwowanych u osób, które w okresie niemowlęcym były karmione inaczej niż mlekiem matki, jest deficyt mikroRNA w mieszankach mlecznych zalecanych dla niemowląt i małych dzieci [11-12]?

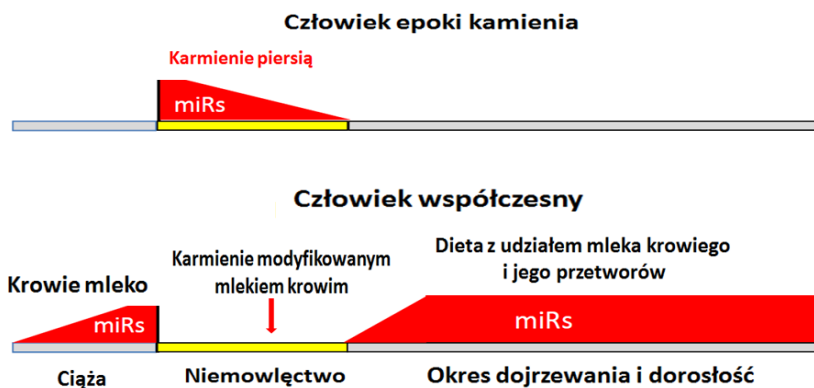
Tabela 1. Stopień podobieństwa sekwencji nukleotydowych ludzkich (hsa) i wołowych (bta) miRNA komplementarnych do mRNA metylotransferaz DNA

hsa-miRNA-148a-5p: 6-aaaguucugagacacucgacu-27	
hsa-miRNA-148a-3p: 44-ucagugcacuacagaaccuuugu-65	bta-miRNA-148a-3p: 44-ucagugcacuacagaaccuuugu-65
hsa-miRNA-21-5p: 8-uagcguuauacagacugauguuga-29	bta-miRNA-21-5p: 8-uagcguuauacagacugauguugacu-31
hsa-miRNA-21-3p: 46-caacaccagucgaugggcugu-66	bta-miRNA-21-3p: 47-aacagcagucgaugggcugucu-68
hsa-miRNA-29b-1-5p: 10-gcugguuucauauuggguuuaga-33	
hsa-miRNA-29b-1-3p: 51-uagcaccuuugaaaucaguuu-73	bta-miRNA-29-1-3p: 51-uagcaccuuugaaaucaguuu-73

Źródło: [11].

3. Podsumowanie

Czy to oznacza, że ludzie epoki neolitu, udomawiając 8000 lat temu bydło, zmienili w ewidentny sposób nie tylko dietę, ale także mechanizmy odpowiedzialne za epigenetyczną regulację ekspresji naszych genów? Melnik i Schmitz podkreślają, że znaczenie mleka krowiego jako epigenetycznego, niepożądanego regulatora ekspresji genów wzrosło dopiero w ostatnim półwieczu, ze względu na wprowadzenie ras bydła o przedłużonym okresie laktacji, stosowanie dodatkowej hormonalnej stymulacji tego procesu oraz powszechne stosowanie pasteryzacji i/lub schładzania mleka [17-18], które to procesy nie eliminują mikroRNA, a jedynie zmniejszają ich zawartość [19]. Powszechne spożywanie pasteryzowanego i/lub schłodzonego krowiego mleka przez starsze dzieci, młodzież i dorosłych może być jedną z przyczyn zaburzeń w regulacji ekspresji wielu genów oraz rozwoju chorób cywilizacyjnych. Znacznie bezpieczniejsze są tradycyjne metody: gotowanie lub kwaszenie mleka. Produkty otrzymywane w wyniku jego fermentacji (kefiry, jogurty, twarogi, sery) nie zawierają miRNA, szczególnie tych, które mogą obniżyć poziom metylotransferaz DNA.



Rys. 1. Schemat przedstawia w jakich okres życia organizmy ludzi epoki kamienia albo ludzi współczesnych były lub są poddawane działaniu mikroRNA mleka matki lub mleka krowiego
Źródło: opracowanie własne wg [20].

Z drugiej strony, zdaniem Melnika i Schmitza, karmienie niemowląt mieszankami pozbawionymi miRNA także prowadzi do zaburzeń w ekspresji genów kodujących m.in. metylotransferazy DNA (poziom tych enzymów pozostaje zbyt wysoki, co prowadzi do hipermetylacji DNA i zahamowania transkrypcji wielu genów). Są wśród nich geny kodujące czynniki transkrypcyjne (NRF2, FOXP3), białka regulatorowe (insulina) oraz enzymy odpowiedzialne za modyfikację RNA (FTO). Brak określonych miRNA w składzie mieszanek mlecznych dla niemowląt może być przyczyną nieprawidłowości w rozwoju układu immunologicznego, co z czasem może prowadzić do rozwoju alergii i astmy oraz innych chorób dieto-zależnych. Obaj autorzy apelują także, aby w świetle najnowszych wyników dotyczących aktywności biologicznej miRNA mleka, zmodyfikować skład preparatów dla niemowląt i wzbogacać je w odpowiednie miRNA, a także ograniczyć hormonalną stymulację laktacji u krów [11-12].

Oczywiście, analizując tę hipotezę należy pamiętać, że wiele aspektów związanych z aktywnością biologiczną egzogennych miRNA nie zostało do końca wyjaśnionych i, być może, nie wszystkie wyniki, na które powołują się autorzy prac przeglądowych, są w pełni wiarygodne [21]. Część naukowców zaangażowanych w badania nad mikroRNA i eksosomami uważa, że egzogenne roślinne miRNA rzeczywiście wykazują aktywność biologiczną w komórkach zwierzęcych i ludzkich, ale zaleca konieczność opracowania i stosowania jednolitych i wiarygodnych procedur badawczych. Przypominają oni, że miRNA jest szczególnym rodzajem kwasu nukleinowego o bardzo zróżnicowanej stabilności, podlega działaniu nieznanych jeszcze enzymów i dlatego wymaga szczególnego postępowania w trakcie eksperymentów. Inną przyczyną sprzecznych wyników może być zróżnicowanie gatunkowe i osobnicze stosowanych modeli zwierzęcych. W literaturze można także znaleźć komentarze tonujące tę ostrą dyskusję. Są autorzy, którzy uważają, że zarówno zwolennicy jak i przeciwnicy tezy o aktywnych egzogennych miRNA mogą mieć rację, ale to czy

określone miRNA pochodzenia roślinnego trafią do krwi i komórek organizmów zwierzęcych zależy od ich (tzn. miRNA) właściwości, m.in. od stabilności, a także sposobu, w jaki zachodzi sortowanie do eksosomów.

Nie ulega wątpliwości, że regulacja transkrypcji zależna od egzogennych miRNA oraz mechanizmy odpowiedzialne za sortowanie cząsteczek tych kwasów nukleinowych to problemy naukowe o kluczowym znaczeniu nie tylko dla nutrigenomiki. Chociaż publikacji dotyczących tych zagadnień pojawia się coraz więcej, to obecnie brak jest zadowalających i ogólnie akceptowanych wyjaśnień. Trudno także przewidzieć, w jakiej perspektywie czasowej można oczekiwać zidentyfikowania mechanizmów zależnych od egzogennych miRNA. Czy rzeczywiście są one epigenetycznymi regulatorami o kluczowym znaczeniu dla zdrowia człowieka? Tym bardziej nie można w tej chwili przewidzieć czy zostaną wprowadzone jakieś praktyczne rozwiązania, które pozwolą zminimalizować niepożądane efekty ich działania (np. nowe technologie). A może, w przypadku mleka, nie warto szukać innowacyjnych rozwiązań, ale należy wrócić do starych tradycyjnych sposobów, jakimi są gotowanie, kwaszenie, produkcja serów i twarogów?

Literatura

- [1] Ambros V.: The functions of animal microRNAs. *Nature*, 7006, (2004), 350-355.
- [2] Benmoussa A., Provost P.: Milk MicroRNAs in Health and Disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, (2019), 703-722.
- [3] Davis C.D., Ross S.A.: Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells. *Nutrition Reviews*, 66(8), (2008), 477-82. doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00080.x.
- [4] Gavrilas L.I., Ionescu C., Tudoran O., Lisencu C., Balacescu O., Miere D.: The Role of Bioactive Dietary Components in Modulating miRNA Expression in Colorectal Cancer. *Nutrients*, 8(10) (2016), pii E590.
- [5] Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J. J., Lotvall J. O.: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9, (2007), 654-659.
- [6] Ragusa M., Barbagallo C., Ciriigliaro M., Battaglia R., Brex D., Caponnetto A., Barbagallo D., Di Pietro C., Purrello M.: Asymmetric RNA Distribution among Cells and Their Secreted Exosomes: Biomedical Meaning and Considerations on Diagnostic Applications. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 4, (2017), 66. doi: 10.3389/fmolb.2017.00066. eCollection 2017].
- [7] Fabbri M.: MicroRNAs and miReceptors: a new mechanism of action for intercellular communication. *Philosophy Transactions of the Royal Society in London. B, Biological Sciences*, 373, (2018), 1737, pii: 20160486. doi: 10.1098/rstb.2016.0486.
- [8] Moldovan, L., Batte, K.E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C.B., Piper, M.: Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18, (2014), 371-390, doi: 10.1111/jcmm.12236.
- [9] Zhang L., Hou D., Chen X., Li D., Zhu L., Zhang Y., Li J., Bian Z., Liang X., Cai X., et al.: Exogenous plant mir168a specifically targets mammalian ldrap1: Evidence of cross-kingdom regulation by microrna. *Cell Research*, 22, (2012), 107-126.
- [10] Łukasik A., Brzozowska I., Zielenkiewicz U., Zielenkiewicz P.: Detection of Plant miRNAs Abundance in Human Breast Milk. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2017, pii: E37. doi: 10.3390/ijms1901003].
- [11] Melnik B.C., Schmitz G.: Milk's Role as an Epigenetic Regulator in Health and Disease. *Diseases*. 5 (1), 2017, pii: E12. doi: 10.3390/diseases5010012.

- [12] Melnik B.C.: Milk: An epigenetic amplifier of FTO-mediated transcription? Implications for Western diseases. *Journal of Translational Medicine*, 13, (2015), 385, doi: 10.1186/s12967-015-0746-z.
- [13] Boles N.C., Temple S.: Epimetronomics: m6A Marks the Tempo of Corticogenesis. *Neuron*. 96(4): (2017), 718-720. doi: 10.1016/j.neuron.2017.11.002.
- [14] Kadumuri R.V., Janga S.C.: Epitranscriptomic Code and Its Alterations in Human Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 24(10), (2018), 886-903. doi: 10.1016/j.molmed.2018.07.010.
- [15] Melnik B.C.: MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? 13:202, (2015), doi: 10.1186/s12967-015-0570-5.
- [16] Golan-Gerstl R., Elbaum Shiff Y., Moshayoff V., Schechter D., Leshkowitz D., Reif S.: Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Molecular Nutrition and Food Research*, 10, (2017), doi: 10.1002/mnfr.201700009
- [17] Wang J., Bian Y., Wang Z., Li D., Wang C., et al.: MicroRNA-152 Regulates DNA Methyltransferase 1 and Is Involved in the Development and Lactation of Mammary Glands in Dairy Cows. *PLoS ONE*, 9, (2014), e101358. doi:10.1371/journal.pone.0101358.
- [18] Muroya S., Hagi T., Kimura A., Aso H., Matsuzaki M., Nomura M.: Lactogenic hormones alter cellular and extracellular microRNA expression in bovine mammary epithelial cell culture. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7 (8), (2016), doi.10.1186/s40104-016-0068-x.
- [19] Howard K.M., Kusuma R.J., Baier S.R., Friemel T., Markham L., Vanamala J., Zemleni J.: Loss of miRNAs during Processing and Storage of Cow's (*Bos taurus*) Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, (2017), 588-592, doi:10.1021/jf505526w.
- [20] Melnik B.C., Schmitz G.: MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* (2017), doi: 10.1016/j.beem.2017.10.003
- [21] Bagci C.; Allmer J.: One step forward, two steps back; xeno-micrnas reported in breast milk are artifacts. *PLoS ONE*, 11, (2016), e0145065.

microRNA – NEW PLAYER AMONG BIOACTIVE DIET COMPONENTS

Abstract: *Discovery of microRNA molecules and their role in gene expression is of fundamental significance for molecular biology, medical diagnostics, nutrigenomics and also for food technology and human nutrition. MicroRNAs are short (approximately 22 -26 nucleotides), noncoding RNAs which together with enzymatic RISC complex are responsible for mRNA degradation, decrease of translation level and, finally, silencing of gene expression. More than 1000 human microRNAs identified so far may control 30% to 60% of gene expression at the posttranscriptional level. Some human microRNAs can be modulated by bioactive diet components like resveratrol, genistein, curcumin and epigallocatechin gallate. An influence of different phytochemicals on microRNA levels and gene silencing is already well evidenced. However biological activity of exogenous microRNA of plant or animal origin is much more controversial. Milk miRNAs are of special interest of scientists, because they can exist as exceptionally resistant toward degradation in biological fluids, gastrointestinal tract and circulation. Moreover, milk microRNA can regulate gene expression in recipient cells of newborns and, probably, adults. Results of very recent studies confirm a mechanism by which milk microRNA can inhibit DNA methyltransferases responsible for epigenetic methylation of DNA and regulation of gene expression. Levels of these microRNA in food are influenced by technological processes, food preservation and storage.*

Keywords: exogenous microRNA, DNA methyltr

METABOLOMIKA JAKO NARZĘDZIE BADAWCZE W OCENIE ŻYWNOSCI

Klaudia KOPCZYŃSKA*, Alicja PONDER, Katarzyna KRÓL,
Karolina MISZTAL

*Katedra Żywności Funkcjonalnej, Ekologicznej i Towaroznawstwa, Szkoła
Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa*

*klaudia_kopczynska@sggw.pl

Streszczenie: *Metabolomika to nauka wywodząca się z dziedzin takich, jak genomika, transkryptomika czy proteomika. Za pomocą badań metabolomicznych możliwa jest kompleksowa charakterystyka badanego materiału, opierająca się na analizie endogennych i egzogennych metabolomów (tj. cząsteczek o masie nie przekraczającej 1,5 kDa). Metody badań metabolomicznych dzieli się na profilowe i ukierunkowane oraz są szeroko wykorzystywane w ocenie jakości żywności. Pochodzenie geograficzne lub system uprawy są ściśle związane z jakością końcowego produktu. W pracy dokonano przeglądu wybranych artykułów naukowych dotyczących wykorzystania badań metabolomicznych do potwierdzenia pochodzenia geograficznego, odmiany i systemu uprawy wybranych przykładów produktów spożywczych.*

Słowa kluczowe: metabolomika; chromatografia; jakość żywności; autentyczność żywności

1. Wprowadzenie

Metabolomika jest szybko rozwijającą się dziedziną nauki, ściśle związaną z obszarem biologii systemowej. Wywodzi się z nauk określanых potocznie jako „omiczne”, do których zaliczamy również genomikę, transkryptomikę czy proteomikę. Istotą badań metabolomicznych jest kompleksowa charakterystyka próbek biologicznych, endogennych i egzogennych tzw. metabolomów wykrywanych w badanym materiale. Badania te mogą być wykorzystywane w analizie zarówno materiału zwierzęcego, jak i roślinnego [1]. Metabolomami określa się zaś związki o bardzo niskiej masie cząsteczkowej, nie przekraczającej 1,5 kDa, takie jak kwasy tłuszczowe, aminokwasy, jedno- i dwucukry, aminy, nukleotydy, małowcząsteczkowe kwasy organiczne [2]. Wszechstronność badań metabolomicznych pozwala analizować metabolity obecne w komórkach każdego rodzaju: ludzkich, zwierzęcych, roślinnych, grzybów i bakteryjnych; umożliwiając użycie tej metody zarówno w badaniach medycznych, jak i badaniach żywności. Coraz częściej nauka ta znajduje zastosowanie w analizie ilościowych i jakościowych zmian zawartości związków chemicznych w surowcach i produktach spożywczych, w celu określenia wpływu przetwarzania

żywności na zawartość związków o niskiej masie cząsteczkowej, a także nowatorską próbę oceny różnic pomiędzy żywnością pochodzącą z upraw ekologicznych i konwencjonalnych [3, 4]. Zwyczajowo metabolomiczną analizę związków rozróżnia się na ogólną analizę profilową (ang. untargeted analysis) i na analizę ukierunkowaną (ang. targeted analysis). Analiza profilowa (holistyczna) pozwala na uzyskanie ogólnego profilu związków niskocząsteczkowych, jednak nie zawsze połączona jest z dokładną identyfikacją związków. Głównym jej celem jest dyskryminacja wzorców metabolitów, które mogą zmieniać się w odpowiedzi na zmiany środowiskowe, genetyczne czy wynikające z działalności człowieka [5]. Aby w lepiej definiować żywność, określa się biomarkery charakterystyczne dla danego produktu metodą tzw. odcisku palca (ang. food fingerprints). Pełnią one funkcję znaczników, które pozwalają nam odpowiedzieć na pytania dotyczące autentyczności, w tym również zafałszowań żywności [6]. W przypadku pochodzenia geograficznego żywności badania metabolomiczne są istotne ze względu na produkty chronione znakami jakościowymi (np. Chronione Oznaczenie Geograficzne, ChOG), tak aby zmniejszyć skalę zafałszowań takich produktów. Natomiast analiza ukierunkowana dotyczy rozpoznania grup konkretnych związków, które mogą sugerować powstałe procesy biochemiczne (identyfikacja konkretnych metabolitów). Efektem tej analizy jest bezpośredni opis jakościowy badanego materiału, wynikający ze składu żywności. Identyfikacja wspomnianych związków najczęściej polega na wykorzystaniu baz danych opisujących metabolity już wcześniej scharakteryzowane. Badania metabolomiczne mogą służyć też jako zaawansowane narzędzie analityczne do oceny korelacji pomiędzy metabolitami i sensorycznymi atrybutami produktów spożywczych [7].

Możliwość wykrycia niskocząsteczkowych związków jest możliwa dzięki wysokiej czułości narzędzi analitycznych stosowanych w metabolomice. Wśród najczęściej wykorzystywanych narzędzi wymienić można: spektroskopię rezonansu magnetycznego (NMR), spektroskopię w niskiej podczerwieni (NIR), spektroskopię mas (MS) w analizie chemometrycznej, chromatografię gazową (GC), w tym chromatografię GC qTOF, jak również chromatografię cieczową LC (wysokosprawna HPLC i ultra-wydajna UPLC) oraz elektroforezę kapilarną (CE). Metodyka analiz próbek żywności, w odróżnieniu do analiz medycznych, wymaga poprawnie przygotowanego materiału badawczego, w postaci ekstraktów badanej żywności [2, 8]. Za szczególnie skuteczne narzędzie uważana jest spektrometria mas. MS pozwala zidentyfikować praktycznie każdy rodzaj cząsteczki, nawet w próbkach o bardzo złożonej strukturze chemicznej. Wyniki uzyskane techniką MS są rejestrowane jako widma masowe, najczęściej na wykresach zależności kumulacji jonów od ich masy cząsteczkowej (m/z). Informacja ta pozwala zidentyfikować lub scharakteryzować strukturalnie składniki złożonych materiałów, na przykład produktów spożywczych [9].

W pracy dokonano przeglądu wybranych artykułów naukowych z czasopism recenzowanych, przedstawiających wyniki badań żywności z dziedziny metabolomiki. Zebrane wyniki podzielono ze względu na czynniki: pochodzenie

geograficzne, odmianę surowca, system uprawy oraz zafałszowanie dodatkiem innego składnika żywności. Według autorów przywołanych artykułów, czynniki te są źródłem różnic między zidentyfikowanymi biomarkerami żywności.

2. Potencjalne biomarkery autentyczności żywności w zależności od pochodzenia geograficznego i odmiany

Jakość żywności, obok ceny produktu, stanowi jedną z jego najbardziej istotnych cech. Nabywcy surowców spożywczych, jak i gotowych wyrobów przetworzonych, przywiązują coraz większą uwagę do jakości kupowanych towarów. Zgodnie z najnowszymi trendami, współczesny konsument ceni sobie rzetelność informacji o produkcie oraz jakość związaną z jego pochodzeniem. Na rynku żywności można znaleźć wiele produktów spożywczych charakterystycznych dla danego regionu geograficznego, którego produkcja i oznaczenie pochodzenia jest obostrzona prawnie. Szczególną ochroną prawną objęte są m.in. oznaczenia geograficzne i nazwy pochodzenia produktów rolnych. Przykładami takich produktów są m.in. wino, kawa i oliwa z oliwek [10, 11].

Wyniki metabolomicznych badań autentyczności wybranych produktów spożywczych oraz wykaz ich potencjalnych biomarkerów (tabela 1) opisano poniżej. Jakość winogron ma decydujące znaczenie dla jakości zrobionego z nich wina, a badania dowodzą, że profil powstających w nich metabolitów, takich jak kwasy organiczne, aminokwasy, węglowodany, fenylopropanoidy i flawonoidy, różnią się w zależności od odmiany i pochodzenia geograficznego. Charakterystycznymi potencjalnymi biomarkerami wykrywanymi w winogronach pochodzących z Portugalii mogą być sześciowęglowe alkohole [12]. Autorzy kolejnych badań, po przeprowadzeniu szczegółowej analizy głównych szlaków metabolomicznych (glikolizy, cyklu kwasów trikarboksylowych, powstawania aminokwasów i sacharozy) i zawartości metabolitów w zależności od stadium dojrzałości owoców, wykazali, że profil metabolomiczny różnicował winogrona dwóch odmian, pochodzących z jednego regiony Chile [13].

Ostatnio przeprowadzone badania wskazały także, że biomarkerami odróżniającymi wina z dwóch odmian białych winogron (Feteasca Regala i Sauvignon Blanc) były taniny, związki charakterystyczne dla win czerwonych. Wino z odmiany Feteasca Regala wyróżniało się większą zawartością tanin, w porównaniu z drugą odmianą winogron [14]. Określenie profilu metabolomicznego pozwala również na ocenę ilościową i jakościową surowców użytych do uzyskania końcowego produktu. Przykładem może być kawa, do produkcji której wykorzystuje się głównie ziarna dwóch gatunków kawowca, Arabica (łac. *Coffea arabica*) i Robusta (łac. *Coffea canephora*). Ziarna kawy gatunku Arabica, w przeciwieństwie do Robusty, charakteryzują się lepszymi walorami sensorycznymi, atrakcyjniejszym zapachem i smakiem.

Tabela 1. Potencjalne biomarkery autentyczności żywności w zależności od pochodzenia geograficznego i odmiany

Biomarkery	Materiał badawczy (kraj pochodzenia)	Źródło literaturowe
1-heksanol, octan 2 metylobutyli, octan heksylu, 2-metylobutanonian butylu, etyl-2- metylobutanonian, heksanonian etylu, propanian heksylu, pentyl-2- metylobutanonian	Sok jabłkowy (Chiny) odmiany: <i>Starkrimson, Qinguan, Gala, Jonagold, Golden Delicious, Fuji</i>	[19]
kwas absycynowy, kwas ferulowy, naringina, neohesperydyna, tryptofan, glukozyd nomiliy	Soki cytrusowe <i>Cytryny, grejpfrut mandarynki, pomarańcze</i>	[20]
adenina, alanina, fruktoza, inozytol, prolina, kwas linolenowy, glukozyd-3- kwercytiny	Winogrona (Korea Południowa)	[35]
1-heksanol, (E)-3- heksanol, (Z)-heksanol	Winogrona (Portugalia)	[12]
aminokwasy, kwasy tłuszczowe, kwasy hydroksykwasy, kwasy dikarboksyłowe, cukry, kwasy fenylpropanowe, flawonoidy	Winogrona (Chile)	[13]
(E)- β -damascenone, α -bisabolene, α -terpineol, α -ylangene, β -bourbonene, β -ionene, geraniol, hotrienol, linalool	Winogrona (Madera)	[37]
taniny	Wino (Rumunia)	[14]
kofeina, cholina, sacharoza, kwas kawoilochinowy, cytrynian, jabłczan, trygonelina	Kawa <i>Arabica (Brazylia, Kolumbia, Gwatemala, Tanzania), Robusta (Indonezja, Wietnam)</i>	[15]
kwaskawoilochinowy, kwas dikawoilochinowy, kwas linolowy, kwas feruloilochinowy, kwas palmitynowy, sacharoza	Kawa <i>Arabica (Brazylia)</i>	[16]
6-O-metylofestestol, kahweol	Kawa <i>Arabica Robusta</i>	[18]
kofeina, inozytol, kwas piroglutaminnowy	Kawa <i>Arabica Kopi Luwak Robusta Kopi Luwak (Indonezja)</i>	[17]

Konsumenci, pomimo wyższej ceny kawy Arabica, doceniają jej jakość, dlatego skłonni są wydać większą sumę pieniędzy. Ma to istotne znaczenie w dobie coraz częstszych przypadków fałszowania kawy ziarnami niskiej jakości. Konsumenci, pomimo wyższej ceny kawy Arabica, doceniają jej jakość, dlatego skłonni są wydać większą sumę pieniędzy. Ma to istotne znaczenie w dobie coraz częstszych przypadków fałszowania kawy ziarnami niskiej jakości. W ostatnich pięciu latach opublikowano wiele artykułów naukowych dotyczących fałszowania kawy, a opisane w nich badania skupiały się na identyfikacji biomarkerów charakterystycznych dla ziaren różnych gatunków i odmian. Stwierdzono na przykład, że kawa gatunku Arabica zawiera znacznie więcej sacharozy, cytrynianu, trygoneliny i jabłczanu, podczas gdy Robusta charakteryzuje się wyższym poziomem kofeiny, cholicy i kwasów kawoilochinowych [15]. Profil związków fenolowych, kwasów tłuszczowych i sacharozy został także zidentyfikowany jako grupa biomarkerów różnicujących osiem odmian kaw gatunku Arabica. Rozpoznawanie charakterystycznego profilu tych związków uznano za narzędzie przydatne w procesie certyfikacji i identyfikowalność ziaren kawy [16]. Analizy metabolomiczne wykonywane w ostatnio przeprowadzanych badaniach pozwoliły również na rozróżnienie gatunków Robusta i Arabica w kawie typu Kopi Luwak, pozyskiwanej z odchodów łaskuna palmowego. Kawa ta jest najdroższą kawą dostępną na rynku, co skłania nieuczciwych producentów do jej fałszowania. Jak dotąd nie istniały skuteczne metody określania jej autentyczności i dopiero analiza metaboliczna stała się potencjalnym narzędziem wykrywania fałszerstw. Wyniki badań wykazały, że biomarkerami dyskryminacyjnymi jest zawartość kofeiny, inozytolu i kwasu piroglutaminowego. Była to jednocześnie pierwsza opublikowana praca na podstawie, której można było skutecznie odróżnić autentyczne i zafałszowane próbki Kopi Luwak, na podstawie analizy zawartości kwasu cytrynowego, kwasu jabłkowego, i stosunku inozytolu do kwasów piroglutaminowych [17]. Późniejsze badania zaprezentowały możliwość potwierdzenia gatunku użytych ziaren kawy na podstawie zawartości dwóch związków, jako potencjalnych biomarkerów. Związek 16-o-metylofestestol zawarty był tylko w kawie gatunku Robusta, natomiast kahweol tylko w kawie gatunku Arabica [18].

Identyfikacja biomarkerów metabolomicznych używana była również do skutecznego rozróżnienia odmian surowców użytych do produkcji soków z jabłek i cytrusów. Według autorów jednej z prac, analiza ta może z powodzeniem służyć jako narzędzie do kontroli jakości soków jabłkowych, wykrywając ewentualne zafałszowania produktu [19]. Wyniki nieukierunkowanej analizy metabolomicznej pozwoliły także na ocenę różnic pomiędzy dostępnymi na rynku sokami z różnych gatunków cytrusów (cytryna, grejpfrut, mandarynka, pomarańcza). Metabolitami różnicującymi były m.in. kwas abscysynowy (ABA), limonoidy, flawonoidy i aminokwasy odróżniały uzyskane soki pomiędzy różnymi odmianami wykorzystanych cytrusów [20].

3. Potencjalne biomarkery autentyczności żywności w zależności od systemu uprawy

Ekologiczny i konwencjonalny sposób uprawy ma istotny wpływ na zawartość wielu związków wytwarzanych przez rośliny, a jednocześnie będących ważnymi składnikami diety człowieka [21]. Profil tych związków, potencjalnych biomarkerów (tabela 2), może odróżniać surowce pochodzące z tych dwóch różnych systemów rolniczych.

Jak ukazują badania, pochodzenie ziarna z uprawy ekologicznej bądź konwencjonalnej, może zostać określone zawartością 8 metabolitów (alaniny, β -alaniny, gliceryny, hydroksyglutaranu, mioinozytolu, kwasu pantotenowego, mocznika i waliny) wykrywanych w produktach zbożowych [22]. W kolejnych badaniach powtórzyły się trzy (alanina, mioinozytol i mocznik) z 11 zidentyfikowanych metabolitów różnicujących pszenicę ekologiczną od konwencjonalnej [3].

Badania z wykorzystaniem analizy metabolomicznej pozwalają także na określenie pochodzenia owoców pomidorów. Przykładem biomarkerów pozwalających na zidentyfikowanie konwencjonalnie uprawianych pomidorów, była obecność glutamylfenyloalanina i N-melonylotryptofan w wytworzonych z nich produktach (ketchup) [23]. Pomidory różnych odmian, uprawiane w takim samym systemie, charakteryzowały się także większą zawartością tomatyny [24].

Tabela 2. Metabolity jako potencjalne biomarkery autentyczności żywności według systemów produkcji (ekologiczny vs. konwencjonalny)

Biomarkery	Materiał badawczy	Źródło literaturowe
glutamylfenyloalanina, N-malonylotryptofan	Pomidor	[23]
tomatyna	Pomidor	[24]
alanina, β -alanina, gliceryna, hydroksyglutaran, mioinozytol, kwas pantotenowy, mocznik, walina	Pszenica	[22]
4-aminobutanonian, alanina, adenozyzna, arabinoza, asparagina, asparagininian, etanoloamina, jabłczan, mio-inozytol, tryptofan, mocznik	Pszenica	[3]
Kofeina, kwas chlorogenowy, trygonelina	Kawa	[26]
β -apo-karotenal, β -karoten, β -kryptoksantyna, kantaksantyna, zeaksantyna	Jaja	[25]

Inne badania, opierające się na profilowaniu karotenoidów, pozwoliły na weryfikację systemu produkcji jaj kurzych. Jaja pochodzenia ekologicznego charakteryzowały się wyższą zawartością β -karotenu i zeaksantyny. Autorzy pracy uznali te dwa związki za potencjalne biomarkery różnicujące pochodzenie jaj [25]. Jednym z produktów popularnych wśród konsumentów żywności ekologicznej jest kawa. Podobnie do przywołanych już badań, metabolitami różnicującymi kawę ekologiczną, od konwencjonalnej są kofeina, trygonelina i kwas chlorogenowy. Jak wykazały badania, związki te wykryte zostały w większej ilości w produktach powstałych z ziaren uprawianych w systemie ekologicznym, w porównaniu do ich konwencjonalnych odpowiedników [26].

4. Badania metabolomiczne w wykrywaniu zafałszowań oliwy z oliwek

Zastępowanie oryginalnych surowców produktów cenionych na rynku spożywczym, tańszymi i gorszymi jakościowo substytutami, może być dla producenta korzystne i atrakcyjne finansowo. Jest to jednak nie tylko oszustwo gospodarcze, ale przede wszystkim poważne wprowadzanie konsumenta w błąd [27-29]. Oliwa z oliwek, ze względu na charakterystyczny skład kwasów tłuszczowych jest produktem trudnym do analizy pod względem jakości i autentyczności. Wykrywanie zafałszowań jest obecnie jednym z największych wyzwań producentów oliwy z oliwek. W celu ochrony klientowi producentów przed fałszywymi deklaracjami jakości oliwy z oliwek, organizacje rządowe ustanowiły wymagania certyfikacji niezbędne dla tego produktu [30]. Zafałszowania oliwy były już szeroko badane wieloma metodami chromatograficznymi, jednak w każdej z nich jest długi czas przygotowania próbki. Jedną z najczęstszych metod fałszowania oliwy jest dodawanie do niej innych rodzajów olejów roślinnych, np. oleju z orzechów laskowych, z orzechów włoskich, oleju sojowego czy rzepakowego. Przykłady zafałszowań oliwy z oliwek dokumentowane w artykułach naukowych, przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Przykłady zafałszowań oliwy z oliwek, wykryte metodą badań metabolomicznych

Zidentyfikowane zafałszowanie oliwy z oliwek	Źródło literaturowe
olejem z orzechów laskowych (6% całej masy produktu)	[32]
nasionami kukurydzy, bawełny, soi, słonecznika lub olejem palmowym	[31]
olejami rafinowanymi i olejem z orzechów włoskich	[36]
mieszkanką olejów roślinnych	[27]
olejem z orzechów laskowych	[39]
mieszkanką olejów ze słonecznika i kukurydzy, z nasion bawełny i rzepaku	[38]
olejem sojowym	[27]

W przypadku oliwy z oliwek, wykrywanie związków różnicujących produkt oryginalny od zafałszowanego wykonuje się przez identyfikację metabolomów charakterystycznych dla składnika fałszującego. W zależności od dokładności zastosowanej metody, możliwe jest wykrycie różnego poziomu zanieczyszczeń. Spektroskopia FTIR użyta w badaniu metabolomicznym pozwoliła na identyfikację dodatku oleju słonecznikowego na poziomie 20 ml w 1 litrze oliwy. Według autorów jest to ilość niższa od poziomu, przy którym takie zafałszowanie staje się korzystne ekonomicznie [27]. Za pomocą analizy metabolomicznej możliwe było także wykrycie zafałszowań dokonanych na etapie przygotowania oliwek do tłoczenia, wynikających z dodatku innych surowców, np. nasion soi i nasion słonecznika [31-33]. Skutecznym sposobem analizy zafałszowań stało się również ukierunkowanie techniki badawczej na zawartość konkretnych substancji, charakterystycznych dla prawdopodobnego dodatku. W taki sposób dokonano wykrycia zawartości oleju sojowego w oliwie z oliwek, podczas badania mającego na celu identyfikację nieoczekiwanych w oliwie związków z grupy triacylogliceroli (TAG) [34, 9]. Oliwa z oliwek charakteryzuje się dużą zawartością związków bioaktywnych (np. karotenoidów i kwasów fenolowych) i steroli. Profil tych typowych dla oliwy związków jest ściśle związany z ich odmianą i pochodzeniem, co pozwala na skuteczne wykrywanie zafałszowania oliwy. Wykorzystanie chromatografii UHPL-QTOF okazało się być pomocne w odróżnieniu dwóch rodzajów oliwy, wskazując kwasy hydroksybenzoesowe, cholesterol i pochodne stigmasterolu jako markery różnicujące oliwę tunezyjską od włoskiej [29]. Wyniki innych badań ujawniły ponad 70 markerów (głównie z grupy polifenoli i steroli) różnicujących oliwy ze względu na ich pochodzenie. Możliwość identyfikacji tak wielu związków wynika z dokładnego poznania charakterystycznych dla danej odmiany szlaków metabolicznych, uwarunkowanych zmianami środowiska. W przypadku oliwy z oliwek, analiza metabolomiczna pozwala na niemalże 100% wykrycie zafałszowań produktu [6].

5. Podsumowanie

Jakość żywności jest pojęciem dotyczącym cech produktu spożywczego na każdym szczeblu jego produkcji, od uprawy do spożycia przez konsumenta. Przykładami cech jakościowych jest pochodzenie geograficzne, odmiana i zastosowany system uprawy surowca. Oryginalność, a przede wszystkim autentyczność tych cech uznaje się za gwarancję wysokiej jakości produktów spożywczych. Pomimo obostrzeń prawnych związanych z certyfikacją produktów (m.in. chronione pochodzenie geograficzne, żywność ekologiczna), na rynku spożywczym dostępne są produkty uważane za oryginalne, a w rzeczywistości tylko sprzedawane w cenie produktu oryginalnego. Dotyczy to produktów takich, jak wina gronowe, kawa, soki owocowe czy oliwa z oliwek. Do oceny zafałszowań żywności potrzebne są precyzyjne metody badawcze. Ta bardzo czuła metoda umożliwiła zidentyfikowanie związków powiązanych z konkretnymi szlakami metabolomicznymi. Różnice profilu metabolomicznego, spowodowane

przez środowisko, różnorodność genetyczną lub zamierzone działanie człowieka, skutkują powstaniem charakterystycznych biomarkerów. Na podstawie przeanalizowanych wyników badań można wnioskować, że metabolomika jest skutecznym narzędziem służącym ocenie autentyczności lub pochodzenia produktów oryginalnych, na podstawie którym można dokonać weryfikacji pochodzenia i składu produktów. Barięą w wykorzystaniu metabolomiki do analizy żywności jest złożoność procesów biochemicznych i fizjologicznych związanych z potencjalnymi biomarkerami żywności. W związku z tym, w celu efektywnego wykorzystania badań metabolomicznych w ocenie żywności, niezbędna jest współpraca specjalistów z wielu dziedzin, m.in. bezpieczeństwa żywności, procesów produkcyjnych, rolnictwa, biochemii, biologii i analizy danych statystycznych.

Literatura

- [1] Trujillo E.: Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. *Journal of the American Dietetic Association*, 106, (2006), 403-413.
- [2] Jawień E.: Ludzki mikrobiom, żywienie, metabolomika, czyli na pograniczu chemii i biologii, *na pograniczu chemii i biologii*, 31, (2013), 347-354.
- [3] Bonte A: Metabolite profiling on wheat grain to enable a distinction of samples from organic and conventional farming system, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, (2014), 2605-2612.
- [4] Lopez-Sanchez P.: Comprehensive metabolomics to evaluate the impact of industrial processing on the phytochemical composition of vegetable purees, *Food Chemistry*, 168, (2014), 348-355.
- [5] Słowikowska A.: Metabolomika – chemiczny „odcisk palca” i istotny element medycyny personalizowanej, *Folia Cariologica*, 11(4), (2016), 353-358.
- [6] Ghisoni S.: Discrimination of extra-virgin-olive oils from different cultivars and geographical origins by untargeted metabolomics. *Food Research International*, 121, (2019), 746-753.
- [7] Jiang T.: Differentiation of commercial ground beef products and correlation between metabolites and sensory attributes: A metabolomic approach. *Food Research International*, 90, (2016), 298-306.
- [8] Michalak M.: Meta-omiki – nowe strategie w analizie mikrobiomu i właściwości funkcjonalnych fermentowanych warzyw, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce*, 1, (2018), 104-109.
- [9] Ferranti P.: The future of analytical chemistry in foodomics, *Current Opinion in Food Science*, 22, (2018), 102-108.
- [10] Lipińska I.: Systemy chronionych nazw pochodzenia i oznaczeń geograficznych produktów rolnych, *Journal of Agribusiness and Rural Development*, 4(10), (2008), 1-10.
- [11] Śmiechowska M.: Autentyczność jako kryterium zapewnienia jakości żywności, *Annales Academiae Medicae Gedanensis*, 43, (2013), 175-181.
- [12] Oliveira J.M.: C 6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin, *Analytica Chimica Acta*, 563(1), (2006), 300-309.
- [13] Caudros-Inostroza A.: GC-MS metabolic profiling of Cabernet Sauvignon and Merlot cultivars during grapevine berry development and network analysis reveals a stage- and cultivar-dependent connectivity of primary metabolites. *Metabolomics*, 12, (2016), 39.
- [14] Magdas D.: Wine discrimination based on chemometric analysis of untargeted markers using FT-Raman spectroscopy, *Food Control*, 85, (2018), 385-391.
- [15] Wei F.: NMR based metabolomics for the classification of green coffee beans according to variety and origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), (2012), 10118-10125.

- [16] Garrett R.: Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics, *LWT Food Science and Technology*, 50(2), (2013), 496-502.
- [17] Jumhawan U.: Selection of discriminant markers for authentication of Asian palm civet coffee (Kopi Luwak): a metabolomics approach, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(33), (2013), 7994-8001.
- [18] Monakhova Y.B.: Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using ¹H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 182, (2015), 178-184.
- [19] Guo J.: Feature Selection and Recognition from Nonspecific Volatile Profiles for Discrimination of Apple Juices According to Variety and Geographical Origin, *Journal of Food Science*, 77(10), (2012), 1090-1096.
- [20] Arbona V.: Non-targeted metabolite profiling of citrus juices as a tool for variety discrimination and metabolite flow analysis. *BMC Plant Biology*, 15(1), (2015), 38-54.
- [21] Barański M.: Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses, *British Journal of Nutrition*, 112, (2014), 794-811.
- [22] Zörb C.: Metabolite Profiling of Wheat Grains (*Triticum aestivum* L.) from Organic and Conventional Agriculture, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), (2006), 8301-8306.
- [23] Vallverdú-Queralt A.: A Metabolomic Approach Differentiates between Conventional and Organic Ketchups, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), (2011), 11703-11710.
- [24] Caprioli G.: High-performance liquid chromatography LTQ-Orbitrap mass spectrometry method for tomatidine and non-target metabolites quantification in organic and normal tomatoes, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(8), (2014), 942-947.
- [25] van Ruth S.: Authentication of organic and conventional eggs by carotenoid profiling. *Food Chemistry*, 126(3), (2011), 1299-1305.
- [26] do Carmo Carvalho D.: Organic and Conventional *Coffea arabica* L.: A Comparative Study of the Chemical Composition and Physiological, *Biochemical and Toxicological Effects in Wistar*, 66, (2011), 114-121.
- [27] Tay A.: Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using Fourier transform infrared spectroscopy, *LWT – Food Science and Technology*, 35(1), (2002), 99-103.
- [28] Gómez-Caravaca A.M.: Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review, *Analytica Chimica Acta*, 913, (2016), 1-21.
- [29] Mohamed M.B.: Discrimination of Tunisian and Italian extra-virgin olive oils according to their phenolic and sterolic fingerprints. *Food Research International*, 106, (2018), 920-927.
- [30] Binetti G.: Cultivar classification of Apulian olive oils: Use of artificial neural networks for comparing NMR, NIR and merceological data, *Food Chemistry*, 219, (2017), 131-138.
- [31] Andrikopoulos N.K.: Analysis of olive oil and seed oil triglycerides by capillary gas chromatography as a tool for the detection of the adulteration of olive oil. *Journal of Chromatographic Science*, 39(4), (2001), 37-145.
- [32] Vaclavik L.: Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment, *Analytica Chimica Acta*, 645, (2009), 56-63.
- [33] Black C.: The current and potential applications of Ambient Mass Spectrometry in detecting food fraud, *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 82, (2016), 268-278.
- [34] Fasciotti M.: Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS, *Talanta*, 81(3), (2010), 1116-1125.
- [35] Ali K.: NMR Metabolic Fingerprinting Based Identification of Grapevine Metabolites Associated with Downy Mildew Resistance, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), (2009), 9599-9606.
- [36] Lai Y.W.: Quantitative analysis of potential adulterants of extra virgin olive oil using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 53(1), (1995), 95-98.

- [37] Perestrelo R.: Establishment of the varietal profile of *Vitis vinifera* L. grape varieties from different geographical regions based on HSSPME/GC-qMS combined with chemometric tools, *Microchemical Journal*, 116, (2014), 107-117.
- [38] Gurdeniz G.: Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data, *Food Chemistry*, 116(2), (2009), 519-525.
- [39] Grošelj N.: The use of FT-MIR spectroscopy and counter-propagation artificial neural networks for tracing the adulteration of olive oil, *Acta Chimica Slovenica*, 55(4), (2008), 935-941.

METABOLOMIC AS A RESEARCH TOOL TO THE FOOD ASSESSMENT

Abstract: *Metabolomics is a science from genomics, transcriptomics and proteomics areas. It is possible to comprehensively characterize the examined research material, based on the analysis of endogenous and exogenous metabolomes (molecules with a mass not exceeding 1.5 kDa). Metabolomic research methods are divided into profiled and targeted and they are widely used in the assessment of food quality. Geographical origin or farming system are closely related to the quality of the final product. The paper reviews selected scientific articles on the use of metabolomic studies to confirm geographical origin, variety and system of growing selected examples of food products.*

Key words: metabolomics; chromatography; food quality; food authenticity

OWOCE GOJI JAKO ŹRÓDŁO SUBSTANCJI DZIAŁAJĄCYCH PROZDROWOTNIE

Aleksandra PLUCIŃSKA*, Alina KUNICKA-STYCZYŃSKA

*Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka*

*aleksandra.plucinska@edu.p.lodz.pl

Streszczenie: *Substancje pochodzenia roślinnego, stosowane od wieków jako środki wspomagające leczenie lub łagodzące objawy wielu chorób, zyskują obecnie uznanie jako aktywne preparaty polecane w celu zapobiegania, czy hamowania rozwoju niektórych chorób cywilizacyjnych. Owoce kolcowoju pospolitego (*Lycium barbarum* L.), znane pod nazwą owoców Goji, charakteryzują się bogactwem substancji działających korzystnie na zdrowie człowieka. Prowadzone badania wskazują na znaczącą aktywność biologiczną zarówno jagód Goji, jak i pozyskiwanych z nich ekstraktów. Celem prezentowanej pracy było przybliżenie wartości prozdrowotnej owoców kolcowoju pospolitego, ze szczególnym uwzględnieniem ich frakcji polisacharydowej. Przedstawiono przykłady badań prowadzonych *in vitro* i *in vivo* w modelach zwierzęcych, dokumentujących szczególne działanie ochronne, przeciwzapalne i przeciwcukrzycowe kompleksu polisacharydów *Lycium barbarum* L. - LBP. Ze względu na właściwości prozdrowotne jagód *Lycium barbarum* L., suplementacja diety tymi owocami lub ich pochodnymi, może działać wspomagająco na organizm człowieka, stanowiąc element żywności funkcjonalnej.*

Słowa kluczowe: kolcowój pospolity; żywność funkcjonalna; polisacharydy; kompleks polisacharydowy *Lycium barbarum* L.

1. Wprowadzenie i ogólna charakterystyka *Lycium barbarum* L.

Współcześnie, organizm ludzki narażony jest na wielokierunkowy stres środowiskowy. Pomimo coraz lepszych warunków życia, wzrastająca aktywność, stres, chemizacja upraw rolnych i spożywanie dużych ilości wysoko przetworzonej żywności, przyczyniają się do rozpowszechnienia chorób cywilizacyjnych. W poszukiwaniu substancji działających prozdrowotnie, człowiek często sięga do zasobów medycyny naturalnej. Znane tylko w niektórych regionach świata rośliny są na nowo odkrywane i wprowadzane do diety na podstawie udokumentowanych naukowo właściwości biologicznych.

Kolczaste winorośle kolcowoju pospolitego (*Lycium barbarum* L.), zwane też kolcowojem szkarłatnym, czy jagodą Goji, należą do klasy *Magnoliopsida*, rzędu *Solanales*, rodziny *Solanaceae* i rodzaju *Lycium*. Roślina ta jest krzewem o długich gałęziach, często wymagających podpory. Kolcowój pospolity nie ma specjalnych wymagań glebowych i jest odporny na suszę. Rośnie w umiarkowanym, wilgotnym klimacie, na glebach dobrze przepuszczalnych. Największe uprawy kolcowoju pospolitego znajdują się w Azji: Chinach, Mongolii i Tybecie. Ponadto kolcowój uprawiany jest na terenach Ameryki Północnej i Ameryki Południowej (Argentyna, Chile) oraz w Afryce Południowej. W ostatnich latach ze względu na dużą popularność jagód kolcowoju, uprawy Goji zakłada się również na terenach Europy. Najwięcej upraw znajduje się na obszarach Włoch, Rumuni i Bułgarii oraz Portugalii [8, 19, 20].

Chociaż owoce kolcowoju pospolitego są jadalne, to roślina ta uznawana jest za trującą, ze względu na możliwe porażenia układu nerwowego, paraliż mięśni i zaburzenia w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego. Uważa się, że niedojrzałe owoce również mogą mieć niekorzystne działanie na zdrowie człowieka. Owoce Goji mają charakterystyczny wydłużony kształt, a wielkość jagód nie przekracza 1-2 cm. Jagody mają barwę jaskrawą, pomarańczowo-czerwoną i słodko-cierpki smak. Zbiór owoców odbywa się od sierpnia do października [19]. Roślina ta znana jest w Azji od ponad 2300 lat i stosowana jako zioło lecznicze, suplement diety oraz tradycyjna żywność [18]. Jagody *Lycium barbarum* L. są na ogół suszone i dopiero w takiej postaci spożywane. Stosowane są również jako dodatek do napojów, deserów oraz potraw mięsnych [10]. W ostatnim czasie na rynku pojawiły się soki i galaretki przygotowane na bazie owoców Goji. Smak tego owocu zależy głównie od proporcji cukrów i kwasów organicznych. Jagody charakteryzują się wysoką zawartością aminokwasów, polisacharydów i karotenoidów [23].

Jagody kolcowoju szkarłatnego stosowane są w chińskiej medycynie ze względu na bardzo korzystny wpływ na organizm człowieka – zawartość witamin i związków mineralnych oraz wysoką wartość odżywczą [15]. Zawierają między innymi: witaminy z grupy B (B₁, B₂, B₆), witaminę C i E oraz żelazo, cynk, wapń, miedź, selen i fosfor [21]. *Lycium barbarum* L. inaczej jagoda wilków (bo i taka nazwa jest znana w starożytnej Azji) ma, zgodnie z teorią i praktyką tradycyjnej chińskiej medycyny, korzystny wpływ na funkcjonowanie wątroby i nerek. W medycynie naturalnej jej zbawienny wpływ przypisuje się zachowaniu równowagi biologicznej organizmu [23]. Za dobroczynne efekty spożywania owoców Goji uważa się: opóźnianie procesów starzenia komórek, zapobieganie rozwojowi nowotworów, wspomaganie układu odpornościowego, działanie hipoglikemiczne, stymulację wydzielania insuliny, przeciwdziałanie zapaleniu jelita grubego, poprawę zdolności uczenia się i zapamiętywania [4, 24]. Ponadto jagodom kolcowoju pospolitego przypisuje się zmniejszanie skutków napromieniowania lub chemioterapii, działanie kardioprotekcyjne, przeciw-wirusowe i przeciwzapalne [6, 9].

Celem prezentowanej pracy jest przybliżenie wartości prozdrowotnej owoców kolcowoju pospolitego, znanych pod nazwą jagód Goji, ze szczególnym uwzględnieniem ich frakcji polisacharydowej.

2. Aktywność biologiczna kompleksów polisacharydowych jagód *Lycium barbarum* L.

Ze względu na wysoką zawartość substancji odżywczych oraz soli mineralnych, jagody Goji otrzymały miano „superfood”. Polisacharydy stanowią najliczniejszą grupę związków zidentyfikowanych w jagodach kolcowoju pospolitego [17, 22]. Kompleks rozpuszczalnych w wodzie polisacharydów *Lycium barbarum* L. (LBP – *Lycium barbarum* L. polysaccharides) jest jednym z najcenniejszych komponentów jagód Goji. Około 5-8% suchej masy suszonych owoców *Lycium barbarum* L. to polisacharydy lub ich glikokoniugaty [1]. Frakcja polisacharydowa ma strukturę glikopeptydu i zawiera kwas galakturonowy, 18 aminokwasów i dziewięć monosacharydów, w tym dużą ilość ksylozy i glukozy oraz małe ilości arabinozy, ramnozy, mannozy i galaktozy [25]. Pomimo stosowania od wieków w diecie człowieka jagód kolcowoju szkarłatnego, nie potwierdzono jeszcze w pełni ich korzystnego działania terapeutycznego na poziomie biochemicznym [3]. Jednakże badania prowadzone w modelach zwierzęcych oraz hodowlach komórkowych wskazują na wielokierunkową aktywność biologiczną kompleksu LBP.

2.1. Działanie opóźniające starzenie się komórek

Wiele badań wskazuje, że kompleks polisacharydowy jagód Goji może korzystnie wpływać na apoptozę i starzenie się komórek. Xia i wsp. [26] badali mechanizmy działania kompleksu LBP w żywym modelu słodkowodnej ryby z rodziny karpowatych *Danio rerio*. Ocenili wskaźniki przeżycia *in vivo* i określili profil ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnałowym p53. Zarodki *Danio rerio* zostały poddane działaniu LBP w stężeniach 1,0-4,0 mg/ml przez okres trzech dni. Stwierdzono, że przy niskich dawkach LBP komórki zarodków były odporne na starzenie replikacyjne. Ponadto obserwowano zmniejszenie ekspresji genów p53, p21 i Bax kodujących białka odpowiedzialne za starzenie się komórek. Równocześnie wzrosła ekspresja genów kodujących ligazę ubikwitynową E3 (Mdm2) działającą antagonistycznie do białka p53 i ekspresja genów odwrotnej transkryptazy telomerazy [26].

Chang i So [3] wykazali działanie neuroprotektoryjne kompleksu LBP, co wskazuje na możliwość wykorzystania tego kompleksu do przeciwdziałania utracie neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych. Polisacharydy wyekstrahowane z jagód Goji mogą chronić neurony przed toksycznym działaniem peptydów beta-amyloidowych, co wykazano w hodowlach komórek nerwowych z komórkami zwojowymi siatkówki w eksperymentalnym modelu jaskry. Ponadto wyizolowano aktywny składnik polisacharydu, który może osłabiać

kinazy stresowe i proapoptotyczne szlaki sygnałowe, co potwierdza działanie przeciwstarzeniowe kompleksu polisacharydów [3].

2.2. Działanie przeciwnowotworowe

Choroby nowotworowe są jednymi z najczęściej występujących w krajach rozwiniętych. Obecne działanie dostępnych leków chemioterapeutycznych nie jest wolne od znaczących skutków ubocznych. Kompleksy polisacharydów pozyskanych z materiału roślinnego stanowią potencjalne źródło substancji chemicznych wykazujących dobrą aktywność przeciwnowotworową. Mogą one stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych substancji, ponieważ wykazują selektywną aktywność wobec komórek nowotworowych przy minimalnej toksyczności dla komórek prawidłowych [14].

W ostatnich latach wykazano zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, że kompleks polisacharydów *Lycium barbarum* L. zawierający kilka frakcji możliwych do rozdzielenia metodą chromatografii jonowymiennej, ma aktywność przeciwnowotworową. Badania wskazują na zależność pomiędzy aktywnością biologiczną frakcji LBP, a jej masą molekularną [7, 11].

2.3. Działanie ochronne

Według danych WHO, w 2012 roku 5,9% wszystkich zgonów na świecie zostało spowodowanych nadmiernym spożywaniem alkoholu. Przewlekłe spożywanie alkoholu wywołuje stres oksydacyjny komórek wątroby z powodu zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu, jak również zmniejszonej aktywności antyoksydacyjnej komórek [25].

Badania nad wpływem kompleksu polisacharydów *Lycium barbarum* L. i potencjalnym zapobieganiem stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez alkohol prowadzono w warunkach *in vivo* w modelu zwierzęcym. Badano aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginowej (AST) w surowicy krwi, poziomy lipidów, przeciwutleniacze oraz określono zmiany histopatologiczne wątroby szczurów, którym podawano alkohol etylowy oraz alkohol etylowy wzbogacany o LBP. Stwierdzono, że wzbogacenie alkoholu etylowego o kompleks LBP znacząco hamowało wzrost aktywności obu aminotransferaz, ALT i AST, w surowicy krwi. Ponadto wprowadzenie polisacharydów *Lycium barbarum* L. wiązało się ze spowalnianiem postępu stłuszczenia wątroby wywołanego alkoholem, zwiększeniem poziomu antyoksydantów, ale także obniżeniem poziomu produktów peroksydacji lipidów [5].

Xiao i wsp. [28] badali ochronne działanie polisacharydów *Lycium barbarum* L. (LBP) w indukowanym tetrachlorkiem węgla (CCl₄) ostrym uszkodzeniu wątroby. Wyniki uzyskane przez ten zespół dowodzą, że kompleks LBP powoduje znaczące zmniejszenie nekroinfekcji i stresu oksydacyjnego wywołanego przez toksycznie działający tetrachlorek węgla. Badania te wskazują na potencjalną ochronną rolę kompleksu polisacharydów *Lycium barbarum* L., który stosowany jako suplement diety mógłby stanowić czynnik protekcyjny,

przyczyniając się do zapobiegania chorobom wątroby. Ochrona LBP może mieć istotne zastosowanie kliniczne, ponieważ wiele ze schorzeń wątroby, w tym stłuszczenie i marskość wątroby, charakteryzują się podobnymi mechanizmami patologicznymi jak zatrucie tetrachlorkiem węgla [28].

2.4. Hamowanie stanów zapalnych

Jagody *Goji* działają modulująco na układ odpornościowy i hamują stan zapalny, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i w warunkach *in vivo*. W pracy Kang i wsp. [13] badano ochronny wpływ jagód *Lycium barbarum* L. w chorobie jelit w modelu mysim. Suplementacja diety owocami Goji łagodziła objawy choroby zapalnej jelita grubego wywołane przez siarczan dekstranu sodu (DSS). Wprowadzenie do diety owoców Goji skutkowało obniżeniem o 30% śmiertelności myszy powodowanej zapaleniem jelita grubego i okrężnicy oraz uszkodzeniem błony śluzowej jelita. Badania te uznano za wskazujące na prawdopodobny korzystny wpływ jagód Goji na zdrowie i samopoczucie pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit, gdzie mogłyby być stosowane jako uzupełniająca strategia terapeutyczna [13].

2.5. Wpływ na metabolizm

Polisacharydy *Lycium barbarum* L. (LBP) mogą mieć również korzystny wpływ na zdrowie dorosłych, u których nie stwierdza się zmian chorobowych. W badaniach Xia i wsp. [27] określano efekty metaboliczne wprowadzenia LBP do diety dorosłych mężczyzn. Są to jedne z nielicznych badań klinicznych dotyczących suplementacji diety człowieka ekstraktami jagód Goji. Badania randomizowane prowadzono na grupie 42 zdrowych młodych mężczyzn (w tym 21 w grupie kontrolnej) wprowadzając do ich diety 300 mg LBP/dobę przez okres 4 tygodni. Po tym czasie oceniano poziom ośmiu metabolitów w moczu i surowicy krwi stwierdzając, że LBP może wpływać na metabolizm glicerofosfolipidów i metabolizm tyrozyny. Stosowano frakcję LBP o masie molekularnej 3,74 kDa, zawierającą fukozę, ramnozę, aminogalaktozę, galaktozę, glukozę, mannozę i fruktozę o stosunku molowym 0,02:0,08:0,03:0,11:46,67:0,37:4,72. Jest to pierwsza praca, łącząca metabolomikę z zastosowaniem fitozwiązków zawartych w kompleksie LBP. Niezbędne są dalsze badania pozwalające na wskazanie dokładnego mechanizmu działania kompleksów polisacharydów *Lycium barbarum* L. i ich wpływu na metabolizm człowieka [27].

W innych badaniach klinicznych [2] 67 pacjentów cierpiących na cukrzycę typu 2 (30 w grupie kontrolnej i 37 w grupie LBP) zażywało kapsułki w dawce 300 mg LBP na dobę. Badania prowadzono w okresie 3 miesięcy dokumentując działanie hipoglikemiczne i wyraźne obniżenie poziomu lipidów u pacjentów, których dietę suplementowano kompleksem LBP. Wyniki wskazują na niezwykle efekt ochronny LBP u pacjentów z cukrzycą typu 2. Stwierdzono, że stężenie glukozy w surowicy krwi zmniejszyło się znacząco, a indeks insulinowy

zwiększył się podczas doustnego testu tolerancji metabolicznej OMTT (oral metabolic tolerance test) po 3 miesiącach podawania LBP. Podawanie polisacharydów *Lycium barbarum* L. wiązano także ze wzrostem poziomu cholesterolu HDL u pacjentów. Skuteczność hipoglikemiczna była bardziej istotna u pacjentów nie przyjmujących leków hipoglikemicznych, niż u pacjentów przyjmujących leki hipoglikemiczne [2]. Badania te, podobnie jak opisane w pracy Jing i wsp. [12], wskazują na kompleks LBP jako potencjalnie dobry środek wspomagający leczenie cukrzycy typu 1 i typu 2.

Aktywność hipoglikemiczna owoców *Lycium barbarum* L. jest przypuszczalnie skorelowana z zawartością, rodzajem i organizacją przestrzenną kompleksu polisacharydów. Ze względu na aktywność kompleksu LBP jagody Goji mogą potencjalnie stanowić hipoglikemiczną żywność funkcjonalną lub surowiec do opracowania nowego środka przeciwcukrzycowego [29].

3. Podsumowanie

Jagody *Lycium barbarum* L. zawierają bogactwo związków działających korzystnie na zdrowie człowieka. Biologiczna aktywność jagód Goji jest nie tylko historycznie ugruntowana poprzez ich szerokie zastosowanie w medycynie naturalnej, ale również potwierdzana naukowo. Oprócz niezaprzeczalnego efektu antyoksydacyjnego, najbardziej interesująca jest biologiczna funkcja kompleksu polisacharydów LBP. Badania prowadzone zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* w modelach zwierzęcych wskazują na szczególne działanie ochronne, przeciwzapalne i przeciwcukrzycowe kompleksu LBP. Biorąc pod uwagę właściwości jagód *Lycium barbarum* L., suplementacja diety tymi owocami lub ich pochodnymi może działać wspomagająco na organizm człowieka utrzymując jego dobrostan.

Literatura

- [1] Amagase H., Farnsworth N.R.: Review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji), *Food Research International*, 44, (2011), 1702-1717.
- [2] Cai H., Liu F., Zuo P., Huang G., Song Z., Wang T., Lu H., Guo F., Han C., Sun G.: Practical application of antidiabetic efficacy of *Lycium barbarum* polysaccharide in patients with type 2 diabetes. *Medicinal Chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))*, 11, (2015), 383-390.
- [3] Chang R., So K-F.: Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far?, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28, (2008), 643-652.
- [4] Chen W., Cheng X., Chen J., Yi X., Nie D., Sun X., Qin J., Tian M., Jin G., Zhang X.: *Lycium barbarum* polysaccharides prevent memory and neurogenesis impairments in scopolamine-treated rats, *PLoS ONE*, 9, (2014), 1-13, e8807, doi: 10.1371/journal.pone.0088076.
- [5] Cheng D., Kong H.: The effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on alcohol-induced oxidative stress in rats, *Molecules*, 16, (2011), 2542-2550.
- [6] Cheng J., Zhou Z., Sheng H., He L., Fan X., He Z., Sun T., Zhang X., Zhao R.J., Gu L., Cao C., Zhou S.: An evidence-based update on the pharmacological activities and possible

- molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides, *Drug Design, Development and Therapy*, 9, (2014), 33-78.
- [7] Deng X., Li X., Luo S., Zheng Y., Luo X., Zhou L.: Antitumor activity of *Lycium barbarum* polysaccharides with different molecular weights: an *in vitro* and *in vivo* study, *Food & Nutrition Research*, 61, (2017), 1399770. doi: 10.1080/16546628.2017.1399770.
 - [8] Dzhugalov H., Lichev V., Yordanov A., Kaymakanov P., Dimitrova V., Kutoranov G.: First results of testing Goji berry (*Lycium barbarum* L.) in Plovdiv region, Bulgaria, *Scientific Papers. Series B, Horticulture* 59, (2015), 47-50.
 - [9] Islam T., Yu X., Badwal T.S., Xu B.: Comparative studies on phenolic profiles, antioxidant capacities and carotenoid contents of red goji berry (*Lycium barbarum*) and black goji berry (*Lycium ruthenicum*), *Chemistry Central Journal*, 11, (2017), 1–8, doi: 10.1186/s13065-017-0287-z.
 - [10] Istrati D., Vizireanu C., Iordachescu G., Dima F., Garnai M.: Physico-chemical characteristics and antioxidant activity of goji fruits jam and jelly during storage, Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: *Food Technology*, 37, (2013), 100-110.
 - [11] Jin M., Huang Q., Zhao K., Shang P.: Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L., *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, (2013), 16-23.
 - [12] Jing L., Cui G., Feng Q., Xiao Y.: Evaluation of hypoglycemic activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum*, *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines* : *AJTCAM*, 6:4, (2009), 579-584.
 - [13] Kang Y., Xue Y., Du M., Zhu M-J.: Preventive effects of Goji berry on dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 40, (2017), 70-76.
 - [14] Khan T., Date A., Chawda H., Patel K.: Polysaccharides as potential anticancer agents – a review of their progress, *Carbohydrate Polymers*, 210, (2019), 412-428.
 - [15] Kulczyński B., Gramza-Michałowska A.: Goji berry (*Lycium barbarum*): composition and health effects – a review, *Polish Journal of Food Nutrition and Science*, 66, (2016), 67-75.
 - [16] Li S., Tan H-Y., Wang N., Zhang Z-J., Lao L., Wong C-W., Feng Y.: The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, (2015), 26087-26124.
 - [17] Li X.M., Li X.L., Zhou A.G.: Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits *in vitro*, *European Polymer Journal*, 43, (2007), 488-497.
 - [18] Li X.M.: Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats, *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, (2007), 461-465.
 - [19] Mencinicopschi I.C., BLAN V.: Scientific substantiation for the introduction, on Romanian territory, of *Lycium barbarum* L.: a species with sanogene properties, *AgroLife Scientific Journal*, 2, (2013), 95-102.
 - [20] Niro S., Fratianni A., Panfili G., Falasca L., Cinquanta L., Alam M.: Nutritional evaluation of fresh and dried Goji berries cultivated in Italy, *Italian Journal of Food Science*, 29, (2017), 398-407.
 - [21] Pai P.G., Habeeba P.U., Ullal S., Shoeb P.A., Pradeepti M.S., Ramya K.: Evaluation of hypolipidemic effects of *Lycium barbarum* (Goji Berry) in a murine model, *Journal of Natural Remedies*, 11, (2013), 4-8.
 - [22] Qian D., Zhao Y., Yang G., Huang L.: Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae), *Molecules*, 22, (2017), e911, doi:10.3390/molecules22060911.
 - [23] Shahrajabian M.H., Sun W., Cheng Q.: A review of Goji berry (*Lycium barbarum*) in traditional Chinese medicine as a promising organic superfood and superfruit in modern industry, *Academia Journal of Medicinal Plants*, 6, (2018), 437-445.
 - [24] Tang T., He B.: Treatment of D-galactose induced mouse aging with *Lycium barbarum* polysaccharides and its mechanism study, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10, (2013), 12-17.

- [25] Tian M., Wang M.: Studies on extraction, isolation and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 31, (2006), 1063-1067.
- [26] Xia G., Xin N., Liu W., Yao H., Hou Y., Qi J.: Inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on cell apoptosis and senescence is potentially mediated by the p53 signaling pathway, *Molecules Medicine Reports*, 9, (2014), 1237-1241.
- [27] Xia H., Tang H., Wang F., Yang X., Wang Z., Liu H., Pan D., Wang S., Sun G.: Metabolic effects of dietary supplementation of *Lycium barbarum* polysaccharides on serum and urine metabolomics in a young healthy male population, *Journal of Functional Foods*, 46, (2018), 440-448.
- [28] Xiao J., Liong E.C., Ching Y.P., Chang R.C.C., So K.F., Fung M.L., Tipoe G.L.: *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation, *Journal of Ethnopharmacology*, 139, (2012), 462-470.
- [29] Zou S., Zhang X., Yao W., Niu Y., Gao X.: Structure characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L., *Carbohydrate Polymers*, 80, (2010), 1161-1167.

GOJI BERRIES AS A SOURCE OF HEALTH-PROMOTING COMPOUNDS

Abstract: *Used for centuries as a supporting treatment, or alleviating symptoms of many diseases, substances of plant origin are currently gaining recognition as active preparations recommended to prevent or inhibit the development of certain civilization diseases. The fruits of *Lycium barbarum* L., also known as Goji berries, are characterized by the richness of the substances acting positively on human health. The current research indicate a significant biological activity of both Goji berries, and their extracts. The aim of the work was to present the health-promoting value of “Goji berries” with particular regard to their polysaccharide fraction. The examples of studies conducted in vitro and in vivo in animal models, documenting specific protective, anti-inflammatory and antidiabetic *Lycium barbarum* L. polysaccharides complex – LBP were highlighted. Due to the health benefits of *Lycium barbarum* L. berries consumption, diet supplementation by these fruits or their derivative, can serve as an support to the human organism, acting as an element of functional foods.*

Key words: Goji berry; functional foods; polisaccharides; *Lycium barbarum* L. polisaccharide complex

WŁAŚCIWOŚCI CZEKOLAD ORIGIN DOSTĘPNYCH NA POLSKIM RYNKU

Dorota ŻYŻELEWICZ*, Joanna ORACZ, Michał BOGUCKI, Gabriela CHACHUŁA, Milena KACZMARSKA, Weronika HARASIMIUK

Instytut Technologii i Analizy Żywności, Politechnika Łódzka, Łódź

*dorota.zyzelewicz@p.lodz.pl

Streszczenie: Czekolady Origin (Single Origin i Blend Origin) to czekolady wyprodukowane z ziaren kakaowych pochodzących z wybranych upraw, z jednego źródła, tj. plantacji, kilku plantacji jednego właściciela lub z danego regionu, np. kraju. Charakteryzują się wyjątkowym oraz unikalnym smakiem i aromatem pochodzącym od użytego ziarna. Decydują o tym położenie geograficzne plantacji oraz warunki agrotechniczne upraw kakaowców. Celem badań było określenie właściwości antyoksydacyjnych oraz porównanie składu związków lotnych tworzących aromat gorzkich, deserowych lub mlecznych czekolad typu Origin o zawartości składników pochodzących z ziaren kakaowych od 32 do 100%, dostępnych na polskim rynku. W czekoladach oznaczono skład jakościowo-ilościowy związków lotnych metodą SPME-GC-MS, stężenie polifenoli metodą UHPLC-DAD i polifenoli ogółem metodą Folina-Ciocalteu, aktywność przeciwrodnikową z zastosowaniem rodnika DPPH oraz zdolność redukowania jonów żelaza metodą FRAP. Badania wykazały, że najbogatsze w związki lotne były czekolady wykonane z ziaren pochodzących z Kolumbii, Ghany i Ekwadoru, natomiast najprzyjemniejszymi nutami zapachowymi (np. orzechowa, kwiatowa) odznaczały się czekolady produkowane z ziaren z Peru. Najniższym stężeniem polifenoli oraz najsłabszymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzowały się czekolady mleczne, najlepszymi zaś czekolady otrzymane z ziaren kakaowców uprawianych w Ekwadorze.

Słowa kluczowe: czekolady Origin, aromat, właściwości przeciwutleniające

1. Wprowadzenie

Czekolady Origin (Single Origin i Blend Origin) to czekolady wyprodukowane z ziaren kakaowych pochodzących z wybranych upraw, z jednego źródła, tj. plantacji, kilku plantacji jednego właściciela lub z danego regionu, np. kraju. Charakteryzują się wyjątkowym oraz unikalnym smakiem i aromatem pochodzącym od użytego ziarna. Decydują o tym położenie geograficzne plantacji oraz warunki agrotechniczne upraw kakaowców, w tym rodzaj gleby, nasłonecznienie, wilgotność i temperatura powietrza, sposób fermentacji i suszenia ziaren. Kolejne etapy produkcji czekolad, takie jak prażenie i konszowanie są równie istotne w formowaniu smaku i aromatu czekolady [1, 2].

Każda czekolada odmiany Origin dostarcza innych, niezwykłych doznań w czasie konsumpcji. Smak może zawierać nuty korzenne, owocowe, kwiatowe lub ziołowe. Pochodzenie ziaren, podstawowego surowca do produkcji czekolad ma wpływ na ich specyficzny charakter oraz wyraźne nuty smakowe i zapachowe. Ziarna uprawiane w różnych regionach posiadają różną intensywność smaku, odczucie słodczy, goryczy, kwasowości oraz charakteryzują się różnymi nutami zapachowymi – owocowymi, drewnianymi, orzechowymi, kwiatowymi i przypraw.

Owocowymi nutami charakteryzują się czekolady wyprodukowane z ziaren plantacji znajdujących się na Jawie, w Tanzanii, Ghanie, Kongo, Papui Nowej Gwinei, Wenezueli, Republice Dominikany i Ekwadorze. Drewnianymi i palonymi nutami wyróżniają się ziarna z upraw na Arribie, Madagaskarze oraz Sao Tome. Ziarna z Papui Nowej Gwinei, Arriby, Ghany charakteryzują się aromatem orzechowym, a kwiatowym ziarna z Meksyku. Nuty herbaciane i ostrych przypraw można znaleźć w czekoladach z ziaren z plantacji w Togo, Meksyku i Tanzanii [1, 8].

Ziarno kakaowe i czekolady zawierają związki biologicznie aktywne, w tym korzystnie oddziałujące na zdrowie ludzi polifenole. Zawartość polifenoli w surowym ziarnie zależy przede wszystkim od jego odmiany, warunków klimatyczno-glebowych danego regionu upraw i sposobu uprawy [3, 6]. Procesy przetwórcze, w tym fermentacja i suszenie a następnie prażenie powodują duży ubytek tych cennych związków oraz obniżenie aktywności antyoksydacyjnej wyrobu gotowego związanej z ich składem jakościowym i ilościowym [3, 4, 6, 10, 11].

Celem badań było określenie właściwości antyoksydacyjnych metodami *in vitro*, składu jakościowo-ilościowego polifenoli oraz porównanie składu związków lotnych tworzących aromat trzynastu czekolad gorzkich, deserowych lub mlecznych typu Origin dostępnych na polskim rynku, charakteryzujących się różną zawartością składników pochodzących z ziaren kakaowych (32-100%).

2. Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły czekolady gorzkie, deserowe i mleczne wyprodukowane z ziaren kakaowych pochodzących z różnych regionów upraw, charakteryzujące się zróżnicowaną zawartością składników tych ziaren (tabela 1). Analizowane czekolady otrzymane były z udziałem sacharozy, poza czekoladą GE-80x, w której jako substancję słodzącą zastosowano ksylitol.

Tabela 1. Wykaz analizowanych czekolad

Nazwa czekolady	Pochodzenie ziarna kakaowego użytego to produkcji czekolady	Zawartość składników z ziaren kakaowych [%]
CZEKOLADY GORZKIE		
GG-100	Ghana	100
GK-85	Kolumbia	85
GE-80x	Ekwador	80
GE-74	Ekwador	74
GM-71	Madagaskar	71
GP-70gcp	Peru	70
GP-70t	Peru	70
GE-70	Ekwador	70
CZEKOLADY DESEROWE		
DP-64	Peru	64
DA-60	Amazonia	60
CZEKOLADY MLECZNE		
MP-43	Peru	43
ME-39	Ekwador	39
MM-32	Madagaskar	32

W badanych czekoladach oznaczono skład jakościowy i ilościowy polifenoli, zawartość polifenoli ogółem, aktywność antyoksydacyjną *in vitro* oraz skład związków lotnych tworzących aromat czekolad. Próby czekolad rozdrobniono i odtłuszczono przy użyciu n-heksanu. Odtłuszczone próby poddano trzykrotnej ekstrakcji za pomocą mieszaniny acetonu, wody i kwasu octowego w stosunku 140:59,5:1 (v/v/v), zgodnie z procedurą opisaną przez Żyżelewicz i wsp. [10].

Skład jakościowy i ilościowy związków polifenolowych

Skład jakościowy i ilościowy związków polifenolowych badanych czekoladach oznaczono metodą ultrasprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych z detekcją spektrofotometryczną – UHPLC-DAD (UHPLC+Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), zgodnie z metodą opisaną przez Żyżelewicz i wsp. [11].

Zawartość polifenoli ogółem

Zawartość polifenoli ogółem w badanych czekoladach oznaczono metodą Folina-Ciocalteu według procedury opisanej przez Oracz i Nebesny [5] oraz Złotek i wsp. [9]. Wyniki wyrażono jako ekwiwalent kwasu galusowego (mg) w przeliczeniu na gram odtłuszczonej czekolady (mg GAE/g).

Aktywność przeciwrodnikowa

Aktywność przeciwrodnikową badanych czekolad określono metodą spektrofotometryczną, wykorzystującą stabilne rodniki DPPH [12]. Zdolność zmiatania rodnika DPPH podano w procentach i μM Troloks/g odtłuszczonej czekolady. Dodatkowo obliczono wskaźnik EC_{50} (ilość próby potrzebna do 50% redukcji początkowego stężenia syntetycznego rodnika DPPH).

Zdolność do redukcji jonów żelaza(III)

Zdolność do redukcji jonów żelaza(III) badanych czekolad oznaczono metodą FRAP (ang. Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter), według procedury opisanej przez Pastoriza i Rufián-Henares [7]. Wyniki aktywności przeciwutleniającej wyrażono jako ekwiwalent Troloksu w przeliczeniu na gram odtłuszczonej czekolady ($\mu\text{mol Troloks/g}$).

Skład związków lotnych tworzących aromat czekolad

Skład związków lotnych tworzących aromat czekolad oznaczono metodą HS-SPME-GC-MS zgodnie z metodyką opisaną przez Żyżelewicz i wsp. [10]. Do ekstrakcji związków lotnych zastosowano włókno diwinylobenzen/karboksen /polidimetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS; 50/30 μm , 1 cm). Analizę związków lotnych przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego Varian GC-450 sprzężonego ze spektrometrem mas Saturn 220-MS (Varian) (Palo Alto, CA, USA). Separację związków prowadzono na kolumnie kapilarnej Thermo Scientific™ TR-WAX (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). Jako gaz nośny zastosowano hel o natężeniu przepływu 0,7 ml/min. Warunki temperaturowe kolumny były następujące: temperatura początkowa: 37°C utrzymywana przez 5 minut, następnie zwiększono ją do 50°C z szybkością 5°C/min. Ostatecznie temperatura zwiększana była w trybie 5,5°C/min do poziomu 230°C i utrzymywana w tzw. izotermie końcowej przez 10 minut. Otrzymanie widm masowych odbywało się w trybie EI (Electron Ionisation) przy potencjale 70eV i w zakresie przemiatania 30–200 m/z (a.m.u). Temperatury źródła jonów oraz linii transferowej łączącej GC-MS wynosiły odpowiednio 180°C oraz 200°C. Identyfikacji związków dokonywano na podstawie porównania widm masowych analitów z widmami masowymi związków zgromadzonych w bibliotece NIST 08 MS i AMDIS 2.6 oraz danych literaturowych [10]. Wykorzystywano w tym celu oprogramowanie systemu GC-MS MS Data Review. Do określenia składu procentowego związków w próbkach brano pod uwagę powierzchnię rozdzielonych pików. Następnie na podstawie powierzchni pików określono zawartość procentową każdego ze zidentyfikowanych związków.

Analiza statystyczna wyników

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Przeprowadzono analizę wariancji w układzie jednoczynnikowym ANOVA przy użyciu programu STATISTICA 10 (StatSoft Inc., Tulsa, USA), a także określono istotność różnic na podstawie testu Tukey'a, przy założonym poziomie istotności $p \leq 0,05$. W celu określenia zależności pomiędzy badanymi parametrami wyliczono współczynnik korelacji Pearsona przy użyciu programu Microsoft Office Excel 2013 firmy Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA). Wyniki analiz każdej próby przedstawiono jako wartości średnie i odchylenia standardowe z trzech równoległych powtórzeń.

3. Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczenia składu jakościowego i ilościowego związków polifenolowych w czekoladach gorzkich, deserowych i mlecznych, wyprodukowanych z ziaren kakaowych pochodzących z różnych regionów upraw, charakteryzujących się zróżnicowaną zawartością składników tych ziaren przedstawiono w tabeli 2. Przeprowadzone analizy wykazały duże zróżnicowanie w zawartości poszczególnych związków polifenolowych w badanych czekoladach. Sumaryczne stężenie oznaczonych związków, w zależności od rodzaju czekolady, regionu upraw kakaowców oraz zawartości składników pochodzących z ziaren kakaowych, mieściło się w granicach od $14,16 \pm 0,45$ do $602,21 \pm 0,76$ mg/100 g. Czekolady gorzkie w porównaniu z pozostałymi próbkami wyróżniały się zdecydowanie najwyższą zawartością wszystkich analizowanych polifenoli. Najniższy poziom stężenia tych związków zaobserwowano w czekoladach mlecznych. We wszystkich badanych czekoladach na najwyższym poziomie stężeń występowały związki należące do grupy flawan-3-oli. Najbogatszym źródłem tej grupy polifenoli okazała się czekolada gorzka GE-80x, wyprodukowana z ziaren kakaowych pochodzących z Ekwadoru, zawierająca w swoim składzie 80% składników pochodzących z tych ziaren, w której zawartość (-)-epikatechiny, procyanidyny B2 i C1 oraz (+)-katechiny wynosiła odpowiednio $280,59 \pm 0,54$, $158,56 \pm 0,32$, $95,34 \pm 0,27$ i $33,78 \pm 0,08$ mg/100 g (tabela 2). Z kolei wśród związków polifenolowych należących do grupy flawonoli we wszystkich badanych czekoladach zidentyfikowano kwercetynę, kwercetyno-3-O-galaktozyd kwercetyno-3-O-glukozyd i kwercetyno-3-O-arabinozyd. Zaobserwowano również, że wszystkie oznaczone flawonole występowały na najwyższym poziomie stężeń w czekoladzie gorzkiej GE-80x. W badanych czekoladach zidentyfikowano i oznaczono ilościowo także dwa związki zaliczane do grupy kwasów hydroksybenzoesowych tj. kwas galusowy i protokatechowy (tabela 2). Najwyższym stężeniem kwasu galusowego ($24,74 \pm 0,05$ mg/100g) odznaczała się czekolada gorzka GG-100, zawierająca w swoim składzie 100% składników ziaren kakaowych pochodzących z Ghany. Natomiast kwas protokatechowy występował w największych ilościach ($6,64 \pm 0,09$ mg/100 g) w czekoladzie gorzkiej GK-85, wyprodukowanej z ziaren kakaowych pochodzących z Kolumbii, zawierającej w swoim składzie 85% składników pochodzących z tych ziaren. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic ($p > 0,05$) w stężeniu tego kwasu pomiędzy próbkami czekolad gorzkich GE-80x i GP-70gcp. Spośród analizowanych prób, najmniejsze ilości wszystkich oznaczonych związków polifenolowych odnotowano w czekoladzie mlecznej MM-32, otrzymanej z ziaren kakaowych pochodzących z Madagaskaru (o zawartości miazgi kakaowej 32%).

Tabela 2. Zawartość związków polifenolowych w badanych czekoladach oznaczona z zastosowaniem metody UHPLC-DAD

Czekolada	Zawartość związków polifenolowych [mg/100g]											Suma polifenoli
	Flawan-3-ole			Kwasy fenolowe			Flawonole				Kwer-3-ara	
	(+)-Kat	(-)-Epi	Proc B2	Proc C1	Kwas gal	Kwas prot	Kwer	Kwer-3-gal	Kwer-3-glu			
CZEKOLADY GORZKIE												
GG-100	16,29±0,09	107,56±0,38	71,84±0,36	37,73±0,08	24,74±0,05	6,17±0,08	0,11±0,02	0,68±0,04	4,98±0,02	6,17±0,04	276,28±0,63	
GK-85	27,21±0,07	107,84±0,39	56,78±0,19	21,53±0,07	7,20±0,07	6,64±0,09	0,10±0,01	0,62±0,03	4,53±0,04	5,61±0,05	238,07±0,69	
GE-80x	33,78±0,08	280,59±0,54	158,56±0,32	95,34±0,27	14,06±0,03	4,69±0,06	0,14±0,02	0,87±0,05	6,34±0,03	7,85±0,08	602,21±0,76	
GE-74	37,28±0,11	212,70±0,35	148,99±0,34	74,55±0,16	12,24±0,05	4,54±0,08	0,13±0,01	0,79±0,02	5,75±0,02	7,12±0,07	504,08±0,73	
GM-71	24,79±0,09	112,53±0,64	74,82±0,25	31,40±0,12	8,98±0,08	3,96±0,07	0,11±0,01	0,71±0,03	5,18±0,03	6,41±0,08	268,88±0,81	
GP-70gcp	27,01±0,07	129,60±0,59	72,75±0,23	28,12±0,11	5,41±0,06	4,62±0,05	0,12±0,02	0,75±0,04	5,43±0,04	6,73±0,06	280,53±0,72	
GP-70t	19,34±0,08	84,96±0,35	62,64±0,36	21,98±0,09	6,45±0,08	1,04±0,04	0,10±0,01	0,86±0,05	5,35±0,05	6,63±0,08	209,35±0,68	
GE-70	17,60±0,10	90,40±0,47	61,59±0,24	31,44±0,11	7,11±0,07	3,53±0,05	0,08±0,02	0,53±0,02	3,83±0,02	4,75±0,04	220,86±0,54	
CZEKOLADY DESEROWE												
DP-64	17,52±0,08	101,26±0,43	82,65±0,17	47,31±0,12	7,04±0,05	3,36±0,02	0,10±0,02	0,82±0,04	5,12±0,02	6,34±0,04	271,52±0,54	
DA-60	13,81±0,09	79,42±0,36	60,24±0,16	34,37±0,13	8,40±0,04	3,38±0,01	0,08±0,01	0,52±0,03	3,76±0,03	4,65±0,03	208,62±0,55	
CZEKOLADY MLECZNE												
MP-43	3,58±0,03	18,87±0,07	13,27±0,07	6,23±0,03	1,46±0,01	0,70±0,01	0,02±0,01	0,16±0,02	1,02±0,03	1,27±0,03	46,59±0,47	
ME-39	6,75±0,05	34,44±0,11	24,70±0,04	12,56±0,07	2,11±0,02	0,70±0,02	0,02±0,01	0,10±0,01	0,79±0,03	0,97±0,03	83,15±0,53	
MM-32	1,30±0,01	5,91±0,04	3,94±0,02	1,65±0,02	0,47±0,01	0,21±0,03	0,01±0,01	0,04±0,03	0,27±0,03	0,36±0,03	14,16 ± 0,45	

(+)-Kat, (+)-katechina; (-)-Epi, (-)-epikatechina; Proc B2, procyanidyna B2; Proc C1, procyanidyna C1; Kwas gal, kwas galusowy; Kwas prot, kwas protokatechowy; Kwer, kwercetyna, Kwer-3-gal, kwercetyno-3-O-galaktozyd; Kwer-3-glu, kwercetyno-3-O-glukozyd; Kwer-ara, kwercetyno-3-O-arabinozyd, Kwer, kwercetyna

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że profil jakościowy i ilościowy związków polifenolowych czekolad gorzkich, deserowych i mlecznych jest istotnie determinowany przez region pochodzenia ziaren kakaowych, co jest związane z różnymi warunkami klimatycznymi i agrotechnicznymi uprawy drzew kakaowych, odmiennymi terminami zbiorów owoców kakaowca, a także procesami przetwórczymi jakim ziarna są poddawane jeszcze na plantacjach [6]. Liczne badania wykazały, iż procesy przerobu ziarna kakaowego, w tym fermentacja, suszenie, prażenie i alkalizacja, przyczyniają się do znaczącego obniżenia zawartości związków polifenolowych w tym surowcu [6, 3]. Jedynie w przypadku czekolad wyprodukowanych z surowego ziarna kakaowego lub przetworzonego w niewielkim stopniu zawartość związków bioaktywnych, w tym polifenoli jest najbardziej zbliżona do wyjściowego surowca [11].

Zawartość polifenoli ogółem oraz aktywność antyoksydacyjną badanych czekolad oznaczaną metodami spektrofotometrycznymi (z rodnikiem DPPH, zdolność do redukcji jonów żelaza(III)) przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Zawartość polifenoli ogółem oraz aktywność przeciwutleniająca badanych czekolad oznaczona z zastosowaniem różnych metod analitycznych

Czekolada	Zawartość polifenoli ogółem [mg GAE/g]	Zdolność redukcji jonów żelaza FRAP [μ M Troloks/g]	Zdolność zmiana rodnika DPPH [μ M Troloks/g]	Zdolność zmiana rodnika DPPH [%]	EC ₅₀ [mg odłuszczonej czekolady/mg DPPH]
CZEKOLADY GORZKIE					
GG-100	8,80±0,30	38,90±0,08	61,78±0,11	92,50±0,16	5,77±0,01
GK-85	10,82±1,09	38,28±0,03	59,51±0,03	92,01±0,04	5,99±0,02
GE-80x	12,00±0,51	39,64±0,06	58,21±0,11	88,41±0,16	6,12±0,01
GE-74	9,70±1,72	39,60±0,16	62,52±0,49	93,31±0,73	5,70±0,04
GM-71	10,94±0,09	38,63±0,11	55,70±5,87	83,68±8,80	6,44±0,68
GP-70gcp	10,32±0,03	38,06±0,05	58,16±3,17	89,13±4,85	6,14±0,33
GP-70t	10,88±0,04	38,63±0,06	58,32±3,95	88,12±5,95	6,13±0,41
GE-70	11,22±0,02	38,31±0,49	59,43±1,27	89,48±1,92	6,00±0,13
CZEKOLADY DESEROWE					
DP-64	10,84±0,03	38,07±0,16	60,11±0,19	92,19±0,28	5,93±0,02
DA-60	13,46±0,61	38,44± 0,05	59,45±0,6	88,99 ±0,90	6,00± 0,06
CZEKOLADY MLECZNE					
MP-43	6,39±0,87	34,98±0,83	40,15±1,04	60,03±1,55	8,88±0,23
ME-39	7,65±1,53	37,10±2,65	38,78±11,91	58,02±17,77	9,64±2,95
MM-32	7,27±0,24	15,96±0,33	3,73±0,93	5,71±1,39	96,42±23,41

Najwyższą zawartością polifenoli ogółem spośród wszystkich czekolad charakteryzowała się czekolada deserowa DA-60 ($13,46 \pm 0,61$ mg GAE/g), wyprodukowana z ziaren kakaowych pochodzących z Amazonii, zawierająca w swoim składzie 60% składników pochodzących z ziaren kakaowych. Czekolada ta zawierała więcej polifenoli ogółem niż badane czekolady gorzkie o wyższej zawartości miazgi kakaowej w swoim składzie. Może to być spowodowane zróżnicowaną zawartością polifenoli w surowcu wyjściowym i/lub zastosowaniem łagodnych warunków procesowych w czasie przetwarzania ziarna na czekoladę [3]. Wysokim stężeniem polifenoli ogółem charakteryzowały się także pozostałe czekolady gorzkie i deserowa, poza czekoladami GG-100 i GE-74. Natomiast zawartość polifenoli ogółem w czekoladach mlecznych była wyraźnie niższa niż w czekoladach gorzkich i deserowych, zwłaszcza w czekoladzie MP-43 ($6,39 \pm 0,87$ mg GAE/g), mimo, że zawierała ona więcej miazgi kakaowej niż pozostałe dwie czekolady mleczne.

Różnice w uzyskanych wynikach przypuszczalnie mogą wynikać z obecności w badanych czekoladach innych niż polifenole związków o właściwościach redukujących, w tym cukrów, białek, aminokwasów, jonów miedzi i żelaza oraz produktów reakcji Maillarda. Występowanie tych substancji w badanych próbach może przyczyniać się do wzrostu oznaczonej zawartości polifenoli, gdyż odczynnik Folina-Ciocalteu reaguje także z tymi związkami [4, 5]. Współczynnik korelacji pomiędzy sumarycznym stężeniem polifenoli oznaczonym metodą UHPLC-DAD a ogólną zawartością polifenoli w czekoladach wyniósł 0,65.

Czekolada deserowa DA-60 odznaczała się także wysoką zdolnością zmiatania rodników DPPH ($59,45 \mu\text{M}$ Troloks/g; $88,99 \pm 0,90\%$; $EC_{50} = 6,00 \pm 0,06$ mg/mg DPPH). Wyższą zdolność zmiatania tego rodnika wykazywały czekolady GE-74 ($62,52 \pm 0,49 \mu\text{M}$ Troloks/g; $93,31 \pm 0,73\%$; $EC_{50} = 5,70 \pm 0,04$ mg/mg DPPH) i GG-100 ($61,78 \pm 0,11 \mu\text{M}$ Troloks/g; $92,50 \pm 0,16\%$; $EC_{50} = 5,77 \pm 0,01$ mg/mg DPPH). Czekolady mleczne wykazywały niższą zdolność zmiatania rodników DPPH niż czekolady gorzkie i deserowe. Najniższą wartość tego parametru oznaczono w czekoladzie mlecznej MM-32 ($3,73 \pm 0,93 \mu\text{M}$ Troloks/g; $5,71\%$; $EC_{50} = 96,42 \pm 23,41$ mg/mg DPPH). Współczynnik korelacji pomiędzy ogólną zawartością polifenoli w czekoladach a zdolnością zmiatania rodników DPPH wyniósł 0,78.

Najwyższą zdolnością redukcji jonów żelaza charakteryzowała się czekolada GE-80x ($39,64 \mu\text{M}$ Troloks/g), GE-74 ($39,60 \mu\text{M}$ Troloks/g), a następnie GG-100 ($38,90 \mu\text{M}$ Troloks/g). Najniższą zdolność chelatowania jonów żelaza oznaczono w czekoladzie mlecznej MM-32 ($15,96 \mu\text{M}$ Troloks/g). Współczynnik korelacji pomiędzy ogólną zawartością polifenoli a zdolnością zredukowania jonów żelaza był na poziomie 0,60. Stwierdzono natomiast występowanie wysokiej korelacji pomiędzy wartościami parametrów DPPH i FRAP ($R^2 = 0,88$).

Występowanie poszczególnych związków lotnych w badanych czekoladach przedstawiono w sposób uogólniony w tabeli 4.

Tabela 4. Występowanie związków lotnych w badanych czekoladach typu *Origin*, dostępnych na polskim rynku

Czekolada	Kraj pochodzenia ziaren	2,3,5-trimetyloprazyna	kwasy octowe	2-metylo-5-propyloprazyna	butandion	3-izobutylo-2-meksyprazyna	kwasy izomasłowe	aldehid izowaleryanowy	kwasy 3-metylobutanowy	5-metylo-2-furfural	aldehid fenylacetylowy	5-metylo-2-furmetanol	kwasy fenylacetylowe	furanol	alkohol benzylowy	fenyletanol	1-oktanol	2-metoksy-4-winylofenol	kwasy heksamowy	2-acetyloptol
CZEKOLADY GORZKIE																				
GG-100	Ghana	x	x	x		x	x		x	x	x	x				x		x	x	x
GK-85	Kolumbia		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
GE-80x	Ekwador	x	x	x		x			x	x		x		x	x	x		x	x	x
GE-74	Ekwador	x	x	x	x	x		x	x	x								x	x	x
GM-71	Madagaskar	x	x			x		x		x					x			x	x	x
GP-70gcp	Peru	x	x		x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x
GP-70t	Peru	x	x		x	x		x		x								x	x	x
GE-70	Ekwador	x	x	x		x		x		x								x	x	x
CZEKOLADY DESEROWE																				
DP-64	Peru	x	x	x	x	x	x	x		x									x	x
DA-60	Amazonia	x	x	x	x	x				x				x				x	x	x
CZEKOLADY MLECZNE																				
MP-43	Peru	x	x	x	x	x	x	x		x									x	x
ME-39	Ekwador	x	x	x		x	x			x					x			x	x	x
MM-32	Madagaskar	x	x	x		x			x	x					x			x	x	x

Najczęściej występującymi związkami lotnymi, obecnymi w prawie wszystkich badanych czekoladach były 2,3,5-trimetylopirazyna, 3-izobutylo-2-metoksypirazyna, 5-metylo-2-furfural, a także kwas octowy, 2-metoksy-4-winylofenol, kwas heksanowy oraz 2-acetylopirol.

Związki lotne występujące w czekoladach wpływają na ich aromat. Następujące związki określają następujące nuty zapachowe w czekoladach:

- 2,3,5-trimetylopirazyna – aromat orzechowy, ostry, trawiasty,
- kwas octowy – aromat mocny, ostry,
- 2-metylo-5-propylopirazyna – aromat słodkiej czekolady, orzechowy,
- 3-izobutylo-2-metoksypirazyna – aromat słodkiej papryki,
- kwas 3-metylobutanowy – aromat słodki,
- 5-metylo-2-furfuranmetanol – aromat słodki, karmelowy,
- furaneol – aromat karmelowy, czekoladowy,
- alkohol benzyloowy – aromat słodki, kwiatowy,
- 2-metoksy-4-winylofenol – aromat dymny, drzewny goździkowy,
- kwas heksanowy – aromat ostry, mdły, zjełczały, kwaśny,
- 2-acetylopirol – aromat prażonych orzechów.

Na podstawie analizy danych można stwierdzić, że wśród analizowanych czekolad orzechowy aromat występował w największym stopniu w czekoladzie GE-80x, tj. w bezcukrowej czekoladzie o 80%-owej zawartości składników z ziarna kakaowego z Ekwadoru. Za tę nutę zapachową odpowiedzialnych jest kilka związków, w tym 2,3,5-trimetylopirazyna i 2-acetylopirol. 2-acetylopirol występował w każdej z badanych czekolad, jednakże w najwyższym stężeniu oznaczono go w gorzkiej czekoladzie GK-85, otrzymanej z ziaren z Kolumbii. W większości czekolad poza orzechowymi nutami zapachowymi występowały przyjemne aromaty ostrej papryki i słodkiej czekolady. Spośród mniej korzystnych aromatów występujących w większości czekolad można wyróżnić aromaty goździków, drewna czy dymu. Odpowiedzialna jest za to obecność 2-metoksy-4-winylofenolu. Kwas heksanowy wpływający na odczucie ostrości, aromatu mdłego, kwaśnego i zjełczałego oznaczony został we wszystkich badanych czekoladach. Najwyższym stężeniem tego związku odznaczała się gorzka czekolada GK-85 o zawartości składników ziarna wynoszącej 85%, wyprodukowana z ziaren z kakaowców uprawianych w Kolumbii. Zaznaczyć należy, że czekolada ta ma najbogatszy bukiet spośród badanych czekolad. Aromat mocny, ostry związany z obecnością kwasu octowego w większości czekolad dominował nad pozostałymi aromatami. Generalnie stężenie tego kwasu w każdej z czekolad było wyższe od 10%. W niektórych czekoladach występowała także nuta miodowa, związana z obecnością kwasu fenylooctowego lub fenyloetanolu. Wśród badanych czekolad kwas fenylooctowy występował tylko w gorzkiej czekoladzie GK-85. W czekoladach GK-85 i DP-70gcp oznaczono natomiast 1-oktanol odpowiedzialny za aromat cytrusowy.

3. Podsumowanie

- 1) Wśród badanych prób najwyższym stężeniem związków polifenolowych, należących do grupy flawan-3-oli, flawonoli oraz kwasów fenolowych, odznaczały się czekolady gorzkie, natomiast najniższą, analizowane czekolady mleczne.
- 2) Najwyższą zawartością polifenoli ogółem spośród badanych czekolad charakteryzowały się czekolady deserowe, mimo niższej w nich zawartości miazgi kakaowej niż w czekoladach gorzkich.
- 3) Czekolady gorzkie wykazywały najwyższą aktywność przeciwutleniającą oznaczaną metodą DPPH i w teście FRAP, szczególnie czekolady otrzymane z ziaren kakaowców uprawianych w Ekwadorze. Czekolada GE-74 odznaczała się najwyższą zdolnością zmiatania rodnika DPPH, natomiast najwyższą zdolnością redukcji jonów żelaza - czekolada GE-80x.
- 4) Aktywność antyoksydacyjna oznaczona z zastosowaniem testów *in vitro* (z rodnikiem DPPH i zdolność redukowania jonów żelaza) była najniższa w czekoladzie mlecznej MM-32, tj. w czekoladzie otrzymanej z udziałem ziaren kakaowych pochodzących z Madagaskaru, o zawartości miazgi kakaowej 32%.
- 5) Kwas octowy to związek lotny występujący w najwyższym stężeniu w badanych czekoladach.
- 6) Wszystkie badane czekolady zawierały nutę zapachową prażonych orzechów.
- 7) Najbogatsze w związki lotne były czekolady otrzymane z ziaren pochodzących z Kolumbii, Ghany i Ekwadoru.
- 8) Najprzyjemniejszymi nutami zapachowymi odznaczały się czekolady wyprodukowane z ziaren z Peru.

Literatura

- [1] Aprotosoae A.C., Luca S.V., Miron, A.: Flavor. Chemistry of cocoa and cocoa products – an overview, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15, (2016), 73-91.
- [2] Cambrai A., Marcic C., Morville S., Sae Houer P., Bindler F., Marchioni E.: Differentiation of chocolates according to the cocoa's geographical origin using chemometrics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(3), (2010) 1478-1483.
- [3] Di Mattia C.D., Sacchetti G., Mastrocola D., Serafini M.: From cocoa to chocolate: The impact of processing on *in vitro* antioxidant activity and the effects of chocolate on antioxidant markers *in vivo*, *Frontiers in Immunology* 8, (2017), 1207.
- [4] Ioannone F., Di Mattia C.D., De Gregorio M., Sergi M., Serafini M., Sacchetti G.: Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing, *Food Chemistry* 174, (2015), 256-262.
- [5] Oracz J., Nebesny E.: Antioxidant properties of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): influence of cultivar and roasting conditions, *International Journal of Food Properties*, 19, (2016), 1242-1258.
- [6] Oracz J., Żyżelewicz D., Nebesny E.: The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), depending on variety, growing region, and processing operations: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, (2015), 1176-1192.

- [7] Pastoriza S., Rufián-Henares J.: Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet, *Food Chemistry* 164, (2014), 438-445.
- [8] Qin X., Lai J., Tan L., Hao, C.-Y., Li, F.-P., He S.-Z., Song Y.-H.: Characterization of volatile compounds in *Criollo*, *Forastero*, and *Tritinario* cocoa seeds, *International Journal of Food Properties* 20(10), (2016), 2261-2275.
- [9] Złotek U., Mikulska S., Nagajek M., Świeca M.: The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts, *Saudi Journal of Biological Sciences* 23(5), (2016), 628-633.
- [10] Żyżelewicz D., Budryn G., Oracz J., Antolak H., Kręgiel D., Kaczmarska M.: The effect on bioactive components and characteristics of chocolate by functionalization with raw cocoa beans, *Food Research International* 113, (2018), 234-244.
- [11] Żyżelewicz D., Krysiak W., Oracz J., Sosnowska D., Budryn G., Nebesny E.: The influence of the roasting process conditions on the polyphenols content in cocoa beans, nibs and chocolate, *Food Research International* 89 (2), (2016), 918-929.
- [12] Żyżelewicz D., Oracz J., Kaczmarska M., Budryn G., Grzelczyk J.: Preparation and characterization of inclusion complex of (+)-catechin with β -cyclodextrin, *Food Research International* 113, (2018), 263-268.

PROPERTIES OF ORIGIN CHOCOLATE AVAILABLE ON THE POLISH MARKET

Abstract: *Origin (Single Origin and Blend Origin) chocolates are chocolates made from cocoa beans from selected crops, from a single source, i.e. plantations, several plantations of one farmer or from a given region, e.g. a country. They are characterized by unique flavor and aroma derived from the cocoa beans used. Flavor and aroma of cocoa beans are determined by the geographical location of the plantations and the applied agrotechnical conditions. The aim of the study was to determine the antioxidant properties and to compare the composition of volatile compounds forming the aroma of bitter, dessert or dairy Origin chocolates with the content of cocoa beans compounds ranging from 32 to 100%, available on the Polish market. In chocolates the qualitative-quantitative composition of volatile compounds was determined by the SPME-GC-MS method, concentration of polyphenols by UHPLC-DAD method, total polyphenol concentration by Folin-Ciocalteu method, antiradical activity using the DPPH radical and the ability to reduce iron ions by the FRAP method. Research has shown that the richest in volatile compounds were chocolates made of cocoa beans originating from Colombia, Ghana and Ecuador, while the most pleasant aroma (eg nutty, floral) was characterized by chocolates produced from beans from Peru. The lowest concentration of total polyphenols and the worst antioxidant properties was found in milk chocolates, the best in chocolates obtained from cocoa beans grown in Ecuador.*

Keywords: Origin chocolates, aroma, antioxidant properties

WPŁYW SPIRULINY I PREPARATÓW STABILIZUJACO-EMULGUJACYCH NA JAKOŚĆ LODÓW

Joanna MARKOWSKA*, Elżbieta POLAK, Marta MADAJ,
Karolina SADŁOWSKA

*Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Technologii i Techniki Chłodnictwa w Łodzi*

* joanna.markowska@ibprs.pl

Streszczenie: *W technologii produkcji lodów przemysłowych stosowane są substancje stabilizująco-emulgujące warunkujące właściwy przebieg procesu technologicznego i uzyskanie pożądanej jakości produktu. Celem badań była ocena możliwości zastąpienia spiruliną *A. platensis*, handlowych preparatów stabilizująco-emulgujących (S/E) w lodach. Jest to kierunek zgodny z tendencją „czystej etykiety” na opakowaniach produktu i wykorzystaniem zdrowotnych właściwości spiruliny. Skład preparatu S/E był czynnikiem decydującym o parametrach fizyko-chemicznych i jakości lodów. Lody z handlowymi preparatami S/E, jak i ze spiruliną w składzie, charakteryzowały się porównywalną zawartością białka (4,32-4,65%) i suchej masy (ok. 38%). Temperatura krioskopowa mieszanek oznaczona podczas zamrażania była porównywalna dla wszystkich wariantów. Skład i rodzaj czynnika stabilizująco-emulgującego wpływał natomiast znacząco na lepkość mieszanek lodowych, a następnie także na osiągnięte napowietrzenie, odporność na topienie oraz twardość lodów. Zastosowanie *A. platensis* w składzie pozwoliło na uzyskanie lodów o kremistej, gładkiej konsystencji i pastelowej zielonkawej barwie, akceptowalnej konsumencji. Stwierdzono, że spiruliną można częściowo zastąpić handlowe preparaty S/E.*

Słowa kluczowe: lody, spirulina, preparaty stabilizująco-emulgujące

1. Wprowadzenie

Lody zajmują szczególne miejsce w grupie wyrobów mrożonych, będąc zamrożoną mieszaniną takich składników jak: mleko, tłuszcz, substancje słodzące, stabilizatory, emulgatory i aromaty [21].

Efektom działania substancji stabilizująco-emulgujących jest prawidłowa struktura i konsystencja oraz cechy organoleptyczne lodów [5, 6, 7, 14, 17]. Istotną rolę odgrywają właściwy rodzaj i ilość emulgatora czy stabilizatora, dedykowane do rodzaju lodów [19, 28, 31]. Rolę emulgatorów pełnią głównie acyloglicerole kwasów tłuszczowych, natomiast mączka chleba świętojańskiego (LBG), guma guar, działają jako stabilizatory i środki zagęszczające. W tej grupie

preparatów znajdują się także alginiany otrzymane z alg morskich [13], a także chlorella [12, 26] czy należąca do cyjanobakterii spirulina. *Arthrospira platensis* zawiera dużą ilość białka (65÷70 % s.m.), witamin (C, E, niacyny, z grupy B) oraz minerałów: P, Fe, Ca, K, Na, Md, a także kwasy: foliowy, pantotenowy i inozytol oraz barwniki. Jest źródłem karotenoidów: β -karotenu, zeaksantyny, beta-kryptoksanty i chlorofilu a [4, 9, 15, 18, 27]. Może być stosowana w celu poprawy wartości odżywczych lodów, a także wpływać na ich cechy funkcjonalne i jakość. Od niedawna zyskała popularność ze względu na właściwości wspomagające odchudzanie [30].

Przemysł spożywczy stale ewoluje dostosowując swoje technologie i produkty do potrzeb i wymagań konsumentów. Wraz z popularnością ruchu „czystej etykiety” w UE, możliwość etykietowania produktów jako bez dodatków syntetycznych jest kluczową strategią marketingową [3].

Celem pracy było zbadanie wpływu spiruliny w porównaniu do rodzaju handlowych preparatów stabilizująco-emulgujących na parametry technologiczne, właściwości fizykochemiczne i charakterystykę organoleptyczną lodów.

2. Metodyka

Przeprowadzono badania lodów o składzie: odtłuszczone mleko w proszku (14%), tłuszcz mleczny (8%), sacharoza, syrop skrobiowy oraz substancje stabilizująco-emulgujące (preparaty S/E) (0,5%), oznaczone jako: A, B, C i D, dedykowane do produkcji przemysłowej lodów, o składzie wskazanym przez producenta:

- **A:** mono- i diacyloglicerole kwasów tłuszczowych (E471), mączka chleba świętojańskiego (E410), guma guar (E412) i karagen (E407);
- **B:** E471, E410, E412 i antyoksydanty: E304 (palmitynian askorbylu) i E307 (alfa-tokoferol);
- **C:** E471, E412 i karageniany;
- **D:** E471, E412, E410.

Handlowy preparat S/E zastąpiono w 100% (wariant kontrolny-„,0,0/0,5S”) i w 50% (wariant-„,....0,25/0,25S”) preparatem spiruliny FEBICO®, pozyskanym z obrotu handlowego.

Lody przygotowano w warunkach laboratoryjnych.

W mieszankach lodowych oznaczono:

- zawartość białka [23],
- lepkość, z wykorzystaniem rurki PANISOL, wg metodyki własnej Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego (IBPRS),
- punkt zamarzania (temperaturę krioskopową, T_k) – wg metodyki własnej IBPRS,
- barwę ($L^*a^*b^*$) w systemie kolorymetrycznym CIELab (spektrofotometr CM-5 Konica Minolta).

Określono nasycenie barwy C* [8]:

$$C^* = [a^2 + b^2]^{0,5}$$

a*,b* – współrzędna chromatyczna barwy, ton barwy.

W lodach oznaczono:

- zawartość suchej masy – metodą suszenia w 102°C do stałej masy,
- napowietrzenie [21],
- odporność lodów na topnienie – metodą „pierwszej kropli” oraz pomiaru ilości wycieku po 30 min, w temp. 20°C ± 2°C. Obserwowano zjawisko zachodzenia lub nie synerezy.

Testem TPA (TextureAnalyser CT3 TA firmy Brookfield) określono twardość lodów, wg metodyki własnej IBPRS.

Analiza organoleptyczna

Przeprowadzono ocenę organoleptyczną lodów określając cechy, takie jak: wygląd ogólny, barwa, struktura/konsystencja, smak i zapach. Oceny dokonał 7 osobowy doświadczony zespół pracowników IBPRS.

Analiza statystyczna

Oznaczenia wykonano w 3 powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania Microsoft Excel 2013 i jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA i testu Tukeya ($p < 0,05$) z wykorzystaniem oprogramowania Statistica®10.0PL (StatSoft Poland Sp. z o.o. Kraków). Wartości w kolumnach tabel oznaczone literami różnią się istotnie przy poziomie $\alpha = 0,05$.

3. Wyniki i dyskusja

Operacje przygotowania mieszanek lodowych i lodów z uwagi na wprowadzenie do receptury spiruliny, nie wymagały zmian w porównaniu z tradycyjnie prowadzonym procesem technologicznym. *A.platensis* to bogate źródło białka. Jego udział w preparacie wynosił ok. 70 g/100 g preparatu, podczas gdy w mleku był dwukrotnie niższy. Zawartość białka w mieszance kontrolnej wynosiła 4,65% i była nieznacznie wyższa od uzyskanej przy zastosowaniu handlowych preparatów (tabela 1). Mieszanki z udziałem preparatów S/E wykazywały w temp. +4°C (temp. po dojrzewaniu), przy porównywalnej suchej masie, wyższą lepkość niż próbka kontrolna.

Zbyt duża lub zbyt mała lepkość może powodować niskie napowietrzenie lodów. Zazwyczaj stosuje się dodatek stabilizatorów 0,3÷0,5% [24]. Absorbują one wodę i zwiększają lepkość układu [2]. Najwyższą lepkością charakteryzowały się mieszanki przygotowane z zastosowaniem preparatu S/E A. Lepkość mieszanek tylko z handlowymi preparatami S/E była zdecydowanie wyższa niż

przy częściowym zastąpieniu ich spiruliną lub całkowitym wyeliminowaniu ze składu. Malik i in. [20] wskazali, że lepkość mieszanki lodowej, w której 50% użytego stabilizatora (0,3% w recepturze) zastąpiono spiruliną, była porównywalna do lepkości próbki kontrolnej. Zdolność zatrzymywania wody przez sinicę wynosi 1,45 g wody/g białka i może powodować zmniejszenie lepkości mieszanek. Należy wywnioskować, że *A.platensis* może być stosowana do częściowego, a nie całkowitego zastąpienia stabilizatora, co potwierdzono w badaniach.

Tabela 1. Wyniki badań fizykochemicznych mieszanek lodowych

wariant recepturowy	zawartość białka (%)	zawartość suchej masy (%)	lepkość (sek.)	T _{kr} (°C)
	X±SD			
0,0/0,5S	4,65±0,04 ^a	37,34±0,07 ^a	14,63±0,29 ^a	-3,2±0,2 ^a
A0,5/0,0S	4,53±0,06 ^a	38,24±0,63 ^a	91,23±0,65 ^b	-3,0±0,3 ^a
A0,25/0,25S	4,59±0,03 ^a	37,82±0,17 ^a	13,39±0,20 ^c	-3,2±0,3 ^a
B0,5/0,0S	4,56±0,06 ^a	38,09±0,53 ^a	34,83±0,12 ^d	-3,5±0,1 ^a
B0,25/0,25S	4,60±0,03 ^a	37,68±0,27 ^a	13,65±0,02 ^c	-3,5±0,3 ^a
C0,5/0,0S	4,45±0,04 ^a	37,70±0,30 ^a	72,14±1,31 ^e	-3,4±0,1 ^a
C0,25/0,25S	4,58±0,02 ^a	37,58±0,11 ^a	36,07±0,15 ^d	-3,5±0,2 ^a
D0,5/0,0S	4,32±0,10 ^a	38,41±0,13 ^a	33,67±0,56 ^f	-3,4±0,1 ^a
D0,25/0,25S	4,48±0,05 ^a	36,77±0,60 ^a	20,09 ± 0,06 ^g	-3,5±0,2 ^a

Punkt zamarzania lodów zależy od ilości substancji rozpuszczonych w mieszance i zmienia się wraz z jej składem [21]. Temperatura krioskopowa (T_k) mieszanki kontrolnej (wariant 0,0/0,5S) wynosiła -3,2°C. Porównywalne wartości T_k zanotowano dla pozostałych mieszanek. Malik i in. [20] zanotowali wzrost T_k od -3,4 do -3,8°C w mieszankach wraz ze wzrostem ilości spiruliny w ich składzie.

Określenie barwy lodów to istotny aspekt oceny instrumentalnej, ale także konsumenckiej. Analizę parametrów CIELab przedstawiono w tabeli 2. Dodatek spiruliny spowodował zmiany wartości parametrów L*a*b*. Lody ze spiruliną odznaczały się pastelową zielonkawo-niebieską barwą. Istotne różnice w barwie mieszanek z 50% udziałem spiruliny były identyfikowane w zależności od rodzaju zastosowanego preparatu S/E. Mieszanki te charakteryzowały się zbliżonym stopniem nasycenia barwy C*, który wskazuje intensywność koloru postrzeżaną przez ludzi [22].

Tabela 2. Parametry barwy mieszanek lodowych

wariant recepturowy	L*	a*	b*	C*
	X±SD			
0,0/0,5S	55,23±0,29 ^a	-7,99±0,03 ^a	15,90±0,11 ^a	17,79±0,11 ^a
A0,5/0,0S	88,37±0,14 ^b	-1,43±0,05 ^b	16,69±0,11 ^b	16,74±0,11 ^b
A0,25/0,25S	44,94±0,28 ^c	-10,04±0,05 ^c	14,36±0,07 ^c	17,52±0,04 ^a
B0,5/0,0S	88,28±0,09 ^b	-1,73±0,03 ^b	16,71±0,18 ^b	16,82±0,18 ^b
B0,25/0,25S	45,10±0,26 ^c	-9,60±0,03 ^c	13,24±0,18 ^d	16,35±0,13 ^d
C0,5/0,0S	88,30±0,07 ^b	-0,97±0,02 ^d	15,32±0,06 ^e	15,35±0,06 ^c
C0,25/0,25S	64,92±0,21 ^d	-8,05±0,05 ^a	12,78±0,03 ^f	15,10±0,04 ^f
D0,5/0,0S	87,63±0,03 ^b	-0,72±0,03 ^d	15,16±0,03 ^e	15,18±0,03 ^f
D0,25/0,25S	63,53±0,15 ^e	-9,96±0,05 ^c	11,99±0,05 ^g	15,59±0,01 ^g

Podczas etapu zamrażania i napowietrzania mieszanki zachodzą zmiany związane z powstawaniem i stabilizacją piany, częściowej koalescencji emulsji tłuszczowej

i w efekcie formowaniem się masy lodowej [11]. Napowietrzenie (określane jako puszystość) zapewnia lekką i delikatną teksturę oraz wpływa na fizyczne właściwości lodów.

Stopień napowietrzenia ma znaczenie ze względu na poziom przenikalności ciepła lub zimna do wnętrza masy lodowej. Mała ilość powietrza generuje powstawanie kryształków lodu o większych rozmiarach i wzrost twardości masy lodowej. Zwiększenie napowietrzenia daje lody delikatniejsze i bardziej odporne na topnienie [1, 10, 25, 29]. Uzyskany stopień napowietrzenia masy lodowej próbek był zmienny w zależności od zastosowanego preparatu S/E. Połowiczne zastąpienie jego ilości spiruliną skutkowało uzyskaniem lodów o obniżonej puszystości (tabela 3).

Całkowite zastąpienie preparatu S/E spiruliną pozwoliło na osiągnięcie ok. 42% stopnia napowietrzenia masy. Obecność hydrokoloidowych składników w preparacie A spowodowało obniżenie napowietrzenia lodów, przy uzyskanej wysokiej lepkości mieszanki.

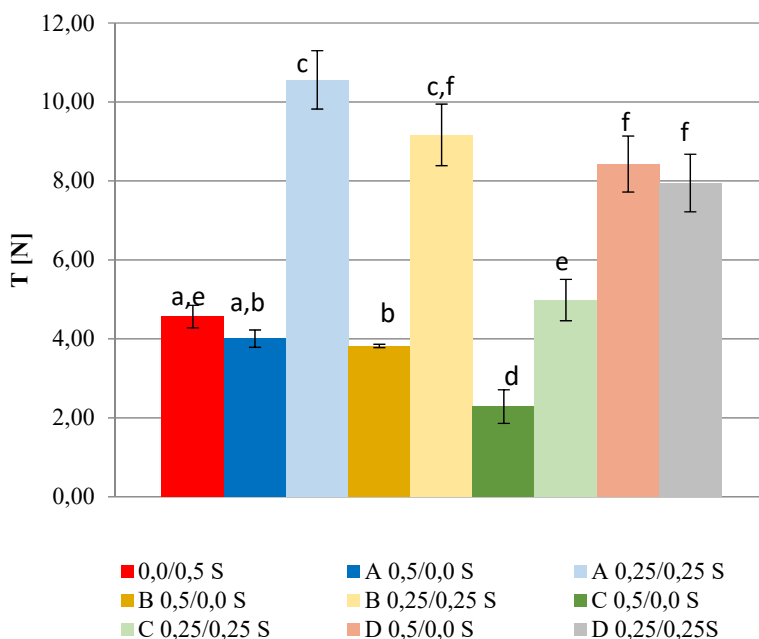
Parametrem obrazującym jakość lodów jest ich topliwość w czasie. Dane przedstawione w tabeli 3, wskazują na wolniejszy przebieg topnienia lodów z handlowymi preparatami S/E niż próbek, w których preparaty te zastąpiono spiruliną.

W ocenie wizualnej nie stwierdzono wystąpienia zjawiska synerезy w żadnym z wariantów lodów.

Tabela 3. Wyniki badań fizykochemicznych lodów

wariant recepturowy	napowietrzenie (%)	czas pojawienia się pierwszej kropli (min/sek.)	ilość odcieku(%) po 30 min.
0,0/0,5S	41,57±0,52 ^a	12/27	75,96±1,2 ^a
A0,5/0,0S	39,34±1,07 ^a	19/20	49,14±0,5 ^b
A0,25/0,25S	25,87±1,52 ^b	12/55	57,62±0,4 ^c
B0,5/0,0S	48,16±1,44 ^c	16/20	65,40±0,2 ^d
B0,25/0,25S	26,99±1,14 ^b	12/10	76,03±0,5 ^a
C0,5/0,0S	58,47±1,53 ^d	16/33	65,02±0,2 ^d
C0,25/0,25S	30,17±0,44 ^e	13/21	75,47±0,6 ^a
D0,5/0,0S	47,61±0,25 ^c	18/45	64,71±0,5 ^d
D0,25/0,25S	29,69±0,31 ^e	14/20	73,43±1,0 ^a

Natomiast rodzaj użytego preparatu stabilizująco-emulgującego różnicował stopień twardości lodów (rysunek 1).



Rys. 1. Twardość lodów

Skład recepturowy lodów wpływa także na akceptację organoleptyczną konsumenta. Lody przygotowane z preparatami S/E cechowały się jasną barwą oraz dobrym, typowym smakiem i zapachem. Struktura i konsystencja ich była gładka, kremista, bez kryształków lodu. Podobnymi cechami charakteryzowały się lody ze spiruliną. Oceniający zakwalifikowali je jako wyroby wysokiej jakości.

Zielonkawa barwa lodów, mimo różnej intensywności, zdefiniowana została jako akceptowalna, atrakcyjna konsumencko. Specyficzną barwę nadaje obecna w spirulinie fikocyjanina, należąca do fikobilyn, która odpowiada za zdolności *A.platensis* do neutralizacji wolnych rodników ochrony skóry przed szkodliwym działaniem promieniowania UV i opóźniania procesów starzenia [16].

Wyniki badań mogą zachęcić do dalszych prac nad zastosowaniem spiruliny jako czynnika kształtującego jakość lodów, poprzez testowanie ich stosowania samodzielnie lub w połączeniu z innymi komponentami.

3. Podsumowanie

W niniejszej pracy wykazano, że:

- zastosowanie spiruliny nie wymaga zmian parametrów w procesie technologicznym produkcji lodów,
- obecność *A. platensis* w składzie pozwoliła na uzyskanie lodów o kremistej, gładkiej konsystencji i pastelowej zielonkawej barwie, akceptowalnej konsumencko,
- do praktycznego zastosowania zaleca się częściowe zastąpienie spiruliną handlowych preparatów S/E,
- spirulina jako zamiennik handlowego preparatu S/E wpływała na:
 - obniżenie lepkości mieszanek lodowych,
 - zmniejszenie napowietrzenia lodów i odporności ich na topnienie,
 - wzrost twardości lodów.

Literatura

- [1] Abd El-Rahman A.M., et al.: Physical characteristics of frozen desserts made with cream, anhydrous milkfat, of milkfat fractions, *Journal of Dairy Science*, 1997, 80, 1926-1935.
- [2] Adapa S., et al.: Mechanisms of ice crystallization and recrystallization in ice cream: a review. *Food Reviews International*, 2000, 16(3), 259-271.
- [3] Asioli D., et al.: Making sense of the “cleanlabel” trends: a review of consumer food choice behaviour and discussion of industry implications. *Food Research International*, 2017, 99, 58-71.
- [4] Belay A.: Spirulina (Arthrospira) Production and Quality Assurance. Spirulina in Human Nutrition and Health, CRC Press, 2008, 1-25.
- [5] Botega D.C., et al.: Development of formulations and processes to incorporate wax oleogels in ice cream, *Journal of Food Science*, 2013, 78(12), 1845-1851.
- [6] Botega D.C., et al.: The potential application of rice bran wax oleogel to replace solid fat and enhance unsaturated fat content in ice cream, *Journal of Food Science*, 2013, 78(9), 1334-1339.
- [7] Chang Y., Hartel R.W.: Stability of air cells in ice cream during hardening and storage, *Journal of Food Engineering*, 2002, 55, 59-70.
- [8] Dobrzańska A., Cais-Sokolińska D.: Ocena przydatności systemów pomiaru barwy do badań preparatów białek mleka i serwatki, *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna*, 2014, 19, 3, 267-272.

- [9] Duliński R., Byczyński Ł., Karbowski A.: Określenie zawartości wybranych kwasów fenolowych i witamin z grupy B w pieczywie żytnim wzbogaconym w algi oraz oszacowanie biodostępności tych związków *in vitro* żywność, *Nauka. Technologia. Jakość*, 2018, 25, 3 (116), 58-70.
- [10] Flores A.A., Goff H.D.: Ice Crystal size distributions in dynamically frozen model solutions and ice cream as affected by stabilizers, *Journal of Dairy Science*, 1999, 82, 1399-1407.
- [11] Goff, H.D., Hartel R.: Ice cream and frozen desserts, [w:] Y.H. Hui, I.G. Legarretta, M.H. Lim, K.D. Murrell & W.K. Nip. *Handbook of frozen foods* 2004, 429-500.
- [12] Gouveia L., et al.: *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions, *European Food Research and Technology*, 2006, 222, 362-7.
- [13] Gouveia L., et al.: Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients, *Food Science and Technology Bulletin Functional Foods*, 2010, 7 (2), 21-37.
- [14] Granger C., et al.: Influence of formulation on the structural networks in ice cream, *International Dairy Journal*, 2005, 15(3), 255-262.
- [15] Habib M., et al.: Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Retrieved, 2008, 20, 2011.
- [16] Hwang J.H., et al.: Spirulina prevents memory dysfunction, reduces oxidative stress damage and augments antioxidant activity in senescence-accelerated mice, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2011, 57 (2), 186-191.
- [17] Jasińska M., et al.: Koncentraty białek serwatkowych i preparaty serwatkowo-tłuszczowe jako zamienniki mleka w proszku w lodach nisko zamrożonych, *Acta Agrophysica*, 2012, 19(1), 37-50.
- [18] Jękot B., et al.: Spirulina (Arthrospira) – badania nad działaniem leczniczym i jej właściwości prozdrowotne, *Farmacja Polska*, 2014, 607-614.
- [19] Kaleda A., et al.: Ice cream structure modification by ice-binding proteins, *Food Chemistry*, 2018, 246, 164-171.
- [20] Malik P., Kempanna C., Paul A.: Quality characteristics of ice cream enriched with spirulina powder, *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 2013, 2,1, 44-50.
- [21] Marshall R.T., Arbuckle W.S.: Ice Cream. 5th Edition, Chapman & Hill, New York, 1996.
- [22] Pathare P.B., Opara U.L., Al-Said F.A.: Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods, A Review. *Food Bioprocess Technology*, 2013, 6(1), 36-60.
- [23] PN-A-04018:1975/Az3:2002 Produkty rolniczo-żywnościowe Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko
- [24] Polak E.: Produkcja lodów. *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*., 2003, 8 (51), 79-82.
- [25] Prindiville E.A., Marshall R.T., Heyman H.: Effect of milk fat on the sensory properties of chocolate ice cream, *Journal of Dairy Science*, 1999, 82, 1425-1432.
- [26] Raymundo A., et al.: Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilised by pea protein, *Food Research International*, 2005, 38(8), 961-65.
- [27] Reddy R.S., et al.: Aeration effect on *SPIRULINA PLATENSIS* growth and g-linolenic acid production, *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43, 12-20.
- [28] Rinaldi M., et al.: Innovation in the Italian ice cream production: effect of different phospholipid emulsifiers, *Dairy Science and Technology*, 2014, 94(1), 33-49.
- [29] Sofjan R.P., Hartel R.W.: Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream, *International Dairy Journal*, 2004, 14(3), 255-262.
- [30] Zdrojewicz Z., Idzior A., Kocjan O.: Spirulina i błonnik witalny a leczenie otyłości, *Medycyna Rodzinna*, 2015, 1, 18-22.
- [31] Zhao Q., et al.: Frozen, chilled and spray dried emulsions for whipped cream: Influence of emulsion preservation approaches on product functionality, *Food Science and Technology-LWT*, 2015, 62(1), 287-293.
- [32] Ziarno M., Zaręba D.: Dodatki do lodów i deserów mlecznych, *Forum Mleczarskie Biznes*, 2015,1, www.forummleczarskie.pl/RAPORTY/452/technologie-dodatki-do-lodow-i-deserow-mlecznych/

THE EFFECT OF SPIRULINA STABILIZERS AND EMULSIFIERS ON THE QUALITY OF ICE CREAM

Abstract: *In the technology of industrial ice cream production there are used stabilizers and emulsifiers which condition proper execution of the technological process and obtaining the desired quality of the product. The aim of the study was to evaluate the possibility of replacing *Arthrospira platensis* commercial stabilisers and emulsifiers preparations (S/E) in ice cream. This is a direction consistent with the trend of "clean label" on the packaging of the product and the use of algae health benefits.*

*The composition of the stabilizers and emulsifiers preparation was the factor determining the physicochemical parameters and quality of ice cream. Ice cream with commercial S/E preparations and spirulina in its composition was characterized by a comparable content of protein (4,32-4,65%) and dry matter (about 38%). The cryoscopic temperature of the mixtures identified during freezing was comparable for all variants. The composition and type of stabilizers and emulsifiers factor significantly affected the viscosity of ice cream blends and then also the aeration, melting resistance and hardness of ice cream. The use of *A.platensis* in the composition allowed to obtain ice cream with creamy, smooth consistency and pastel greenish colour, acceptable to consumers.*

Keywords: spirulina, ice cream, stabilizers, emulsifiers

WPŁYW TEMPERATURY DOJRZEWANIA NA MIKROFLORĘ SERÓW PODPUSZCZKOWYCH PRZYGOTOWYWANYCH Z NIEPASTERYZOWANEGO MLEKA KROWIEGO

Anna SZOSLAND-FALTYN^{1*}, Beata BARTODZIEJSKA¹, Aleksandra SIKORSKA², Agnieszka MATUSIAK², Magdalena CHMIELA²

¹*Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego, Zakład Jakości Żywności, Pracownia Mikrobiologii w Łodzi,*

²*Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej w Łodzi Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki*

*anna.szosland@ibprs.pl

Streszczenie: *Celem pracy było zbadanie wpływu dwóch temperatur dojrzewania serów podpuszczkowych, przygotowywanych z niepasteryzowanego mleka krowiego, na skład mikroflory. Stan mikrobiologiczny określano na podstawie wyników badań liczebności tlenowych bakterii mezofilnych, bakterii fermentacji mlekowej, Enterobacteriaceae, gronkowców koagulazododatnich, drożdży i pleśni. Badano również obecność bakterii Salmonella spp., Listeria monocytogenes, Campylobacter spp. Liczebność poszczególnych grup drobnoustrojów oznaczano według norm. Surowiec użyty do produkcji podpuszczkowych serów dojrzewających charakteryzował się złą jakością pod względem analizowanych wyróżników mikrobiologicznych. Zalecany w literaturze czas dojrzewania serów podpuszczkowych w temperaturze powyżej 4°C przez 63 dni nie spowodował redukcji liczby żadnej z badanych grup drobnoustrojów, tym samym nie zapewnił bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktu. Badane dwie temperatury dojrzewania nie wpłynęły na analizowaną mikroflorę serów, co potwierdzono nieparametrycznym testem U Mann-Whitney. Dlatego też, mleko surowe, do produkcji podpuszczkowych serów dojrzewających, charakteryzujące się złą jakością mikrobiologiczną, bezwzględnie powinno być spasteryzowane w celu zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów.*

Słowa kluczowe: ser, dojrzewanie, niepasteryzowane mleko, bezpieczeństwo mikrobiologiczne

1. Wprowadzenie

Wyrób serów, znany od stuleci wymaga wiedzy oraz zachowania właściwych warunków higieny. Sery, dostępne w handlu detalicznym, otrzymuje się z mleka pasteryzowanego, do którego dodaje się komercyjne kultury bakterii fermentacji mlekowej (LAB). Ostatnio, wśród konsumentów, poszukujących autentycznego, naturalnego smaku, pojawił się jednak nowy trend kupowania surowego mleka i produktów z niego wytwarzanych. Polacy doceniają świeże, niepasteryzowane

mleko ze względu na wyższą zawartość tłuszczu, w którym rozpuszczone są witaminy A i D oraz kwasy tłuszczowe stymulujące układ odpornościowy. Wykorzystanie mleka surowego do przygotowania sera i innych mlecznych produktów niesie jednak ryzyko zakażenia patogenami [1]. W świetle regulacji prawnych, pełną odpowiedzialność za bezpieczeństwo zdrowotne żywności ponosi jej wytwórca lub wprowadzający do obrotu. Według kryteriów zawartych w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 z późniejszymi zmianami, finalny produkt nie powinien zawierać mikroorganizmów, ich toksyn oraz metabolitów w ilościach stanowiących zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. W rozporządzeniu parametry jakości mikrobiologicznej stanowią o bezpieczeństwie żywności i jej higienie. Do parametrów bezpieczeństwa należą: obecność lub liczba drobnoustrojów patogennych dla człowieka tj.: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter* spp. i *Escherichia coli* oraz obecność: enterotoksyny gronkowcowej i histaminy. Wskaźniki higieniczne obejmują ogólną liczbę drobnoustrojów tlenowych, liczbę *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* i koagulazo-dodatnich gronkowców [2].

Do najbardziej groźnych dla zdrowia patogenów, związanych ze środowiskiem mleka należą: *Brucella* spp., *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* 0157: H7, *Listeria monocytogenes* oraz *Campylobacter* spp. [3, 4, 5, 6]. *Campylobacter* spp., głównie kojarzony z drobiem, jest zdolny kolonizować również inne zwierzęta domowe: bydło, świnie, psy i koty [7, 8, 9].

Dojrzewanie serów jest jednym z kluczowych etapów, dzięki któremu produkt nabiera charakterystycznych cech smakowo-zapachowych. W czasie leżakowania część komórek LAB ulega lizie, uwalniając enzymy wewnątrzkomórkowe, wytwarzane są kwasy organiczne wpływające na smak oraz CO₂ powodujący charakterystyczne oczkowanie. Wzajemne interakcje międzyszczepowe LAB w serach dojrzewających mają charakter komensalizmu [10]. Aby zapewnić bezpieczeństwo mikrobiologiczne sery produkowane z niepasteryzowanego mleka muszą dojrzewać przynajmniej 60 dni w temperaturze nie niższej niż 4°C [11]. Niezbędne jest również monitorowanie obecności drobnoustrojów w tym patogenów. Dlatego też, celowe jest prowadzenie badań zmierzających nie tylko do zapewnienia powtarzalności cech jakościowych serów podpuszczkowych z niepasteryzowanego mleka, ale zwiększenia ich bezpieczeństwa mikrobiologicznego [12].

2. Metodyka

Celem badań była ocena wpływu temperatury dojrzewania serów podpuszczkowych, z niepasteryzowanego mleka krowiego, na ich jakość mikrobiologiczną. Badania prowadzono w dwóch temperaturach chłodniczych: 5 i 12°C, przez 63 dni, ze względu na zalecany czas dojrzewania nie krótszy niż 60 dni.

Material badawczy

Materiałem badawczym były sery podpuszczkowe, wytworzone z mleka krowiego w warunkach laboratoryjnych. Surowcem do ich przygotowania było świeże mleko, pochodzące z gospodarstwa rolnego. Mleko, analizowano mikrobiologicznie, a następnie przygotowywano z niego sery.

Przygotowanie sera podpuszczkowego

Część świeżego mleka naturalnie ukwaszono (48 godzin w temperaturze pokojowej). Zsiadłe mleko zmieszano z niepasteryzowanym i podgrzano do temperatury 38°C w proporcji 0,1 l mleka ukwaszonego do 4 l mleka niepasteryzowanego. Dodano, wg instrukcji producenta podpuszczkę (Browin Sp. z o.o.). Powstały skrzep pokrojono i przełożono do sitka w celu ocieknięcia. Ser porcjowano i włożono do solanki o stężeniu soli 10g/l. Po 12 godzinach sery wyjęto i pozostawiono do obeschnięcia. W ten sposób otrzymano ser świeży oraz pozostałe sery, które przetrzymywano w temperaturze 5 i 12°C przez 63 dni. Sery leżakowały na tacach ze stali nierdzewnej, w pomieszczeniach z kontrolą wilgotności (80%), wyposażonych w lampy UV. W czasie leżakowania sery były obracane. Raz w tygodniu wykonywano ich badania mikrobiologiczne.

Badania mikrobiologiczne

Próbki mleka oraz serów przygotowywano zgodnie normą PN-EN ISO 6887-5:2010, a następnie analizowano pod względem:

- ✓ obecności bakterii z rodzaju *Campylobacter* spp. PN-EN ISO 10272-1:2017-08,
- ✓ obecności *Salmonella* spp. PN-EN ISO 6579-1:2017-04,
- ✓ obecności *Listeria monocytogenes* PN-EN ISO 11290-1:2017-07,
- ✓ ogólnej liczby drobnoustrojów w temperaturze 30°C PN-EN ISO 4833-1:2013-12+ Ap1:2016-11,
- ✓ liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej PN-ISO 15214:2002,
- ✓ liczby *Enterobacteriaceae* PN-ISO 21528-2:2017-08,
- ✓ liczby *Escherichia coli* PN-EN ISO 16649-2:2004,
- ✓ liczby gronkowców koagulazododatnich PN-EN ISO 6888-2:2001 + A1:2004,
- ✓ liczby drożdży i pleśni PN-ISO 7954:1999.

Analiza statystyczna danych

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.3 PL (StatSoft, Kraków, Polska Zebrane). Obliczano średnie (z dwóch powtórzeń) i odchylenia standardowe. Wpływ temperatury dojrzewania na mikroflorę serów podpuszczkowych oceniono nieparametrycznym testem U Mann-Whitney, przy $p \leq 0,05$.

3. Wyniki i dyskusja

Dobra jakość mleka surowego warunkuje jego przydatność technologiczną oraz odpowiednią jakość i trwałość przetworów [13]. W przeprowadzonych

badaniach, ogólna liczba drobnoustrojów w mleku wynosiła 6,65 log jtk/ml (Tabela 1). Analizowane mleko nie spełniało, więc wymagań rozporządzenia Komisji (WE) nr 1662/2006, które dopuszcza stopień skażenia mikrobiologicznego drobnoustrojami nie większy niż 5 log jtk/ml [16]. Mleko pozyskiwane ze zdrowego gruczołu mlekowego zawsze zawiera niewielką ilość drobnoustrojów wynoszącą do kilku tysięcy komórek w 1 ml [14, 15]. Badając w pracy próbki mleka w żadnej nie wykryto natomiast obecności pałeczek patogennych *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* oraz *Campylobacter* spp (tabela 2).

Tabela 1. Jakość mikrobiologiczna niepasteryzowanego mleka

Liczba mikroorganizmów ± odchylenie standardowe [log jtk/ml ± SD]						
OLD	LAB	E	EC	G	P	D
6,65 ± 0,06	5,70 ± 0,04	5,29 ± 0,10	3,13 ± 0,02	3,84 ± 0,09	3,21 ± 0,03	4,07 ± 0,07

Objaśnienia: OLD – ogólna liczba drobnoustrojów, LAB – liczba bakterii fermentacji mlekowej, E – liczba *Enterobacteriaceae*, EC – liczba *Escherichia coli*, G – liczba gronkowcówkoagulazo- dodatnich, P – liczba pleśni, D – liczba drożdży

Tabela 2. Obecność pałeczek patogennych w mleku świeżym oraz serach podpuszczkowych

Obecność patogenu	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
mleko surowe	nie wykryto	nie wykryto	nie wykryto
ser świeży	nie wykryto	nie wykryto	nie wykryto
ser dojrzewający 63 dni w 5°C	nie wykryto	nie wykryto	nie wykryto
ser dojrzewający 63 dni w 12°C	nie wykryto	nie wykryto	nie wykryto

Kolejnym zbadanym parametrem mikrobiologicznym, mówiącym o czystości mleka, była *E. coli* oznaczana na dość wysokim poziomie 3,13 log jtk/ml. Świadczy to o niskiej higienie produkcji. O złej jakości badanego mleka dowodziły również inne parametry mikrobiologiczne. Wysoka liczba gronkowców koagulazododatnich (3,84 log jtk/ml) oraz *Enterobacteriaceae* (5,29 log jtk/ml). Wspomniane bakterie dostają się do mleka w czasie jego pozyskiwania, skarmiania skażoną paszą lub niedokładnego schłodzenia surowca. W czasie niehigienicznego udoju, dochodzi do zanieczyszczenia drobnoustrojami z zakażonych wymion, ze skóry zwierzęcia, dojarza, zanieczyszczonej wody, używanej do mycia urządzeń udojowych [17, 18, 19]. W mleku znajdowały się również drożdże i pleśnie w liczbie odpowiednio 4,07 oraz 3,21 log jtk/ml. Podsumowując badane mleko niepasteryzowane charakteryzowało się złą jakością mikrobiologiczną i nie powinno być dopuszczone do sprzedaży ani do

przetwarzania. Pomimo złej jakości surowca autorzy zdecydowali się przygotować sery ze względu na wysoką liczbę LAB (5,70 log jtk/ml) oraz nieobecność bakterii chorobotwórczych. Z literatury wynika, że LAB są najważniejszymi mikroorganizmami, stanowiącymi normalną mikroflorę, biorącymi udział w procesie fermentacji serów podpuszczkowych z niepasteryzowanego mleka. Odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu niepowtarzalnych właściwości sensorycznych i organoleptycznych serów, decydując o ich trwałości a ich metabolity (kwasy organiczne, nadtlenuk wodoru, bakteriocyny) działają inhibującą na mezofilną mikroflorę [19, 20]. Ocena mikrobiologiczna sera świeżego i serów podpuszczkowych dojrzewających obejmowała te same wyróżniki, co w przypadku mleka. Badane próbki serów: świeżego i dojrzewającego 63 dni w dwóch temperaturach spełniały kryterium bezpieczeństwa żywności. Bakterie *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* oraz *Campylobacter* spp. były niewykryte (tabela 2). Ogólna liczba drobnoustrojów (OLD) w serze świeżym wynosiła 8,00 log jtk/g (tabela 3). Po siedmiu dniach dojrzewania serów OLD wahała się od 8,46 log jtk/g w temperaturze 5°C do 8,61 log jtk/g w temperaturze 12°C (Tabela 3). Po 63 dniach leżakowania serów zaobserwowano nieznaczny wzrost OLD wynoszący 8,85 log jtk/g i 8,81 log jtk/g odpowiednio dla temperatury 5 i 12°C. Liczba LAB przez cały okres eksperymentu, niezależnie od temperatury dojrzewania serów, utrzymywała się na wysokim poziomie wynoszącym powyżej 8 log jtk/g.

Tabela 3. Jakość mikrobiologiczna świeżego sera

Liczba mikroorganizmów ± odchylenie standardowe [log jtk/ml ± SD]						
OLD	LAB	E	EC	G	P	D
8,00 ± 0,01	8,22 ± 0,07	6,76 ± 0,03	5,65 ± 0,12	4,87 ± 0,03	5,46 ± 0,28	5,35 ± 0,12

Objaśnienia: OLD – ogólna liczba drobnoustrojów, LAB – liczba bakterii fermentacji mlekowej, E – liczba *Enterobacteriaceae*, EC – liczba *Escherichia coli*, G – liczba gronkowców koagulazo-dodatnich, P – liczba pleśni, D – liczba drożdży

W próbkach sera świeżego (tabela 3) oraz dojrzewających przez 63 dni w dwóch temperaturach (tabela 4, 5) poziom gronkowców koagulazo-dodatnich utrzymywał się poniżej 5 log jtk/g. W związku z tym, nie istniało ryzyko intoksykacji enterotoksyną gronkowcową, a tym samym spełnione było kryterium higieny procesu [2]. Liczba *E. coli* w serze świeżym i podpuszczkowych dojrzewających wahała się od 5,04 log jtk/g (ser leżakujący 44 dni w temperaturze 12°C) do 7,05 log jtk/g (ser leżakujący 35 dni w temperaturze 12°C). Poziom *Enterobacteriaceae* w serze świeżym i dojrzewających oscylował od 5,16 log jtk/g (ser leżakujący 44 dni w temperaturze 12°C) do 7,19 log jtk/g (ser leżakujący 7 dni w temperaturze 12°C). Tak wysokie skażenie bakteriami kałowymi potwierdza nieprawidłową higienę pozyskiwania surowca. Badane próbki były zanieczyszczone drożdżami. Najwyższa ich liczba odnotowana była

w świeżym serze (5,35 log jtk/g), zaś najniższa w serze dojrzewającym przez 35 dni w 12°C (2,44 log jtk/g). Występowanie drożdży w serach jest powszechne, nie stanowi problemu związanego z bezpieczeństwem żywności. We wszystkich próbkach serów oznaczono pleśń, których maksymalna liczba wynosiła do 6,13 log jtk/g (ser po 21 dniach leżakowania w 12°C). Ich obecność zwiększa ryzyko skażenia wyrobu mykotoksynami, niskocząsteczkowymi, słabo polarnymi, ciepłostabilnymi związkami. Spożycie wraz z produktami mykotoksyn może doprowadzić do mykotoksykozy, ostrego lub chronicznego zatrucia, wynikającego z przyjmowania małych dawek mykotoksyn przez dłuższy czas [21].

Tabela 4. Jakość mikrobiologiczna sera dojrzewającego w temperaturze 5°C

Parametr	Liczba mikroorganizmów ± odchylenie standardowe w serze dojrzewającym [log jtk/g ± SD]							
	Czas dojrzewania [dni]							
	7	16	21	28	35	44	50	63
OLD	8,46 ± 0,77	8,96 ± 0,04	8,81 ± 0,01	8,79 ± 0,07	8,80 ± 0,02	7,56 ± 0,04	8,67 ± 0,01	8,85 ± 0,02
LAB	8,78 ± 0,11	8,82 ± 0,03	8,71 ± 0,01	8,60 ± 0,03	8,62 ± 0,02	7,44 ± 0,03	8,52 ± 0,04	8,40 ± 0,06
E	6,70 ± 0,76	6,48 ± 0,09	6,45 ± 0,05	6,29 ± 0,03	6,08 ± 0,01	5,56 ± 0,02	5,52 ± 0,04	5,92 ± 0,48
EC	5,45 ± 0,70	6,14 ± 0,72	6,57 ± 0,05	6,30 ± 0,06	6,28 ± 0,05	5,43 ± 0,18	5,67 ± 0,02	5,58 ± 0,00
G	4,03 ± 0,04	4,42 ± 0,04	3,79 ± 0,00	4,22 ± 0,05	4,42 ± 0,01	3,81 ± 0,04	3,98 ± 0,01	3,35 ± 0,10
P	5,93 ± 0,01	5,60 ± 0,11	5,88 ± 0,05	5,76 ± 0,05	5,49 ± 0,05	5,21 ± 0,05	5,61 ± 0,05	5,93 ± 0,18
D	4,46 ± 0,02	4,48 ± 0,25	4,50 ± 0,09	4,94 ± 0,03	4,66 ± 0,06	4,12 ± 0,02	3,94 ± 0,03	4,53 ± 0,18

Objaśnienia: OLD – ogólna liczba drobnoustrojów, LAB – liczba bakterii fermentacji mlekowej, E – liczba *Enterobacteriaceae*, EC – liczba *Escherichia coli*, G – liczba gronkowcówkoagulazododatnich, P – liczba pleśni, D – liczba drożdży

Niewiele jest doniesień dotyczących stanu mikrobiologicznego serów otrzymywanych z surowego mleka, obejmujących tak szeroki zakres badań, jak w prezentowanej pracy. Wyniki eksperymentów nie odbiegają jednak od danych literaturowych. Pyz-Łukasik i in. (2018) badali 12 próbek oscypków (serów długo dojrzewających z niepasteryzowanego mleka), sprzedawanych na lokalnym rynku. Naukowcy oznaczyli OLD na poziomie 10,19 log jtk/g, zaś LAB w liczebności 10,38 log jtk/g. Ponadto, oscypki nie spełniały kryterium higieny procesu. Liczba *Enterobacteriaceae*, *E. coli* i gronkowców koagulazododatnich wynosiła, odpowiednio 8,28 log jtk/g, 4,78 log jtk/g i 6,46 log jtk/g [22]. O'Brien i in. (2009), analizując irlandzkie sery farmerskie z niepasteryzowanego mleka

potwierdzili obecność *L. monocytogenes* w 6% przebadanych serów. 21% próbek było zakażonych *E. coli* powyżej 5 log jtk/g. Jedynie 3,4% próbek wykazywało przekroczenie pod względem liczby gronkowców koagulazododatnich [23]. Martins i in. (2015) analizując próbki sera stwierdzali obecność *Salmonella* spp. przez pierwszych 15 dni dojrzewania. Po 22 dniach nie wykrywali, już obecności tego patogenu, sugerując to inhibującym działaniem metabolitów autochtonicznych LAB [24]. Marin i in. (2015) analizując mykoflorę mleka i sera dojrzewającego z regionu Castilla la Mancha wyizolowali 18 gatunków pleśni. Liczba drożdży w hiszpańskim mleku była o ok. 1-2 log jtk/ml niższa niż w przedstawionej pracy i nie przekraczała $2,6 \times 10^3$ jtk/ml. Najwyższa odnotowana liczba pleśni wynosiła $3,1 \times 10^2$ jtk/ml, podczas gdy w niniejszych badaniach pleśnie oznaczano na poziomie $3,21 \pm 0,03$ jtk/ml [25].

Tabela 5. Jakość mikrobiologiczna sera dojrzewającego w temperaturze 12°C

Parametr	Liczba mikroorganizmów ± odchylenie standardowe w serze dojrzewającym [log jtk/g ± SD]							
	Czas dojrzewania [dni]							
	7	16	21	28	35	44	50	63
OLD	8,61 ± 0,72	8,71 ± 0,11	8,79 ± 0,07	8,68 ± 0,06	9,03 ± 0,03	8,53 ± 0,09	8,43 ± 0,01	8,81 ± 0,05
LAB	8,48 ± 0,071	8,75 ± 0,02	8,63 ± 0,01	8,52 ± 0,04	9,18 ± 0,05	8,50 ± 0,3	8,39 ± 0,03	8,40 ± 0,04
E	7,19 ± 0,05	6,61 ± 0,1	6,50 ± 0,04	6,26 ± 0,05	6,32 ± 0,03	5,16 ± 0,03	5,34 ± 0,03	5,63 ± 0,03
EC	5,26 ± 1,42	5,92 ± 0,09	6,54 ± 0,01	6,18 ±0,03	7,05 ± 0,01	5,04 ± 0,5	5,30 ± 0,01	5,65 ± 0,01
G	3,67 ± 0,70	4,75 ± 0,04	3,73 ± 0,05	4,31 ± 0,07	4,32 ± 0,02	3,60 ± 0,3	3,10 ± 0,09	3,38 ± 0,01
P	5,87 ± 0,02	5,97 ± 0,03	6,13 ± 0,02	5,85 ± 0,09	5,80 ± 0,03	6,12 ± 0,3	5,98 ± 0,02	5,81 ± 0,04
D	4,41 ± 0,01	4,61 ± 0,07	4,55 ± 0,16	4,41 ± 0,21	2,44 ± 0,12	3,30 ± 0,3	4,26 ± 0,06	4,37 ± 0,04

Objaśnienia: OLD – ogólna liczba drobnoustrojów, LAB – liczba bakterii fermentacji mlekowej, E – liczba *Enterobacteriaceae*, EC – liczba *Escherichia coli*, G – liczba gronkowcówkoagulazododatnich, P – liczba pleśni, D – liczba drożdży

Analiza statystyczna testem U Mann-Whitney wykazała brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$) liczby badanych drobnoustrojów w serach leżakujących w dwóch temperaturach. Zastosowane temperatury dojrzewania serów nie miały wpływu na mikroflorę serów dojrzewających.

4. Podsumowanie

Z przeprowadzonych badań wynika, iż mleko surowe, charakteryzujące się złą jakością mikrobiologiczną, wykorzystywane do produkcji podpuszczkowych serów dojrzewających, musi być uprzednio spasteryzowane gdyż, zalecany w literaturze czas dojrzewania (60 dni) nie zapewnia bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktu. Pomimo wysokiej liczby LAB oraz zastosowania temperatury chłodniczej dojrzewania, żaden z parametrów mikrobiologicznych nie uległ redukcji. Dlatego też, w celu ograniczenia ryzyka zakażenia bakteriami patogennymi i potencjalnie chorobotwórczymi zastosowany surowiec powinien charakteryzować się wysoką czystością mikrobiologiczną. W czasie udoju i na każdym z etapów wytwarzania serów podpuszczkowych dojrzewających należy przestrzegać zasad dobrej praktyki higienicznej.

Literatura

- [1] Alemdar S., Agaoglu S.: Survival of *Salmonella* Typhimurium during the ripening of herby cheese (Otlu peynir). *Journal of Food Safety*, 30(3), (2010), 526-536.
- [2] Rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r., w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych z późn. zm.
- [3] Bianchini V., Borella L., Benedetti V., Parisi A., Miccolupo A., Santoro E., Recordati, Luini C.M.: Prevalence in Bulk Tank Milk and Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in Dairy Herds in Northern Italy. *Applied Environmental Microbiology*, 80(6), (2014), 1832-1837.
- [4] de Freitas Kobayashi P., de Carvalho A.F., Fredrigo R.C, Costa A.M., Piatti R.M., Scarcelli Pinheiro E.: Detection of *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São Paulo. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 38(4), (2017), 1897-1904.
- [5] El-Zamkan M., Hameed K.: Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and some dairy products. *Veterinary World*, 9(10), (2016), 1147-1151.
- [6] Leclerc V., Dufour B., Lombard B., Gauchard F., Garin-Bastuji B., Salvat G., Brisabois A., Poumeyrol M., De Buyser M.L., Gnanou-Besse N., Lahellec C.: Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science*, 76, (2002), 195-202.
- [7] Gölz G., Rosner B., Hofreuter D., Josenhans C., Kreienbrock L., Löwenstein A., Schielke A., Stark K., Sauerbaum S., Wieler L., Alter T.: Relevance of *Campylobacter* to public health- the need for a one health approach. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, (2014), 817-823.
- [8] Wieczorek K., Osek J.: Występowanie *Campylobacter* spp. w stadach oraz w tuszach brojlerów w krajach Unii Europejskiej w świetle badań monitoringowych. *Życie Weterynaryjne*, 85(6), (2010), 534-537.
- [9] Wieczorek K., Szewczyk R., Osek J.: Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from retail raw meat in Poland. *Veterinarni Medicina*, 57(6), (2012), 293-299.
- [10] Mikš-Krajnik M.: Rola paciorkowców mlekowych i pałeczek propionowych w procesie dojrzewania sera typu szwajcarsko-holenderskiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, (2012), 1(80), 45-59.
- [11] Zin M., Znamirowska A., Rudy M., Głodek E., Stanisławczyk R., Gil M.: Ocena żywności i żywienia. Podręcznik dla studentów. Wydawnictwo UR., Rzeszów 2009.

- [12] Knysz P., Gondek M., Pyz-Łukasik R., Ziomek M., Drozd Ł., Paszkiewicz W., Szkucik K.: Skład chemiczny i wartość odżywcza regionalnych serów podpuszczkowych produkowanych metodą tradycyjną. *Medycyna Weterynaryjna*, 74(10), (2018), 671-675.
- [13] Adamiak A., Górská A., Mróz B.: Bakterie psychrotrofowe w mleku surowym i jego przetworach. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (101), (2015), 36-48.
- [14] Gwandu S.H., Nonga H.E., Mdegela R.H., Katakweba A.S., Suleiman T.S, Ryoba R.: Assessment of raw cow milk quality in smallholder dairy farms in Pemba Island Zanzibar, Tanzania. *Veterinary Medicine International*, 2018, (2018), 1-9.
- [15] Tekilegiorgis T.: Microbiological quality analysis of raw and pasteurized milk samples collected from Addis Ababa and its surrounding in Ethiopia. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 4(5), (2018), 1-8.
- [16] Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1662/2006 z dnia 6 listopada 2006 r., zmieniające Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Dz. Urz. UE L 320 z 18.11.2006 r. z późn. zm.
- [17] Bis H., Mędreła-Kuder E.: Czystość mikrobiologiczna mleka i jego produktów dostarczanych przez indywidualnych producentów na plac targowy Stary Kleparz w Krakowi. *Hygeia Public Health*, 46(1), (2011), 57-63 Czerwińska E., Piotrowski W. Potencjalne źródła skażenia mleka wpływające na jego jakość spożywczą. *Rocznik Ochrona Środowiska*, 13, (2011), 635-652.
- [18] Czerwińska E., Piotrowski W.: Potencjalne źródła skażenia mleka wpływające na jego jakość spożywczą. *Rocznik Ochrona Środowiska*, 13, (2011), 635-652.
- [19] Jarosińska A., Barłowska J., Wolanciuk A, Pastuszka R., Barłowska K.: Skład chemiczny i jakość mikrobiologiczna mleka towarowego dostarczanego do 5 mleczarni z regionu lubelskiego, z uwzględnieniem sezonu skupu. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 10, (2014), 2, 47-56.
- [20] Sip A., Olejnik-Schmidt A., Więckowicz M., Grajek W.: Analiza mikroflory regionalnych serów gołka. *Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia*, 9(4), (2010), 25-38.
- [21] Szosland-Fałtyń A., Królasik J.: Zastosowanie bakterii fermentacji mlekowej do kontroli wzrostu pleśni toksynotwórczych oraz usuwania mikotoksyn z produktów mlecznych. *Postępy Techniki i Przetwórstwa Spożywczego*, 1, (2015), 91-94.
- [22] Pyz-Łukasik R., Knysz P., Gondek M.: Hygiene quality and consumer safety of traditional short- and long-ripened cheeses from Poland. *Journal of Food Quality*, 2018, (2018), 1-7.
- [23] O'Brien M., Hunt K., McSweeney S., Jordan K.: Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 26, (2009) 910-914.
- [24] Martins J.M., Galinari É., Pimentel-Filho N.J., Ribeiro Jr J.I., Furtado M.M., Ferreira C.L.L.F.: Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), (2015), 219-230.
- [25] Marin P., Palmero D., Jurado M.: Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International Journal of Dairy Technology*, 68(4), 2015, 1-7.

THE INFLUENCE OF THE RIPENING TEMPERATURE ON THE MICROFLORA OF CHEESE PREPARED FROM UNPASTEURIZED COW MILK

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of two ripening temperatures of cheese, manufactured from raw cow's milk, on the composition of microflora. The microbiological counts of aerobic mesophilic bacteria, lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, yeasts and molds were determined. The presence of the bacteria *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. was also examined. All analysis were performed according to the standards. The raw

milk did not fulfill the microbial criteria for food safety. The ripening time recommended in the literature at temperatures above 4°C for 63 days did not reduce the number of any of the groups of microorganisms studied, thus it did not ensure the microbiological safety of the product. The two ripening temperatures studied did not affect the analyzed cheese microflora, which was confirmed by the non-parametric U Mann-Whitney test. Therefore, raw milk, for the production of ripened cheeses, characterized by poor microbiological quality, should absolutely be pasteurized in order to ensure consumer health safety.

Key words: cheese; ripening; unpasteurized milk; microbiological safety

WPLYW PARAMETRÓW TECHNOLOGII SOUS-VIDE NA JAKOŚĆ MIĘSA WOŁOWEGO

Elżbieta POLAK*, Joanna MARKOWSKA, Marta MADAJ,
Karolina SADŁOWSKA

*Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Technologii i Techniki Chłodnictwa w Łodzi*

*elzbieta.polak@ibprs.pl

Streszczenie: *Celem pracy było zbadanie wpływu parametrów technologii sous-vide na jakość mięsa wołowego. Surowiec do badań stanowiła wołowa kostka gulaszowa poddana obróbce termicznej w temperaturach: 64, 68, 72 i 100°C w czasie 2, 24 oraz 30 h. W mięsie oznaczono ubytek masy metodą wagową, przeprowadzono instrumentalną analizę tekstury oraz pomiar parametrów barwy odcieku w przestrzeni CIE $L^*a^*b^*$. Ubytek masy mięsa wynosił od około 29,99 do 38,01% w zależności od parametrów procesu. Analiza teksturometryczna wskazała, że twardość, gumowatość oraz żujność próbek gotowanych w temperaturze 64÷72°C malały ze wzrostem temperatury i wydłużeniem czasu gotowania dla 24 i 30 godzin. Wartość parametru barwy odcieku mięsa wołowego L^* wynosiła od 37,78 do 72,61 i zwiększała się wraz ze wzrostem temperatury i z czasem gotowania mięsa. Wartość parametru a^* (10,74÷43,20) zależała zarówno od temperatury, jak i od czasu gotowania mięsa. Parametr b^* (-niebieski/+żółty) charakteryzował się bardzo zbliżonymi wartościami niezależnie od zadanych parametrów gotowania. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że większy wpływ na jakość mięsa wołowego wywiera czas niż temperatura zastosowana w technologii sous-vide.*

Słowa kluczowe: sous-vide, wołowina, tekstura, barwa

1. Wprowadzenie

Współczesny konsument to świadomy konsument, który stawia wiele wymagań dotyczących żywności. Jednym z istotnych wyróżników jest czas oraz łatwość i prostota w przygotowaniu posiłków, a ponadto zachowanie wszelkich walorów sensorycznych oraz zapewnienie ich pełnego bezpieczeństwa zdrowotnego. Konsument wymaga świeżych, zdrowych i dobrej jakości produktów. Oczekiwania takie spełnia technologia sous-vide, która poprzez zastosowanie obróbki cieplnej surowca zapakowanego próżniowo w niskiej temperaturze w środowisku wodnym, zapewnia doskonałą jakość i trwałość gotowego wyrobu [19].

Termin *sous-vide*, tłumacząc z języka francuskiego, oznacza „pod próżnią”. Obróbka kulinarna metodą sous-vide to gotowanie surowców zapakowanych próżniowo w worki w kontrolowanych warunkach czasu i temperatury [1, 19]. Za ojca sous-vide uważa się Georges'a Pralusa, francuskiego szefa kuchni, który zauważył, że przyrządzenie w ten sposób *foie gras* (pasztet produkowany ze

stłuszczonej wątróbki kaczki i gęsi) nie powoduje zmian wizualnych, ani konsystencji, a ponadto nie dochodzi w nim do utraty tłuszczu. Z kolei jego rodak, Bruno Goussault przyczynił się do wypromowania sous-vide, jako nowoczesnej metody gotowania, szkoląc tym samym kucharzy w zakresie jej stosowania. Łącząc swe siły w latach 70. ubiegłego wieku, opracowali oni parametry temperatury i czasu gotowania dla różnych produktów spożywczych, choć dopiero przełom lat 2000. oraz początek roku 2010 to znaczny wzrost zainteresowania i wykorzystania metody sous-vide w domach i restauracjach. Obecnie metoda ta znalazła największe zastosowanie w termicznej obróbce mięs [1].

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu parametrów (temperatury i czasu) zastosowanych w technologii sous-vide na ubytek masy, teksturę oraz barwę odcieku mięsa wołowego.

2. Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiło mięso wołowe klasy I w formie kostki gulaszowej nieregularnych wymiarach. Mięso zostało zakupione na rynku lokalnym. Wołowinę podzielono na porcje po około 500 g i zapakowano próżniowo w worki (f-my HENDI) za pomocą pakowarki próżniowej (MULTIVAC Sp. z o.o. Polska). Do technologii sous-vide wykorzystano urządzenie Sous vide GN 1/1, firmy HENDI. Próbkę wołowiny gotowano w temperaturach: 64°C, 68°C, 72°C, przez 24 h oraz 30 h (warianty 2_{SV}-7_{SV}). Dodatkowo przygotowano próbkę zapakowaną próżniowo gotowaną w wodzie o temperaturze 100°C w ciągu 2 h (wariant 1_{SV}). Po obróbce termicznej próbki natychmiast schłodzono do temperatury 10°C±1°C. Wariant kontrolny stanowiła wołowina gotowana w sposób tradycyjny- wariant 0 (T_{wody} = 100°C, t = 2 h). Warianty przygotowania mięsa przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry przygotowania mięsa wołowego w technologii sous-vide

Wariant przygotowania	Temperatura [°C]	Czas [h]
0	100	2
1 _{SV}		
2 _{SV}	64	24
3 _{SV}		30
4 _{SV}	68	24
5 _{SV}		30
6 _{SV}	72	24
7 _{SV}		30

gdzie: SV – próbka sous-vide

Ubytek masy

Ubytek masy obliczono na podstawie różnicy masy mięsa przed i po gotowaniu. Każdą próbkę dokładnie osuszono i zważono, z dokładnością do 0,01 g. Wykonano 3 równoległe powtórzenia [11]:

$$\text{Ubytek masy (\%)} = \frac{\text{masa mięsa surowego} - \text{masa mięsa ugotowanego}}{\text{masa mięsa surowego}} \cdot 100$$

Analiza tekstury

Analizę tekstury przeprowadzono za pomocą analizatora tekstury typu CT3 TA (Brookfield Ametek U.S.A.) Wykonano test TPA (ang. Texture Profile Analysis) stosując 2 cykle pomiarowe, z użyciem sondy TA-39, przy prędkości przesuwu sondy 1,00 mm/s i głębokości penetracji 15 mm oraz przy obciążeniu 1,00 N. Próbki do analizy stanowiły sześciany o wymiarach 30/30/30 mm.

Przeprowadzono również test kompresji (cięcia), w którym próbkami były sześciany o wymiarach 15/15/15 mm, a test wykonano z użyciem sondy TA-7, przy obciążeniu 2,00 N, prędkości przesuwu sondy 1,00 mm/s i głębokości penetracji 5 mm. Do sterowania pomiarami i obróbki danych zastosowano program komputerowy TexturePro CT V 1.2 Build 9. W przypadku obu testów wykonano 5 równoległych powtórzeń.

Analiza parametrów barwy

Analizę parametrów barwy klarownego odcieku mięsa wołowego (po gotowaniu metodą sous-vide) w przestrzeni CIE L*a*b* przeprowadzono za pomocą spektrofotometru CM-5 Konica Minolta (Konica Minolta Sensing Europe BV Sp. z o o. Polska) zgodnie z metodyką badań zalecaną przez producenta urządzenia.

W celu analizy barwy wykonano pomiar transmitancji z użyciem szklanej kuwety o długości drogi optycznej 1 cm. Kalibrację zera (kalibracja 0%) wykonano przy użyciu płytki kalibracji zera transmitancji, a następnie wykonano kalibrację bieli (kalibracja 100%) za pomocą wbudowanej w urządzenie płytki kalibracji bieli. W pomiarach barwy stosowano iluminant D65 oraz standardowy obserwator kolorymetryczny o polu widzenia 10°.

W celu pełnego opisu barwy wyznaczono następujące parametry barwy w przestrzeni CIE L*a*b*: **L*** (jasność), **a*** (-zielony/ +czerwony), **b*** (-niebieski/ +żółty), **h** (odcień).

Na podstawie tych wartości obliczono parametry przedstawione poniżej [6, 7, 10]: ΔL^* , Δa^* , Δb (różnica między jasnością/barwą wzorca a jasnością/barwą próbki badanej),

C* (stopień nasycenia barwy):

$$C^* = [a^2 + b^2]^{0,5}$$

ΔE (różnica barw między wzorcem a próbką):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5}$$

WI (indeks oddalenia od bieli):

$$WI = [(100-L)^2 + (a)^2 + (b)^2]^{0,5}$$

Jako wzorzec do obliczeń przyjęto próbkę o następujących parametrach $L^* = 100$, $a^* = 0,00$ i $b^* = 0,00$.

Pomiar parametrów barwy wykonano w 5 równoległych powtórzeniach.

3. Wyniki i dyskusja

W tabeli 2 przedstawiono procentowy ubytek masy próbek mięsa w zależności od parametrów obróbki termicznej. Największym ubytkiem masy odznaczało się mięso gotowane w sposób tradycyjny – 42,47%, najmniejszym zaś próbka 1_{SV} ($T = 100^\circ\text{C}$, $t = 2$ h) – 29,99%. Dla mięsa gotowanego w technologii sous-vide, w przedziale temperatur 64÷72°C, zaobserwowano zwiększenie ubytku masy wraz ze wzrostem temperatury gotowania. Wzrost ubytku wynosił średnio 4%, porównując próbki mięsa gotowane w temperaturze 64 i 72°C, zarówno w czasie 24 h, jak i 30 h. Wydłużenie czasu gotowania również nieznacznie wpływało na zwiększenie ubytku masy próbek. Podobną zależność zanotowali, m.in. Jeong i wsp. [2018] oraz Oz i Zikirov [2015], którzy analizowali wpływ warunków gotowania sous-vide, odpowiednio na szynkę wieprzową oraz kotlety wołowe. Oba zespoły badawcze wykazały większe znaczenie temperatury niż czasu obróbki na wielkość ubytku masy mięsa. Zauważono jednak, że znaczne skrócenie czasu obróbki, do 2 h, spowodowało mniejszą utratę masy pomimo zwiększenia temperatury do 100°C.

Tabela 2. Ubytek masy mięsa wołowego przygotowanego w technologii sous-vide

Wariant	Temperatura [°C]	Czas [h]	Ubytek masy [%]
			$\bar{X} \pm \text{SD}$
0	100	2	42,47±0,18
1 _{SV}			29,99±0,27
2 _{SV}	64	24	33,29±0,83
3 _{SV}		30	34,18±0,11
4 _{SV}	68	24	34,45±0,54
5 _{SV}		30	37,23±1,89
6 _{SV}	72	24	37,43±0,17
7 _{SV}		30	38,01±0,32

X – średnia arytmetyczna

SD – odchylenie standardowe

Wykazali to również Rinaldi i wsp. [2014], którzy prowadzili badania w kierunku doboru parametrów gotowania wołowiny metodą sous-vide. Wyniki ich badań wskazywały, że próbki mięsa gotowane w temperaturze 75°C w czasie 36 h charakteryzowały się większym ubytkiem masy niż te gotowane w temperaturze 100°C przez 2 h. Podobnie jak Rinaldi i wsp. [2014] oraz Sánchez del Pulgar i wsp. [2012], badający mięso wołowe oraz poliki wieprzowe, wykazano wpływ pakowania próżniowego na zmniejszenie ubytku masy produktu. Zastosowanie pakowania próżniowego stanowi fizyczną barierę, która zapobiega utracie wody z mięsa i pomaga zachować odpowiednią wilgotność wewnątrz opakowania [Rinaldi i wsp., 2014].

Kolejnym etapem badań była analiza tekstury próbek mięsa. Przeprowadzono test TPA, który dostarcza informacji o tym, jak zachowuje się dana próbka podczas przeżuwania [12]. Wyniki uzyskane dla testu TPA badanego mięsa wołowego przedstawiono w tabeli 3.

Największą twardością charakteryzowała się próbka 1_{sv} (T = 100°C, t = 2 h) – 7,48 N, a najmniejszą wariant kontrolny – 3,24 N. Zaobserwowano także, że dla próbek 2_{sv}÷7_{sv} zarówno wzrost temperatury, jak i czasu gotowania powodował zmniejszenie twardości mięsa. Podobną zależność wykazały wyniki badań przeprowadzonych przez Sánchez del Pulgar i wsp. [2012], gdzie twardość polików wieprzowych gotowanych w temperaturze 60°C była wyższa niż próbek gotowanych w 80°C, przy tych samych czasach obróbki. Porównując czasy gotowania, 5 h i 12 h, również zanotowano zmniejszenie twardości mięsa, nawet ponad 2-krotnie w przypadku próbek przygotowywanych w temperaturze 80°C. Zmniejszenie wartości parametru twardości zanotowali także Roldán i wsp. [2013] badający comber jagnięcy gotowany w technologii sous-vide (T = 60, 70, 80°C; t = 6, 12, 24 h). Przeprowadzona przez nich analiza TPA wskazała, że wydłużanie czasu obróbki, zachowując tę samą temperaturę, wpływało na wzrost miękkości próbki. Jednak Jeong K. i wsp. [2018] analizujący szynkę wieprzową zanotowali odwrotną zależność. Szynka gotowana w temperaturze 71°C w czasie 45 minut była około 3,5-krotnie twardsza niż szynka gotowana w temperaturze 61°C w tym samym czasie. Do podobnego wniosku doszła Palka K. [2003] analizująca wołowy mięsień półścięgnisty (*semitendinosus*) poddany obróbce w temperaturach 50, 60, 70, 80 i 90°C w czasie wystarczającym do osiągnięcia zadanej temperatury wewnątrz próbki. Porównując wyniki analizy twardości próbki przygotowanej w temperaturze 50°C i 90°C zanotowano około 7-krotnie wyższą twardość w wyższej temperaturze.

Rozważając powyższe rozbieżności można wnioskować, że krytycznym parametrem wpływającym na twardość mięsa jest czas obróbki mięsa, a nie temperatura. Znaczne wydłużenie czasu gotowania (powyżej 20 h) powoduje zmiękczenie struktury mięsa. Może być to związane z tym, że krótki czas gotowania, nawet w wysokich temperaturach, jest niewystarczający do całkowitego rozpuszczenia kolagenu, co mogłoby niwelować twardość powodowaną przez skracanie włókien miofibryli [14, 17].

Tabela 3. Analiza tekstury mięsa wołowego gotowanego w technologii sous-vide

Wariant	Parametry przygotowania		Parametr						Test kompresji (cięcia)
			Test TPA						
	T [°C]	t [h]	Twardość [N]	Kohezynność	Indeks sprężystości	Gumowatość [N]	Żujność [mJ]	Twardość [N]	
0	100	2	3,24±0,46	0,15±0,05	0,10±0,01	0,47±0,16	0,90±0,19	5,34±1,12	
1sv			7,48±1,41	0,38±0,06	0,13±0,01	0,42±0,16	0,82±0,13	15,63±2,76	
2sv	64	24	6,41±0,30	0,06±0,02	0,16±0,08	0,48±0,05	1,15±0,15	15,74±2,09	
3sv			6,14±0,33	0,05±0,01	0,16±0,03	0,30±0,06	0,65±0,17	9,25±1,04	
4sv	68	24	6,04±0,96	0,07±0,02	0,15±0,01	0,43±0,09	1,00±0,26	13,58±3,04	
5sv			4,72±1,20	0,03±0,02	0,17±0,05	0,28±0,03	0,58±0,15	8,62±1,77	
6sv	72	24	4,53±0,48	0,07±0,02	0,15±0,03	0,40±0,04	0,80±0,10	12,23±2,09	
7sv			3,57±0,26	0,05±0,01	0,14±0,02	0,25±0,05	0,42±0,05	7,03±1,45	

Kohezyjność jest to parametr charakteryzujący siłę wiązań wewnętrznych próbki, inaczej zwartość próbki [12]. Najwyższą kohezyjnością charakteryzowała się próbka 1_{SV} (T = 100°C, t = 2 h), a najniższą próbka 5_{SV} (T = 68°C, t = 30 h), odpowiednio 0,38 i 0,03. Przy tych samych parametrach obróbki (T = 100°C, t = 2 h) pakowanie próżniowe spowodowało ponad 2-krotne zwiększenie zwartości próbki. W przypadku pozostałych wariantów przygotowania nie zanotowano znacznych zmian wartości tego parametru. Podobną zależność wykazali, m.in. Jeong i wsp. [2018], Sánchez del Pulgar i wsp. [2012] czy Rinaldi i wsp. [2014]. Sprężystość i indeks sprężystości opisują zdolność próbki do odzyskania kształtu po ustaniu siły nacisku. Próbki o wartości indeksu sprężystości 0 definiuje się jako doskonale plastyczne, a te o wartości 1 jako doskonale elastyczne [12]. W wyniku niniejszych badań stwierdzono, że wszystkie analizowane próbki mięsa były plastyczne, a wartości ich indeksów sprężystości nie przekraczały wartości 0,20 i zmieniały się nieznacznie przy różnych parametrach gotowania.

Mięso gotowane w temperaturze 64°C przez 24 h (wariant 2_{SV}) charakteryzowało się największą gumowatością (0,48 N) i żujnością (1,15 mJ). Natomiast najniższe wartości tych parametrów zanotowano dla próbki gotowanej w temperaturze 72°C w czasie 30 godzin (wariant 7_{SV}), odpowiednio: 0,25 N i 0,42 mJ. W przypadku próbek mięs przygotowanych w temperaturach od 64 do 72°C stwierdzono, że wydłużenie czasu obróbki wywiera większy wpływ na obniżenie wartości żujności mięsa niż podwyższenie temperatury. Przy wzroście temperatury obróbki z 64°C do 72°C żujność mięsa zmniejszyła się o około 30%. Natomiast wydłużenie czasu z 24 do 30 godzin, w każdej temperaturze, spowodowało średnio 50% spadek wartości tego parametru. Większy wpływ czasu niż temperatury obróbki na żujność mięsa potwierdzają również badania przeprowadzone przez Roldán i wsp. [2013]. Żujność próbek gotowanych w temperaturach 60, 70 i 80°C w czasie 6 h zwiększała się ze wzrostem temperatury. Dopiero wydłużenie czasu gotowania do 12 i 24 godzin sprawiło, że wartość parametru żujności zaczęła się zmniejszać.

Kolejnym przeprowadzonym testem był test kompresji. Dostarczył on informacji o twardości próbki podczas jej ściskania sondą imitującą ostrze noża. Najwyższymi wartościami twardości charakteryzowały się próbki 1_{SV} (T = 100°C, t = 2 h) i 2_{SV} (T = 64°C, t = 24 h), odpowiednio 15,63 i 15,74 N. Najniższą wartość tego parametru wykazała próbka 0 (T = 100 °C, t = 2 h) - 5,34 N. Podobnie jak w przypadku testu TPA zastosowanie pakowania próżniowego przy parametrach 100°C i 2 h wpłynęło na zwiększenie twardości próbki, blisko 3-krotnie. Analizując wyniki uzyskane dla wariantów 2_{SV}-7_{SV} stwierdzono, że zarówno wzrost temperatury jak i wydłużenie czasu obróbki spowodowało zmniejszenie twardości mięsa. Tę zależność potwierdzają także badania przeprowadzone m.in. przez Roldán i wsp. [2013], Jeong i wsp. [2018] czy Vaudagna i wsp. [2002]. Z drugiej strony Christensen i wsp. [2011] analizujący dwa rodzaje mięśni, mięsień półścięgnisty (SD) i mięsień najdłuższy (LD), pochodzące od zwierząt w różnym wieku, nie otrzymali wyników jednoznacznie wskazujących na zależność wartości twardości od parametrów obróbki termicznej. Przykładowo

dla LD świn twardość malała wraz ze wzrostem temperatury obróbki, a dla LD loch nie zauważono znacznych zmian.

Biorąc pod uwagę wyniki badań uzyskanych w niniejszej pracy oraz dane literaturowe można wnioskować, że niemożliwe jest jednoznaczne wskazanie wpływu parametrów obróbki mięsa w technologii sous-vide na jego cechy tekstury. Jest to spowodowane różnymi czynnikami, m.in.: rodzajem mięsa, wiekiem zwierzęcia (termostabilność kolagenu, średnica komórek mięśniowych), rodzajem mięśnia (zawartość kolagenu i tkanki łącznej), czasem dojrzewania mięsa (post-mortem), sposobem przechowywania mięsa (warunki chłodnicze, mrożenie) oraz kombinacjami temperatury i czasu obróbki [2, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17].

Kolejny etap badawczy dotyczył określenia wpływu parametrów czasu i temperatury na barwę odcieku mięsa wołowego. Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Parametry barwy odcieku mięsa wołowego

Temperatura [°C]	Czas [h]	Parametry pomiaru barwy						
		L*	a*	b*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
		X \pm SD						
WZORZEC		100,00	0,00	0,00	-----	-----	-----	-----
64	24	37,78 \pm 0,03	43,20 \pm 0,04	45,71 \pm 0,28	-62,22 \pm 0,03	43,20 \pm 0,04	45,71 \pm 0,28	88,47 \pm 0,18
	30	51,87 \pm 0,04	27,82 \pm 0,03	45,89 \pm 0,07	-48,13 \pm 0,04	27,80 \pm 0,03	45,89 \pm 0,07	72,08 \pm 0,03
68	24	47,72 \pm 0,02	33,24 \pm 0,02	47,36 \pm 0,13	-52,28 \pm 0,02	33,24 \pm 0,02	47,36 \pm 0,13	77,98 \pm 0,09
	30	66,84 \pm 0,06	28,27 \pm 0,03	45,00 \pm 0,07	-33,16 \pm 0,06	28,27 \pm 0,03	45,00 \pm 0,07	62,64 \pm 0,03
72	24	59,54 \pm 0,00	15,16 \pm 0,01	40,41 \pm 0,04	-40,49 \pm 0,00	15,16 \pm 0,01	40,41 \pm 0,04	59,18 \pm 0,02
	30	72,61 \pm 0,04	10,74 \pm 0,01	43,94 \pm 0,06	-27,39 \pm 0,04	10,74 \pm 0,01	43,94 \pm 0,06	52,88 \pm 0,05

Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć, że jasność L* zwiększała się w sposób proporcjonalny do zadanej temperatury gotowania, ponadto w danym wariancie temperaturowym wartości te zwiększały się wraz z czasem gotowania. Parametry a* i b* odpowiadają za barwę produktu. Podczas gotowania w najniższej temperaturze, w najkrótszym czasie (64 °C, 24 h) uzyskano najwyższą wartość parametru a* (43,20) i odwrotnie – w najdłuższym czasie gotowania (36 h), w najwyższej temperaturze (72 °C) parametr a* charakteryzował się najniższą wartością – 10,74. Na tej podstawie można wnioskować, że parametr a* zależał zarówno od temperatury jak i od czasu gotowania mięsa. Z kolei parametr b* (-niebieski/+żółty) charakteryzował się bardzo zbliżonymi wartościami niezależnie od zadanych parametrów gotowania.

W celu porównania zmian barwy produktu (wynikających na przykład z zastosowanej temperatury w trakcie obróbki termicznej lub też czasu jej trwania), bądź barwy produktów między sobą, służą parametry ΔL , Δa , Δb i ΔE [6]. Kolejne próby porównywano do wzorca, za który przyjęto próbkę o następujących parametrach $L^* = 100$, $a^* = 0,00$ i $b^* = 0,00$. Największe różnice wykazał wariant o parametrach: $T = 64\text{ }^\circ\text{C}$ i $t = 24\text{ h}$, z kolei najmniejsze próbka gotowana w temperaturze $72\text{ }^\circ\text{C}$ w czasie 30 h. Zgodnie z danymi literaturowymi wartości ΔE wynoszące powyżej 5 wskazują, że obserwator odnosi wrażenie dwóch różnych barw [6].

Na podstawie parametrów układu CIE $L^*a^*b^*$ wyznaczono stopień nasycenia barwy, odcień barwy i indeks oddalenia od bieli badanego odcieku mięsa wołowego (tabela 5).

Tabela 5. Stopień nasycenia barwy (C^*), odcień barwy (h) i indeks oddalenia od bieli (WI) ocenionego instrumentalnie odcieku mięsa wołowego

Temperatura [$^\circ\text{C}$]	Czas [h]	Parametry pomiaru barwy		
		C^*	h	WI
		$X \pm SD$		
64	24	62,90±0,23	46,62±0,16	88,47±0,18
	30	53,66±0,06	58,78±0,04	72,08±0,03
68	24	57,86±0,10	54,94±0,08	77,98±0,09
	30	53,14±0,07	57,86±0,02	62,64±0,03
72	24	43,16±0,03	69,44±0,03	59,18±0,02
	30	45,23±0,06	76,27±0,02	52,88±0,05

Nasycenie (C^*) opisuje czystość barwy. Jest to odległość punktu od środka układu, im dalej od środka układu tym barwa jest głębsza i czystsza [6]. W przypadku badanego odcieku najmocniejszą barwą charakteryzował się wariant $T = 64\text{ }^\circ\text{C}$ i $t = 24\text{ h}$, najmniejsze nasycenie wykazał wariant $T = 72\text{ }^\circ\text{C}$ i $t = 30\text{ h}$. Można wnioskować zatem, że wysoka temperatura wpłynęła na zmniejszenie nasycenia barwy w badanych próbkach.

Parametr h określa odcień (kąt tonu) [6, 10]. Wszystkie badane próbki posiadały odcień bardziej żółty (wartości h zbliżone do 90°).

Indeks oddalenia od bieli (WI) określa odległość między barwą badanej próbki a bielą w przestrzeni CIE $L^*a^*b^*$ [7]. Najniższą wartość WI posiadał wariant $T = 72\text{ }^\circ\text{C}$ i $t = 30\text{ h}$, pozostałe warianty charakteryzowały się zbliżonymi wartościami.

4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania umożliwiły sformułowanie następujących wniosków:

1. Warunki gotowania mięsa wołowego w technologii sous-vide miały wpływ na ubytek masy mięsa, jego teksturę oraz barwę odcieku.
2. Ubytek masy mięsa gotowanego w technologii sous-vide wyniósł od 29,99 do 38,01% i był mniejszy niż dla mięsa gotowanego w sposób tradycyjny.
3. Twardość, gumowatość oraz żujność próbek gotowanych w temperaturze 64÷72°C malały ze wzrostem temperatury i wydłużeniem czasu gotowania (od 24 do 30 h). Wszystkie te parametry osiągnęły najwyższą wartość dla próbki T = 64°C, t = 24 h, odpowiednio: 6,41 N, 0,48 N, 1,15 mJ, a najniższą dla próbki T = 72°C, t = 30 h, odpowiednio: 3,57 N, 0,25 N i 0,42 mJ. Pozostałe parametry zmieniały się nieznacznie.
4. W przypadku wołowiny przygotowanej w technologii sous-vide stwierdzono, że większy wpływ na parametry tekstury miało wydłużenie czasu gotowania (z 2 do 24, 36 h) niż zwiększenie temperatury do 100°C.
5. Dla próbek gotowanych w wodzie o temperaturze 100°C przez 2 h na twardość oraz kohezynność mięsa wpłynęło pakowanie próżniowe. Próbki zapakowane próżniowo wykazały ponad 2-krotny wzrost wartości tych parametrów w porównaniu do próbek niezapakowanych.
6. Jasność L* badanego odcieku mięsa wołowego zwiększała się wraz z temperaturą i czasem gotowania (37,78÷72,61). Wartości nasycenia barwy C* (43,16÷62,90) oraz indeksu oddalenia od bieli WI (52,88÷88,47) badanych próbek zmniejszały się wraz ze wzrostem czasu gotowania. Natomiast wartości h (odcień) wzrastały proporcjonalnie do czasu i temperatury (46,62÷76,27).

Badania zostały sfinansowane ze środków NCBR w ramach projektu pt. "Nowa linia dań gotowych wysokiej jakości", zrealizowanym przez Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Handlowo-Uslugowe Janusz Socha, współfinansowanym ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020, nr POIR.01.01.01-00-0666/17-00.

Literatura

- [1] Baldwin D.E.: Sous vide cooking: A review, *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1, (2012), 15-30.
- [2] Becker A., et al.: Low temperature cooking of pork meat – physicochemical and sensory aspects, *Meat Science*, 118, (2016), 82-88.
- [3] Christensen L., et al.: Effect of prolonged heat treatment from 48°C to 63°C on toughness, cooking loss and color of pork, *Meat Science*, 88, (2011), 280-285.
- [4] Christensen L., et al.: Relationship between meat toughness and properties of connective tissue from cows and young bulls heat treated at low temperatures for prolonged times, *Meat Science*, 93, (2013), 787-795.
- [5] Christensen L., et al.: Sensory characteristics of meat cooked for prolonged times at low temperature, *Meat Science*, 90, (2012), 485-489.
- [6] Chudy S., et al.: Pomiar barwy produktów mleczarskich, [w:] Piasecka Kwiatkowska D., Cegielska-Radziejewska R. (red.), Współczesne trendy w kształtowaniu jakości żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań 2016, 85-95.

- [7] Dobrzańska A., Cais-Sokolińska D.: Ocena przydatności systemów pomiaru barwy do badań preparatów białek mleka i serwatki, *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna*, T. 19, nr 3, (2014), 267-272.
- [8] Dominguez-Hernandez E., Salaseviciene A., Ertbjerg P.: Low-temperature long-time cooking of meat: Eating quality and underlying mechanisms, *Meat Science*, 143, (2018), 104-113.
- [9] García-Segovia P., Andrés-Bello A., Martínez-Monzó J.: Effect of cooking method on mechanical properties, color and structure of beef muscle (M. pectoralis), *Journal of Food Engineering*, 80, (2007), 813-821.
- [10] Gozdecka G.: Zastosowanie obiektywnej metody kolorymetrycznej do oceny barwy mięsa, *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2, (2006), 35-37.
- [11] Jeong K., et al.: Effects of sous-vide method at different temperatures, time and vacuum degrees on the quality, structural, and microbiological properties of pork ham, *Meat Science*, 143, (2018), 1-7.
- [12] Kusińska E., Starek A.: Właściwości mechaniczne tekstury ciasta biszkoptowo-tłuszczowego, *Inżynieria Rolnicza*, 5, (2011), 157-164.
- [13] Oz F., Zikirov E.: The effects of sous-vide cooking method on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef chops, *LWT – Food Science and Technology*, 64, (2015), 120-125.
- [14] Palka K., Daun H.: Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine M. semitendinosus during heating, *Meat Science*, 51, (1999), 237-243.
- [15] Palka K.: The influence of post-mortem ageing and roasting on the microstructure, texture and collagen solubility of bovine semitendinosus muscle, *Meat Science*, 64, (2003), 191-198.
- [16] Rinaldi M., et al.: A novel time/temperature approach to sous vide cooking of beef muscle, *Food Bioprocess Technology*, 7, (2014), 2969-2977.
- [17] Roldán M., et al.: Effect of different temperature-time combinations on physicochemical, microbial, textural and structural features of sous-vide cooked lamb loins, *Meat Science*, 93, (2013), 572-578.
- [18] Sánchez del Pulgar J., Gázquez A., Ruzi-Carrascal J.: Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature, and cooking time, *Meat Science*, 90, (2012), 825-835.
- [19] Seydi Y., et al.: Evaluation of Sous-Vide Technology in Gastronomy, *International Journal of Agricultural and Life Sciences*, 4, (2018), 226-229.
- [20] Vaudagna S.R., et al.: Sous vide cooked beef muscles: effects of low temperature-longtime (LT-LT) treatments on their quality characteristics and storage stability, *International Journal of Food Science and Technology*, 37, (2002), 425-441.

THE INFLUENCE OF SOUS-VIDE TECHNOLOGY PARAMETERS ON THE QUALITY OF BEEF

Abstract: *The aim of the study was to investigate the influence of sous-vide technology parameters on the quality of beef. The raw material for the test was beef goulash cube boiled at the temperatures: 64, 68, 72 and 100 °C for 2, 24 and 30 h. In the probes was measured: weight loss (weight method), texture parameters and colour parameters of the effluent, in CIEL*a*b* space. The meat weight loss ranged from 29,99 to 38,01% depending on the process parameters. Texturometric analysis showed that the values of hardness, gumminess and chewiness of the samples cooked at 64÷72°C decreased with the increasing temperature and the extending cooking time (24 and 30 h). For the meat effluent the value of L* ranged from 37,78 to 72,61 and increased with the growth of temperature and cooking time. The value of parameter a* (10,74÷43,20) depended on the temperature and cooking time of the meat. The values of b* parameter (-blue/+yellow) were very similar regardless of the sous-vide parameters. Performed studies shows the greater influence of time than temperature on the quality of beef cooked sous-vide.*

Keywords: sous-vide, beef; texture, colour

JAKOŚĆ KIELBAS Z MIĘSA DANIELA Z DODATKIEM SERWATKI KWASOWEJ I INULINY

Agnieszka LATOCH*, Dariusz Mirosław STASIAK

Katedra Technologii Surowców Pochodzenia Zwierzęcego, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin

*agnieszka.latoch@up.lublin.pl

Streszczenie: *Celem badań była ocena wpływu zastąpienia peklosoli serwatką kwasową oraz redukcji tłuszczu zwierzęcego i zastąpienie go inuliną na jakość kielbas z mięsa daniela. Badaniami objęto: skład chemiczny, zawartość azotanów, ocenę sensoryczną, profil kwasów tłuszczowych i związaną z tym charakterystykę zdrowotną, stopień utlenienia tłuszczów, kwasowość, a_w , czystość mikrobiologiczną oraz parametry barwy i tekstury. Stwierdzono, że zastąpienie peklosoli serwatką oraz tłuszczu zwierzęcego inuliną nie zmienia cech sensorycznych i składu chemicznego, a zawartość azotanów oraz kryteria mikrobiologiczne są zgodne z aktualnymi wymaganiami prawnymi. Kielbasy z inuliną cechowały się korzystną proporcją kwasów Ω -3: Ω -6, ale jednocześnie niższą zawartością kwasów Ω -9 oraz wyższymi wskaźnikami: miazdżycowym i trombogeniczności. Nie stwierdzono jednoznacznego wpływu serwatki na profil kwasów tłuszczowych oraz wskaźniki zdrowotności. Stwierdzono, spadek kwasowości w kielbasach z inuliną i jej wzrost w kielbasach z dodatkiem serwatki. Zastąpienie peklosoli solą spowodowało istotny wzrost zawartości produktów przemiany tłuszczów. Jednak dodatek serwatki oraz inuliny spowodował ograniczenie tych przemian. Zastąpienie tłuszczu zwierzęcego inuliną i dodatek serwatki nie miały wpływu na parametry barwy i twardość kielbas.*

Słowa kluczowe: mięso daniela, serwatka, inulina, jakość kielbas

1. Wprowadzenie

Mięso zwierząt łownych żyjących w środowiskach naturalnych cechuje się niepowtarzalnymi cechami sensorycznymi [39] i wysoką wartością odżywczą [4]. Mięso daniela ma wysoką zawartość białek, niską zawartość tłuszczu i dobry profil kwasów tłuszczowych, bogate jest w mikro- i makroelementy (głównie magnez i żelazo hemowe) i witaminy. W mięsie zwierząt jeleniowatych, w tym w mięsie daniela, znajdują się związki biologicznie czynne takie jak: tauryna, karnozyna, koenzym Q10, kreatynina i anseryna. Jest ono także naturalnym źródłem izomerów kwasu linolowego – CLA [6]. To wszystko sprawia, że mięso daniela pozytywnie oddziałuje na zdrowie człowieka wspomagając proces odchudzania, zmniejszając ryzyko powstawania chorób sercowo-naczyniowych i ograniczając ryzyko zawałów serca i udarów [13]. Cechami odbieranymi przez konsumentów jako wada dziczyzny są: ciemna barwa, która może prowadzić do fałszywego wniosku, że mięso to może być obciążone wadami jakościowymi typu

DFD, podczas gdy barwa ta jest zazwyczaj wynikiem wysokiej zawartości mioglobiny w mięśniach dzikich zwierząt [2, 16], dużo wyższa twardość niż u zwierząt hodowlanych [30] oraz ograniczona trwałość związana ze wzrostem bakterii peroksydacyjnychi oksydację lipidów, które w efekcie mogą prowadzić do pogorszenia jakości sensorycznej i bezpieczeństwa zdrowotnego mięsa [3, 4].

Jedną z możliwości wykorzystania mięsa daniela jest produkcja kielbas. Do jej produkcji niezbędny jest tłuszcz zwierzęcy, który odpowiada za prawidłową jakość sensoryczną w tym smakowitość, zapach oraz właściwości reologiczne. Jego stosowanie niesie za sobą pewne ograniczenia dietetyczne, związane z wysoką kalorycznością i wysokim udziałem nasyconych kwasów tłuszczowych. Dobrym zamiennikiem tłuszczu zwierzęcego w przemyśle mięsny może być inulina. Inulina jest naturalnym polisacharydem, posiada niską wartość kaloryczną i nie jest trawiona w jelicie przez enzymy, pełniąc przy tym funkcje błonnika [12]. Wpływa korzystnie na zdrowie człowieka [12], może być stosowana w żywności dla diabetyków [15], ponadto pobudza w jelicie grubym aktywność oraz wzrost bakterii probiotycznych. Ze względu na swój neutralny aromat, biały kolor i to, że po rozpuszczeniu w wodzie stanowi stabilny żel podobny do tłuszczu, inulina jest najodpowiedniejszym substytutem tłuszczu, który w przemyśle mięsny ma pozytywny wpływ na teksturę wyrobu gotowego i poprawia jego cechy organoleptyczne [7].

Największym wyzwaniem stojącym przed przemysłem mięsny jest produkcja atrakcyjnych sensorycznie bezpiecznych wyrobów. Blisko 80-90% wyrobów mięsnych jest produkowana z dodatkiem azotanów. Ich dodatek kształtuje barwę, smakowitość, spowalnia procesy utleniania oraz ogranicza wzrost mikroflory, w tym patogennej przez co przedłuża trwałość i podnosi bezpieczeństwo zdrowotne produktów mięsnych. Jednak azotany charakteryzują się bardzo wysoką reaktywnością. W procesie obróbki termicznej wędlin mogą inicjować powstanie związków nitrozowych, które są toksyczne dla organizmu człowieka uszkadzając funkcje wątroby, działając rakotwórczo, mutagennie i teratogennie. Dotychczas podejmowano różne działania, mające na celu wyeliminowanie azotanów przy jednoczesnym osiągnięciu efektów peklowania [1, 28, 29, 32]. Jednak żadna z proponowanych technologii nie jest równie skuteczna w kształtowaniu pożądanej barwy i działaniu bakteriostatycznym w odniesieniu do patogenów, takich jak *Cl. botulinum* czy *L. monocytogenes*. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań [5, 9-11, 31-36] stwierdzono, że osiągnięcie pożądanych cech sensorycznych oraz odpowiedniej trwałości mikrobiologicznej można uzyskać poprzez użycie serwatki kwasowej. Niskie pH serwatki i obecne w niej bakterie fermentacji mlekowej wykazują duże możliwości przeciwdziałania rozwojowi drobnoustrojów chorobotwórczych i korzystnego oddziaływania na jakość oraz trwałość wyrobów mięsnych.

Celem badań była ocena wpływu zastąpienia azotanu sodu serwatką kwasową oraz redukcji tłuszczu zwierzęcego i zastąpienie go inuliną na jakość kielbas średnio rozdrobnionych poddanych obróbce termicznej (parzeniu) wyprodukowanych z mięsa daniela.

2. Materiał i metodyka

Materiałem badawczym były kielbasy średnio rozdrobnione poddane obróbce termicznej (parzeniu) wyprodukowane z mięsa daniela, peklowanego lub solonego, z dodatkiem lub bez dodatku surowca tłuszczowego (podgardla wieprzowego) lub inuliny (jako substytutu tłuszczu), z dodatkiem lub bez dodatku serwatki kwasowej.

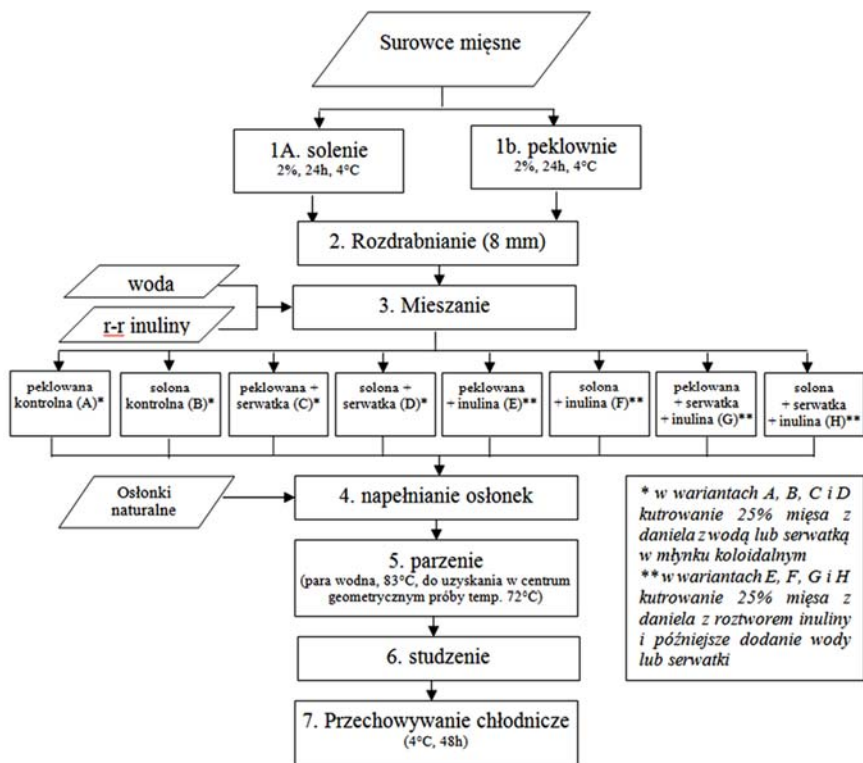
Surowce do produkcji kielbas:

- a) mięso z daniela, pochodzącego z hodowli na terenie Podkarpacia, pozyskano z uboju, następnie zamrożono w warunkach przemysłowych w mroźni Z.M. Jasiołka z Dukli do czasu wykonania produkcji
- b) podgardle wieprzowe pozyskane ze świń hodowanych na terenie Podkarpacia
- c) serwatka kwasowa pozyskana z mleka krów hodowanych na terenie Podkarpacia
- d) inulina Orafi®HPX firmy Beneo-Orafi (Belgia)

Kielbasy zostały wyprodukowane w Z.M. Jasiołka w Dukli. Skład surowcowy przedstawiono w tabeli 1, zaś schemat technologii produkcji na rysunku 1.

Tabela 1. Skład surowcowy kielbas

Surowce [%]	Wariant badawczy							
	A	B	C	D	E	F	G	H
mięso daniela	80	80	80	80	80	80	80	80
podgardle wieprzowe	20	20	20	20	10	10	10	10
inulina (25% roztwór)	-	-	-	-	10	10	10	10
peklosól	2		2		2		2	
sól	-	2	-	2	-	2	-	2
woda	10	10			10	10		
serwatka kwasowa	-	-	10	10	-	-	10	10



Rys. 1. Schemat blokowy produkcji kielbasy z mięsa daniela
Źródło: opracowanie własne.

Metodyka badań:

- podstawowy skład chemiczny: zawartość białka, tłuszczu, wody, kolagenu i soli oznaczono metodą spektrometrii transmisyjnej w bliskiej podczerwieni (NIR) zgodnie z PN-A-82109:2010 [18] z użyciem aparatu FoodScan firmy Foss (Dania);
- zawartość azotanów w przeliczeniu na NaNO_3 i azotynów w przeliczeniu na NaNO_2 oznaczono zgodnie z PN-EN 12014-3:2006 [19];
- ocena sensoryczna: oznaczenie metodą opisową wykonane przez firmę AGROLAB Polska Sp z o.o. (Dęblin, Polska) według standardu QMP_504_EC_86_50_2 z dnia 11.01.2016: Wygląd ogólny, barwa, zapach, konsystencja i smak;
- profil kwasów tłuszczowych: udział kwasów tłuszczowych oznaczono techniką chromatografii gazowej GC/FID zgodnie z PN-EN ISO 12966-1:2015-01 [21] i PN-EN ISO 12966-2:2017-05 [22]. Średnią zawartość kwasów tłuszczowych wykorzystano do obliczenia wskaźnika miażdżycowego (AI); wskaźnika trombogeniczności (TI); indeksu hipocholesterolemicznego (h); indeksu hipercholesterolemicznego (H) według algorytmów opisanych przez Mancini i in. [14];
- kwasowość: oznaczono zgodnie z PN-ISO 2917:2001 [26];

- f) aktywność wody: oznaczono przy użyciu aparatu typu Lab Master firmy Novasina LabMaster – aw firmy Novasina (Niemcy). Pomiar prowadzono w temp. 20°C;
- g) stopień utlenienia tłuszczów (TBARS): określono, mierząc ilość TBARS w próbkach zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Pikula i in. [17]. Wartości wyrażono jako mg aldehydu malonowego (MDA) na kilogram próbki;
- h) czystość mikrobiologiczna: oznaczono ogólną liczbę drobnoustrojów (jtk/g) zgodnie z PN-EN ISO 4833-1:2013-12 [24], *Enterobacteriaceae* (jtk/g) zgodnie z PN-EN ISO 21528-2:2017-08 [23]; gronkowce koagulazo-dodatnie (jtk/g) zgodnie z PN-EN ISO 6888-2:2001/A1:2004 [25] oraz *Listeria monocytogenes* (obecność w 25 g próbki) zgodnie z PN-EN ISO 11290-1:2017-07 [20];
- i) parametry barwy: pomiar wykonywano metodą odbiciową przy użyciu spektrofotometru sferycznego 8200 Series (X-Rite Inc., USA). Pomiar parametrów barwy wykonano na świeżo uzyskanej powierzchni. Wyniki wyrażano w jednostkach systemu CIE Lab [8], gdzie: L* oznacza jasność barwy, a* – chromatyczność w zakresie czerwono-zielonym, b* – chromatyczność w zakresie żółto-niebieskim. Pomiar prowadzono przy wykorzystaniu źródła światła D65 oraz standardowego obserwatora kolorymetrycznego o polu widzenia 10°;
- j) parametry tekstury: analizę wykonano przy użyciu teksturometru TA.XT plus firmy Stable Micro System (Wielka Brytania). Instrumentalną ocenę tekstury wykonano stosując metodę profilowej analizy tekstury (TPA) testem podwójnego ściskania. Próbki w kształcie walca o średnicy 20 mm i wysokości 25 mm ściskano dwukrotnie do uzyskania 50% deformacji próbki. Prędkość przesuwu głowicy podczas testu wynosiła 2mm/s. Na podstawie otrzymanych danych wyznaczono następujące parametry profilu tekstury: twardość [N] będącą określeniem maksymalnej wartości siły potrzebnej do deformacji próbki podczas pierwszego ściśnięcia; sprężystość – wyrażająca stosunek podstawy drugiego piksu do podstawy pierwszego piksu; spoistość – stosunek pracy wykonanej podczas drugiego cyklu ściskania do pracy zarejestrowanej przy pierwszej kompresji próbki; żujność – wyrażona, jako iloczyn twardości, spoistości i sprężystości [N];
- k) analiza statystyczna: ze względu na fakt, że przedstawione wyniki były częścią projektu badawczego oznaczenia przeprowadzono w jednej serii. Każdy wariant kiełbasy wyprodukowano w ilości 10 kg. Z tej ilości w sposób randomiczny pobrano próbki do badań. Podstawowy skład chemiczny, zawartość azotanów i azotynów, profil kwasów tłuszczowych, kwasowość, aktywność wody i stopień utlenienia tłuszczów oznaczono w 6 próbkach pobranych z każdej próby. Parametry barwy i parametry tekstury oznaczono w 10 próbkach pobranych z każdej próby. Obliczono wartość średnią (X) oraz odchylenie standardowe (SD). Do określenia istotności różnic na poziomie $p < 0,05$ posłużono się testem t-Studenta.

3. Wyniki i dyskusja

Przedstawione wyniki badań są częścią projektu finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (HOR.re.027.7.2017). Analiza składu chemicznego kiełbas (tab. 2.) wykazała, brak różnic istotnych statystycznie ($p < 0,05$) pomiędzy wariantami. Zawartość wody wynosiła około 60%, zaś białka 19%. Próby, w których tłuszcz zwierzęcy zastąpiono roztworem inuliny (E, F, G, H) charakteryzowały się niższą jego zawartością o ok. 3-4 p.p. w stosunku do prób z tłuszczem (A, B, C, D). Zawartość kolagenu wynosiła średnio 1,5%, a soli od 1,6%.

Tabela 2. Podstawowy skład chemiczny kiełbas z mięsa daniela

Wariant	woda [%]		tłuszcz [%]		białko [%]		kolagen [%]	sól [%]
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD		
A	60,12 ^a	3,01	19,90 ^a	2,19	18,83 ^a	0,48	1,45 ^a	1,40 ^a
B	59,06 ^a	2,95	22,04 ^a	2,42	19,26 ^a	0,49	1,71 ^a	1,57 ^a
C	58,25 ^a	2,91	22,04 ^a	2,42	18,09 ^a	0,49	1,47 ^a	1,76 ^a
D	59,30 ^a	2,97	22,04 ^a	2,42	18,68 ^a	0,47	1,70 ^a	1,55 ^a
E	59,04 ^a	2,95	18,18 ^a	2,00	20,82 ^a	0,53	1,60 ^a	1,54 ^a
F	61,35 ^a	3,07	17,00 ^a	1,87	20,47 ^a	0,52	1,42 ^a	1,52 ^a
G	59,17 ^a	2,96	18,41 ^a	2,03	20,31 ^a	0,52	1,28 ^a	1,64 ^a
H	59,54 ^a	2,98	19,40 ^a	2,13	19,93 ^a	0,48	1,74 ^a	1,70 ^a

\bar{X} – średnia, SD – odchylenie standardowe; średnie oznaczone tymi samymi małymi literami w kolumnach nie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$)

Tabela 3. Zawartość azotanów i azotynów w kiełbasach z mięsa daniela

Wariant	Azotany w przeliczeniu na NaNO ₃ [mg/kg]		Azotyny w przeliczeniu na NaNO ₂ [mg/kg]	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
A	48,60 ^a	5,83	49,40 ^b	0,99
B	1,69 ^e	0,20	<1,00 ^c	
C	28,10 ^b	3,37	47,70 ^b	0,95
D	1,63 ^e	0,20	<1,00 ^c	
E	19,60 ^c	2,35	62,80 ^a	1,26
F	<1,00 ^f		<1,00 ^c	
G	17,00 ^c	2,04	49,90 ^b	1,00
H	5,02 ^d	0,60	<1,00 ^c	

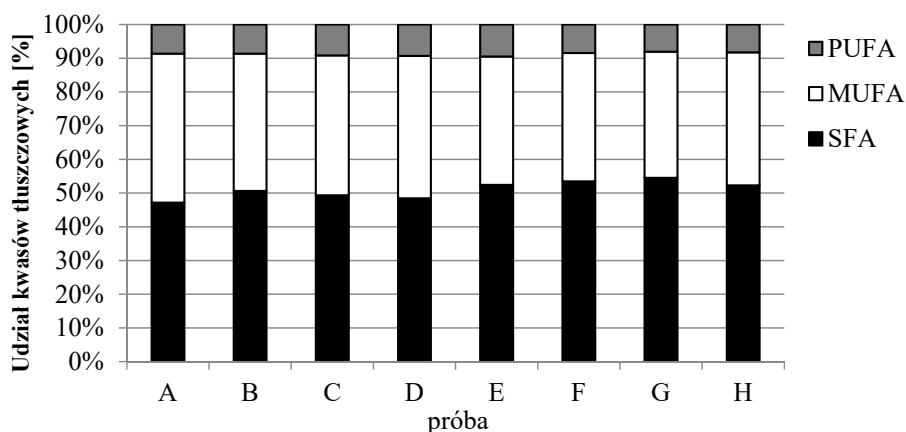
\bar{X} – średnia, SD – odchylenie standardowe; średnie oznaczone tymi samymi małymi literami w kolumnach nie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$)

Próby peklowane (A, C, E i G) zawierały znaczne ilości azotanów i azotynów (tab. 3.). Jednak suma azotanów w przeliczeniu na NaNO_3 oraz azotynów w przeliczeniu na NaNO_2 w żadnej z badanych prób nie przekroczyła dopuszczalnych norm tj. 100 mg/kg, określonych w Rozporządzeniu w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych [27]. Stwierdzono, że dodanie serwatki kwasowej do produkcji kiełbas peklowanych istotnie zredukowało zawartość azotanów w gotowym produkcie. Podobnie w peklowanych próbach E i G, w których połowę ilości podgardla zastąpiono inuliną zawartość azotanów była na bardzo niskim poziomie odpowiednio 19,6 i 17 mg/kg. Takich zależności nie stwierdzono w przypadku azotynów.

Wszystkie wyprodukowane warianty kiełbas sensorycznie zostały ocenione pozytywnie. Paneliści nie stwierdzili obcych posmaków i zapachów oraz zróżnicowania wyglądu kiełbas związanych z dodatkiem serwatki i inuliny. Cechy ocenianych prób zostały scharakteryzowane przez panelistów w następujący sposób:

- a) wygląd ogólny: produkt stanowią batony kiełbasy o wydłużonym, walcowatym kształcie i wyrównanej wielkości. Produkt w osłonce, która ściśle przylega do jego powierzchni. Powierzchnia nierówna, naturalnie, delikatnie wilgotna, bez uszkodzeń i widocznych zanieczyszczeń. Na przekroju widoczne rozdrobnione składniki mięsne i nieliczne tłuszczowe;
- b) barwa kiełbas peklowanych: na powierzchni – beżowa z różowym odcieniem, niejednolita, na przekroju – zróżnicowana, niejednolita, ciemnoróżowo – beżowa, tłuszczu – kremowa;
barwa kiełbas solonych: na powierzchni – beżowa z szarym odcieniem, niejednolita, na przekroju – zróżnicowana, ciemnobieżowa, niejednolita, tłuszczu – kremowa;
- c) konsystencja: stała, dość zwarta, odpowiednio miękka;
- d) zapach: wyraźny, intensywny, właściwy dla tego rodzaju mięsa, bez obcych zapachów;
- e) smak: odpowiednio słony, właściwy dla mięsa tego rodzaju, swoisty, bez obcych posmaków.

Wyniki przeprowadzonej analizy profilu kwasów tłuszczowych wykazały (rys. 2.), że w kiełbasach wyprodukowanych z mięsa daniela nasycone kwasy tłuszczowe (SFA) stanowiły średnio 50%, jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) – ok. 40% a wielonienasycone kwasy tłuszczowe PUFA – do 10%. Dodatek inuliny do kiełbas spowodował zwiększenie procentowego udziału SFA średnio o 5 p.p. i jednocześnie zmniejszenie o 3-4 p.p. udziału MUFA i o ok. 1 p.p. PUFA.



Rys. 2. Udział kwasów tłuszczowych [%] w kielbasach z mięsa daniela

Charakterystykę zdrowotną kielbas z mięsa daniela opartą na analizie indeksów obliczonych na podstawie zawartości kwasów tłuszczonych przedstawiono w tabeli 4. Kielbasy bez dodatku inuliny charakteryzował stosunek kwasów omega-3 do omega-6 w zakresie od 1:8,1 do 1:9,6. Kielbasy, do produkcji których dodano inuliny jako zamiennika tłuszczu cechowały się korzystniejszą proporcją kwasów tłuszczowych omega-3:omega-6 wynoszącą od 1:1,57 do 1:1,74. Średnia zawartość kwasów omega-9, które obniżają poziom cholesterolu całkowitego i frakcji LDL, jednocześnie niemających wpływu na poziom cholesterolu frakcji HDL wynosiła od 7,35 do 8,17 g/100 g produktu bez dodatku inuliny oraz od 5,89 do 6,83 g/100 g w próbach z inuliną.

Tabela 4. Charakterystyka zdrowotna kielbas z mięsa daniela

Wariant	ω -3 [g/100 g]	ω -6 [g/100 g]	ω -9 [g/100 g]	ω -3/ ω -6 [-]	AI [-]	TI [-]	h/H [-]
A	0,18 ^a	1,54 ^c	7,35 ^d	1:8,6 ^d	0,68 ^b	1,57 ^a	1,37 ^d
B	0,21 ^b	1,70 ^d	7,45 ^d	1:8,1 ^d	0,76 ^e	1,77 ^d	1,21 ^a
C	0,19 ^a	1,82 ^e	8,00 ^e	1:9,6 ^e	0,68 ^b	1,70 ^c	1,37 ^d
D	0,20 ^b	1,85 ^e	8,17 ^e	1:9,3 ^e	0,66 ^a	1,64 ^b	1,44 ^f
E	0,21 ^b	1,51 ^c	6,26 ^b	1:7,2 ^c	0,70 ^e	1,83 ^e	1,40 ^e
F	0,19 ^a	1,23 ^a	5,89 ^a	1:6,5 ^b	0,73 ^d	1,89 ^e	1,37 ^d
G	0,22 ^c	1,26 ^a	6,21 ^b	1:5,7 ^a	0,76 ^e	1,95 ^f	1,30 ^b
H	0,19 ^a	1,41 ^b	6,83 ^c	1:7,4 ^c	0,73 ^d	1,86 ^e	1,34 ^c

\bar{X} – średnia, SD – odchylenie standardowe; średnie oznaczone tymi samymi małymi literami w kolumnach nie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$)

Niższe wartości wskaźnika miażdżycowego (AI) oraz wskaźnika trombo-geniczności (TI) są korzystniejsze ze zdrowotnego punktu widzenia. Jednak zastąpienie tłuszczu zwierzęcego inuliną nieoczekiwanie podniosło wartość wskaźnika AI i TI w próbach z inuliną. Prawdopodobnie jest to efekt obniżenia zawartości kwasów omega-6 związanego z eliminacją tłuszczu zwierzęcego.

Im wyższa wartość stosunku indeksu hipocholesterolemicznego (h) do hipercholesterolemicznego (H) tym produkt jest zdrowszy. Nie stwierdzono jednoznacznego wpływu dodatku serwatki kwasowej na profil kwasów tłuszczowych kiełbas oraz wskaźniki i indeksy zdrowotności. Ogólnie ich wartości wskazywały na wysoki potencjał zdrowotności tych wyrobów, biorąc pod uwagę profil kwasów tłuszczowych.

W tabeli 5 umieszczono wyniki ocenianych parametrów chemicznych kiełbas z daniela tj. kwasowości, aktywności wody i wskaźnika utleniania tłuszczów (TBARs). Stwierdzono wyższe wartości pH prób, w których tłuszcz zwierzęcy został zastąpiony roztworem inuliny. Ponadto zaobserwowano nieznaczne obniżenie pH prób, do których w czasie produkcji dodano serwatkę. Wyniki oznaczeń poziomu aktywności wody nie wykazały istotnego wpływu ($p < 0,05$) rodzaju zastosowanej modyfikacji składników na wartość tego parametru. Kiełbasy poddane badaniu cechowały się aktywnością wody na poziomie od 0,972 do 0,981. Zastąpienie w produkcji kiełbas z mięsa daniela peklosoli solą spowodowało 7-krotny wzrost zawartości produktów przemian tłuszczów wyrażonych w miligramach aldehydu malonowego (MDA) na 1 kg produktu. Dodatek serwatki kwasowej spowodował obniżenie zawartości MDA, podobnie jak dodatek inuliny.

Tabela 5. Kwasowość, aktywność wody i wartość wskaźnika utlenienia tłuszczu kiełbas z mięsa daniela

Wariant	Kwasowość [pH]		Aktywność wody [-]		TBARs [mg MDA/kg]	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
A	5,75 ^a	0,02	0,976 ^a	0,000	0,35 ^a	0,05
B	5,73 ^a	0,01	0,973 ^a	0,004	2,46 ^c	0,15
C	5,72 ^a	0,01	0,976 ^a	0,003	0,26 ^a	0,04
D	5,71 ^a	0,00	0,977 ^a	0,001	1,95 ^b	0,13
E	5,90 ^d	0,02	0,972 ^a	0,004	0,29 ^a	0,03
F	5,84 ^c	0,01	0,978 ^a	0,000	2,12 ^b	0,11
G	5,77 ^b	0,01	0,978 ^a	0,001	0,19 ^d	0,02
H	5,73 ^a	0,01	0,974 ^a	0,001	1,53 ^e	0,09

\bar{X} – średnia, SD – odchylenie standardowe; średnie oznaczone tymi samymi małymi literami w kolumnach nie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$)

Nie stwierdzono wpływu zastąpienia peklosoli solą, a tłuszczu zwierzęcego inuliną oraz dodatku serwatki kwasowej na czystość mikrobiologiczną parzonych kiełbas z mięsa daniela (Tab. 6.). Wszystkie warianty kiełbas cechowały się wysokim poziomem spełnienia kryteriów mikrobiologicznych. Kiełbasy były oceniane po upływie 48 godzin od wyprodukowania i przez cały ten czas przetrzymywane w warunkach chłodniczych. Wysoka czystość mikrobiologiczna świadczy o poprawnie przeprowadzonym w warunkach przemysłowych procesie technologicznym, w tym właściwej obróbce termicznej.

Tabela 6. Czystość mikrobiologiczna kielbas z mięsa daniela

Wariant	OLD [jtk/g]		<i>Entero- bacteriaceae</i> [jtk/g]	Gronkowce kagulazo- dodatnie [jtk/g]		<i>Listeria monocytogenes</i> [obecność w 25 g]
	\bar{X}	Przedział		\bar{X}	Przedział	
A	210	(140-310)	< 10	<10		(-)
B	220	(140-340)	< 10	< 10		(-)
C	760	(530-1100)	< 10	< 10		(-)
D	910	(640-1300)	< 10	< 10		(-)
E	470	(320-690)	< 10	< 10		(-)
F	1100	(780-1600)	< 10	10	(2-42)	(-)
G	260	(170-400)	< 10	< 10		(-)
H	400	(270-590)	< 10	15	(5-49)	(-)

\bar{X} – średnia

Tabela 7. Parametry barwy kielbas z mięsa daniela

Wariant	L* [-]		a* [-]		b* [-]	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
A	56,66 ^a	2,24	11,05 ^b	1,18	8,50 ^a	0,60
B	57,35 ^a	2,02	5,14 ^a	0,47	10,19 ^b	0,53
C	57,84 ^a	1,33	10,64 ^b	0,76	8,44 ^a	0,52
D	59,95 ^a	2,32	5,46 ^a	0,81	10,23 ^b	1,03
E	57,18 ^a	1,78	12,00 ^b	1,19	9,30 ^a	0,89
F	60,13 ^a	3,78	5,79 ^a	0,71	11,76 ^b	0,93
G	59,19 ^a	2,19	10,88 ^b	1,36	9,09 ^a	1,10
H	58,65 ^a	2,25	5,47 ^a	0,53	10,70 ^b	0,68

\bar{X} – średnia, SD – odchylenie standardowe; średnie oznaczone tymi samymi małymi literami w kolumnach nie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$)

Analiza parametrów barwy (tab. 7) nie wykazała wpływu zastosowanych modyfikacji surowcowych na stopień jasności (L*). Wartość parametru L* we wszystkich próbach oscylowała w granicach 57-60. Natomiast stwierdzono wpływ zastąpienia peklosoli solą na stopień nasycenia barwą czerwoną (a*) i żółtą (b*). Próby solone charakteryzowała o połowę niższa wartość parametru a* i statystycznie istotna ($p < 0,05$) wyższa wartość parametru b* w porównaniu z próbami peklowanymi. Stwierdzono nieznaczny, statystycznie nieistotny ($p < 0,05$) wpływ, dodatku serwatki kwasowej na obniżenie wartości parametru a*. Zastąpienie tłuszczu zwierzęcego roztworem inuliny nie miało wpływu na parametry barwy kielbas z mięsa daniela.

Zastąpienie peklosoli solą, redukcja tłuszczu zwierzęcego i wykorzystanie roztworu inuliny oraz zastosowanie serwatki kwasowej nie miały istotnego wpływu na twardość kielbas (tab. 8). Próba kontrolna (A) oraz próba E, w której składzie podgardle częściowo zastąpiono inuliną, cechowały się najniższą żuźnością oraz spoistością spośród badanych prób. Ponadto zaobserwowano, że próby z inuliną (E, F, G i H) charakteryzowały się istotnie niższą ($p < 0,05$)

spoistością oraz istotnie wyższą ($p < 0,05$) sprężystością niż próby bez tej substytucji. Nie stwierdzono wpływu zastąpienie peklosoli solą oraz dodatku serwatki na żujność, spoistość oraz sprężystość.

Tabela 8. Parametry barwy kiełbas z mięsa daniela

Wariant	Twardość [N]		Żujność [-]		Spoistość [-]		Sprężystość [N]	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
A	11,54 ^a	2,93	3,46 ^a	1,19	2,45 ^b	0,92	0,54 ^{ab}	0,05
B	18,13 ^a	4,57	7,88 ^b	2,52	5,48 ^c	1,89	0,53 ^a	0,01
C	14,92 ^a	4,04	6,27 ^{ab}	1,97	4,51 ^{bc}	1,76	0,54 ^{ab}	0,08
D	15,45 ^a	6,44	4,82 ^{ab}	3,53	4,06 ^{bc}	2,19	0,50 ^a	0,02
E	11,60 ^a	3,03	3,96 ^a	1,19	0,98 ^a	0,37	0,65 ^b	0,06
F	15,89 ^a	4,15	5,68 ^{ab}	1,86	1,57 ^{ab}	0,70	0,61 ^b	0,04
G	14,71 ^a	5,51	5,24 ^{ab}	2,43	1,44 ^{ab}	0,83	0,63 ^b	0,05
H	14,44 ^a	3,95	5,38 ^{ab}	1,48	1,52 ^{ab}	0,59	0,65 ^b	0,09

\bar{X} – średnia, SD – odchylenie standardowe; średnie oznaczone tymi samymi małymi literami w kolumnach nie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$)

3. Podsumowanie

Nie stwierdzono istotnego wpływu zastąpienia azotanu sodu serwatką kwasową oraz częściowej redukcji tłuszczu zwierzęcego i zastąpienie go inuliną na skład chemiczny i ocenę sensoryczną średnio rozdrobnionych parzonych kiełbas z mięsa daniela. Zawartość azotanów oraz kryteria mikrobiologiczne były zgodne z aktualnymi wymaganiami prawnymi. Wartości wskaźników zdrowotności oparte na algorytmach wykorzystujących profil kwasów tłuszczowych wskazywały na wysoki potencjał zdrowotności kiełbas z mięsa daniela. Kiełbasy z substytucją tłuszczu inuliną cechowały się korzystną proporcją kwasów omega-3 do omega-6, ale jednocześnie niższą zawartością kwasów omega-9 oraz wyższymi wskaźnikami: miażdżycowym i trombo-geniczności. Nie stwierdzono jednoznacznego wpływu serwatki kwasowej na profil kwasów tłuszczowych oraz oceniane wskaźniki zdrowotności. Stwierdzono, wzrost wartości pH w próbach z dodatkiem inuliny i jej obniżenie w próbach z dodatkiem serwatki kwasowej. Zastąpienie w produkcji kiełbas z mięsa daniela peklosoli solą spowodowało istotny wzrost zawartości produktów przemiany tłuszczów. Jednak dodatek serwatki kwasowej oraz inuliny spowodował ograniczenie tych przemian. Próby, w których peklosól zastąpiono solą cechowało istotnie niższe nasycenie barwą czerwoną oraz istotnie wyższe nasycenie barwą żółtą. Stwierdzono nieistotny wpływ dodatku serwatki kwasowej na obniżenie wartości parametru a^* . Zastąpienie tłuszczu zwierzęcego roztworem inuliny nie miało wpływu na parametry barwy kiełbas z mięsa daniela.

Redukcja tłuszczu zwierzęcego i wykorzystanie roztworu inuliny oraz zastosowanie serwatki kwasowej nie miały istotnego wpływu na twardość kielbas. Próby z inuliną charakteryzowały się istotnie niższą spoistością oraz istotnie wyższą sprężystością niż próby bez tej substytucji.

Projekt został sfinansowany ze środków Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi przyznanych na podstawie decyzji nr HOR.re.027.7.2017.

Literatura

- [1] Bázan-Lugo E., García-Martínez I., Alfaro-Rodríguez R.H., Totosaus A.: Color compensation in nitrite-reduced meat batters incorporating paprika or tomato paste. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, (2012), 1627-1632.
- [2] Daszkiewicz T., Janiszewski P., Wajda S.: Quality characteristics of meat from wild red deer (*Cervus elaphus* L.) hinds and stags. *Journal of Muscle Foods*, 20, 4, (2009), 428-448.
- [3] Daszkiewicz T., Lipowski T., Kubiak D.: Effect of freezer storage on quality of m. longissimus lumborum from fallow deer (*Dama dama* L.). *South African Journal of Animal*, 47,6, (2017), 834-841.
- [4] Daszkiewicz T., Wilga K., Janiszewski P., Śmieciński K., Kubiak D.: Porównanie jakości mięsa jelenia szlachetnego (*Cervus Eloptus* L) pozyskanych na terenie Polski i Węgier. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 89, 4, (2013), 77-89.
- [5] Dolatowski Z.J., Wójciak K.M.: Evaluation of natural preservatives in combination with acid whey for use in fermented sausage. *Scientia Agricola*, 73, 2, (2016), 125-133
- [6] Florek M., Drozd L.: Związki bioaktywne w mięsie jeleniowatych. *Medycyna Weterynaryjna*, 69, 9, (2013), 535-539.
- [7] Glibowski P. Bochyńska R.: Wpływ inuliny na właściwości reologiczne roztworów białek serwatkowych. *Acta Agrophysica*, 8, 2, (2006), 337-345.
- [8] Hunt R.G.W.: Measuring colour. Chichester, UK: Ellis Horwood Limited. (1987).
- [9] Karwowska M., Dolatowski Z.J.: Effect of acid whey and freeze-dried cranberries on lipid oxidation and fatty acid composition of nitrite-/nitrate-free fermented sausage made from deer meat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30, 1, (2017), 85-93.
- [10] Karwowska M., Wójciak K., Dolatowski Z.J.: Comparative studies on lipid oxidation of organic model sausage without nitrite produced with the addition of native or autoclaved mustard seed and acid whey. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 12, (2014), 2563-2570.
- [11] Karwowska M., Wójciak K., Dolatowski Z.J.: The influence of acid whey and mustard seed on lipid oxidation of organic fermented sausage without nitrite. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 3, (2014), 628-634.
- [12] Kramek K., Glibowski P.: Właściwości teksturalne i reologiczne mieszaniny inuliny i tłuszczu mlecznego stabilizowanej lecytyną. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 97, 6, (2014), 159-169.
- [13] Kwiecinska K., Kosicka-Gebaska M., Gebaski J. Zainteresowanie polskich konsumentów dziczyzną jako przeciwwaga dla mięsa pochodzącego od zwierząt z chowu przemysłowego. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, 18, 1, (2016), 151-156.
- [14] Mancini S., Preziuso G., Dal Bosco A., Roscini V., Parisi G., Paci G.: Modifications of fatty acids profile, lipid peroxidation and antioxidant capacity in raw and cooked rabbit burgers added with ginger. *Meat Science*, 133, (2017), 151-158.
- [15] Niness R.K.: Inulin and oligofructose. What are they? *Journal of Nutrition*, 129, 7, (1999), 1402-1406.
- [16] Onyango C.A., Izumimoto M., Kutima P.M.: Comparison of some physical and chemical properties of selected game meats. *Meat Science*, 49, 1, (1998), 117-125.

- [17] Pikul J., Leszczynski D.E., Kummerow F.A.: Evaluation of Tyree modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, (1989), 1309-1313.
- [18] PN-A-82109:2010 - Mięso i przetwory mięsne -- Oznaczanie zawartości tłuszczu, białka i wody -- Metoda spektrometrii transmisyjnej w bliskiej podczerwieni (NIT) z wykorzystaniem kalibracji na sztucznych sieciach neuronowych (ANN).
- [19] PN-EN 12014-3:2006 Oznaczanie zawartości azotanów i/lub azotynów -- Część 3: Spektrometryczne oznaczanie zawartości azotanów i azotynów w produktach mięsnych po enzymatycznej redukcji.
- [20] PN-EN ISO 11290-1:2017-07 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego -- Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp. -- Część 1: Metoda wykrywania.
- [21] PN-EN ISO 12966-1:2015-01 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce -- Chromatografia gazowa estrów metyloowych kwasów tłuszczowych -- Część 1: Przewodnik do nowoczesnej chromatografii gazowej estrów metyloowych kwasów tłuszczowych.
- [22] PN-EN ISO 12966-2:2017-05 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce -- Chromatografia gazowa estrów metyloowych kwasów tłuszczowych -- Część 2: Przygotowanie estrów metyloowych kwasów tłuszczowych
- [23] PN-EN ISO 21528-2:2017-08 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego -- Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby Enterobacteriaceae -- Część 2: Metoda liczenia kolonii.
- [24] PN-EN ISO 4833-1:2013-12 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego -- Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów -- Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30 stopni C.
- [25] PN-EN ISO 6888-2:2001/A1:2004 Mikrobiologia żywności i pasz -- Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków) -- Część 2: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynohemem.
- [26] PN-ISO 2917:2001 Mięso i przetwory mięsne - Pomiar pH - Metoda odwoławcza.
- [27] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych. Dz.U. 2010 nr 232 poz. 1525
- [28] Sebranek J.G., Bacus J.N.: Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issue? *Meat Science*, 77, (2007), 136-147.
- [29] Sebranek J.G., Jackson-Davis A.L., Myers K.L., Lavieri N.A.: Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Science*, 92, (2012), 267-273.
- [30] Šnivic M., Belej L., Židek R., Bobko M., Kročko M., Kašćik P., Golian J., Král M.: Influence of different curing meathoods on the fatty acid composition in sausage prepared from red deer meat. *Potravinarstvo - Scientific Journal for Food Industry*, 10, 1, (2016), 585-590.
- [31] Stadnik J., Stasiak D.M.: Effect of acid whey on physicochemical characteristics of dry-cured organic pork loins without nitrite. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 4, (2016), 970-977.
- [32] Wójciak K. M., Karwowska M., Dolatowski Z.J.: Fatty acid profile, color and lipid oxidation of organic fermented sausage during chilling storage as influenced by acid whey and probiotic strains addition. *Scientia Agricola*, 72, 2, (2015), 124-131.
- [33] Wójciak K., Dolatowski Z.J.: Effect of acid whey on nitrosylmyoglobin concentration in uncured fermented sausage. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 2, (2015), 713-719.
- [34] Wójciak K., Krajmas P., Solska E., Dolatowski Z.J.: Application of acid whey and set milk to marinate beef with reference to quality parameters and product safety. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 14, 4, (2015), 293-302.
- [35] Wójciak K.M., Dolatowski Z.J., Kolożyn-Krajewska D.: Use of acid whey and probiotic strains to improve microbiological quality and sensory acceptance of organic fermented sausage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39, 5, (2015), 539-547.
- [36] Wójciak K.M., Karwowska M., Dolatowski Z.J.: Use of acid whey and mustard seed to replace nitrites during cooked sausage production. *Meat Science*, 96, 2A, (2014), 750-756.

- [37] Wolf-Maier K., Cooper R.S., Kramer H., Banegas J.R., Giampaoli S., Joffres M.R., Poulter N., Primatesta P., Stegmayr B., Thamm M.: Hypertension treatment and control in five European Countries, Canada, and the United States. *Hypertension*, 43, (2004), 10-17.

QUALITY OF SAUSAGES FROM FALLOW DEER MEAT WITH THE ADDITION OF ACID WHEY AND INULIN

Abstract: *The aim of the study was to evaluate the replacement of sodium nitrate by acid whey and the reduction of animal fat and replace it with inulin on the quality of cooked sausages from meat of deer. The study included: chemical composition, the content of nitrates, sensory evaluation, fatty acid profile and the related health characteristics, degree of oxidation of fats, acidity, and, microbiological characteristics and the color and texture parameters. It was found that replacement of sodium nitrate by whey and animal fat by inulin does not alter the sensory characteristics and chemical composition, and the content of nitrates and microbiological criteria are consistent with the current legal requirements. Sausages with the addition of inulin were characterized by a favorable ratio of Ω -3: Ω -6 acids, but at the same time a lower content of Ω -9 acids and higher indicators: atherosclerosis and thrombogenicity. There was no clear effect of whey on the fatty acid profile and health indicators. It was found that acidity decreased in the samples with the addition of inulin, and its increase in the samples with the addition of acid whey. Replacement of sodium nitrate by salt resulted in a significant increase in the content of fat metabolism products in sausages. However, the addition of whey and inulin caused the reduction of oxidation products. Substitution of animal fat by inulin and whey supplement did not affect the color parameters and sausage hardness.*

Key words: deer meat, whey, inulin, quality of sausages.

AKTYWNOŚĆ I STABILNOŚĆ KOMPLEKSU INKLUZYJNEGO POLIFENOLI Z EKSTRAKTU Z PROSZKU KAKAOWEGO ACTICOA Z B-CYKLODEKSTRYNĄ

Milena KACZMARSKA*, Dorota ŻYŻELEWICZ, Joanna ORACZ,
Anna WOJCIECHOWSKA, Edyta GAJDA, Agnieszka ŁOSIEWICZ

Instytut Technologii i Analizy Żywności, Politechnika Łódzka, Łódź

* milena.kaczmarska@edu.p.lodz.pl

Streszczenie: β -cyklodekstryna (β -CD) to cykliczny oligosacharyd, który dzięki swojej budowie jest zdolny do tworzenia trwałych kompleksów inkluzyjnych z wieloma związkami poprzez niekowalencyjne wiązania pomiędzy inkludowaną cząsteczką a wnęką β -CD. Ze względu na termolabilność i utlenianie wielu związków polifenolowych ich aplikacja do żywności jest ograniczona. Proces tworzenia kompleksów inkluzyjnych ekstraktów polifenolowych może przyczynić się do poprawy właściwości funkcjonalnych otrzymanych z nich preparatów. Celem badań było otrzymanie kompleksu inkluzyjnego związków polifenolowych liofilizowanego ekstraktu proszku kakaowego Acticoa z β -CD oraz charakterystyka właściwości funkcjonalnych tych preparatów. Kompleks inkluzyjny z β -CD został otrzymany metodą liofilizacji. W ekstrakcie kakaowym oraz uzyskanym z niego kompleksie oznaczono zawartość polifenoli metodami UHPLC-DAD oraz Folina-Ciocalteu, a także zbadano aktywność antyoksydacyjną z zastosowaniem testów *in vitro* (DPPH, FRAP). Ocenie poddano również rozpuszczalność, stabilność termiczną i długoterminową wyjściowego ekstraktu i kompleksu z β -CD. Wydajność tworzenia kompleksu inkluzyjnego określono na poziomie 47,58%. Całkowita zawartość polifenoli w kompleksie ekstraktu polifenolowego z β -CD wynosiła $6,36 \pm 0,36$ g/100 g. Uzyskane wyniki wykazały, że otrzymany kompleks w porównaniu do wyjściowego ekstraktu odznaczał się niższą zawartością polifenoli oraz mniejszą aktywnością. Natomiast charakteryzował się znacznie lepszą rozpuszczalnością w wodzie, etanolu oraz roztworach symulujących płyny ustrojowe człowieka, a także wyższą stabilnością termiczną i długoterminową w porównaniu do wyjściowego ekstraktu.

Słowa kluczowe: proszek kakaowy, polifenole, kompleks inkluzyjny z β -CD

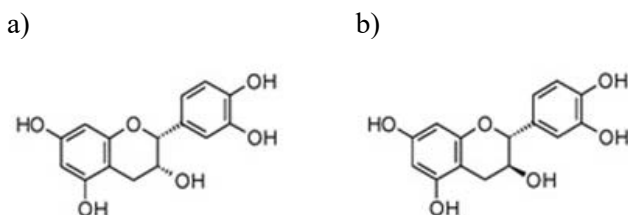
1. Wprowadzenie

Ziarno kakaowe (*Theobroma cacao* L.) oraz produkty jego przetwórstwa tj. proszek kakaowy i czekolada są bogatym źródłem związków bioaktywnych, w tym polifenoli, głównie flawonoidów. Polifenole to wtórne metabolity roślin, które doskonale sprawdzają się w walce z wolnymi rodnikami powstającymi w wyniku procesów oddychania zachodzących w organizmie człowieka. Nadmierna ilość wolnych rodników może przyczyniać się do rozwoju wielu chorób cywilizacyjnych tj. miażdżycy, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych czy nowotworów. Stała obecność związków polifenolowych w naszej codziennej

diecie może zapobiegać występowaniu tych chorób [7, 13, 17]. Związki te zyskują coraz większe zainteresowanie przede wszystkim ze względu na swoje silne właściwości przeciwutleniające. Ponadto coraz częściej wykorzystywane są jako naturalne barwniki czy środki przedłużające trwałość żywności, a także stosowane są w produkcji papieru czy kosmetyków [2, 3]. Liczne badania epidemiologiczne wykazały, że dzięki spożywaniu czekolady i proszku kakaowego bogatego we flawonoidy zmniejsza się ryzyko zachorowalności na choroby serca i układu krążenia [1, 2, 6]. Ze względu na swoje właściwości obniżające ciśnienie krwi zalecane są w leczeniu nadciśnienia. Polifenole wykazują działanie antybakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe, dlatego doskonale nadają się w zwalczaniu infekcji i różnego rodzaju alergii korzystnie wpływając na nasz układ odpornościowy. Działają ochronnie na wątrobę, przez co są stosowane w leczeniu chorób układu pokarmowego.

W ostatnich latach wśród producentów żywności nastąpił wyraźny wzrost zainteresowania nowatorskim podejściem oferowania wyrobów funkcjonalnych, wzbogacanych w naturalne przeciwutleniacze. Prawdziwym bogactwem związków polifenolowych charakteryzują się produkty otrzymywane z ziarna kakaowego, tj. proszek kakaowy, czekolada, ale również czerwone wino czy ciemno zabarwione owoce (aronia, czarna porzeczka, wiśnia) [14, 24].

Głównymi związkami polifenolowymi występującymi w produktach przerobu ziarna kakaowego są epikatechiny i katechiny oraz procyanidyny. Epikatechiny i jej izomer katechiny są nielicznymi związkami z grupy flawonoidów, występującymi w postaci aglikonu. Cząsteczka (epi)katechiny zbudowana jest z 15 atomów węgla (rys. 1).

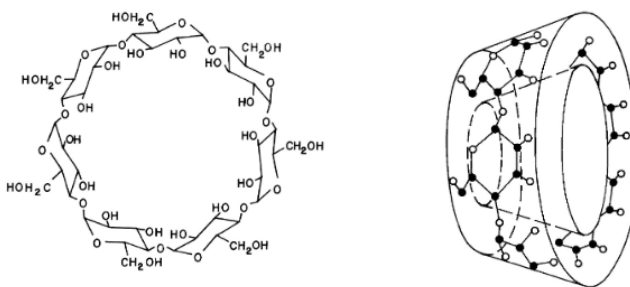


Rys. 1. Struktura chemiczna (-)-epikatechiny (a) i (+)-katechiny (b)
Źródło: [11, 17].

Ze względu na obecność pięciu grup hydroksylowych w cząsteczce epikatechiny i katechiny, związki te należą do jednych z najskuteczniejszych przeciwutleniaczy. Jednakże, dotychczasowe badania wykazały, że naturalne substancje polifenolowe wprowadzane do produktów spożywczych mogą tracić swoje właściwości prozdrowotne. Jest to związane głównie z ich termolabilnością i utlenianiem, a także możliwymi interakcjami z pozostałymi składnikami. Wprowadzenie wolnych związków polifenolowych do produktów spożywczych może obniżać przyswajalność w wyniku tworzenia kompleksów głównie z polisacharydami, białkami oraz produktami reakcji Maillarda [4, 5]. Ponadto

flawonoidy są również odpowiedzialne za cierpki i gorzki smak surowego ziarna kakaowego a także produktów otrzymywanych w wyniku jego przerobu. Z tego względu aplikacja do żywności ekstraktu proszku kakaowego bogatego we flawonoidy jest ograniczona. Istnieje zatem konieczność poszukiwania skutecznych metod poprawy właściwości funkcjonalnych preparatów polifenolowych.

Jedną z możliwości zwiększenia stabilności związków polifenolowych izolowanych z surowców roślinnych jest ich kapsułkowanie wewnątrz pierścienia β -cyklodekstryny (β -CD). Jest to cykliczny oligosacharyd, który posiada zdolność do tworzenia trwałych kompleksów inkluzyjnych z wieloma związkami poprzez niekowalencyjne wiązania pomiędzy inkludowaną cząsteczką a wnęką β -CD. Ten oligosacharyd zbudowany jest z sześciu jednostek glukopiranozowych połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi (rys. 2). Ze względu na hydrofobowe wnętrze i hydrofilową powierzchnię cząsteczki, związek ten wykorzystywany jest do zwiększania rozpuszczalności substancji bioaktywnych w wodzie [4, 11, 12, 22].



Rys. 2. Struktura chemiczna β -CD

Źródło: [11].

Tworzenie kompleksów z β -CD jest możliwe dzięki budowie tego oligosacharydu w kształcie toroidalnego pierścienia. W ten sposób ułatwiony jest dostęp cząsteczki gościa do wnęki β -CD. Wiazaniami biorącymi udział w tworzeniu kompleksu inkluzyjnego są wiązania wodorowe, siły dyspersyjne oraz oddziaływania Van der Waalsa. Cyklodekstryny mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne z substancjami o różnych rozmiarach. Jeśli cząsteczka gościa ma wymiary większe niż średnica wnęki cyklodekstryny to tylko niektóre grupy funkcyjne inkludowanej cząsteczki wypełniają wnękę β -CD [4, 15, 19, 23]. Cyklodekstryny mają wiele zastosowań w przemyśle spożywczym. Chronią kapsułkowane substancje przed promieniowaniem UV czy temperaturą, maskują ich nieprzyjemny smak i aromat, stabilizują emulsje, zabezpieczają przed zakażeniem mikrobiologicznym, ale również stanowią barierę w interakcji z innymi składnikami żywności [9, 10, 21, 22]. β -CD została uznana za bezpieczny środek spożywczy możliwy do stosowania w żywności. Z tego względu wpisano ją na listę produktów GRAS (ang. Generally Recognized as Safe) [10].

Celem badań było otrzymanie kompleksu inkluzyjnego związków polifenolowych liofilizowanego ekstraktu proszku kakaowego Acticoa z β -CD oraz charakterystyka właściwości funkcjonalnych tych preparatów

2. Metodyka

Materiał badawczy stanowił proszek kakaowy Acticoa o wysokiej zawartości polifenoli, wyprodukowany przez firmę Barry Callebaut.

Ekstrakty polifenolowe przygotowano według zmodyfikowanej procedury opisanej przez Żyżelewicz i wsp. [25]. Proszek kakaowy przed ekstrakcją odtłuszczono przy użyciu heksanu. Odtłuszczony proszek poddano 2-krotnej ekstrakcji z wykorzystaniem mieszaniny etanol : woda (70:30, v/v) przez 10 minut w temperaturze 60°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem (200 obr/min). Po upływie tego czasu ekstrakcję kontynuowano w wytrząsarce orbitalnej (150 obr/min) w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Otrzymane ekstrakty połączono, wirowano z zastosowaniem wirówki K2015R (Centurion Scientific, Stoughton, Wielka Brytania) z prędkością 4000 obr/min przez 15 minut w temperaturze 4°C. Supernatant filtrowano pod zmniejszonym ciśnieniem przez membranę z regenerowanej celulozy o średnicy porów 1,2 μ m. Następnie z uzyskanych ekstraktów odparowano etanol w częściowej próżni w temperaturze 40°C przy zastosowaniu wyparki obrotowej (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Niemcy). Uzyskany wodny ekstrakt zamrożono i poddano liofilizacji z wykorzystaniem liofilizatora DELTA model 1-24LSC (Christ, Ostrode am Harz, Niemcy) (-50°C; 0,9 MPa). Zliofilizowany ekstrakt do czasu dalszych analiz przechowywano w szczelnie zamkniętym pojemniku w temperaturze -20°C.

Utrwalony ekstrakt polifenolowy proszku kakaowego poddano kapsułkowaniu z wykorzystaniem β -CD stosując zmodyfikowaną procedurę opisaną przez Budryn i wsp. [5] oraz Żyżelewicz i wsp. [26]. Naważkę liofilizowanego ekstraktu proszku kakaowego Acticoa (0,2000 g) oraz β -CD (0,2837 g) rozpuszczono w wodzie dejonizowanej. Otrzymaną zawiesinę wytrząsano w temperaturze 40°C przez 3h. Następnie próbę stopniowo ochłodzono do temperatury 20°C i pozostawiono na 24h w temperaturze 0°C w celu strącenia otrzymanego kompleksu inkluzyjnego. Po tym czasie zawiesinę wirowano z prędkością 6000 obr/min przez 20 minut w temperaturze 4°C, a supernatant zdekantowano. Pozostałość po odwirowaniu wysuszono metodą liofilizacji (-50°C, 0,9 MPa) i poddano 2-krotnej ekstrakcji z zastosowaniem bezwodnego etanolu w celu oddzielenia kompleksu inkluzyjnego od nieskompleksowanych związków polifenolowych. Mieszaninę wirowano z prędkością 6000 obr/min przez 20 minut w temperaturze 4°C, a supernatanty zdekantowano. Wszystkie supernatanty połączono i poddano analizie UHPLC-DAD (UHPLC+Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) w celu oznaczenia zawartości nieskompleksowanych związków polifenolowych. Osad zawierający kompleks inkluzyjny wysuszono metodą liofilizacji (-50°C, 0,9 MPa)

i do czasu dalszych analiz przechowywano w szczelnie zamkniętym pojemniku w temperaturze -20°C .

Skład jakościowy i ilościowy związków polifenolowych ekstraktu proszku kakaowego Acticoa oraz połączonych supernatantów uzyskanych po procesie kapsułkowania oznaczono metodą ultrasprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych z detekcją spektrofotometryczną – UHPLC-DAD (UHPLC+Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), zgodnie z metodą opisaną przez Żyżelewicz i wsp. [25]. Zawartość polifenoli ogółem w utrwalonym ekstrakcie oraz uzyskanym z niego kompleksie oznaczono metodą Folina-Ciocalteu według procedury opisanej przez Oracz i Nebesny [16]. Wyniki wyrażono jako ekwiwalent kwasu galusowego (mg) w przeliczeniu na gram suchej masy liofilizowanej próby (mg GAE/g).

Aktywność przeciwutleniającą utrwalonego ekstraktu polifenolowego i otrzymanego kompleksu inkluzyjnego określono metodą spektrofotometryczną (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japonia) z wykorzystaniem stabilnych rodników DPPH [26]. Zdolność do redukcji jonów żelaza(III) ekstraktu polifenolowego i jego kompleksu inkluzyjnego z β -CD oznaczono metodą FRAP (ang. Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter), według procedury opisanej przez Pastoriza i Rufián-Henares [18]. Wyniki aktywności przeciwutleniającej wyrażono jako ekwiwalent Troloksu w przeliczeniu na suchą masę liofilizowanej próby (μmol Troloksu/g).

Rozpuszczalność wyjściowego ekstraktu i kompleksu z β -CD zbadano w: wodzie; etanolu; 0,1 M roztworze HCl o pH 1,2; buforze fosforanowym o pH 6,8 w temperaturze 25°C [20].

Ocenie poddano również stabilność długoterminową i termiczną wyjściowego liofilizowanego ekstraktu i otrzymanego kompleksu inkluzyjnego polifenoli ekstraktu proszku kakaowego Acticoa z β -CD. W celu zbadania stabilności długoterminowej i termicznej otrzymane kompleksy inkluzyjne oraz wyjściowe ekstrakty inkubowano odpowiednio w temperaturze 37°C przez 2 miesiące oraz w temperaturze 100°C przez 2h. Po tym czasie próby rozpuszczono w mieszaninie metanol : woda (70:30 v/v) i poddano analizie pod kątem zawartości polifenoli metodą UHPLC-DAD [8].

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej, która obejmowała przeprowadzenie analizy wariancji w układzie jednoczynnikowym ANOVA przy użyciu programu STATISTICA 10 firmy StatSoft (Inc., Tulsa, USA) i określono istotność różnic na podstawie testu Tukey'a, przy założonym poziomie istotności $p < 0,05$. Wyniki analiz każdej próby przedstawiono jako wartości średnie i odchylenia standardowe z trzech równoległych powtórzeń.

3. Wyniki i dyskusja

Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz stwierdzono, że efektywność tworzenia kompleksów inkluzyjnych związków polifenolowych ekstrakt proszku kakaowego Acticoa z β -CD wynosi $47,58 \pm 0,16\%$. Uzyskane wyniki są zbliżone do danych przedstawionych przez innych autorów [8, 26],

którzy podają, że wydajność kapsułkowania epikatechiny i katechiny z β -CD mieści się w zakresie od 27,5 do 64,9%. Przeprowadzone badania wykazały, że wyjściowy ekstrakt proszku kakaowego Acticoa zawiera w swoim składzie głównie związki polifenolowe należące do grupy flawan-3-oli, w tym (+)-katechinę ($1,65 \pm 0,09$ g/100 g), (-)-epikatechinę ($10,23 \pm 0,13$ g/100 g), procyanidynę B2 i C1 (odpowiednio $4,47 \pm 0,07$ i $2,83 \pm 0,08$ g/100 g), a także niewielkie ilości kwasów fenolowych i ich pochodnych. Zawartość kwasu galusowego, kwasu protokatechowego, asparaginian kwasu kawowego oraz asparaginian kwasu *p*-kumarowego w wyjściowym ekstrakcie wynosiła odpowiednio $0,06 \pm 0,01$, $0,07 \pm 0,02$, $0,64 \pm 0,05$ i $0,17 \pm 0,02$ g/100 g. Sumaryczne stężenie oznaczonych związków polifenolowych w ekstrakcie polifenolowym i otrzymanym kompleksie inkluzyjnym wynosiło odpowiednio $20,11 \pm 0,47$ g/100 g i $6,36 \pm 0,36$ g/100 g (tabela 1).

Tabela 1. Skład jakościowy i ilościowy polifenoli ekstraktu proszku kakaowego Acticoa oraz jego kompleksu z β -CD

Związek	Zawartość g/100 g	
	Wyjściowy ekstrakt	Kompleks ekstrakt Acticoa- β -CD
(+)-katechina	$1,65 \pm 0,09$	$0,56 \pm 0,08$
(-)-epikatechina	$10,23 \pm 0,13$	$3,17 \pm 0,10$
procyanidyna B2	$4,47 \pm 0,07$	$1,42 \pm 0,05$
procyanidyna C1	$2,83 \pm 0,08$	$0,86 \pm 0,06$
kwas galusowy	$0,06 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
kwas protokatechowy	$0,07 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$
asparaginian kwasu kawowego	$0,64 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,05$
asparaginian kwasu <i>p</i> -kumarowego	$0,17 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$
Suma polifenoli	$20,11 \pm 0,47$	$6,36 \pm 0,36$

Wyniki oznaczenia zawartości polifenoli ogółem, zdolności zmiatania rodników DPPH oraz siły redukcji jonów żelaza FRAP przed i po przeprowadzeniu procesu tworzenia kompleksów inkluzyjnych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Aktywność antyoksydacyjna w ekstrakcie proszku kakaowego Acticoa oraz jego kompleksu z β -CD

Preparat	Polifenole ogółem [mg GAE/g]	DPPH [μ M Troloksu/g]	FRAP [μ M Troloksu/g]
Ekstrakt Acticoa	91,29 \pm 0,14	2024,50 \pm 2,05	2458,83 \pm 2,17
Kompleks ekstrakt Acticoa- β -CD	45,10 \pm 0,10	1325,53 \pm 0,14	1390,82 \pm 0,48

Polifenole ogółem – zawartość polifenoli ogółem wyrażona mg GAE/g; *DPPH* – zdolność zmiatania rodników DPPH wyrażona w μ mol Troloksu/g; *FRAP* – siła redukcji jonów żelaza(III) wyrażona w μ mol Troloksu/g.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że uzyskany kompleks inkluzyjny polifenoli zawartych w proszku kakaowym, w porównaniu z wyjściowym ekstraktem, charakteryzował się prawie 2-krotnie niższą zawartością polifenoli ogółem, wynoszącą 45,10 \pm 0,10 mg GAE/g. Ponadto powstanie kompleksu inkluzyjnego przyczyniło się do znacznego obniżenia zarówno aktywności przeciwutleniającej mierzonej w teście z wykorzystaniem stabilnych rodników DPPH (1325,53 \pm 0,14 μ M Trolox/g), jak i zdolności do redukcji jonów żelaza FRAP (1390,82 \pm 0,48 μ M Trolox/g).

W kolejnym etapie badań określono rozpuszczalność liofilizowanego ekstraktu proszku kakaowego Acticoa oraz kompleksu inkluzyjnego z niego otrzymanego w temperaturze pokojowej w wodzie i etanolu, a także roztworach symulujących płyny ustrojowe człowieka tj. 0,1 M roztworze kwasu solnego o pH równym 1,2 (środowisko soku żołądkowego) i buforze fosforanowym o pH 6,8 (środowisko płynu jelitowego). Wyniki oznaczenia rozpuszczalności badanych preparatów przedstawiono w tabeli 3. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, że liofilizowany ekstrakt polifenolowy proszku kakaowego Acticoa oraz kompleks inkluzyjny z niego otrzymany charakteryzowały się istotnie ($p < 0,05$) zróżnicowaną rozpuszczalnością.

Tabela 3. Rozpuszczalność utrwalonego ekstraktu proszku kakaowego Acticoa oraz jego kompleksu z β -CD

Preparat	Rozpuszczalność [mg/ml]			
	Woda	Etanol	Bufor pH 6,8	0,1 M HCl
Ekstrakt Acticoa	0,67 \pm 0,02	0,42 \pm 0,01	0,83 \pm 0,03	1,14 \pm 0,02
Kompleks ekstrakt Acticoa- β -CD	1,57 \pm 0,04	0,77 \pm 0,05	1,67 \pm 0,02	1,38 \pm 0,03

Utrwalony wyciąg polifenoli proszku kakaowego odznaczał się najlepszą rozpuszczalnością w 0,1M roztworze HCl ($1,141,14 \pm 0,02$ mg/ml). Z kolei otrzymany kompleks inkluzyjny tego ekstraktu z β -CD wykazywał najwyższą rozpuszczalność w symulowanym płynie jelitowym, tj. $1,67 \pm 0,02$ mg/ml (Tab.3.) Zaobserwowano również, że w porównaniu do wyjściowego ekstraktu, otrzymany kompleks inkluzyjny wykazywał znacznie lepszą rozpuszczalność we wszystkich badanych rozpuszczalnikach i roztworach. Największy wzrost rozpuszczalności otrzymanego kompleksu, wynoszący odpowiednio 57,4 i 50,3%, stwierdzono w przypadku wody oraz buforu fosforanowego o pH 6,8. Przeprowadzone badania wykazały również, że uzyskany kompleks posiadał wyższą stabilność długoterminową i termiczną w porównaniu do wyjściowego ekstraktu. Można zatem stwierdzić, że proces kapsułkowania ekstraktu proszku kakaowego przyczynił się do ochrony związków przeciwutleniających w nim obecnych.

Zbliżone rezultaty uzyskali w swoich badaniach Ho i wsp. [8]. Autorzy ci stwierdzili, że kapsułkowanie katechiny z β -cyklodekstryną zwiększa 2-krotnie jej rozpuszczalność w wodzie, a także chroni tę bioaktywną substancję przed niekorzystnym wpływem wysokiej temperatury, promieniowania UV i tlenu.

3. Podsumowanie

Otrzymany kompleks inkluzyjny proszku kakaowego Acticoa z β -CD utrwalono metodą liofilizacji. Wydajność enkapsulacji związków polifenolowych z β -CD wynosi 47,58%. Otrzymany kompleks inkluzyjny w porównaniu do wyjściowego ekstraktu polifenolowego odznacza się niższą zawartością związków polifenoli ogółem, a także znacznie słabszą pojemnością przeciwutleniającą mierzoną w testach DPPH i FRAP. Charakteryzował się natomiast znacznie lepszą rozpuszczalnością w wodzie, etanolu oraz roztworach symulujących płyny ustrojowe człowieka oraz wyższą stabilnością w porównaniu do wyjściowego ekstraktu.

Literatura

- [1] Abbas M., Saeed F., Anjum F.M., Afzaal M., Tufail T., Bashir M.S., Ishtiaq A., Hussain S., Suleria H.A.R.: Natural polyphenols: an overview, *International Journal of Food Properties* 20(8), (2017), 1532-2386.
- [2] Abdel-Shafy H.: Polyphenols: properties, occurrence, content in food and potential effects, *Toxicology* 6, (2017), 232-261.
- [3] Bernatoniene J., Kopustinskiene D.M.: The role of catechins in cellular responses to oxidative stress, *Molecules* 23(4), (2018), 965.
- [4] Braga Carneiro S. et al.: Cyclodextrin-drug inclusion complexes: in vivo and in vitro approaches, *International Journal of Molecular Sciences* 20, (2019), 1-23.
- [5] Budryn G., Patecz B., Rachwał-Rosiak D., Oracz J., Zaczyńska D., Belica S., Navarro-González I., Meseguer J.M., Pérez-Sánchez H.: Effect of inclusion of hydroxycinnamic and chlorogenic acids from green coffee bean in β -cyclodextrin on their interactions with whey, egg white and soy protein isolates, *Food Chemistry*, 168, (2015), 276-287.

- [6] Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M., Mattei J., The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review, *Frontiers in Nutrition* 5, (2018), 87.
- [7] Hii C.L., Law C.L., Suzannah S., Misnawi, Cloke M.: Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.), *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2(04), (2009), 702-722.
- [8] Ho S., Thoo Y.Y., Young D.J., Siow L.F.: Inclusion complexation of catechin by β -cyclodextrins: Characterization and storage stability, *LWT – Food Science and Technology*, 6 (2017), 555-565
- [9] Jin Z.: Applications in Food, [w:] Redaktor R. (Yuan Ch.), Cyclodextrins: preparation and application in industry, World Scientific Publishing, China 2018, 1-285.
- [10] Kumar A.R., Ashok K., Brahmaiah B., Nama S., Baburao C.: The cyclodextrins: a review, *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science* 2(2), (2013), 291-304.
- [11] Li B., Zhang W., Ma H.: Physicochemical characterization of inclusion complex of catechin and glucosyl- β -cyclodextrin, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 15(1), (2016), 167-172.
- [12] Loftsson T., Jarho P, Másson M, Järvinen T.: Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, (2005), 335-351.
- [13] Maleyki Mhd Jalil A., Ismail A.: Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules* 13, (2008), 2190-2219.
- [14] Manach C. Scalbert A., Morand Ch., Rémésy Ch., Jiménez L.: Polyphenols: Food source and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition* 79(5), (2004), 727-747.
- [15] Miranda J.C., Martins T.E.A., Veiga F., Ferraz H.G.: Cyclodextrins and ternary complex: technology to improve solubility of poorly soluble drugs, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 47, (2011), 665-682.
- [16] Oracz J., Nebesny E.: Antioxidant Properties of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.): Influence of Cultivar and Roasting Conditions, *International Journal of Food Properties*, 19, (2016), 1242-1258.
- [17] Oracz J., Żyżelewicz D., Nebesny E.: The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, (2015), 1176-1192.
- [18] Pastoriza S., Rufián-Henares J.: Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet, *Food Chemistry* 164, (2014), 438-445.
- [19] Pio di Cagno M.: The Potential of Cyclodextrins as Novel Active Pharmaceutical Ingredients: A short Overview, *Molecules* 22, (2017), 1-14.
- [20] Seedher N., Kanojia M.: Co-solvent solubilization of some poorly-soluble antidiabetic drugs, *Pharmaceutical Development and Technology*, 14(2), (2009), 185-192.
- [21] Sharma N., Baldi A.: Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview, *Drug Delivery* 23, (2014), 729-747.
- [22] Tiwari G. Tiwari R., Rai A.K.: Cyclodextrins in delivery system: Applications, *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences* 2(2), (2010), 72-79.
- [23] Tsai Y., Tsai H., WU C., Tsai F.: Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with β -cyclodextrin, *Food Chemistry* 120, (2010), 837-841.
- [24] Żyżelewicz D., Budryn G., Oracz J. Antolak H., Kręgiel D., Kaczmarek M.: The effect on bioactive components and characteristics of chocolate by functionalization with raw cocoa beans, *Food Research International* 113, (2018), 234-244.
- [25] Żyżelewicz D., Krysiak W., Oracz J., Sosnowska D., Budryn G., Nebesny E.: The influence of the roasting process conditions on the polyphenols content in cocoa beans, nibs and chocolate, *Food Research International*, 89 (2), (2016), 918-929.
- [26] Żyżelewicz D., Oracz J., Kaczmarek M., Budryn G., Grzelczyk J.: Preparation and characterization of inclusion complex of (+)-catechin with β -cyclodextrin, *Food Research International* 113, (2018), 263-268.

THE ACTIVITY AND STABILITY OF THE COMPLEX OF PHENOLIC COMPOUND FROM ACTICOA COCOA POWDER EXTRACT WITH β -CYCLODEXTRIN

Abstract: *β -cyclodextrin (β -CD) is a cyclic oligosaccharide, which due to its structure is able to form stable inclusion complexes with many compounds through non-covalent bonds between the embedded molecule and the β -CD cavity. Due to the thermolability and oxidation of many polyphenolic compounds, their application to food is limited. The process of forming the inclusion complexes of polyphenol extracts may contribute to the improvement of functional properties of the preparations obtained from them. The aim of the research was to obtain the inclusion complex of polyphenol compounds of the lyophilized extract of Actico cocoa powder with β -CD and the characteristics of functional properties of these preparations. The inclusion complex with β -CD was obtained by lyophilization. In the cocoa extract and the complex obtained from it, the content of polyphenols was determined using the methods UHPLC-DAD and Folin-Ciocalteu, and the antioxidant activity was tested using in vitro tests (DPPH, FRAP). The solubility, thermal and long-term stability of the initial extract and complex with β -CD were also evaluated. The complexation efficiency was 47.58%. The total content of polyphenols in the complex of polyphenol extract with β -CD was 6.36 ± 0.36 g/100 g. The obtained results showed that the complex of phenolic compound from Acticoa cocoa powder extract compared to the initial extract was characterized by lower polyphenol content and less antioxidant activity. However, it was characterized by much better solubility in water, ethanol and solutions simulating human body fluids, as well as higher thermal and long-term stability compared to the initial extract.*

Keywords: cocoa powder, polyphenols, inclusion complex with β -CD

ZDOLNOŚCI ADHEZYJNE SZCZEPÓW CAMPYLOBACTER SPP. WYIZOLOWANYCH Z MIĘSA DROBIOWEGO

Anna SZOSLAND-FAŁTYN*, Beata BARTODZIEJSKA,
Joanna KRÓLASIK, Beata PAZIAK-DOMAŃSKA

*Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego,
Zakład Jakości Żywności, Pracownia Mikrobiologii w Łodzi*

*anna.szosland@ibprs.pl

Streszczenie: W prezentowanej pracy zbadano kinetykę tworzenia się biofilmu przez szczepy *Campylobacter spp.* na powierzchni abiotycznej, którą stanowiło tworzywo polipropylenowe. Adhezję do powierzchni polipropylenu badano trzema technikami. Pierwszą była metoda hodowlana, szacująca liczbę żywych komórek na pożywce mikrobiologicznej, połączona ze zmodyfikowaną jakościową metodą Christensen'a. Drugą spektrofotometryczna wykorzystująca zależność zachodzącą między gęstością płynnej hodowli a intensywnością światła przepuszczalnego przez badany ośrodek. Ostatnią ATP-bioluminescencja, mierząca aktywność metaboliczną komórek poprzez oznaczanie zawartości ATP drobnoustrojów. Szczepy *Campylobacter* z gatunku *jejuni* i *coli*, po 5 dniach inkubacji, w metodzie hodowlanej tworzyły biofilm na średnim poziomie wynoszącym odpowiednio $4,8 \pm 0,3$ i $4,4 \pm 0,5$ log jtk/cm². ATP bioluminescencja po tym samym czasie wynosiła od 1550 RLU/cm² dla szczepu *C. coli* 438/06 do 26000 RLU/cm² dla *C. jejuni* 414/06. Wykazano, że szczepy *Campylobacter spp.* po 5 dniach hodowli w bulionie *Brucella* adherowały do powierzchni abiotycznej polipropylenu, niezależnie od zastosowanej metody. Szczepy *Campylobacter* z gatunku *jejuni* charakteryzowały się lepszą adhezją do powierzchni abiotycznej niż szczepy z gatunku *coli*.

Słowa kluczowe: biofilm, *Campylobacter spp.*, mięso drobiowe, powierzchnia abiotyczna, adhezja

1. Wprowadzenie

Pałeczki *Campylobacter spp.* są obecnie jednym z najczęstszych etiologicznych czynników zaburzeń żołądkowo-jelitowych u ludzi. Szeroko rozprze-strzenione w przyrodzie, mogą doprowadzić do zakażenia człowieka, które określane jest jako kampylobakterioza. Jej objawami są głównie zapalenie jelita powiązane z biegunką, złym samopoczuciem, gorączką, nudnościami, bólem brzucha [1, 2, 3]. Głównym źródłem infekcji są ptaki i ssaki żyjące na wolności oraz domowe: drób, bydło, świnie, psy, koty, króliki. Człowiek zaraża się poprzez kontakt ze zwierzętami chorymi lub bezobjawowymi nosicielami, przez spożycie zakażonych produktów spożywczych (zwłaszcza mięsa drobiowego, wody,

niepasteryzowanego mleka) [3, 4, 5]. Zapobieganie zakażeniom polega na prawidłowej obróbce cieplnej produktów, prewencji zanieczyszczenia ujęć wody i kontroli częstości zakażeń. W wyniku braku zachowania podstawowych zasad higieny, w około 30% przypadków, dochodzi do zakażeń krzyżowych czyli przeniesienia patogenów znajdujących się np. w posoce pochodzącej z surowego mięsa, z rąk i sprzętu kuchennego na ludzi i potrawy [6, 7, 8].

Jak wynika z raportów zoonotycznych, liczba zarejestrowanych i potwierdzonych kamylobakterioz od lat utrzymuje się na wysokim poziomie dochodzącym do 246158 przypadków [9-13]. W 2013 r. odsetek zakażeń u ludzi, przewyższył zachorowania na salmonellozę [11]. Większość przypadków tej zoonozy nie jest diagnozowana, szacuje się, więc że liczba zatruć może sięgać nawet 9 milionów przypadków rocznie. Koszt leczenia z publicznych systemów opieki zdrowotnej oraz koszt strat w produkcji, szacowany jest na około 2,4 miliardy euro rocznie w całej UE [2].

Wyniki badań przemawiają za tym, że w przeżyciu i ekspansji *Campylobacter* spp. w środowisku oraz w wirulencji, istotną rolę mogą odgrywać zdolności adhezyjne do różnego typu powierzchni oraz tworzenie biofilmu [14, 15, 16]. Dzięki nim dochodzi do wymiany materiału genetycznego oraz wzmocnienia struktury populacyjnej. Tworzenie biofilmu może być istotne również w rozprzestrzenianiu się tych patogenów w czasie produkcji czy przetwarzania żywności, w następstwie prowadząc do kamylobakteriozy [17, 18]. Biofilm (błona biologiczna) jest przestrzenną wielokomórkową strukturą złożoną z różnego typu organizmów jednego lub kilku gatunków. Organizmy te wykazują zdolność przylegania do siebie nawzajem i do powierzchni stałych. Głównym komponentem biofilmu, determinującym jego biologiczne i fizykochemiczne cechy, są pozakomórkowe substancje, wytwarzane przez mikroorganizmy tzw. EPS (ang. Extracellular Polymeric Substances). EPS wchłaniają wodę, wychwytyują znajdujące się w niej substancje odżywcze i utrzymują biofilm w całości [14, 19]. Zapewniają ochronę przed wpływem niekorzystnych czynników środowiskowych.

2. Metodyka, założenia badawcze

Celem badań było określenie zdolności adhezyjnych wyizolowanych z mięsa drobiowego szczepów z rodzaju *Campylobacter* spp. do powierzchni abiotycznej. Mając na uwadze, że analizy adhezji i żywotności drobnoustrojów tworzących biofilmy na powierzchniach abiotycznych, można dokonać różnymi technikami posłużono się trzema metodami. Powierzchnię abiotyczną stanowiło tworzywo polipropylenowe. Kinetykę tworzenia się biofilmu zbadano metodą:

- Hodowlaną, szacując liczbę żywych komórek na pożywce mikrobiologicznej, połączoną ze zmodyfikowaną jakościową metodą Christensen'a,
- Spektrofotometryczną wykorzystując zależność zachodzącą między gęstością płynnej hodowli, a intensywnością światła przepuszczalnego przez badany ośrodek.

- ATP-bioluminescencji mierząc aktywność metaboliczną komórek poprzez oznaczanie zawartości ATP drobnoustrojów, a intensywnością światła przepuszczalnego przez badany ośrodek.

Material biologiczny

Szcepki *Campylobacter coli* i *jejuni* wyizolowane z mięsa drobiowego (z różnych elementów mięsa z kurczaka i indyka), zidentyfikowane w testach fenotypowych i genotypowych.

Przechowywanie i aktywacja szczepów

Szcepki przechowywano w temperaturze -20°C w kriobankach. Przed każdym eksperymentem szcepki uaktywniano przez pojedynczy pasaż na nieselektywnej pożywce Columbia agar z krwią, w atmosferze mikroaerofilnej, w temperaturze $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ przez 48 h.

We wszystkich eksperymentach warunki mikroaerofilne uzyskiwano stosując gotowe zestawy CampyGenTM (OXOID).

Badanie kinetyki tworzenia się biofilmu na powierzchni abiotycznej przez Campylobacter spp.

Przygotowanie inokulum i nanoszenie na powierzchnie abiotyczne

Szcepki hodowano w bulionie Brucella (BTL) w warunkach mikroaerofilnych w 37°C przez 24 h. Następnie pobierano 1 ml hodowli i przenoszono do 5 ml świeżego bulionu Brucella. Tak przygotowane inokulum nanoszono w ilości 5 ml na powierzchnie jałowych płytek polipropylenowych. Płytki inkubowano w warunkach mikroaerofilnych w 37°C przez 5 dni.

Metoda hodowlana

Badanie kinetyki tworzenia się biofilmu przez szcepki *Campylobacter* spp. na powierzchni polipropylenu metodą referencyjną- hodowlaną, wykonywano poprzez posiew na podłoże selektywne CASA (Biomerieux). Kinetykę tworzenia biofilmu badano po 1, 3 i 5 dniach. Po odpowiednim czasie przemywano powierzchnie sterylną wodą destylowaną i wymazywano gazikami, które następnie przenoszono do 5 ml świeżego bulionu Brucella. Przygotowane zawiesiny dziesięciokrotnie rozcieńczano, posiewając po 0,1 ml na stałe podłoże Brilliance *Campylobacter*. Posiane pożywki inkubowano w warunkach mikroaerofilnych w 37°C przez 48 h. Po tym czasie zliczano kolonie. Eksperymenty powtarzano dwukrotnie.

Zmodyfikowana jakościowa metoda Christensen'a detekcji biofilmu

Detekcję biofilmu tworzonego przez szcepki z rodzaju *Campylobacter* spp. na powierzchni polipropylenu wykonywano zmodyfikowaną metodą wg Christensen i in. (1982) [20]. Po 5 dniach inkubacji w warunkach mikroaerofilnych płytki przemywano sterylną wodą destylowaną i suszono. Następnie barwiono 0,5% roztworem fioletu krystalicznego w ilości 5 ml przez 15 minut. Po tym czasie zlewano fiolet krystaliczny osuszano płytki i wykonywano zdjęcia.

Metoda spektrofotometryczna

Badanie kinetyki tworzenia się biofilmu przez szczepy *Campylobacter* spp. na powierzchni polipropylenu metodą spektrofotometryczną, na spektrofotometrze Helios firmy UNICAM. Po inkubacji w warunkach mikroaerofilnych płytki przemywano trzykrotnie sterylną wodą destylowaną i suszono w 42°C przez 30 min. Następnie barwiono 0,5% roztworem fioletu krystalicznego w ilości 5 ml przez 15 minut. Po tym czasie zlewano fiolet krystaliczny. Zabarwioną biomasę wypłukiwano 5 ml 98% etanolu, mierząc jednocześnie gęstość optyczną przy długości fali 595 nm. Eksperymenty powtarzano dwukrotnie.

Metoda ATP-bioluminescencji

Badanie kinetyki tworzenia się biofilmu przez szczepy *Campylobacter* spp. na powierzchni polipropylenu metodą ATP-bioluminescencji wykonywano w oparciu o pomiar intensywności impulsów świetlnych (w jednostkach świetlnych RLU ang. relative light unit) proporcjonalny do ilości wewnątrzkomórkowego adenozyno trójfosforanu (cATP). Po inkubacji w warunkach mikroaerofilnych płytki przemywano sterylną wodą destylowaną. Wykonywano wymazy płytek polipropylenowych specjalnymi piórami (gotowymi zestawami odczynników do prowadzenia reakcji enzymatycznych). Zachodzące reakcje enzymatyczne analizowano przy pomocy bioluminometru HY-LiTE®2 firmy Merck. Eksperymenty powtarzano dwukrotnie.

3. Wyniki i dyskusja

Badanie kinetyki tworzenia się biofilmu na powierzchni abiotycznej przez szczepy z rodzaju *Campylobacter* spp.

Analizy adhezji i żywotności drobnoustrojów tworzących biofilmy na powierzchniach abiotycznych można dokonać różnymi metodami. Do najczęściej stosowanych technik należą:

- ✓ hodowlane, szacując liczbę drobnoustrojów na pożywkach mikrobiologicznych lub określające składniki komórek drobnoustrojów budujących biofilmy (egzopolisacharydy, lipidy, sterole, kwasy nukleinowe),
- ✓ mierzące aktywność metaboliczną zaadherowanych komórek, (adenozynotrifosforanu- ATP, enzymów zewnątrzkomórkowych),
- ✓ mikroskopowe oceniające adhezję oraz tworzenie i strukturę biofilmu na podstawie analizy obrazu (SEM, AFM, mikroskop fluorescencyjny) [21, 22, 23, 24, 25].

W prezentowanej pracy zbadano kinetykę tworzenia się biofilmu na powierzchni polipropylenu przez szczepy z rodzaju *Campylobacter* spp. trzema metodami.

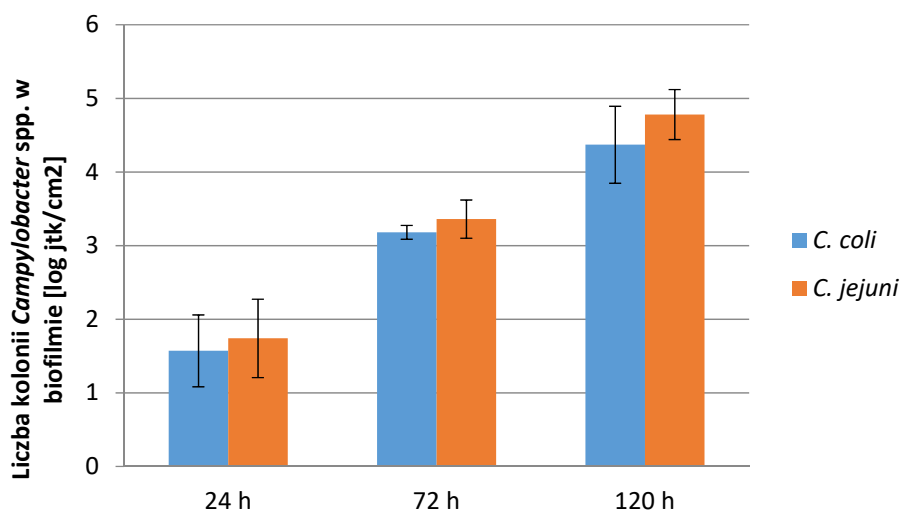
Metoda hodowlana

Wyniki kinetyki tworzenia biofilmu przez *Campylobacter* spp. metodą hodowlaną, przedstawione są w tabeli 1. Liczbę bakterii oceniano na powierzchni po przemyciu i usunięciu komórek planktonicznych, które nie uległy adhezji do

polipropylenu. Po jednym dniu inkubacji liczba zaadherowanych komórek bakterii wynosiła od < 10 jtk/cm² do $2,4 \times 10^2$ jtk/cm². Po 5 dniach liczba kolonii *Campylobacter* spp. na powierzchni polipropylenu kształtowała się na poziomie od $1,4 \times 10^4$ jtk/cm² do $7,8 \times 10^5$ jtk/cm². Podobne wyniki badań otrzymali Ica i in. (2012). Naukowcy badali w bulionie Mueller-Hinton mieszaną kulturę bakterii *C. jejuni* i *Pseudomonas aeruginosa*. Po 5 dniach inkubacji liczba *C. jejuni* w biofilmie wynosiła $3,0 \times 10^5$ jtk/ml [26]. Najlepiej do powierzchni abiotycznej adherował szczep *C. jejuni* 414/04. W prezentowanej pracy szczepy *Campylobacter* z gatunku *jejuni* wykazywały nieco lepszą adherencję do powierzchni abiotycznej wynoszącą średnio $4,8 \pm 0,3$ log jtk/cm² niż szczepy z gatunku *coli*, które tworzyły biofilm na poziomie $4,4 \pm 0,5$ log jtk/cm² (rys. 1). Podobnych spostrzeżeń dokonali Sulaeman i in. (2009) podkreślając tym samym znaczenie *C. jejuni* w ludzkiej kamylobakteriozie [18].

Tabela 1. Kinetyka tworzenia biofilmu przez *Campylobacter* spp. na powierzchni polipropylenu

Szczep	Liczba kolonii <i>Campylobacter</i> spp. na powierzchni polipropylenu w zależności od czasu [jtk/cm ²]		
	po 24 h	po 72 h	po 120 h
<i>C. coli</i> 438/06	$<10 \div 9,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^3 \div 1,5 \times 10^3$	$7,1 \times 10^4 \div 5,2 \times 10^5$
<i>C. coli</i> 438/12	$9,0 \times 10^1 \div 1,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3 \div 1,4 \times 10^3$	$8,7 \times 10^4 \div 1,9 \times 10^5$
<i>C. coli</i> 414/18	$<10 \div 1,1 \times 10^1$	$1,4 \times 10^3 \div 1,7 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4 \div 1,5 \times 10^4$
<i>C. coli</i> 438/02	$7,0 \times 10^1 \div 8,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^3 \div 2,2 \times 10^3$	$5,3 \times 10^4 \div 5,6 \times 10^4$
<i>C. coli</i> 414/19	$9,0 \times 10^1 \div 1,3 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3 \div 1,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5 \div 1,4 \times 10^5$
<i>C. jejuni</i> 414/04	$<10 \div 1,2 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3 \div 3,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5 \div 7,8 \times 10^5$
<i>C. jejuni</i> 414/06	$<10 \div 2,4 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3 \div 3,4 \times 10^3$	$1,9 \times 10^5 \div 2,0 \times 10^5$
<i>C. jejuni</i> 414/02	$<10 \div 1,2 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3 \div 2,2 \times 10^3$	$8,9 \times 10^4 \div 3,2 \times 10^5$
<i>C. jejuni</i> 414/05	$7,0 \times 10^1 \div 1,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3 \div 1,5 \times 10^3$	$9,1 \times 10^4 \div 1,6 \times 10^5$
<i>C. jejuni</i> 414/16	$8,0 \times 10^1 \div 1,0 \times 10^2$	$8,6 \times 10^2 \div 1,1 \times 10^3$	$5,7 \times 10^4 \div 2,1 \times 10^5$



Rys. 1. Ocena adhezji bakterii na powierzchni polipropylenu w zależności od gatunku *Campylobacter* spp. metodą hodowlaną

Zmodyfikowana jakościowa metoda Christensen'a detekcji biofilmu

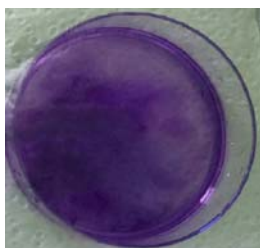
Zdolności adhezyjne *Campylobacter* spp. do powierzchni polipropylenu wizualizowano dzięki zmodyfikowanej metodzie Christensen'a. Polega ona na wiązaniu fioletu krystalicznego z negatywnie naładowanymi molekułami znajdującymi się na powierzchni komórek bakteryjnych oraz egzopolisacharydów tworzących biofilm [20, 27]. Barwienie fioletem krystalicznym wykazało, że wszystkie z analizowanych szczepów *Campylobacter* spp. były w stanie tworzyć biofilm w warunkach *in vitro*, jednak z różną intensywnością (rys. 2). Zastosowana metoda pozwala na ocenę zdolności tworzenia błony biologicznej na powierzchni abiotycznej przez bakterie. Ze względu na jej subiektywny charakter może być jedynie wykorzystywana jako screeningowa metoda selekcji szczepów o potencjalnych właściwościach adhezyjnych.



Wybarwiona płytka polipropylenu po 5 dniowej inkubacji z niezaszczepionym bakteriami *Campylobacter* spp. (jałowym) bulionem Brucella



Zdolności adhezyjne do powierzchni polipropylenu szczepu *C. coli* 414/18 po 120 h inkubacji



Zdolności adhezyjne do powierzchni polipropylenu szczepu *C. jejuni* 414/04 po 120 h inkubacji

Rys 2. Zmodyfikowana metoda wg Christensen'a i in. (1982) wizualizacji biofilmu przez bakterie *Campylobacter* spp.

Metoda spektrofotometryczna

Wyniki kinetyki tworzenia biofilmu przez *Campylobacter* spp. na powierzchni polipropylenu metodą spektrofotometryczną przedstawione zostały w tabeli 2.

Spektrofotometryczna metoda oceny biofilmu potwierdziła wyniki otrzymane metodą hodowlaną. Szczepy *C. jejuni* jak i *C. coli* były zdolne do tworzenia biofilmu na powierzchni abiotycznej. Izolaty *C. jejuni* lepiej adherowały do powierzchni abiotycznej niż *C. coli*. Absorbancja po 5 dniach inkubacji wynosiła od 1,2 dla szczepu *C. coli* 438/12 do 2,76 dla *C. jejuni* 414/04. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi [3, 18, 28, 29]. Z badań Brown i in. (2014) wynika, że szczepy *C. jejuni* i *C. coli* adherowały do powierzchni abiotycznych w bulionie Brucella zarówno w warunkach mikroaerofilnych jak i tlenowych. Właściwości adhezyjne bakterii były stymulowane dodatkiem posoki kurczaka [29].

Tabela 2. Kinetyka tworzenia biofilmu przez *Campylobacter* spp. metodą spektrofotometryczną

Szczep	Wartość ODC _{595 nm}		
	po 24 h	po 72 h	po 120 h
<i>C. coli</i> 438/06	0,23 ÷ 0,28	0,59 ÷ 1,33	2,18 ÷ 2,38
<i>C. coli</i> 438/12	0,33 ÷ 0,45	0,89 ÷ 1,05	1,20 ÷ 1,62
<i>C. coli</i> 414/18	0,09 ÷ 0,17	0,52 ÷ 1,20	2,06 ÷ 2,21
<i>C. coli</i> 438/02	0,29 ÷ 0,34	0,81 ÷ 1,47	2,70 ÷ 2,72
<i>C. coli</i> 414/19	0,24 ÷ 0,38	0,57 ÷ 1,55	2,32 ÷ 2,73
<i>C. jejuni</i> 414/04	0,26 ÷ 0,37	1,21 ÷ 1,41	2,62 ÷ 2,76
<i>C. jejuni</i> 414/06	0,28 ÷ 0,34	0,78 ÷ 1,28	2,43 ÷ 2,70
<i>C. jejuni</i> 414/02	0,20 ÷ 0,35	0,46 ÷ 1,45	2,17 ÷ 2,22
<i>C. jejuni</i> 414/05	0,41 ÷ 0,54	0,78 ÷ 1,28	2,40 ÷ 2,51
<i>C. jejuni</i> 414/16	0,27 ÷ 0,35	0,46 ÷ 1,45	2,02 ÷ 2,38

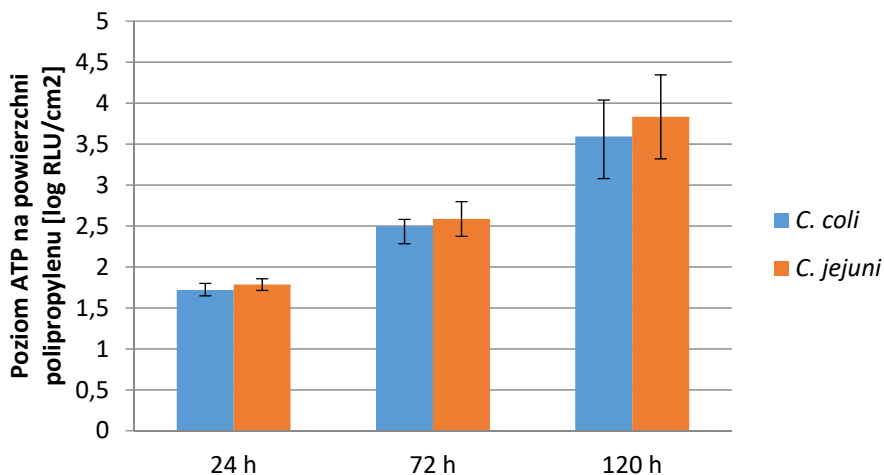
Doświadczenia Kim i in. (2017) wykazały, że po 3 dniach inkubacji w bulionie Mueller-Hinton bakterie *C. jejuni* i *C. coli* były zdolne tworzyć biofilm na polistyrenie, a wyniki absorpcji mierzone przy długości fali 590 nm wynosiły od 0,27±0,09 dla szczepu *C. jejuni* do 0,84±0,12 dla *C. coli* [3].

Metoda ATP luminescencji

Metoda ATP luminescencji oceny biofilmu dała równoważne wyniki do dwóch powyżej przedstawionych metod. Wyniki średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego kinetyki tworzenia się biofilmu przez *Campylobacter* spp. metodą ATP luminescencji przedstawione są w Tabeli 3. Zarówno szczepy *C. jejuni* jak i *C. coli* były zdolne do tworzenia biofilmu na powierzchni abiotycznej po 5 dniach inkubacji. ATP luminescencja po tym czasie wynosiła od 1550 RLU/cm² dla szczepu *C. coli* 438/06 do 26000 RLU/cm² dla *C. jejuni* 414/06. Poziom ATP powierzchni polipropylenowych, zawieszonych uprzednio w bulionie Brucella bez hodowli *Campylobacter* spp. wynosił: 19-25 RLU/cm². Szczepy *C. jejuni* lepiej adherowały do powierzchni abiotycznej niż *C. coli* (rys. 3). Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami eksperymentów innych uczonych [3, 28, 29].

Tabela 3. Dynamika wzrostu szczepów *Campylobacter* spp. na powierzchni abiotycznej metodą ATP luminescencji

Szczep	ATP bioluminescencja [RLU/cm ²]		
	po 24 h	po 72 h	po 120 h
<i>C. coli</i> 438/06	48,0 ± 11,3	270 ± 56,6	1550 ± 70,7
<i>C. coli</i> 438/12	59,5 ± 20,5	280 ± 14,1	2450 ± 212,1
<i>C. coli</i> 414/18	47,0 ± 26,9	325 ± 35,4	1900 ± 141,4
<i>C. coli</i> 438/02	48,5 ± 6,4	435 ± 21,2	7200 ± 282,8
<i>C. coli</i> 414/19	70,0 ± 18,4	285 ± 35,4	17500 ± 707,1
<i>C. jejuni</i> 414/04	54,5 ± 26,2	595 ± 106,1	18500 ± 707,1
<i>C. jejuni</i> 414/06	96,0 ± 76,4	640 ± 113,1	26000 ± 1414,2
<i>C. jejuni</i> 414/02	60,5 ± 24,8	395 ± 77,8	6650 ± 212,1
<i>C. jejuni</i> 414/05	66,0 ± 29,7	290 ± 28,3	1800 ± 424,3
<i>C. jejuni</i> 414/16	57,0 ± 5,7	200 ± 28,3	2550 ± 353,3



Rys. 3. Ocena adhezji bakterii na powierzchni polipropylenu w zależności od gatunku *Campylobacter* spp. metodą ATP luminescencji

4. Podsumowanie

1. Badane szczepy *Campylobacter* spp. adherowały do powierzchni abiotycznej polipropylenu, co potwierdzono trzema metodami.
2. Szczepy *Campylobacter* z gatunku *jejuni* wykazywały lepszą adherencję do powierzchni abiotycznej niż szczepy z gatunku *coli*.
3. Metoda ATP bioluminescencji może być stosowana jako test oceniający żywotność bakterii na różnych typach powierzchni abiotycznych w czystych hodowlach bakteryjnych.

Projekt został sfinansowany ze środków tematu badawczego: „Zdolności adhezyjne szczepów *Campylobacter* spp. wyizolowanych z mięsa drobiowego”. Badania statutowe Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego Zakładu Jakości Żywności Pracowni Mikrobiologii w Łodzi nr tematu: 500-01-ZJ-01.

Literatura

- [1] Epps S.V.R., Harvey R.B., Hume M.E., Phillips T.D., Anderson R.C., Nisbet D.J.: Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. International Journal of Environmental Research of Public Health, 10(12), (2013), 6292-6304.
- [2] Gözl G., Rosner B., Hofreuter D., Josenhans C., Kreienbrock L., Löwenstein A., Schielke A., Stark K., Sauerbaum S., Wieler L., Alter T.: Relevance of *Campylobacter* to public health—the need for a one health approach. International Journal of Medical Microbiology, 304, (2014), 817-823.
- [3] Kim, S.-H., Park, C., Lee, E.-J., Bang, W.-S., Kim, Y.-J., and Kim, J.-S.: Biofilm formation of *Campylobacter* strains isolated from raw chickens and its reduction with DNase I treatment. Food Control, 71, (2017), 94-100.
- [4] Josefsen M.H., Bhunia A.K., Engvall O.E., Fachmann M.S.R., Hoorfar J.: Monitoring *Campylobacter* in the poultry production chain- from culture to genes and beyond. Journal of Microbiology Methods, 112(5), (2015), 118-125.
- [5] Melo R.T., Nalevaiko P.C., Mendonça E.P., Borges L.W., Fonseca B.B., Beletti M.E., Rossi D.A.: *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans. Food Control, 33, (2013), 227-231.
- [6] Bolton D.J.: *Campylobacter* virulence and survival factors, Food Microbiology, 48(6), (2015), 99-108.
- [7] Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: A review. Frontiers in Microbiol.ogy 2, (2011), 1-12.
- [8] Szczepańska B., Andrzejewska M., Śpica D., Klawke J.: *Campylobacter* spp. – niedoceniany w Polsce czynnik etiologiczny zakażeń przewodu pokarmowego. Problemy Higieny i Epidemiologii 95(3), (2014), 574-579.
- [9] EFSA: The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA Journal, 11(4), (2013), 3129.
- [10] EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. EFSA Journal, 12(2), (2014), 3547.
- [11] EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal, 13(1), (2015), 3991.
- [12] EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal, 14(12), (2016), 4634.
- [13] EFSA The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal, 16 (12), (2018), 5500.
- [14] Gunther IV N. W., Chen C.-Y.: The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. Food Microbiology, 26, (2009), 44-51.
- [15] He Y., Chen C.-Y.: Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176. Food Microbiology, 27(4), (2010), 439-446.
- [16] Magajna B.A., Schraft H.: *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4°C more quickly than their planktonic counterparts. Food Control, 50, (2015), 45-50.
- [17] Reuter M., Mallett A., Pearson B. M., van Vliet A. H. M.: Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology, 76(7), (2010), 2122-2128.
- [18] Sulaeman S., Le Bihan G., Rossero A., Federighi M., De E., Tresse O.: Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test®. Journal of Applied Microbiology, 108, (2010), 1303-1312.

- [19] Królasik J., Szosland-Fałtyń A.: Higienizacja urządzeń oraz instalacji chłodniczych w aspekcie usuwania i zapobiegania rozwojowi biofilmów. *Chłodnictwo*, 47(11), (2012), 28-32.
- [20] Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H.: Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 37, (1982), 318-326.
- [21] Căpriță R., Căpriță A., Vintilăa T., Ilia G.: The ATP assay, a method for measuring biological activity in industrial water. *Revue Roumaine de Chimie*, 51(10), (2006), 1031-1036.
- [22] Costa P.D., Andrade N.J., Brandão S.C.C., Passos F.J.V., Soares N.F.F.: ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, (2006), 345-349.
- [23] Dostalek P., Branyik T.: Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry- a review. *Czech Journal of Food Science*, 23(3), (2005), 85-92.
- [24] Gutarowska B., Piotrowska M., Żakowska Z., Gwoździński K.: Analiza przydatności metod oznaczania adenozynotrifosforanu (ATP) bakterii na powierzchni bioaktywnych polimerów oraz mikroskopii fluorescencyjnej do oceny żywotności i adhezji. *Polimery*, 57(3), (2012), 236-245.
- [25] Yue W., Bai C.: Improved design of automatic luminometer for total bacteria number detection based on ATP- bioluminescence. *Journal of Food Safety*, 33, (2013), 1-7.
- [26] Ica T., Caner V., Istanbul O., Nguyen H.D., Ahmed B., Call D.R., Beyenal H.: Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, (2012), 1033-1038.
- [27] Teh A.H.T., Lee S.M., Dykes G. A.: Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? *Applied Environmental Microbiology*, 80, (2014), 5154-5160.
- [28] Brown H.L., Reuter M., Hanman K., Betts R.P., van Vliet A.H.M.: Prevention of biofilm formation and removal of existing biofilms by extracellular DNases of *Campylobacter jejuni*. *PLOS ONE*, 24, (2015), 1-21.
- [29] Brown H.L., Reuter M., Salata L.J., Crossa K.L., Betts R.P., van Vliet A.H.M.: Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Applied Environmental Microbiology*, 80(22), (2014), 7053-7060.

ADHESION ABILITY OF *CAMPYLOBACTER* SPP. STRAINS ISOLATED FROM POULTRY MEAT

Abstract: *In the presented work, the kinetics of biofilm formation by Campylobacter spp. strains on the abiotic surface, which was polypropylene plastic, were examined. Adhesion to the surface of polypropylene was examined by three techniques. The first one was the culture method, estimating the number of living bacterial cells on the microbial medium, combined with the modified Christensen quality method. The second spectrophotometric method using the relationship between the density of liquid culture and light intensity permeable through the test center. The last one ATP-bioluminescence, measuring cell metabolic activity by determining the microbial ATP content. Campylobacter jejuni and coli after 5 days of incubation, produced a biofilm on the average level of 4.8 ± 0.3 and $4.4 \pm 0.5 \log \text{cfu/cm}^2$, respectively. ATP bioluminescence after the same time was from 1550 RLU/cm^2 for the strain C. coli 438/06 to 26000 RLU/cm^2 for C. jejuni 414/06. It was shown that Campylobacter spp. strains after 5 days of cultivation in Brucella broth adhered to the polypropylene, regardless of the method used. Campylobacter jejuni strains were characterized by better adhesion to the abiotic surface than Campylobacter coli.*

Key words: biofilm; *Campylobacter* spp., poultry meat, abiotic surface, adhesion

OCENA ZDOLNOŚCI BAKTERII *LACTOBACILLUS* SPP. DO OGRANICZANIA WZROSTU OPORNEGO NA WANKOMYCYNĘ SZCZEPU *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATCC 51299 – BADANIA *IN VITRO*

Elżbieta KLEWICKA^{1*}, Robert KLEWICKI², Justyna WIECZOREK¹

¹*Institut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka w Łodzi*

²*Institut Technologii i Analizy Żywności, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka w Łodzi*

*elzbieta.klewicka@p.lodz.pl

Streszczenie: *W pracy przeprowadzono badania antagonistycznego oddziaływania 8 szczepów bakterii z rodzaju Lactobacillus: 3 kultury Lactobacillus brevis (oznaczone jako 0944, 0945, 0980), 3 szczepy Lactobacillus casei (oznaczone 0900, 0908, 0979) oraz jeden szczep Lactobacillus paracasei 0919 w stosunku do szczepów Enterococcus spp. Jako kontrolę pozytywną wybrano szczep Lactobacillus rhamnosus GG (kontrola pozytywna dla szczepów Lactobacillus spp.) oraz szczep Enterococcus faecalis ATCC 29212 (szczep wrażliwy na wankomycynę) jako kontrola dla szczepu badanego Enterococcus faecalis ATCC 51299. Wzrost obu szczepów Enterococcus był efektywnie hamowany przez badane bakterie z rodzaju Lactobacillus. Aktywność antagonistyczna badanych szczepów z rodzaju Lactobacillus była wyższa niż aktywność antagonistyczna szczepu Lactobacillus rhamnosus GG. W hodowli wspólnej obniżenie liczebności komórek bakterii Enterococcus faecalis ATCC 51299 stwierdzono po hodowli z Lactobacillus brevis 0980 oraz Lactobacillus brevis 0945. Po 48 godzinach liczebność enterokoków w obecności wymienionych szczepów wnosila 2.4 log jtk/ml i była niższa od liczebności enterokoków zdolnych do wzrostu w obecności Lactobacillus rhamnosus GG.*

Słowa kluczowe: *Lactobacillus, Enterococcus, aktywność antagonistyczna, oporność na wankomycynę*

1. Wprowadzenie

Do rodzaju *Enterococcus* zaliczamy Gram-dodatnie, katalazo-ujemne, nie przetrwalnikujące, fakultatywnie beztlenowe bakterie, które mogą występować zarówno jako pojedyncze ziarniaki, jak i w układach tworzących łańcuszki [3]. Bakterie *Enterococcus* spp. są komensalną mikroflorą przewodu pokarmowego człowieka i zwierząt. Bakterie te, oprócz przewodu pokarmowego ssaków, mogą występować w warzywach korzeniowych i liściastych. Bakterie *Enterococcus* spp. są ważnym elementem wskaźnikowym w ocenie sanitarnej zanieczyszczenia wód [2]. W czasie ostatnich 10-15 lat obserwuje się szybki wzrost (około 20-krotnie) częstości występowania enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) [9, 15, 17]. Oporność szczepów *Enterococcus* spp. na antybiotyki jest

dość dobrze udokumentowana. Bakterie te mogą wykazywać oporność na glikopeptydy, takie jak wankomycyna i teikoplanina oraz amnioglikozydy [3, 4]. Do dnia dzisiejszego zidentyfikowano sześć genów związanych z opornością na glikopeptydy u gatunków *Enterococcus*: od vanA do vanG [3]. Trzy główne typy oporności to te, które są zakodowane przez klastry vanC, vanA i vanB. Wewnętrzna oporność na antybiotyki zakodowana przez klaser vanC jest specyficzna dla gatunków *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* i *E. flavescens*. Operon vanC jest zlokalizowany na chromosomie i nie można go przenieść [3]. Dwa najbardziej rozpowszechnione gatunki, *E. faecalis* i *E. faecium*, mogą zawierać geny vanA i vanB, które kodują oporność na wankomycynę i przyczyniają się do rozwoju trwałych, zakaźnych zakażeń szpitalnych [8, 9, 12]. Enterokoki odporne na wankomycynę są w stanie przekazywać cechę oporności innym mikroorganizmom. W tej sytuacji leczenie zakażeń klinicznych jest niezwykle trudne i wymaga wdrożenia procedur określających punkty krytyczne transferu zakażenia jak i wdrożenia środków prewencyjnych [9].

Obiecujące są badania nad ograniczaniem wzrostu bakterii VRE przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* [9, 10, 14]. Prawie wszystkie szczepy bakterii fermentacji mlekowej należące do rodzaju *Lactobacillus* są odporne na wankomycynę [5, 6]. Oporność glikopeptydowa u szczepów *Lactobacillus* spp. jest uważana za naturalną cechę niektórych gatunków np. *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*. W badaniach przeprowadzonych dla szczepów *Lb. rhamnosus* wykazano, że oporność na glikopeptydy tych bakterii opiera się na elementach genetycznych różniących się od tych, które wytwarzają oporność na glikopeptydy u enterokoków [5, 6, 13].

Celem badań była ocena zdolności szczepów *Lactobacillus* spp. izolowanych ze środowiska żywności fermentowanej i kału ludzkiego do ograniczenia wzrostu bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 opornych na wankomycynę.

2. Metodyka, założenia badawcze

Mikroorganizmy

Materiał biologiczny stanowiło 8 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* spp., w tym 3 kultury *Lactobacillus brevis* (oznaczone jako 0944, 0945, 0980 izolaty ze środowiska roślinnego), 3 kultury *Lactobacillus casei* (oznaczone: 0900, 0908 – jelitowe izolaty, 0979 – izolat z żywności fermentowanej) i jeden szczep *Lactobacillus paracasei* 0919 (izolat jelitowy). Szczepy zostały zdeponowane w Kolekcji Czystych Kultur Przemysłowych ŁOCK 105, w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii. Jako kontrolę w badaniach dla szczepów *Lactobacillus* spp. zastosowano szczep *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103). W badaniach nad antagonizmem jako szczep testowy zastosowano szczep odporny na wankomycynę *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 dla którego jako kontrolę zastosowano szczep wrażliwy na wankomycynę *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Aktywność antagonistyczna bakterii Lactobacillus spp. w stosunku do szczepów Enterococcus faecalis.

Aktywność antagonistyczną bakterii *Lactobacillus* spp. określono metodą słupkową na podłożu Mueller Hinton Agar (Oxoid) [7]. Metoda ta opiera się na obserwacji równoległego wzrostu badanych szczepów (wskaźnikowych i antagonistycznych). Bakterie *Lactobacillus* spp. hodowano na płytkach petriego w podłożu stałym (10 ml podłoża MRS Agar zaszczeplonym bakteriami tak aby gęstość bakterii odpowiadała 10^9 jtk/ml i inkubowano w 30°C szczepy *Lactobacillus brevis* w warunkach tlenowych a pozostałe w 37°C w atmosferze CO₂ 5% (v/v) przez 24 godziny. Z tak uzyskanych „murawek” wycinano słupki o średnicy 10 mm i umieszczano na płytkach z podłożem Mueller Hinton Agar zaszczeplonym szczepem wskaźnikowym *Enterococcus faecalis* 10^5 - 10^6 jtk/ml). Po 18 godzinach inkubacji mierzono średnice stref zahamowania wzrostu wokół słupków agarowych. Wyniki podano w mm, po odjęciu średnicy słupka. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Wyniki wyrażono jako wartości średnie uwzględniając odchylenie standardowe. Dla uzyskanych wyników przeprowadzono analizę wariancji jednoczynnikowej ANOVA przy poziomie istotności $P \leq 0,05$.

Dynamika ograniczania wzrostu bakterii Enterococcus faecalis w hodowli wspólnej z bakteriami Lactobacillus spp.

Dynamikę ograniczania wzrostu bakterii *Enterococcus faecalis* przez bakterie *Lactobacillus* spp. wyznaczono stosując metodę hodowli wspólnej. W tym celu do płynnego podłoża MRS wprowadzono bakterie *Lactobacillus* spp. i *Enterococcus faecalis* (24 godzinne hodowle, zawieszono w soli fizjologicznej) tak aby uzyskać gęstość 10^9 jtk/ml każdego mikroorganizmu w zawiesinie hodowlanej. Hodowle wspólną inkubowano w warunkach optymalnych dla szczepów *Enterococcus faecalis* (37°C, warunki tlenowe) przez 48 godzin. Liczebność bakterii *Enterococcus faecalis* oznaczano metodą płytkową, stosując podłoże selektywne Bile Aesculin Agar (Oxoid) po 6, 16, 24, 48 godzinach inkubacji. Po zadanym czasie inkubacji zliczano kolonie o czarnym zabarwieniu. Wyniki przedstawiano jako log jtk/ml. Dla uzyskanych danych przeprowadzono analizę wariancji jednoczynnikowej ANOVA przy poziomie istotności $P \leq 0,05$.

3. Wyniki i dyskusja

W badaniach określono aktywność antagonistyczną szczepów bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* pochodzących ze środowiska fermentowanej żywności roślinnej – szczepy oznaczone: 0944, 0945, 0979, 0980) oraz szczepy bakterii mlekowych izolowane z przewodu pokarmowego dzieci (0900, 0908, 0919) w stosunku do szczepów *Enterococcus faecalis*. Do badań wybrano dwa szczepy *Enterococcus faecalis*: szczep oznaczony ATCC 51299 charakteryzujący się opornością w stosunku do aminoglikozydów i wankomycyny. Drugi szczep *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 jest szczepem wrażliwym na

wymienione antybiotyki. Zastosowane w badaniach szczepy bakterii mlekowych zostały wyselekcjonowane po przeprowadzeniu charakterystyki cech probiotycznych. Jedną z takich cech jest aktywność antagonistyczna. Badane szczepy charakteryzują się wysoką aktywnością antagonistyczną w stosunku do testowych szczepów *Enterococcus faecalis*. Wzrost obu szczepów testowych był efektywnie ograniczany przez badane bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (tabela 1). Aktywność antagonistyczna badanych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* była wyższa niż aktywność antagonistyczna szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Dynamikę zahamowania wzrostu bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 i ATCC 29212 przeprowadzono w hodowli wspólnej z bakteriami z rodzaju *Lactobacillus*. Szczep *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (VRE) wykazywał wysoką tolerancję na obecność 5 z zastosowanych szczepów *Lactobacillus*: 0919, 0908, 0900, 0979, 0944. Po 48 godzinach inkubacji bakterii VRE z bakteriami *Lactobacillus* sp. liczebność wynosiła od 6.1 log jtk/ml do 7.7 log jtk/ml (dla *Lactobacillus rhamnosus* GG – 4.5 log jtk/ml) (wykres 1).

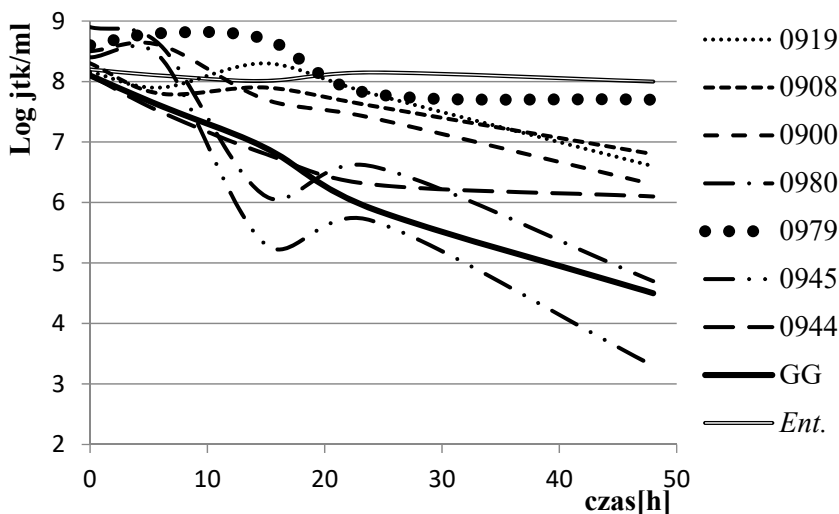
Tabela 1. Aktywność antagonistyczna szczepów *Lactobacillus* spp. w stosunku do *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (VRE) i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (szczep wrażliwy na wankomycynę).

Szczep antagonistyczny	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	ATCC 51299	ATCC 29212
	Strefa zahamowania wzrostu [mm]	
<i>Lb. brevis</i> 0944	25.7 ± 0.6 ^{ac}	24.7 ± 0.6 ^b
<i>Lb. brevis</i> 0945	25.0 ± 0.5 ^{ac}	23.7 ± 1.5 ^b
<i>Lb. casei</i> 0979	26.0 ± 0.8 ^{bc}	23.0 ± 0.6 ^b
<i>Lb. brevis</i> 0980	25.0 ± 0.7 ^{bc}	30.0 ± 0.9 ^c
<i>Lb. casei</i> 0900	38.0 ± 1.2 ^d	30.0 ± 0.5 ^c
<i>Lb. casei</i> 0908	26.0 ± 0.8 ^{bc}	24.7 ± 0.6 ^b
<i>Lb. paracasei</i> 0919	26.3 ± 1.5 ^{bc}	24.7 ± 0.6 ^b
<i>Lb. rhamnosus</i> GG (control)	22.3 ± 7.2 ^a	20.5 ± 5.4 ^a

^{a,b,c,d} różnice statystyczne (ANOVA, $P \leq 0,05$).

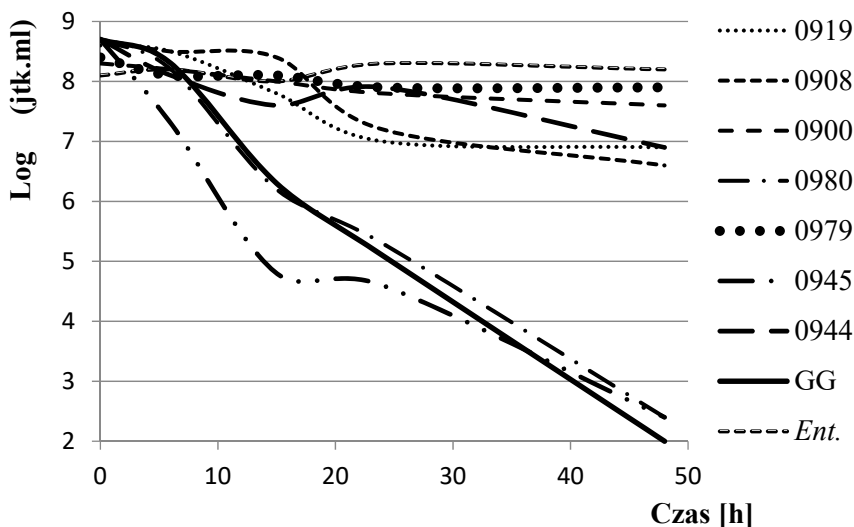
Dwa z zastosowanych do badań szczepów z rodzaju *Lactobacillus*: 0945 oraz 0980 powodowały znaczne obniżenie liczebności populacji komórek VRE odpowiednio do poziomu 3.3 log jtk/ml ($P = 0,0012$) i 4.4 log jtk/ml ($P = 0,008$). Obydwa szczepy należą do gatunku *Lactobacillus brevis* i zostały wyizolowane z kiszonek roślinnych. Zdolność do ograniczania wzrostu bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 przez szczepy *Lactobacillus* oznaczone symbolami 0945 i 0980 była porównywalna z właściwościami w tym obszarze ze szczepem *Lactobacillus rhamnosus* GG. W przypadku szczepu testowego *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (szczep wrażliwy na wankomycynę) zaobserwowano podobną dynamikę zahamowania wzrostu przez bakterie *Lactobacillus* jak poprzednio. W obecności szczepu kontrolnego *Lactobacillus rhamnosus* GG wzrost *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 po 48 godzinach obniżył się z 8.3 log jtk/ml do 2.0 log jtk/ml ($P = 0,006$) (wykres 2). Dla szczepów *Lactobacillus*

oznaczonych symbolami: 0919, 0908, 0900, 0979, 0944 gęstość komórek *Enterococcus faecalis* wynosiła odpowiednio: 6.9 log jtk/ml, 6.6 log jtk/ml, 7.8 log jtk/ml, 7.9 log jtk/ml, 6.9 log jtk/ml. Znaczne obniżenie liczebności komórek bakterii *Enterococcus faecalis* stwierdzono po hodowli z bakteriami *Lactobacillus brevis* 0980 oraz *Lactobacillus brevis* 0945. Po 48 godzinach liczebność enterokoków w obecności wymienionych szczepów wnosila 2.4 log jtk/ml ($P = 0,0021$) i była niższa lub porównywalna z liczebnością enterokoków rosnących w obecności *Lactobacillus rhamnosus* GG.



Wykres. 1. Dynamika zahamowania wzrostu *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 w hodowli wspólnej z bakteriami *Lactobacillus* spp.

W literaturze opisane są mechanizmy aktywności antagonistycznej bakterii *Lactobacillus* spp. wobec bakterii patogennych. Mechanizmy te obejmują produkcję niskocząsteczkowych kwasów organicznych, niezdysonowanych cząsteczek organicznych i bakteriocyn oraz konkurencję o receptorowe miejsca adhezji czy koagregację z patogenami [1, 7, 16]. W klasycznych testach antagonistycznych obserwujemy strefę zahamowania (wyrażoną w mm) wzrostu szczepu testowego przez szczep antagonistyczny. Taki test nie daje nam odpowiedzi czy obserwowana strefa zahamowania wzrostu szczepu testowego jest wynikiem efektu bakteriostatycznego czy bakteriobójczego.



Wykres. 2. Dynamika zahamowania wzrostu *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 w hodowli wspólnej z bakteriami *Lactobacillus* spp.

W prezentowanych badaniach w teście statycznym (metoda słupkowa) antagonizmu między szczepówego obserwujemy zdolność do ograniczania wzrostu szczepów *Enterococcus faecalis* przez wszystkie zastosowane szczepy *Lactobacillus* sp. Po przeprowadzeniu badań w układzie dynamicznym czyli hodowla wspólna szczepu testowego z antagonistycznym stwierdzono, że zaledwie dwa szczepy badane: *Lactobacillus brevis* 0945 i 0980 oraz szczep kontrolny *Lactobacillus rhamnosus* GG są zdolne ograniczania liczebności bakterii *Enterococcus faecalis*. Szczepy te nie tylko ograniczają wzrost bakterii *Enterococcus* ale również powodują obniżanie liczebności tych bakterii zatem możemy mówić o efekcie bakteriobójczym porównywalnym z efektem uzyskanym dla szczepu kontrolnego *Lactobacillus rhamnosus* GG. Badania przeprowadzone przez Manleya i in. [9] na modelach mysich sugerują, że podawanie probiotyku – *Lactobacillus rhamnosus* GG poprawia równowagę mikrobiologiczną jelit i że probiotyk może być interesującym środkiem do zwalczania lub zapobiegania opornych na wankomycynę szczepów *Enterococcus* spp. Podobne wyniki uzyskali Szchta i in. (2011) [10]. Grupa ta potwierdziła hipotezę, że suplementacja bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* GG czasowo eliminuje bakterie odporne na wankomycynę i zwiększa populację bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w przewodzie pokarmowym dzieci. W prezentowanych badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* wykazano, zdolność ograniczania wzrostu szczepów *Enterococcus faecalis* przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* oraz wyselekcjonowano dwa szczególnie aktywne szczepy *Lactobacillus brevis* oznaczone symbolami 0945 i 0980.

4. Podsumowanie

Szczególnie istotne wydaje się poszukiwanie nowych szczepów *Lactobacillus* spp. o zdolności ograniczania namnażania i eliminowania ze środowiska wankomycynoopornych enterokoków. Szczepy *Lactobacillus brevis* 0945 i 0980 charakteryzują porównywalnym potencjałem antagonistycznym jak *Lactobacillus rhamnosus* GG. Ponadto, szczepy te ze względu na swoje pochodzenie (kiszonki roślinne) mogą być zastosowane do wytwarzania żywności funkcjonalnej. Spożywanie takiej żywności mogłoby przyczynić się do ograniczenia i eliminacji wankomycynoopornych bakterii *Enterococcus* z żywności a w konsekwencji nawet z przewodu pokarmowego człowieka. W dalszych badaniach planuje się przeprowadzenie charakterystyki genomu szczepów *Lactobacillus brevis* 0945 i 0980 pod kontem umiejscowienia genów antybiotykooporności.

Literatura

- [1] Chen X.Y., Shuai J.B., Chen J.S., Zhang Z.F., Fang W.H.: The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* 115, (2007), 307-312.
- [2] EU-Bathing Water Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC; 2006.
- [3] Fisher K., Phillips C.: The ecology, epidemiology, and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, (2009), 1749-1757.
- [4] Kacmaz B., Aksoy A.: Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25, (2005), 535-538.
- [5] Klein G., Hallmann C., Casas I.A., Abad J., Louwers J., Reuter G.: Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied of Microbiology* 89, (2000), 815-824.
- [6] Klein G., Pack A., Reuter G.: Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Applied Environmental of Microbiology* 64, (1998), 1825-1830.
- [7] Klewicka E., Libudzisz Z.: Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteria towards selected food-contaminating bacteria. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 13/15 (2), (2004) 169-174.
- [8] Linares D.M., Kok J., Poolman B.: Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. *Journal of Bacteriology* 192, (2010), 5806-5812.
- [9] Manley K.J., Fraenkel M.B., Mayall B.C., Power D.A.: Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomized controlled trial. *Medical Journal of Australia* 186, (2007) 454-457.
- [10] Szachta P., Ignýs I., Cichy W.: An evaluation of the ability of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG to eliminate gastrointestinal carrier state of vancomycin-resistant enterococci in colonized children. *Journal of Clinical Gastroenterology* 10, (2011), 872-877.
- [11] Tjalsma H., Antelmann H., Jongbloed J.D.H., Braun P.G., Darmon E., Dorenbos R., Dubois J.-Y.F., Westers H., Zanen G., Quax W.J., Kuipers O.P., Born S., Hecker M., Dijk J.M.: Proteomics secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "secrets" of the secretome. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 68, (2004), 207-233.

- [12] Tonover F.C., McDonald L.C.: Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Current Opinion in Infectious Diseases* 18, (2005), 300-305.
- [13] Tynkynnen, S., Singh, D.V. and Varmanen, P.: Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *International Journal of Food Microbiology* 41, (1998), 195-204.
- [14] Vidal M., Forestier C., Charbonnel N., Henard S., Rabaud C. Lesens O.: Probiotics and intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in the mice and human. *Journal of Clinical Microbiology* 7, (2010), 2595-2598.
- [15] Willems R.J., Top J., van Santen M., Robinson A., Coque T.M., Baquero F., Grundmann H., Bonten M.J.M.: Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerging Infectious Diseases* 11, (2005), 821-828.
- [16] Zhang Y., Zhang L., Du M., Yi H., Guo C., Tuo Y., Han X., Li J., Zhang L., Yang L.: Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological Research* 167, (2011), 27-31.
- [17] Zirakzadeh A., Patel R.: Epidemiology and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Current Opinion in Infectious Diseases* 18, (2005) 507-512.

ASSESSMENT OF CAPACITY *LACTOBACILLUS* SPP. TO LIMIT THE GROWTH OF VANCOMYCIN RESISTANT *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATCC 51299 STRAIN – *IN VITRO* RESEARCH

Abstract: *The study investigated the antagonistic activity of 8 strains of the Lactobacillus genus: 3 cultures of Lactobacillus brevis (designated as 0944, 0945, 0980), 3 strains of Lactobacillus casei (labeled 0900, 0908, 0979) and one strain of Lactobacillus paracasei 0919 towards Enterococcus spp. Lactobacillus rhamnosus GG strain (positive control for Lactobacillus spp. strains) and the Enterococcus faecalis ATCC 29212 strains (vancomycin sensitive strain) were selected as positive control for the test strain Enterococcus faecalis ATCC 51299. Growth of both Enterococcus strains was effectively inhibited by the tested Lactobacillus bacteria. The antagonistic activity of the tested strains of the Lactobacillus genus was higher than the antagonistic activity of the Lactobacillus rhamnosus GG strain. In a common culture, the decrease in bacterial counts of Enterococcus faecalis ATCC 51299 was found after cultivation with Lactobacillus brevis 0980 and Lactobacillus brevis 0945. After 48 hours, the number of enterococci in the presence of the mentioned strains was 2.4 log cfu/ml and was lower than the number of enterococci capable of growing in the presence of Lactobacillus rhamnosus GG.*

Key words: *Lactobacillus, Enterococcus, antagonistic activity, vancomycin resistance*

WPLYW NOWO OPRACOWANYCH PREPARATÓW SYNBIOTYCZNYCH NA GENOTOKSYCZNOŚĆ WODY KAŁOWEJ PROSIĄT

Agnieszka CHLEBICZ*, Adriana NOWAK, Katarzyna ŚLIŻEWSKA

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, Łódź

*agnieszka.chlebicz@edu.p.lodz.pl

Streszczenie: *Preparaty synbiotyczne stanowią połączenie żywych mikroorganizmów określanych mianem probiotyków oraz substancji prebiotycznych i wykazują pozytywny wpływ na zdrowie gospodarza poprzez modulację mikrobioty oraz jej aktywności. Ograniczanie genotoksycznego działania mikrobioty jelitowej prosiąt, może być jednym z korzystnych efektów stosowania preparatów synbiotycznych wraz z paszą i stanowiło przedmiot przeprowadzonych badań. Materiał do analizy stanowił kał prosiąt w 7 oraz 28 dniu życia, jak również po odsadzeniu od loch w 35 i 66 dniu życia. Wodę kałową poddano analizie z wykorzystaniem testu kometowego. Genotoksyczność wody kałowej prosiąt po 7 dniach życia wahała się w zakresie od 5,80% do 8,86% i po odsadzeniu prosiąt od loch karmiących wzrosła nawet do poziomu 15,41% (35 dzień życia). Nowo opracowane synbiotyki obniżały genotoksyczność wody kałowej warchlaków (pomiędzy 35 a 66 dniem życia) z efektywnością mieszczącą się w granicach 16,55-40,80%. Stwierdzono, iż bezpośrednie przyjmowanie preparatów synbiotycznych wpływa korzystnie na ich zdolność do obniżania genotoksyczności wody kałowej. Zaobserwowano ponadto, iż efektywność preparatów zależała od składu preparatu synbiotycznego, przy czym najwyższa zdolność do redukcji genotoksycznego działania wody kałowej wykazywały synbiotyki A oraz C.*

Słowa kluczowe: synbiotyki, prosięta, genotoksyczność

1. Wprowadzenie

Mikrobiota układu pokarmowego ssaków jest złożonym ekosystemem, który może składać się nawet z 10^{14} komórek w 1 g treści jelitowej i jest postrzegany jako aktywny metabolicznie organ [1]. U zwierząt, w tym u trzody chlewnej, mikrobiota jelitowa pełni wiele funkcji, spośród których ważne jest wspomaganie procesów fizjologicznych, immunologicznych oraz trawiennych. Ponadto, drobnoustroje kolonizujące przewód pokarmowy, stanowią swoistą barierę przed patogenami, jak również odpowiadają za pobieranie, akumulowanie oraz rozkład energii pobranej z pokarmu [2,3]. Jednakże, dysbioza mikrobioty jelitowej może skutkować obniżeniem antagonistycznego działania w stosunku do mikroorganizmów patogennych, ograniczeniem zdolności do trawienia pokarmów,

a co z tym związane, do limitacji adsorpcji składników pokarmowych [4]. Drobnoustroje kolonizujące jelita mogą mieć ponadto wpływ na mutagenność i genotoksyczność treści jelitowej oraz kałowej [5]. W wyniku aktywności metabolicznej mikroorganizmów jelitowych mogą powstawać związki o potencjale kancerogennym, spośród których w kale wykrywane są związki N-nitrozowe, heterocykliczne aminy aromatyczne, policykliczne węglowodory aromatyczne, fekapentaeny, czy też kwasy żółciowe. Metabolity te mogą prowadzić do uszkodzeń DNA, a w konsekwencji przyczyniać się do rozwoju chorób [5,6]. Substancje kancerogenne mogą być również wprowadzane do organizmu zwierząt wraz z paszą [7].

W celu zapobiegania infekcjom powodowanym przez bakterie patogenne, ale również dla poprawy wzrostu, antybiotyki są stosowane w żywieniu zwierząt hodowlanych [8,9]. Ich nadużywanie stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi, ze względu na nabywanie antybiotykoodporności przez patogeny, które następnie mogą dostawać się do łańcucha produkcji żywności, a w konsekwencji przekazywać geny oporności drobnoustrojom patogennym dla człowieka [4,10]. W krajach członkowskich Unii Europejskiej od 1 stycznia 2006 roku został wprowadzony zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu na mocy Rozporządzenia (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady, natomiast w 2007 roku Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization, WHO) zarekomendowała ograniczenie stosowania antybiotyków jedynie do leczenia zwierząt [11,12]. Pomimo podjętych kroków i wprowadzenia zakazów legislacyjnych, chemioterapeutyki są wciąż stosowane w żywieniu zwierząt hodowlanych, jako stymulatory wzrostu, w niektórych częściach świata [12,13]. W poszukiwaniu alternatywnych rozwiązań, coraz częściej stosowane są pro-, pre- oraz synbiotyki [13].

W 1995 roku Gibson i Roberfroid przedstawili koncepcję synbiotyku, jako kombinacji pro- oraz prebiotyku, która może poprawiać przeżywalność pasażu jelitowego żywych mikroorganizmów stosowanych, jako dodatki do żywności, a tym samym wykazywać pozytywny wpływ na zdrowie gospodarza [14]. Probiotyki są definiowane, jako „żywe mikroorganizmy, które podawane w odpowiedniej dawce oddziałują pozytywnie na zdrowie gospodarza”, co zostało potwierdzone przez Międzynarodowe Towarzystwo Naukowe do spraw Probiotyków i Prebiotyków (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP) [15,16]. Mianem prebiotyków określa się natomiast składniki pokarmowe, które wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza poprzez modulację mikrobioty jelitowej [17].

Synbiotyki nie tylko poprawiają przeżywalność, czy też stymulują funkcjonalność probiotyków, ale wpływają korzystnie na właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz adhezję mikroorganizmów probiotycznych [18]. Połączenie korzystnych mikroorganizmów ze składnikiem prebiotycznym wywołuje również pozytywny efekt na przyrost masy zwierząt hodowlanych, poprawę konwersji paszy, zwiększenie aktywności enzymów trawiennych i adsorpcji minerałów, stymuluje układ immunologiczny oraz przeciwdziała występowaniu biegunek [19]. Ponadto, synbiotyki mogą wpływać na strukturę

tkanek, zmiany molekularne w śledzionie i wątrobie, jak również oddziaływać na aktywność mikroflory jelitowej [20]. Pro- oraz prebiotyki mogą przyczyniać się także do redukcji sekrecji związków genotoksycznych oraz kancerogennych, jak również ograniczać aktywność enzymatyczną drobnoustrojów, która może prowadzić do tworzenia tych substancji, w tym działanie β -glukuronidazy, nitroreduktazy, czy też azoreduktazy [21,22].

Celem badań było określenie wpływu nowo opracowanych preparatów synbiotycznych, zawierających inulinę jako prebiotyk oraz wyselekcjonowane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, na genotoksyczność wody kałowej prosiąt.

2. Materiały i metodyka

Preparaty

Preparaty synbiotyczne opracowano w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii (ITFiM), Politechniki Łódzkiej. Wszystkie szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wykorzystane w nowo opracowanych synbiotykach stanowią przedmiot zgłoszenia patentowego [23]. Efekt wywołany przez synbiotyki był porównany z działaniem handlowo dostępnych probiotyków – BioPlus 2B[®] oraz Cylactin[®]LBC. Skład preparatów zastosowanych, jako dodatki paszowe, przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład preparatów synbiotycznych oraz probiotycznych użytych w badaniach

Nazwa preparatu	Mikroorganizmy probiotyczne	Substancja prebiotyczna
Synbiotyki A	<i>Lactobacillus pentosus</i> ŁOCK 1094 <i>Lactobacillus plantarum</i> ŁOCK 0860 <i>Lactobacillus reuteri</i> ŁOCK 1092 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ŁOCK 0119	Inulina
Synbiotyki B	<i>Lactobacillus pentosus</i> ŁOCK 1094 <i>Lactobacillus plantarum</i> ŁOCK 0860 <i>Lactobacillus reuteri</i> ŁOCK 1092 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ŁOCK 1087 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ŁOCK 0119	
Synbiotyki C	<i>Lactobacillus paracasei</i> ŁOCK 1091 <i>Lactobacillus pentosus</i> ŁOCK 1094 <i>Lactobacillus plantarum</i> ŁOCK 0860 <i>Lactobacillus reuteri</i> ŁOCK 1092 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ŁOCK 1087 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ŁOCK 0119	
BioPlus 2B [®]	<i>Bacillus subtilis</i> CH201/DSM5749, <i>Bacillus licheniformis</i> CH200/DSM574	nie dotyczy
Cylactin [®] LBC	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	

Hodowla zwierząt

Lochy rasy Denbred hodowano na farmie pod nadzorem Państwowego Instytutu Weterynaryjnego–Państwowego Instytutu Badawczego (PIWet PIB) w Puławach. Produkcja była prowadzona w trybie „all-in/all-out”. Lochy podzielono na 6 grup, ze względu na podawane dodatki paszowe lub ich brak. Synbiotyki A, B oraz C podawano wraz z paszą (tabela 2) zwierzętom należącym do grup A, B lub C. Lochy należące do grup D oraz E, otrzymywały odpowiednio probiotyk BioPlus 2B[®] lub Cylactin®LBC. Preparaty synbiotyczny oraz probiotyczne podawano wraz z paszą w ilości 0,5 kg/tonę paszy. Pasza podawana zwierzętom grupy K nie była suplementowana.

Podawanie synbiotyków oraz probiotyków rozpoczęto 10 dni przed oproszeniem loch i kontynuowano po urodzeniu prosiąt. Młode były karmione przez matki, a w 29 dniu życia prosięta odstawiono od loch i rozpoczęto ich karmienie paszą wraz z odpowiednimi dodatkami paszowymi. Na tym etapie hodowli młode określano mianem warchlaków. Materiał biologiczny, który stanowił kał prosiąt lub warchlaków (prosięta po odstawieniu) pobrano w 7, 28, 35 oraz 66 dniu życia.

Badania zostały zaakceptowane przez II Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie.

Tabela 2. Składniki oraz skład chemiczny pasz

Składniki [g/kg]	Lochy	Prosięta
Owies	100	-
Jęczmień	250	220
Pszonżyto	110	-
Pszenica	362	300
Mączka sojowa	90	50
Olej sojowy	10	20
Mączka sojowa poekstrakcyjna poddana obróbce cieplnej	-	25
Pełnotłusta soja poddana obróbce cieplnej	-	50
Mączka sojowa HP + mączka rybna	40	-
Permeat serwatki	-	50
LanoFish ^a	-	50
Specilac ^b	-	40
Lonacid Max ^c	-	5
LonoGrain ^d	-	150
Fosforan wapnia	2	-
Premix witaminowo-mineralno-aminokwasowy ¹	36	40
Skład chemiczny		
Energia metaboliczna (MJ/kg)	13,1	13,8
Białko surowe (%)	16,5	18,8
Lizyna (%)	0,88	1,56
Metionina + Cysteina (%)	0,59	0,82
Treonina (%)	0,58	0,87
Tryptofan (%)	0,20	0,30

Walina (%)	0,76	0,75
Wapń (%)	1,03	0,91
Fosfor (%)	0,47	0,61
Witamina A (IU/ kg)	12 500	14 000
Witamina D ₃ (IU/kg)	2 000	2 000
Witamina E (mg/kg)	80,0	84,0

¹ mieszanka uzupełniająca (4%), Cargill, Poland; ^a źródło białka; ^b dodatek paszowy bogaty w białko i laktozę; ^c sucha mieszanina kwasu fosforowego, mrówkowego, propionowego, mlekowego, cytrynowego, octowego i benzoowego; ^d mikronizowana pszenica, jęczmień i kukurydza

Przygotowanie wody kałowej

Świeżo pobrane próby kału (20%) mieszano ze sterylnym buforowanym fosforanem roztworem fizjologicznym soli (phosphate-buffered saline, PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o pH 7,2 (80%), homogenizowano przez 2 minuty, a następnie odwirowano przy 10 000 obr/min (wirówka MPW-251; MPW, Warszawa Polska) przez 40 minut w temperaturze 4°C. Supernatant przefiltrowano z wykorzystaniem filtrów strzykawkowych, o rozmiarze porów 0,45 µm (Merck-Millipore, Darmstadt, Niemcy) i przechowywano w plastikowych pojemnikach w temperaturze -20°C do czasu wykonania analizy.

Hodowla komórek

Do analizy wykorzystano linię świńskich komórek nabłonka kanalików proksymalnych nerki LLC-PK1 (Cell Lines Service, Eppelheim, Niemcy) po 38 pasażu.

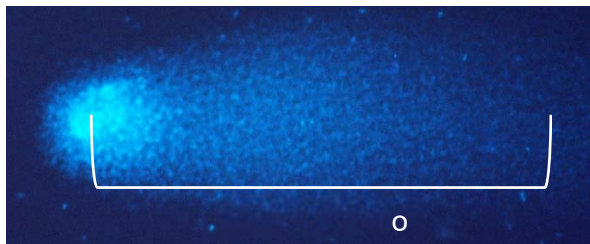
Komórki hodowano w postaci monowarstwy w butelkach typu Roux T75 (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, USA) z wykorzystaniem pożywki Eagle'a zmodyfikowanej przez Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM; Cell Lines Service, Eppelheim, Niemcy) oraz podłoża Ham'a F12 (Cell Lines Service, Eppelheim, Niemcy) w stosunku 1:1. Medium hodowlane wzbogacono 5% płodową surowicą bydlęcą (foetal bovine serum, FBS; Cell Lines Service, Eppelheim, Niemcy), 2 mM L-glutaminą (Cell Lines Service, Eppelheim, Niemcy) oraz buforem HEPES (Cell Lines Service, Eppelheim, Niemcy). Komórki inkubowano w inkubatorze w atmosferze 5% CO₂ (Galaxy 48S, New Brunswick, UK) w temperaturze 37°C przez 7 dni, do uzyskania 80% stanu konfluencji. Następnie, komórki były subkulturowane, poprzez odklejenie z użyciem TrypLE™ Express (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Następnie, zawiesinę komórek w buforze PBS przenoszono do probówek typu Falcon, odwirowano i zawieszano w świeżej podłożu pożywce hodowlanej. Pożywkę hodowlaną zmieniano co 2-3 dni.

Komórki były gotowe do użycia po zliczeniu i określeniu żywotności za pomocą barwienia z zastosowaniem testu wykluczenia z użyciem błękitu trypanu. Żywotność komórek wykorzystanych do eksperymentu wynosiła minimum 90%.

Test kometowy

Wykonano test komety – elektroforezę pojedynczych jąder komórkowych w żelu agarozowym SCGE (single cell gel electrophoresis). Test ten posłużył do oceny stopnia uszkodzeń DNA w komórkach nerek świńskich LLC-PK1, pod wpływem działania czynnika genotoksycznego, którym była przygotowana wcześniej woda kałowa. Ostateczna liczba komórek LLC-PK1 w każdej próbie wynosiła 1×10^5 komórek w 1ml, a badane stężenie wody kałowej wynosiło 20%, v/v. Kontrolę ujemną stanowiły komórki w pożywce DMEM bez dodatku wody kałowej. Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 60 minut.

Test kometowy wykonano w warunkach alkalicznych (pH > 13) zgodnie z metodą opisaną przez Błasiak i Kowalik (2004). Po zakończeniu inkubacji, komórki odwirowano (1400 obr/min, 15 minut, 4°C), przemyto a następnie zawieszono w 0,75% agarozie o niskiej temperaturze topnienia (low melting point agarose, LMP agarose; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Tak przygotowane komórki nakładano na szkiełka opłaszczone 0,5% agarozą o normalnej temperaturze topnienia (normal melting point agarose, NMP agarose) i poddano lizie w temperaturze 4°C przez godzinę z użyciem buforu składającego się z 2.5 M NaCl, 1% Triton X-100, 100 mM EDTA oraz 10 mM Tris, o końcowym pH 10. Następnie, próby umieszczono w buforze rozwijającym (20 minut, 4°C) o składzie 300mM NaOH i 1mM EDTA. Szkiełka przepłukano buforem elektroforetycznym (30 mM NaOH i 1mM EDTA, pH 13) i umieszczono w aparacie do elektroforezy (Gel Electrophoresis Apparatus GNA-20, Pharmacia, Szwecja), którą prowadzono przy natężeniu 29 mA i napięciu 21 V przez 20 minut. Następnie szkiełka neutralizowano 5 minut w wodzie destylowanej i pozostawiono do wyschnięcia. Wysuszone próby wybarwiano fluorescencyjnym barwnikiem DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o stężeniu 1 µg/ml i inkubowano w ciemności przez godzinę w temperaturze 4°C, po czym stopień uszkodzenia komórek analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon Cis, Japonia) wyposażonego w kamerę (Nikon Digital Sight DS.-U3). Procentowy udział DNA w ogonie komety (rys. 1) analizowano dla 50 losowo wybranych komórek, a wyniki opracowano za pomocą programu komputerowego Lucia Comet V.7.0. (Laboratory Imaging, Czechy).



Rys. 1. Obraz mikroskopowy uszkodzenia DNA w komórce LLC-PK1 po ekspozycji na wodę kałową w teście kometowym

Źródło: opracowanie własne.

Efektywność badanych preparatów synbiotycznych i probiotycznych w zmniejszeniu genotoksyczności wody kałowej obliczono zgodnie z równaniem:

$$E = 100\% - \frac{P \times 100\%}{M}$$

gdzie E – efektywność, M – genotoksyczność wody kałowej na początku prowadzenia badań dla danej grupy zwierząt, natomiast P - genotoksyczność wody kałowej na końcu prowadzenia badań dla danej grupy zwierząt.

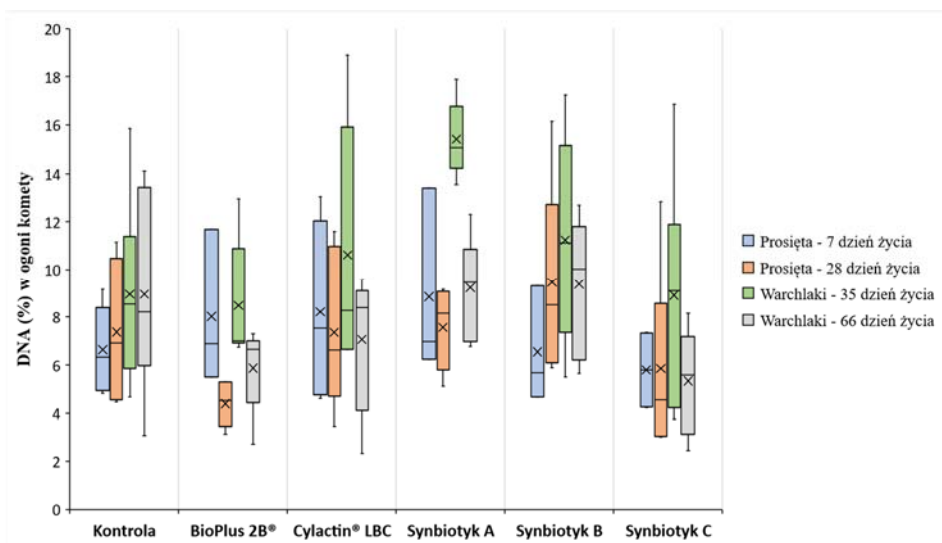
Analiza statystyczna

Wyniki analizy mikroskopowej uszkodzeń DNA sprawdzono pod kątem normalności rozkładu z zastosowaniem testu Shapiro-Wilk'a. Ponieważ test ten wykazał brak normalności rozkładu zmiennych, w celu analizy różnic pomiędzy próbami, wykonano test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunn'a ($p < 0,05$). Wyniki przedstawiono w formie wykresu pudełkowego z uwzględnieniem średniej, jak również jako średnią wartość z uwzględnieniem standardowego błędu średniej (standard error of the mean, SEM).

3. Wyniki i dyskusja

Genotoksyczność wody kałowej jest powiązana z dietą, w której mogą być obecne związki chemiczne indukujące uszkodzenia DNA, bądź wręcz przeciwnie – zapobiegające mutacjom [27]. Przedmiotem przeprowadzonych badań było określenie wpływu nowo opracowanych synbiotyków na genotoksyczność wody kałowej prosiąt, przy czym efekt ten porównano z działaniem handlowo dostępnych probiotyków. Wyniki przedstawiono na rysunku 2 oraz w tabeli 3.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Alexopoulos i wsp. (2004) wskazywały pozytywny wpływ probiotyku BioPlus 2B[®] na skład mleka loch oraz zdrowie prosiąt, podkreślając tym samym efekty, jakie wywołuje dieta [28]. Bian i wsp. (2016) wykazali w swoich badaniach, iż mleko lochy karmiącej, ale również bezpośredni kontakt prosiąt z matką, ma znaczący wpływ na rozwój mikrobioty u młodych, a jej aktywność może skutkować syntezą związków genotoksycznych [5,29].



Rys. 2. Genotoksyczność wody kałowej prosiąt i warchlaków wyrażona, jako odsetek uszkodzonego DNA znajdującego się w ogonie komety. Symbol „x” oznacza średnią genotoksyczność

Tabela 3. Średnia wartość genotoksyczności wody kałowej badana w 7, 28, 35 i 66 dniu życia prosiąt

Stosowany dodatek paszowy	Średnia genotoksyczność wody kałowej [%] ± SEM			
	prosiąta		warchlaki	
	7 dzień	28 dzień	35 dzień	66 dzień
Synbiotyki A	8,86 ± 0,96 f, g, h	7,57 ± 0,63 e, f, g, h	15,41 ± 1,89 i	9,24 ± 1,08 e, f, g, h
Synbiotyki B	6,55 ± 0,80 a, b, c, d, e	9,46 ± 0,96 f, g, h	11,24 ± 1,45 ^{h, i}	9,38 ± 0,97 g, h
Synbiotyki C	5,80 ± 0,67 a, b, c	5,86 ± 0,75 a, b, c, d	9,02 ± 0,93 e, f, g, h	5,34 ± 0,59 a, b
BioPlus 2B®	8,02 ± 0,90 d, e, f, g, h	4,38 ± 0,46 a	8,48 ± 0,79 e, f, g, h	5,87 ± 0,63 a, b, c, d
Cylactin® LBC	8,22 ± 0,79 e, f, g, h	7,36 ± 0,67 d, e, f, g, h	10,61 ± 1,15 ^{g, h}	7,06 ± 0,75 b, c, d, e, f
Brak	6,63 ± 0,59 c, d, e, f, g	7,38 ± 0,74 d, e, f, g, h	8,98 ± 1,00 e, f, g, h	8,96 ± 0,89 e, f, g, h

* Średnie oznaczone różnymi literami (a-i) były istotnie statystycznie różne (analiza Kruskala-Wallis'a z uwzględnieniem testu post-hoc Dunn'a przy poziomie istotności $p < 0,05$)

Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano, iż w 7 dniu życia prosiąt, karmionych przez lochy przyjmujące dodatki paszowe, średnia

genotoksyczność w przypadku stosowania synbiotyku B lub C wynosiła odpowiednio 6,55% i 5,80%, przy czym była istotnie statystycznie niższa niż w przypadku pozostałych suplementów, dla których przekraczała 8%. Statystycznie istotne obniżenie genotoksyczności wody kałowej prosiąt, między 7 a 28 dniem życia, obserwowano jedynie w przypadku wzbogacania paszy loch probiotykiem BioPlus 2B[®], a odsetek DNA w ogonie komety wynosił średnio 4,38% w 28 dniu życia prosiąt. Efektywność tego dodatku paszowego do obniżania genotoksycznego działania wody kałowej po 28 dniach życia prosiąt wynosiła 45,39% (tab. 4).

Odsadzenie prosiąt od matek i rozpoczęcie przyjmowania stałego pokarmu przyczyniło się do wzrostu genotoksyczności wody kałowej warchlaków (rys. 2.). Mogło być to konsekwencją stresu, jaki jest związany z tym etapem hodowli, co z kolei mogło prowadzić do zachwiania równowagi mikrobioty jelitowej oraz jej aktywności metabolicznej [30-32]. W grupach, w których stosowano synbiotyki A lub C, jak również probiotyk BioPlus 2B[®] obserwowano niemalże dwukrotny wzrost średniej genotoksyczności wody kałowej warchlaków, która w 35 dniu życia tych zwierząt wynosiła odpowiednio 15,41%, 9,02% i 8,48%. Wzbogacenie diety warchlaków synbiotykiem B, bądź preparatem Cylactin[®] LBC, ograniczało wzrost genotoksyczności wody kałowej po odstawieniu prosiąt od matek.

Tabela 4. Efektywność preparatów synbiotycznych oraz probiotycznych do obniżania genotoksyczności wody kałowej prosiąt po 28 i 66 dniach stosowania

Stosowany dodatek paszowy	Efektywność [%]	
	prosiąta po 28 dniu życia	warchlaki po 66 dniu życia
Synbiotyki A	14,56	40,04
Synbiotyki B	- 44,43	16,55
Synbiotyki C	- 1,03	40,80
BioPlus 2B [®]	45,39	30,78
Cylactin [®] LBC	10,46	33,46

W 66 dniu życia warchlaków najniższą średnią genotoksyczność obserwowano w przypadku stosowania synbiotyku C (5,34%) i probiotyku BioPlus 2B[®] (5,87%). Średni odsetek DNA w ogonie komety w badaniach wody kałowej w pozostałych grupach warchlaków wahał się od 7,06% do 9,38%. Efektywność obniżenia genotoksyczności wody kałowej warchlaków po odstawieniu od loch do 66 dnia życia była najwyższa w przypadku stosowania synbiotyków A oraz C i przekraczała 40%, natomiast w przypadku stosowania probiotyków wynosiła powyżej 30% (tab. 4). Najniższą efektywnością w redukowaniu genotoksycznego działania wody kałowej warchlaków odznaczała się dieta wzbogacona synbiotykiem B (16,55%). Skuteczność badanych preparatów synbiotycznych do obniżania genotoksyczności wody kałowej kurecząt, po indukcji uszkodzeń

DNA ochratoksyną A, była obserwowana również przez Markowiak i wsp. (2019) [33].

Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono ponadto, iż genotoksyczność wody kałowej była cechą osobniczą, na co wskazywała wyznaczona w analizie statystycznej wartość przedziału międzykwartyłowego, która wahała się od blisko 2% do niemalże 10% (rys. 2).

4. Podsumowanie

Zarówno preparaty synbiotyczne, jak i probiotyczne obniżają genotoksyczność wody kałowej prosiąt, aczkolwiek ich efektywność zależna jest od składu oraz sposobu przyjmowania preparatów przez zwierzęta. Bezpośrednie przyjmowanie paszy wzbogaconej preparatami znacznie zwiększa ich zdolność do obniżania genotoksyczności, z czego preparaty synbiotyczne A oraz C wykazują największy potencjał do redukcji genotoksycznej aktywności mikrobioty jelitowej. Stwierdzono również, iż stopień genotoksyczności nie jest zależny jedynie od diety, ale również od wieku i czynników środowiskowych, takich jak odsadzenie oraz jest cechą osobniczą. Niemniej jednak, zarówno synbiotyki, jak i probiotyki wykazują prozdrowotny wpływ na aktywność metaboliczną mikrobioty jelitowej prosiąt.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w Warszawie na podstawie decyzji nr PBS3/A8/32/2015.

Literatura

- [1] Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B.: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, (2010), 15-28.
- [2] Angelakis E.: Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microbial Pathogenesis*, 106, (2017), 162-170.
- [3] Zeineldin M., Aldridge B., Benjamin B., Kancer K., Lowe J.: Impact of parenteral antimicrobial administration on the structure and diversity of the fecal microbiota of pigs. *Microbial Pathogenesis*, 118, (2018), 220-229.
- [4] Modesto M., D'Aimmo M.R., Stefanini I., Trevisi P., De Filippi S., Casini L., Mazzoni M., Bosi P., Biavati B.: A novel strategy to select *Bifidobacterium* strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livestock Science*, 122, (2009), 248-258.
- [5] Federici E., Prete R., Lazzi C., Pellegrini N., Moretti M., Corsetti A., Cenci G.: Bacterial composition, genotoxicity, and cytotoxicity of fecal samples from individuals consuming omnivorous or vegetarian diets. *Frontiers in Microbiology*, 8, (2017), 300.
- [6] Gratz S.W., Wallace R.J., El-Nezami H.S.: Recent perspectives on the relations between fecal mutagenicity, genotoxicity, and diet. *Frontiers in Pharmacology*, 2, (2011), 4.

- [7] Nowak A., Śliżewska K., Gajęcka M., Piotrowska M., Żakowska Z., Zielonka Ł., Gajęcki M.: The genotoxicity of cecal water from gilts following experimentally induced *Fusarium* mycotoxicosis. *Veterinarni Medicina*, 60(3), (2015), 133-140.
- [8] Martin M.J., Thottathil S.E., Newman T.B.: Antibiotics overuse in animal agriculture: a call to action for health care providers. *American Journal of Public Health*, 105(12), (2015), 2409-2410.
- [9] Geigerová M., Bunešová V., Vlková E., Salmonová H., Rada V.: Selection of prebiotic oligosaccharides suitable for synbiotic use in calves. *Animal Feed Science and Technology*, 229, (2017), 73-78.
- [10] Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E., Larson E.L.: A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, 127(1), (2012), 4-22.
- [11] European Parliament And The Council. Rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt (2003). <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2003R1831:20100901:EN:PDF> (dostęp na dzień 25.04.2019).
- [12] Slyamova A., Sarsembayeva N., Valdovska A., Micinski J., Ussenbayev A., Paritova A., Mankibayev A.: Effects of antibiotic growth promoters on biochemical and haematological parameters of broiler chickens' blood. *Veterinary Medicine*, 1, (2016), 131-136.
- [13] Naqid I.A., Owen J.P., Maddison B.C., Gardner D.S., Foster N., Tchórzewska M.A., La Ragione R.M., Gough K.C.: Prebiotic and probiotic agents enhance antibody-based immune responses to *Salmonella* Typhimurium infection in pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 201, (2015), 57-65.
- [14] Gibson G.R., Roberfroid M.B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), (1995), 1401-1412.
- [15] FAO, WHO: Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food Agriculture Organization / World Health Organization (2002).
- [16] Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E.: Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, (2014), 506-514.
- [17] Food and Agriculture Organization. FAO technical meeting on prebiotics: food quality and standards service (AGNS), food and agriculture organization of the United Nations (FAO); FAO technical meeting report; FAO: Rome, Italy, 15-16 September 2007.
- [18] Anand S., Mandal S., Singh K.S., Patil P., Tomar S.K.: Synbiotic combination of *Lactobacillus rhamnosus* NCDC 298 and short chain fructooligosaccharides prevents enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *LWT-Food Science and Technology*, 98, (2018), 329-334.
- [19] Hamasalim H.J.: Synbiotic as feed additives relating to animal health and performance. *Advances in Microbiology*, 6, (2016), 288-302.
- [20] Kołodziejwski P.A., Sassek M., Chalupka D., Leciejewska N., Nogowski L., Mackowiak P., Jozefiak D., Stadnicka K., Siwek M., Bednarczyk M., Szwechowski T., Pruszyńska-Oszmałek E.: GLP1 and GIP are involved in the action of synbiotics in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9, (2018), 13.

- [21] Sivieri K., Bedani R., Cavallini D.C.U., Rossi E.A.: Probiotics and intestinal microbiota: implications in colon cancer prevention. W: Kongo J.M. (red.), Lactic acid bacteria – R&D for food, health and livestock purposes, IntechOpen, Rijeka, 2013, 217-242.
- [22] Chaayasut C., Pattananandecha T., Sirilun S., Suwannalert P., Peerajan S., Sivamaruthi B.S.: Synbiotic preparation with lactic acid bacteria and inulin as a functional food: *In vivo* evaluation of microbial activities, and preneoplastic aberrant crypt foci. *Food Science and Technology*, 37(2), (2016), 328-336.
- [23] Śliżewska K., Chlebicz A.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus pentosus*". Zgłoszenie patentowe nr P.422589.
- [24] Śliżewska K., Chlebicz A.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus reuteri*". Zgłoszenie patentowe nr P.422593.
- [25] Śliżewska K., Chlebicz A.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus*". Zgłoszenie patentowe nr P.422602
- [26] Śliżewska K., Chlebicz A.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus paracasei*". Zgłoszenie patentowe nr P.422603.
- [27] Nowak A., Śliżewska K., Otlewska A.: Antigenotoxic activity of lactic acid bacteria, prebiotics, and products of their fermentation against selected mutagens. *Regular Toxicology and Pharmacology*, 73, (2015), 938-946.
- [28] Alexopoulos C., Georgoulakis I.E., Tzivara A., Kritas S.K., Siochu A., Kyriakis S.C.: Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88, (2004), 381-392.
- [29] Bian G., Ma S., Zhu Z., Su Y., Zoetendal E.G., Mackie R., Liu J., Mu C., Huang R., Smidt H., Zhu W.: Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. *Environmental Microbiology*, 18, (2016), 1566-1577.
- [30] Guevarra R.B., Hong S.H., Cho J.H., Kim B.R., Shin J., Lee J.H., Kang B.N., Kim Y.H., Wattanaphansak S., Isaacson R.E., Song M., Kim H.B.: The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9, (2018), 54.
- [31] Li Y., Guo Y., Wen Z., Jiang X., Ma X., Han X.: Weaning stress perturbs gut microbiome and its metabolic profile in piglets. *Scientific Reports*, 8(1), (2018), 18068.
- [32] Han G.G., Lee J.-Y., Jin G.-D., Park J., Choi Y.H., Kang S.-K., Chae B.J., Kim E.B., Choi Y.-J.: Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Scientific Reports*, 8(1), (2018), 6012.
- [33] Markowiak P., Śliżewska K., Nowak A., Chlebicz A., Żbikowski A., Pawłowski K., Szeleszczuk P.: Probiotic microorganisms detoxify ochratoxin A in both a chicken liver cell line and chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(9), (2019), 4309-4318.

THE INFLUENCE OF NEWLY DEVELOPED SYNBiotic PREPARATIONS ON THE GENOTOXICITY OF FAECAL WATER OF PIGLETS

Abstract: *Synbiotics are a combination of live microorganisms, called probiotics and prebiotics substances, and they have a positive effect on the health of the host through modulation of microbiota and its activity. Limiting the genotoxic impact of intestinal microbiota may be one of the beneficial effects of synbiotics usage as feed additives and was the subject of the research. Faeces of piglets at 7 and 28 days of age as well as after weaning, collected at 35 and 66 days of age was the material for the analysis. The faecal water obtained by homogenizing faecal content, centrifugation and filtration of the supernatant was analyzed using the comet assay. Genotoxicity of faecal water of piglets after 7 days of life ranged from 5.80% to 8.86% and after weaning piglets from sows it increased even to the level of 15.41% (35 days of age). Newly developed synbiotics reduced the genotoxicity of faecal water of weaners (between 35 and 66 days of age) with efficiency in the range of 16.55-40.80%. Based on the results obtained, it was found that the direct intake of synbiotic preparations has a positive effect on their ability to reduce faecal genotoxicity. It was also observed that the effectiveness of the preparations depended on the composition of the synbiotic preparation, with the highest ability to reduce the genotoxic effects of faecal water demonstrated by the synbiotic A and C.*

Key words: synbiotics; piglets; genotoxicity

GRZYBY PLEŚNIOWE, GROŹNE ZANIECZYSZCZENIE PRZYPRAW

Magdalena GAJEWSKA*, Katarzyna WYKA,
Beata BARTODZIEJSKA, Anna SZOSLAND-FAŁTYN

*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waclawa
Dąbrowskiego, 02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36, Zakład Jakości Żywności, 92-202
Łódź, Al. Marszałka J. Piłsudskiego 84*

*magdalena.gajewska@ibprs.pl

Streszczenie: *Celem badań było określenie poziomu zanieczyszczenia grzybami pleśniowymi przypraw, dostępnych w sprzedaży detalicznej województwa łódzkiego. Badaniami objęto 14 rodzajów produktów: czosnek mielony (*Allium sativum*), koperek (*Anethum graveolens*), natka pietruszki (*Petroselinum crispum*), bazylia (*Ocimum basilicum*), oregano (*Origanum vulgare*), estragon (*Artemisia dracunculus*), tymianek (*Thymus vulgaris*), majeranek (*Origanum majorana*), galka muszkatołowa (*Myristica fragans*), curry (*Helichrysum angustifolia*), kurkuma (*Curcuma longa*), pieprz czarny mielony (*Piper nigrum*), papryka słodka mielona (*Capsicum annuum*), cynamon (*Cinnamomum cassia*). Łącznie przebadano 168 próbek. Analiza mikrobiologiczna obejmowała liczbę grzybów pleśniowych i ich skład jakościowy. Zanieczyszczenie badanych przypraw przez pleśnie było zróżnicowane i nie przekraczało poziomu 10^4 jtk·g⁻¹ (4,89 log jtk·g⁻¹). Grzyby te były obecne w 95 % badanych próbek. Najbardziej zanieczyszczonymi przez grzyby pleśniowe przyprawami były: papryka słodka mielona (średnio 4,31 log jtk·g⁻¹), pieprz czarny mielony (średnio 4,27 log jtk·g⁻¹) oraz koperek (średnio 4,13 log jtk·g⁻¹). Pleśnie obecne w badanych produktach należały łącznie do 6 rodzajów: *Aspergillus* (w tym dwa gatunki *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*), *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* oraz *Rhizopus*. Najliczniej reprezentowany był rodzaj *Aspergillus*, dominującym gatunkiem był *Aspergillus niger*, którego obecność stwierdzono we wszystkich rodzajach przypraw. Bardzo licznie występował także *Aspergillus flavus*. Wyizolowane z badanych przypraw grzyby pleśniowe to mikroflora typowa dla tego typu produktów.*

Słowa kluczowe: przyprawy, grzyby pleśniowe, zanieczyszczenie mikrobiologiczne

1. Wprowadzenie

Przyprawy cieszą się zainteresowaniem już od czasów antycznych. Są ważnym elementem pożywienia, poprawiają nie tylko smak i zapach potraw, lecz także zwiększają ich wartość odżywczą oraz trwałość. Ponadto, spełniają w żywności inne funkcje, np. posiadają właściwości barwiące, wzmagają łaknienie konsumenta, pobudzają czynności motoryczne jelit, umożliwiają ograniczenie spożycia cukru, soli i tłuszczów [16, 19]. Wiele ziół przyprawowych

i przypraw, oprócz oddziaływania na zmysły człowieka, ma działanie lecznicze lub wspomagające (rozkurczowe, moczopędne, oczyszczające, stymulujące pracę wątroby i jelit) chroniące przed dolegliwościami, zwłaszcza przewodu pokarmowego [13]. Mają wszechstronne zastosowanie w przemyśle spożywczym, owocowo-warzywnym, spirytusowym, gastronomii oraz w gospodarstwach domowych [2, 14]. Wykorzystanie w różnych gałęziach przemysłu wynika nie tylko z niepowtarzalnego smaku i aromatu tych produktów, lecz również z obecności w ich składzie związków biologicznie aktywnych (alkaloidy, flawonoidy, glikozydy) [17]. Wyniki prowadzonych badań potwierdzają, że przyprawy wykazują działanie przeciwbakteryjne, korzystnie wpływają na procesy trawienia, a także stanowią bogate źródło naturalnych związków o właściwościach antyoksydacyjnych. Ma to duże znaczenie ze względu na potencjalne działanie prozdrowotne naturalnych przeciwutleniaczy i ich ważną rolę w prewencji chorób cywilizacyjnych [1, 18].

Sezonowa dostępność świeżych roślin przyprawowych, a także aspekty ekonomiczne związane z kosztami dystrybucji i magazynowania (zmniejszenie kosztów przechowywania, zminimalizowanie strat związanych z psuciem się surowców roślinnych podczas przechowywania) stwarza konieczność zabezpieczenia tych produktów. Jedną z form zabezpieczania jest przetwarzanie ich na susze, nie tracąc korzystnego oddziaływania na zdrowie konsumenta [21].

Niemniej jednak, podobnie jak wiele innych płodów rolnych, rośliny przyprawowe są narażone na różnego rodzaju zanieczyszczenia mikrobiologiczne, które w znacznym stopniu zależą od warunków środowiska. Skażenie może nastąpić na każdym etapie produkcji: uprawa, zbiór, obróbka, przechowywanie, transport [20].

Badania związane z oceną mikrobiologiczną surowców roślinnych i przypraw wykazują, iż spośród czynników biologicznych, znaczny stopień zanieczyszczenia tych produktów stanowi mikroflora należąca do grzybów strzępkowych, potocznie zwanych pleśniami [3, 4]. Pleśnie powodują niekorzystne zmiany w produktach, prowadząc do znacznego obniżenia ich jakości. Ponadto, ich obecność w artykułach spożywczych jest niebezpieczna dla człowieka. Wywołują alergie, a ich wtórne metabolity – mykotoksyny mogą być przyczyną ostrych zatruć. Związki te powodują u ludzi i zwierząt efekty toksyczności o charakterze ostrym, podostrym lub przewlekłym, wykazują także działanie kancerogenne, teratogenne, genotoksyczne, immunotoksyczne i neurotoksyczne. Z uwagi na fakt, iż są odporne na wysoką temperaturę, zanieczyszczenie mykotoksynami jest trudne do wyeliminowania, nawet w produktach poddawanych obróbce termicznej [6, 7, 12]. Do zanieczyszczenia tymi toksynami produktów rolnych dochodzi w trakcie wegetacji roślin, jednakże największe ich stężenie obserwuje się w artykułach w trakcie ich transportu i przechowywania w nieodpowiednich warunkach wilgotności oraz temperatury. Grzyby pleśniowe produkują powyższe metabolity m. in. w warunkach stresu środowiskowego (zmiany temperatury, wilgotności oraz dostępności tlenu) [6-8].

W obowiązujących aktach prawnych brak jest kryteriów mikrobiologicznych, dotyczących dopuszczalnego poziomu zanieczyszczenia grzybami

pleśniowymi, w odniesieniu do ziół przyprawowych oraz przypraw. W przypadku braku wymagań, bezpieczeństwo zdrowotne produktów spożywczych określają polskie normy. Według PN-A-86967:1998 „Mieszanki przyprawowe. Przyprawy ziołowe” liczba pleśni nie powinna przekraczać 10^3 jtk w 1 g.

W celu zminimalizowania problemów związanych z mikrobiologicznym zanieczyszczeniem przypraw, *Codex Alimentarius* powołał specjalny Komitet ds. Ziół Przyprawowych i Przypraw, którego głównym celem było ustanowienie międzynarodowych standardów i postępowania przy produkcji tych produktów, aby nie stwarzały zagrożenia zdrowotnego dla konsumentów. W związku z powyższym, Organizacja ds. Żywności i Rolnictwa (FAO) oraz Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) apelują do publikowania danych dotyczących ryzyka mikrobiologicznego związanego z tymi produktami [5, 6].

Mając na uwadze bezpieczeństwo zdrowia konsumenta oraz powszechność stosowania przypraw, w niniejszej pracy podjęto badania mające na celu określenie poziomu zanieczyszczenia grzybami pleśniowymi tych produktów.

2. Metodyka

Materiał do badań stanowiły wybrane rodzaje przypraw: czosnek mielony (*Allium sativum*), koperek (*Anethum graveolens*), natka pietruszki (*Petroselinum crispum*), bazylia (*Ocimum basilicum*), oregano (*Origanum vulgare*), estragon (*Artemisia dracuncululus*), tymianek (*Thymus vulgaris*), majeranek (*Origanum majorana*), gałka muszkatołowa (*Myristica fragans*), curry (*Helichrysum angustifolia*), kurkuma (*Curcuma longa*), pieprz czarny mielony (*Piper nigrum*), papryka słodka mielona (*Capsicum annuum*), cynamon (*Cinnamomum cassia*), dostępne w sprzedaży detalicznej województwa łódzkiego. Zakupiono cztery różne marki każdego rodzaju produktu oraz zbadano trzy partie produkcyjne z każdej marki. Łącznie przebadano 168 próbek. Pochodzenie produktów zakupionych do badań przedstawiono w tabeli 1.

Badania przeprowadzono w latach 2017 -2018. Produkty przechowywano do czasu analiz w temp. 20-23°C i wilgotności 30-48 % oraz badano sukcesywnie po zakupie.

Tabela 1. Pochodzenie przypraw zakupionych do badań

L.p.	Przyprawa	Pochodzenie
1.	Czosnek mielony	Polska, Chiny, nieznane
2.	Koperek	Polska, Czechy, Egipt
3.	Natka pietruszki	Polska, Czechy
4.	Bazylia	Polska, Indonezja, Egipt
5.	Oregano	Polska, Turcja, nieznane
6.	Estragon	Polska, Czechy, nieznane
7.	Tymianek	Polska, Czechy, nieznane
8.	Majeranek	Polska, Egipt, nieznane

9.	Gałka muszkatołowa	Sri Lanka, Indie, Indonezja
10.	Curry	Polska, Indie, Chiny, Słowacja
11.	Kurkuma	Indie, Iran
12.	Pieprz czarny mielony	Wietnam,
13.	Papryka słodka mielona	Węgry, Hiszpania, nieznane
14.	Cynamon	Sri Lanka, Indie, Chiny, Indonezja

Analiza mikrobiologiczna badanych produktów obejmowała liczbę grzybów pleśniowych i ich skład jakościowy. Liczbę grzybów strzępkowych określono metodą płytkową poprzez posiew wgłębnny na podłoże Sabourauda z chloramfenikolem (ekstrakt drożdżowy, 5 g/l; glukoza, 20 g/l; chloramfenikol, 0,1 g/l; agar, 15 g/l; pH 6,6) i inkubację w temp. 25°C do 5 dni, według PN-ISO 7954:1999 [15]. Wyizolowane z przypraw szczepy grzybów pleśniowych posiewano na płytki z pożywką syntetyczną Czapek-Doxa (NaNO₃, 3 g/l; KH₂PO₄, 1 g/l; KCl, 0,5 g/l, MgSO₄·7H₂O, 0,5 g/l; FeSO₄·7H₂O, 0,01 g/l; sacharoza, 30 g/l; agar, 15 g/l; pH 5,6). Płytki inkubowano w temperaturze 25°C przez 48 h. Następnie pobierano czą fragmenty kolonii badanych grzybów i sporządzano preparaty bezpośrednie w soli fizjologicznej, które oceniano w mikroskopie świetlnym (powiększenie 100× i 400×). Różnicowanie gatunkowe grzybów pleśniowych przeprowadzono na podstawie cech morfologicznych grzybni, biorąc pod uwagę: zabarwienie hodowli, konsystencję grzybni, stopień puszystości oraz kształt i wielkość konidioforów, w oparciu o atlasy: P. Krzyściak, M. Skóra, A. B. Macura „Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka” [10] oraz G.S. de Hoog & J. Guarro „Atlas of clinical fungi [9].

Liczbę grzybów pleśniowych wyrażono jako jednostki tworzące kolonie w 1 g (jtk·g⁻¹) i transportowano je do postaci logarytmicznej w celu wykonania analizy statystycznej, przy użyciu programu komputerowego Statistica 10. Dokonano oceny zróżnicowania poziomu zanieczyszczenia grzybami pleśniowymi badanych produktów w zależności od rodzaju przyprawy, stosując test nieparametryczny Kruskala-Wallisa.

3. Wyniki i dyskusja

Zanieczyszczenie badanych przypraw przez grzyby pleśniowe było zróżnicowane i nie przekraczało poziomu 10⁴ jtk·g⁻¹ (4,89 log jtk·g⁻¹). Grzyby te były obecne w 95 % badanych próbek, przy czym średnie zanieczyszczenie we wszystkich produktach wynosiło 3,54 log jtk·g⁻¹ (tabela 2).

Tabela 2. Stopień zanieczyszczenia przypraw grzybami pleśniowymi

Przyprawy	Liczba prób	Liczba grzybów strzępkowych [$\log \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$]		
		Zakres	Średnia	Powyżej normy [%]
Czosnek mielony	12	nb - 1,18	-	0
Koperek	12	2,30 - 4,36	4,13	25
Natka pietruszki	12	2,00 - 4,41	3,21	17
Bazylia	12	2,78 - 4,71	3,25	17
Oregano	12	3,51 - 4,22	3,82	17
Estragon	12	2,48 - 4,46	3,26	17
Tymianek	12	2,00 - 3,62	2,96	0
Majeranek	12	3,00 - 3,61	3,31	0
Gałka muszkatołowa	12	2,40 - 4,49	3,68	8
Curry	12	3,20 - 4,57	3,77	17
Kurkuma	12	2,50 - 3,80	3,15	0
Pieprz czarny mielony	12	3,75 - 4,45	4,27	42
Papryka słodka mielona	12	3,60 - 4,89	4,31	58
Cynamon	12	1,26 - 3,87	2,87	0
Średnia			3,54	

Objaśnienia: nb –nieobecne w 1 g

Najmniejszą liczbę pleśni stwierdzono w próbkach czosnku mielonego, w większości przypadków były one nieobecne, bądź występowały nielicznie $15 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ ($1,18 \log \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$). Największą natomiast liczbę grzybów pleśniowych wykryto w próbce papryki słodkiej $7,8 \cdot 10^4 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ ($4,89 \log \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$). Przekroczenie dopuszczalnego poziomu zanieczyszczenia pleśniami odnotowano w 25% próbek koperku (3 próbki), 17% próbek natki pietruszki (2 próbki), 17% próbek bazylii (2 próbki), 17% próbek oregano (2 próbki), 17% próbek estragonu (2 próbki), 17% próbek curry (2 próbki), 8% próbek gałki muszkatołowej (1 próbka), 42% próbek pieprzu czarnego mielonego (5 próbek) oraz 58% próbek papryki słodkiej mielonej (7 próbek). Najbardziej zanieczyszczonymi przyprawami przez grzyby pleśniowe były: papryka słodka (średnio $4,31 \log \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$), pieprz czarny (średnio $4,27 \log \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$) oraz koperek (średnio $4,13 \log \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$).

Dane literaturowe donoszą, że liczba grzybów pleśniowych w suszach roślin przyprawowych i przyprawach kształtuje się na poziomie od 0 do 10^6 jtk·g⁻¹, a do najbardziej zanieczyszczonych należą: pieprz czarny, papryka, majeranek, bazylia i cynamon [17]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań, dotyczące poziomu zanieczyszczenia przez pleśnie przypraw, są porównywalne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów [6, 11, 12, 20, 21].

Statystyczna analiza wyników wykazała zróżnicowanie poziomu zanieczyszczenia pleśniami w zależności od rodzaju przyprawy. Istotne różnice w średniej liczbie grzybów pleśniowych wykazano pomiędzy: czosnkiem i pozostałymi przyprawami ($p < 0,010$); pieprzem czarnym i pozostałymi przyprawami, z wyjątkiem koperku i papryki słodkiej ($0,009 \leq p \leq 0,0042$); papryką słodką i pozostałymi przyprawami, z wyjątkiem koperku i pieprzu czarnego ($0,008 \leq p \leq 0,040$); tymiankiem i: oregano, gałką muszkatołową, curry, koperkiem, pieprzem czarnym oraz papryką słodką ($0,012 \leq p \leq 0,042$); cynamonem i: oregano, gałką muszkatołową, curry, koperkiem, pieprzem czarnym oraz papryką słodką ($0,010 \leq p \leq 0,040$). W pozostałych rodzajach przypraw różnice te były nieistotne.

Pleśnie obecne w badanych produktach należały łącznie do 6 rodzajów: *Aspergillus* (w tym dwa gatunki *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*), *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* oraz *Rhizopus*. (tabela 3). Najliczniej reprezentowany był rodzaj *Aspergillus*, dominującym gatunkiem był *Aspergillus niger*, którego obecność stwierdzono we wszystkich rodzajach przypraw - średni udział w ogólnej liczbie szczepów wyizolowanych z badanych produktów wynosił 56,4%. Bardzo licznie występował także *Aspergillus flavus* – średni udział wynosił 33,7% , z nieco mniejszą częstotliwością *Penicillium* sp. (16,0%) oraz *Alternaria* sp. (10,3%) i *Mucor* sp. (8,3%). *Cladosporium* sp. stwierdzono tylko w bazylii (6% próbek), natomiast *Rhizopus* sp. był charakterystyczny dla cynamonu (11,1% próbek). Wyizolowane z badanych przypraw grzyby pleśniowe to mikroflora typowa dla tego typu produktów. Doniesienia literaturowe dotyczące zanieczyszczenia przypraw wskazują, że jakość mikrobiologiczna tych produktów pod względem rodzaju występujących w nich drobnoustrojów, jest zróżnicowana, a *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp. stanowią główne zanieczyszczenie suszy roślin przyprawowych i przypraw [1, 3, 4, 6, 8, 12, 13].

Tabela 3. Skład jakościowy grzybów pleśniowych wyizolowanych z badanych przypraw

	Udział % ogólnej liczby szczepów wyizolowanych z badanych przypraw							
	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	
Czosnek mielony	100	-	-	-	-	--	-	
Koperek	60,9	28,6	-	10,5	-	-	-	
Natka pietruszki	46,0	-	33,4	5,2	15,4	-	-	
Bazylija	46,1	23,1	15,3	9,5	-	6,0	-	
Oregano	77,4	-	22,6	-	-	-	-	
Estragon	62,2	26,4	7,4	-	4,0	-	-	
Tymianek	57,1	-	40,9	2,0	-	-	-	
Majeranek	48,6	35,6	4,2	-	11,6	-	-	
Gałka muszkatołowa	37,6	50,7	11,7	-	-	-	-	
Curry	36,8	27,3	18,2	17,7	-	-	-	
Kurkuma	66,7	28,8	4,5	-	-	-	-	
Pieprz czarny mielony	33,2	49,5	12,6	4,7	-	-	-	
Papryka słodka mielona	38,5	55,8	5,7	-	-	-	-	
Cynamon	77,9	11,0	-	-	-	-	11,1	

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań są porównywalne z wynikami innych autorów. Wójcik-Stopczyńska i wsp. [21], w suszonych ziołach przyprawowych, zidentyfikowali pleśnie z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria* oraz *Cladosporium*. Stwierdzili także, że dominującymi gatunkami są *Aspergillus* i *Penicillium*. Elshafie i wsp. [4] oraz Hammami i wsp. [8], badając przyprawy dostępne w lokalnych marketach na terenie Omanu i Qataru, wykryli zanieczyszczenie *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., a także aflatoksynami syntetyzowanymi przez te grzyby. Mandeel [12] oraz Mohamed i Saad [13] w importowanych przyprawach stwierdzili toksynogenne szczepy grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* oraz *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. i *Cladosporium* sp. Zróżnicowane zanieczyszczenie grzybami pleśniowymi przypraw stwierdzili także Mahgubi i wsp.[11], Garcia i wsp.[6], a także Wieczorkiewicz-Górnik i wsp [20].

4. Podsumowanie

Jakość mikrobiologiczna badanych przypraw, zarówno pod względem liczby, jak i rodzaju występujących w nich grzybów pleśniowych, była zróżnicowana. Zanieczyszczenie pleśniami kształtowało się na poziomie od 0 do 10^4 jtk·g⁻¹, a do najbardziej zanieczyszczonych produktów należały: pieprz czarny mielony, papryka słodka mielona oraz koperek, w których średnia liczba grzybów pleśniowych była wyższa od dopuszczalnego poziomu. Wyizolowane z badanych przypraw grzyby strzępkowe to mikroflora typowa dla tego rodzaju produktów. Zidentyfikowano pleśnie należące do 6 rodzajów: *Aspergillus* (w tym dwa gatunki *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*), *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* oraz *Rhizopus*. Najliczniej reprezentowany był rodzaj *Aspergillus*, dominującym gatunkiem był *Aspergillus niger*, którego obecność stwierdzono we wszystkich rodzajach przypraw. Bardzo licznie występował także *Aspergillus flavus*. Zanieczyszczenie grzybami pleśniowymi z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* jest niezwykle ważne z punktu widzenia mykotoksykologicznego. Ich obecność może być przyczyną zanieczyszczenia przypraw mykotoksynami, związkami silnie toksycznymi o działaniu kancerogennym, teratogennym, genotoksycznym, neurotoksycznym. Większość badanych przypraw pochodzi z importu, z regionów, w których panują sprzyjające warunki klimatyczne do rozwoju grzybów pleśniowych i produkcji mykotoksyn. Ponadto, z uwagi na długą drogę transportu, istnieje ryzyko zanieczyszczenia aflatoksynami i ochratoksyną A tych produktów. Grzyby pleśniowe produkują powyższe metabolity m. in. w warunkach stresu środowiskowego (zmiany temperatury, wilgotności oraz dostępności tlenu) [6-8]. Dlatego też, istotne jest ciągłe monitorowanie przypraw w aspekcie zanieczyszczenia grzybami pleśniowymi.

Literatura

- [1] Banerjee M., Sarkar P.K.: Microbiological quality of some retail spices in India, *Food Research International*, 36, (2003), 469-474.
- [2] Biezanowska-Kopceć R., Leszczyńska T., Pysz M.: Preferencje i częstotliwość stosowania roślin przyprawowych przez mieszkańców województwa małopolskiego – badania pilotażowe, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLVII(3), (2014), 277-283.
- [3] Bugno A., Almodovar A., Pereira T., Pinto T., Sabino M.: Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, (2006), 47-51.
- [4] Elshafie A.E., Al-Rashdi T., Al-Bahry S.N., Bakheit Ch. S.: Fungi and aflatoxins associated with spices in Sultanate of Oman, *Mycopathologia*, 155(3), (2002), 155-160.
- [5] FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations, WHO World Health Organization: Call for data and experts on microbiological hazard associated with Spice and dried aro-matic herbs, 2013 (dostępny na: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jemra/Call_for_data_and_experts_on_spices_Final_20121220.pdf).
- [6] Garcia M.V., Parussolo G., Moro C.B., Bernardi A.O., Copetti M.V.: Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolates, *Food Microbiology*, 73, (2018), 93-98.
- [7] Grajewski J.: Mikotoksyny i grzyby pleśniowe – zagrożenia dla człowieka i zwierząt, Wydawnictwo UKW, Bydgoszcz 2006, 117-147.
- [8] Hammami W., Fiori S., Al Thani R., Ali Kali N., Balmas V., Migheli Q., Jaoua S.: Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. *Food Control*, 37, (2014), 177-181.
- [9] de Hoog G.S. & Guarro J.: Atlas of clinical fungi, ASM Press, 2 edition, Utrecht 2001.
- [10] Krzyściak P., Skóra M., Macura A. B.: Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka, MedPharm, Warszawa 2010.
- [11] Mahgubi A.El., Puel O., Bailly S., Tadriss S., Querin A., Ouadia A., Oswald I.P., Bailly J.D.: Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco, *Food Control*, 32, (2013), 143-148.
- [12] Mandel Q.A.: Fungal contamination of some imported spices, *Mycopathologia*, 159(2), (2005), 291-298.
- [13] Mohamed H., Saad A.: Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, (2010), 167-175.
- [14] Olewnicki D., Jabłońska L., Orliński P., Gontar Ł.: Zmiany w krajowej produkcji zielarskiej i wybranych rodzajach przetwórstwa roślin zielarskich w kontekście globalnego wzrostu popytu na te produkty. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Problemy Rolnictwa Światowego* 15 (XXX), 1, (2015), 68-76.
- [15] PN-ISO 7954: 1999. Ogólne zasady oznaczania drożdży i pleśni. Metoda płytkowa w 25°C.
- [16] Pszczoła D.E.: A Spice odyssey, *Food Technology*, 55(1), (2001), 36-44.
- [17] Remiszewski M., Kulczak M., Jeżewska M., Korbas E., Czajkowska D.: Wpływ procesu dekontaminacji z zastosowaniem pary wodnej na jakość wybranych przypraw, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3(48), (2006), 23-24.
- [18] Szajdek A., Borowska J.: Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(41) S, (2004), 5-28.
- [19] Tainter D.R., Grenis A.T.: Spices and seasonings: A Food Technology Handbook. A. John Wiley & Sons Inc, USA 2001.
- [20] Wieczorkiewicz-Górnik M., Piątkiewicz A.: Mikrobiologiczne zanieczyszczenia przypraw ziołowych, *Gospodarka Mięsna*, 8, (2001), 46-49.
- [21] Wójcik-Stopczyńska B., Jakubowska B., Reichelt M.: Microbiological contamination of dried culinary herbs, *Herba Polonica*, 55 (3), (2009), 206-213.

FILAMENTOUS FUNGI, DANGEROUS CONTAMINATION OF SPICES

Abstract: *The objective of this paper was to determine the filamentous fungi contamination of spices on retail sale in the lodz region. The research material covered 14 types of products: garlic powder (*Allium sativum*), dill (*Anethum graveolens*), parsley (*Petroselinum crispum*), basil (*Ocimum basilicum*), oregano (*Origanum vulgare*), tarragon (*Artemisia dracuncululus*), thyme (*Thymus vulgaris*), marjoram (*Origanum majorana*), nutmeg (*Myristica fragans*), curry (*Helichrysum angustifolia*), turmeric (*Curcuma longa*), black pepper powder (*Piper nigrum*), sweet paprika powder (*Capsicum annum*), cinnamon (*Cinnamomum cassia*). A total of 168 samples were tested. Microbiological analysis included number of filamentous fungi and their qualitative composition. The filamentous fungal contamination of the tested spices was varied and did not exceed $10^4 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ ($4.89 \log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$). Fungi were present in 95% of the samples tested. The most contaminated spices by filamentous fungi were: sweet pepper (average of $4.31 \log \text{cfu}^{-1}$), black pepper (average of $4.27 \log \text{cfu}^{-1}$) and dill (average of $4.13 \log \text{cfu}^{-1}$). Filamentous fungi present in the tested products belonged to 6 types: *Aspergillus* (including two species *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*), *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* and *Rhizopus*. The most numerous genera was *Aspergillus*, the dominant species was *Aspergillus niger*, whose presence was found in all types of spices. *Aspergillus flavus* was also very abundant. The filamentous fungi isolated from the tested spices is the microflora typical for this type of products.*

Keywords: spices, filamentous fungi, microbiological contamination.

UWARUNKOWANIA ŚRODOWISKOWE ACYDOTERMOFILNYCH BAKTERII *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS*

Alina KUNICKA-STYCZYŃSKA*, Agnieszka TYFA

*Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk
o Żywności, Politechnika Łódzka, Łódź*

**alina.kunicka@p.lodz.pl*

Streszczenie: *Acydotermofilne bakterie Alicyclobacillus acidoterrestris stanowią powszechne zanieczyszczenie soków i koncentratów soków owocowych. Nie tylko wykazują zdolność do bytowania w ekstremalnych warunkach środowiskowych, ale również stanowią element naturalnej flory bakteryjnej w klimacie umiarkowanym, kolonizując glebę i powierzchnie roślin. Po raz pierwszy przedstawiono charakterystykę biochemiczną szczepów środowiskowych A. acidoterrestris izolowanych w Polsce, pochodzących ze środowiska produkcji pierwotnej (sady jabłoni). Biorąc pod uwagę możliwość wnikania tych szczepów do zakładów produkcji soków i koncentratów soków jabłkowych, ich pełna charakterystyka umożliwi rozpoznanie zagrożenia na poziomie produkcji wtórnej. Izolaty A. acidoterrestris charakteryzowały się profilem biochemicznym zbliżonym do opisanych w literaturze szczepów izolowanych w Niemczech i Turcji oraz odmiennym niż szczepy izolowane w Afryce. Międzyszczepowa zmienność metaboliczna świadczy o różnorodności w obrębie tego gatunku bakterii. Izolaty wykazywały wzrost w szerokim zakresie temperatur 20-60°C, z optymalną temperaturą wzrostu w zakresie 30-55°C oraz w szerokim zakresie pH od 2,2 do 5,8, ze zróżnicowanym szczepowo optimum w zakresie 3,5-5,0. Wydłużenie czasu hodowli skutkowało adaptacją szczepów do temperatury optymalnej dla bakterii mezofilnych.*

Słowa kluczowe: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, bakterie acydotermofilne, izolaty środowiskowe bakterii

1. Wprowadzenie

Zanieczyszczenia mikrobiologiczne stanowią jeden z kluczowych problemów przemysłu spożywczego, ze względu na straty ekonomiczne oraz potencjalne zagrożenie zdrowia konsumentów. W ostatniej dekadzie, w branży sokowniczej przemysłu spożywczego obserwuje się wzrost częstości psucia soków i napojów owocowych wywołanych rozwojem acydotermofilnych bakterii, należących do rodzaju *Alicyclobacillus*. Pojawienie się tych drobnoustrojów w końcowych produktach takich jak soki owocowe, czy koncentraty soków owocowych, może świadczyć zarówno o zanieczyszczeniu surowców, jak i zanieczyszczeniu na poziomie produkcji pierwotnej. W przypadku, gdy na którymkolwiek z tych etapów dojdzie do wtórnego zanieczyszczenia mikrobiologicznego, bakterie *Alicyclobacillus* sp. ze względu na swoje specyficzne

cechy (zdolność do sporulacji, acydofilność, termofilność) mogą przeżywać wszystkie etapy procesu produkcyjnego.

Pierwsze doniesienia na temat bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris* pojawiają się pod koniec lat 80 XX wieku, a nazwę systematyczną tych bakterii wprowadzili Wisotzkey i wsp. w 1992 roku [5, 21]. Nazwa gatunkowa *A. acidoterrestris* oznacza dosłownie kwasolubny (*acidum*) i wyizolowany z gleby (*terrestris*). *A. acidoterrestris* to Gram-dodatnie, tlenowe, wykazujące ruch bakterie o cylindrycznym kształcie, o wymiarach 2,9-4,3 μm długości i 0,6-0,8 μm szerokości. Komórki zdolne są do wytwarzania owalnych przetrwalników (1,5-1,8 μm \times 0,9-1,0 μm) ulokowanych terminalnie bądź subterminalnie, któremu może towarzyszyć odkształcenie komórek. Zawartość par zasad G+C wynosi około 51,6-53,3 mol% [5, 21, 23]. Cechą charakterystyczną jest obecność w ścianie komórkowej kwasów tłuszczowych ω -cykloheksanowych C_{17:0}, C_{19:0}, kwasu palmitynowego C_{16:0}, kwasów izo C_{17:0}, anteizo C_{17:0}, śladowych ilości kwasów izo C_{15:0} i anteizo C_{15:0} oraz hopanoidów i sulfonolipidów [7, 12, 21]. *A. acidoterrestris* nie wytwarzają indolu, są oksydazo-ujemne, katalazo-dodatnie i zazwyczaj nie wytwarzają acetoiny [5]. Różnicowanie cech biochemicznych szczepów opisanych w literaturze jest znaczące. *A. acidoterrestris* wykorzystują glicerol, erytrytol, L-arabinozę, D-glukozę, D-fruktozę jako źródła węgla z wytworzeniem kwasu, natomiast nie wytwarzają kwasu z D-arabinozy, L-ksylozy, L-sorbozy, D-fukozy, L-arabitolu, dulcytolu, glukonianu potasu, 2 keto-glukonianu potasu, inuliny oraz N-acetyloglukozoaminy.

Bakterie *A. acidoterrestris* wykazują zdolność wzrostu w zakresie pH 2,2-5,8, z optimum pH około 4,0 [3, 5, 21]. Według innych źródeł, szczepy *A. acidoterrestris* wyizolowane z zepsutych kwaśnych napojów wykazywały wzrost w zakresie pH 2,5-6,0 [23]. Odnotowano także wzrost izolatów bakterii *A. acidoterrestris* pozyskanych z zagęszczonych polskich soków jabłkowych, w zakresie pH od 2,5 do 6,0; z optimum wzrostu w zakresach pH od 3,5 do 5,0; w zależności od szczepu [18]. Bakterie *A. acidoterrestris* cechuje również wzrost w szerokim przedziale temperaturowym. Najczęściej cytowany w literaturze zakres temperatury wzrostu to 20-60°C, z optimum około 40-53°C [5, 23, 18]. Skrajne wartości temperatur, w których obserwowano wzrost bakterii *A. acidoterrestris* to 19,5°C oraz 57,7°C [11].

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* wykazują zdolność do bytowania w ekstremalnych warunkach środowiskowych, ale również stanowią element naturalnej flory bakteryjnej w klimacie umiarkowanym, kolonizując glebę i powierzchnie roślin. Zdziwiająca jest powszechność występowania tych bakterii również w Polsce, a cechy szczepów izolowanych z polskich sadów nie zostały dotychczas opisane. Celem badań była charakterystyka profilu biochemicznego polskich izolatów środowiskowych bakterii *A. acidoterrestris* pozyskanych z gleby, kory jabłoni i jabłek oraz wskazanie zakresu temperatur wzrostu i tolerancji na kwasowość środowiska.

2. Metodyka

Mikroorganizmy

W badaniach wykorzystano 15 szczepów bakterii *A. acidoterrestis* izolowanych z sadów owocowych w regionie łódzkim, oznaczonych symbolami: 007, 008, 009, 024, 025, 026, 027, 040, 041, 042, 055, 056, 057, 062, 063. Materiał do badań pobrano z powierzchni jabłek, kory jabłoni i gleby sadów. Jako szczep odniesienia zastosowano bakterie *A. acidoterrestis* DSM 3922, (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Niemcy). Bakterie przechowywano na pożywce BAT agar (Merck, Niemcy) w temperaturze 4°C. Przed każdym eksperymentem szczepy aktywowano przez dwukrotny pasaż w pożywce płynnej BAT (Merck, Niemcy), inkubując hodowle w temperaturze 44°C przez 24 h.

Badania profilu metabolicznego bakterii

W celu określenia zdolności bakterii do asymilacji wybranych związków jako jedynego źródła węgla, wykonano posiew kłuty zawiesiny aktywnych komórek na pożywkę BAM Agar (Merck, Niemcy), zawierającej 0,1% odpowiedniego związku. Hodowle inkubowano w temperaturze 44°C w czasie 4 dni. Badano zdolność asymilacji 1 – erytrytolu, 2 – D-glukozy, 3 – D-fruktozy, 4 – skrobi, 5 – D-sacharozy, 6 – D-rafinozy, 7 – D-maltozy, 8 – D-mannozy, 9 – L-arabinozy, 10 – D-galaktozy, 11 – D-sorbitolu, 12 – D-mannitolu, 13 – D-ksylozy, 14 – D-celobiozy, 15 – L-ramnozy, 16 – D-laktozy. Zdolność asymilacji erytrytolu dodatkowo potwierdzano prowadząc hodowle na pożywce BAT EB Agar (Merck, Niemcy) w temperaturze 44°C w czasie 4 dni.

Badania wpływu temperatury na wzrost bakterii

Płynną pożywkę BAT o pH 4,0 o objętości 9,9 mL inokulowano 0,1 mL zawiesiny aktywnych komórek bakterii, po czym prowadzono hodowle w czasie 6 dni w temperaturze 20, 25, 30, 37, 44, 50, 55 lub 60°C. Po 24, 48 i 144 godzinach inkubacji wykonywano pomiar gęstości optycznej hodowli (OD) za pomocą spektrofotometru T60 UV/Vis, (PG Instruments Ltd., Lutterworth, Wielka Brytania) przy długości fali 520 nm.

Badania wpływu kwasowości środowiska na wzrost bakterii

Zdolność wzrostu bakterii badano analogicznie jak w ocenie wpływu temperatury na wzrost bakterii, przy czym pożywkę stanowił bulion BAT o różnej kwasowości. pH pożywek wynosiło 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 lub 6,0. Hodowle inkubowano przez 6 dni w temperaturze 44°C. Po 24, 48 i 144 godzinach inkubacji wykonywano pomiar gęstości optycznej hodowli (OD) za pomocą spektrofotometru T60 UV/Vis, (PG Instruments Ltd., Lutterworth, Wielka Brytania) przy długości fali 520 nm.

3. Wyniki i dyskusja

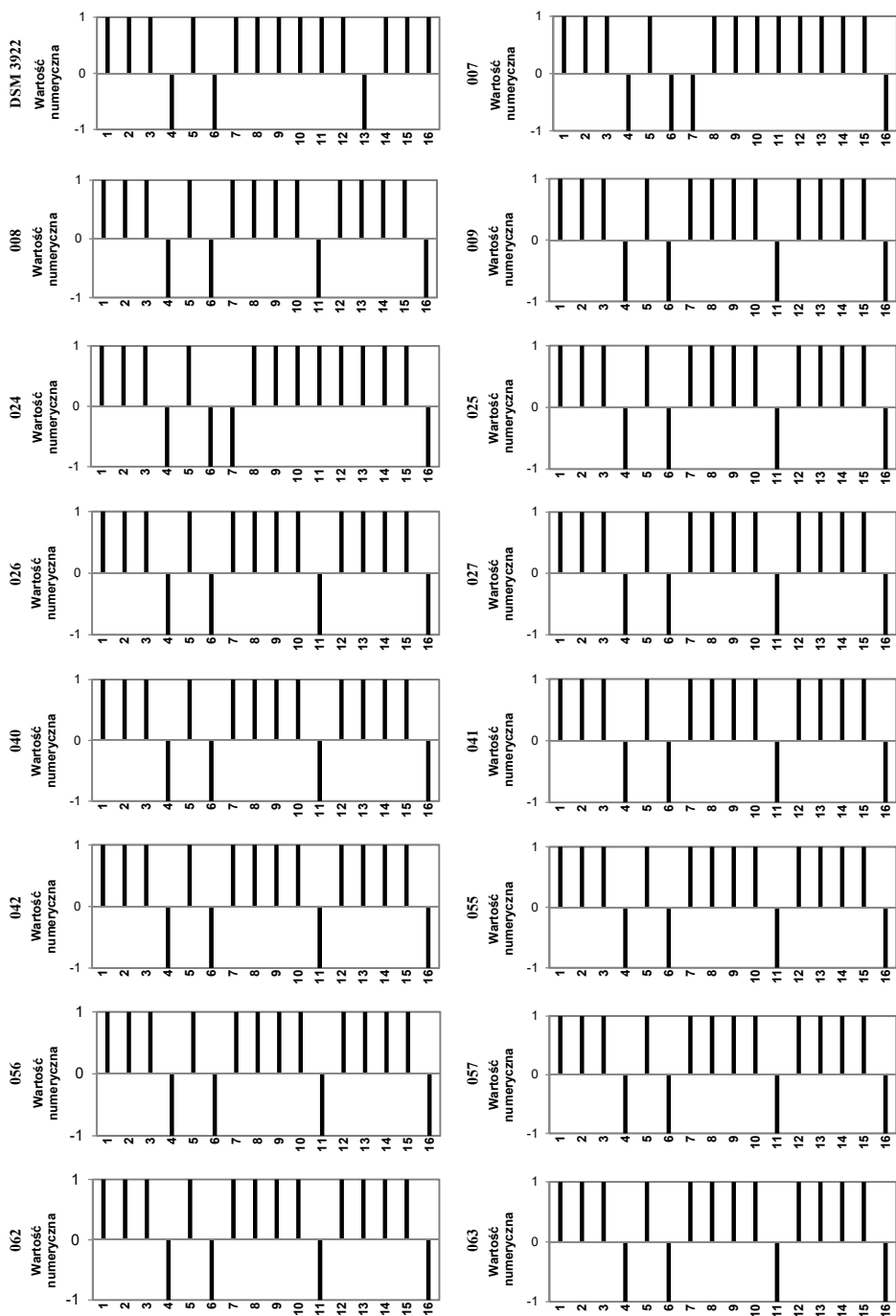
Profile biochemiczne izolatów środowiskowych A. acidoterrestris

Ze względu na różnorodność bakterii *Alicyclobacillus* sp. oraz ich głęboką adaptację do ekstremalnych środowisk naturalnych, izolaty różnego pochodzenia charakteryzowane są pod względem zdolności metabolicznych. Dane literaturowe szczegółowo podają profile biochemiczne izolatów. Zdolność bakterii *A. acidoterrestris* do asymilacji jako jedyne źródła węgla badano dla 16 wybranych związków.

Wszystkie badane w niniejszej pracy izolaty asymilowały erytrytol, D-glukozę, D-fruktozę, D-sacharozę, D-mannozę, L-arabinozę, D-galaktozę, D-mannitol, D-ksylozę, D-celobiozę oraz L-ramnozę z wytworzeniem kwasu (Wykres 1). Według danych literaturowych, bakterie należące do gatunku *A. acidoterrestris* asymilowały również erytrytol, D-glukozę, D-fruktozę i L-arabinozę [1, 2, 8, 9, 12, 16, 18]. Ponadto, szczepy bakterii *A. acidoterrestris*, za wyjątkiem nielicznych szczepów izolowanych z polskich środowisk przemysłowych przez Sokołowską i wsp. [18], wykorzystywały D-galaktozę, D-mannozę, D-mannitol oraz L-ramnozę. Dane literaturowe dotyczące zdolności asymilacji D-sacharozy są zróżnicowane. Nie stwierdzono asymilacji tego cukru przez szczepy izolowane w Polsce, w Turcji oraz przez szczep referencyjny *A. acidoterrestris* DSM 2498 [2, 16, 18]. Natomiast, szczepy izolowane z gleb, surowców i środowisk przemysłowych Południowej Afryki, jak również szczepy *A. acidoterrestris* DSM 3922 i DSM 3923, wykorzystywały D-sacharozę [1, 8, 9, 12].

Badane w tej pracy izolaty środowiskowe wykorzystywały D-ksylozę jako jedyne źródło węgla (Wykres 1), podobnie jak większość szczepów *A. acidoterrestris* opisanych w literaturze, ale odmiennie niż szczepy pochodzące z Południowej Afryki oraz *A. acidoterrestris* DSM 3922 [1, 6, 8, 10]. D-celobiozę asymilowały wszystkie badane izolaty *A. acidoterrestris*, tak jak szczepy izolowane w Niemczech, Afryce, oraz większość szczepów izolowanych ze środowisk przemysłowych w Polsce. Brak tej cechy obserwowano dla szczepu referencyjnego *A. acidoterrestris* DSM 2498 oraz izolatów pochodzących z Turcji [2, 16].

Dwa spośród badanych izolatów, *A. acidoterrestris* 007 i 024, nie wykazywały zdolności asymilacji D-maltozy (Wykres 1), analogicznie jak uprzednio stwierdzono dla szczepu *A. acidoterrestris* DSM 2498, szczepów izolowanych w Turcji oraz większości szczepów izolowanych z soków w Polsce. Odnotowano wykorzystywanie tego związku przez *A. acidoterrestris* DSM 3922 i DSM 3923 oraz szczepy pochodzące z Afryki Południowej, podobnie jak dla pozostałych szczepów badanych w niniejszej pracy [2, 16, 18].



Wykres 1. Profile biochemiczne bakterii *A. acidoterrestris*; wartości numeryczne 1 lub -1 oznaczają asymilację źródła węgla z wytworzeniem kwasu lub brak tej cechy; 1-16 rodzaj źródła węgla podano w metodyce

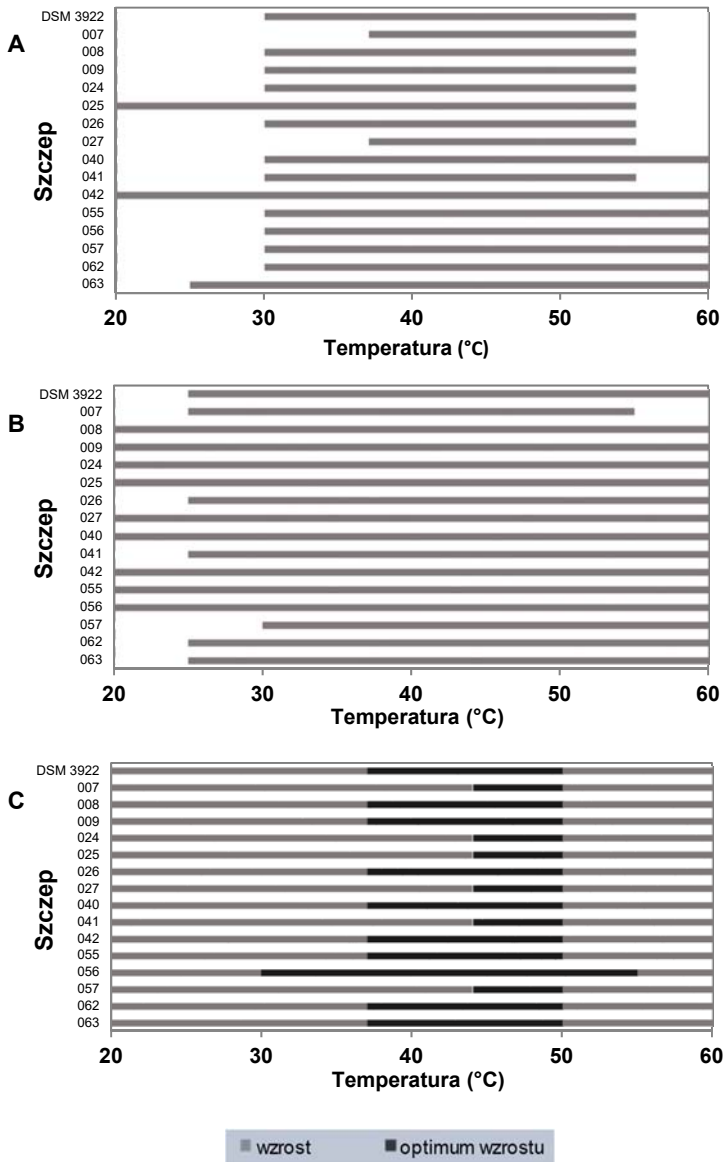
Preferencje temperaturowe A. acidoterrestris

Badano zdolność izolatów środowiskowych do wzrostu w zakresie temperatur 20-60°C. Do badań przyjęto wartości temperatury, w których stwierdzano rozwój bakterii *Alicyclobacillus* sp. [4, 18, 22]. Wszystkie izolaty wykazywały zdolność wzrostu w temperaturach 20-60°C, z optimum specyficznym dla bakterii termofilnych (37-50°C) (Wykres 2). Bakterie termofilne, pomimo wysokich optymalnych temperatur wzrostu, mogą rosnąć w szerokim zakresie temperatur, przy czym poziom namnożenia biomasy jest zróżnicowany, zależnie od temperatury hodowli.

Po 24-godzinnej hodowli, izolaty środowiskowe podzielono na cztery grupy, zgodnie z zakresem temperatury, w której odnotowano ich wzrost. W pierwszej grupie umieszczono 5 izolatów środowiskowych (008, 009, 024, 026, 041) oraz szczep referencyjny *A. acidoterrestris* DSM 3922 (Wykres 2). Wszystkie te szczepy wykazywały wzrost w temperaturach od 30 do 55°C. Najwyższy przyrost biomasy dla *A. acidoterrestris* 026 i 041 oraz szczepu referencyjnego odnotowano w temperaturze 44°C, dla *A. acidoterrestris* 008 i 024 w temperaturze 50°C, a dla szczepu *A. acidoterrestris* 009 w temperaturze 37°C. Druga grupa szczepów to pięć izolatów środowiskowych (040, 055, 056, 057, 062) rosnących w szerszym zakresie temperatur tj. od 30 do 60°C (Wykres 2). Wszystkie te izolaty, poza *A. acidoterrestris* 055, cechował najwyższy przyrost biomasy w temperaturze 50°C. Trzecia grupa szczepów wykazywała wzrost w najwęższym zakresie temperatur (37-55°C), z najwyższym przyrostem biomasy w temperaturze 50°C. Zaklasyfikowano tu dwa izolaty środowiskowe *A. acidoterrestris* 007 i 027 (Wykres 2). W czwartej grupie znajdują się 3 izolaty środowiskowe *A. acidoterrestris* (025, 042, 063) o największej tolerancji temperaturowej, przy czym izolat *A. acidoterrestris* 042 rósł w temperaturach od 20 do 60°C, osiągawszy najwyższy przyrost biomasy w temperaturze 37°C.

Po 48 godzinach inkubacji stwierdzono wzrost 56% izolatów w zakresie temperatur 20-60°C, podobnie jak szczepu referencyjnego *A. acidoterrestris* DSM 3922. Wyjątek stanowiły izolat *A. acidoterrestris* 057, którego wzrost obserwowano dopiero w temperaturze 30°C oraz *A. acidoterrestris* 007 rosnący w temperaturze 25-55°C. Wzrost pozostałych izolatów (026, 041, 062, 063) stwierdzano w temperaturze od 25 do 60°C (Wykres 2).

Wydłużenie inkubacji do 6 dni spowodowało, że wszystkie badane szczepy wykazywały wzrost w zakresie temperatur 20-60°C, przy zróżnicowanych temperaturach optymalnych (Wykres 2). Wyodrębniono dwie grupy szczepów o optymalnych temperaturach wzrostu. Do pierwszej grupy zaklasyfikowano 8 izolatów środowiskowych (008, 009, 026, 040, 042, 055, 062, 063) o optimum wzrostu w zakresie 37-50°C, podobnie jak szczep referencyjny *A. acidoterrestris* DSM 3922 badany w niniejszej pracy. Izolaty *A. acidoterrestris* 007, 024, 025, 027, 041 i 057 zaliczono do drugiej grupy szczepów wykazujących optimum wzrostu w temperaturze 44-50°C.



Wykres 2. Zakres temperatur wzrostu izolatów środowiskowych *A. acidoterrestris*: A-po 24 godzinach inkubacji, B-po 48 godzinach inkubacji, C-po 6 dniach inkubacji

Najszerzy zakres optymalnej do wzrostu temperatury stwierdzono dla izolatu *A. acidoterrestris* 056. Szczep ten już po 48-godzinnej inkubacji cechował intensywny przyrost biomasy w temperaturach od 30 do 55°C.

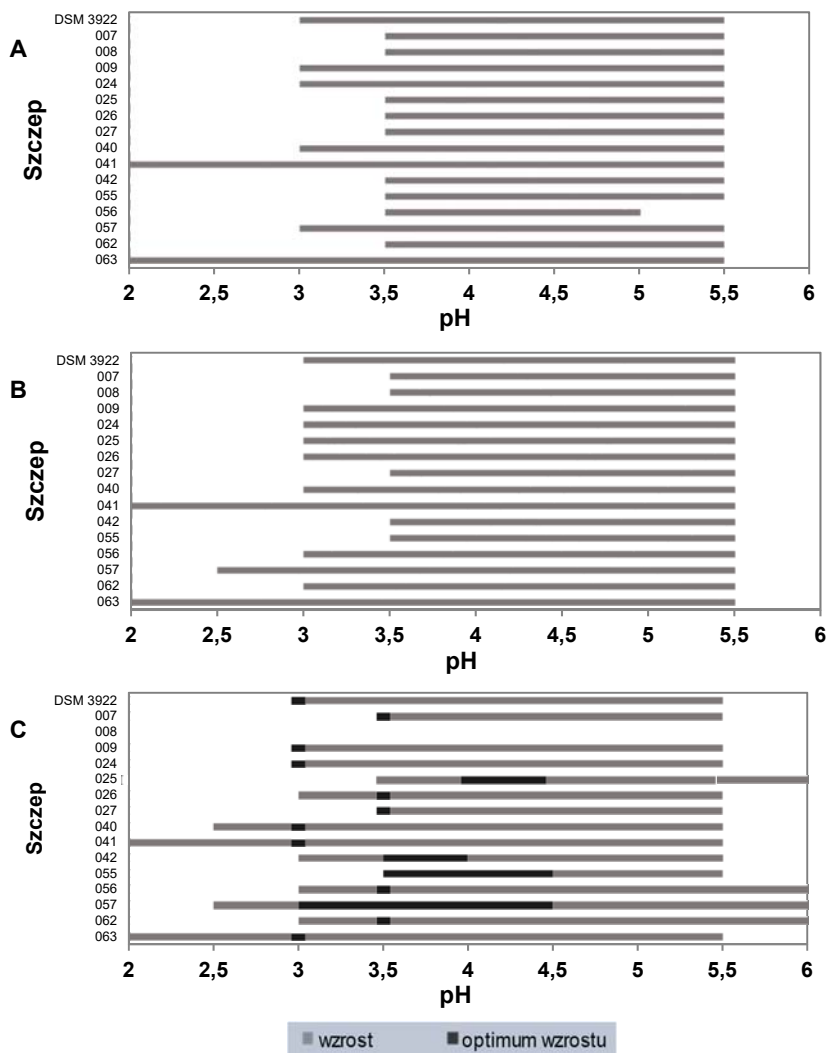
Szczep *A. acidoterrestris* wyizolowany i scharakteryzowany przez Deinharda i wsp. [5], uznawany jako szczep referencyjny DSM 3922 lub ATCC 49025, wykazuje wzrost w temperaturze od 20 do 55°C, z optimum w zakresie 42-53°C.

Wzrost szczepu referencyjnego obserwowano w badanych temperaturach, za wyjątkiem temperatury 60°C (wykres 2). Ponadto, ze względu na intensywny przyrost biomasy szczepu w temperaturze 37°C stwierdzono, iż jego optimum temperaturowe przypada w zakresie 37-50°C, co jest zgodne z danymi literaturowymi [5, 21]. Bakterie *A. acidoterrestris* izolowane ze środowisk naturalnych i przemysłowych wykazują podobne cechy. W większości prac badawczych, rozwój *A. acidoterrestris* stwierdzano w zakresie temperatur 20-55°C, zarówno w pożywkach hodowlanych, jak i sokach owocowych. Wartości optymalne do wzrostu są natomiast odmienne i charakterystyczne dla danego szczepu. Zwykle jednak zakres optymalnych do wzrostu tych acydotermofilnych bakterii temperatur to 37-55°C [11, 15, 17, 19, 22, 23]. Izolaty środowiskowe badane w niniejszej pracy potwierdzają różnorodność oraz adaptację *A. acidoterrestris* do zmiennych warunków temperaturowych. Stwierdzono rozwój wszystkich izolatów w zakresie temperatur 20-60°C, a wyznaczone optymalne zakresy temperatur to 37-50°C (8 izolatów), 44-50°C (6 izolatów) oraz 30-55°C (izolat *A. acidoterrestris* 056). Badania Yamazaki i wsp. [23] oraz Jensen i Whitfield [11] również pokazują, że szczepy środowiskowe mogą rozwijać się w mniej sprzyjających, niż dla szczepów referencyjnych, warunkach. Najniższa cytowana w literaturze temperatura, w której odnotowano wzrost bakterii *A. acidoterrestris* to 19,5-20,6°C, zaś najwyższa to 57,5-60°C [11, 23]. Ponadto, zarówno w niniejszej pracy, jak i pracach innych autorów potwierdzono, że wydłużenie czasu hodowli pozwala na rozwój bakterii *A. acidoterrestris* nawet w temperaturach optymalnych dla bakterii mezofilnych [15, 18, 22].

Tolerancja kwasowości środowiska

Bakterie acydofilne *A. acidoterrestris* mogą wykazywać wzrost w szerokim zakresie pH [5, 18, 22, 23], zatem dla izolatów środowiskowych sprawdzono tolerancję kwasowości środowiska w przedziale wartości pH od 2,0 do 6,0. Wszystkie badane izolaty środowiskowe to bakterie kwasolubne wykazujące zdolność wzrostu w zakresie pH od 3,5 do 5,5 niezależnie od czasu hodowli, za wyjątkiem *A. acidoterrestris* 056 (Wykres 3). Bakterie klasyfikowane jako ekstremofilne charakteryzują się zwykle długim czasem generacji, a zasiedlanie przez nie środowiska trwa dłużej niż 24 godziny. Połowa spośród badanych izolatów (*A. acidoterrestris* 007, 008, 025, 026, 027, 042, 055, 056) wykazywała wzrost już po 24 godzinach inkubacji w pożywce o pH od 3,5 do 5,5. Najniższą tolerancję kwasowości środowiska oraz najniższy przyrost biomasy stwierdzono dla izolatu *A. acidoterrestris* 056. Rozwój izolatów środowiskowych 041 i 063 obserwowano przy badanych pH, za wyjątkiem pH 6,0. Szczepy te wykazywały również najbardziej dynamiczny wzrost w pożywce o pH 3,0.

Po 48 godzinach inkubacji stwierdzono wzrost wszystkich izolatów środowiskowych w pożywce o pH 5,5, czterech izolatów środowiskowych (025, 026, 056, 062) w hodowlach w pożywce o pH 3,0 oraz izolatu *A. acidoterrestris* 057 w pożywce o pH 2,5 (wykres 3).



Wykres 3. Zakres pH środowiska dla wzrostu izolatów środowiskowych *A. acidoterrestris*: A-po 24 godzinach inkubacji, B-po 48 godzin inkubacji, C-po 6 dniach inkubacji

Po 6 dniach hodowli stwierdzono rozwój 4 izolatów *A. acidoterrestris* (025, 056, 057, 062) w pożywce o pH 6,0 oraz dwóch izolatów przy niższych wartościach pH. Wzrost izolatu 040 odnotowano w pożywce o pH 2,5, zaś izolatu 042 w pożywce o pH 3,0.

Optymalne wartości pH dla wzrostu badanych szczepów bakterii *A. acidoterrestris* były zróżnicowane. Stwierdzono optimum wzrostu 2 izolatów w zakresie pH od 3,5 do 5,0 i pH od 3,0 do 4,5 (odpowiednio *A. acidoterrestris* 025 i 055), 5 izolatów w pH 3,5 (007, 026, 027, 056, 062) oraz 5 izolatów (009, 024, 040, 041, 063) w pH 3,0, podobnie jak szczepu referencyjnego *A. acidoterrestris* DSM 3922. Optymalne do wzrostu dla izolatu środo-

wiskowego 055 pH wynosiło w zakresie od 3,5 do 4,5. Dla pozostałych dwóch izolatów środowiskowych, 008 i 042, optymalne do ich wzrostu pH wynosiło odpowiednio w zakresach od 4,0 do 4,5 i od 3,5 do 4,0 (wykres 3).

Jedne z pierwszych doniesień naukowych dotyczących bakterii *A. acidoterrestris* opisują izolaty pozyskane z gleby przez Deinhard i wsp. [5], scharakteryzowane przez Wisotzkey i wsp. [21] i uznane za szczep referencyjny *A. acidoterrestris* DSM 3922. Bakterie te wykazywały wzrost w środowisku kwaśnym o pH 2,2-5,8, z optimum wzrostu przy pH 3,5-4,0, co zostało potwierdzone badaniami Yamazaki i wsp. [23]. Według danych literaturowych, bakterie *A. acidoterrestris* pochodzące z różnych źródeł wykazują podobne zdolności. Najczęściej cytowane w literaturze wartości pH, przy których stwierdzano rozwój *A. acidoterrestris*, zarówno w pożywkach hodowlanych jak i sokach owocowych, to 2,5-6,0, ze zróżnicowanym dla każdego szczepu optimum w granicach pH 3,5-5,0 [11, 13, 14, 18, 23, 24].

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy dla szczepów *A. acidoterrestris* izolowanych z naturalnych środowisk, pozostają zgodne z danymi literaturowymi. Wszystkie izolaty cechował szybki wzrost w pożywce o pH w zakresie 3,5-5,5, z optimum w granicach 3,0-5,0. Ponadto stwierdzono, że wydłużenie czasu hodowli środowiskowych szczepów może sprzyjać ich adaptacji do panujących warunków, a tym samym zasiedlaniu środowisk o wysokiej kwasowości (pH 2,0-2,5) oraz bliskim neutralnemu pH (pH 6,0) (wykres 3).

4. Podsumowanie

Po raz pierwszy przedstawiono charakterystykę biochemiczną szczepów środowiskowych *A. acidoterrestris* izolowanych w Polsce, pochodzących ze środowiska produkcji pierwotnej (sady jabłoni). Biorąc pod uwagę możliwość wnikania tych szczepów do zakładów produkcji soków i koncentratów soków jabłkowych, ich pełna charakterystyka umożliwi rozpoznanie zagrożenia na poziomie produkcji wtórnej. Izolaty *A. acidoterrestris* charakteryzowały się profilem biochemicznym zbliżonym do opisanych w literaturze szczepów izolowanych w Niemczech i Turcji oraz odmiennym niż szczepy izolowane w Afryce. Międzyszczepowa zmienność metaboliczna świadczy o różnorodności w obrębie tego gatunku bakterii. Izolaty wykazywały wzrost w szerokim zakresie temperatur 20-60°C, z optymalną temperaturą wzrostu w zakresie 30-55°C oraz w szerokim zakresie pH od 2,2 do 5,8, ze zróżnicowanym szczepowo optimum w zakresie 3,5-5,0. Wydłużenie czasu hodowli skutkowało adaptacją szczepów do temperatury optymalnej dla bakterii mezofilnych.

Literatura

- [1] Albuquerque L., Rainey F.A., Chung A.P., Sunna A., Nobre M.F., Grote R., Antranikian G., Da Cost, M.S.: *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov., and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, (2000), 451-457.
- [2] Bahçeci K.S., Gökmen V., Acar J.: Occurrence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on apples and in apple juice concentrates and effect of process technology on *A. acidoterrestris* spores in apple juice, *Fruit Processing*, 10, (2005), 328-331.
- [3] Cerny G., Hennlich W., Poralla K.: Fruchtsaftverderb durch Bacillen: isolierung und charakterisierung des verderbserregers, *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 179, (1984), 224-227.
- [4] Chen S., Tang Q., Zhang X., Zhao G., Hu X., Liao X., Chen F., Wu J., Xiang H.: Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment, *Food Microbiology*, 23, (2006), 439-445.
- [5] Deinhard G., Blanz P., Poralla K., Altan E.: *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils, *Systematic and Applied Microbiology*, 10, (1987), 47-53.
- [6] Goto K., Mochida K., Asahara M., Suzuki M., Kasai H., Yokota A.: *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, (2003), 1537-1544.
- [7] Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Fujita R., An S.-Y., Kasai H., Yokota A.: Proposal of six species of moderately bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangioides*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, (2007), 1276-1285.
- [8] Groenewald W.H., Gouws P.A., Witthuhn R.C.: Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa, *Food Microbiology*, 26, (2009), 71-76.
- [9] Groenewald W.H., Gouws P.A., Witthuhn R.C.: Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa, *Extremophiles*, 12, (2008), 159-163.
- [10] Imperio T., Viti C., Marri L.: *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the North-West slope of Mount Melbourne (Antarctica), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, (2008), 221-225.
- [11] Jensen N., Whitfield F.B.: Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice, *Letters in Applied Microbiology*, 36, (2003), 9-14.
- [12] Matsubara H., Goto K., Matsumura T., Mochida K., Iwaki M., Niwa M., Yamasato K.: *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, ω -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, (2002), 1681-1685.
- [13] Molva C., Baysal A.H.: Antimicrobial activity of grape seed extract on *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice, *Food Science and Technology*, 60, (2015), 238-245.
- [14] Peña W.E.L., De Massaguer P.R., Zuñiga A.D.G., Saraiva S.H.: Modeling the growth limit of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 in apple juice: effect of pH, Brix, temperature and nisin concentration, *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, (2011), 509-517.
- [15] Pettipher G.L., Osmundson M.E., Murphy J.M.: Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks, *Letters in Applied Microbiology*, 24, (1997), 185-189.
- [16] Previdi M.P., Colla F., Vicini E.: Characterization of *Alicyclobacillus*, a spore forming thermophilic acidophilic bacterium, *Industria Conserve*, 70, (1995), 128-132.

- [17] Siegmung B., Pöllinger-Zierler B.: Odor threshold of microbially induced off-flavor compounds in apple juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, (2006), 5984-5989.
- [18] Sokołowska B., Niezgoda J., Bytońska M., Frankiel A.: Bioróżnorodność szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, 65, (2010), 29-38.
- [19] Tayefe M., Zade A.N., Asl M.S., Hashemi S.A.: Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from commercial spoiled apple juice and study on some influence parameters on its growth in apple juice, *Biological Forum - an International Journal*, 6, (2014), 41-45.
- [20] Walker M., Phillips C.A.: *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science and Technology*, 43, (2008), 250-260.
- [21] Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K.: Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, (1992), 263-269.
- [22] Witthuhn R.C., Smit Y., Cameron M., Venter P.: Isolation of *Alicyclobacillus* and the influence of different growth parameters, *International Journal of Food Microbiology*, 146, (2011), 63-68.
- [23] Yamazaki K., Teduka H., Shinano H.: Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 60, (1996), 543-545.
- [24] Zhang J., Yue T., Yuan Y.: *Alicyclobacillus* contamination in the production line of kiwi products in China, *PLoS ONE*, 8, (2013), e67704.

ENVIRONMENTAL CONSIDERATIONS OF ACIDOTHERMOPHILIC BACTERIA *ALICYCLOBACILLUS* *ACIDOTERRESTRIS*

Abstract: *Acidothermophilic bacteria Alicyclobacillus acidoterrestris* are the widespread contamination of juice and fruit juice concentrates. They are not only able to grow in extreme environmental conditions, but also are a part of the natural bacterial flora in a moderate climate, colonizing soil and plant surfaces. For the first time, it was shown the biochemical characteristics of the environmental *A. acidoterrestris* strains isolated in Poland, originating from primary production (orchards of apple trees). Taking into account the possibility of penetration of these strains for the production of juices and concentrates, apple juice, their full characteristics will enable the identification of contamination hazards at the level of a secondary production. Isolates of *A. acidoterrestris* were characterized by biochemical profile similar to that described in the literature of isolated in Germany and Turkey and different than the strains isolated in Africa. Their inter-strain metabolic variation testifies to the diversity within the species of bacteria. Isolates showed a growth in a wide temperature range of 20-60°C, with optimal growth temperature in the range of 30-55°C and in a wide range of pH from 2.2 to 5.8, with a strain-dependent optimum in the range of 3.5-5.0. An increase in the incubation time resulted in an adaptation of strains to the temperature optimal for mesophilic bacteria.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, acidothermophilic bacteria, environmental bacterial isolates

OZNACZANIE AZOTOANÓW(III) I AZOTANÓW(V) W PRODUKTACH GARMAŻERYJNYCH

Katarzyna WYKA*, Magdalena GAJEWSKA,
Beata BARTODZIEJSKA, Anna SZOSLAND-FAŁTYN

*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego,
Zakład Jakości Żywności, al. M. J. Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź.*

*katarzyna.wyka@ibprs.pl

Streszczenie: *Celem badań było określenie zawartości azotanów(III) i azotanów(V) w produktach garmażeryjnych – pulpetach w sosie pomidorowym, fasolce po bretońsku, gołąbkach w sosie pomidorowym oraz flakach po zamojsku. Gotowe produkty zawierają zarówno warzywa jak i przetwory mięsne, dlatego ważne jest aby wyrób końcowy spełniał normy odnośnie zawartości azotanów(III) i azotanów(V) jako dodatków do żywności i był bezpieczny dla konsumenta. Obecność azotanów(V) nie stanowi niebezpieczeństwa dla organizmu człowieka, natomiast przekroczenie dziennego dopuszczalnego spożycia azotanów(III) może znacząco wpłynąć na zdrowie, a nawet życie ludzkie. Do oznaczania zawartości azotanów(III) i azotanów(V) wykorzystano metodę chromatografii jonowej (IC) bez tłumienia przewodnictwa oraz detekcję fotodiodową (DAD). Materiał do badań stanowiły produkty zakupione w sieci handlowej, pochodzące od różnych producentów. Azotany(V) występowały we wszystkich badanych próbkach, ich zawartość była zróżnicowana i wynosiła 3,2 mg·kg⁻¹ do 116,5 mg·kg⁻¹. Azotany(III) wystąpiły tylko w dwóch z spośród dwudziestu badanych produktów, ich stężenie wynosiło 13,3 mg·kg⁻¹ oraz 4,9 mg·kg⁻¹. Wyniki wykazały, że produkty badanie nie stanowią zagrożenia dla konsumentów.*

Słowa kluczowe: azotany(III), azotany(V), IC-DAD, produkty garmażeryjne

1. Wprowadzenie

Azotany(III) i azotany(V) są związkami nieorganicznymi powszechnie występującymi w środowisku: woda, gleba, żywność. Jest to konsekwencją obiegu azotu w przyrodzie, zastosowaniem ich w przemyśle spożywczym a także zanieczyszczeniami antropogenicznymi [1,3,9,11]. W żywności największym źródłem azotanów(V) są warzywa, w szczególności te części roślin, które biorą czynny udział podczas transportu substancji odżywczych. W konsekwencji większa zawartość azotanów(V) będzie występowała w warzywach liściastych, a niżeli w warzywach korzeniowych, najmniejszym źródłem azotanów(V) będą natomiast warzywa owocowo-nasienne [2,3,8]. Na zawartość azotanów(V) w roślinach może także wpływać zbyt obfite stosowanie nawozów, typ gleby, nasłonecznienie, wilgotność oraz jej pH. Dodatkowo niedobór molibdenu może powodować wzrost stężenia azotanów(V) w roślinach, ponieważ bierze on udział w redukcji cząsteczek azotu

atmosferycznego do jonów amonowych. Reakcja ta katalizowana jest przez kompleks nitrogenazy, który składa się z reduktazy nitrogenazy – białka, które zawiera kompleksy żelazosiarczkowe, oraz właściwej nitrogenazy – białka, które jako kofaktor zawiera między innymi molibden. [2, 15]. Ograniczenie dostarczania azotanów pochodzenia roślinnego jest możliwe poprzez stosowanie upraw ekologicznych, dzięki którym możliwe jest zmniejszenie nawet o 50% ilości dostarczonych związków do organizmu [6]. W surowcach pochodzenia odzwierzęcego również występują azotany(V), ma to związek z pojeniem zwierząt wodą pitną, a także karmieniem zwierząt hodowlanych paszami z dodatkami związków azotowych [1]. Także w przetwórstwie mięsnym stosowane są związki azotanów jako dodatki do żywności, wykorzystywane w licznych procesach technologicznych. Stosuje się azotany(III) jako sole potasowa (E 249) i sodowa (E 250) oraz azotany(V) również jako sole potasowe (E 251) i sodowe (E 252). Dodawane są one do produktów mięsnych aby nadać im stabilną, ciepłooporną czerwono-różową barwę, poprawić i utrwalić ich zapach oraz smak, a także wpływają na przedłużenie czasu trwałości przez działanie bakteriobójcze (np. na *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*). Dodatkowo zapobiegają one rozwojowi *Clostridium botulinum* - bakterii, która wytwarza toksynę, tak zwany jad kiełbasiany. Jest ona uważana za jedną z najsilniejszych trucizn biologicznych [3].

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wydała opinie, w której stwierdza iż obecność azotanów(III) i azotanów(V) w żywności, a szczególnie w ich dużych stężeniach, które przekraczają dopuszczalne normy, stanowi zagrożenie dla ludzkiego zdrowia. Obecność tych związków w żywności może skutkować zatruciami układu pokarmowego, a także wywoływać skutki toksykologiczne. Azotany mogą powodować obniżenie wartości odżywczych produktów spożywanych przez konsumenta, za sprawą ograniczenia wykorzystania przez organizm pozostałych składników obecnych w diecie, a także powodować rozkład witaminy A, witamin z grupy B oraz karotenu [13, 3]. Jeżeli chodzi o azotany(V) to nie powodują one bezpośredniego ryzyka dla człowieka, dostarczone z pożywieniem są stosunkowo szybko wchłaniane a następnie wydalane w niezmienionej postaci z moczem, azotany(III) mogą natomiast wpływać negatywnie na zdrowie ludzi [1, 5, 12]. Azotany(III) stanowią niebezpieczeństwo ponieważ mogą trwale wiązać się z heomoglobina, blokując ją, co w konsekwencji uniemożliwia transport tlenu wewnątrz organizmu, prowadząc do niedotlenienia tkanek oraz organów. Dodatkowo powodują rozszerzenie wszelkich naczyń krwionośnych u człowieka, a także działają rozkurczowo na mięśnie gładkie. W przypadku ostrych zatruc azotanami(III) pierwsze objawy pojawiają się szybko, już po około 30 minutach może pojawić się zaczerwienienie powłok skórnych oraz twarzy, zawroty głowy, bóle brzucha, duszności, sinica, która będzie objawem wystąpienia methemoglobinemii, a także tachykardia, spadek ciśnienia krwi, zamroczenie, a w konsekwencji zapaść. Duże ryzyko wystąpienia „przedawkowania” azotanami(III) występuje u niemowląt i dzieci, ponieważ ich hemoglobina jest bardziej podatna na działanie

tych związków. Azotany(III) Wpływają również na powstawanie nitrozoamin – wykazują one działanie kancerogenne, teratogenne oraz mutagenne, ich ilość zależna jest od ilości azotynów (III) w danym produkcie [3, 4, 7].

Dopuszczalne dzienne spożycie (ADI – *Acceptable Daily Intake*) azotanów(V), zgodnie z zaleceniami WHO nie powinno przekraczać $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ masy ciała, a azotanów(III) $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [3, 13]. Najwyższe dopuszczalne poziomy związków azotanów w środkach spożywczych określono również w ustawodawstwie europejskim [1, 10]. Ważne aby pamiętać iż przyjęcie 1g azotanu(III) potasu może już spowodować zatrucie organizmu, natomiast przyjęcie ok 4 g może być dawką śmiertelną dla dorosłego człowieka. Podobna zależność występuje w przypadku azotanu(V) sodu. Dla niemowląt i dzieci wartości te są znacząco mniejsze [3].

Biorąc pod uwagę wszystkie możliwe źródła azotanów(III) i azotanów(V) z jakich dostarczamy te związki oraz ewentualne konsekwencję dla organizmu człowieka, ważna jest kontrola żywności pod tym względem. Produkty garmażeryjne łączą ze sobą te źródła – warzywa, przetwory mięsne, dlatego zasadnym jest prowadzenie badań w celu oznaczenia zawartości związków azotanów(V) oraz azotanów(III) w produktach końcowych. W wyrobach garmażeryjnych, wędlinach oraz konserwach mięsnych łączna zawartość azotanów(III) i azotanów(V) nie może przekraczać $125 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ wyrobu [14].

2. Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły produkty garmażeryjne – pulpety w sosie pomidorowym, fasolka po bretońsku, flaki po zmojsku oraz gołąbki w sosie pomidorowym. Przetwory zakupione były w sieci handlowej i pochodziły od różnych producentów z terenu całej Polski. Próbki badane były w różnych odstępach czasu.

Przygotowanie próbek oraz ich analizę wykonywano w ciągu jednego dnia. Produkty garmażeryjne homogenizowano, następnie homogeny materiał pobierano i odważono, za pomocą wagi analitycznej, ok. 2g do szklanych naczynek o pojemności 20 ml. Naczynka uzupełniano wodą ultraczystą (MilliQ), zakręcano za pomocą dopasowanych korków i mieszano w wytrząsarce typu Vortex. W kolejnym etapie próbkę umieszczano w wytrząsarce z łaźnią wodną w temperaturze 60°C i wytrząsano przez 60 minut. Po wystudzeniu, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, ilościowo przenoszono zawiesinę, dodając 10 ml acetonitrylu i uzupełniając do kreski wodą ultraczystą (MilliQ). Następnie za pomocą wytrząsarki typu Vortex próbkę energicznie mieszano i odstawiano na kolejne 10 minut. W celu usunięcia tłuszczu oraz cząstek białek próbki filtrowano wykorzystując system filtrowania Simplicity (Merck). Wszystkie próbki analizowano w dwóch powtórzeniach.

W celu oznaczenia ilościowego azotanów(III) oraz azotanów(V) wykonano krzywe kalibracyjne, jako substancję wzorcowe wykorzystano azotan(III) sodu oraz azotan(V) potasu firmy Merck. Stosując szereg rozcieńczeń przygotowano wzorce kalibracyjne dla pięciu stężeń azotanu(III) sodu, w zakresie od 1,2 do 11,6 mg·dm⁻¹, a także azotanu(V) potasu, które zostały przeliczone na azotan(V) sodu, w zakresie od 2,0 do 20,8 mg·dm⁻¹.

Wykorzystując chromatograf cieczowy Performance, firmy Shimadzu, w układzie dwukanałowym, wyposażonym w detektor DAD oraz automatyczny podajnik próbek, wykonano analizę azotanów(III) i (V). Detektor pracował przy długości fali $\lambda = 205\text{nm}$. Do rozdziału badanych związków zastosowano kolumnę Dionex IonPacTM AS11-HC o wymiarach 250 x 4 mm, 9 μm z prekolumną Dionex IonPacTM AG11-HC 50 x 4 mm, firmy Thermo Scientific. Jako fazę ruchomą zastosowano roztwór buforowy zawierający 12,5% acetonitrylu oraz 1,7% boranoglukonianu litu (roztwór wodny zawierający 12,5% glicerolu, 1,96% kwasu glukonowego, 3,4% kwasu borowego oraz 1,1% wodorotlenku litu) – o Ph 6,5 i izokratycznym przepływie 1,75 cm³·min⁻¹. Czas analizy wynosił 38 minut. Na szczyt kolumny chromatograficznej nastrzykiwano 80 μl zarówno roztworów wzorcowych jak i próbek. Porównując czasy retencji sygnałów pochodzących od substancji wzorcowych z sygnałami analizowanych próbek przeprowadzono identyfikację azotanów(III) i (V). W celu określenia zależności pomiędzy powierzchnią pików badanych związków a ich stężeniem w próbkach zastosowano analizę regresji liniowej. Współczynnik determinacji (r^2) w odniesieniu do azotanów(III) jak i azotanów(V) wyniósł $r^2 = 0,99$. Granice wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ) dla azotanu(III) sodu wynoszą odpowiednio 0,02 mg·kg⁻¹ oraz 0,05 mg·kg⁻¹, natomiast dla azotanu(V) sodu wynoszą odpowiednio 0,05 mg·kg⁻¹ oraz 0,10 mg·kg⁻¹.

3. Wyniki i dyskusja

Badane przetwory garmażeryjne różniły się od siebie zawartością azotanów(III) i azotanów(V). Pulpety w sosie pomidorowym zakupione były od trzech niezależnych producentów, każdy z nich deklarował brak azotanów(III) w swoich wyrobach. Wyniki badań potwierdziły takie założenia. W produktach obecne natomiast były azotany(V), ich stężenie wahało się od 6,6 mg·kg⁻¹ do 29,9 mg·kg⁻¹ (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość azotanów (III) i (V) w pulpetach w sosie pomidorowym

Nazwa produktu	Zawartość azotanów(III) [mg·kg ⁻¹] $\bar{x} \pm s$	Zawartość azotanów(V) [mg·kg ⁻¹] $\bar{x} \pm s$
Pulpety w sosie pomidorowym 1	nie wykryto*	28,8 ± 4,4
Pulpety w sosie pomidorowym 2	nie wykryto*	6,6 ± 1,7
Pulpety w sosie pomidorowym 3	nie wykryto*	22,3 ± 3,4
Pulpety w sosie pomidorowym 4	nie wykryto*	28,8 ± 4,4
Pulpety w sosie pomidorowym 5	nie wykryto*	7,9 ± 1,2
Pulpety w sosie pomidorowym 6	nie wykryto*	29,9 ± 4,6
Pulpety w sosie pomidorowym 7	nie wykryto*	26,2 ± 4,0
Pulpety w sosie pomidorowym 8	nie wykryto*	22,1 ± 3,4
Pulpety w sosie pomidorowym 9	nie wykryto*	14,3 ± 2,2
Pulpety w sosie pomidorowym 10	nie wykryto*	21,1 ± 3,2

Objaśnienia: \bar{x} – wartość średnia; s – odchylenie standardowe; n=2; * – granica oznaczalności – 0,05 mg·kg⁻¹.

Fasolka po bretońsku pochodziła od dwóch producentów i podobnie jak w przypadku pulpetów w sosie pomidorowym deklarowali oni brak obecności azotanów(III). Badania potwierdziły deklarację umieszczoną na etykietach produktów. Natomiast zawartość azotanów(V) sodu mieściła się w granicach od 3,2 mg·kg⁻¹ do 25,3 mg·kg⁻¹ (tab. 2).

Tabela 2. Zawartość azotanów(III) i (V) w fasolce po bretońsku

Nazwa produktu	Zawartość azotanów(III) [mg·kg ⁻¹] $\bar{x} \pm s$	Zawartość azotanów(V) [mg·kg ⁻¹] $\bar{x} \pm s$
fasolka po bretońsku 1	nie wykryto*	6,5 ± 1,0
fasolka po bretońsku 2	nie wykryto*	14,6 ± 2,2
fasolka po bretońsku 3	nie wykryto*	8,7 ± 1,7
fasolka po bretońsku 4	nie wykryto*	3,2 ± 0,8
fasolka po bretońsku 5	nie wykryto*	17,1 ± 2,6
fasolka po bretońsku 6	nie wykryto*	19,3 ± 3,0
fasolka po bretońsku 7	nie wykryto*	20,4 ± 3,1
fasolka po bretońsku 8	nie wykryto*	25,3 ± 3,5
fasolka po bretońsku 9	nie wykryto*	14,3 ± 2,2
fasolka po bretońsku 10	nie wykryto*	21,1 ± 3,2

Objaśnienia: \bar{x} – wartość średnia; s – odchylenie standardowe; n = 2; * – granica oznaczalności – 0,05 mg·kg⁻¹.

Kolejnym produktem garmażeryjnym poddanym badaniom były gołąbki w sosie pomidorowym. Dania te były zakupione od trzech producentów i tak jak było to we wcześniejszych przypadkach deklarowali oni na etykiecie brak dodatku azotanów(III) sodu. Badania potwierdziły te zapewnienia. Zawartość azotanów(V) sodu mieściła się w granicy od 14,4 mg·kg⁻¹ do 116,5 mg·kg⁻¹ (tab. 3). Wartości te były wyższe niż w przypadku wcześniejszych produktów, co mogło być spowodowane większą ilością warzyw, w tym przypadku kapusty, która jest jednym z głównych produktów używanych do wyrobu gołąbków.

Tabela 3. Zawartość azotanów(III) i (V) w gołąbkach w sosie pomidorowym

Nazwa produktu	Zawartość azotanów(III) [mg·kg ⁻¹] $\bar{x} \pm s$	Zawartość azotanów(V) [mg·kg ⁻¹] $\bar{x} \pm s$
gołąbki w sosie pomidorowym 1	nie wykryto*	68,5 ± 10,5
gołąbki w sosie pomidorowym 2	nie wykryto*	76,9 ± 11,8
gołąbki w sosie pomidorowym 3	nie wykryto*	14,4 ± 2,2
gołąbki w sosie pomidorowym 4	nie wykryto*	116,5 ± 17,8
gołąbki w sosie pomidorowym 5	nie wykryto*	74,4 ± 11,4
gołąbki w sosie pomidorowym 6	nie wykryto*	42,4 ± 6,5
gołąbki w sosie pomidorowym 7	nie wykryto*	96,8 ± 14,8
gołąbki w sosie pomidorowym 8	nie wykryto*	115,8 ± 17,7
gołąbki w sosie pomidorowym 8	nie wykryto*	68,7 ± 10,5
gołąbki w sosie pomidorowym 10	nie wykryto*	74,3 ± 11,4

Objaśnienia: \bar{x} – wartość średnia; s – odchylenie standardowe; n = 2; * – granica oznaczalności – 0,05 mg·kg⁻¹.

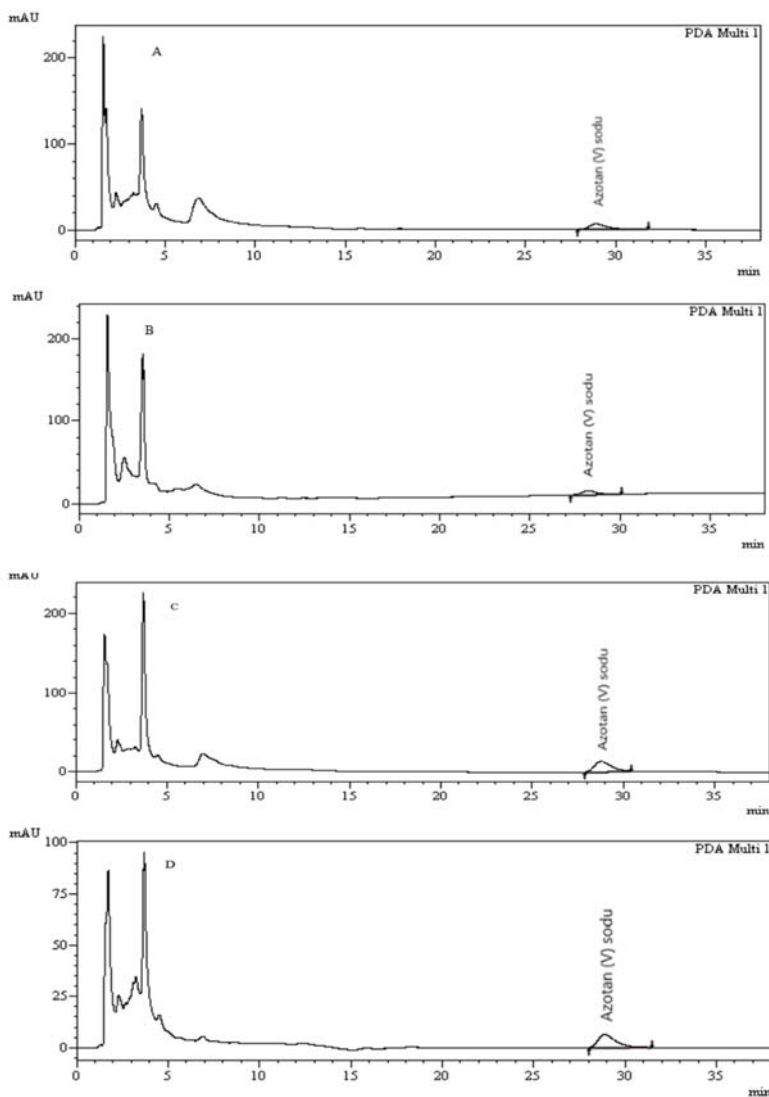
Ostatnim produktem, który został poddany badaniu były flaki po zamojsku. Pochodziły one od trzech producentów. W dwóch przypadkach wykryto azotany(III) w stężeniu 13,3 mg·kg⁻¹ oraz 4,9 mg·kg⁻¹. Mogło to być spowodowane użyciem różnych gatunków mięs, różnego ich pochodzenia, czy też różnicach w samym sposobie przygotowania dania. W pozostałych ośmiu przypadkach zawartość azotanów(III) była poniżej granicy oznaczalności (LOD), która wynosiła 0,05 mg·kg⁻¹. Natomiast zawartość azotanów(V) mieściła się w granicy od 12,5 mg·kg⁻¹ do 40,1 mg·kg⁻¹ (tab. 4).

Tabela 4. Zawartość azotanów(III) i (V) w flakach po zamojsku

Nazwa produktu	Zawartość azotanów(III) [mg·kg ⁻¹] $\bar{x} \pm s$	Zawartość azotanów(V) [mg·kg ⁻¹] $\bar{x} \pm s$
flaki po zamojsku 1	nie wykryto*	16,3 ± 2,5
flaki po zamojsku 2	nie wykryto*	21,3 ± 3,3
flaki po zamojsku 3	nie wykryto*	21,9 ± 3,4
flaki po zamojsku 4	nie wykryto*	31,2 ± 4,8
flaki po zamojsku 5	nie wykryto*	12,7 ± 1,9
flaki po zamojsku 6	13,3 ± 1,9	17,5 ± 2,7
flaki po zamojsku 7	nie wykryto*	24,2 ± 3,7
flaki po zamojsku 8	nie wykryto*	16,5 ± 2,5
flaki po zamojsku 9	4,9 ± 0,7	12,5 ± 1,9
flaki po zamojsku 10	nie wykryto*	40,1 ± 6,1

Objaśnienia: \bar{x} – wartość średnia; s – odchylenie standardowe; n = 2; * – granica oznaczalności – 0,05 mg·kg⁻¹.

Ponieważ produkty garmazeryjne są wyrobami zawierającymi dużą różnorodność składników istniało ryzyko, że złożone matryce będą stanowiły problem w uzyskaniu wyników. Badania wykazały jednak, że wszelkie niezidentyfikowane piki na chromatogramach miały inne czasy retencji niż azotany(III) i (V). Można zatem stwierdzić, że nie doszło do zafalszowania wyników (rys. 1).



Rysunek 1. Wybrane chromatogramy IC-DAD próbek: A – pulpety w sosie pomidorowym, B – fasolka po bretońsku, C – gołąbki w sosie pomidorowym, D – flaki po zamojsku.

4. Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników badań produktów garmażeryjnych, w tym przypadku pulpetów w sosie pomidorowym, fasolki po bretońsku, gołąbków w sosie pomidorowym oraz flaków po zamojsku, można stwierdzić, że są to produkty bezpieczne dla zdrowia i życia ludzi. W większości przypadków nie stwierdzono obecności azotanów(III). W dwóch przypadkach, w których wykryto azotany(III) ich stężenie było na tyle niskie, że konsumpcja tego wyrobu

nie spowodowałyby uszczerbku na zdrowiu. Jeżeli chodzi o azotany(V) to występowały one we wszystkich badanych obiektach. Ich stężenia wahały się od 3,2 mg·kg⁻¹ do 116,5 mg·kg⁻¹. Różnice te wynikały z charakteru dania oraz produktów wykorzystanych do jego przyrządzenia.

Literatura

- [1] Czajkowska A., Gajewska M., Bartodziejska B.: Adaptacja metody IC-DAD z własną modyfikacją przygotowania próbek do oznaczania zawartości azotanów(III) i azotanów(V) w produktach spożywczych, *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 6 (97), (2014), 92-101.
- [2] Niewczas J., Kamionowska M., Mitek M.: Zawartość azotanów(III) i (V) w owocach nowych odmian dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*), *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2 (47), (2006), 238-245.
- [3] Pospiech E., Frankowska A.: Azotany III i V – ich zastosowanie i przyszłość w przetwarzaniu mięsa, *Medycyna Weterynaryjna*, 65 (12), (2009), 803-806.
- [4] Świąder K., Piotrowska A., Rachtan-Janicka J., Rembiałkowska E., Kostyra E., Dybkowska E., Wilk S.: Możliwości otrzymywania funkcjonalnych produktów z mięsa wieprzowego poprzez modyfikowanie technologii ich wytwarzania, *Postęp Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 1, (2017), 128-135.
- [5] Wojciechowska R., Akumulacja azotanów a jakość produktów rolniczych, [w:] Ochrona środowiska naturalnego w XXI wieku – nowe wyzwania i zagrożenia. Red. K. Wiech, H. Kołoczek, P. Kaszycki. Wyd. F.W.O., Kraków 2005, ss. 21-27.
- [6] Gadomska J., Sadowski T., Buczkowska M.: Ekologiczna żywność jako czynnik sprzyjający zdrowiu, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 95 (3), (2014), 556-560.
- [7] Keller R.M., Beaver L., Prater C.M., Hord N.G.: Dietary Nitrate and Nitrite Concentrations in Food Patterns and Dietary Supplements, *Nutrition Today*, 0, (2017), 1-9.
- [8] Bahadoran Z., Mirmiran P., Jeddi S., Azizi F., Ghasemi A., Hadaegh F.: Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products, meats and processed meats, *Journal of Food Composition and Analysis*, 51, (2016), 93-105.
- [9] Ding Z., Johanningsmeier S.D., Price R., Reynolds R., Truong V., Conley Payton S., Breidt F.: Evaluation of nitrate and nitrite contents in pickled fruit and vegetable, *Food Control*, 90, (2018), 304-311.
- [10] Rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. Dz. Urz. UE L364/5, s. 11, z dnia 20.12.2006.
- [11] Szczerbiński R., Karczewski J., Fiłon J.: Azotany(V) w wodzie do picia jako czynnik ryzyka zdrowotnego ludności województwa podlaskiego, *Rocznik Państwowego Zakładu Higieny*, 57, (2006), 39-48.
- [12] Dżugan M., Pasternakiewicz A.: Ocena dziennego pobrania azotanów z wyrobami mięsnymi i wodą pitną, *Proceedings of ECOpole*, 1, (2007), 129-132.
- [13] FAO/WHO. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series, 50, (2003), 1053-1071.
- [14] Olędzka I., Konieczna L.: Opracowanie metody oznaczania zawartości azotanów (III) i (V) w przetworach mięsnych z zastosowaniem kapilarnej elektroforezy strefowej, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 3, (2009), 503-507.
- [15] Paśmionka I.: Mikrobiologiczne przemiany azotu glebowego, *Kosmos. Problemy nauk biologicznych*, 2, (2017), 186-192.

DETERMINATION OF NITRATES(III) AND NITRATES(V) IN DELICATESSEN PRODUCTS

Abstract: *The aim of the study was to determine the content of nitrates(III) and nitrates(V) in ready-made products - meatballs in tomato sauce, baked beans, cabbage rolls in tomato sauce and zamojski tripe. Finished products contain both vegetables and meat preparations, so it is important that the final product meets the standards for the content of nitrates(III) and nitrates(V) as food additives and safe for the consumer. The presence of nitrates(V) is not dangerous for the human body, while exceeding the daily allowable consumption of nitrates(III) can significantly affect health and even human life. A non-suppressor ion chromatography method (IC) and photodiode array detection (DAD) were used. The material for the experiment were products purchased from the commercial network, from different manufacturers. Nitrates(V) were found in all tested samples, their content was varied and amounted to 3,2 mg·kg⁻¹ to 116,5 mg·kg⁻¹. Nitrates(III) occurred only in two of the twenty tested products, their concentration was 13,3 mg·kg⁻¹ and 4,9 mg·kg⁻¹. The results showed that the test products do not pose a threat to consumers.*

Key words: nitrates(III), nitrates(V), IC-DAD, ready-made products

ZNAKOWANIE ŻYWNOSCI ŻYWNOSĆ I PASZE „WOLNE OD GMO”

Iwona WRZEŚNIEWSKA-WAL*

*Zakład Prawa, Ekonomiki i Zarządzania Szkoły Zdrowia Publicznego Centrum
Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie*

**idrwal@yahoo.com*

**iwona.wrzesniewska-wal@cmkp.edu.pl*

Streszczenie: *Artykuł przedstawia regulacje dotyczące znakowania produktów żywnościowych i paszowych zawierających organizmy genetycznie zmodyfikowane (GMO). W UE został ustanowiony tzw. próg tolerancji wynoszący maksymalnie 0,9% zawartości GMO w dopuszczonym do obrotu produkcie żywnościowym lub paszy, jeśli jego występowanie ma charakter przypadkowy lub jest nieuniknione ze względów technicznych. Jednak regulacje te nie dotyczą produktów wytworzonych ze zwierząt karmionych GMO. Pozostają one zwolnione z obowiązku znakowania i identyfikacji, co należy uznać za niespójne z regulacją mającą na celu kontrole żywności w całym łańcuchu żywnościowym. Producenci żywności, którzy wychodząc naprzeciw wymaganiom konsumentów chcą umieścić na etykietach swoich produktów informację „wolny od GMO” muszą poddać swoje produkty dodatkowej ocenie, czyli certyfikacji. Od 2020 roku będzie to również możliwe w Polsce. Sejm pracuje nad nową regulacją dotyczącą dobrowolnej certyfikacji produktów zwierających lub składających się z GMO.*

Słowa kluczowe: GMO, żywność, pasze, certyfikacja,

1. Wprowadzenie

Przepisy prawa unijnego dotyczące znakowania żywności mają osiągnąć są dwa równorzędne cele: chronić interesy konsumentów oraz zapewnić swobodny przepływ towarów. Europejscy konsumenci oczekują żywności nie tylko bezpiecznej dla zdrowia ludzi, ale również produkowanej z poszanowaniem środowiska naturalnego i praw zwierząt. W związku z tym na etykiecie powinni otrzymywać pełne i zrozumiałe informacje. Znakowanie żywności ma nie tylko zapewnić wolność wyboru, ale również „ostrzec” o obecności GMO w nabywanej żywności [6]. Wszystko wskazuje na to, że i w Polsce od 1 stycznia 2020 r. pojawią się produkty oznakowane jako „wolne od GMO” [17]. Projektowane przepisy polskiej ustawy umożliwią oznakowanie produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych, co jest wyrazem realizacji prawa konsumenta do informacji i wyboru zakupu produktów żywnościowych „wolnych” od GMO lub produkowanych z wykorzystywaniem GMO.

Od 1994 roku, gdy na rynku pojawił się pierwszy produkt roślinny genetycznie zmodyfikowane (GM), pomidor *Flavr-Savr*, minęło już 25 lat. Jednak w Polsce i w wielu innych krajach UE istnieje niepewność i obawa, co do długofalowego wpływu genetycznych modyfikacji na zdrowie ludzi. Organizacje pozarządowe od wielu lat, regularnie przeprowadzają badania opinii publicznej z których wynika, że w 2006 r. – 75 % Polaków obawiała się GMO [8], a w 2013 r. 73,1 % [4] Z tego względu Polacy chętnie wybierają produkty pochodzące od zwierząt, które są karmione paszami nie zawierającymi GMO¹ [17]. Przepisy regulujące znakowanie żywności wolnej od GMO funkcjonują już od połowy lat 80 w wielu krajach UE. Przykładem takich rozwiązań ustawodawczych jest Szwajcaria² [3], Niemcy, Austria, Francja, Włochy, Słowenia, a od roku 2016 starają się o nie również Węgry. W Niemczech istnieje stowarzyszenie producentów żywności „bez GMO” do którego należy ok. 600 producentów, którzy wprowadzają na rynek ponad 6 700 produktów żywnościowych „wolnych od GMO”, a ich wartość sprzedaży wynosi ok. 4,6 mld euro rocznie [19].

2. Bezpieczeństwo obrotu żywnością i paszami GM

W ramach europejskich regulacji prawnych podstawowym aktem w obszarze bezpieczeństwa żywności jest rozporządzenie nr 178/2002 ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego; powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz określające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności [13]. Jednak specyfika żywności GMO, a przede wszystkim wspomniane powyżej obawy konsumentów o jej wpływ na zdrowie i życie człowieka spowodowała, iż UE ustanowiła szczegółowe przepisy dotyczące bezpieczeństwa w tym obszarze. Zostały one zawarte w dyrektywie 2001/18/WE w sprawie zamierzonego uwalniania do środowiska organizmów zmodyfikowanych [7], która wyznaczyła kierunki regulacji prawnych dotyczących GMO a w pierwszej kolejności zdefiniowała najistotniejsze pojęcia m.in. organizm zmodyfikowany genetycznie, zamierzone uwolnienie, wprowadzenie do obrotu. Zgodnie z dyrektywą 2001/18/WE organizm genetycznie zmodyfikowany to taki organizm (rośliny, zwierzęta, drobnoustroje), których DNA zostało celowo zmienione przez człowieka metodami modyfikacji z wykorzystaniem, co najmniej jednej z technik wskazanych dyrektywą³.

¹ Badanie Millward Brown, Polacy o GMO, 2013. 56,8% Polaków, mając wybór, wybrałoby zwierzęta karmione paszą bez GMO.

² W Szwajcarii obowiązuje rozporządzenie z 1 marca 1985 r. w zakresie oznakowania produktów spożywczych zawierających GMO, umieszczenie na opakowaniu deklaracji „Wolne od GMO”.

³ Do technik modyfikacji genetycznej określonych w art. 2 ust. 2 dyrektywy 2001/18/WE należą między innymi: 1) techniki rekombinacji kwasów nukleinowych, obejmujące tworzenie nowych kombinacji materiału genetycznego przez dodanie cząsteczek kwasu nukleinowego, zsyntetyzowanych w dowolny sposób poza organizmem, do wirusa, plazmidu bakteryjnego lub innego wektora, i włączenie ich do organizmu docelowego, w którym nie występują one w sposób naturalny, ale w którym są zdolne do ciągłego

Zamierzone uwolnienie oznacza, jakiegokolwiek celowe wprowadzenie tych organizmów do środowiska naturalnego. Wprowadzenie do obrotu organizmu GMO to np. sprzedaż lub inne udostępnienie produktu GMO. Udostępnienie materiału siewnego roślin GMO dla rolnictwa będzie wprowadzaniem GMO do obrotu, zaś klasyczna uprawa rolna z wykorzystaniem takich odmian będzie właśnie zamierzonym uwolnieniem GMO do środowiska naturalnego [8].

Wprowadzenie na rynek produktów GM poprzedzone jest długą i dość restrykcyjną procedurą ujętą w przepisach prawa UE o charakterze unifikacyjnym tj. rozporządzeniu nr 1829/2003 w sprawie żywności i paszy GM [14]. Na podstawie niniejszego rozporządzenia, zezwolenie można wydać albo w odniesieniu do GMO przewidzianego do stosowania w charakterze materiału źródłowego do produkcji żywności lub paszy. Procedura podzielona jest na etapy: oceny administracyjnej, oceny naukowej oraz konsultacji (dostęp do oceny dla opinii społecznej). Ocena ryzyka powinna być podejmowana w sposób niezależny, obiektywny i zrozumiały oraz opierać się na dostępnych dowodach naukowych. Z tego względu dyrektywa 2001/18 oraz rozporządzenie 1829/2003 w sprawie żywności GM 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. Każdy przedsiębiorca, który chce wprowadzić do obrotu żywność lub paszę GM musi posiadać zezwolenie. Rejestr dopuszczonych do obrotu produktów GMO prowadzi Komisja Europejska. „Wspólnotowy rejestr genetycznie zmodyfikowanej żywności i pasz” ma formę elektroniczną [11].

Wspomniane już obawy społeczeństwa europejskiego związana w produktami GMO sprawiły, że w drodze porozumienia między Komisją Europejską a państwami członkowskimi w 2015 r. zmieniono przepisy dyrektywy 2001/18 wprowadzając *klauzulę opt-out*. Zmienione przepisy dają krajom członkowskim UE możliwość tworzenia na swoim terytorium obszarów wolnych od upraw roślin GMO, jak też obszarów o ograniczeniach w takich uprawach. Z *klauzuli opt-out* skorzystało 19 państw członkowskich, w tym Polska, z czego 16 państw zadeklarowało całkowity zakaz upraw genetycznie zmodyfikowanych, a trzy tylko ograniczenie [21-22] Podsumowując zmiany tych przepisów należy podkreślić, że obecnie w Polsce nie ma upraw roślin GM.

Inaczej jest w przypadku pasz, gdzie wspomniane już rozporządzenie 1829/2003 zezwala na obrót paszami GM wpisanymi do Rejestru Żywności i Pasz Unii Europejskiej. Państwa członkowskie nie wypracowały w tym obszarze mechanizmów podobnych do *klauzuli opt-out*. Jednak w Polsce ustawa o paszach

powielania; 2) techniki obejmujące bezpośrednie wprowadzenie do organizmu materiału dziedzicznego przygotowanego poza organizmem, takie jak mikroiniekcja, makroiniekcja i mikroenkapsulacja; 3) fuzja komórek (w tym fuzja protoplastów) lub techniki hybrydyzacji, w których żywe komórki z nowymi kombinacjami materiału genetycznego powstają na skutek fuzji dwóch lub więcej komórek, dokonanej w sposób, który nie występuje w warunkach naturalnych.

wprowadza zakaz obrotu paszami GM [18]. Taki kształt polskich regulacji sprawił, że Komisja Europejska skierowała przeciwko Polsce skargę do Trybunału Sprawiedliwości UE–TSUE (sprawa C-313/11) [24]. Należy jednak wspomnieć, że zakaz ten nie wszedł w życie a termin *vacatio legis* tych przepisów jest stale wydłużany [26] obecnie do 2021 r. Podsumowując należy podkreślić, że obecnie w Polsce do karmienia zwierząt można używać pasze zawierające GM.'

3. Znakowanie produktów GMO

W krajach UE już w połowie lat osiemdziesiątych zwrócono uwagę na fakt, że etykiety produktów żywnościowych mogą stać się swoistymi deklaracjami i zobowiązaniami cywilnoprawnymi producenta wobec konsumenta, które łatwiej będzie można egzekwować niż w przypadku różnego rodzaju przepisów i norm, służących bardziej administracji niż konsumentom [1]. Dzięki temu producenci będą zabezpieczeni przed nieuczciwą konkurencją a konsumenci przed wprowadzającą w błąd reklamą. Z tego punktu widzenia znakowanie produktu stanowi najprostszy sposób zabezpieczenia uczciwej konkurencji poprzez sprzedaż żywności „takiej, jaka ona jest” [9].

Obecnie znakowanie żywności i pasz znajduje się w dwóch unijnych rozporządzeniach: wspomnianym już rozporządzeniu nr 1829/2003 oraz rozporządzeniu nr 1830/2003 [15]. Powyższe regulacje nakładają obowiązek znakowania produktów GMO, które zawierają, 9% i powyżej GMO w produkcji lub w składnikach zmodyfikowanych genetycznie. Jeżeli obecność ta jest przypadkowa lub technicznie nieunikniona i zawartość GMO jest poniżej poziomu 0,9%, a podmioty gospodarcze odpowiedzialne za ten produkt są w stanie tę przypadkowość udowodnić – produkty nie muszą być znakowane, jako GMO. Nie znakuje się również produktów pochodzenia zwierzęcego pochodzących ze zwierząt lub od zwierząt karmionych paszami GM, gdyż zgodnie z badaniami naukowymi, zmodyfikowane DNA nie przechodzi do organizmu zwierzęcego, tym samym produkt pochodzenia zwierzęcego nie jest GMO i nie podlega znakowaniu informacją dotyczącą GMO [23]. Powyższa regulacja oraz rozporządzenie 1169/2011 w sprawie informacji dla konsumenta [16] sprawiła, że niektórzy producenci żywności opierając się na tych zasadach stosowali oznakowanie „bez GMO” lub podobne [10]. Zgodnie z art. 38 ust. 2 rozporządzenia 1169/2011 państwa członkowskie mogą przyjmować przepisy krajowe, ale tylko w kwestiach, które nie zostały zharmonizowane w przepisach unijnych. Warunkiem jest jednak to, że nie zakazują one, nie utrudniają, ani nie ograniczają swobodnego przepływu towarów, które są zgodne z tym rozporządzeniem. Dobrym przykładem w Polsce jest przemysł mleczarski [19].

W związku z tym nie tylko w UE, ale i na świecie [12] rozwinął się system dobrowolnej certyfikacji „*non-GMO*”. Opiera się on na autorytatywnym stwierdzeniu niezależnej jednostki (tzw. strony trzeciej), że przedsiębiorca posiada wdrożony system jakości, który w praktyce zapewnia nieobecność składników zmodyfikowanych genetycznie w wyrobach wprowadzanych do obrotu. Potwierdzeniem tego faktu jest uzyskanie odpowiedniego certyfikatu

i prawo oznaczania produktów, jako wolnych od GMO. Oprócz regulacji prawnych warto zwrócić uwagę na efektywność ekonomiczną wdrażania takiego systemu a tym samym implikacje dla rozwoju rynku artykułów rolno-spożywczych [5]. Odpowiedzią na powyższe zmiany jest projekt ustawy o oznakowaniu produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych, jako wolnych od tych organizmów, który przewiduje wprowadzenie dobrowolnego systemu oznakowania.

4. Znakowanie „wolne od GMO” (projekt)

Projekt nowej polskiej ustawy o oznakowaniu produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych, jako wolnych od tych organizmów przewiduje wprowadzenie dobrowolnego systemu znakowania z wykorzystaniem określenia „wolne od GMO”. W stosunku do żywności normy dopuszczone w projekcie są bardziej rygorystyczne niż przepisy UE, tj. rozporządzenie 1829/2003. Planowana regulacja zakłada, że dopuszczalny limit obecności GMO w żywności ma wynieść 0,1% (w UE 0,9%), a w stosunku do pasz tak jak w UE czyli 0,9%, o ile ilości te będą przypadkowe lub nieuniknione technologicznie. Oznacza to, że produkty spożywcze zawierające GMO pomiędzy 0,1% a 0,9% nie będą mogły być w Polsce znakowane, jako wolne od GMO, ale również nie będą podlegały obowiązkowemu oznakowaniu na obecności GMO w produkcie [10]. Produkty, które zostaną objęte systemem takiego znakowania można podzielić na: produkty pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Produkty roślinne mogą być jedno i wieloskładnikowe⁴ [19], ale tylko te które stanowią konwencjonalny odpowiednik produktów GMO dopuszczonych do obrotu na rynku UE, tj. kukurydza, rzepak, soja, burak cukrowy. Bardzo istotny jest fakt, że znakowanie produktów roślinnych jako „wolne od GMO” jest możliwe tylko dla tych produktów, które mają odpowiedniki zmodyfikowane genetycznie dopuszczone do obrotu na rynku UE. Nie można znakować produktów roślinnych, które nie mają takich odpowiedników (np. jabłka, marchew, sałata, pszenica). Drugą grupę stanowią produkty pochodzenia zwierzęcego (np. mięso, mleko, jaja, sery) od zwierząt lub ze zwierząt karmionych paszami bez GMO. Przykładem tej grupy jest produkcja zwierzęca wykorzystująca do karmienia zwierząt niezmodyfikowane genetycznie białko roślinne rodzimej produkcji [20]. Sposób żywienia zwierząt będzie trzeba udokumentować w tzw. okresie karencji np. fakturami z zakupu odpowiednich pasz lub przeprowadzać badania laboratoryjne na obecność modyfikacji genetycznych w paszach. Powyższe zasady dotyczą również nieopakowanej żywności pochodzenia roślinnego i produktów pochodzenia zwierzęcego, lub nieopakowanej paszy przeznaczonej do karmienia zwierząt, jeśli będą posiadały oznakowanie „wolne od GMO”. W tych

⁴ Produkty wieloskładnikowe: wszystkie jej składniki spełniają warunki wskazane w omawianym projekcie; składniki te stanowią więcej niż 50% łącznej masy wszystkich składników oraz inne składniki takiej żywności nie zawierają, nie składają się oraz nie zostały wyprodukowane z GMO.

przypadkach producenci również są zobowiązani przed wprowadzeniem do obrotu przeprowadzać badania laboratoryjne na obecność modyfikacji genetycznych oraz posiadać i przechowywać przez okres dwóch lat od wprowadzenia na rynek tego produktu dokumenty pozwalające na kontrolę.

Zgodnie z projektowaną regulacją na opakowaniu lub etykiecie produktów wolnych od GMO będzie znak graficzny. Wzór tego znaku zostanie ściśle określony w rozporządzeniu ministra rolnictwa i rozwoju wsi, co zapewni jednolitość stosowanego znakowania: kształt i kolorystyka. Obok znaku graficznego będą mogły pojawić się określenia „bez GMO”, a w przypadku produktów pochodzenia zwierzęcego lub zawierających takie składniki „wyprodukowane bez stosowania GMO”. Wynika to z braku możliwości stwierdzenia obecności DNA pochodzącego z pasz używanych w karmieniu zwierząt. W tej sytuacji oznakowanie jaj, mięsa lub mleka określeniem „bez GMO” (np. mleko bez GMO) będzie wprowadzaniem konsumentów w błąd.

5. Wnioski

Warto podkreślić, że wejście w życie projektowanej ustawy o dobrowolnej certyfikacji podmiotów produkujących żywność i pasze bez GMO wprowadzi zmiany na rynku spożywczym zarówno dla konsumentów jak i producentów. Po pierwsze na początku jej obowiązywania, czyli już od 2020 r. pojawi się konieczność edukowania i informowania konsumentów, dlaczego tylko niektóre produkty mogą być oznakowane, jako wolne od GMO. Ponadto wraz ze wzrostem zapotrzebowania na żywność niezawierającą GMO na rynku pojawią się nowe podmioty. Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) zapowiada, że światowe zapotrzebowanie na żywność do 2050 r. może wzrosnąć nawet o 70%, co spowoduje zwiększenie popytu na pasze [20]. W Polsce znakowanie produktów „wolne od GMO” jest uzupełnieniem działań ministerstwa rolnictwa polegających na zwiększeniu udziału krajowego białka roślinnego bez GMO w produkcji pasz. Od roku 2010 rząd realizuje programy wsparcia produkcji roślin białkowych, ale obecnie zainteresowanie przemysłu paszowego krajowym białkiem nie jest duże [25]. W innych krajach, gdzie wprowadzono dobrowolną certyfikację produktów wolnych od GMO zwraca się uwagę na możliwość konkurencji między produktami wolnymi od GMO a produktami ekologicznymi. Przeciwnicy certyfikacji twierdzą, że zaufanie konsumentów do produktów ekologicznych zostanie podważone, jeśli odkryją, że żywność ekologiczna też może być zanieczyszczona GMO. W tym celu planowane są programy dla rolnictwa ekologicznego, gdzie zostaną ustalone poziomy progowe zanieczyszczeń, w tym GMO, a także wprowadzony zostanie obowiązek dla producentów do wykonania testów GMO [2].

Literatura

- [1] Adamowicz M., Jasiulewicz A., *Znakowanie produktów spożywczych jako instrument marketingu i zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego*, Wyd. SGGW, Warszawa 2003, ss. 24-25.
- [2] Bain C. i Selfa T., *Non-GMO vs organic labels: purity or process guarantees in a GMO contaminated landscape* Agriculture and Human Values, (AFHVS), vol. 34(4), pp. 805-818, December 2017 r. <https://doi.org/10.1007/s10460-017-9776-x>
- [3] Biuro Informacji ds. Żywności Genetycznie Modyfikowanej Biuletyn nr 1, 1999 r.
- [4] [„Chcemy wiedzieć – projekt partycypacji obywateli na rzecz wprowadzenia systemu znakowania żywności wolnej od GMO”, *Do czego dążymy? „Znakowanie żywności „wolne od GMO” w Polsce. To możliwe* W:Znakowanie żywności wolnej od GMO. Propozycja dla Polski, Instytut Spraw Obywatelskich, Łódź – Kraków 2015 <https://inspro.org.pl/polecamy/raport-znakowanie-zywnosci> [dostęp 27.05.2019 r.].
- [5] Chodkowski A., *Zapewnienie tożsamości i dobrowolna certyfikacja artykułów rolno-spożywczych*, materiały z konferencji pt. „Czy chcemy żyć z GMO? Aspekty gospodarcze, ekologiczne i etyczne stosowania produktów GMO”, Warszawa 24 lutego 2004 r.
- [6] Christofourou T., *The regulation of genetically modified organisms in European Union: The interplay of science, law and politics*, Common Market Law Review, Vol. 41, Nr 3, 2004, ss. 637-709.
- [7] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2001/18 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, s. 1; ze zm.).
- [8] Gała P., *Uprawy roślin genetycznie zmodyfikowanych w świetle projektu nowelizacji ustawy o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych* W:Red. Łobos-Kotowska D., Gała P., Stańko M., *Współczesne problemy prawa rolnego i cywilnego Księga jubileuszowa Profesor Teresy Kurowskiej*, Warszawa 2018, ss. 107-126.
- [9] Jurcewicz A., *Wybrane problemy prawne sektora produktów spożywczych*, „Przegląd Prawa Europejskiego” nr 2 (6) z 1999, ss. 41-60.
- [10] Krakowiak J., *Prawo żywnościowe 2019: Oznakowanie „wolne od GMO”* z 14.02.2019, <http://www.codozasady.pl/prawo-zywnosciowe-2019-oznakowanie-wolne-od-gmo/> [dostęp 19/05.2019].
- [11] [Restrictions of geographical scope of GMO applications/authorisations: Member States demands and outcomes http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/authorisation/cultivation/geographical_scope_en.htm [dostęp 19.05.2019].
- [12] Roseboro K., *A Tale of two labels: organic and Non –GMO*, 5.01.2015. <https://www.naturalvitality.com/blog/a-tale-of-two-labels-organic-and-non-gmo/> [dostęp 19.05.2019].
- [13] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 178/2002 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).
- [14] Rozporządzenie nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy (Dz. Urz. WE L 268 z 18 października 2003 r.).
- [15] 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.
- [16] Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności (Dz.U. L 304 z 22.11.2011, s. 18).

- [17] Rządowy projekt ustawy o oznakowaniu produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych jako wolnych od tych organizmów (druk nr 3269) <http://www.sejm.gov.pl/Sejm8.nsf/druk.xsp?nr=3262> [dostęp 19.05.2019].
- [18] Ustawa z dnia 22 lipca 2006 r. o paszach (Dz.U. z 2017 r. poz. 453 ze zm.).
- [19] Uzasadnienie projekt ustawy o oznakowaniu produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych jako wolnych od tych organizmów (druk nr 3269) z 2019 r. <http://www.sejm.gov.pl/Sejm8.nsf/druk.xsp?nr=3262> [dostęp 19.05.2019].
- [20] Uzasadnienie do projektu ustawy o wykorzystaniu roślin wysokobiałkowych w paszach (druk sejmowy nr 2220) z 2017 r. <http://www.sejm.gov.pl/sejm8.nsf/PrzebiegProc.xsp?id=26D156630E1872E6C125822000418A5D> [dostęp 19.05.2019].
- [21] Wrześniewska-Wal I., *Bezpieczeństwo żywności GMO po wprowadzeniu klauzuli opt-out*, [w:] red. G. Lewandowska, A. Makowska, *Bezpieczeństwo żywności w łańcuchu żywnościowym*, Poznań 2016, ss. 14-23.
- [22] Wrześniewska-Wal I., *Regulacje prawne GMO. Aspekty prawne i środowiskowe*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych nr 593, 2018, ss. 101-112, DOI 10.22630/ZPPNR.2018.593.19.
- [23] Wrześniewska-Wal I., *Żywność genetycznie zmodyfikowana. Aspekty prawne*, Warszawa 2008, ss. 167-171
- [24] *Wyrok Trybunału Sprawiedliwości UE (2013) z 18 lipca, sprawa C-313/11* http://trybunal.gov.pl/uploads/media/C-313_11__wyrok_Trybunalu_z_18_lipca_2013_r_.pdf [dostęp 19.05.2019]
- [25] Zapis przebiegu z komisji sejmowej Rolnictwa i Rozwoju Wsi (nr 309), 24.04.2019 r.
- [26] <http://www.sejm.gov.pl/sejm8.nsf/biuletyn.xsp?documentId=24768B12D23FA602C12583F500498842> [dostęp 19.05.2019].
- [27] Zmiana ustawy z 22 listopada 2018 r. o paszach (Dz. U. z 2018 r., poz. 2430).

FOOD MARKING FOOD AND FEED "GMO-FREE"

Abstract: *The article presents regulations concerning the labeling of food and feed products containing GMOs. In the EU, the so-called a tolerance threshold of a maximum of 0.9% of the GMO content in a food or feed authorized for marketing if it is accidental or unavoidable for technical reasons. However, these regulations do not apply to products made of animals fed with GMOs. They remain exempt from labeling and identification, which should be considered inconsistent with regulation to control food throughout the food chain. Food producers who want to put "GMO-free" information on the labels of their products must subject their products to additional evaluation, that is certification. From 2020 it will also be possible in Poland. The Parliament is working on a new regulation regarding the voluntary certification of products containing or consisting of GMOs.*

Key words: GMO, food, fodder, certification

OCENA ZAWARTOŚCI OLEJKU ETERYCZNEGO W LIŚCIU MIĘTY, ZIELU MAJERANKU, ZIELU TYMIANKU I KOSZYCZKU RUMIANKU PRZECHOWYWANYCH W RÓŻNYCH WARUNKACH

Radosław KOWALSKI^{1*}, Grażyna KOWALSKA², Artur MAZUREK¹,
Urszula PANKIEWICZ¹, Monika SUJKA¹,
Marzena WŁODARCZYK-STASIAK¹,

¹*Katedra Analizy i Oceny jakości Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Skromna 8, 20-704 Lublin*

²*Katedra Turystyki i Rekreacji, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 15,
20-950 Lublin*

*radoslaw.kowalski@up.lublin.pl

Streszczenie: *Celem pracy była ocena zawartości olejku eterycznego w liściu mięty pieprzowej, ziele majeranku ogrodowego, ziele tymianku właściwego i koszyczku rumianku pospolitego przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych (21°C; 4°C, 40°C, -25°C) i czasowych (30 dni, 90 dni, 150 dni, 200 dni, 270 dni). W doświadczeniu wykazano, że temperatura 40°C powodowała najwyższe straty olejku eterycznego dochodzące po 270 dniach przechowywania badanych partii do poziomu 76% i 75% odpowiednio w przypadku ziele tymianku i liścia mięty oraz do poziomu ok. 52% i 40% w przypadku koszyczka rumianku i ziele majeranku. Liść mięty oraz koszyczek rumianku przechowywane w temperaturze pokojowej traciły odpowiednio ok. 30% i 36% początkowej zawartości olejku (270 dni). Natomiast przechowywanie w 4°C i -25°C spowodowało stabilizację zawartości olejku eterycznego w badanych ziołach.*

Słowa kluczowe: olejek eteryczny, zioła, przechowywanie, temperatura

1. Wprowadzenie

Rozwój nauk chemicznych i farmaceutycznych przyczynił się do zmniejszenia zainteresowania roślinami pod względem ich właściwości leczniczych na korzyść związków chemicznych o zmodyfikowanym składzie i wyższej aktywności w porównaniu do pierwotnych składników izolowanych z roślin. Jednakże obecnie znowu powraca się do składników naturalnych występujących m.in. w ziołach, na co wpływ ma wzrost świadomości na temat występujących zagrożeń związanych z powszechną „chemizacją”.

Jedną z interesujących grup związków biologicznie czynnych występujących w roślinach są olejki eteryczne. Termin „olejki eteryczne” został użyty po raz

pierwszy w XVI wieku przez Paracelsus'a von Hohenheim, lekarza, filozofa i przyrodnika, zwanego ojcem medycyny nowożytnej, fitochemii i farmakognozji [1]. Staroegipskie hieroglify, chińskie manuskrypty oraz teksty biblijne informują, że wonne wydzieliny roślinne były składnikami mikstur wykorzystywanych do balsamowania ciał oraz były stosowane w lecznictwie [2]. Z około 350 000 różnych gatunków roślin występujących na Ziemi, tylko 5% czyli około 18 000 stanowią rośliny olejkodajne. Tylko kilkaset gatunków jest powszechniej wykorzystywanych na skalę przemysłową do produkcji olejku eterycznego, który stanowi charakterystyczną dla rośliny cechę chemotaksonomiczną [3].

Olejki eteryczne wytwarzane są przeważnie jako metabolity wtórne a miejscem ich gromadzenia są struktury wydzielnicze występujące na powierzchni (włoski wydzielnicze) lub umieszczone wewnątrz rośliny (kanały wydzielnicze). Rodzaj struktur wydzielniczych jest charakterystyczny dla danej rodziny botanicznej [4-6]. Rola olejków eterycznych dla rośliny polega m. in. na: obronie przed zwierzętami lub owadami, ochronie przed patogenami, przekazywaniu informacji w roślinie jak również do otoczenia (zapylenie), ułatwieniu przetrwania w niesprzyjających warunkach, hamowanie wzrostu innych roślin rosnących w pobliżu [7].

Olejki eteryczne to wieloskładnikowe mieszaniny lotnych związków chemicznych wyodrębnionych z tkanek roślinnych, głównie przez destylację z parą wodną (w różnych wariantach) [3]. Stosowane są także inne metody, które umożliwiają izolację związków lotnych, jako dominujących składników w kompleksie substancji aktywnych i prowadzone są badania nad zwiększeniem wydajności poprzez modyfikowanie metod konwencjonalnych (wytlaczanie, enfleurage, maceracja, ekstrakcja rozpuszczalnikami lotnymi i w stanie nadkrytycznym, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, ekstrakcja wspomagana ultradźwiękowo i mikrofalowo) [3, 8]. Metodą destylacji z parą wodną pozyskuje się 93% olejków eterycznych, zaś pozostałe 7% przypada na inne metody [9].

Olejki eteryczne zawierają od kilkudziesięciu do kilkuset składników chemicznych, głównie terpenoidów oraz fenylopropanoidów z grupy węglowodorów, alkoholi, estrów, aldehydów, ketonów, fenoli, eterów i kwasów [10, 11]. Olejki eteryczne posiadają charakterystyczny zapach, płynną, oleistą konsystencję, najczęściej są bezbarwne, ale znane są olejki o barwie brunatnej, ciemnoniebieskiej i zielonej, mają wysoki współczynnik załamania światła oraz są optycznie czynne. W większości przypadków ich gęstość jest niższa od gęstości wody. Różnią się od tłuszczów lotnością, która zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury. Olejki eteryczne są łatwopalne, temperatura wrzenia waha się od 150°C do 300°C. Ponadto ta grupa związków rozpuszcza się w większości rozpuszczalników organicznych, ale ma bardzo ograniczoną rozpuszczalność w wodzie [11].

Olejki eteryczne wykazują szerokie spektrum aktywności m. in. działanie antyseptyczne, uspokajające, ale także spazmolityczne oraz drażniące. Niektóre z nich wykazują właściwości znieczulające, wykrztuśne, przeciwzapalne, obniżające poziom cholesterolu, antynowotworowe, żółciopędne oraz moczopędne. Obecnie wykorzystywane są w lecznictwie, aromaterapii, przy produkcji

żywności oraz w kosmetyce [2, 12, 13]. Olejki eteryczne i ich składniki podczas wdychania są łatwo wchłaniane przez drogi oddechowe. Resorpcja przez skórę i wchłanianie w żołądku po podaniu doustnym są mniej skuteczne, ale nadal możliwe [4, 12, 14-16].

Zarówno zawartość, skład, jak i właściwości olejków eterycznych oraz wydajność olejkowa uzależnione są od wielu czynników, do których należą: fenotyp rośliny, warunki klimatyczne w jakich następuje jej wzrost, skład gleby, wiek rośliny, a także pora i metoda zbioru oraz sposób pozyskiwania olejku. Na skład olejku wpływa także stosowanie środków ochrony roślin podczas uprawy, których pozostałości mogą być obecne w gotowym produkcie [2]. Druga grupa czynników wpływających na zawartość olejku eterycznego oraz jego skład i właściwości wiąże się z operacjami przeprowadzanymi w stosunku do surowca roślinnego po zbiorze (suszenie, oczyszczanie, przechowywanie, rozdrabnianie, sortowanie, dekontaminacja, granulowanie) oraz ma związek ze sposobem wydzielenia olejku z tkanki roślinnej (metoda pozyskania olejku, rodzaj rozpuszczalnika, temperatura, ciśnienie, czynniki wspomagające) [8, 17, 18]. Na zawartość i skład olejku eterycznego już gotowych produktów ziołowych (spożywczych czy farmaceutycznych) mają także wpływ warunki przechowywania (temperatura, wilgotność, rodzaj atmosfery oraz czas przechowywania). Informacja producenta na opakowaniu takich ziołowych produktów wskazuje, że optymalne jest przechowywanie w suchym miejscu w temperaturze pokojowej. Wobec powyższego interesującym jest określenie zmian w zawartości olejku eterycznego w wybranych ziołach w zależności od temperatury i czasu przechowywania.

Celem pracy była ocena zawartości olejku eterycznego w liściu mięty pieprzowej, ziele majeranku ogrodowego, ziele tymianku właściwego i kosczyzku rumianku pospolitego przechowywanych w różnych warunkach.

2. Metodyka

Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiły: liść mięty pieprzowej (*Menthae x piperitae folium*), ziele majeranku ogrodowego (*Majoranae herba*), ziele tymianku właściwego (*Thymi herba*), oraz kosczyzek rumianku pospolitego (*Chamomillae anthodium*), każde pochodzące z jednej partii produkcyjnej, z upraw przemysłowych (2010) z terenu Lubelszczyzny. Poszczególne partie ujednorodniano i pakowano w kilogramowe torebki papierowe. Do badań każdorazowo pobierano po trzy opakowania ziół, które były przeznaczone tylko do pojedynczego badania.

Przechowywanie

Materiał poddano przechowywaniu w następujących warunkach: temperatura pokojowa (21°C), warunki chłodnicze (4°C), warunki termostatowane (40°C), warunki zamrażalnicze (-25°C). Próbkę do badań pobierano w następujących odstępach czasowych: 30 dni, 90 dni, 150 dni, 200 dni, 270 dni.

Destylacja olejku eterycznego

Analizę zawartości olejku eterycznego w surowcach doświadczalnych przeprowadzono metodą destylacji z parą wodną zgodnie z FP VIII [19] metodą bezpośrednią (liść mięty, ziele majeranku, ziele tymianku) oraz metodą pośrednią z ksylenem (koszyczek rumianku). Wielkość próbki materiału roślinnego poddawanego destylacji wynosiła 20 g, czas destylacji 3 h, wszystkie pomiary wykonywano trójrotnie dla każdej próbki.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono stosując jednoczynnikową analizę wariancji z testem Duncana na poziomie istotności $p < 0,05$ przy użyciu programu komputerowego SAS (SAS Version 9.1, SAS Inst., Cary, N.C., U.S.A.).

3. Wyniki i dyskusja

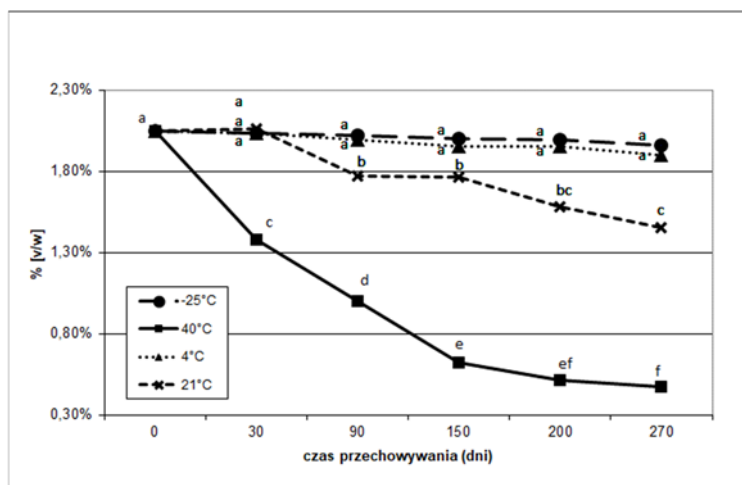
Najwyższą zawartością olejku eterycznego w próbkach wyjściowych badanych ziół charakteryzowało się ziele tymianku 3,26 % ($\pm 0,11\%$), następnie liść mięty 2,05% ($\pm 0,04\%$), ziele majeranku 1,30% ($\pm 0,06\%$) oraz koszyczek rumianku 0,50% ($\pm 0,04\%$) (rys. 1-4). Badane surowce zielarskie są powszechnie stosowane w różnych gałęziach produkcji przemysłu spożywczego, farmaceutycznego czy kosmetycznego ze względu na zawartość i aktywność olejku eterycznego.

Mięta pieprzowa, majeranek ogrodowy oraz tymianek właściwy należą do rodziny jasnotowatych (Lamiaceae) i charakteryzują się występowaniem zewnętrznych struktur wydzielniczych typu włosków gruczołowych [6], natomiast w rumianku pospolitym (Asteraceae) obserwowane są oprócz włosków zewnętrznych także wewnętrzne struktury wydzielnicze typu kanałów [20]. Trwałość tych struktur może mieć wpływ na tempo uwalniania związków lotnych. Ponadto ważny jest profil składników olejku eterycznego pod względem lotności. Olejki bogatsze w związki o niższych temperaturach wrzenia charakteryzują się mniejszą stabilnością składu wraz ze wzrostem temperatury przechowywania. Monografie szczegółowe oraz odpowiednie normy podają wymagania dotyczące zawartości olejku eterycznego w badanych surowcach [19, 21-23]. Według piśmiennictwa zawartość olejku eterycznego w liściu mięty pieprzowej wynosi od 1,2% do 3,9% [6, 19, 21, 24], w ziele majeranku ogrodowego do 5% [6, 24, 25], w ziele tymianku właściwego do 2,5% [6, 18, 23, 26, 27], natomiast w koszyczku rumianku od 0,3% do 1,5% [18, 19, 24, 27].

Olejek mięty pieprzowej (*Oleum Menthae x piperitae*) zaliczany jest do grupy najcenniejszych i najczęściej stosowanych olejków eterycznych [28]. Wykorzystanie w przemyśle mają głównie odmiany bogate w mentol i jego izomery. Ma zastosowanie w leczeniu chorób układu pokarmowego, jako dodatek do past do zębów i w produkcji spożywczej (słodycze, guma do żucia, napoje) [28]. Olejek majerankowy (*Oleum majoranae*) ma znaczenie przyprawowe, stosowany jest w aromaterapii i w perfumerii [29]. Olejek tymiankowy (*Oleum thymi*) m. in. dzięki zawartości tymolu, ma właściwości

dezynfekujące oraz wykrztuśne, stosowany jest także w przemyśle spożywczym [19, 30]. Natomiast olejek rumianku pospolitego (*Oleum chamomillae*) charakteryzuje się gorzkim smakiem i zapachem oraz niebieską barwą (ang. blue chamomile oil) pochodzącą od zawartego w nim chamazulenu [31] i jest szeroko stosowany w produkcji preparatów wykorzystywanych w przemyśle kosmetycznym i medycynie: stomatologii, laryngologii, okulistyce, pediatrii, gastrologii, pulmonologii czy dermatologii.

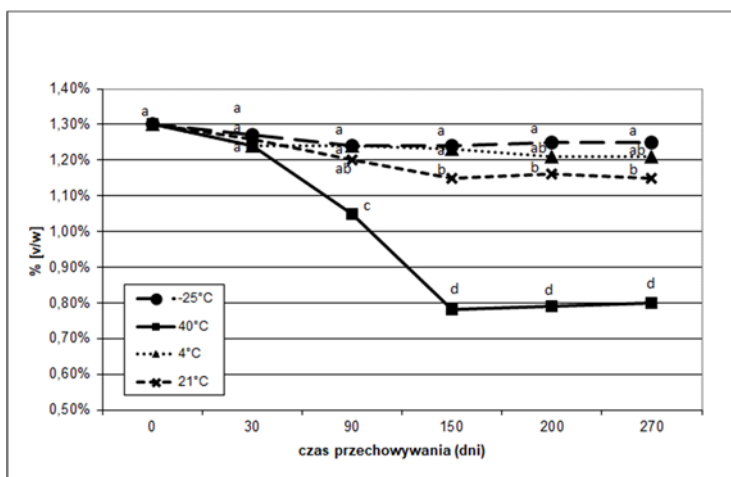
Podczas przechowywania liścia mięty pieprzowej (rys. 1, rys. 5) w temperaturze pokojowej dopiero po 90 dniach zaobserwowano istotne zmiany w zawartości olejku (obniżenie o ok. 14% początkowej zawartości olejku). Po 270 dniach przechowywania oznaczono ok. 1,5% olejku eterycznego, co stanowiło poziom niższy o ok. 29% od początkowej zawartości. Podczas przechowywania w -25°C oraz w 4°C zaobserwowano nieistotne statystycznie zmiany zawartości olejku eterycznego. Natomiast liść mięty przechowywany w 40°C charakteryzował się następującymi zawartościami olejku eterycznego: ok. 1,4% po 30 dniach przechowywania, ok. 1,0% po 90 dniach, ok. 0,6% po 150 dniach, ok. 0,5% po 200 dniach i 270 dniach (obniżenie o ok. 70% i 75% początkowej zawartości olejku).



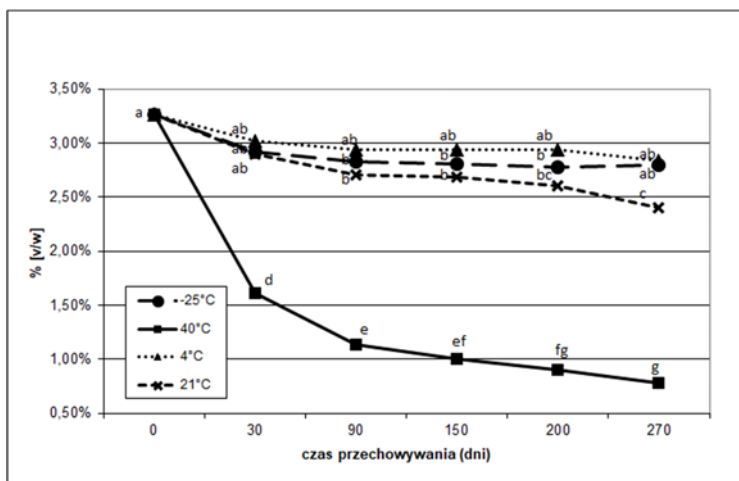
Rys. 1. Zawartość olejku eterycznego w liściu mięty w zależności od temperatury i czasu przechowywania (a, b, c... – dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą istotnie statystycznie przy $p < 0,05$)

Podczas przechowywania ziela majeranku (rys. 2, rys. 5) w temperaturze pokojowej oznaczono zawartość olejku eterycznego na poziomie ok. 1,2% po 90, 150, 200 i 270 dniach przechowywania (obniżenie od ok. 8% do 12% początkowej zawartości olejku). W temperaturach -25°C oraz w 4°C nie zaobserwowano istotnych zmian zawartości olejku eterycznego. Natomiast ziele majeranku przechowywane w 40°C charakteryzowało się następującymi zawartościami olejku eterycznego: ok. 1,2% po 30 dniach przechowywania, ok. 1,1% po

90 dniach, ok. 0,8% po 150, 200 i 270 dniach (obniżenie o ok. 40% początkowej zawartości olejku).



Rys. 2. Zawartość olejku eterycznego w ziele majeranku w zależności od temperatury i czasu przechowywania (a, b, c... – dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą istotnie statystycznie przy $p < 0,05$)

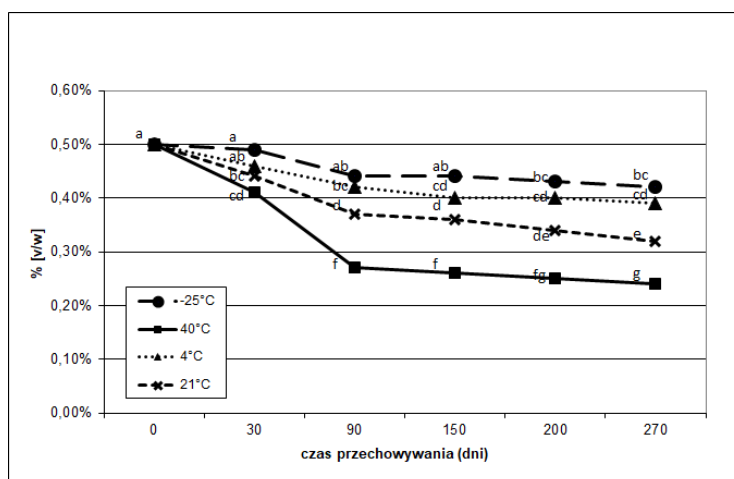


Rys. 3. Zawartość olejku eterycznego w ziele tymianku w zależności od temperatury i czasu przechowywania (a, b, c... – dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą istotnie statystycznie przy $p < 0,05$)

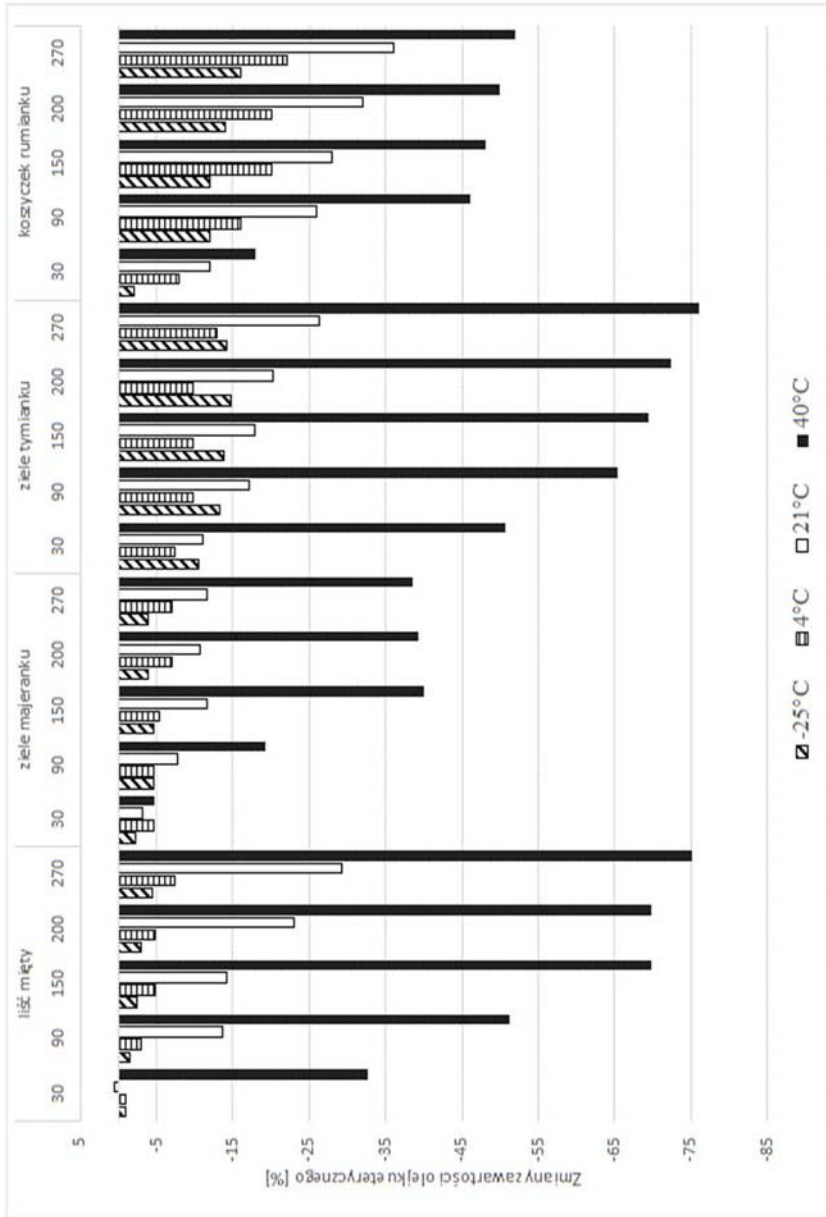
Podczas przechowywania ziela tymianku (rys. 3, rys. 5) w temperaturze pokojowej zaobserwowano istotne zmiany w zawartości olejku eterycznego po 150 dniach przechowywania (obniżenie o ok. 18% początkowej zawartości olejku), i odpowiednio po 200 dniach przechowywania (2,6%, obniżenie o ok. 20% początkowej zawartości olejku) oraz po 270 dniach przechowywania

(ok. 2,4%, obniżenie o ok. 26% początkowej zawartości olejku). Podczas przechowywania w -25°C oraz w 4°C zaobserwowano niewielkie różnice w zawartości olejku eterycznego w porównaniu do pozostałych warunków przechowywania tj. od ok. 3% po 30 dniach przechowywania do ok. 2,8% po 270 dniach przechowywania (ubytki olejku eterycznego od ok. 10% do ok. 15%). Natomiast ziele tymianku przechowywane w 40°C charakteryzowało się następującymi zawartościami olejku eterycznego: ok. 1,6% po 30 dniach przechowywania, ok. 1,1% po 90 dniach, ok. 1,0% po 150 dniach), ok. 0,9% po 200 dniach i 0,78% po 270 dniach (obniżenie o ok. 72% i 76% początkowej zawartości olejku).

Po 30 dniach przechowywania koszyczka rumianku (rys. 4, rys. 5) w temperaturze pokojowej zaobserwowano istotne zmiany w zawartości olejku od ok. 0,44% (obniżenie o ok. 12% początkowej zawartości olejku eterycznego), oraz ok. 0,37% i 0,36% po 90 i 150 dniach przechowywania (obniżenie o ok. 26% i 28% początkowej zawartości olejku), i ok. 0,34% po 200 dniach przechowywania (obniżenie o ok. 32% początkowej zawartości olejku) oraz ok. 0,32% po 270 dniach przechowywania (obniżenie o ok. 36% początkowej zawartości olejku). Po 200 dniach przechowywania w -25°C zaobserwowano istotne różnice w zawartości olejku eterycznego w porównaniu do surowca wyjściowego, zaś w warunkach chłodniczych (4°C) już po 90 dniach odnotowano istotne zmiany w porównaniu do początkowego poziomu, tj. ok. 0,42%, osiągając po 270 dniach przechowywania 0,39%. Natomiast koszyczek rumianku przechowywany w 40°C charakteryzował się następującymi zawartościami olejku eterycznego: ok. 0,41% po 30 dniach przechowywania, ok. 0,27% po 90 dniach, ok. 0,26% po 150 dniach, ok. 0,25% po 200 dniach i 0,24% po 270 dniach (obniżenie o ok. 50% początkowej zawartości olejku).



Rys. 4. Zawartość olejku eterycznego w koszyczku rumianku w zależności od temperatury i czasu przechowywania, (a, b, c... – dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą istotnie statystycznie przy $p < 0,05$)



Rys. 5. Zmiany zawartości olejku eterycznego [%] w liściu mięty, ziele majeranku, ziele tymianku i koszyczku rumianku w zależności od temperatury i czasu przechowywania

W doświadczeniu wykazano, że temperatura 40°C spowodowała najwyższe straty olejku eterycznego dochodzące po 270 dniach termostatowania badanych partii do poziomu 76% i 75% odpowiednio w przypadku ziela tymianku i liścia mięty oraz do poziomu ok. 52% i 40% w przypadku koszyczka rumianku i ziela majeranku (rys. 5). Analiza danych uzyskanych w prezentowanym doświadczeniu przechowalniczym w temperaturze pokojowej wskazuje na ubytek olejku eterycznego, co także jest zgodne z wynikami innych doświadczeń. El-Sawi i Ibrahim [32] podają, że zawartość olejku eterycznego w wysuszonej skórce pomarańczy przechowywanej w temperaturze pokojowej zmieniała się w ciągu roku z poziomu 0,87% i 0,68% do poziomu 0,68 % oraz 0,51%, co stanowiło ubytek olejku odpowiednio o ok. 22% oraz ok. 25%. Podobne zmiany w ubytku olejków eterycznych zaobserwowali Ebadi i in. [33] dla próbek werbeny cytrynowej przechowywanej także w temperaturze pokojowej (zmiana w zawartości olejku od 1,1% do 0,7% po 8 miesiącach przechowywania). Natomiast w innej pracy dotyczącej przechowywania kwiatów róży damasceńskiej stwierdzono, że zastosowanie warunków 0°C oraz 3°C także nie jest wolne od ubytków olejku eterycznego [34]. Cytowane badania potwierdzają, że ważny jest dobór odpowiednich warunków przetwarzania oraz przechowywania celem zapewnienia odpowiedniej jakości surowca olejkowego.

3. Podsumowanie

Zawartość, skład jak i właściwości olejków eterycznych oraz wydajność olejkowa uzależnione są od wielu czynników, wśród których należy wyróżnić warunki przechowywania. Pomimo stosowania się do zaleceń podanych na opakowaniu produktów ziołowych wskazujących na optymalne warunki przechowalnicze w temperaturze pokojowej, nie zawsze w ten sposób możemy ograniczyć ubytek olejku eterycznego. Straty przechowalnicze olejku eterycznego są różne dla poszczególnych rodzajów surowca i mogą być skutecznie ograniczane m.in. przez obniżenie temperatury przechowywania ziół.

ASSESSMENT OF THE ESSENTIAL OIL CONTENT IN THE MARJORAM HERB, THYME HERB, PEPPERMINT LEAVES AND CAMOMILE FLOWER STORED IN DIFFERENT CONDITIONS

Abstract: *The aim of the work was to evaluate the content of essential oil in peppermint leaves, marjoram herb, thyme herb and chamomile flowers stored at different temperatures (21 °C; 4 °C, 40 °C, -25 °C) and time (30 days, 90 days, 150 days, 200 days, 270 days). The experiment showed that storage at 40° C resulted in the highest loss of essential oil reaching, respectively, 76% and 75% in the case of thyme herb and mint leaves after 270 days of storage and up to approx. 52%*

and 40% in the case of chamomile inflorescences and marjoram herb. The leaves of mint and chamomile inflorescence stored for 270 days at room temperature lost about 30% and 36% of the initial content of the essential oil, respectively. On the other hand, storage in 4 °C and -25 °C stabilized the content of essential oil in the examined herbs.

Key words: essentials oil, herbs, storage, temperature

Literatura

- [1] Edris A.E.: Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review, *Phytotherapy Research*, 21,4, (2007), 308-323.
- [2] Higley A.: Reference guide for essential oils, Abundant Health., Spanish Fork City, USA, 2005.
- [3] Thoppil J. E.: Herb and spice essential oils. Therapeutic, flavour and aromatic chemicals of Apiaceae, Minija Janardhanan, Discovery Publishing House, New Delhi, India, 2004.
- [4] Rose J.: 375 essential oils and hydrosols, Frog, Ltd, North Atlantic Books, Berkeley, California, USA, 1999.
- [5] Pitman V.: Aromatherapy: A practical approach, Nelson Thornes, Nashville, USA, 2004.
- [6] Kowalski R., Kowalska G., Jankowska M., Nawrocka A., Kałwa K., Pankiewicz U., Włodarczyk-Stasiak M.: Secretory structures and essential oil composition of selected industrial species of Lamiaceae, *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 8, 2, (2019), 53-69.
- [7] Price S., Price L.: Aromatherapy for health professionals, Churchill Livingstone, Elsevier Ltd., 2007.
- [8] Kowalski R., Gagoś M., Kowalska G., Pankiewicz U., Sujka M., Mazurek A., Nawrocka A.: The effects of ultrasound technique on the composition of different essential oils, *Journal of Analytical Method in Chemistry*, Article ID 6782495, (2019), 1-10.
- [9] Masango P.: Cleaner production of essential oils by steam distillation, *Journal of Cleaner Production*, 13, (2005), 833–839.
- [10] Trytek M., Paduch R., Fiedurek J., Kandefor-Szerszeń M.: Monoterpeny – stare związki, nowe, zastosowania i biotechnologiczne metody ich otrzymywania, *Biotechnologia*, 1, 76, (2007), 135-155.
- [11] Nowak K., Żmudzińska- Żurek B.: 2009 Aromaty naturalne wyizolowane z surowców roślinnych, *Przemysł Spożywczy*, 63, 5, (2009), 18-22.
- [12] Burt S.: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review, *International Journal of Food Microbiology*, 94, (2004), 223-253.
- [13] Bakkali F. Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: Biological effects of essential oils – A review, *Food and Chemical Toxicology*, 46, (2008), 446-475.
- [14] Damian K.: Aromatherapy: scent and psyche : using essential oils for psychological and physical well-being, Inner Traditions / Bear & Company, Rochester, USA, 1995.
- [15] Grassmann J., Elstner E.F.: Essential oils properties and uses, W: B. Caballero, L. Turgo, P.M. Finglas (red.), Encyclopedia of food sciences and nutrition, Academic Press, San Diego, CA, 2003, 2177-2184.
- [16] Sankarikutty B., Narayanan C.S.: Essential oils isolation and production; [w:] B. Caballero, L. Turgo, P.M. Finglas (red.), Encyclopedia of food sciences and nutrition, Academic Press, San Diego, CA, 2003, 2185–2189.
- [17] Tomaino A., Cimino F., Zimbalatii V., Venuti V., Sulfaro V., De Pasquale A., Saija A.: Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some essential oils, *Food Chemistry*, 89, (2005), 549-554.
- [18] Kowalski R., Wawrzykowski J.: Essential oils analysis on dried materials and granulates obtained from *Thymus vulgaris* L., *Salvia officinalis* L., *Mentha piperita* L. and *Chamomilla recutita* L., *Flavour and Fragrance Journal*, 24, (2009), 31-35.

- [19] Farmakopea Polska VIII, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. Warszawa, 2008.
- [20] Andreucci A.C., Ciccarelli D., Desideri I., Pagni A.M.: Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry, *Annales Botanici Fennici*, 45, (2008), 11-18.
- [21] European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) EMEA/HMPC/193910/2007 Assessment report on *Mentha x piperita* L., folium: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/assessment-report-mentha-x-piperita-l-folium_en.pdf, London, 2008.
- [22] European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) EMA/HMPC/63479/2015; Assessment report on *Origanum majorana* L., herba: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-origanum-majorana-l-herba_en.pdf, London, 2016.
- [23] European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) EMA/HMPC/342334/2013; Assessment report on *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* L., herba https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-thymus-vulgaris-l-vulgaris-zygis-l-herba_en.pdf, London, 2013.
- [24] Kowalski R., Kowalska G., Jamroz J., Nawrocka A., Metyk D.: Effect of the ultrasound-assisted preliminary maceration on the efficiency of the essential oil distillation from selected herbal raw materials, *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, (2015), 214-220.
- [25] Nurzyńska-Wierdak R., Zawislak G., Kowalski R.: The content and composition of essential oil of *Origanum majorana* L. grown in Poland depending on harvest time and method of raw material preparation, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18, 6, (2015), 1482-1489.
- [26] Kowalski R., Wawrzykowski J.: Effect of ultrasound-assisted maceration on the quality of oil from the leaves of thyme *Thymus vulgaris* L., *Flavour and Fragrance Journal*, 24, (2009), 69-74.
- [27] WHO Monographs on selected medicinal plants, World Health Organization, Geneva, 1999.
- [28] Góra J., Lis A.: Najcenniejsze olejki eteryczne, Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 2005.
- [29] Wallwork K.: Aromatherapy and reflex sympathetic dystrophy, *The International Journal of Aromatherapy*, 14, (2004), 136-138.
- [30] Pothier J., Galand N., El Ouali M., Viel C.: Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme, *Farmaco*, 56, (2001), 505-511.
- [31] Szöke É., Máday E., Tyihák E., Kuzovkina I. N., Lemberkovics É.: New terpenoids in cultivated and wild chamomile (in vivo and in vitro), *Journal of Chromatography B*, 800, (2004), 231-238.
- [32] El-Sawi S.A., Ibrahim M.E.: Effects of processing and storage conditions on oil constituents of dried washington navel orange peel (*Citrus sinensis* L) from Egypt, *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 9, 8, (2018), 2225-2230.
- [33] Ebadi M.T., Sefidkon F., Azizi M., Ahmadi N.: Packaging methods and storage duration affect essential oil content and composition of lemon verbena (*Lippia citriodora* Kunth.), *Food Science and Nutrition*, 5, (2017), 588-595.
- [34] Kazaz S., Erbas S., Baydar H.: The effects of storage temperature and duration on essential oil content and composition oil rose (*Rosa damascena* Mill.), *Turkish Journal of Field Crops*, 14, 2, (2009), 89-96.

ISBN 978-83-66287-14-3