



ŻYWNOŚĆ

Nauka Technologia Jakość

FOOD

Science Technology Quality

Nr 2 (127)

Kraków 2021

Rok 28

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Lesław Juszczyk; e-mail: rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl; tel. 12 662-47-78
Zastępca redaktora naczelnego: dr hab. inż. Mariusz Witczak, prof. UR
Sekretarz redakcji (kontakt z autorami): mgr inż. Jadwiga Ślawska; e-mail: redakcja@pttz.org; tel. 12 662-48-30; 609-800-458

Redaktorzy tematyczni: prof. dr hab. Grażyna Jaworska (żywność pochodzenia roślinnego), prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska (mikrobiologia, bezpieczeństwo i higiena żywności), prof. dr hab. Krzysztof Krygier (technologia tłuszczów, żywność funkcjonalna), prof. dr hab. Irena Ozimek (zachowania konsumentów na rynku żywności), prof. dr hab. Edward Pospiech (nauka o mięsie), dr hab. Anna S. Tarczyńska (mleczarstwo, zarządzanie jakością)

Redaktor językowy (język polski): dr hab. Anna Piechnik
Native speaker: Stanley Holt (Bolton, UK)
Redaktor statystyczny: dr hab. Mariusz Witczak

Stali współpracownicy: dr Grażyna Morkis (Kraków)

Rada Naukowa: prof. dr hab. Tadeusz Sikora (przewodniczący), prof. dr hab. Barbara Baraniak, prof. dr Henryk Daun (USA), prof. dr hab. Teresa Fortuna, prof. dr hab. Mariola Friedrich, prof. dr Jozef Golian (Słowacja), prof. dr hab. Anna Gramza-Michałowska, prof. dr hab. Waldemar Gustaw, prof. dr Jerzy Jankun (USA), prof. dr hab. Henryk Jeleń, prof. dr Miroslava Kačániová (Słowacja), prof. dr hab. Agnieszka Kita, prof. dr Józef Korolczuk (Francja), prof. dr hab. Andrzej Lenart, prof. dr hab. Zdzisława Libudzisz, prof. dr hab. Katarzyna Majewska, prof. dr hab. Jan Oszmiański, prof. dr hab. Mariusz Piskuła, prof. dr Jan Pokorný (Czechy), prof. dr Roman Przybylski (Kanada), prof. dr hab. Piotr Przybyłowski, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, dr Andrzej Sośnicki (USA), prof. dr hab. Krzysztof Surówka, prof. dr hab. Tadeusz Trziszka, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz, prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, dr John Wojciak (Kanada).

WYDAWCA: POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994-1999 wydawcą czasopisma był Oddział Małopolski PTTŻ

© *Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2021*
Printed in Poland

e-ISSN 2451-0777 ISSN 2451-0769

Czasopismo w postaci elektronicznej jest wersją główną (pierwotną)

ADRES REDAKCJI: 30-149 KRAKÓW, ul. Balicka 122

Projekt okładki: Jolanta Czarnecka
Zdjęcie na okładce: mikelaptev-Fotolia.com

SKŁAD I DRUK:



Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków
Tel. 608 024 572
e-mail: wn@akapit.krakow.pl; www.akapit.krakow.pl

ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 2 (127)

Kraków 2021

Rok 28

SPIS TREŚCI

Od Redakcji	3
KAMILA JOANNA DANILUK, MICHAŁ WÓJCICKI, EDYTA JUSZCZUK-KUBIAK: Biofilm bakteryjny i możliwości jego eliminacji w przemyśle spożywczym	5
OLGA ŚWIDER, MICHAŁ WÓJCICKI, MAREK ŁUKASZ ROSZKO: Aminy biogenne – oszacowanie ryzyka spożycia i możliwości ograniczenia ich formowania w żywności fermentowanej	21
PAULINA ŚREDNICKA, EDYTA JUSZCZUK-KUBIAK, MAREK Ł. ROSZKO: Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikrobiotą jelitową człowieka	36
JOANNA BUCKA-KOLENDO, BARBARA SOKOŁOWSKA: Porównanie metod identyfikacji bakterii <i>Lactobacillus</i>	49
DZIYANA SHYMIALEVICH, MICHAŁ WÓJCICKI, STANISŁAW BŁAŻEJAK: Wykorzystanie fagów litycznych do ograniczania liczby pałeczek <i>Salmonella</i> w roślinnej matrycy żywnościowej	61
PATRYCJA SKWAREK, JUSTYNA LIBERA: Bezpieczeństwo mikrobiologiczne mięsa drobiowego w krajach UE w latach 2019 - 2020	78
JOANNA MARKOWSKA, ELŻBIETA POLAK, ANNA DRABENT, ALEKSANDRA ŻAK: Konopie siewne <i>Cannabis sativa</i> L. – odmiany, właściwości, zastosowanie	90
JOANNA KAPUSTA-DUCH, ANNA WISŁA-ŚWIDER, EWELINA NOWAK: Ocena zawartości azotanów(V) i azotanów(III) w kapuście kiszzonej białej chłodniczo składowanej, pochodzącej z upraw konwencjonalnych i ekologicznych	106
ANNA S. TARCZYŃSKA: Skala marnowania żywności wśród studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie	121
MAGDALENA NIEWCZAS-DOBROWOLSKA: Preferowane źródła informacji dotyczącej żywności w opinii konsumentów	132
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym	144
MONIKA PRZEOR: XXV Jubileuszowa Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ	154
Technolog Żywności	151

Zamieszczone artykuły są recenzowane

Czasopismo jest referowane przez: Chemical Abstracts Service, IFIS, Scopus, AGRO, BazEkon, Index Copernicus, CrossRef

FOOD. Science. Technology. Quality

The Scientific Organ of Polish Food Technologists' Society (PTTŻ) – quarterly

No 2 (127)

Kraków 2021

Vol. 28

CONTENTS

From the Editor	3
KAMILA JOANNA DANILUK, MICHAŁ WÓJCICKI, EDYTA JUSZCZUK-KUBIAK: Bacterial biofilm and possibilities of eliminating it in the food industry	5
OLGA ŚWIDER, MICHAŁ WÓJCICKI, MAREK ŁUKASZ ROSZKO: Biogenic amines – consumption risk assessment and prospects of limiting their formation in fermented foods	21
PAULINA ŚREDNICKA, EDYTA JUSZCZUK-KUBIAK, MAREK Ł. ROSZKO: Interactions of endocrine disrupting compounds present in food with human intestinal microbiota	36
JOANNA BUCKA-KOLENDO, BARBARA SOKOŁOWSKA: Comparison of <i>Lactobacillus</i> identification methods.....	49
DZIYANA SHYMIALEVICH, MICHAŁ WÓJCICKI, STANISŁAW BŁAŻEJAK: Using lytic phages to reduce the number of <i>Salmonella</i> rods in plant food matrix.....	61
PATRYCJA SKWAREK, JUSTYNA LIBERA: Microbiological safety of poultry meat in EU countries in 2019 - 2020	78
JOANNA MARKOWSKA, ELŻBIETA POLAK, ANNA DRABENT, ALEKSANDRA ŻAK: Hemp <i>Cannabis sativa</i> L. – types, properties, uses	90
JOANNA KAPUSTA-DUCH, ANNA WISŁA-ŚWIDER, EWELINA NOWAK: Content evaluation of nitrates and nitrites in white sauerkraut kept in cold storage and produced from conventional and organic cultivation	106
ANNA S. TARCZYŃSKA: The scale of food waste among students of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn.....	121
MAGDALENA NIEWCZAS-DOBROWOLSKA: Preferred sources of food information in the opinion of consumers	132
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish and EU legislation	144
Monika Przeor: The 25th Jubilee Scientific Session of Young Academic Scientists of PTTŻ.....	148
The Food Technologist.....	151

Only reviewed papers are published

Covered by: Chemical Abstracts Service, IFIS, Scopus, AGRO, BazEkon, Index Copernicus, CrossRef

OD REDAKCJI

Szanowni Czytelnicy,

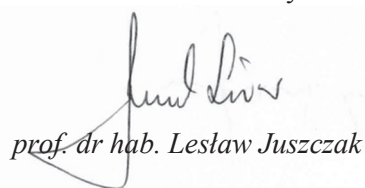
przekazujemy Państwu nr 2 (127) czasopisma Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, w którym zamieściliśmy wybrane artykuły będące pokłosiem dwóch konferencji przeprowadzonych online: V Sympozjum Naukowe z cyklu „Bezpieczeństwo żywnościowe i żywności” oraz Krokusowego XI Sympozjum Naukowe nt. „Probiotyki i prebiotyki żywności”. Polecamy je uwadze naszych Czytelników, mając nadzieję, że spełnią Państwa oczekiwania.

Zapraszamy również do lektury tzw. stałych działów, w których zamieściliśmy m.in. informacje o wybranych konferencjach współorganizowanych przez Polskie Towarzystwo Technologów Żywności w 2021 roku. Prosimy jednak o sprawdzanie aktualnych informacji na stronach odpowiednich konferencji lub kontakt z organizatorami, gdyż sytuacja pandemiczna wymusza niekiedy zmiany terminów bądź sposobów odbywania konferencji.

Zapraszamy do odwiedzania strony internetowej Wydawnictwa:
<http://wydawnictwo.pttz.org>

Kraków, czerwiec 2021 r.

Redaktor Naczelny



prof. dr hab. Lesław Juszcak

KAMILA JOANNA DANILUK, MICHAŁ WÓJCICKI,
EDYTA JUSZCZUK-KUBIAK

BIOFILM BAKTERYJNY I MOŻLIWOŚCI JEGO ELIMINACJI W PRZEMYŚLE SPOŻYWCZYM

Streszczenie

Biofilmy bakteryjne występujące w przemyśle spożywczym stanowią złożone, wielogatunkowe grupy zarówno bakterii saprofitycznych, jak i patogennych. Często zlokalizowane są na powierzchniach trudno dostępnych dla środków myjących stosowanych w obiegu zamkniętym, jak i dla mechanicznego czyszczenia. W przemyśle spożywczym biofilmy bakteryjne stanowią źródło zanieczyszczeń mikrobiologicznych żywności, powodując obniżenie jakości i trwałości produktów spożywczych. Ponadto biofilmy spożywcze mogą być źródłem bakterii patogennych, takich jak *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. czy *Listeria monocytogenes* oraz bakterii oportunistycznych (np. *Escherichia coli*), wywołujących choroby układu pokarmowego, które mogą być długotrwałe i trudne do leczenia, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością. W niniejszym opracowaniu przedstawiono podstawowe mechanizmy tworzenia biofilmu bakteryjnego oraz najistotniejsze funkcje pełnione przez zewnątrzkomórkową macierz biofilmu (EPS). Scharakteryzowano główne bakteryjne patogeny występujące w branżach: mięsnej, mleczarskiej, ryb i owoców morza, produktów pochodzenia roślinnego o minimalnym stopniu przetworzenia oraz w sokowniczej, z uwzględnieniem możliwości tworzenia przez te drobnoustroje biofilmu trwałego i opornego na czynniki zewnętrzne. Przedyskutowano również możliwości eradykacji biofilmów spożywczych ze szczególnym uwzględnieniem metod polegających na zastosowaniu związków naturalnych pochodzenia roślinnego oraz wykorzystaniu litycznych bakteriofagów i/lub ich oczyszczonych enzymów.

Słowa kluczowe: biofilm bakteryjny, macierz zewnątrzkomórkowa, patogeny, eliminacja biofilmu, przetwórstwo żywności

Wprowadzenie

Wzrost świadomości konsumentów, standardy jakości produktów spożywczych oraz konkurencja na rynku wpłynęły na konieczność prowadzenia ścisłej kontroli produktów, które dostarczane są do handlu, jak również monitorowanie każdego etapu

Mgr inż. K. J. Daniluk, mgr inż. M. Wójcicki, dr hab. E. Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa. Kontakt: michal.wojcicki@ibprs.pl

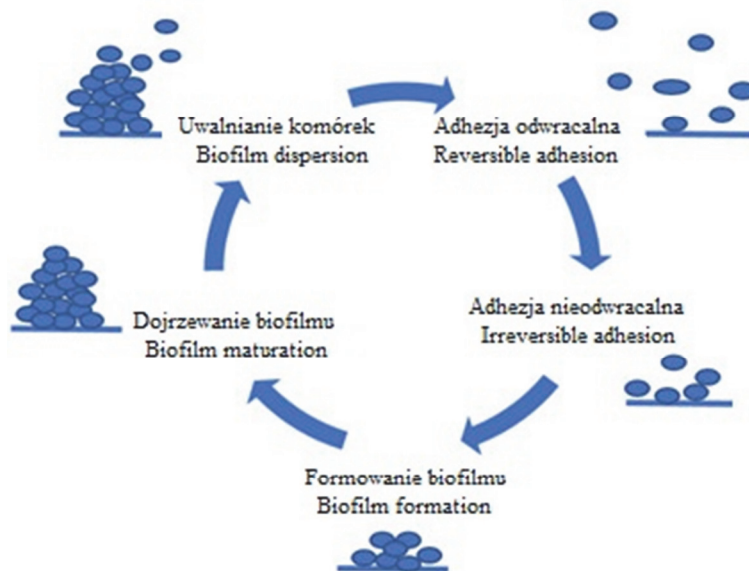
procesu technologicznego w zakładzie produkcyjnym. W przemyśle spożywczym wypracowano procedury mycia i dezynfekcji linii produkcyjnych, które gwarantują zachowanie bezpieczeństwa mikrobiologicznego w procesie produkcyjnym [30]. Metody te są skuteczne w usuwaniu zanieczyszczeń spowodowanych przez formy planktoniczne drobnoustrojów [22]. Wciąż nierozwiązanym problemem jest tworzenie na liniach produkcyjnych, zwłaszcza w miejscach trudno dostępnych podczas czyszczenia, skupisk drobnoustrojów w formie biofilmu. Wielogatunkowe biofilmy bakteryjne to złożone struktury charakteryzujące się opornością na wiele powszechnie stosowanych środków dezynfekcyjnych [15].

Celem niniejszego opracowania było przybliżenie mechanizmów tworzenia biofilmu bakteryjnego oraz jego występowania w różnych branżach przemysłu spożywczego, jak również omówienie możliwości jego skutecznej eliminacji ze środowiska produkcji żywności.

Mechanizm powstawania biofilmu

Formowanie matrycy biofilmu bakteryjnego jest procesem złożonym i wieloetapowym [26] – rys. 1. Niezależnie od rodzaju podłoża, na którym powstaje biofilm, pierwszym etapem jest adhezja pierwotna (odwracalna) uwarunkowana przyciąganiem elektrostatycznym, siłami van der Waalsa i wiązaniami kowalencyjnymi, podczas której tworzy się warstwa kontaktowa [8, 31]. Na tym etapie u bakterii ważną rolę odgrywa obecność rzęsek (np. u *E. coli*) lub wici (np. u *Pseudomonas aeruginosa*) [26, 45]. Podczas kolejnego etapu (adhezja nieodwracalna) rozpoczyna się produkcja macierzy zewnątrzkomórkowej EPS (ang. *Extracellular Polymeric Substances*) [8] oraz tworzenie zasadniczej warstwy biofilmu nieodwracalnie związanej z podłożem [31]. Adhezja nieodwracalna związana jest z procesem namnażania komórek bakteryjnych oraz aktywowania procesu ich wewnętrznej komunikacji zwanego *quorum sensing* (*QS*), prowadząc do formowania dojrzałego biofilmu [32]. Powstały biofilm bakteryjny tworzy strukturę biologiczną zróżnicowaną pod względem budowy i rodzaju zasiedlających go drobnoustrojów [45]. Odłączenie komórek od powierzchni skolonizowanego materiału jest ostatnim etapem, który jest aktywowany w momencie osiągnięcia grubości krytycznej danej populacji w biofilmie regulowanej przez *QS* lub wzmożonym stresem środowiskowym, tj. brakiem substancji odżywczych czy obecnością związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych [1].

Najczęściej spotykaną strukturą biofilmu w przemyśle spożywczym jest forma kolumnowa oraz model grzyba [3, 26]. Biofilm kolumnowy nazywany inaczej „modelem heterogennej mozaiki” tworzony jest najczęściej przez *E. coli* i *P. aeruginosa*.



Rys. 1. Uproszczony schemat etapów rozwoju biofilmu

Fig. 1. Simplified chart of biofilm development stages

Źródło / Source: opracowanie własne / the authors' own study

Rola macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu (EPS)

Komórki bakteryjne w biofilmach otoczone są macierzami zewnątrzkomórkowymi, zwanymi egzopolisacharydami (EPS), których składniki pełnią ważną rolę w funkcjonowaniu biofilmu. Macierz biofilmu stanowi polimerowy śluz składający się z polisacharydów, białek, fosfolipidów, kwasów nukleinowych, substancji powierzchniowo czynnych oraz wody [7, 8]. Funkcją EPS jest unieruchomienie komórek bakteryjnych w biofilmie, co sprzyja wzajemnej komunikacji bakterii oraz wychwytywaniu substancji odżywczych będących źródłem energii [26]. W zależności od drobnoustrojów obecnych w biofilmie struktura chemiczna EPS jest zróżnicowana, a skład ilościowy i jakościowy substancji odżywczych wpływa na ilość wytwarzanego polimeru. Obecność kanałów transportowych w biofilmie powoduje, że komórki bakterii znajdujące się w warstwie powierzchniowej są metabolicznie aktywne, a ich rozwój wpływa na rozrost struktury biofilmu. Bakterie znajdujące się w głębszych warstwach biofilmu są w stanie anabiozy lub powolnego wzrostu. Dostępność tlenu w głębszych warstwach jest ograniczona, co prowadzi do aktywacji alternatywnych szlaków oddychania komórkowego. Różnorodność gatunkowa drobnoustrojów tworzących biofilm wpływa na jego integralność oraz wzajemną ochronę przed ekspozycją na czynniki środowiskowe,

tj. neutralizację substancji chemicznych [7]. W tab. 1. przedstawiono wybrane składniki zewnątrzkomórkowej macierzy polimerycznej i funkcje, jakie pełnią.

Tabela 1. Podstawowe funkcje pełnione przez wybrane składniki zewnątrzkomórkowej macierzy polimerycznej

Table 1. Basic functions performed by selected components of the extracellular polymeric matrix

Składniki EPS Components of EPS	Funkcja / Function
Polisacharydy, DNA, białka / Polysaccharides, DNA, proteins	Adhezja komórek bakteryjnych do powierzchni abiotycznych i biotycznych; łączenie komórek bakteryjnych i wzajemne rozpoznawanie Bacterial cells adhesion to abiotic and biotic surfaces; fusion of bacterial cells and mutual recognition
Polisacharydy i białka Polysaccharides and proteins	Bariera ochronna przed związkami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym Protective barrier against compounds with antimicrobial activity
Białka / Proteins	Aktywność enzymatyczna rozkładająca makrocząsteczki do prostego substratu pokarmowego; aktywność enzymatyczna umożliwiająca uwolnienie komórek z biofilmu / Enzymatic activity to break down macromolecules into simple food substrate; enzymatic activity which allows cell releasing from biofilm
DNA	Wymiana materiału genetycznego pomiędzy komórkami w biofilmie spowodowana horyzontalnym transferem genów / Genetic material exchange between biofilms cells caused by horizontal gene transfer
Ramnolipidy Rhamnolipids	Wykluczenie niektórych gatunków ze struktury biofilmu; wpływ na funkcjonalność kanałów transportowych / Exclusion of some species from biofilm structure; impact on functionality of transport channels
Wszystkie polimery EPS All EPS polymers	Źródło energii pokarmowej ze związków węgla, potasu i azotu / Source of food energy from carbon, potassium and nitrogen compounds

Źródło / Source: opracowanie własne na podstawie [8, 20, 25] / the authors' own study based on [8, 20, 25]

Rola quorum sensing (QS) w funkcjonowaniu biofilmu bakteryjnego

System *QS* (wyczuwania liczebności) jest procesem komunikacji międzykomórkowej umożliwiającym wydzielanie specyficznych cząsteczek sygnałowych w odpowiedzi na zmiany gęstości komórek bakteryjnych tworzących biofilm [32]. Wykrywanie kworum przez populację bakteryjną reguluje etapy tworzenia biofilmu poprzez aktywację ekspresji genów odpowiedzialnych za funkcjonowanie biofilmu. Aktywacja głównego genu bakteryjnego – *pelA* – powodującego wydzielanie macierzy zewnątrzkomórkowej [11] i białek tworzy organizm wielokomórkowy odporny na eradykację [53]. Oprócz formowania błony biologicznej *QS* aktywuje geny związane z syntezą bakteriocyn, przetrwalników oraz regulacją wirulencji i apoptozy. Zdolność komunikacji między bakteriami umożliwia podział funkcji biologicznych w biofilmie i adaptację do środowiska zewnętrznego. W wyczuwaniu kworum pośredniczą cząsteczki sygnałowe zwane autoinduktorami (AI) [32], wydzielane w zależności od wzrostu liczby

bakterii tworzących biofilm [9], które są wiązane przez receptory białkowe komórek bakteryjnych [19]. System wzajemnej komunikacji związany z AI determinuje odmienną budowę ściany komórkowej bakterii, a komunikacja zachodzi na poziomie tego samego lub różnych gatunków [28]. Bakterie Gram-ujemne wydzielają cząsteczki sygnałowe, zwane AHL (laktony N-acylo-L-homoseryny), zbudowane z laktonu homoseryny, który w pozycji α jest acylowany kwasem tłuszczowym [24, 32]. Cząsteczki sygnałowe bakterii Gram-ujemnych różnią się między sobą liczbą atomów węgla w łańcuchu, budową kwasu tłuszczowego oraz stopniem utlenienia. Niejednorodna budowa strukturalna biofilmu umożliwia bakteriom stworzenie własnego „języka”, niezbędnego do komunikacji w obrębie każdego gatunku [20]. Bakterie Gram-dodatnie wydzielają cząsteczki sygnałowe AIP, czyli oligopeptydy autoindukcyjne, dwuskładnikowe białka, które przekazują sygnał do komórki za pomocą mechanizmu fosforylacji i defosforylacji oraz regulują ekspresję genów powiązanych w komórce [53]. Dyfuzja AIP do cytoplazmy odbywa się za pomocą białka transportowego zależnego od ATP [47]. Powszechnie znanym systemem komunikacji bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich są autoinduktory typu drugiego (AI-2) umożliwiające komunikację międzygatunkową w biofilmach mieszanych [53]. AI-2 wydzielane są przez bakterie z rodzajów *Bacillus*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia* i *Vibrio* [53]. Dokładne poznanie mechanizmu QS w funkcjonowaniu biofilmu bakteryjnego umożliwi w przyszłości opracowanie nowoczesnych metod inhibicji tworzenia biofilmów w przemyśle rolno-spożywczym.

Występowanie biofilmów bakteryjnych w przemyśle spożywczym

Biofilmy bakteryjne występują powszechnie w wielu gałęziach przemysłu spożywczego. Stanowią one źródło zanieczyszczeń mikrobiologicznych żywności, powodują obniżenie jakości i trwałości produktów spożywczych.

Biofilmy w przemyśle mięsnym

W przemyśle mięsnym zanieczyszczenia spowodowane bakteriami patogennymi są poważnym problemem dla zdrowia publicznego i często prowadzą do wycofania produktów ze sprzedaży, co powoduje znaczne straty finansowe producentów [15]. Do zanieczyszczenia mięsa dochodzi głównie podczas uboju oraz dalszej jego obróbki. Linie produkcyjne są uznawane za główne źródło zanieczyszczeń krzyżowych w całym łańcuchu żywnościowym. Głównymi patogenami bakteryjnymi występującymi w przemyśle mięsnym są: *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* oraz *Staphylococcus aureus* [48].

Pałeczki z rodzaju *Salmonella* są jednym z głównych patogenów przenoszonych przez mięso i produkty drobiowe, a konieczność wykrywania tych bakterii w żywności jest regulowana prawnie. W środowisku produkcyjnym *Salmonella* tworzy biofilm na

różnych powierzchniach, a zdolność ta jest koordynowana przez złożony program ekspresji genów i aktywność odpowiednich białek w zależności od serowaru patogenu, powierzchni produkcyjnej oraz warunków środowiskowych [15]. W trakcie tworzenia biofilmu *Salmonella* wytwarza celulozę oraz wykorzystuje fimbrie (włosowate struktury, których główną funkcją jest ułatwianie adhezji bakterii do innych komórek) [1, 14]. Innym istotnym patogenem związanym z przemysłem mięsnym jest *L. monocytogenes*, czynnik etiologiczny listeriozy, choroby o stosunkowo wysokim wskaźniku śmiertelności (ok. 20 %) [39]. Z uwagi na zdolność przylegania do powierzchni stałych oraz adaptację do warunków stresowych (niski poziom składników odżywczych, wahania pH i niska temperatura) biofilm utworzony przez tę bakterię może być obecny w zakładach przetwórstwa żywności przez wiele lat [1]. Bakterie *L. monocytogenes* mogą tworzyć biofilmy wielogatunkowe (mieszane) z innymi bakteriami występującymi w produktach mięsnych, tj. *Pseudomonas* oraz *Carnobacterium*, rodziną Enterobacteriaceae czy bakteriami kwasu mlekowego (LAB, ang. *Lactic Acid Bacteria*) [15, 48]. Enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC, ang. *enterohemorrhagic E. coli*) wytwarzają toksynę Shiga (STEC, ang. *Shiga-toxin producing E. coli*). W warunkach naturalnych kolonizują przewód pokarmowy bydła, a do środowiska przedostają się wraz z odchodami swoich gospodarzy. Do zanieczyszczenia tymi bakteriami dochodzi głównie podczas skórowania zwierząt, gdy zostaje odsłonięta macierz zewnątrzkomórkowa mięśni szkieletowych. Podczas interakcji z powierzchnią biotyczną lub abiotyczną patogen ten angażuje różne mechanizmy molekularne aktywujące ekspresję odpowiednich genów [15]. Wśród EHEC najczęściej izolowana jest *E. coli* O157:H7, której w przytwierdzeniu do powierzchni mięsa i w późniejszym tworzeniu biofilmu pomagają inne, odporne na środki dezynfekujące mikroorganizmy, np. *Acinetobacter calcoaceticus* [48].

Głównym źródłem *C. jejuni*, podobnie jak w przypadku *Salmonella*, jest drób. W porównaniu z wcześniej omówionymi patogenami pałeczki *C. jejuni* są wrażliwe zarówno pod względem wymagań rozwojowych, jak i na czynniki środowiskowe. Tworzenie biofilmu jest kluczowym czynnikiem umożliwiającym przetrwanie tych bakterii w środowisku produkcji i przetwarzania żywności [4]. Patogenność *S. aureus* związana jest natomiast z wytwarzaniem szeregu termostabilnych enterotoksyn. Do zanieczyszczenia produktów mięsnych może dochodzić podczas uboju zwierząt, zanieczyszczenia krzyżowego w trakcie przygotowywania żywności oraz bezpośredniego kontaktu z zakażonymi osobami mającymi kontakt z żywnością, będącymi bezobjawowymi nosicielami enterotoksycznych *S. aureus* [15].

Biofilmy w przemyśle mleczarskim

Z uwagi na dużą zawartość składników odżywczych mleko jest środowiskiem sprzyjającym wzrostowi patogennych bakterii tworzących biofilmy. W zakładach mleczarskich biofilmy bakteryjne występują w zbiornikach, rurach, na powierzchniach

roboczych, ścianach oraz na podłogach [30]. Najczęściej izolowanymi bakteriami z linii produkcyjnych są rodzaje *Pseudomonas*, *Serratia* oraz gatunki *Staphylococcus sciuri* i *Stenotrophomonas maltophilia*. Do powstawania biofilmów mieszanych często dochodzi na membranach do ultrafiltracji i odwróconej osmozy. Macierz biofilmu, która jest oporna na czyszczenie i dezynfekcję, stanowi potencjalne źródło zanieczyszczenia mleka oraz powoduje problemy techniczne (zatykanie porów membran filtrów, wzrost kosztów energii). Obecność w środowisku mleka bakterii LAB może mieć silny antagonistyczny wpływ zarówno na osadzanie patogenów na powierzchniach, jak również na ich proliferację. Z surowego mleka i niepasteryzowanych produktów mlecznych powszechnie izoluje się *L. monocytogenes*, która wraz z bakteriami z rodzajów *Citrobacter* i *Lactococcus* wchodzi w skład biofilmów występujących na powierzchniach urządzeń przeznaczonych do dojzenia [15]. Bakterie z gatunku *S. aureus* stanowią główny czynnik etiologiczny odpowiedzialny za ostre i przewlekłe zapalenie wymienia u krów (*mastitis*). W patogenezie zapalenia gruczołu mlekowego głównym czynnikiem zjadliwości jest zdolność do tworzenia biofilmów opornych na środki przeciwdrobnoustrojowe. Tworzenie przez *S. aureus* biofilmu jest związane z produkcją polisacharydowej adhezyny międzykomórkowej i kilku białek [41]. Zagrożenie w przemyśle mleczarskim stanowi rodzaj *Bacillus*, jak również inne bakterie tworzące przetrwalniki, z uwagi na zdolność do przetrwania procesu pasteryzacji i tworzenia biofilmów w rurociągach poboru mleka. Biofilm chroni osadzone w nim przetrwalniki przed inaktywacją [21]. Ponadto kwas masłowy oraz wolne kwasy tłuszczowe uwalniane podczas lipolizy tłuszczu mlecznego powodują tworzenie struktur związanych z biofilmem, które dodatkowo chronią bakterie przed niekorzystnymi warunkami środowiska [34]. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* sporadycznie zanieczyszczają mleko w proszku (a zatem również produkty dla niemowląt), przyczyniając się do wywoływania zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Z uwagi na możliwość tworzenia biofilmu są odporne na powszechnie stosowane środki odkażające [15].

Biofilmy w produkcji ryb i owoców morza

Czynniki bakteryjne związane ze spożywaniem owoców morza są odpowiedzialne za większość zakażeń wymagających hospitalizacji. Warstwa śluzu na powierzchni ryb stanowi pierwszą barierę dla zagrożeń zewnętrznych, zawiera liczne związki przeciwbakteryjne (m.in. immunoglobuliny, aglutyniny, lektyny, lizyny i lizozym). Owoce morza są podatne na zanieczyszczenia powierzchniowe lub tkankowe, zwłaszcza w przypadku hodowli w obszarach zanieczyszczonych ściekami komunalnymi. Dodatkowe ryzyko stanowi spożywanie surowych lub niedogotowanych owoców morza. Najczęściej izolowanymi bakteriami są rodzaje *Pseudomonas*, *Listeria*, *Stenotrophomonas*, *Brochothrix*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* i *Chryseobacterium*, które mogą tworzyć stabilne biofilmy [15]. Powszechnie izolowanymi patogenami bakteryj-

nymi owoców morza zdolnymi do tworzenia biofilmów są: *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp. oraz *L. monocytogenes*. Zdolność do szybkiej kolonizacji powierzchni owoców morza przez te patogeny (zwłaszcza w biofilmach mieszanych) zmniejsza skuteczność stosowanych metod dezynfekcji. Biofilmy formowane przez patogenne dla człowieka szczepy *Vibrio* stanowią zanieczyszczenie akwakultury morskiej [12], ponieważ mogą koncentrować się w skorupiakach filtrujących (np. małże podczas filtracji wody gromadzą mikroflorę patogenną) [15]. Zdolność do tworzenia biofilmu wynika z aktywności genów odpowiedzialnych za syntezę pilusów, wici i egzopolisacharydów oraz mechanizmów regulacyjnych (dwuskładnikowych regulatorów transdukcji sygnału oraz sygnalizacji *QS*). Bakterie z rodzaju *Aeromonas* stanowią naturalną mikroflorę jelit wielu ryb. Wytwarzanie biofilmu przez *A. hydrophila* jest ściśle skorelowane z ich wirulencją. Bakterie te łatwo tworzą cienki biofilm o złożonej strukturze [17]. Pałeczki *A. hydrophila* mają system *QS* zależny od N-acylohomoseryny (AHL), bazujący na locus *ahyRI*. Wykazano, że rozwój biofilmu przez te bakterie jest regulowany przez *QS*. Istotny problem w produkcji rybnej stanowią również bakterie *L. monocytogenes* [15].

Biofilmy w produktach pochodzenia roślinnego o minimalnym stopniu przetworzenia

Coraz częstszym problemem są zatrucia spowodowane spożyciem produktów o minimalnym stopniu przetworzenia pochodzenia roślinnego zanieczyszczonych mikroflorą patogenną. W celu zmniejszenia liczby drobnoustrojów na powierzchni owoców i warzyw producenci stosują mycie z dodatkiem środków odkażających. Z uwagi na silne przywiązanie przylegających patogenów do powierzchni produktów (czemu sprzyjają nierówności powierzchni, tj. szorstkość, szczeliny i wgłębienia), mycie w niewielkim stopniu redukuje ich liczbę. Najczęściej izolowanymi z żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego bakteryjnymi patogenami tworzącymi biofilmy są: *S. enterica*, *L. monocytogenes* i *E. coli*. Ponadto z biofilmów na powierzchni kapusty i sałaty wyizolowano *Bacillus cereus* i *A. hydrophila* [15]. Rodzaj *Salmonella*, pomimo narażenia na stres środowiskowy, skutecznie utrzymuje się na powierzchni rośliny, co związane jest z produkcją celulozy i innych polisacharydów, zdolnością penetracji tkanki roślinnej i możliwością wbudowywania do już istniejących biofilmów wielogatunkowych [23]. W mechanizmie początkowego przyczepiania i rozwoju biofilmu ważną rolę odgrywają wici oraz powierzchniowe struktury komórkowe tych bakterii, m.in. fimbrie [1].

Biofilmy w przemyśle sokowniczym

Głównym problemem przemysłu sokowniczego i koncentratów soków owocowych są zepsucia powodowane występowaniem acidotermofilnych bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*, zwłaszcza gatunku *A. acidoterrestis*. Zarówno komórki tych bakterii,

jak i ich przetrwalniki tworzą na powierzchni urządzeń przetwórczych trudny do usunięcia biofilm [22]. Materiały spożywcze ułatwiają przyleganie bakterii do powierzchni. Wykazano, że wodne powłoki spożywcze mogą zmniejszać adhezję komórek bakteryjnych, przez co utrudniają tworzenie macierzy biofilmu w środowisku produkcyjnym.

Metody usuwania biofilmów spożywczych

Różnorodność mikroorganizmów obecnych w biofilmach oraz stopień ich rozwoju wpływają na wybór odpowiedniej metody eradykacji biofilmu. Uważa się, że najlepszą strategią usuwania biofilmu jest zapobieganie jego rozwojowi. Odpowiednio zaprojektowany sprzęt produkcyjny w połączeniu ze środkami higieny prowadzi do usuwania niepożądanych resztek żywności, w tym drobnoustrojów [29]. Stosowane antybakteryjne dodatki do żywności, tj. środki powierzchniowo czynne, olejki eteryczne czy barwniki stanowią skuteczne bariery zapobiegające formowaniu błony biologicznej w przemyśle spożywczym [53]. Prowadzone są badania dotyczące inhibitorów roślinnych wykrywających *QS*. Wykazano, że składniki roślin wykorzystywanych w tradycyjnej medycynie chińskiej hamują tworzenie biofilmu [6]. Przykładem jest emodyna, naturalny składnik korzeni wielu roślin, który istotnie hamuje bakteryjny system wytwarzający kworum, np. u bakterii z gatunku *P. aeruginosa* [37]. Furanony izolowane z morskiego glona *Delisea pulchra* są zdolne do usuwania autoinduktorów z komórek *E. coli* [50]. Zwalczanie patogenów w ich chronionym środowisku polimerowym jest powszechnym problemem, z którym zmaga się przemysł spożywczy [49].

W zwalczaniu biofilmów bakteryjnych stosowane są metody fizyczne, chemiczne oraz biologiczne [52].

Metody fizyczne

Klasycznym sposobem eliminacji biofilmu jest zastosowanie metod fizycznych, tj. mechaniczne niszczenie macierzy biofilmu poprzez skrobanie i szorowanie. Techniki te cechuje niska precyzja ze względu na różnorodną budowę sprzętu produkcyjnego. Oprócz działania mechanicznego można zastosować wysoką temperaturę (powyżej 95 °C) lub kilkakrotne zamrażanie [27]. Skuteczną metodą usuwania biofilmu jest zastosowanie zimnej plazmy [35, 52]. Jest to mieszanina naładowanych cząsteczek, jonów, atomów i wolnych rodników w połączeniu z promieniowaniem UV. Uważa się, że mieszanina tych substancji czynnych zakłóca metaboliczne szlaki i integralność błony komórkowej bakterii [54].

Metody chemiczne

Substancje chemiczne stosowane w przemyśle spożywczym powinny charakteryzować się nie tylko skutecznością w zwalczaniu drobnoustrojów, ale także szybkością

i łatwością splukiwania z urządzeń produkcyjnych. Z uwagi na to, że powstawanie biofilmu jest procesem wieloetapowym, na rynku dostępne są środki chemiczne o różnej aktywności działania na drobnoustroje [10]. Preparaty dezynfekujące zawierające związki chloru i kwas nadoctowy są często stosowane w branży owocowo-warzywnej [1]. Wykazano, że gazowy dwutlenek chloru jest skuteczny w niszczeniu endosporów bakterii z gatunku *B. cereus* obecnych na urządzeniach przemysłowych [33]. Stwierdzono, że podchloryny stanowią najskuteczniejsze związki chloru stosowane w odkażaniu powierzchni roboczych. Ich wadą jest mała rozpuszczalność w wodzie i możliwość korozji powierzchni metalowych przy wysokiej temperaturze [1]. W przemyśle mięsny i jajeczny do dezynfekcji powierzchni stosuje się kwas nadoctowy ze względu na brak toksycznych pozostałości. Innym rozwiązaniem jest używanie nadtlenu wodoru w stężeniu do 5 %, który generuje wolne rodniki w trakcie kontaktu z zewnątrzkomórkowymi substancjami polimerowymi, niszcząc strukturę biofilmu bez powstawania toksycznych produktów ubocznych [43]. Gazem o silnym działaniu utleniającym jest ozon, który niszczy wiele mikroorganizmów tworzących biofilm. Ozon wykorzystuje się w przemyśle mleczarskim do dezynfekcji stali nierdzewnej używanej przy produkcji serów pleśniowych [43, 46]. Powszechnie stosowanymi środkami dezynfekcyjnymi w różnych gałęziach sektora spożywczego są czwartorzędowe związki amoniowe (QAC) powodujące lizę komórek bakteryjnych tworzących strukturę biofilmu [18].

Innym sposobem niszczenia biofilmów spożywczych jest wykorzystywanie właściwości kwasów organicznych, np. cytrynowego, jabłkowego oraz galusowego jako alternatywnych środków kontroli tworzenia biofilmu w przemyśle mleczarskim. Źródłem tych kwasów są rośliny, które pod względem oczekiwań konsumentów nie budzą tyłu zastrzeżeń, co związki chloru powszechnie stosowane do niszczenia biofilmu [42]. Akbas i Kokumer [2] potwierdzili, że użycie 2- i 10-procentowego kwasu cytrynowego przez 20 min wyeliminowało bakterie *S. aureus* z powierzchni ze stali nierdzewnej. Wymienieni autorzy zastosowali w doświadczeniu także 0,3-procentowy kwas nadoctowy, który charakteryzował się mniejszą skutecznością usuwania biofilmu w porównaniu z zastosowanymi kwasami organicznymi.

Kolejną grupą związków pochodzenia roślinnego o właściwościach niszczących biofilmy są olejki eteryczne [13]. Substancje te działają antybakteryjnie i przeciwgrzybiczo, zwłaszcza w warunkach *in vitro* [40, 44]. Raffaella i wsp. [38] zastosowali mikroemulsję olejku z *Cinnamomum cassia* (bogatego w aldehyd cynamonowy). W błonie utworzonej przez 24-godzinny biofilm *S. aureus* uzyskali zredukowanie liczby bakterii o 4 rzędy logarytmiczne (99,99 %). Innym przykładem jest cytral, główny składnik olejku z trawy cytrynowej, który utrudnia tworzenie biofilmu bakteryjnego. Shi i wsp. [42] przy użyciu tego związku zmniejszyli poziom czynnika wirulencji i biosyntezę wici u *Cronobacter sakazakii*. Różnorodność chemiczna olejków pozy-

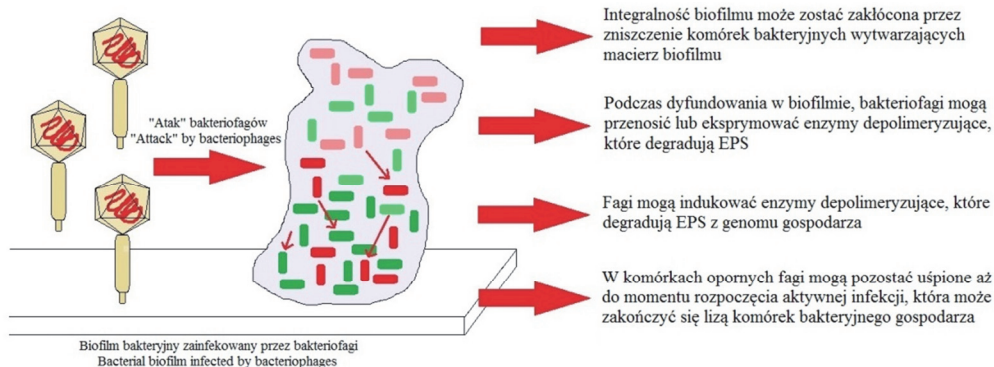
skiwanych z roślin pozwala naukowcom na opracowanie preparatów przeciw biofilmom lub wykorzystanie poszczególnych składników, dodając je bezpośrednio do produktów spożywczych. Olejki eteryczne pozyskiwane z lebiodki pospolitej (oregano) wykazują właściwości antyadhezyjne, które są kluczowe w powstawaniu biofilmu. Wykazano, że monoterpen i karwakrol z olejku eterycznego oregano można zastosować bezpośrednio do produkcji soków, octu i mięsa mielonego w celu zahamowania wzrostu bakterii z gatunków *S. enterica* czy *Clostridium perfringens* [13].

Metody biologiczne

Do metod biologicznej eliminacji biofilmów bakteryjnych należy stosowanie wirusów bakteryjnych (bakteriofagów, fagów) lub bezpośrednio oczyszczonych enzymów fagowych [36]. Zastosowanie bakteriofagów w przemyśle spożywczym jest stosunkowo nową koncepcją utrwalania żywności [39]. Na rynku dostępne są preparaty bazujące na fagach litycznych ukierunkowanych na określone rodzaje lub szczepy patogenów żywności, w tym *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 czy *Shigella*. Wiele z tych preparatów ma status GRAS, rekomendację FDA (ang. *Food and Drug Administration*) oraz certyfikat koszerności [39, 51]. W Polsce preparaty te nie są dopuszczone do stosowania w przemyśle spożywczym. Natomiast komercyjne środki fagowe są stosowane m.in. w Australii, Brazylii, Holandii, Izraelu, Kanadzie, Nowej Zelandii, Szwajcarii czy USA [39]. Początkowo zakładano, że biofilmy są barierą dla bakteriofagów z uwagi na nieprzepuszczalność macierzy biofilmu. Okazuje się, że wiele bakteriofagów może funkcjonować w biofilmie i aktywnie się w nim namnażać. Bakteriofagi wykazują inny mechanizm niszczenia biofilmu niż antybiotyki czy biocydy. Fagi ewoluowały z biofilmami bakteryjnymi. Wyróżnia się co najmniej cztery mechanizmy różnicujące ich działanie [16] – rys. 2.

Inną koncepcją biologicznego niszczenia biofilmów jest wykorzystanie oczyszczonych enzymów fagowych. Genomy fagów zawierają wiele genów kodujących enzymy służące do rozkładu macierzy biofilmu. Zazwyczaj celują one w ścianę komórkową bakterii podczas uwalniania z komórki gospodarza oraz mają możliwość degradacji egzopolisacharydów tworzących biofilm [16]. Depolimerazy fagowe charakteryzują się różną aktywnością. Zaliczane są do enzymów szczepowo specyficznych i stanowią istotny problem w przypadku eradykacji biofilmu mieszanego. Innymi enzymami fagowymi są endolizyny, które uczestniczą w cyklu litycznym. Specyficzność tych enzymów, podobnie jak fagów, które je produkują, jest zwykle duża [5]. W połączeniu z białkiem fagoliną enzymy te powodują lizę komórki bakteryjnej od wewnątrz [5, 36]. Kolejną grupą enzymów fagowych są DNazy, które uwalniane do środowiska powodują degradację bakteryjnego DNA [16]. Znaczną grupę stanowią białka zaliczane do enzymów ogona fagowego, które wykazują jednak ograniczone działanie, ponieważ są często maskowane do czasu rekonfiguracji ogona bakteriofaga podczas in-

fekcji [5]. Główną zaletą stosowania enzymów fagowych jest brak ryzyka transferu genów pomiędzy populacjami bakteryjnymi. Wadę z kolei stanowi to, że same enzymy musiałyby być dodawane cyklicznie do biofilmu, podczas gdy fagi samoczynnie zwiększają swoją dawkę podczas infekcji komórek bakteryjnego gospodarza [51].



Objaśnienia / Explanatory notes:

Integralność biofilmu może zostać zakłócona przez zniszczenie komórek bakteryjnych wytwarzających macierz biofilmu / Integrity of biofilm can be disrupted by destruction of bacterial cells that produce the biofilm matrix; Podczas dyfundowania w biofilmie, bakteriofagi mogą przenosić lub ekspresować enzymy depolimeryzujące, które degradują EPS / When diffusing through biofilm, bacteriophages can carry or express depolymerising enzymes that degrade EPS; Fagi mogą indukować enzymy depolimeryzujące, które degradują EPS z genomu gospodarza / Phages can induce depolymerising enzymes that degrade EPS from host genome; W komórkach opornych fagi mogą pozostać uśpione aż do momentu rozpoczęcia aktywnej infekcji, która może zakończyć się lizą komórek bakteryjnego gospodarza / In resistant cells phages can remain dormant until active infection begins, that can result in lysis of bacterial cells of host.

Rys. 2. Mechanizmy działania fagów na biofilm bakteryjny

Fig. 2. Modes of action of phages in bacterial biofilm

Źródło / Source: opracowanie własne na podstawie [16] / the authors' own study based on [16]

Metody kombinowane

Wyższą skuteczność eliminacji biofilmów można osiągnąć dzięki połączeniu kilku technik dezynfekcji. Wykazano, że kombinacja związków chemicznych z promieniowaniem UV efektywnie usuwa biofilm *P. aeruginosa* [53]. Inną metodą jest połączenie enzymów proteolitycznych z falami ultradźwiękowymi. Przykładowo, zastosowanie takiej techniki przez 10 min eliminuje 96 % biofilmu *E. coli* obecnego na powierzchni stalowej w zakładzie mleczarskim [13].

Podsumowanie

Drobnoustroje tworzące biofilmy stanowią poważny problem w sektorze produkcji żywności, powodując straty finansowe w danym sektorze spożywczym oraz zagrożenie zdrowia konsumenta. Obecność biofilmów bakteryjnych została potwierdzona m.in. w przemyśle mięsnym, mleczarskim, sokowniczym, ryb i owoców morza oraz żywności świeżej gotowej do spożycia. Powstawanie biofilmu jest procesem dynamicznym składającym się z kilku etapów, na które wpływają odpowiednie czynniki środowiskowe. Dostępność składników odżywczych na powierzchni produktów spożywczych lub pochodzących z powierzchni linii produkcyjnej jest głównym czynnikiem stymulującym namnażanie komórek bakteryjnych, a następnie formowanie wielogatunkowych biofilmów bakteryjnych. Drobnoustroje tworzące biofilm otoczone są zewnątrzkomórkową substancją polimerową (EPS), która chroni komórki bakteryjne przed środkami dezynfekcyjnymi oraz niekorzystnymi zmianami środowiska. Ponadto bakterie tworzące biofilm wykształciły zdolność wzajemnej komunikacji (QS), która steruje procesem rozwoju biofilmu i odgrywa ważną rolę w ochronie komórek. Wysoka oporność EPS na środki dezynfekujące stwarza trudności w wyborze odpowiedniej metody usuwania biofilmu. W celu eliminacji biofilmów bakteryjnych w przemyśle spożywczym stosuje się przede wszystkim metody fizyczne i chemiczne. Stały problem występowania biofilmów w zakładach przetwórczych zwraca uwagę na konieczność opracowywania nowych, alternatywnych metod jego eradykacji. Biologiczna metoda zwalczania biofilmów z zastosowaniem wirusów bakteryjnych oraz ich oczyszczonych enzymów litycznych lub zastosowanie metod kombinowanych może skutkować oczekiwanymi rezultatami. Opracowanie skutecznej metody eliminacji biofilmów ze środowiska produkcyjnego pozwoli na utrzymanie wysokiego poziomu higieny w zakładach przemysłu spożywczego.

Publikacja finansowana w ramach działalności statutowej IBPRS-PIB nr 136-01 pt. „Molekularna i funkcjonalna analiza regulacji ekspresji genów i modułów genetycznych biorących udział w quorum sensing jako modułowej odpowiedzi sygnałowej bakterii” oraz nr 144-01 pt. „Wykorzystanie bakteriofagów wobec Salmonella sp. jako innowacyjnej metody zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności”.

Literatura

- [1] Akbas M.Y.: Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. In: The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. Ed. A. Méndez-Vilas. Formatex Research Center, Badajoz 2015, pp. 383-394.
- [2] Akbas M.Y., Kokumer T.: The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. Int. J. Food Sci. Tech., 2015, 50 (7), 1666-1672.

- [3] Baranowska K., Rodziewicz A.: Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2008, 57 (1-2), 29-38.
- [4] Bronowski C., James C.E., Winstanley C.: Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2014, 356 (1), 8-19.
- [5] Chan B.K., Abedon S.T.: Bacteriophage and their enzymes in biofilm control. *Curr. Pharm. Des.*, 2015, 21, 85-99.
- [6] Chen Y., Liu T., Wang K., Hou C., Cai S., Huan Y., Du Z., Huang H., Kong J., Che Y.: Baicalein inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the quorum sensing system *in vitro*. *Plos One*, 2016, 11 (4), #0153468.
- [7] Cłapa T., Selwet M., Narożna D.: Życie w społeczności - warunki powstawania biofilmu. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2016, 65 (3), 463-468.
- [8] Czaczyk K., Myszka K.: Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish J. Environ. Stud.*, 2007, 16 (6), 799-806.
- [9] Czyżewska-Dors E., Dors A., Pomorska-Mól M.: Właściwości biofilmu bakteryjnego warunkujące oporność na antybiotyki oraz metody jego zwalczania. *Życie Weterynaryjne*, 2018, 93 (11), 765-771.
- [10] Daniluk K.J.: Eliminacja biofilmów *Listeria monocytogenes* ze środowiska produkcji żywności. W: *Listeria w przemyśle spożywczym*. [on line]. Foodfakty. Dostęp w Internecie [20.04.2021]: <https://foodfakty.pl/listeria-w-przemysle-spozywczym>
- [11] Frederick M.R., Kuttler C., Hense B.A., Eberl H.J.: A mathematical model of quorum sensing regulated EPS production in biofilm communities. *Theor. Biol. Med. Model*, 2011, 8, #8.
- [12] Froelich B.A., Noble R.T.: *Vibrio* bacteria in raw oysters: Managing risks to human health. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2016, 371 (1689), #20150209.
- [13] Galié S., García-Gutiérrez C., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F.: Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front. Microbiol.*, 2018, 9, #898.
- [14] Giaouris E., Heir E., Hébraud M., Chorianopoulos N., Langsrud S., Møretro T., Habimana O., Desvaux M., Renier S., Nychas G.-J.: Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.*, 2014, 97 (3), 298-309.
- [15] Giaouris E.E., Simões M.V.: Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. In: *Foodborne Diseases*. Eds. A.M. Holban, A.M. Grumezescu. Academic Press, London 2018, pp. 309-377.
- [16] Harper D.R., Parracho H.M.R.T., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., Lehman S., Morales S.: Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 2014, 3 (3), 270-284.
- [17] Jahid I.K., Lee N.Y., Kim A., Ha S.D.: Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Prot.*, 2013, 76 (2), 239-247.
- [18] Jennings M.C., Minbiole K.P.C., Wuest W.M.: Quaternary ammonium compounds: An antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. *ACS Infect. Dis.*, 2015, 1 (7), 288-303.
- [19] Kishen A., Haapasalo M.: Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontic Topics*, 2010, 22 (1), 58-78.
- [20] Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochrona Środowiska*, 2011, 33 (4), 3-14.
- [21] Kumari S., Sarkar P.K.: *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 2016, 69, 20-29.
- [22] Kunicka-Styczyńska A.: Biofilmy bakteryjne w produkcji żywności. W: *Bezpieczeństwo zdrowotne żywności. Aspekty mikrobiologiczne, chemiczne i ocena towaroznawcza*. Red. J. Stadnik i I. Jackowska. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2015, ss. 109-120.
- [23] Lapidot A., Yaron S.: Transfer of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *J. Food Prot.*, 2009, 72 (3), 618-623.


- [24] Lipa P., Kozieł M., Janczarek M.: Zjawisko *Quorum Sensing* bakterii Gram-ujemnych: Częsteczki sygnałowe i inhibitory oraz ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne. *Postępy Biochem.*, 2017, 63 (4), 242-260.
- [25] Ławniczak Ł., Czaczyk K., Owsianiak M., Chrzanowski Ł.: Rola ramnolipidów w środowisku naturalnym. *Post. Microbiol.*, 2011, 50 (1), 17-30.
- [26] Łyszcz M.: Biofilm – złożona i wielokomórkowa struktura bakterii. W: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Mikrobiologia i ekologia. Młodzi Naukowcy, Poznań 2020*, ss. 54-60.
- [27] Maciejewska M., Bauer M., Dawgul M.: Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.*, 2016, 55 (1), 3-11.
- [28] Matejczyk M., Suchowierska M.: Charakterystyka zjawiska *Quorum Sensing* i jego znaczenie w aspekcie formowania i funkcjonowania biofilmu w inżynierii środowiska, budownictwie, medycynie oraz gospodarstwie domowym. *Budownictwo i Inżynieria Środowiska*, 2011, 2 (1), 71-75.
- [29] Merino L., Procura F., Trejo F.M., Bueno D.J., Golowczyc M.A.: Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Res. Int.*, 2017, 119, 530-540.
- [30] Mogha K.V., Shah N.P., Prajapati J.B., Chaudhari A.R.: Biofilm – A threat to dairy industry. *Indian J. Dairy Sci.*, 2014, 67 (6), 459-466.
- [31] Myszka K., Czaczyk K.: Characterization of adhesive exopolysaccharide (EPS) produced by *Pseudomonas aeruginosa* under starvation conditions. *Curr. Microbiol.*, 2009, 58, 541-546.
- [32] Myszka K., Czaczyk K.: Mechanizm *Quorum Sensing* jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010, 64, 582-589.
- [33] Nam H., Seo H.-S., Bang J., Kim H., Beuchat L.R., Ryu J.-H.: Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.*, 2014, 188, 122-127.
- [34] Pasvolsky R., Zakin V., Ostrova I., Shemesh M.: Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 2014, 181, 19-27.
- [35] Patange A., Boehm D., Zuizina D., Cullen P.J., Gilmore B., Bourke P.: High voltage atmospheric cold air plasma control of bacterial biofilms on fresh produce. *Int. J. Food Microbiol.*, 2019, 293, 137-145.
- [36] Połaska M., Sokołowska B.: Bacteriophages – a new hope or huge problem in the food industry. *AIMS Microbiol.*, 2019, 5 (4), 324-346.
- [37] Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O.: Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Med. Chem.*, 2015, 7 (5), 647-671.
- [38] Raffaella C., Casettari L., Fagioli L., Cespi M., Bonacucina G., Baffone W.: Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 2017, 241, 132-140.
- [39] Roszko M.Ł., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E., Świder O., Wójcicki M.: Bakteriofagi jako czynniki biokontroli *Listeria monocytogenes* w przemyśle spożywczym. W: *Listeria w przemyśle spożywczym*. [on line]. *Foodfakty*. Dostęp w Internecie [20.04.2021]: <https://foodfakty.pl/listeria-w-przemysle-spozywczym>
- [40] Sadowska A., Skarżyńska E., Rakowska R., Batogowska J., Waszkiewicz-Robak B.: Substancje bioaktywne w surowcach pochodzenia roślinnego i roślinach zielarskich. *Post. Tech. Przetw. Spoż.*, 2014, 2, 131-135.
- [41] Salimena A.P.S., Lange C.C., Camussone C., Signorini M., Calvino L.F., Brito M.A.V.P., Borges C.A.V., Guimarães A.S., Ribeiro J.B., Mendonça L.C., Piccoli R.H.: Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet. Res. Commun.*, 2016, 40, 97-106.
- [42] Shi C., Sun Y., Liu Z., Guo D., Sun H., Sun Z., Chen S., Zhang W., Wen Q., Peng X., Xia X.: Inhibition of *Cronobacter sakazakii* virulence factors by citral. *Sci. Rep.*, 2017, 7, #43243.
- [43] Srey S., Jahid I.K., Ha S.-D.: Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 2013, 31 (2), 572-585.
- [44] Śledź M., Witrowa-Rajchert D.: Składniki biologicznie czynne w suszonych ziołach – czy ciągle aktywne? *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2012, 61 (2), 319-329.

- [45] Tomczyk B., Kaźmierczuk M., Kalinowski R., Paczkowski S., Rybak J.: Biofilm: Źródło zagrożeń mikrobiologicznych w przemyśle. *Przemysł Chemiczny*, 2016, 95 (3), 581-586.
- [46] Varga L., Szigeti J.: Use of ozone in the dairy industry: A review. *Int. J. Dairy Technol.*, 2016, 69 (2), 157-168.
- [47] Wang M., Zhu P., Jiang J., Zhu H., Tan S.: Signaling molecules of quorum sensing in bacteria. *Rev. Biotechnol. Biochem.*, 2020, 1 (1), #002.
- [48] Wang R.: Biofilms and meat safety: A mini-review. *J. Food Protect.*, 2019, 82 (1), 120-127.
- [49] Wolfmeier H., Pletzer D., Mansour S.C., Hancock R.E.W.: New perspectives in biofilm eradication. *ACS Infect. Dis.*, 2018, 4 (2), 93-106.
- [50] Wolska K.I., Grudniak A.M., Markowska K.: Związki interferujące z bakteryjnymi systemami wyczuwania liczebności i ich potencjalna funkcja terapeutyczna. *Post. Mikrobiol.*, 2016, 55 (3), 300-308.
- [51] Wójcicki M., Błażej S., Gientka I., Brzezicka K.: The concept of using bacteriophages to improve the microbiological quality of minimally-processed foods. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2019, 18 (4), 373-383.
- [52] Zabielska J., Tyfa A., Kunicka-Styczyńska A.: Methods for eradication of the biofilms formed by opportunistic pathogens using novel techniques – A review. *Acta Universitatis Lodzianis. Folia Biologica et Oecologica*, 2016, 12, 26-37.
- [53] Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N.: Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives. *RSC Advances*, 2017, 7, 36670-36683.
- [54] Zhu Y., Li C., Cui H., Lin L.: Feasibility of cold plasma for the control of biofilms in food industry. *Trends Food Sci. Tech.*, 2020, 99, 142-151.

BACTERIAL BIOFILM AND POSSIBILITIES OF ELIMINATING IT IN THE FOOD INDUSTRY

S u m m a r y

Bacterial biofilms occurring in the food industry are complex, multi-species consortia of both the saprophytic and the pathogenic bacteria. They are often localised on surfaces that are difficult to access for both the closed-circuit cleaning agents and the mechanical cleaning. In the food industry bacterial biofilms are a source of microbiological contamination of food, causing the quality and durability of food products to decrease. In addition, food biofilms can be a source of pathogenic bacteria, such as *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. or *Listeria monocytogenes*, and of opportunistic bacteria (e.g. *Escherichia coli*) that cause gastrointestinal diseases, which can be long-lasting and difficult to treat, especially in immunocompromised individuals. In the paper there are presented basic mechanisms of bacterial biofilm formation and the most important functions performed by the extracellular biofilm matrix (EPS). There were characterised main bacterial pathogens occurring in the industries such as: meat, dairy, fish, seafood, plant-derived products with a minimum degree of processing, and in the juice branch; it was taken into account the possibility of those microorganisms to form a permanent and resistant to external factors biofilm. Also discussed were the possibilities of eradicating food biofilms with a particular emphasis on the methods based on the use of natural compounds of plant origin and the use of lytic bacteriophages and/or their purified enzymes.

Key words: bacterial biofilm, extracellular matrix, pathogens, biofilm elimination, food processing 

OLGA ŚWIDER, MICHAŁ WÓJCICKI, MAREK ŁUKASZ ROSZKO

AMINY BIOGENNE – OSZACOWANIE RYZYKA SPOŻYCIA I MOŻLIWOŚCI OGRANICZENIA ICH FORMOWANIA W ŻYWNOŚCI FERMENTOWANEJ

Streszczenie

Zapewnienie bezpieczeństwa żywności to jedno z najważniejszych zadań wielu instytucji o zasięgu międzynarodowym. Ich działalność obejmuje współpracę w zakresie kontroli i analizy jakości produktów spożywczych, mającą na celu ochronę zdrowia konsumentów i racjonalne gospodarowanie dostępnymi zasobami. Obecność amin biogennych w żywności to zagadnienie niejednokrotnie podejmowane przez liczne organizacje, zarówno w kontekście ustalania limitów zawartości tych związków w produktach spożywczych (FDA, EFSA), jak i wskazywania kierunków dalszych badań (EFSA). Dostarczenie amin biogennych z dietą może wywołać szereg niekorzystnych reakcji w organizmie. Obecność tych związków w żywności wynika głównie z aktywności metabolicznej drobnoustrojów wchodzących w skład produktu. W związku z tym wielu naukowców podjęło próbę stworzenia Indeksu Amin Biogennych jako wskaźnika jakości i/lub świeżości wybranych produktów (głównie mięsa i ryb), w których działalność mikroorganizmów jest niepożądana i wpływa na obniżenie jakości produktu, przez co skraca termin jego przydatności do spożycia. Produkty fermentowane stanowią grupę żywności, w której ryzyko formowania amin jest szczególnie wysokie, a obecność i rozwój mikroorganizmów stanowią podstawę procesu ich wytwarzania. Będące potencjalnym zagrożeniem drobnoustroje mogą stać się sojusznikami w ograniczaniu zawartości amin biogennych w żywności fermentowanej. Dobór kultur starterowych o znanych właściwościach i/lub odpowiednie ukierunkowanie metabolizmu stosowanych mikroorganizmów przez dodatek substancji roślinnych oraz zapewnienie optymalnych warunków środowiska stanowią dobrą strategię.

Słowa kluczowe: aminy biogenne, Indeks Amin Biogennych, bezpieczeństwo żywności, żywność fermentowana

Wprowadzenie

Aminy biogenne (BAs, ang. *Biogenic Amines*) występują naturalnie w organizmie człowieka, gdzie pełnią wiele ważnych funkcji. Regulują m.in. temperaturę ciała, wy-

Mgr inż. O. Świder, dr hab. inż. M. Ł. Roszko, prof. IBPRS, Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, mgr inż. M. Wójcicki, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa. Kontakt: olga.swider@ibprs.pl

dzielanie soków żołądkowych, ciśnienie krwi, reakcje immunologiczne czy aktywność układu nerwowego [9]. Aminy biogenne obecne są również w produktach spożywczych, a dostarczone z dietą nazywane są aminami egzogennymi. Najczęściej występujące BAs w żywności to: histamina, tyramina, kadaweryna, putrescyna, spermina, spermidyna, agmatyna, tryptamina i β -fenyloetyloamina, a źródło tych związków stanowią takie produkty, jak: mięso, ryby, sery, wina, produkty sojowe czy warzywa [41]. W produktach spożywczych związki te mogą występować naturalnie, np. spermidyna i spermina w mięsie, jak również być formowane przez mikroorganizmy, głównie w procesie dekarboksylacji wolnych aminokwasów. Wobec powyższego żywność o dużej zawartości prekursorów oraz zawierająca mikroflorę zdolną do ich dekarboksylacji stanowi korzystne środowisko do produkcji amin [2, 41]. Zarówno wśród bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich oraz drożdży znanych jest wielu producentów amin biogennych. W moszczu gronowym za formowanie tych związków odpowiedzialne są pleśnie z gatunku *Botrytis cinerea* [13]. W organizmie aminy dostarczone z żywnością rozkładane są w jelicie cienkim głównie przez enzymy monoaminooksydazę (MAO), diaminooksydazę (DAO) i poliaminooksydazę (PAO) [36].

Niniejsza praca przybliży problem występowania amin biogennych w żywności, ze szczególnym uwzględnieniem produktów fermentowanych. Przedstawione zostały stosowane obecnie rozwiązania ukierunkowane na ograniczenie formowania tych związków w procesie fermentacji.

Ryzyko wynikające z dostarczenia z dietą nadmiaru amin biogennych

Za najbardziej toksyczne aminy biogenne uznawane są histamina i tyramina [49]. Histamina może działać psychoaktywnie i naczynioaktywnie, wywołując biegunki, duszności, wysypki, bóle głowy czy powodować obniżenie ciśnienia krwi [4, 18, 36]. W raporcie podsumowującym liczbę zatruć histaminą w wyniku spożycia ryb, przeprowadzonym na podstawie danych z 13 lat (2001 - 2013) w Australii, jako najczęściej występujące objawy wskazano biegunki i wysypkę. W około połowie przypadków pojawiły się nudności, wymioty, gorączka oraz ból brzucha. Zaczerwienienie ciała lub twarzy dotyczyło ponad 5 % przypadków, natomiast dreszcze, pieczenie lub opuchlina skóry – ok. 8 % zatruć. W nielicznych przypadkach nastąpiła niewydolność oddechowa lub trudności w oddychaniu [21]. Nadmierna podaż tyraminy może skutkować ostrymi bólami głowy, krwotokami oraz podwyższonym ciśnieniem krwi, które może doprowadzić do niewydolności serca. Dodatkowo amina ta poprzez ułatwienie adhezji bakteryjnych patogenów do enterocytów nabłonka jelita zwiększa podatność gospodarza na infekcje. β -fenyloetyloamina i tryptamina wykazują działanie wazoaktywne, które skutkuje takimi objawami, jak nadciśnienie czy zawroty i bóle głowy. W wyniku połączenia amin z azotynami powstają nitrozoaminy o potencjalnych

Tabela 1. Zawartości amin biogennych w wybranych produktach fermentowanych

Table 1. Content of biogenic amines in selected fermented products

Produkt fermentowany Fermented product	Zawartość amin biogennych Content of biogenic amines	Metoda analityczna Analytical method	Źródło Reference
Wino białe White wine	Tyramina ND ÷ 1,24 mg/l Histamina 0,20 ÷ 3,00 mg/l β-feniloetyloamina ND ÷ 3,82 mg/l Tryptamina 0,08 ÷ 0,14 mg/l	RP-HPLC	[33]
Wino czerwone Red wine	β-feniloetyloamina NQ ÷ 1,75 mg/l Agmatyna NQ ÷ 5,18 mg/l Kadaweryna 0,33 ÷ 9,90 mg/l Histamina NQ ÷ 3,16 mg/l Putrescyna 0,84 ÷ 25,40 mg/l Spermidyna NQ ÷ 1,03 mg/l Spermina NQ ÷ 1,37 mg/l Tyramina 0,22 ÷ 34,99 mg/l	HPLC-FLD	[34]
Cydr Cider	Spośród ośmiu analizowanych amin biogennych w największych ilościach występowała tyramina, a następnie putrescyna i kadaweryna. Zawartość amin w przedziale 5 ÷ 20 mg/l wykryto w prawie połowie z 74 badanych próbek; 20 ÷ 50 mg/l w ponad 30 %; > 50 mg/l w 16 %; ok. 120 mg/l w 4 %.	HPLC	[26]
Miód pitny / Mead	Obecne: putrescyna, spermina, spermidyna, tyramina	TLC	[39]
Produkty z mięsa wieprzowego – <i>Nham</i> Pork meat products – <i>Nham</i>	Putrescyna 209,99 ÷ 531,06 mg/kg Kadaweryna 28,33 ÷ 169,09 mg/kg histamina 41,89 ÷ 45,21 mg/kg Tyramina 59,85 ÷ 384,99 mg/kg Spermidyna 1,57 ÷ 6,54 mg/kg Spermina 20,01 ÷ 26,02 mg/kg	HPLC-DAD	[37]
Produkty rybne Fish products	Putrescyna 23 ÷ 830 mg/kg Kadaweryna ND ÷ 2035 mg/kg Histamina ND ÷ 840 mg/kg Tyramina ND ÷ 691 mg/kg	RP-HPLC	[28]

Produkty mleczne – sery dojrzewające i pleśniowe / Milk products – ripened and blue cheeses	Histamina ND ÷ 115,97 mg/100g Tyramina ND ÷ 159,70 mg/100g Putrescyna ND ÷ 84,00 mg/100g Kadaweryna ND ÷ 126,80 mg/100g Tryptamina ND ÷ 31,22 mg/100g	UHPLC-TUV	[31]
Produkty warzywne Vegetable products	Putrescyna 11 ÷ 197 ppm Kadaweryna ND ÷ 118 ppm Histamina ND ÷ 103 ppm Tyramina ND ÷ 86 ppm	RP-HPLC	[28]
Produkty sojowe – <i>miso</i> Soy products – <i>miso</i>	Tryptamina ND ÷ 9,71 mg/kg Fenyloetyloamina 2,38 ÷ 11,76 mg/kg Putrescyna 2,69 ÷ 14,09 mg/kg Kadaweryna ND ÷ 1,31 mg/kg Histamina ND ÷ 24,42 mg/kg Tyramina ND ÷ 66,66 mg/kg Spermidyna ND ÷ 28,31 mg/kg Spermina ND ÷ 2,85 mg/kg	HPLC-UV-Vis	[5]

Objaśnienia / Explanatory notes:

RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych / reversed-phase high-performance liquid chromatography; HPLC-FLD – wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem fluorescencyjnym / high-performance liquid chromatography with fluorescence detection; TLC – cienkowarstwowa chromatografia cieczowa / thin-layer chromatography; HPLC-DAD – wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem DAD / high-performance liquid chromatography with diode array detection; UHPLC-TUV – ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem TUV / ultra-high-performance liquid chromatography with tunable UV detector; HPLC-UV-Vis – wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem UV-Vis / high-performance liquid chromatography with UV-Vis detector; ND – poniżej limitu detekcji / below limit of detection; NQ – poniżej granicy oznaczalności / below limit of quantification.

właściwościach kancerogennych. Putrescyna i kadaweryna potęgują działanie histaminy, gdyż działają jako inhibitory diaminooksydazy (DAO) i N-metylotransferazy histaminowej (HMT) odpowiedzialnych za jej rozkład [4, 36]. Podobne właściwości wykazuje alkohol. Spożywanie wina lub innych produktów bogatych w aminy wraz z alkoholem zwiększa ryzyko wystąpienia niekorzystnych objawów. Ponadto szczególną ostrożność w kontekście obecności amin w diecie powinny zachować osoby z genetycznie obniżoną aktywnością aminooksydaz oraz przyjmujące leki będące inhibitorami monoaminooksydaz (MAOI). Ilość BAs, która skutkuje niekorzystnymi objawami jest kwestią indywidualną i podlega działaniu wielu czynników, co powoduje trudności w ustaleniu prawnych limitów zawartości tych związków w produktach spożywczych [25]. W tab. 1. przedstawiono zawartości amin biogennych w wybranych produktach fermentowanych.

Limity prawne oraz Indeks Amin Biogennych jako wskaźniki bezpieczeństwa

Obecnie jedynie zawartość histaminy w sosie rybnym oraz produktach rybołówstwa wytwarzanych z gatunków ryb o podwyższonej zawartości histydyny jest regulowana Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 2073/2005 [35]. W 2011 roku EFSA opublikowała raport dotyczący kontroli zawartości amin biogennych w żywności fermentowanej, w którym podkreślono potrzebę m.in. prowadzenia dalszych badań dotyczących toksyczności amin oraz zgromadzenia danych o konsumpcji fermentowanej żywności celem oszacowania kryteriów bezpieczeństwa w zakresie zawartości histaminy w produktach innych niż ryby [8].

W produktach, takich jak ryby, mięso czy ich niefermentowane przetwory Indeks Amin Biogennych (BAI, ang. *Biogenic Amine Index*) może stanowić indikator jakości rozumianej jako świeżość produktu oraz zachowanie zasad higieny w procesie produkcji i dystrybucji, a także wskaźnik skuteczności przeprowadzonych procesów, mających na celu ograniczenie rozwoju mikroflory i zakonserwowanie produktu [41]. Wskaźnik ten jako pierwszy wprowadzili w 1977 r. Mietz i Karmas [32], a jego celem było oszacowanie jakości ryb. W późniejszym czasie wielu autorów wykorzystywało indeks w podobnym celu, modyfikując równanie w zależności od produktu, do którego miał być zastosowany. W żywności fermentowanej obecność i rozwój mikroorganizmów stanowi podstawę procesu produkcyjnego, dlatego zastosowanie BAI w znaczeniu takim, jak opisane powyżej byłoby jedynie częściowo zasadne. W przypadku fermentowanych warzyw Indeks Amin Biogennych zastosowano jako wskaźnik ryzyka wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu produktu [41]. Ryzyko to jest w pewnym stopniu związane z zachowaniem dobrych praktyk higienicznych w procesie produkcji. W dużej mierze zależy od jakości zastosowanego surowca, w szczególności składu mikroflory autochtonicznej i dostępności aminokwasów. Ważne są także

Tabela 2. Zastosowanie indeksów BAI w ocenie produktów

Table 2. Applying BAIs to assess products

Matryca żywnościowa Food matrix	Równanie / Equation	Cel zastosowania BAI Purpose of using BAI index	Źródło Reference
Puszkowany tuńczyk / Canned tuna	$(HIS + KAD + PUT) / (1 + SPD + SPM)$	Oszacowanie jakości / Quality assessment	[32]
Mięso drobiowe / Poultry meat	$HIS + TYR + PUT + KAD$	Oszacowanie świeżości i jakości Freshness and quality assessment	[44]
Kalamarnica zwyczajna / Common squid	AGM lub $AGM + KAD$	Oszacowanie jakości / Quality assessment	[46]
Mięso ryb z rodziny łososiowatych Salmonid fishes meat	KAD	Oszacowanie jakości / Quality assessment	[47]
Gotowana peklowana łopatką wieprzowa Cooked, cured pork shoulder	$HIS + TYR + PUT + KAD$	Oszacowanie świeżości Freshness assessment	[16]
Tuńczyk / Tuna	$HIS + TYR + PUT + KAD$	Oszacowanie jakości / Quality assessment	[43]
Mięso drobiowe i przetwory z mięsa drobiowego Poultry meat and poultry meat products	SPD / SPM	Oszacowanie jakości / Quality assessment	[38]
Morszczuk śródziemnomorski Mediterranean hake	$HIS + TYR + PUT + KAD$	Oszacowanie świeżości i/lub zanieczyszczenia mikrobiologicznego Assessment of freshness and/or of microbial contamination	[3]
Mięso indyjskie pakowane w atmosferze ochronnej Turkey meat under modified atmosphere packaging	$PUT + KAD + TYR$	Oszacowanie świeżości Freshness assessment	[11]
Wieprzowina / Pork	$HIS + TYR + PUT + KAD$	Oszacowanie świeżości i jakości Freshness and quality assessment	[7]
Fermentowane warzywa Fermented vegetables	$HIS + TYR + PUT + KAD$	Oszacowanie ryzyka wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu Risk assessment of adverse health effects after consumption	[41]

Objaśnienia / Explanatory notes:

HIS – histamina / histamine; KAD – kadaweryna / cadaverine; PUT – putrescyna / putrescine; SPD – spermidyna / spermidine; SPM – spermina / spermine; TYR – tyramina / tyramine; AGM – agmatyna / agmatine.

warunki środowiskowe, takie jak pH, temperatura czy stężenie NaCl, które wpływają na ogólny metabolizm mikroorganizmów oraz ich aktywność enzymatyczną. Mogą również modulować działanie enzymów niezależnie od żywotności komórek, które je wytworzyły [13]. Wybrane Indeksy Amin Biogennych przedstawiono w tab. 2.

Możliwości ograniczania zawartości amin biogennych w żywności fermentowanej

Fermentowana żywność stanowi potencjalne źródło toksycznych amin biogennych, dlatego prowadzone są badania nad możliwością ograniczenia produkcji tych związków przez mikroorganizmy. Ze względu na charakter produktów fermentowanych zabiegi technologiczne, takie jak: pakowanie próżniowe (VP), pakowanie w modyfikowanej atmosferze ochronnej (MAP), ciśnieniowanie czy obróbka cieplna, mające na celu ograniczenie aktywności lub całkowitą inaktywację drobnoustrojów, nie znajdują zastosowania. Dodatkowo ze względu na wiele korzyści zdrowotnych, jakie wynikają ze spożywania żywności fermentowanej, pożądane przez konsumentów walory sensoryczne [41] oraz tradycyjne, często chronione receptury, dobór odpowiedniej metody redukcji zawartości amin stanowi duże wyzwanie [42].

Jednym z kluczowych czynników wpływających na zawartość amin biogennych w produktach fermentowanych jest charakterystyka obecnej w nich mikroflory. Dobrym sposobem jest wykorzystanie kultur starterowych o znanych właściwościach, np. bakterii probiotycznych, które nie wykazują zdolności do tworzenia amin [40]. Zdolność do degradacji amin biogennych jest specyficzna nie dla całych rodzajów czy gatunków bakterii, ale dla poszczególnych szczepów. Zastosowanie mikroorganizmów wykazujących zdolność do produkcji aminooksydaz lub sam dodatek enzymów degradujących aminy może być skuteczną metodą ograniczania zawartości amin w produktach, które zostały wytworzone z surowców lub półproduktów będących źródłem amin, a ich mikroflora autochtoniczna wykazuje zdolność do dekarboksylacji wolnych aminokwasów [23]. Oprócz mono- i diaminooksydaz istotną rolę w degradacji amin biogennych w żywności mogą odegrać enzymy z grupy wielomiedziowych oksydaz (MCO) wytwarzane przez bakterie fermentacji mlekowej [14]. Geny kodujące enzymy z tej grupy zidentyfikowano w wielu szczepach LAB należących do gatunków, takich jak: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. fermentum* i *Lb. paraplantarum*, wyizolowanych z tradycyjnych włoskich serów [15] oraz *Lactobacillus plantarum* i *Pediococcus acidilactici*, wyizolowanych z wina [6]. Zhao i wsp. [49] wykazali, że szczepy *Staphylococcus carnosus* M43 i *P. acidilactici* M28 pochodzące z fermentowanej pasty sojowej nie tylko są zdolne do degradacji amin, ale również przyczyniają się do kształtowania pożądanego smaku produktu [49].

Innym rozwiązaniem mającym na celu ograniczanie formowania amin w produktach fermentowanych są roślinne dodatki w postaci ziół, przypraw, ekstraktów czy

Tabela 3. Wybrane sposoby ograniczania zawartości amin biogennych w fermentowanej żywności
 Table 3. Selected strategies for reducing the content of biogenic amines in fermented food

Matryca żywnościowa Food matrix	Sposób ograniczania amin biogennych / Method for reducing biogenic amines formation	Efekt ograniczania amin biogennych Effect of reducing biogenic amines	Źródło Reference
Fermentowane kielbasy wieprzowe Fermented pork sausages	Kultury starterowe: 1. <i>Pediococcus pentosaceus</i> + <i>Staphylococcus xylosum</i> 2. <i>Lactobacillus farciminis</i> + <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Istotne zmniejszenie zawartości tyraminy, histaminy, putrescyny i kadaweryny ($p < 0,001$) po zastosowaniu <i>Lb. farciminis</i> + <i>S. saprophyticus</i>	[27]
Fermentowana pasta sojowa Fermented soybean paste	Kultury starterowe: 1. <i>Staphylococcus carnosus</i> M43 2. <i>Pediococcus acidilactici</i> M28 3. <i>Staphylococcus carnosus</i> M43 + <i>Pediococcus acidilactici</i> M28	Zmniejszenie zawartości sumy 8 amin w porównaniu z próbą kontrolną, w tym: o 33,18 % – <i>P. acidilactici</i> M28, o 30,94 % – <i>S. carnosus</i> M43 i o 39,69 % – <i>P. acidilactici</i> M28 + <i>S. carnosus</i> M43). Redukcja zawartości histaminy o odpowiednio: 4,49, 8,39 i 8,32 %. Istotne zmniejszenie zawartości tyraminy ($p < 0,05$)	[49]
Fermentowane kielbasy wieprzowe Fermented pork sausages	Kultury starterowe: 1. <i>Staphylococcus carnosus</i> + <i>Lactobacillus sakei</i> (komercyjna kultura starterowa) 2. <i>Enterococcus thailandicus</i> 3. <i>Enterococcus faecalis</i> 4. <i>Enterococcus thailandicus</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	Ograniczenie zawartości kadaweryny w porównaniu z próbą kontrolną (fermentacja spontaniczna). Największą redukcję uzyskano po zastosowaniu <i>E. thailandicus</i> + <i>E. faecalis</i> ($p < 0,05$)	[20]

<p>Fermentowany sos rybny Fermented fish sauce</p>	<p>Kultury starterowe: 1. <i>Staphylococcus carnosus</i> FS19 2. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FS05</p>	<p>Redukcja zawartości sumy czterech amin biogennych w porównaniu z próbą kontrolną o odpowiednio: 15,9 i 12,5 % po zastosowaniu <i>S. carnosus</i> FS19 i <i>B. amyloliquefaciens</i> FS05. Redukcja zawartości histaminy o odpowiednio: 27,7 i 15,4 %, putrescyny – 10,2 i 13,5 %, kadaweryny – 6,2 i 11,6 % oraz tyraminy – 22,4 i 10,9 %</p>	<p>[48]</p>
<p>Wino Wine</p>	<p>Kultura starterowa: 1. <i>Lactobacillus casei</i> IFI-CA 52</p>	<p>Redukcja zawartości histaminy, tyraminy i putrescyny o odpowiednio: 54, 55 i 65 % w podłożu doświadczalnym w porównaniu z próbą kontrolną. Redukcja zawartości histaminy, tyraminy i putrescyny o odpowiednio: 17,6, 15,3 oraz 7,6 % w modelowym winie po fermentacji malolaktycznej</p>	<p>[12]</p>
<p>Sery dojrzewające Ripened cheeses</p>	<p>Kultury starterowe: 1. <i>Lactobacillus casei</i> 4a 2. <i>Lactobacillus casei</i> 5b</p>	<p>Redukcja w podłożu doświadczalnym zawartości histaminy o odpowiednio: 47,9 i 43,64 %, a tyraminy – 36,22 i 40,55 % po zastosowaniu szczepów <i>L. casei</i> 4a i <i>L. casei</i> 5b. W modelowym serze dodatek któregośkolwiek z tych szczepów ograniczył tworzenie tyraminy do wartości poniżej 0,2 mM, nawet jeśli równocześnie dodawano szczep <i>E. durans</i> 655, który wykazuje zdolność do produkcji tyraminy. W produktach, w których kulturą starterową były <i>E. durans</i> 655 lub <i>E. durans</i> 655 + <i>L. casei</i> EM116 (szczep niewykazujący zdolności do redukcji amin biogennych), zawartość tyraminy była na poziomie odpowiednio powyżej 1,6 oraz 1,4 mM. W modelowym serze dodatek <i>L. casei</i> 4a lub <i>L. casei</i> 5b ograniczył tworzenie histaminy do wartości poniżej 1 mM, nawet jeśli równocześnie dodawano szczep <i>L. parabuchneri</i> DSM 5987, który wykazuje zdolność do produkcji histaminy. W produktach, w których jako kulturą starterową zastosowano tylko <i>L. parabuchneri</i> DSM 5987 lub <i>L. parabuchneri</i> DSM 5987 + <i>L. casei</i> EM116, zawartość histaminy po 4 miesiącach dojrzewania wynosiła odpowiednio: 5,1 mM oraz 4,7 mM</p>	<p>[17]</p>
<p>Fermentowane kiełbasy wieprzowe Fermented pork sausages</p>	<p>Kultury starterowe: 1. <i>Lactobacillus plantarum</i> 2. <i>Staphylococcus xylosum</i> 3. <i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Staphylococcus xylosum</i></p>	<p>Łagodna redukcja zawartości tyraminy (21 %), histaminy (25 %) i kadaweryny (22 %) po zastosowaniu <i>S. xylosum</i>, w porównaniu z produktem kontrolnym. <i>S. xylosum</i> + <i>L. plantarum</i> efektywnie zredukowały zawartość tryptaminy, fenyloetyloaminy, putrescyny, kadaweryny, histaminy i tyraminy o odpowiednio: prawie 100, 100, 86, 63, 82 i 43 %. Podobne rezultaty osiągnięto przy zastosowaniu jedynie <i>L. plantarum</i> ($p > 0,05$)</p>	<p>[45]</p>

Fermentowany bekon Fermented bacon	Kultura starterowa: 1. <i>Lactobacillus curvatus</i> G-1	Istotna redukcja całkowitej zawartości amin biogennych. W produkcie kontrolnym suma zawartości analizowanych amin biogennych wynosiła 1044,04 mg/kg. W modelowym produkcie z dodatkiem <i>Lb. curvatus</i> G-1 osiągnięto ponad trzykrotnie mniejszą ich zawartość (318,19 mg/kg)	[24]
Czarna fasola – <i>douchi</i> Black beans – <i>douchi</i>	Kultura starterowa: 1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG 2. <i>Lactobacillus casei</i> Shirota 3. <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Ograniczenie formowanie tyraminy do zawartości poniżej limitu detekcji, przy czym ważną rolę odegrał nie tylko skład mikroorganizmów, ale również warunki środowiska, tj. dostępność tlenu i temperatura	[10]
Kapusta kiszona Sauerkraut	Dodatki roślinne: 1. Cebula – 350 g/kg 2. Kminek – 10 g/kg	Fermentacja w temp. 18 °C: redukcja zawartości kadaweryny i tyraminy w obu wariantach w porównaniu z próbą kontrolną oraz fenyloetyloaminy w wariancie z dodatkiem cebuli. Fermentacja w temp. 31 °C: redukcja zawartości tryptaminy w obu wariantach oraz putrescyny w wariancie z dodatkiem cebuli	[30]
<i>Tarhana</i> – fermentowany produkt zbożowy <i>Tarhana</i> – fermented grain product	Dodatek ekstraktu roślinnego: 1. Ekstrakt z pestek winogron w stężeniach 4, 8 lub 16 g/kg	Istotna redukcja zawartości putrescyny przy dodatku ekstraktu na poziomie 8 lub 16 g/kg (odpowiednio o 84 i 90 %), kadaweryny (do wartości poniżej limitu detekcji) i ogólnej zawartości analizowanych amin biogennych (o odpowiednio 77 i 83 %) w porównaniu z próbą kontrolną (bez dodatku ekstraktu) po 6 miesiącach fermentacji	[1]
Fermentowana pasta sojowa Fermented soybean paste	Dodatek substancji roślinnych: 1. Ekstrakt z pestek grejpfruta (300 mg/kg) 2. Katechiny (3g/kg): 2.1. Epikatechina 2.2. Galusan epikatechiny 2.3. Epigallokatechina 2.4. Galusan epigallokatechiny	Skuteczna redukcja zawartości putrescyny, spośród 8 analizowanych amin biogennych, po zastosowaniu dodatku ekstraktu z pestek grejpfruta. Po zastosowaniu galusanu epikatechiny, epikatechiny, galusanu epigallokatechiny oraz epigallokatechiny redukcja zawartości putrescyny i kadaweryny wynosiła odpowiednio: 60, 64, 73 i 76 %	[22]

<p>Fermentowana kielbasa z baraniny Fermented mutton sausage</p>	<p>Dodatek ekstraktów przypraw: 1. Anyż 2. Amomum tsao-ko (roślina podobna do imbiru) 3. Goździki 4. Cynamon chiński 5. Koper włoski 6. Liść laurowy 7. Gałka muszkatołowa</p>	<p>Największa redukcja zawartości tyraminy (o 18,7 %) w porównaniu z próbą kontrolną po zastosowaniu ekstraktu z goździków. Redukcja zawartości histaminy, spermidyny i putrescyny (o odpowiednio: 24,4, 27,5 i 19,3 %) po dodaniu ekstraktu z cynamonu chińskiego, a β-fenyloetyloaminy i tryptaminy – po dodaniu ekstraktu z goździków (o odpowiednio: 21,8 i 24,6 %) ($p < 0,05$)</p>	<p>[19]</p>
<p><i>Myeolchi-jeot</i> – fermentowane sardele <i>Myeolchi-jeot</i> – fermented anchovies</p>	<p>Dodatek etanolowych ekstraktów przypraw: 1. Imbir 2. Czosnek 3. Szczypior 4. Czerwona papryka 5. Goździki 6. Cynamon</p>	<p>Redukcja zawartości amin biogennych po zastosowaniu ekstraktów w ilości (w porównaniu z próbą kontrolną): 1) imbir: 1,0 ml – redukcja putrescyny o 12,77 %, 0,5 ml – redukcja tyraminy o 26,27 % i 0,1 ml – redukcja spermidyny o 27,17 %; 2) czosnek: 1 ml (ok. 16 %) – redukcja zawartości putrescyny, kadaweryny, histaminy i tyraminy o odpowiednio: 11,2, 18,4, 11,7 i 30,9 %; 0,5 ml (ok. 8 %) – redukcja spermidyny o 17,4 %. W doświadczeniu modelowym całkowita zawartość analizowanych amin biogennych w produkcie z dodatkiem ekstraktu z czosnku była o 8,7 % mniejsza niż w produkcie kontrolnym; 3) szczypior: 0,5 ml – redukcja tyraminy o 33,28 %, 1,0 ml – redukcja spermidyny o 10,87 %; 4) czerwona papryka: 0,5 ml – redukcja kadaweryny, tyraminy i spermidyny o odpowiednio: 10,73, 32,49 i 27,34 %; 5) goździki: 0,1 ml – redukcja tyraminy o 28,30 %, 1,0 ml – redukcja spermidyny o 28,30 %; 6) cynamon: 0,1 ml – redukcja putrescyny o 20,57 %, i 0,5 ml – redukcja tyraminy o 23,66 % ($p < 0,05$)</p>	<p>[29]</p>

olejków eterycznych. Jest to korzystny sposób, gdyż może stanowić jednocześnie pożądanym przez konsumentów dodatk sensoryczny, wzbogacić produkt o cenne, prozdrowotne składniki oraz w naturalny sposób zakonserwować produkt, wydłużając czas jego przydatności do spożycia [13]. W tab. 3. przedstawiono wybrane sposoby ograniczania formowania amin biogennych w fermentowanej żywności oraz osiągnięte efekty.

Podsumowanie

Obecność amin biogennych wynika głównie z aktywności metabolicznej drobnoustrojów wchodzących w skład produktu. Spożycie takiej żywności może wywołać szereg niekorzystnych reakcji w organizmie. U większości konsumentów objawy po spożyciu produktów zawierających aminy biogenne są jednak łagodne i nie zagrażają życiu. Często nie są kojarzone z przyczyną, czyli bezpośrednim dostarczeniem tych związków z dietą, dlatego poziom amin biogennych w żywności pozostaje niedoszacowany. Przeprowadzenie badań konsumenckich dotyczących spożycia żywności fermentowanej, uwzględniających m.in. rodzaj i wielkość porcji oraz występujące po jej spożyciu reakcje organizmu, przyczyniłoby się znacznie do oceny skali tego zagadnienia. Zgromadzone dane mogłyby stanowić podstawę do określenia limitów zawartości amin biogennych w produktach nieobjętych dotąd wymaganiami w tym zakresie. Poszukiwanie rozwiązań technologicznych, które mają na celu ograniczenie zawartości amin biogennych w żywności fermentowanej stanowi w ostatnich latach przedmiot zainteresowania wielu badaczy. Główne kierunki działań obejmują zastosowanie kultur starterowych niewytwarzających dekarboksylaz lub produkujących enzymy degradujące aminy oraz modulowanie metabolizmu drobnoustrojów poprzez wzbogacenie produktów w roślinne dodatki technologiczne.

Badania zostały sfinansowane w ramach działalności statutowej IBPRS-PIB nr 127-01 pt. „Wpływ wybranych czynników na ograniczanie występowania amin biogennych w fermentowanych warzywach”.

Literatura

- [1] Akan S., Ocak Ö.Ö.: Evaluation of storage time and grape seed extract addition on biogenic amines content of tarhana: A cereal-based fermented food. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2019, 111, 861-868.
- [2] Alvarez M.A., Moreno-Arribas M.V.: The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci. Technol.*, 2014, 39 (2), 146-155.
- [3] Baixas-Nogueras S., Bover-Cid S., Veciana-Nogués M.Y., Mariné-Font A., Vidal-Carou M.C.: Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *J. Food Protect.*, 2005, 68 (11), 2433-2438.

- [4] Bankerroum N.: Biogenic amines in dairy products: Origin, incidence, and control means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2016, 15 (4), 801-826.
- [5] Byun B.Y., Mah J.H.: Occurrence of biogenic amines in miso, Japanese traditional fermented soybean paste. *J. Food Sci.*, 2012, 77(12), 216-223.
- [6] Callejón S., Sendra R., Ferrer S., Pardo I.: Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 185-198.
- [7] Cheng W., Sun D.W., Cheng J.H.: Pork biogenic amine index (BAI) determination based on chemometric analysis of hyperspectral imaging data. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2016, 73, 13-19.
- [8] EFSA: Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.*, 2011, 9(10), #2393.
- [9] Ekici K., Omer A.K.: Biogenic amines formation and their importance in fermented foods. *BIO Web Conf.*, 2020, 17, #00232.
- [10] Fong F.L.Y., Lam K.Y., Lau C.S., Ho K.H., Kan Y.H., Poon M.Y., El-Nezami H., Sze E.T.P.: Reduction in biogenic amines in douchi fermented by probiotic bacteria. *PLoS ONE*, 2020, 15(3), #0230916.
- [11] Fraqueza M.J., Alfaia C.M., Barreto A.S.: Biogenic amine formation in turkey meat under modified atmosphere packaging with extended shelf life: Index of freshness. *Poultry Sci.*, 2012, 91 (6), 1465-1472.
- [12] García-Ruiz A., González-Rompinelli E.M., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V.: Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 148 (2), 115-120.
- [13] Gardini F., Özogul Y., Suzzi G., Tabanelli G., Özogul F.: Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Front. Microbiol.*, 2016, 7, #1218.
- [14] Góralczyk-Bińkowska A., Jasińska A., Długoński J.: Charakterystyka i kierunki wykorzystania enzymów z grupy wielomiedziowych oksydaz. *Post. Mikrobiol.*, 2019, 58 (1), 7-18.
- [15] Guarcello R., Angelis M.D., Settanni L., Formiglio S., Gaglio R., Minervini F., Moschetti G., Gobetti M.: Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzymes and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, 82 (23), 6870-6880.
- [16] Hernández-Jover T., Izquierdo-Pulido M., Veciana-Nogués M.T., Vidal-Carou M.C.: Biogenic amines sources in cooked cured shoulder pork. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44 (10), 3097-3101.
- [17] Herrero-Fresno A., Martínez N., Sánchez-Llana E., Díaz M., Fernández M., Martín M.C., Ladero V., Alvarez M.A.: *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 157 (2), 297-304.
- [18] Huang L., Wang Y., Li R., Wang Q., Dong J., Wang J., Lu S.: Thyme essential oil and sausage diameter effects on biogenic amine formation and microbiological load in smoked horse meat sausage. *Food Bioscience*, 2021, 40, #100885.
- [19] Jia W., Zhang R., Shi L., Zhang F., Chang J., Chu X.: Effects of spices on the formation of biogenic amines during the fermentation of dry fermented mutton sausage. *Food Chem.*, 2020, 321, #126723.
- [20] Kim H.S., Lee S.Y., Hur S.J.: Effects of different starter cultures on the biogenic amine concentrations, mutagenicity, oxidative stress, and neuroprotective activity of fermented sausages and their relationships. *J. Funct. Food.*, 2019, 52, 424-429.
- [21] Knope K.E., Sloan-Gardner T.S., Stafford R.J.: Histamine fish poisoning in Australia, 2001 to 2013. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.*, 2014, 38, 285-293.
- [22] Lee J.-Y., Kim Y., Her J.-Y., Kim M.K., Lee K.G.: Reduction of biogenic amine contents in fermented soybean paste using food additives. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2018, 98, 470-476.

- [23] Li B., Lu S.: The importance of amine-degrading enzymes on the biogenic amine degradation in fermented foods: A review. *Process Biochem*, 2020, 99, 331-339.
- [24] Li L., Wen X., Wen Z., Chen S., Wang L., Wei X.: Evaluation of the biogenic amines formation and degradation abilities of *Lactobacillus curvatus* from Chinese bacon. *Front. Microbiol.*, 2018, 9, #1015.
- [25] Linares D.M., del Rio B., Redruello B., Ladero V., Martin M.C., Fernandez M., Ruas-Madiedo P., Alvarez M.A.: Comparative analysis of the *in vitro* cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chem.*, 2016, 197, Part A, 658-663.
- [26] Lorencová E., Salek R.N., Buňková L., Szczybrochová M., Černíková M., Buňka F.: Assessment of biogenic amines profile in ciders from the Central Europe region as affected by storage time. *Food Bioscience*, 2021, 41, #100957.
- [27] Lu S., Xu X., Zhou G., Zhu Z., Meng Y., Sun Y.: Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control*, 2010, 21 (4), 444-449.
- [28] Ly D., Mayrhofer S., Schmidt J.M., Zitz U., Domig K.J.: Biogenic amine contents and microbial characteristics of Cambodian fermented foods. *Foods*, 2020, 9 (2), #198.
- [29] Mah J.H., Kim Y.J., Hwang H.J.: Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. *Food Control*, 2009, 20 (5), 449-454.
- [30] Majcherczyk J., Surówka K.: Effects of onion or caraway on the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation and refrigerated storage. *Food Chem.*, 2019, 298, #125083.
- [31] Mayer H.K., Fiechter G.: UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties. *Food Control*, 2018, 93, 9-16.
- [32] Mietz J.L., Karmas E.: Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 1977, 42 (1), 155-158.
- [33] Perestrelo R., Bordiga M., Locatelli M., Silva C., Câmara J.S.: Polyphenols, biogenic amines and amino acids patterns in Verdelho wines according to vintage. *Microchem. J.*, 2020, 153, #104383.
- [34] Preti R., Vieri S., Vinci G.: Biogenic amine profiles and antioxidant properties of Italian red wines from different price categories. *J. Food Compos. Anal.*, 2016, 46, 7-14.
- [35] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. *Dz. U. L* 338, s. 1-26, z 22.12.2005 z późn. zm.
- [36] Ruiz-Capillas C., Herrero A.M.: Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, 2019, 8 (2), #62.
- [37] Santyanont P., Chantarasakha K., Tepkasikul P., Srimarut Y., Mhuantong W., Tangphatsornruang S., Zo Y.-G., Chokesajjawatee N.: Dynamics of biogenic amines and bacterial communities in a Thai fermented pork product *Nham*. *Food Res. Int.*, 2019, 119, 110-118.
- [38] Silva C.M.G., Glória M.B.A.: Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. *Food Chem.*, 2002, 78 (2), 241-248.
- [39] Silva I.P., Dias L.G., da Silva M.O., Machado C.S., Paula V.M.B., Evangelista-Barreto N.S., de Carvalho C.A.L., Estevinho L.M.: Detection of biogenic amines in mead of social bee. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2020, 121, #108969.
- [40] Stadnik J.: Aminy biogenne w wyrobach mięsnych surowo dojrzewających. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, 3 (88), 5-15.
- [41] Świder O., Roszko M.Ł., Wójcicki M., Szymczyk K.: Biogenic amines and free amino acids in traditional fermented vegetables – dietary risk evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, 2020, 68 (3), 856-868.
- [42] Świder O., Wójcicki M.: Aminy biogenne w fermentowanej żywności. [on line]. *FoodFakty*. Dostęp w Internecie [20.02.2021]: <https://foodfakty.pl/aminy-biogenne-w-fermentowanej-zywnosci>

- [43] Veciana-Nogués M.T., Mariné-Font A., Vidal-Carou M.C.: Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45 (6), 2036-2041.
- [44] Wortberg B., Woller R.: Zur Qualität und Frische von Fleisch und Fleischwaren im Hinblick auf ihren Gehalt an biogenen Aminen. *Fleischwirtschaft*, 1982, 62 (11), 1457-1463.
- [45] Xie C., Wang H.H., Nie X.K., Chen L., Deng S.-L., Xu X.-L.: Reduction of biogenic amine concentration in fermented sausage by selected starter cultures. *CyTA – Journal of Food*, 2015, 13 (4), 491-497.
- [46] Yamanaka H., Shiomi K., Kikuchi T.: Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). *J. Food Sci.*, 1987, 52 (4), 936-938.
- [47] Yamanaka H., Shiomi K., Kikuchi T.: Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonoid fishes. *Food Hyg. Safety Sci.*, 1989, 30 (2), 170-174.
- [48] Zaman M.Z., Bakar F.A., Jinap S., Bakar J.: Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 145 (1), 84-91.
- [49] Zhao J., Niu C., Du S., Liu C., Zheng F., Wang J., Li Q.: Reduction of biogenic amines formation during soybean paste fermentation by using *Staphylococcus carnosus* M43 and *Pediococcus acidilactici* M28 as starter culture. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2020, 133, #109917.

BIOGENIC AMINES – CONSUMPTION RISK ASSESSMENT AND PROSPECTS OF LIMITING THEIR FORMATION IN FERMENTED FOODS

S u m m a r y

Ensuring food safety is currently one of the most important missions of many internationally active institutions. Their activities include the cooperation in the field of controlling and analysing the quality of food products in order to protect consumer health and to rationally manage available resources. The presence of biogenic amines in food is a subject raised many times by numerous organizations, both in the context of setting limits of the content of these compounds in food (FDA, EFSA) and pointing out directions of future research (EFSA). If provided with the diet, biogenic amines can cause a number of unfavourable reactions in the body. The occurrence of these compounds in food results mainly from the metabolic activity of microorganisms in the product. Therefore many scientists attempted to create a Biogenic Amine Index as an indicator of the quality and/or freshness of selected products (mainly meat and fish), in which the activity of microorganisms is undesirable, contributes to a reduction in the quality of product and therefore reduces its shelf life. Fermented foods are a group of products, where the risk of amine formation is particularly high, but where the presence and growth of microorganisms constitute a basis of the process of producing them. While being a potential threat, the microorganisms can become allies in reducing the content of biogenic amines in fermented foods. A good strategy is to select starter cultures with known properties and/or to appropriately modulate the metabolism of microorganisms by adding plant substances and ensuring optimal environmental conditions.

Key words: biogenic amines, Biogenic Amine Index, food safety, fermented food ☒

PAULINA ŚREDNICKA, EDYTA JUSZCZUK-KUBIAK, MAREK Ł. ROSZKO

INTERAKCJE ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNIE CZYNNYCH OBECNYCH W ŻYWNOŚCI Z MIKROBIOTĄ JELITOWĄ CZŁOWIEKA

Streszczenie

Związki endokrynnie czynne (ang. EDCs) należą do niejednorodnej grupy związków chemicznych zwanych ksenobiotykami, których charakterystyczną cechą jest oddziaływanie na układ hormonalny ludzi i zwierząt. Do EDCs zaliczane są zarówno związki pochodzenia antropogenicznego, takie jak: pestycydy, związki stosowane w przemyśle tworzyw sztucznych, metale ciężkie, polichlorowane bifenyle, jak również naturalnie występujące w środowisku mykotoksyny i fitoestrogeny. Szeroka skala wytwarzania EDCs prowadzi do stałej ekspozycji na nie populacji ludzkiej, a ich niekorzystny wpływ na zdrowie został opisany w licznych publikacjach. Podstawową drogą narażenia ludzi na EDCs jest spożywanie zanieczyszczonej żywności i wody. Związki te po dostaniu się do organizmu mogą, poza oddziaływaniem na układ hormonalny, wpływać również na funkcjonowanie mikrobioty jelita, prowadząc do dysbiozy i zaburzeń homeostazy gospodarza. Z drugiej strony ksenobiotyki oraz ich metabolity wątrobowe mogą ulegać biotransformacji przez mikrobiotę jelita, która prowadzi do zmian ich właściwości, takich jak potencjał hormonalny, biodostępność i cytotoksyczność. Ponadto mikrobiota jelita może regulować ekspresję genów gospodarza odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków. Zrozumienie interakcji pomiędzy EDCs i mikrobiotą jelita jest więc niezbędne do prawidłowej oceny stopnia bezpieczeństwa tych związków dla zdrowia ludzi.

Słowa kluczowe: związki endokrynnie czynne (EDCs), ksenobiotyki, mikrobiota jelita, biotransformacja

Wprowadzenie

Związki endokrynnie czynne (ang. *Endocrine Disrupting Compounds*, EDCs) to biologicznie aktywne ksenobiotyki, które oddziałują na układ hormonalny ludzi i zwierząt [11]. W organizmach żywych EDCs mogą wpływać na syntezę hormonów i ich transport, wiązanie z receptorami, metabolizm oraz procesy ich usuwania z organizmu, prowadząc do zaburzeń homeostazy hormonalnej [11, 12, 40]. Obecnie zidentyfikowa-

Mgr P. Średnicka, dr hab. E. Juszczyk-Kubiak, prof. IBPRS, Zakład Mikrobiologii, dr hab. M. Ł. Roszko, prof. IBPRS, Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa. Kontakt: paulina.grzelak@ibprs.pl

no ponad 1000 związków chemicznych, które wykazują właściwości endokryenne [11]. EDCs to niejednorodna chemicznie grupa związków, do której zalicza się m.in. niektóre leki, substancje aktywne pestycydów, związki stosowane w przemyśle tworzyw sztucznych, detergenty, metale ciężkie, a także niektóre naturalne metabolity produkowane przez rośliny i grzyby [13]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono istotną korelację pomiędzy ekspozycją na związki endokrynie czynne a ryzykiem wystąpienia niekorzystnych efektów zdrowotnych, takich jak: zaburzenia płodności [29, 31], zespół metaboliczny [15, 24], choroby nowotworowe [26] oraz zaburzenia immunologiczne [2]. Duża różnorodność i szerokie stosowanie EDCs w przemyśle prowadzi do stałej ekspozycji na nie, a główną drogą narażenia ludzi jest żywność [13].

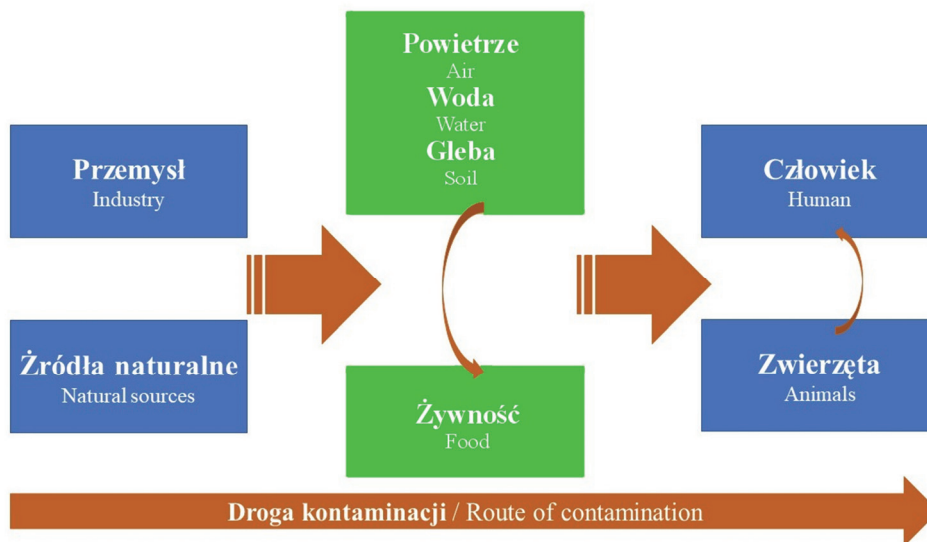
Od wielu lat EDCs są badane w kierunku oceny ich potencjału hormonalnego, profilu toksykologicznego i wpływu na organizmy żywe. Zwrócono uwagę na interakcje EDCs z mikrobiotą jelita, co może w sposób istotny wpływać na wywoływane przez nie efekty biologiczne [8, 17]. Dowiedziono, że ksenobiotyki i ich metabolity oddziałują na mikrobiotę, prowadząc do zmian w strukturze gatunkowej i liczebności drobnoustrojów [16, 33, 44], a także do zaburzeń metabolomu jelitowego poprzez np. obniżenie poziomu syntezy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *Short Chain Fatty Acids*, SCFA) [30]. Z drugiej strony potwierdzono zdolność mikrobioty jelita do biotransformacji ksenobiotyków, co prowadzi do powstawania metabolitów o zmienionej aktywności biologicznej [7, 41]. Wykazano również, że metabolity wydzielane przez mikrobiotę jelita regulują ekspresję genów gospodarza, w tym genów odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków [6, 46].

Interakcja EDCs z mikrobiotą jelita jest zjawiskiem złożonym, wielokierunkowym i wywołującym szereg swoistych odpowiedzi biologicznych, mających istotny wpływ na homeostazę organizmu. W pracy przedstawiono dotychczasowe wyniki badań dotyczące interakcji między mikrobiotą jelitową, jej gospodarzem a związkami endokrynie czynnymi. Omówiono zanieczyszczenia chemiczne najczęściej identyfikowane w żywności, istotne ze względu na bezpieczeństwo żywności.

Związki endokrynie czynne (EDCs) występujące w żywności

EDCs obecne w żywności są pochodzenia naturalnego, jak i antropogenicznego (rys. 1). Zalicza się do nich m.in. mykotoksyny wytwarzane przez pleśnie z rodzajów *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Alternaria*, które zanieczyszczają światowe uprawy kukurydzy, zbóż, soi, orzeszków ziemnych, ale także naturalnie obecne w roślinach fitoestrogeny [4, 19]. Antropogeniczne źródła skażenia żywności EDCs obejmują natomiast stosowanie pestycydów w rolnictwie, migrację zanieczyszczeń z materiałów opakowaniowych do żywności (bisfenol A i jego analogi), zanieczyszczoną wodę, powietrze i glebę w wyniku działalności człowieka, np. poprzez dioksyny, polichloro-

wane bifenyle, czy polibromowane difenyle [28, 36]. Metale ciężkie dostają się do łańcuchów pokarmowych zarówno w wyniku działalności człowieka, jak również poprzez naturalne procesy, takie jak: aktywność wulkaniczna, wietrzenie skał i gleb, trzęsienia ziemi i erozja [28]. Należy pamiętać, że żywność jest złożoną matrycą, w której mogą współwystępować różne związki o charakterze endokrynnie czynnym, prowadząc do tzw. efektu koktajlu, który w skrajnych przypadkach polega na działaniu synergistycznym lub co najmniej addytywnym. Oznacza to, że mieszaniny takich związków chemicznych mogą wykazywać silniejsze działanie endokrynnie niż pojedyncze substancje oddziałujące w tych samych dawkach [5].



Rys. 1. Źródła skażenia żywności związkami endokrynnie czynnymi (EDCs)
 Fig. 1. Sources of contaminating food by endocrine disrupting compounds (EDCs)

W rocznym sprawozdaniu Komisji Europejskiej dotyczącym systemu wczesnego ostrzegania o żywności i paszach (RASFF) za 2019 r. najczęściej zgłaszanym związkiem wśród ksenobiotyków była orchatoksyna A występująca głównie w rodzynkach i suszonych figach [27]. Ponadto 253 powiadomienia dotyczyły pozostałości pestycydów, które w większości przypadków stwierdzono w owocach i warzywach, natomiast pozostałe powiadomienia dotyczyły kolejno metali (136 powiadomień) i substancji chemicznych środowiskowych (56 powiadomień) [27]. Powiadomienia systemu RASFF dotyczą jedynie przypadków przekroczeń maksymalnych dopuszczalnych poziomów pozostałości substancji regulowanych prawem żywnościowym Unii Europejskiej. Należy jednak podkreślić, że człowiek jest narażony na niskie stężenia EDCs, niestanowiące przekroczeń dopuszczalnych i wskazanych w prawie poziomów lub

substancji nieregulowanych, z których obecnością środowiskową styka się w sposób ciągły.

Wpływ związków endokrynnie czynnych (EDCs) na strukturę i funkcję mikrobioty jelita

Mikrobiota jelitowa jest złożonym konglomeratem składającym się z bakterii, wirusów, archeonów, grzybów i protozoa [3]. Liczba zidentyfikowanych gatunków waha się od 700 do 1000, jednak dominują bakterie należące do typów *Firmicutes* i *Bacteroidetes* [41]. Mikrobiota jelitowa spełnia wiele istotnych funkcji [8], takich jak: udział w procesie fermentacji węglowodanów, metabolizm peptydów, rozkład niektórych polifenoli, synteza witaminy K, składników witaminy B i SCFA [17]. Ponadto mikrobiota jelitowa uczestniczy w procesie dojrzewania układu immunologicznego oraz w ochronie przed patogenami [1]. Wyniki badań wskazują, że niektóre metabolity syntetyzowane przez mikrobiotę jelitową (cholina, metabolity kwasów żółciowych, proste gazy) mogą wykazywać działanie hormonalne oraz modulować odpowiednie szlaki metaboliczne gospodarza [23].

Właściwe funkcjonowanie i odpowiednia struktura gatunkowa mikrobioty jelitowej jest niezbędna do utrzymania zdrowia i prawidłowego funkcjonowania organizmu gospodarza [32, 39]. Zaburzenia mikrobioty jelitowej są istotnie skorelowane z występowaniem takich chorób, jak: otyłość, cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe czy rak jelita grubego [10]. Do czynników zaburzających prawidłową strukturę i funkcjonalność mikrobioty należą: stres, stosowanie antybiotyków, nieodpowiednia dieta, uwarunkowania genetyczne, wiek gospodarza [1, 3]. Według ostatnich badań chroniczna ekspozycja na EDCs prowadzi nie tylko do zaburzenia homeostazy hormonalnej organizmu, ale również negatywnie wpływa na strukturę i metabolizm mikrobioty jelitowej (tab. 1) [34, 38, 42, 43]. Na przykład w pilotażowych badaniach z udziałem kobiet w ciąży oraz dzieci pochodzących z zanieczyszczonego regionu Tanzanii wykazano, że chroniczne narażenie na arsen (As) w istotny sposób zmieniało strukturę mikrobioty jelita w kierunku wzrostu *Firmicutes* oraz obniżenia liczby *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium* [16]. Z kolei Lu i wsp. [22] na modelu mysim wykazali silną korelację między zaburzeniami składu gatunkowego mikrobioty a zmianami metabolomu pod wpływem ekspozycji na As. Zaobserwowane zmiany dotyczyły poziomu pochodnych aminokwasów, kwasów żółciowych, tłuszczów, kwasów tłuszczowych, izoflawonów, indolu oraz koniugatów glukuronidowych i karnitynowych.

Innym przykładem jest chlorpyrifos, powszechnie stosowany w rolnictwie insektycyd fosforoorganiczny, charakteryzujący się aktywnością antyandrogenową. Wywiera istotny wpływ na obniżenie poziomu biosyntezy testosteronu i ekspresji genu kodującego receptor estrogenowy [47]. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na

Tabela 1. Wybrane związki endokrynnie czynne (EDCs) i ich oddziaływanie na mikrobiotę jelitową oraz na odpowiedź gospodarza
 Table 1. Selected endocrine disrupting compounds (EDCs) and their effect on intestinal microbiota and on host response

EDCs	Typ związku Type of chemical compound	Badany model Research model	Wpływ na mikrobiotę jelitową i na odpowiedź gospodarza / Effect on intestinal microbiota and on host response	Źródło Reference
BPA	Fenole Phenols	Mikrobiota jelitowa człowieka Human intestinal microbiota (<i>in vitro</i>)	↓ Bioróżnorodność mikrobioty jelitowej Biodiversity of the intestinal microbiota ↑ <i>Microbacterium</i> , <i>Alcaligenes</i> (bakterie degradujące BPA / BPA-degrading bacteria)	[43]
		Psy / Dogs (<i>in vivo</i>)	↑ BPA w surowicy (3-krotny wzrost) Serum BPA (3-fold increase) ↑ <i>Bacteroidetes ovatus</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Ruminococcus</i> spp., <i>Cetobacterium somerae</i> ↓ <i>Bacteroides</i> spp., <i>Streptophyta</i> , <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Flexispira</i> spp.	[20]
		Króliki Rabbits (<i>in vivo</i>)	↓ <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Oscillospira</i> spp., <i>Odoribacter</i> spp. ↓ SCFA (kwas octowy, propionowy, masłowy / acetic, propionic, butyric acid) ↑ Lipopolisacharydy w surowicy krwi Lipopolysaccharides in blood serum	[30]
Arsen Arsenic	Metaloidy Metalloids	Ludzie Humans (<i>in vivo</i>)	↑ Bakterie należące do 8 rodzajów (6 z gromady <i>Firmicutes</i>) / Bacteria belonging to 8 genera (6 from the <i>Firmicutes</i> cluster) ↓ Bakterie należące do 15 rodzajów, w tym: Bacteria belonging to 15 genera, including: <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i>	[16]
Ołów Lead	Metale ciężkie Heavy metals	<i>Danio reiro</i> (<i>in vivo</i>)	↓ <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Firmicutes</i> Różnice w poziomach 41 metabolitów związanych z przemianami glukozy, lipidów, nukleotydów i aminokwasów / Differences in levels of 41 metabolites associated with metabolism of glucose, lipids, nucleotides and amino acids ↓ Transkrypcja niektórych genów biorących udział w metabolizmie lipidów i glikolizie Transcription of some genes involved in lipid metabolism and glycolysis	[44]

Chloropiryfos Chlorpyrifos	Pestycydy Pesticides	Szczury Rats (<i>in vivo</i>), mikrobiota jelitowa ludzi human intestinal micro- biota (<i>in vitro</i>)	↓ <i>Lactobacillus</i> spp. ↓ <i>Bifidobacterium</i> spp.	[18]
Glifosat Glyphosate		Szczepy bakterii wchodzące w skład mikrobioty jelitowej drobiu Bacterial strains being a part of intestinal microbiota of poultry (<i>in vitro</i>)	↓ <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bacillus badius</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. ↑ <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Gallinarum, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> , <i>Clostridium botulinum</i>	[35]
PCB #126	PCB	Myszy Mice C56BL6/J	Zaburzenia w strukturze mikrobioty jelitowej myszy przypominające zmiany występujące przy przewlekłych chorobach zapalnych Disturbances in structure of intestinal microbiota of mice similar to changes occurring in chronic inflammatory diseases ↑ Wzrost liczby bakterii typu <i>Firmicutes</i> w stosunku do <i>Bacteroidetes</i> / Increase in <i>Firmicutes</i> count compared to <i>Bacteroidetes</i> ↓ α -różnorodność / α -diversity ↑ Ekspresja <i>Cyp11a1</i> / Expression <i>Cyp11a1</i>	[25]
PCB #77, #126, #153		Myszy Mice C57BL/6	↑ Zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie Body fat content ↑ Wielkość adipocytów / Size of adipocytes ↑ Ekspresja prozapalnych cytokin / Expression of pro-inflammatory cytokines (TNF α , iNOS, IL-6) ↑ Współczynnik <i>Firmicutes/Bacteroidete</i> (#126 i #153) / <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> ratio (#126 and #153)	[6]

Mieszanina A mixture of PBDE-47, PBDE-99	PBDE	Myszy Mice C57BL/6	Zmiana liczby 45 gatunków bakterii jelitowych Change in count of 45 species of intestinal bacteria ↓ Bioróżnorodność / Biodiversity ↑ <i>Akkermansia muciniphila</i> , <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Allobaculum</i> spp. ↓ <i>Coriobacteriia</i> , <i>Bacilli</i> ↑ <i>Erysipelotrichia</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Verrucomicrobiae</i> Modulacja szlaków biochemicznych odpowiedzialnych za biosyntezę penicyliny, cefalosporyny i lipopolisacharydów, modulacja szlaków biotransformacji ksenobiotyków i ich metabolizmu / Modulation of biochemical pathways responsible for biosynthesis of penicillin, cephalosporins and lipopolysaccharides, modulation of biotransformation pathways of xenobiotics and their metabolism	[46]
PBDE-47, PBDE-99		Myszy Mice C57BL/6	↓ Poziom metabolitów w surowicy: 3-IPA, kwas indolo-3-octowy, kinurenina, N-acetyloetyloamina, kwas fenylooctowy (nie zachodzi u myszy pozbawionych mikrobioty) Serum metabolite levels: 3-IPA, indole-3-acetic acid, kynurenine, N-acetylethylamine, phenylacetic acid (does not occur in mice devoid of microbiota) Zmiany liczby 23 taksonów bakterii Changes in count of 23 taxonomies of bacteria Zaburzenie poziomu ekspresji 133 genów związanych ze szlakami metabolizmu węglowodanów (38 genów) oraz metabolizmu i biosyntezy glikanów (13 genów) / Impairment of expression level of 133 genes related to carbohydrate metabolism pathways (38 genes) and glycans metabolism pathways and biosynthesis (13 genes)	[34]
Zearalenone	Mykotoksyny Mycotoxins	Myszy Mice BALB/C	↑ Ekspresja mRNA: błonowej β-defensyny, mucyny-1, mucyny-2, interleukiny-1beta (IL-1β), czynnika martwicy nowotworu-α (TNF-α) i wydzielniczej immunoglobuliny A (sIgA) Expression of mRNAs: membrane β-defensin, mucin-1, mucin-2, interleukin-1beta (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and secretory immunoglobulin A (sIgA) ↓ <i>Cyanobacteria</i> ↓ <i>Lactobacillus intestinalis</i>	[42]

Objaśnienia / Explanatory notes:

↓ – zmniejszenie wpływu czynnika / reducing the influence of the factor; ↑ – zwiększenie wpływu czynnika / increasing the influence of the factor.

szczurach oraz *in vitro* z użyciem symulatora ekosystemu ludzkiej mikrobioty jelitowej (SHIME) wykazano, że długotrwałe podawanie małych dawek chloropiryfosu powoduje zmiany w składzie gatunkowym mikrobioty jelita, w tym obniżenie poziomu *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. [18]. W przypadku glifosatu, najpowszechniej stosowanego herbicydu na świecie, w badaniach *in vitro* wykazano negatywny wpływ na *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus badius*, *Bifidobacterium adolescentis* i *Lactobacillus* spp. wchodzących w skład mikrobioty jelita drobiu. Jednocześnie stwierdzono wysoką odporność na działanie glifosatu patogenów, takich jak: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Typhimurium, *Clostridium perfringens* i *Clostridium botulinum* [35]. Również ekspozycja na bisfenol A (BPA), związek o właściwościach endokrynnych, skorelowana była istotnie z dysbiozą mikrobioty jelita. Koestel i wsp. [20] w badaniach z udziałem psów wykazali 3-krotny wzrost stężenia BPA w surowicy krwi zwierząt karmionych karmą w puszcze zawierającej BPA w porównaniu z psami z grupy kontrolnej. Zmiany poziomu BPA były dodatnio skorelowane ze zwiększeniem liczby *Bacteroidetes ovatus*, *Prevotella* spp., *Ruminococcus* spp. i *Cetobacterium somerae* oraz negatywnie – z liczbą *Bacteroides* spp., *Streptophyta*, *Erysipelotrichaceae* i *Flexispira* spp. Petriello i wsp. [25] w badaniach dotyczących polichlorowanych bifenyli (PCB) wykazali, że kongener PCB #126 powoduje zaburzenia w strukturze mikrobioty jelita myszy przypominające zmiany występujące przy przewlekłych chorobach zapalnych. Zaburzenia mikrobioty jelita były związane ze wzrostem liczby *Firmicutes* w stosunku do *Bacteroidetes* [25]. Yanfei Li i wsp. [46] podawali myszom polibromowane difenyletery (PBDE-47 i PBDE-99), co spowodowało zmianę liczby 45 gatunków bakterii jelitowych, w tym typu *Actinobacteria*. Ponadto ekspozycja na PBDE-47 i PBDE-99 spowodowała obniżenie liczby *Coriobacteriia* i *Bacilli* z jednoczesnym zwiększeniem *Erysipelotrichia*, *Gamma-proteobacteria* i *Verrucomicrobiae*. Pod wpływem ekspozycji na wyżej wymienione ksenobiotyki zaobserwowano istotny wzrost aktywności metabolicznej mikrobioty jelita związanej z biosyntezą penicyliny, cefalosporyny i lipopolisacharydów oraz biotransformacją i metabolizmem ksenobiotyków [46].

Udział mikrobioty jelitowej w metabolizmie związków endokrynnie czynnych (EDCs)

Zdolność mikroorganizmów jelitowych do metabolizowania ksenobiotyków opisali po raz pierwszy Gingell i wsp. [14] na przykładzie detoksykacji antybiotyków. Obecnie istotnym kierunkiem badań toksykologicznych jest określenie wpływu mikrobioty jelita na zmiany struktury chemicznej i aktywności biologicznej ksenobiotyków występujących w żywności [9].

Szlak metabolizmu ksenobiotyków u ludzi przebiega w kilku etapach [21]. Związki te są słabo wchłaniane przez przewód pokarmowy i przesuwane w dalsze od-

cinki jelita przez ruchy perystaltyczne, gdzie mogą być bezpośrednio metabolizowane przez mikroorganizmy. Znaczna część ksenobiotyków będących substancjami niepolarnymi jest wchłaniana przez tkanki gospodarza i transportowana żyłą wrotną do wątroby, gdzie ulega procesowi detoksykacji [8]. Biotransformacja ksenobiotyków przez organizm gospodarza ma na celu obniżenie toksyczności związków i/lub ułatwienie ich wydalania, a polega na przekształceniu niepolarnych związków w pochodne bardziej hydrofilowe oraz zwiększeniu masy cząsteczkowej metabolitów [21]. W I fazie detoksykacji zachodzą głównie reakcje utleniania, hydroksylacji i epoksydacji. W II fazie metabolizmu wątrobowego ksenobiotyki ulegają procesom sprzęgania z wytworzeniem znacznie bardziej polarnych metabolitów. Enzymy wątrobowe katalizują reakcje glukuronidacji, metylacji, acetylacji, sulfonowania oraz sprzęgania ksenobiotyków z glutationem. Związki o mniejszej masie cząsteczkowej są przeważnie wydalone przez nerki wraz moczem, natomiast metabolity o wyższej masie wydzielane są wraz z żółcią do światła jelita cienkiego, gdzie mogą zostać powtórnie wchłonięte. Związki, które nie wejdą powtórnie w krążenie jelitowo-wątrobowe, są przesuwane do dalszych odcinków przewodu pokarmowego, gdzie ostatecznie zostaną wydalone z kałem [7].

Mikrobiota jelitowa modyfikuje zarówno ksenobiotyki, jak i ich metabolity wątrobowe, syntezując enzymy katalizujące reakcje dekonjugacji i redukcji, co może prowadzić do odwrócenia procesu detoksykacji [37]. Powstające pochodne mogą wykazywać się inną aktywnością biologiczną, biodostępnością i toksycznością niż wyjściowe związki i ich metabolity wątrobowe. Co więcej, pochodne ksenobiotyków powstałe w wyniku biotransformacji z udziałem mikrobioty jelitowej mogą być również adsorbowane przez nabłonek jelita grubego [7].

W badaniach na myszach dotyczących biotransformacji BPA wykazano detoksykację wątrobowego metabolitu BPA przez mikrobiotę jelitową oraz obecność w kale pochodnych HO-BPA, HO₃S-BPA i dehydroksylowanych glukuronidów BPA [48]. Detoksykacja PCB zaliczanego do trwałych zanieczyszczeń przebiega przy udziale enzymów katalizujących metabolizm ksenobiotyków gospodarza w interakcji z mikrobiotą jelita [45]. Cytochrom P450 w wątrobie katalizuje oksydację PCB, a dalsze przemiany prowadzą do przekształcenia epoksydu do HO-PCB lub metabolitów zawierających siarkę, takich jak metylosulfonowe pochodne PCB. Hydroksylowe pochodne ulegają koniugacji z glutationem i w większości są wydalone z organizmu, natomiast bakterie jelitowe mogą katalizować dalszą przemianę związku do tiolu PCB i następnie do metylosulfonowych pochodnych PCB. Związki te są wchłaniane i transportowane do wątroby, gdzie ulegają utlenianiu do MeSO₂-PCB, który jest akumulowany w tkance tłuszczowej. Zarówno MeSO₂-PCB, jak i HO-PCB wykazują działanie endokrynnie czynne [45].

Podsumowanie

Związki endokrynnie czynne (EDCs) są szeroko stosowane w przemyśle i znajdują się w wielu produktach codziennego użytku, jak również w żywności. Ciągła ekspozycja na ksenobiotyki znajdujące się w żywności ma istotny wpływ na zdrowie człowieka poprzez zaburzenie struktury gatunkowej i funkcjonalnej mikrobioty jelitowej. Z drugiej strony mikrobiota jelitowa ma szerokie spektrum enzymów katalizujących reakcje biotransformacji ksenobiotyków w organizmie gospodarza, a powstające pochodne mogą charakteryzować się inną cytotoxycywnością, potencjałem endokrynnym oraz odmienną ich biodostępnością. Interakcje między gospodarzem, mikrobiotą jelitową a EDCs nie są jeszcze w pełni poznane. Dalsze badania są niezbędne w celu oceny skutków zdrowotnych stałej ekspozycji populacji na EDCs w kontekście ich interakcji z mikrobiotą jelitową.

Artykuł został opracowany w ramach założeń pracy doktorskiej mgr Pauliny Średnickiej, wykonywanej w szkole doktorskiej „AgroBioTech PhD” w IBPRS-PIB pod kierunkiem dr hab. Edyty Juszcuk Kubiak, prof. IBPRS i dr hab. Marka Roszki, prof. IBPRS.

Publikacja finansowana z tematu statutowego (ZM-142-01) w ramach działalności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego.

Literatura

- [1] Anwar H., Irfan S., Hussain G., Faisal M.N., Muzaffar H., Mustafa I., Mukhtar I., Malik S., Ullah M.I.: Gut microbiome: A new organ system in body. In: Parasitology and Microbiology Research. IntechOpen, London 2020, pp. 137-144.
- [2] Bansal A., Hena-Mejia J., Simmons R.A.: Immune system: An emerging player in mediating effects of endocrine disruptors on metabolic health. *Endocrinology*, 2018, 159 (1), 32-45.
- [3] Barko P.C., McMichael M.A., Swanson K.S., Williams D.A.: The gastrointestinal microbiome: A review. *J. Veter. Int. Med.*, 2018, 32 (1), 9-25.
- [4] Bennetau-Pelissero C.: Risks and benefits of phytoestrogens: Where are we now. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2016, 19 (6), 477-483.
- [5] Buha Djordjevic A., Antonijevic E., Curcic M., Milovanovic V., Antonijevic B.: Endocrine-disrupting mechanisms of polychlorinated biphenyls. *Curr. Opin. Toxicol.*, 2020, 19, 42-49.
- [6] Chi Y., Lin Y., Zhu H., Huang Q., Ye G., Dong S.: PCBs – high-fat diet interactions as mediators of gut microbiota dysbiosis and abdominal fat accumulation in female mice. *Environ. Pollut.*, 2018, 239, 332-341.
- [7] Clarke G., Sandhu K.V., Griffin B.T., Dinan T.G., Cryan J.F., Hyland, N.P.: Gut reactions: Breaking down xenobiotic-microbiome interactions. *Pharmacol. Rev.*, 2019, 71 (2), 198-224.
- [8] Claus S.P., Guillou H., Ellero-Simatos S.: The gut microbiota: A major player in the toxicity of environmental pollutants? *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2016, 2, #16003.

- [9] Collins S.L., Patterson A.D.: The gut microbiome: An orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharm. Sin. B.*, 2020, 10 (1), 19-31.
- [10] Degruittola A.K., Low D., Mizoguchi A., Mizoguchi E.: Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2016, 22 (5), 1137-1150.
- [11] Street M.E., Angelini S., Bernasconi S., Burgio E., Cassio A., Catellani C., Cirillo F., Deodati A., Fabbri E., Fanos V., Gargano G., Grossi E., Iughetti L., Lazzeroni P., Mantovani A., Migliore L., Palanza P., Panzica G., Papini A.M., Parmigiani S., Predieri B., Sartori C., Tridenti G., Amarri S.: Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood: Highlights from a national Italian meeting. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19 (6), #1647.
- [12] Gálvez-Ontiveros Y., Páez S., Monteagudo C., Rivas A.: Endocrine disruptors in food: Impact on gut microbiota and metabolic diseases. *Nutrients*, 2020, 12 (4), #1158.
- [13] Gibert Y., Lorena L., Cardozo Y., Naville D., Diamanti-Kandarakis E., Papalou O., Kandaraki E.A., Papadakis G.: Endocrine disrupting chemicals: An occult mediator of metabolic disease. *Front. Endocrinol.*, 2019, 10, #112.
- [14] Gingell R., Bridges J.W., Williams R.T.: The role of the gut flora in the metabolism of prontosil and neoprontosil in the rat. *Xenobiotica*, 1971, 1 (2), 143-156.
- [15] Heindel J.J., Blumberg B., Cave M., Machtinger R., Mantovani A., Mendez M.A., Nadal A., Palanza P., Panzica G., Sargis R., Vandenberg L.N., von Saal F.: Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod. Toxicol.*, 2017, 68, 3-33.
- [16] Hoen A.G., Madan J.C., Li Z., Coker M., Lundgren S.N., Morrison H.G., Palys T., Jackson B.P., Sogin M.L., Cottingham K.L., Karagas M.R.: Sex-specific associations of infants' gut microbiome with arsenic exposure in a US population. *Sci. Rep.*, 2018, 8, #12627.
- [17] Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., Sasikala M., Reddy N.: Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.*, 2015, 21 (29), 8787-8803.
- [18] Joly C., Gay-Quéheillard J., Léké A., Chardon K., Delanaud S., Bach V., Khorsi-Cauet H.: Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and in the rat. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2013, 20 (5) 2726-2734.
- [19] Khoury D.E., Fayjaloun S., Nassar M., Sahakian J., Aad P.Y.: Updates on the effect of mycotoxins on male reproductive efficiency in mammals. *Toxins*, 2019, 11 (9), #515.
- [20] Koestel Z.L., Backus R.C., Tsuruta K., Spollen W.G., Johnson S.A., Javurek A.B., Eilersieck M.R., Wiedmeyer C.E., Kannan K., Xue J., Bivens N.J., Givan S.A., Rosenfeld C.S.: Bisphenol A (BPA) in the serum of pet dogs following short-term consumption of canned dog food and potential health consequences of exposure to BPA. *Sci. Total Environ.*, 2017, 579, 1804-1814.
- [21] Koppel N., Maini Rekdal V., Balskus E.P.: Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*, 2017, 356 (6344), #eaag2770.
- [22] Lu K., Abo R.P., Schlieper K.A., Graffam M.E., Levine S., Wishnok J.S., Swenberg J.A., Tannenbaum S.R., Fox J.G.: Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: An integrated metagenomics and metabolomics analysis. *Environ. Health Perspect.*, 2014, 122 (3), 284-291.
- [23] Martin A.M., Sun E.W., Rogers G.B., Keating D.J.: The influence of the gut microbiome on host metabolism through the regulation of gut hormone release. *Front. Physiol.*, 2019, 10, #428.
- [24] La Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Cogliano V.J., Woodruff T.J., Rieswijk L., Sone H., Korach K.S., Gore A.C., Zeise L., Zoeller R.T.: Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2020, 16 (1), 45-57.

- [25] Petriello M.C., Hoffman J.B., Vsevolozhskaya O., Morris A.J., Hennig B.: Dioxin-like PCB 126 increases intestinal inflammation and disrupts gut microbiota and metabolic homeostasis. *Environ. Pollut.*, 2018, 242, 1022-1032.
- [26] Rachoń D.: Endocrine disrupting chemicals (EDCs) and female cancer: Informing the patients. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2015, 16, 359-364.
- [27] European Commission: RASFF Annual Report 2019. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2020.
- [28] Rather I.A., Koh W.Y., Paek W.K., Lim J.: The sources of chemical contaminants in food and their health implications. *Front. Pharmacol.*, 2017, 8, #830.
- [29] Rattan S., Zhou C., Chiang C., Mahalingam S., Brehm E., Flaws J.A.: Exposure to endocrine disruptors during adulthood: Consequences for female fertility. *J. Endocrinol.*, 2017, 233 (3), R109-R129.
- [30] Reddivari L., Veeramachaneni D.N.R., Walters W.A., Lozupone C., Palmer J., Hewage M.K.K., Bhatnagar R., Amir A., Kennett M.J., Knight R., Vanamala J.K.P.: Perinatal bisphenol a exposure induces chronic inflammation in rabbit offspring via modulation of gut bacteria and their metabolites. *MSystems*, 2017, 2 (5), #e00093-17.
- [31] Rehman S., Usman Z., Rehman S., Al Draihem M., Rehman N., Rehman I., Ahmad G.: Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health. *Transl. Androl. Urol.*, 2018, 7 (3), 490-503.
- [32] Rosenfeld C.S.: Gut dysbiosis in animals due to environmental chemical exposures. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, 579, 1804-1814.
- [33] Rouzé R., Moné A., Delbac F., Belzunces L., Blot N.: The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes Environ.*, 2019, 34 (3), 226-233.
- [34] Scoville D.K., Li C.Y., Wang D., Dempsey J.L., Raftery D., Mani S., Gu H., Cui J.Y.: Polybrominated diphenyl ethers and gut microbiome modulate metabolic syndrome-related aqueous metabolites in mice. *Drug Metab. Dispos.*, 2019, 47 (8) 928-940.
- [35] Shehata A.A., Schrodل W., Aldin A.A., Hafez H.M., Krüger M.: The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr. Microbiol.*, 2013, 66 (4), 350-358.
- [36] Silano M., Silano V.: Food and feed chemical contaminants in the European Union: Regulatory, scientific, and technical issues concerning chemical contaminants occurrence, risk assessment, and risk management in the European Union. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, 57 (10) 2162-2217.
- [37] Swanson H.I.: Drug metabolism by the host and gut microbiota: A partnership or rivalry? *Drug Metab. Dispos.*, 2015, 43 (10), 1499-1504.
- [38] Tetel M.J., de Vries G.J., Melcangi R.C., Panzica G., O'Mahony S.M.: Steroids, stress and the gut microbiome-brain axis. *J. Neuroendocrinol.*, 2018, 30 (2), #e12548.
- [39] Velmurugan G., Ramprasath T., Gilles M., Swaminathan K., Ramasamy S.: Gut microbiota, endocrine-disrupting chemicals, and the diabetes epidemic. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2017, 28 (8), 612-625.
- [40] Vilela C.L.S., Bassin J.P., Peixoto R.S.: Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. *Environ. Pollut.*, 2018, 235, 546-559.
- [41] Walsh J., Griffin B.T., Clarke G., Hyland N.P.: Drug-gut microbiota interactions: Implications for neuropharmacology. *Br. J. Pharmacol.*, 2018, 175 (24), 4415-4429.
- [42] Wang X., Yu H., Shan A., Jin Y., Fang H., Zhao Y., Shen J., Zhou C., Zhou Y., Fu Y., Wang J, Zhang J.: Toxic effects of zearalenone on intestinal microflora and intestinal mucosal immunity in mice. *Food Agric. Immunol.*, 29 (1), 1002-1011.

- [43] Wang Y., Rui M., Nie Y., Lu G.: Influence of gastrointestinal tract on metabolism of bisphenol A as determined by in vitro simulated system. *J. Hazard. Mater.*, 2018, 355, 111-118.
- [44] Xia J., Lu L., Jin C., Wang S., Zhou J., Ni Y., Fu Z., Jin Y.: Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, 2018, 209, 1-8.
- [45] Xu Y., Yu R.M.K., Zhang X., Murphy M.B., Giesy J.P., Lam M.H.W., Lam P.K.S., Wu R.S.S., Yu H.: Effects of PCBs and MeSO₂-PCBs on adrenocortical steroidogenesis in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Chemosphere*, 2006, 63 (5), 772-784.
- [46] Yanfei Li C., Dempsey J.L., Wang D., Lee S., Weigel K.M., Fei Q., Bhatt D.K., Prasad B., Raftery D., Gu H., Yue Cui J.: PBDEs altered gut microbiome and bile acid homeostasis in male C57BL/6 mice. *Drug Metab. Dispos.*, 2018, 46, 1226-1240.
- [47] Yu K., Li G., Feng W., Liu L., Zhang J., Wu W., Xu L., Yan Y.: Chlorpyrifos is estrogenic and alters embryonic hatching, cell proliferation and apoptosis in zebrafish. *Chem. Biol. Interact.*, 2015, 239, 26-33.
- [48] Zalko D., Soto A.M., Dolo L., Dorio C., Rathahao E., Debrauwer L., Faure R., Cravedi J.-P.: Bio-transformations of bisphenol A in a mammalian model: Answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health Perspect.*, 2003, 111 (3), 309-319.

INTERACTIONS OF ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS PRESENT IN FOOD WITH HUMAN INTESTINAL MICROBIOTA

S u m m a r y

Endocrine disrupting compounds (EDCs) belong to an inhomogeneous group of chemical compounds called xenobiotics, the characteristic feature of which is the acting on the hormonal system of humans and animals. EDCs include both the compounds of anthropogenic origin, such as: pesticides, compounds used in the plastic industry, heavy metals, polychlorinated biphenyls (PCBs), and naturally present in the environment mycotoxins and phytoestrogens. Owing to a broad range of the EDCs production, the human population is constantly exposed to them; their adverse effect on human health has been described in numerous publications. The primary pathway to cause the human exposure to EDCs is the consumption of contaminated food and water. After being introduced into the body, the EDCs affect not only the endocrinal system, but also the functioning of the intestinal microbiota, leading to dysbiosis and homeostasis dysfunctions of the host. On the other hand xenobiotics and their hepatic metabolites can undergo biotransformation reactions by intestinal microbiota that leads to changes in their properties, such as hormone balance, bioavailability and cytotoxicity. Moreover, the intestinal microbiota can modulate the expression of host genes that are responsible for the metabolism of xenobiotics. Therefore it is indispensable to understand the interactions between EDCs and intestinal microbiota in order to properly assess the safety level of those compounds in terms of human health.

Key words: endocrine disrupting compounds (EDCs), xenobiotics, intestinal microbiota, biotransformation 

JOANNA BUCKA-KOLENDO, BARBARA SOKOŁOWSKA

PORÓWNANIE METOD IDENTYFIKACJI BAKTERII *LACTOBACILLUS*

Streszczenie

Szerokie zastosowanie bakterii kwasu mlekowego (LAB) w różnych gałęziach przemysłu spożywczego, w biotechnologii i w medycynie powoduje, że właściwa identyfikacja i ocena ich zróżnicowania wewnątrzgatunkowego jest bardzo istotna. Dobór odpowiednich technik molekularnych analizy powinien uwzględniać dużą dokładność, powtarzalność i typowość metody.

Celem pracy była ocena możliwości różnicowania 12 szczepów *Lactobacillus* przy użyciu metod powszechnie stosowanych w laboratoriach: sekwencjonowania genu *16S* rDNA, genu *pheS* oraz MALDI-TOF MS. Na podstawie otrzymanych wyników analiz stwierdzono, że gen *pheS* w badanych szczepach charakteryzował się wysokim poziomem homologii (98 %) i niską siłą dyskryminacyjną. W dwóch niezależnych analizach MALDI-TOF MS uzyskano taki sam wynik dla 10 szczepów: siedmiu – *L. brevis* (DSM 6235, 102, 103, 489, 863, 975, 3/16/1), dwóch – *L. plantarum* (1178, 133) i jednego – *L. curvatus* 557. Po przeprowadzeniu analizy sekwencjonowania genu *16S* rDNA wyniki potwierdziły się natomiast tylko w odniesieniu do pięciu szczepów (DSM 6235, 3/16/1 i 489) z dwunastu przebadanych. Porównanie wyników było podstawą do wnioskowania, że dla wybranych szczepów LAB największą wartość różnicującą miała analiza bazująca na sekwencjonowaniu genu *16S* rDNA.

Słowa kluczowe: bakterie kwasu mlekowego, LAB, gen 16S rDNA, gen pheS, MALDI-TOF MS

Wprowadzenie

Bakterie kwasu mlekowego są grupą drobnoustrojów o bardzo dużym znaczeniu ekonomicznym z uwagi na ich szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym (kultury starterowe i kultury ochronne) oraz w medycynie i biotechnologii (probiotyki). Zastosowanie odpowiednich technik umożliwiających precyzyjne, szybkie i jednocześnie wydajne ekonomicznie analizy jest bardzo ważne i stanowi często istotę zróżnicowania bakterii i w dużej mierze decyduje o uzyskanym wyniku. Najczęściej stosowanymi metodami identyfikacji gatunków LAB są metody bazujące na genomice (*16S*, *pheS*, RAPD, rep-PCR, MLST, Real Time-PCR, DGGE/TGGE) i proteomice

Mgr inż. J. Bucka-Kolendo, dr hab. inż. Barbara Sokółowska, prof. IBPRS, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa. Kontakt: joanna.bucka@ibprs.pl

(MALDI-TOF MS, 2-DE) [1, 2, 3, 7, 11, 13, 14]. Dokonując wyboru techniki identyfikacji LAB, należy mieć na uwadze trzy kryteria: metoda musi charakteryzować się wystarczająco dużym potencjałem różnicującym, powtarzalnością oraz typowością, czyli możliwością zidentyfikowania na poziomie rodzaju, gatunku, a nawet szczepu. Powinna być również szybka i ekonomicznie opłacalna [14]. Przy wyborze metod związanych z genami konserwatywnymi trzeba uwzględniać takie czynniki, jak długość analizowanego odcinka genu oraz siła dyskryminująca genu, jak również to, że różne geny mogą dostarczać innych wyników filogenetycznych przypisujących szczepy do innego sąsiedztwa. Przez wiele lat analiza sekwencji genu *16S* rDNA była referencyjnym wyznacznikiem w określaniu filogenetycznego pokrewieństwa bakterii LAB. Stwierdzono jednak, że w przypadku blisko spokrewnionych gatunków LAB metoda ta ma zbyt małą rozdzielczość, a gen kodujący podjednostkę *16S* rRNA może wykazywać niewielki stopień polimorfizmu. Ponadto wysoki stopień zróżnicowania fenotypowego i genotypowego oraz zawartość par zasad G+C w zakresie 32 ÷ 54 % może nasręczać problemów w ich identyfikacji [8]. Z tego powodu poszukiwano innych genów konserwatywnych, które mogłyby posłużyć jako wiarygodne narzędzie różnicujące o dużej czułości. Taki gen powinien charakteryzować się powszechnością występowania w genomie bakteryjnym i powinien zawierać w sobie swoisty, zmienny region, który pozwoli na jednoznaczne zróżnicowanie gatunków/podgatunków [12].

Jedną z alternatyw sekwencjonowania genu *16S* jest analiza genu *pheS*, kodującego podjednostkę α -syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA). Analiza sekwencji genu *pheS* uznawana jest za wiarygodną metodę dyskryminującą [4, 8, 10] i jest obecnie powszechnie stosowanym narzędziem do identyfikacji bakterii LAB.

Pomimo dużych możliwości analizy genów konserwatywnych taksonomia tego rodzaju nie daje odpowiedzi na pytania dotyczące korelacji filogenetyki z właściwościami fizjologicznymi lub ekotypem [5]. Wprowadzane są dodatkowe techniki chemotaksonomiczne, jak MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), analizujące białka rybosomalne. W ostatnich latach nastąpił rozwój identyfikacji mikroorganizmów techniką MALDI-TOF MS, głównie pochodzenia klinicznego, ale również występujących w sektorze spożywczym. Metoda polegająca na analizie „odcisku palca” białek rybosomalnych, charakterystycznych dla danej rodziny, rodzaju, gatunku, a nawet dla poszczególnych szczepów, umożliwia identyfikację profili widm masowych badanych szczepów poprzez porównanie ich z biblioteką zawierającą referencyjne widma odniesienia. W odróżnieniu od technik genomowych, w których analizowane sekwencje są przyrównywane w ciągle rozbudowywanej i aktualizowanej, światowej bazie danych NCBI BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*), w technice MALDI-TOF MS identyfikacja mikroorganizmów odbywa się przy użyciu wewnętrznych baz przynależnych do danego urządzenia i ewentualnie rozbudowywanych o nowe profile widm maso-

wych na potrzeby danego laboratorium. Ograniczenia w identyfikacji MALDI-TOF MS blisko spokrewnionych gatunków, jak w przypadku LAB, mogą wynikać z braku referencyjnych widm masowych w bazie danych przynależnej do aparatu, z błędów technicznych powstałych podczas przygotowania próbki do analizy lub z różnych warunków hodowlanych, które mogą oddziaływać na wynik analizy [1]. Takie ograniczenia mogą stanowić dużą przeszkodę we właściwej identyfikacji mikroorganizmów, szczególnie nowych, niewystępujących w danej bazie danych.

Celem pracy była ocena możliwości różnicowania 12 szczepów *Lactobacillus* przy użyciu metod powszechnie stosowanych w laboratoriach: sekwencjonowania genu *16S* rDNA, genu *pheS* oraz MALDI-TOF MS.

Material i metody badań

Badaniom poddano 12 szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności, w tym jeden szczep pochodzący z kolekcji DSMZ – tab. 1. Zgodnie z nową nomenklaturą [15] bakterie kwasu mlekowego zreklasyfikowano na podstawie najnowszych danych genetycznych i filogenetycznych.

Tabela 1. Taksonomia analizowanych szczepów LAB według *16S* rDNA i nowej nomenklatury
Table 1. Taxonomy of analysed LAB strains according to *16S* rDNA and new nomenclature

Szczep Strain	Źródło / Source	Identyfikacja wg <i>16S</i> rDNA <i>16S</i> rDNA identification	Nowa nomenklatura New nomenclature
1178	Chleb / Bread	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
975	Sok pomidorowy Tomato juice	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
863	Sok pomidorowy Tomato juice	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
DSM 6235	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
102	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
103	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
133	Probiotyk / Probiotic	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
3/16/1	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
432	Sok z kiszonych ogórków Sauerkraft juice	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
489	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
557	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
738	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus rossiae</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>

Bakterie kwasu mlekowego izolowano z produktów spożywczych zgodnie z procedurą PN-ISO 15214:2002 [9]. W zależności od potrzeb LAB posiewano na pożywkę MRS agar (*Lactobacillus* Agar według DeMan, Rogosa i Sharpe, Merck KGaA, Niemcy) lub do pożywki MRS bulion (Merck KGaA, Niemcy) i inkubowano w temp. 30 °C przez 72 h w warunkach anaerobowych.

Zastosowano trzy rodzaje analiz (sekwencjonowanie genu *16S*, *pheS* oraz MALDI-TOF MS) w celu porównania możliwości różnicujących każdej z metod.

Do izolacji DNA z 18-godzinnych hodowli płynnych badanych szczepów używano zestawu ExtractMe DNA Bacteria Kit (Blirt, Gdańsk, Polska) zgodnie z instrukcją producenta. Sekwencjonowanie genu *16S* rDNA prowadzono z wykorzystaniem primerów 16SF: 5'-AGACTTTGATCCTGGCTCAG-3' i 16SR: 5'-ACGGCTACCTGTTACGACT-3' amplifikujących prawie całą sekwencję genu o długości ok. 1500 bp. Warunki przeprowadzonej reakcji opisano w pracy Buckiej-Kolendo i wsp. [3].

Analizę genu *pheS* prowadzono z wykorzystaniem primerów pheS-21-F: 5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3' i pheS-22-R: 5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3' w warunkach podanych przez Nasera i wsp. [7].

Na podstawie wyników sekwencjonowania genu *16S* rDNA i *pheS* badanych szczepów *Lactobacillus* przeprowadzono analizę filogenetyczną z zastosowaniem algorytmu CLUSTAL W. Przy użyciu programu MEGAX [6] dokonywano alignmentu sekwencji i konstruowano na ich podstawie drzewa z wykorzystaniem analizy Neighbor-Joining z odległościami obliczonymi metodą największej wiarygodności. Odległości ewolucyjne obliczano przy użyciu metody największej złożonej wiarygodności. Zostały one podane w jednostkach liczby podstawień zasad przypadających na miejsce. Ostateczny zbiór danych zawierał łącznie 1480 pozycji dla genu *16S* DNA oraz 390 pozycji dla *pheS*. Różnorodność nukleotydów badanych sekwencji była odpowiednio na poziomie $\pi = 0,86$ i $0,16$.

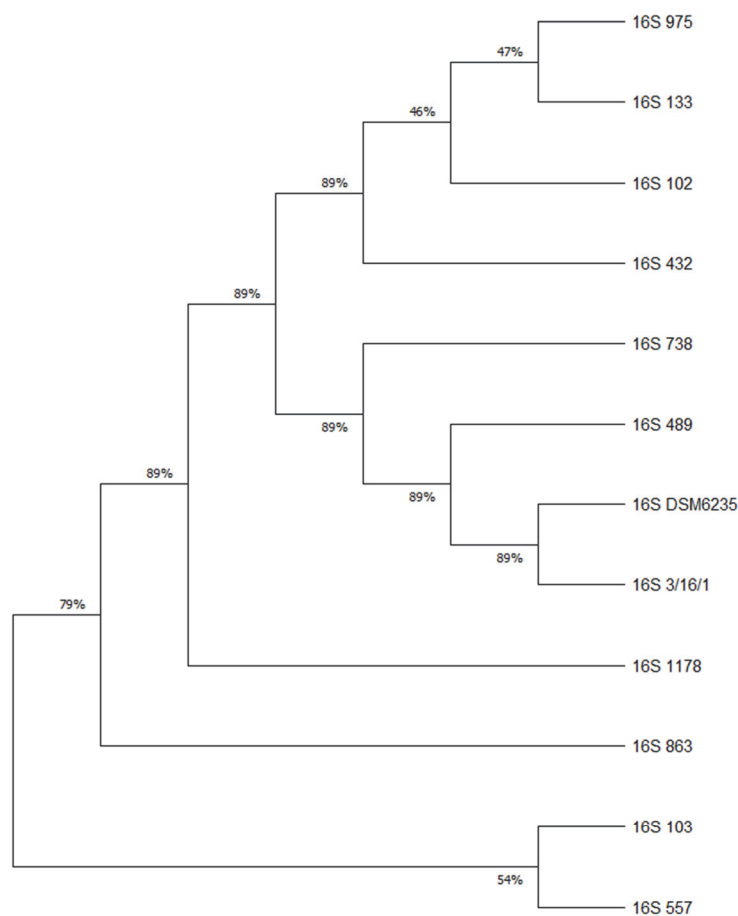
Analizę MALDI-TOF MS wykonywano przy użyciu dwóch niezależnych aparatów Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Niemcy), każdy z własną bazą danych. Do badań stosowano 18-godzinne hodowle LAB w warunkach przedstawionych przez Bucką-Kolendo i wsp. [3]. W obu przypadkach jako matrycę stosowano HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid). Analizę widm masowych przeprowadzono w programie BioNumerics 7.6.3 (Applied Maths). Wykonano po trzy powtórzenia widm wszystkich badanych szczepów.

Hierarchiczną analizę skupień widm MALDI-TOF MS prowadzono na podstawie macierzy podobieństw obliczonej z zastosowaniem współczynnika Pearsona. Profile widm masowych tworzono w odniesieniu do ich sygnałów i intensywności otrzymanych pików. Alignment i grupowanie prowadzono z tolerancją liniową 300 ppm i stałą tolerancją 0,5. Wyniki uzyskane techniką MALDI-TOF MS poddano analizie wielowymiarowego skalowania profili widm masowych (MDS – *Multi Dimensional Scaling*), która jest uważana za alternatywę analizy czynnikowej.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie badań filogenetycznych, mających na celu ustalenie wzajemnego pokrewieństwa szczepów *Lactobacillus*, przeprowadzonych metodą analizy sekwencji

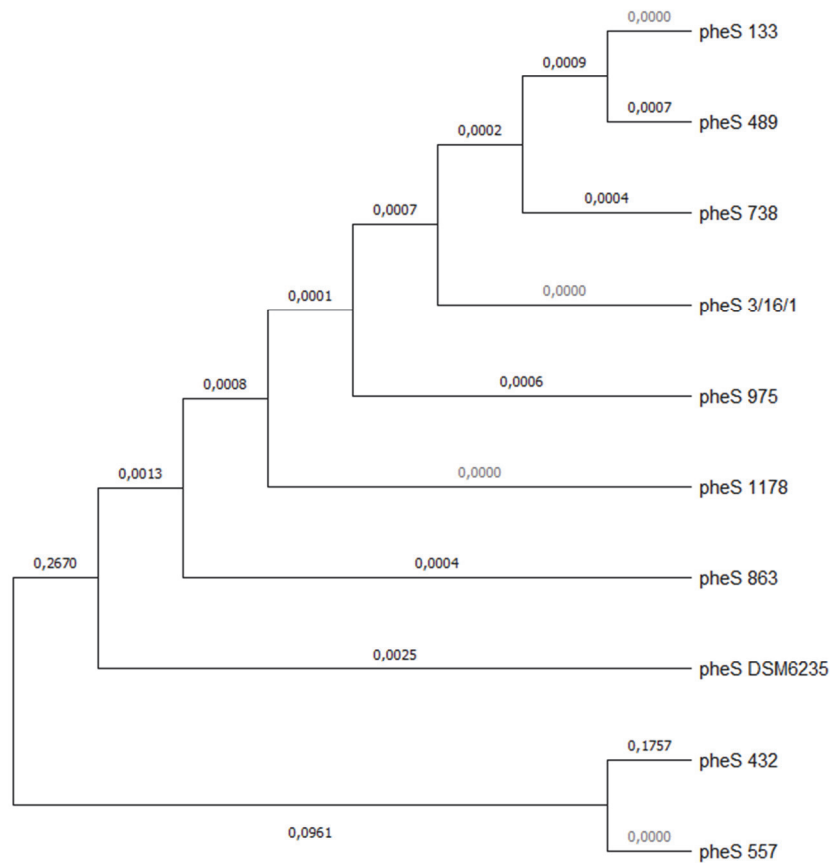
genów *16S* i *pheS*, wykazano, że gen *16S* miał większy potencjał różnicujący. Podobieństwo analizowanych sekwencji genu *16S* rDNA (rys. 1) było na poziomie 89 % dla 10 szczepów, homologia 2 szczepów (*L. backii* 103 i *L. brevis* 557) stanowiła mniej niż 79 % w stosunku do pozostałych i zostały one ujęte w oddzielny klaster. Otrzymana różnorodność nukleotydowa sekwencji była na poziomie $\pi = 0,86$. Wyniki nie korelowały z wynikami identyfikacji bakterii bazującej na sekwencjonowaniu genu *16S* rDNA.



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie analizy sekwencji genu *16S* rDNA przedstawiające relacje pokrewieństwa badanych szczepów (suma długości gałęzi = 3,25666995)

Fig. 1. Phylogenetic tree build on the basis of sequence analysis of the *16S* rDNA gene and representing evolutionary relationships of taxa tested (total of branch lengths = 3.25666995)

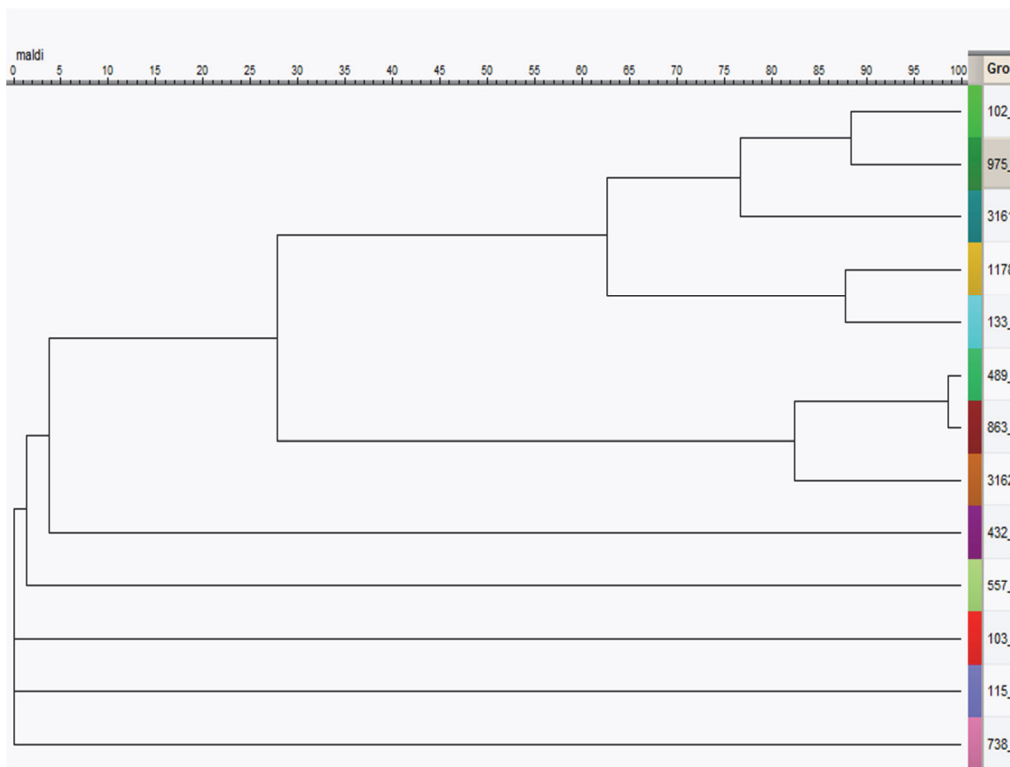
Drzewo filogenetyczne sekwencji genu *pheS* (rys. 2) podzielono na dwa klastry. Jeden klaster zawierał 8 szczepów z homologią na poziomie 90 ÷ 98 %, a drugi – z 2 szczepami: 557 i 432, których podobieństwo wynosiło poniżej 90 %. W przypadku 2 szczepów: 102 i 103 nie udało się otrzymać sekwencji genu *pheS*. Różnorodność nukleotydowa π była na poziomie 0,16. Uzyskane wyniki korelują z wynikami identyfikacji bakterii na podstawie sekwencji genu *pheS*, w której 8 szczepów (DSM 6235, 1178, 975, 863, 738, 489, 133, 3/16/1) scharakteryzowano jako *L. plantarum*, a 2 szczepy (557 i 432) – jako *L. brevis*.



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie analizy sekwencji genu *pheS* przedstawiające relacje pokrewieństwa badanych szczepów (suma długości gałęzi = 0,54758904)

Fig. 2. Phylogenetic tree build on the basis of sequence analysis of the *pheS* gene and representing evolutionary relationships of taxa tested (total of branch lengths = 0.54758904)

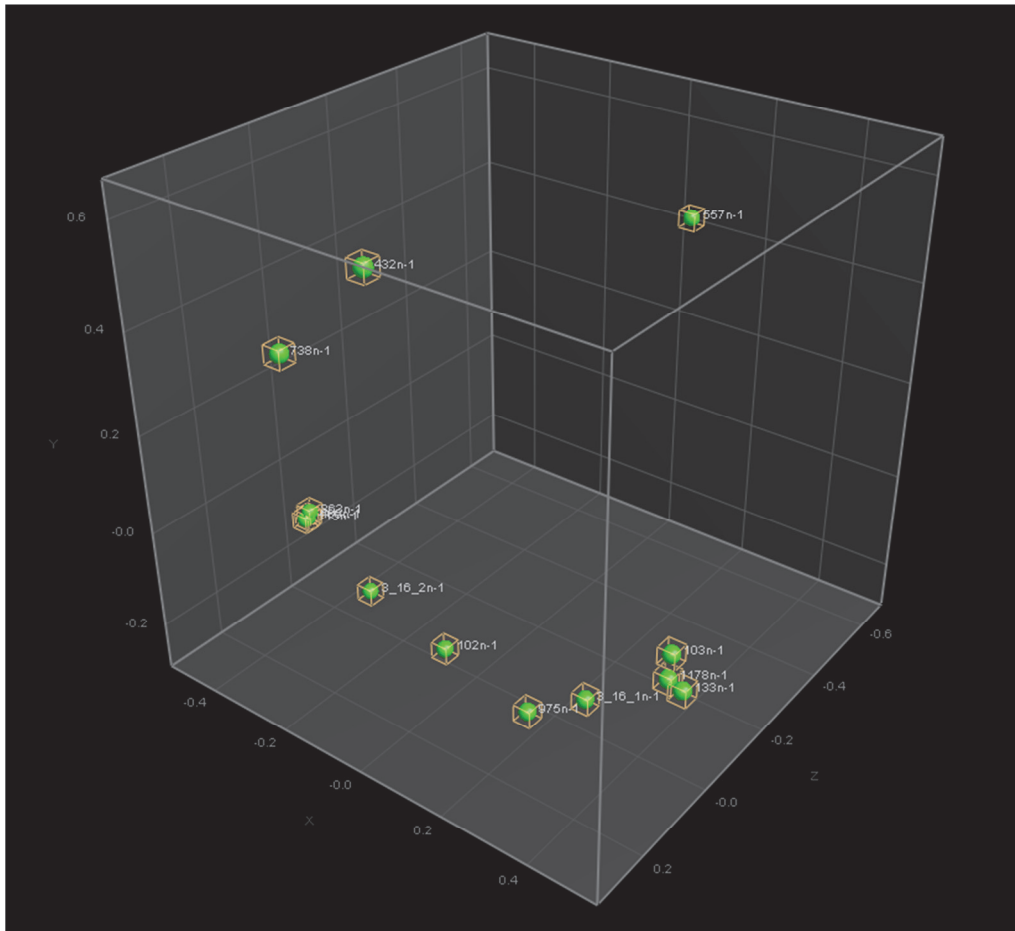
W celach porównawczych stopnia identyfikacji techniką MALDI-TOF MS z analizą sekwencji *16S* rDNA i genu *pheS* wykonano dendrogram profili widm masowych (rys. 3). Analizę przeprowadzono metodą UPGMA. W analizie profili widm masowych (MSP) względną odległość między odkształceniami przedstawia się w jednostkach arbitralnych, gdzie 100 oznacza całkowite podobieństwo, a 0 oznacza minimalne podobieństwo.



Rys. 3. Dendrogram skupień widm MALDI-TOF MS badanych szczepów LAB (barwy odpowiadają szczepom)

Fig. 3. Cluster dendrogram of MALDI-TOF MS spectra of LAB strains tested (colours represent strains)

W wyniku rozmieszczenia badanych szczepów jako punktów w przestrzeni n-wymiarowej zaobserwowano rozłożenie podobieństw i różnic pomiędzy badanymi szczepami LAB (rys. 4). Rozłożenie korelowało z hierarchiczną analizą skupień widm masowych.



Rys. 4. Analiza MDS. Skalowanie wielowymiarowe profili mas (MS) uzyskanych analizą MALDI-TOF, określające podobieństwa i różnice pomiędzy badanymi szczepami *Lactobacillus*

Fig. 4. MDS analysis. Multidimensional scaling of mass spectra (MS) profiles obtained using MALDI-TOF analysis and showing similarities and differences between analysed *Lactobacillus* strains

W analizie klastrow zidentyfikowanych na podstawie sekwencji genów *16S* rDNA i *pheS* zaobserwowano, że gen *pheS* w badanych szczepach charakteryzował się wysokim stopniem konserwatywności i niskim potencjałem różnicującym. Analizą sekwencji *pheS* dowiedziono, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mają duże pokrewieństwo tego genu, co może wskazywać na niewielkie możliwości jego zastosowania jako wiarygodnego i czułego narzędzia do różnicowania. Tylko w przypadku 3 szczepów w obu metodach uzyskano ten sam wynik identyfikacji (*L. plantarum* 1178, *L. plantarum* 867 i *L. brevis* 557). Spośród metod molekularnych analiza genu *16S* rDNA umożliwiła uwidocznienie większej różnorodności badanych szczepów w porównaniu

z analizą *pheS* (tab. 2), co potwierdzono również w analizie różnorodności nukleotydowej badanych sekwencji, w której współczynnik π był wyższy dla genu *16S* rDNA (0,86) niż dla genu *pheS* (0,16). Po przeprowadzeniu analizy *16S* rDNA zidentyfikowano 4 szczepy *L. brevis* (DSM 6235, 557, 489, 3/16/1), po 2 szczepy *L. plantarum* (1178, 863), *L. rhamnosus* (975, 115), *L. backii* (102, 103) i po jednym – *L. curvatus* (432) i *L. rossiae* (738). W analizie genu *pheS* zróżnicowanie szczepów było znacznie mniejsze. Otrzymano 8 szczepów *L. plantarum* (DSM 6235, 1178, 975, 863, 738, 489, 133, 3/16/1) i 2 szczepy *L. brevis* (557, 432). W przypadku 2 szczepów scharakteryzowanych jako *L. backii*, w analizie *16S* rDNA nie udało się uzyskać sekwencji *pheS*. Stwierdzono, że badaniem sekwencji *16S* rDNA uzyskuje się większe możliwości różnicujące.

W identyfikacji metodą MALDI-TOF MS, w obu analizach, uzyskano taki sam wynik dla 10 z 12 szczepów: 7 – *L. brevis* (DSM 6235, 102, 103, 489, 863, 975, 3/16/1), 2 – *L. plantarum* (1178, 133) i 1 – *L. curvatus*. W przypadku szczepów 432 i 738 otrzymano różną identyfikację.

Identyfikacja wybranych bakterii kwasu mlekowego metodami molekularnymi i porównanie ich z metodą MALDI-TOF MS doprowadziły do wniosku, że wyniki wszystkich metod pokrywały się tylko w przypadku jednego szczepu *L. plantarum* 1178. Dla porównania taką samą identyfikację z użyciem genu *16S* rDNA i MALDI-TOF MS uzyskano dla 5 szczepów, w tym 3 szczepów *L. brevis* (DSM 6235, 3/16/1 i 489), jednego szczepu *L. plantarum* 1178 i szczepu *F. rossiae* 738, ale w przypadku MALDI-TOF MS tylko z pierwszej analizy. W wyniku porównania metod z wykorzystaniem sekwencjonowania genu *pheS* i MALDI-TOF MS uzyskano taki sam wynik (w obu metodach) w przypadku szczepów 1178 i 133 i zidentyfikowano je jako *L. plantarum*, a w przypadku pierwszej analizy MALDI-TOF MS scharakteryzowano szczep 432 jako *L. brevis*.

Jak podają Naser i wsp. [8], analiza różnicowania blisko spokrewnionych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na podstawie genu *pheS* stanowi wiarygodną, alternatywną metodę dla genu *16S* rDNA. W badaniach własnych wykazano jednak, że identyfikacja szczepów LAB z zastosowaniem sekwencjonowania genu *pheS* była mało zróżnicowana, a w analizie porównawczej odnotowano wysoki poziom homologii tego genu w badanych szczepach (98 %). Podobne wyniki uzyskali wcześniej Naser i wsp. [7] w badaniach nad identyfikacją bakterii z gatunku *Enterococcus*. Zaobserwowali oni, że gen *pheS* miał wysoki stopień homogeniczności wśród badanych szczepów. Podobieństwo sekwencji genu *pheS* w szczepach *Enterococcus* wynosiło 97 %, co wskazywało na niską moc dyskryminacyjną tego genu przy zastosowaniu do różnicowania wewnątrzgatunkowego. Sanches-Juanes i wsp. [10] stwierdzili, że identyfikacja bakterii kwasu mlekowego z użyciem genu *pheS* oraz metoda MALDI-TOF MS są wiarygodnymi technikami identyfikacji tych bakterii i mają dużą siłę dyskryminacyjną. Obie

Tabela 2. Wyniki identyfikacji bakterii kwasu mlekowego z zastosowaniem metod sekwencjonowania genu *16S* rDNA, genu *pheS* i techniki MALDI-TOF MSTable 2. Identification results of lactic acid bacteria using *16S* rDNA and *pheS* gene sequencing methods and MALDI-TOF MS technique

Szczep Strain	Analiza <i>16S</i> rDNA <i>16S</i> rDNA analysis	Analiza genu <i>pheS</i> Gene <i>pheS</i> analysis	Analiza MALDI-TOF MS MALDI-TOF MS analysis	
			I	II
1178	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
975	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
863	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
DSM 6235	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
102	<i>Levitlactobacillus backii</i>	NR	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
103	<i>Levitlactobacillus backii</i>	NR	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
133	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
3/16/1	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
432	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
489	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
557	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
738	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>

Objaśnienie / Explanatory note:
NR – brak wyników / no results.

techniki umożliwiły autorom przypisanie bakterii do właściwego rodzaju i gatunku. W przypadku badań własnych takie same wyniki otrzymano dla dwóch z 12 szczepów zidentyfikowanych jako *L. plantarum* (1178, 133), z czego tylko jeden szczep 1178 został potwierdzony jako *L. plantarum* również w analizie *16S* rDNA oraz dla szczepu 432 w jednej analizie MALDI-TOF MS, w której został on przypisany do *L. brevis*. W identyfikacji bakterii metodą MALDI-TOF MS kluczowa jest zasobność bazy danych urządzenia w widma masowe, gdyż w dużej mierze od niej zależy właściwe scharakteryzowanie mikroorganizmu. Porównanie wyników identyfikacji przy użyciu dwóch urządzeń, ale zawierających różne biblioteki danych, dowodzi, że w niektórych przypadkach identyfikacja może się różnić (szczep 432, 738).

Wnioski

1. Przy doborze metod różnicujących i identyfikujących szczepy bakterii kwasu mlekowego stwierdzono, że sekwencjonowanie genu *16S* rDNA umożliwiło większe zróżnicowanie bakterii w porównaniu z analizą genu *pheS*, który charakteryzował się większą homologią, a przez to miał znacznie mniejszy potencjał różnicujący.
2. Wartość współczynnika różnorodności nukleotydowej (π) sekwencji potwierdziła większą homologię w obrębie genu *pheS* w stosunku do genu *16S* rDNA.
3. Analizą nukleotydową badanych sekwencji nie wykazano korelacji z analizami filogenetycznymi.
4. Stwierdzono, że możliwości dyskryminacyjne MALDI-TOF MS są porównywalne do innych stosowanych procedur identyfikacyjnych. Metoda ta nadaje się do rutynowego stosowania dzięki szybkości, precyzji i prostocie przygotowania próbki.
5. Uznano, że przy identyfikacji bakterii metodą MALDI-TOF MS duże znaczenie miała biblioteka referencyjnych widm masowych, do której analizowane szczepy były porównywane.

Literatura

- [1] Akimowicz M., Bucka-Kolendo J.: MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta Biochimica Polonica*, 2020, (3) 67, 327-332.
- [2] Berg G., Rybakova D., Fischer D., Cernava T., Verges M.-C.C., Charles T., Chen X., Cocolin L., Eversole K., Corral G.H., Kazou M., Kinkel L., Lange L., Lima N., Loy A., Macklin J.A., Maguin E., Mauchline T., McClure R., Mitter B., Rayan M., Sarand I., Smidt H., Schelkle B., Roume H., Kira G.S., Selvin J., de Souza R.S.C., van Overbeek L., Singh B.K., Wagner M., Walsh M., Sessitsch A., Schloter M.: Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 2020, 8, #103.
- [3] Bucka-Kolendo J., Sokołowska B., Winiarczyk S.: Influence of high hydrostatic pressure on the identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS – Preliminary study. *Microorganisms*, 2020, 8 (6), #813.
- [4] Chao S.-H., Kudo Y., Tsai Y.-Ch., Watanabe K.: *Lactobacillus futsaii* sp. nov., isolated from fu-tsai and suan-tsai, traditional Taiwanese fermented mustard products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, 62 (3), 489-494.
- [5] Foschi C., Laghi L., Parolin C., Giordani B., Compri M., Cevenini R., Margangoni A., Vitali B.: Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and H-NMR. *PLoS ONE*, 2017, 12(2), #e0172483.
- [6] Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, 35, 1547-1549.
- [7] Naser S., Thompson F., Hoste B., Gevers D., Dawyndt P., Vancanneyt M., Swings J.: Application of multilocus sequences analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 2005, 151, 2141-2150.


- [8] Naser S., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J.: Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57, 2777-2789.
- [9] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 stopni C.
- [10] Sánchez-Juanes F., Teixeira-Martín V., González-Buitrago J.M., Velázquez E., Flores-Félix J.D.: Identification of species and subspecies of lactic acid bacteria present in Spanish cheeses type “Torta” by MALDI-TOF MS and *pheS* gene analyses. *Microorganisms*, 2020, 8(2), #301.
- [11] Sharma A., Lee S., Park Y.-S.: Molecular typing tools for identification and characterizing lactic acid bacteria: A review. *Food Sci. Biotechnol.*, 2020, 29(10), 1301-1318.
- [12] Stackebrandt E., Fredriksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maidem M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B.: Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, 52, 1043-1047.
- [13] Stefańska I., Stecka K.: Postępy w identyfikacji i różnicowaniu bakterii fermentacji mlekowej. Część I. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 2012, 67 (3), 35-51.
- [14] Stefańska I., Stecka K.: Postępy w identyfikacji i różnicowaniu bakterii fermentacji mlekowej. Część II. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 2012, 67 (4), 49-66.
- [15] Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Tolle P.W., Pot W., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G.E., Ganzle M.G., Lebeer S.: A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description on 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020, 70, 2782-2858.

COMPARISON OF *LACTOBACILLUS* IDENTIFICATION METHODS

S u m m a r y

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in various sectors of food industry, in biotechnology and in medicine, therefore it is very important to properly identify them and to correctly assess their intra-species differentiation. The selection of appropriate molecular analysis techniques should take into account the high accuracy, repeatability and typability of the method.

The objective of the research study was to assess the possibility of differentiating 12 *Lactobacillus* strains with the use of techniques commonly applied in laboratories: the sequencing of the *16S* rDNA gene, *pheS* gene and MALDI-TOF MS. Based on the analysis results obtained, it was found that in the tested strains the *pheS* gene was characterised by a high level of homology (98 %) and a low discriminant power. In the two independent MALDI-TOF MS analyses the same result was obtained for 10 strains: seven – *L. brevis* (DSM 6235, 102, 103, 489, 863, 975, 3/16/1), two – *L. plantarum* (1178, 133) and one – *L. curvatus* 557. After the performed sequencing analysis of the *16S* rDNA gene the findings were confirmed only in the case of five (DSM 6235, 3/16/1 and 489) of the twelve strains tested. The comparison of the results obtained made it possible to conclude that as for the selected LAB strains the highest differentiating value had the analysis based on the sequencing of the *16S* rDNA gene.

Key words: lactic acid bacteria, LAB, gene *16S* rDNA, gene *pheS*, MALDI-TOF MS 

DZIYANA SHYMIALEVICH, MICHAŁ WÓJCICKI, STANISŁAW BŁAŻEJAK

WYKORZYSTANIE FAGÓW LITYCZNYCH DO OGRANICZANIA LICZBY PAŁECZEK *SALMONELLA* W ROŚLINNEJ MATRYCY ŻYWNOŚCIOWEJ

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań była izolacja bakteriofagów ze ścieków komunalnych oraz określenie skuteczności ich stosowania jako środka eliminacji wybranych serowarów bakterii z rodzaju *Salmonella* z żywności minimalnie przetworzonej. Roślinną matrycę żywnościową stanowiły kiełki rzodkiewki.

Wyizolowano cztery bakteriofagi specyficzne wobec bakterii z rodzaju *Salmonella*. Określono ich aktywność lityczną, morfologię z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) oraz tolerancję na wybrane czynniki środowiskowe (temperaturę oraz pH). Przygotowany koktajl fagowy zaaplikowano przy użyciu metod natrysku oraz wkładki absorpcyjnej do kiełków rzodkiewki wcześniej zainfekowanych bakteriami z rodzaju *Salmonella*. Wszystkie wyizolowane fagi skutecznie skróciły fazę logarytmicznego wzrostu badanych szczepów. Bakteriofagi charakteryzowały się złożoną budową. Na podstawie analizy morfologicznej zostały sklasyfikowane do rzędu *Caudovirales*. Wrażliwość fagów na czynniki środowiskowe jest cechą indywidualną, a przy projektowaniu preparatu bakteriofagowego należy dobierać fagi o stabilnych cechach i szerokim zakresie tolerancji na czynniki zewnętrzne. Wykazano, że temperatura silniej oddziaływała na zahamowanie aktywności litycznej badanych fagów aniżeli kwasowość czynnika środowiska. Najwyższą redukcję liczby pałeczek *Salmonella*, na poziomie 99 % w porównaniu z próbkami kontrolnymi, uzyskano po zastosowaniu wkładki absorpcyjnej zawierającej koktajl fagowy.

Przeprowadzone badania potwierdzają skuteczność fagów w zapewnianiu bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności minimalnie przetworzonej. Pomimo braku unijnych przepisów prawnych dotyczących preparatów bazujących na bakteriofagach litycznych, w przyszłości mogą one stać się jedną z biologicznych metod zwiększających bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności o minimalnym stopniu przetworzenia. Będą mogły być również skutecznym środkiem dezynfekującym przeznaczonym do czyszczenia sprzętu produkcyjnego.

Słowa kluczowe: bakteriofagi (fagi), cykl lityczny, *Salmonella*, żywność minimalnie przetworzona, kiełki, utrwalanie żywności

Inż. D. Shymialewich, prof. dr hab. inż. S. Błażej, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Instytut Nauki o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, inż. D. Shymialewich, mgr inż. M. Wójcicki, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa. Kontakt: michal.wojcicki@ibprs.pl

Wprowadzenie

Produkcja żywności minimalnie przetworzonej ogranicza się do zastosowania nowoczesnych, niskoenergetycznych metod utrwalania surowca [19]. Pod pojęciem żywności minimalnie przetworzonej należy rozumieć produkty otrzymane z wykorzystaniem ograniczonej liczby zabiegów technologicznych, które gwarantują bezpieczeństwo mikrobiologiczne, lecz mogą wpływać na cechy sensoryczne [19, 30]. Spośród szerokiej gamy produktów pochodzenia roślinnego o minimalnym stopniu przetworzenia, których dotyczy najwyższe ryzyko zanieczyszczenia mikrobiologicznego, można wymienić kiełki, mieszanki sałat oraz soki niepasteryzowane.

Bakterie z rodzaju *Salmonella* to Gram-ujemne, względnie beztlenowe pałeczki, które nie wytwarzają przetrwalników. Należą do rodziny *Enterobacteriaceae* i są wskaźnikiem jakości mikrobiologicznej żywności [6]. Rodzaj ten obejmuje dwa gatunki: *Salmonella enterica* oraz *Salmonella bongori*. Pierwszy z nich obejmuje sześć podgatunków, których serotypy różnią się między sobą strukturą wiciową i somatyczną. Dotychczas opisano ponad 2600 różnych serotypów *S. enterica* [4, 13]. Głównym źródłem pałeczek *Salmonella* są zwierzęta, w tym drób, świnie i bydło. Bakterie *Salmonella* są jednym z najczęściej izolowanych patogenów przenoszonych przez żywność [4, 11, 13, 24]. Rocznie odnotowuje się 93,8 mln przypadków zachorowań spowodowanych spożyciem zanieczyszczonej żywności, z czego 155 tysięcy kończy się zgonem pacjentów [4]. Do chorób związanych z zakażeniem *S. enterica* zalicza się dur brzuszny wywołany przez *Salmonella* Typhi, zakażenia ogólnoustrojowe (paradury) wywołane przez *Salmonella* Paratyphi oraz zapalenie jelit, zwane salmonellozą, związane z wieloma serotypami (np. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* czy *S. Agona*) [4, 6]. Serowary duru brzuszego powodują choroby inwazyjne wśród ludzi, natomiast serowary niedurowe wywołują choroby również u zwierząt [32]. Patogenność serowarów *S. enterica* może być specyficzna dla wielu żywicieli (np. *S. Typhimurium*) lub ograniczona do jednego gospodarza (np. *S. Typhi*), a przebieg infekcji wywołany przez ten sam serowar jest zróżnicowany w zależności od gospodarza. Przykładowo serowar *S. Typhimurium* infekuje szeroką gamę żywicieli, zarówno ludzi, jak i zwierząt, a także różne typy komórek gospodarza, w tym makrofagi i komórki niefagocytarne, takie jak enterocyty nabłonka jelitowego [24].

Jedną z metod utrwalania żywności jest wykorzystanie bakteriofagów – wirusów, których cykl replikacyjny odbywa się w komórkach bakteryjnych. Wykorzystanie bakteriofagów jako biologicznej metody eliminacji bakteryjnych patogenów żywności jest stosunkowo nową koncepcją utrwalania żywności. Na świecie dostępny jest szereg komercyjnych preparatów bakteriofagowych przeznaczonych dla przemysłu spożywczego [33]. Wykorzystanie bakteriofagów umożliwia regulację zanieczyszczenia opornymi szczepami bakterii (np. tworzącymi biofilm bakteryjny). Fagi mogą rozwijać się jedynie w komórkach bakteryjnych, zatem nie oddziałują na komórki człowieka. Dzię-

ki szczepowej specyficzności nie niszczą naturalnej mikroflory jelitowej ludzi i zwierząt [10, 22, 33]. W preparatach bakteriofagowych stosowane są jedynie fagi lityczne, co zapobiega nabywaniu przez bakterie oporności oraz horyzontalnemu transferowi genów [18, 33].

Wymagania konsumentów związane z przetwórstwem żywności i dążenie producentów do produkcji mało przetworzonych produktów powodują konieczność poszukiwania przez nich nowych rozwiązań zapewniania jakości. Dąży się do produkcji żywności o minimalnym stopniu przetworzenia, a przy tym w pełni bezpiecznej mikrobiologicznie [19, 30]. Komercyjne preparaty bakteriofagowe nie są zatwierdzone w UE, w tym w Polsce, do stosowania w przemyśle rolno-spożywczym. W ośrodkach naukowych na świecie prowadzi się jednak intensywne badania nad skutecznością ich stosowania [23].

Celem przeprowadzonych badań była izolacja bakteriofagów ze ścieków komunalnych oraz określenie skuteczności ich stosowania jako środka eliminacji wybranych serowarów bakterii z rodzaju *Salmonella* z żywności minimalnie przetworzonej na przykładzie kiełków rzodkiewki.

Material i metody badań

Szczepy pałeczek z rodzaju *Salmonella* pochodziły z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych Zakładu Mikrobiologii IBPRS-PIB. W badaniach użyto czterech serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*: *S. Virchow* (KKP 997), *S. Itami* (KKP 1001), *S. Enteritidis* (KKP 3078) oraz *S. Typhimurium* (KKP 3079). Źródło fagów stanowił ściek komunalny pozyskany z Gminnego Przedsiębiorstwa Wodociągów i Kanalizacji „Mokre Łąki” w Izabelinie k. Warszawy. Badania mikrobiologiczne przeprowadzono na dostępnych na polskim rynku kiełkach rzodkiewki.

Poszukiwano specyficznych bakteriofagów wobec wymienionych wyżej serowarów *Salmonella*. Namnażanie i izolację fagów prowadzono metodą płytek dwuwarstwowych [1, 5], następnie łysinki fagowe wycinano za pomocą skalpela i oczyszczano w buforze SM [17]. Kinetykę wzrostu badanych szczepów *Salmonella* infekowanych fagami sprawdzano metodą, którą zaproponowali Islam i wsp. [7] z użyciem automatycznego analizatora wzrostu Bioscreen C (Yo AB Ltd, Growth Curves, Finlandia). Przyjęto współczynnik infekcji MOI = 1,0, a pomiar wykonano w dziesięciu powtórzeniach. Na podstawie krzywych wzrostu bakterii wyznaczono współczynniki właściwej szybkości wzrostu (μ) z równania:

$$\mu = \frac{\ln OD_{max} - \ln OD_{min}}{t}$$

gdzie:

$\ln OD_{\max}$ – logarytm naturalny z wartości maksymalnej gęstości optycznej hodowli podczas wykładniczego wzrostu,

$\ln OD_{\min}$ – logarytm naturalny z wartości minimalnej gęstości optycznej hodowli podczas wykładniczego wzrostu,

t – czas trwania fazy wzrostu wykładniczego hodowli [h].

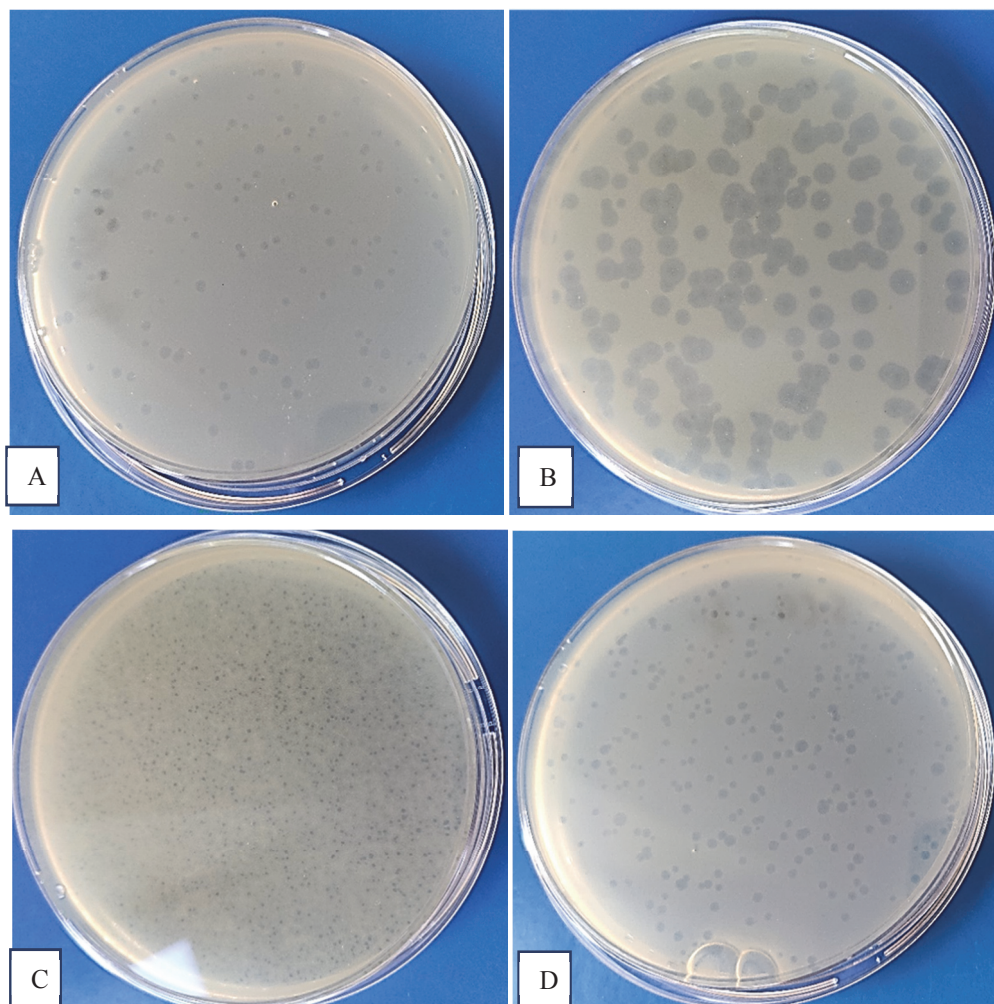
Do określania morfologii wyizolowanych bakteriofagów zastosowano transmisyjny mikroskop elektronowy (JEOL JEM-1220, USA). Preparaty przygotowywano na siateczkach miedziowo-wolframowych napyłanych węglem i wybarwiano 2-procentowym roztworem kwasu fosforowolframowego [26]. Badano wpływ temperatury i pH na zachowanie aktywności litycznej fagów. Zdolność do lizy komórek bakteryjnych gospodarzy po godzinnym termostataowaniu w zmiennych warunkach temperatury i kwasowości czynnej sprawdzano metodą płytek dwuwarstwowych [25], w trzech powtórzeniach.

Przygotowany koktajl fagowy (o mianie $1,9 \cdot 10^8$ PFU \cdot ml $^{-1}$), zawierający wszystkie cztery wyizolowane bakteriofagi, stosowano do sprawdzenia możliwości zahamowania wzrostu badanych serowarów *Salmonella* w roślinnej matrycy żywnościowej. W tym celu 15 g kiełków rzodkiewki pobranych bezpośrednio z opakowania jednostkowego kontaminowano patogennym szczepem bakterii do poziomu 10^7 jtk \cdot g $^{-1}$ i do próbek wprowadzano, przy użyciu wkładki absorpcyjnej lub natrysku, mieszaninę fagów. Produkt pakowano w folię ochronną, zgrzewano w atmosferze normalnej (MULTIVAC C200, USA) i przechowywano w temp. 20 °C przez 6 dni. Każdy wariant pakowano w trzy niezależne opakowania. W kolejnych dniach przechowywania (1, 4 i 6) określano liczbę pałeczek *Salmonella* metodą posiewów na podłoża diagnostyczne XLD (BTL, Polska) oraz Hektoena (BTL, Polska).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie Statistica 13.1. Do oceny aktywności litycznej bakteriofagów przy zastosowaniu zmiennych warunków pH oraz temperatury zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test Tukeya ($p < 0,05$). Wpływ czasu przechowywania i sposobu aplikacji koktajlu fagowego na jakość mikrobiologiczną kiełków określono z zastosowaniem dwuczynnikowej analizy wariancji z interakcją ($p < 0,05$).

Wyniki i dyskusja

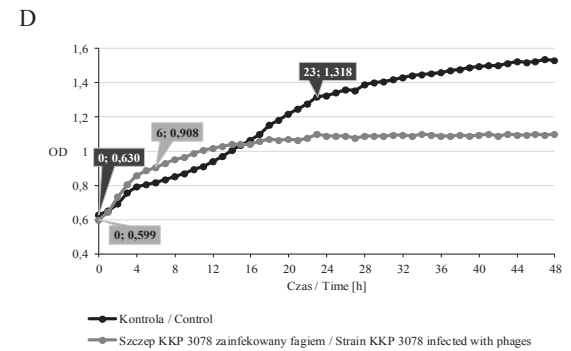
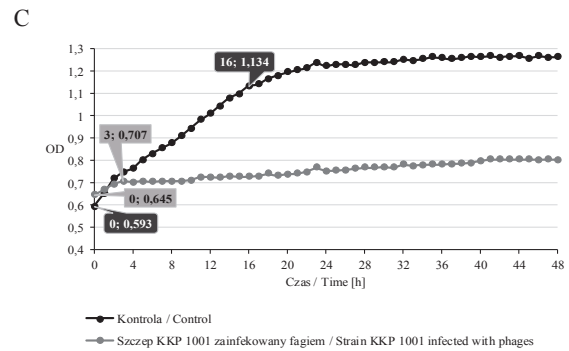
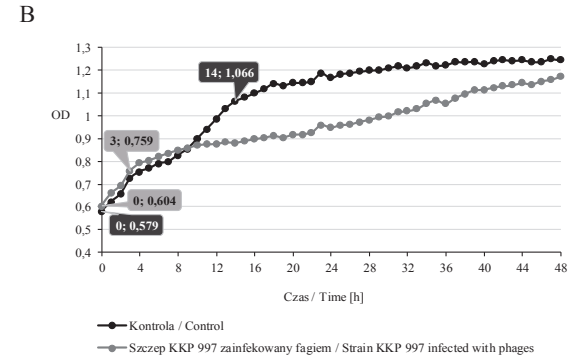
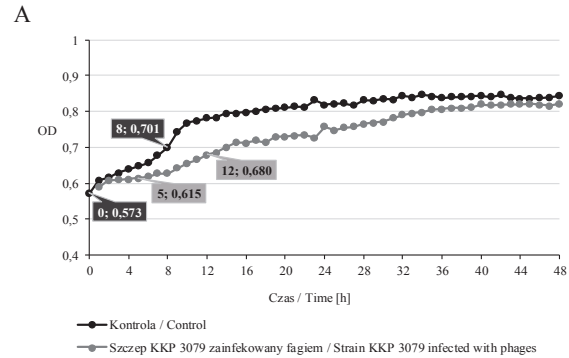
Na fot. 1. przedstawiono łyśinki fagów specyficznych wobec badanych serowarów *Salmonella*. Ich średnica była zróżnicowana, co świadczyło o różnych rozmiarach wyizolowanych fagów. Duża średnica łyśinek wynika z obecności fagów o małych rozmiarach. Dzięki niewielkim rozmiarom cząstek fagi takie łatwiej dyfundują w miękkim agarze i infekują sąsiadujące komórki bakteryjnego gospodarza [20, 36].



Objaśnienia / Explanatory notes:

A – fagi KKP 3266 wobec szczepu KKP 3079 (*S. Typhimurium*) / KKP 3266 phages against KKP 3079 strain (*S. Typhimurium*), B – fagi KKP 3265 wobec szczepu KKP 997 (*S. Virchow*) / KKP 3265 phages against KKP 997 strain (*S. Virchow*), C – fagi KKP 3332 wobec szczepu KKP 1001 (*S. Itami*) / KKP 3332 phages against KKP 1001 strains (*S. Itami*), D – fagi KKP 3267 wobec szczepu KKP 3078 (*S. Enteritidis*) / KKP 3267 phages against KKP 3078 strain (*S. Enteritidis*).

Fot. 1. Łysinki fagów specyficznych wobec badanych szczepów bakterii
Photo 1. Plaques of specific phages against tested bacterial strains



Objaśnienia / Explanatory notes:

Na rysunkach zaznaczono początek i koniec fazy logarytmicznego wzrostu / In figures there are marked the beginning and the end of the logarithmic growth phase; n = 10.

Rys. 1. Krzywe wzrostu badanych serotypów *Salmonella*: A – *S. Typhimurium*, B – *S. Virchow*, C – *S. Itami*, D – *S. Enteritidis*

Fig. 1. Growth curves of *Salmonella* serotypes tested: A – *S. Typhimurium*, B – *S. Virchow*, C – *S. Itami*, D – *S. Enteritidis*

Dla każdego z badanych serowarów wyznaczono kinetykę wzrostu drobnoustrojów zainfekowanych fagami wobec hodowli kontrolnych (rys. 1). W wyniku zainfekowania danego szczepu bakterii specyficznym fagiem dochodziło do stopniowej lizy komórek bakteryjnych, o czym świadczyło zmniejszenie gęstości optycznej hodowli. Na wykresach (rys. 1A - 1D) zaznaczono również początek i koniec fazy logarytmicznego wzrostu. Każdy z zastosowanych fagów specyficznych dla danego szczepu bakteryjnego gospodarza spowodował skrócenie fazy logarytmicznego wzrostu w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Wyznaczone wartości współczynników właściwej szybkości wzrostu (tab. 1) różniły się od graficznego obrazu krzywych wzrostu (rys. 1) z powodu znacznie dłuższego czasu trwania fazy logarytmicznej hodowli kontrolnych w stosunku do hodowli zainfekowanych fagami.

Tabela 1. Współczynniki właściwej szybkości wzrostu (μ) badanych serowarów *Salmonella*
Table 1. Specific growth rate coefficients (μ) of *Salmonella* serovars tested

Serowar <i>Salmonella</i> <i>Salmonella</i> serovar	Hodowla kontrolna Control culture				Hodowla po zainfekowaniu fagiem Culture after phage infection			
	Czas log-fazy Duration of log-phase [h]	OD _{min}	OD _{max}	μ [h ⁻¹]	Czas log-fazy Duration of log-phase [h]	OD _{min}	OD _{max}	μ [h ⁻¹]
		\bar{x}				\bar{x}		
KKP 997	14	0,579	1,066	0,044	3	0,604	0,759	0,076
KKP 1001	16	0,593	1,134	0,041	3	0,645	0,707	0,031
KKP 3078	23	0,630	1,318	0,032	6	0,599	0,908	0,069
KKP 3079	8	0,573	0,701	0,025	7	0,615	0,680	0,014

Objaśnienia / Explanatory notes:

OD_{min} – wartość minimalna gęstości optycznej hodowli / minimal value of optical density of culture;
OD_{max} – wartość maksymalna gęstości optycznej hodowli / maximal value of optical density of culture; \bar{x} – wartość średnia / mean value; n = 10.

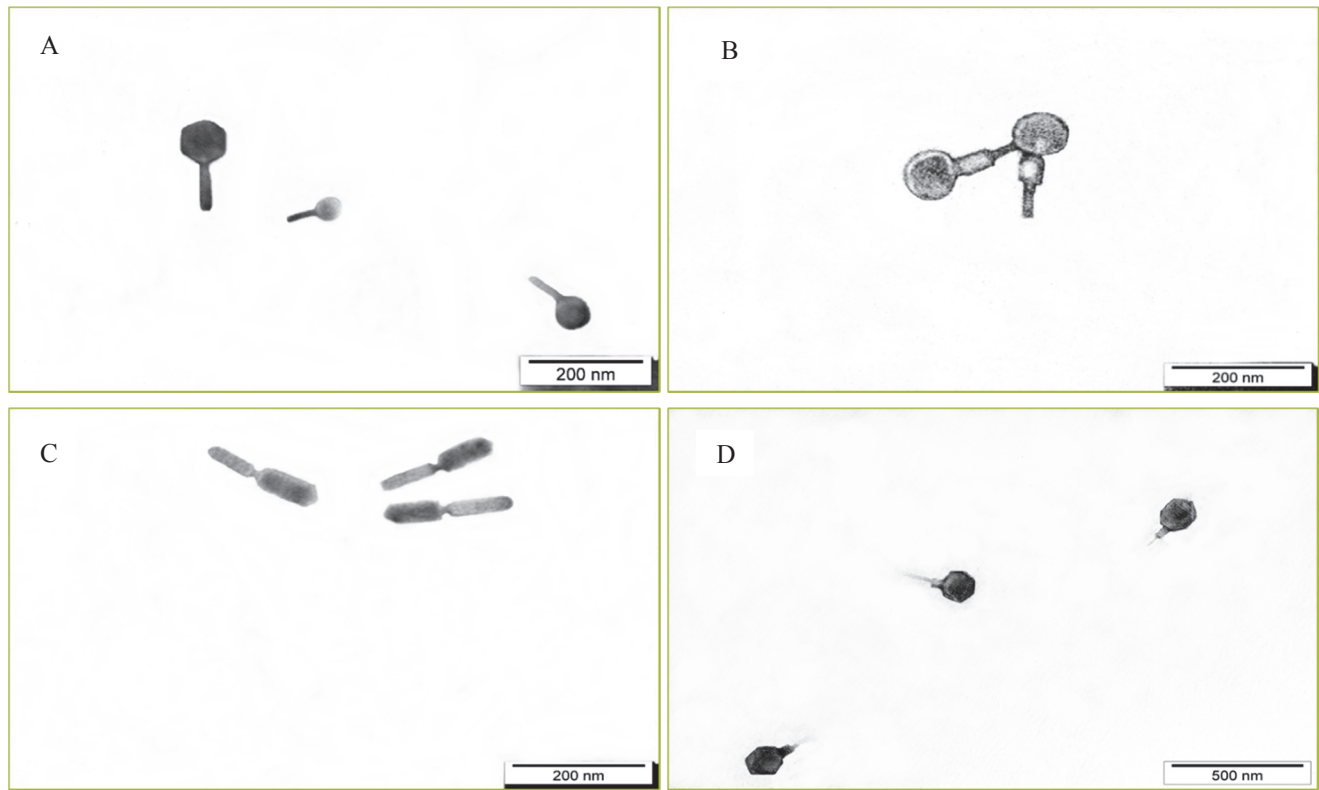
Zmiany szybkości rozpoczęcia fazy logarytmicznego wzrostu w hodowlach zainfekowanych fagami badali Zhao i wsp. [35]. Wykazali, że, niezależnie od zastosowanego współczynnika infekcji, hodowle bakteryjne traktowane fagami istotnie później rozpoczynały log-fazę w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Mahmoud i wsp. [15] odnotowali, że wzrost *Salmonella* Kentucky przy MOI = 1,0 został opóźniony przez wszystkie badane fagi w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Po 24-godzinnej inkubacji fagi całkowicie zahamowały wzrost szczepu bakteryjnego gospodarza. W doświadczeniu Yu i wsp. [34] hodowle infekowane fagami cechowały się słabszym wzrostem w porównaniu z hodowlą kontrolną do 24. godziny. W kolejnej dobie część hodowli przejawiała silniejszy wzrost w porównaniu z hodowlą kontrolną, co autorzy tłumaczyli nabyciem przez bakterie oporności na badane fagi. Opisane doświadczenia

prowadzą do wniosku, że zachowanie aktywności litycznej jest ściśle zależne od rodzaju bakteriofaga, a badanie szybkości lizy komórek bakteryjnych infekowanych fagami w czasie pozwala na wstępne oszacowanie stopnia zjadliwości wirusów.

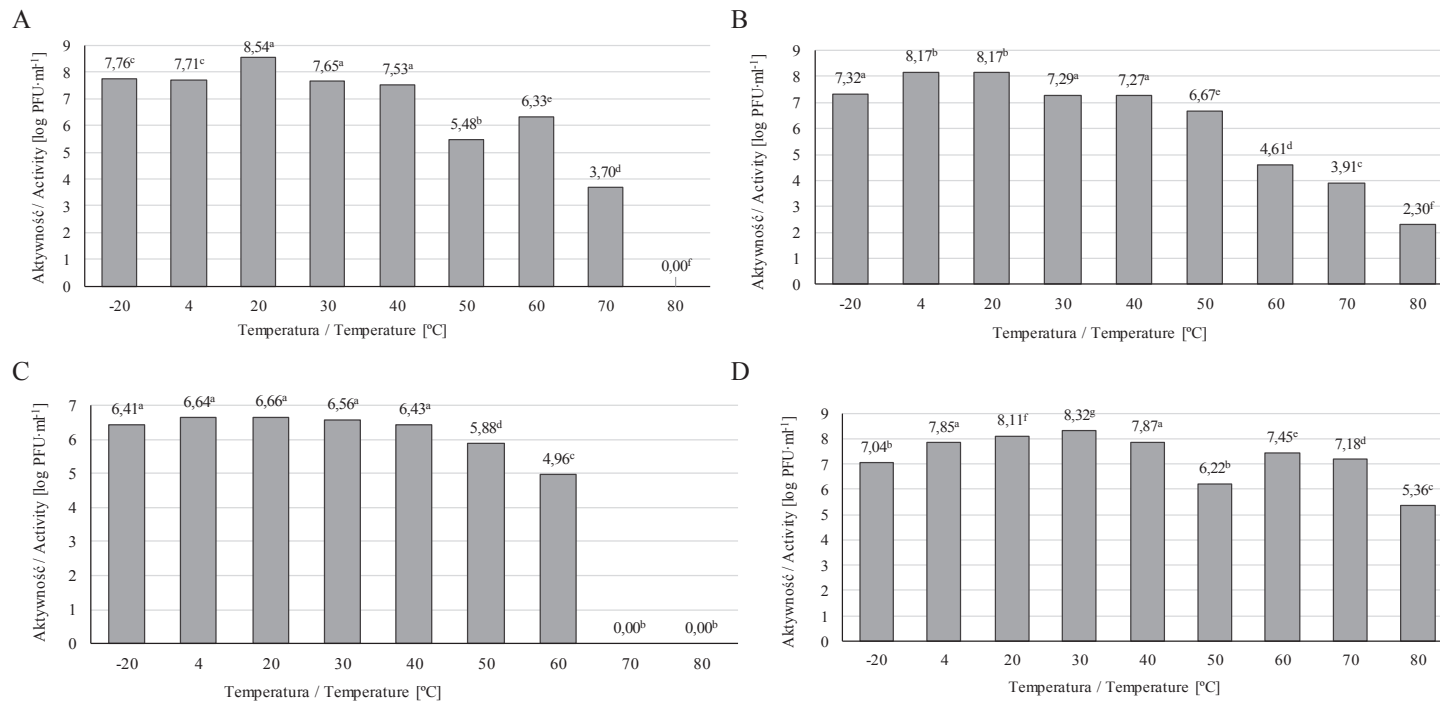
Cechy morfologiczne fagów określono z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) w barwieniu różnicowym (rys. 2). Z uwagi na obecność główki i ogonka wyizolowane wirusy zaklasyfikowano do rzędu *Caudovirales* – bakteriofagów o strukturze złożonej [12]. Większość (ok. 96 %) scharakteryzowanych do tej pory bakteriofagów klasyfikuje się do rzędu *Caudovirales* i większość z nich reprezentuje rodziny *Myoviridae* lub *Siphoviridae* [2].

Na podstawie cech morfologicznych fagi przydzielono do trzech rodzin. Fag KKP 3079, specyficzny dla *S. Typhimurium*, należy do rodziny *Siphoviridae*. Bakteriofagi te charakteryzuje obecność długiego, niekurczliwego ogonka, bez osłonki. Główki fagów, zawierające cały genomowy DNA, miały strukturę dwudziestościenną (ikosaedralną) [12, 15]. Dla *S. Enteritidis* wyizolowano faga KKP 3267 z rodziny *Podoviridae*, którego charakteryzuje krótki i niekurczliwy ogon. Dla bakterii *S. Virchow* oraz *S. Itami* wyizolowano odpowiednio fagi KKP 3265 i KKP 3332 należące do rodziny *Myoviridae*. Bakteriofagi te charakteryzuje obecność długiego, sztywnego i kurczliwego ogonka. Ogonek połączony szyjką z ikosaedralnym kapsydem składa się z wewnętrznej tubularnej rurki rdzeniowej i wyraźnie widocznej zewnętrznej, helikalnej, kurczliwej pochewki [3, 12, 15].

Stopień zachowania aktywności litycznej bakteriofagów określono poprzez podanie ich ekspozycji na szeroki zakres temperatury oraz kwasowości czynnej (pH) środowiska. Na rys. 3. przedstawiono wpływ temperatury w zakresie $-20 \div 80$ °C na zachowanie aktywności litycznej badanych fagów. Termostatowanie fagów w temp. powyżej 50 °C we wszystkich przypadkach spowodowało zmniejszenie aktywności fagów, co mogło mieć związek z denaturacją białek wirionu. W przypadku faga wobec *S. Itami* temp. 70 °C i powyżej całkowicie inaktywowała badanego faga. W przypadku fagów wobec *S. Typhimurium* oraz *S. Enteritidis* w temp. 60 °C wykazano wyższą aktywność lityczną w porównaniu z temp. 50 °C. W przypadku niektórych fagów lizogennych (zdolnych do utajonego cyklu rozwoju) poddanie ich działaniu wyższej temperatury ($42 \div 45$ °C) skutkuje indukcją profagów [14, 21], co przejawia się silniejszą lizą fagów termostatowanych w wyższej temperaturze hodowli. Fagi zachowały najwyższą aktywność w temp. $-20 \div 40$ °C, a podwyższenie temperatury o kolejne 10 °C powodowało redukcję liczby cząstek fagów nawet o 2 rzędy logarytmiczne. Wpływ temperatury na aktywność lityczną fagów został określony w doświadczeniach wielu naukowców. Shahin i Bouzari [25] zaobserwowali, że fagi wobec *Shigella flexneri* zachowały aktywność lityczną w zakresie temp. $4 \div 60$ °C. Temp. 70 °C i wyższa całkowicie zahamowała ich aktywność. W badaniach, które przeprowadzili Thung i wsp.



Rys. 2. Morfologia wyizolowanych bakteriofagów: A – fag KKP 3266, B – fag KKP 3265, C – fag KKP 3332, D – fag KKP 3267
Fig. 2. Morphology of isolated bacteriophages: A – KKP 3266 phage, B – KKP 3265 phage, C – KKP 3332 phage, D – KKP 3267 phage



Objaśnienia / Explanatory notes:

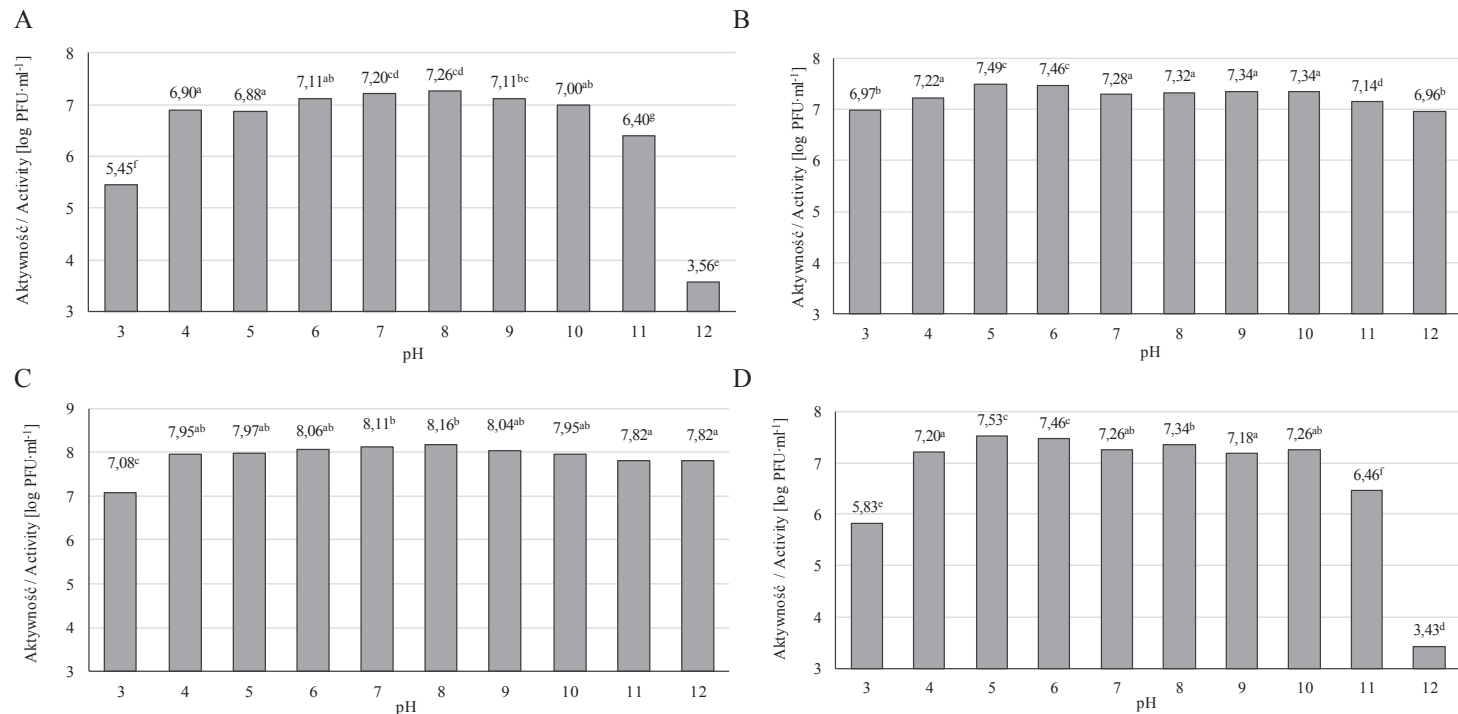
Na rysunku przedstawiono wartości średnie / Figure shows mean values; a, b, ... – wartości średnie oznaczone różnymi literami (na danym wykresie) różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) / mean values denoted by different letters (in the given chart) differ statistically significantly ($p < 0,05$); $n = 3$.
 Rys. 3. Wpływ temperatury na zachowanie aktywności badanych fagów: A – fag KKP 3266, B – fag KKP 3265, C – fag KKP 3332, D – fag KKP 3267

Fig. 3. Effect of temperature on maintaining activity of phages tested: A – KKP 3266 phage, B – KKP 3265 phage, C – KKP 3332 phage, D – KKP 3267 phage

[29], bakteriofagi przejawiały aktywność wobec *S. Enteritidis* w temp. 65 °C, jednak ich miano uległo zmniejszeniu. Ogólnie uważa się, że w temperaturze niższej od temperatury optymalnej dla aktywności litycznej danego faga mniej materiału genetycznego przenika do komórki bakteryjnego gospodarza. To skutkuje mniejszą liczbą potomnych cząstek wirusa [9]. Jamal i wsp. [8] stwierdzili, że wobec *Pseudomonas aeruginosa* bakteriofagi były stabilne w zakresie temp. 37 ÷ 65 °C, a przy temp. 70 °C były one całkowicie nieskuteczne. Mahmoud i wsp. [15] wykazali z kolei, że fagi były stabilne w zakresie temp. 30 ÷ 70 °C oraz pozostawały aktywne przez 15 min w temp. 80 °C.

Badane fagi sprawdzono pod względem zachowania aktywności litycznej w szerokim zakresie kwasowości czynnej pH 3 ÷ 12 (rys. 4). Kwasowość czynna oddziaływała hamująco na aktywność fagów w mniejszym stopniu niż temperatura. Fagi wobec *S. Virchow* oraz *S. Itami* wykazywały stabilność w całym badanym zakresie pH. W przypadku dwóch pozostałych fagów skrajne wartości pH wpływały istotnie ($p < 0,05$) ograniczając na aktywność lityczną bakteriofagów. Shahin i Bouzari [25] odnotowali, że fagi wobec *S. flexneri* zachowały najwyższą aktywność lityczną w zakresie pH środowiska 7 ÷ 11. Kwasowość czynna poniżej 5 i powyżej 13 całkowicie hamowała ich aktywność. Jamal i wsp. [8] podali, że w ich doświadczeniu fagi przejawiały aktywność przy pH 3 ÷ 11. Z kolei Yu i wsp. [34] podkreślili różnice w zakresie tolerancji na zmienną kwasowość czynną poszczególnych fagów skierowanych wobec tego samego szczepu bakteryjnego gospodarza. Środowisko kwaśne silnie ograniczało aktywność fagów w porównaniu ze środowiskiem alkalicznym. Thung i wsp. [29] badali aktywność fagów wobec *S. Enteritidis* i zaobserwowali całkowitą inaktywację wirusów przy pH 3. Tożsame wyniki przedstawili Sváb i wsp. [27] oraz Thung i wsp. [28]. W innych badaniach [16] fagi zachowały swoją aktywność w zakresie pH 5 ÷ 9 przy inkubacji w temp. 37 °C. Według Wanga i Saboura [31] optymalne pH większości bakteriofagów zawiera się w zakresie 5 ÷ 8. Obniżenie temperatury rozszerza zakres tolerancji pH od 4 do 10 [33]. Zbyt kwaśne środowisko wpływa prawdopodobnie na denaturację białek wirionu, a zdolność do przeżycia w szerokim zakresie pH jest cechą wymaganą w biokontroli [29]. Fagi scharakteryzowane w badaniach własnych utrzymały aktywność zarówno w szerokim zakresie pH, jak i temperatury, co stanowi przesłankę do ich skutecznego zastosowania w biokontroli żywności.

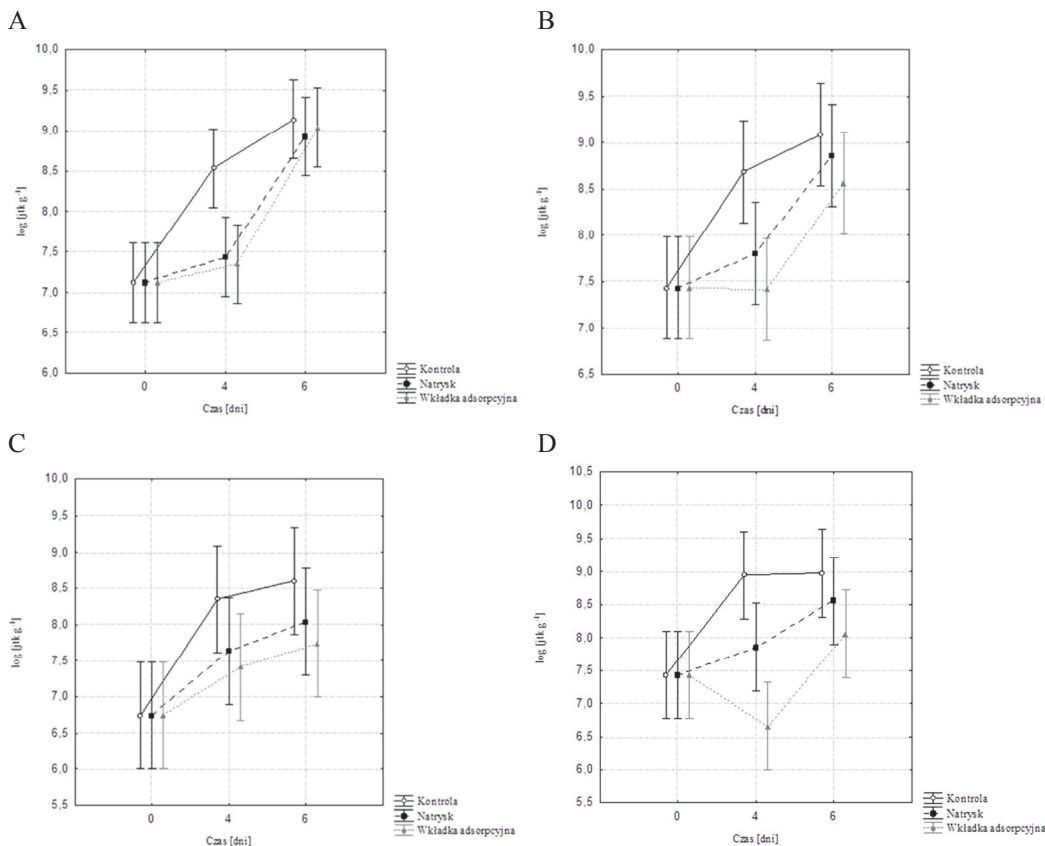
W ostatnim etapie badań oceniono skuteczność zastosowania fagów w roślinnej matrycy żywnościowej, tj. w kielkach rzodkiewki. Wyniki zmiany liczby poszczególnych serowarów *Salmonella* w matrycy żywnościowej przedstawiono na rys. 5. Fagi ograniczyły wzrost pałeczek *Salmonella* wobec prób kontrolnych. We wszystkich przypadkach wkładka absorpcyjna hamowała skuteczniej wzrost pałeczek *Salmonella* w matrycy żywnościowej (redukcja nawet o 2 rzędy logarytmiczne) niż metoda



Objaśnienia jak pod rys. 3. / Explanatory notes as in Fig. 3.

Rys. 4. Wpływ kwasowości czynnej (pH) na zachowanie aktywności badanych fagów: A – fag KKP 3266, B – fag KKP 3265, C – fag KKP 3332, D – fag KKP 3267

Fig. 4. Effect of active acidity (pH) on maintaining activity of phages tested: A – KKP 3266 phage, B – KKP 3265 phage, C – KKP 3332 phage, D – KKP 3267 phage



Objaśnienia / Explanatory notes:

Pionowe słupki na wykresach oznaczają przedziały ufności 0,95 / Vertical bars in the charts represent 0.95 confidence intervals; n = 3.

Rys. 5. Wpływ metody aplikacji fagów oraz czasu przechowywania na liczbę badanych bakterii: A – *S. Typhimurium*, B – *S. Virchow*, C – *S. Itami*, D – *S. Enteritidis*

Fig. 5. Effect of phages application method and storage time on number of bacteria tested: A – *S. Typhimurium*, B – *S. Virchow*, C – *S. Itami*, D – *S. Enteritidis*

natrysku. Prawdopodobnie wkładka absorpcyjna wpływała na zachowanie wyższej aktywności litycznej fagów wchodzących w skład koktajlu. Fagi mogły być podczas przechowywania stopniowo uwalniane z wkładki absorpcyjnej, natomiast w przypadku natrysku dawka mieszaniny fagów była jednorazowa. Wzrost liczby bakterii w kolejnych dniach może świadczyć o nabyciu przez badane pałeczki częściowej oporności na zastosowane fagi. Inną przyczyną wzrostu bakterii mogła być zmiana fizjologii komórek bakterii wywołana stresem środowiskowym, co mogło negatywnie wpłynąć na proces absorpcji fagów [10].

Wnioski

1. Ścieki komunalne charakteryzowały się dużą zawartością wirusów bakteryjnych, co pozwoliło otrzymać preparaty fagowe o wysokim mianie (10^8 PFU·ml⁻¹).
2. Fagi skutecznie skróciły fazę logarytmicznego wzrostu wszystkich badanych serowarów pałeczek *Salmonella*.
3. Wyizolowane fagi charakteryzowały się budową złożoną i prawdopodobnie należały do rzędu *Caudovirale*.
4. Temperatura silniej oddziaływała na zahamowanie aktywności litycznej badanych fagów niż kwasowość czynna. Temperatura powyżej 50 °C zmniejszyła aktywność lityczną fagów wobec wszystkich badanych serowarów pałeczek *Salmonella*. Fagi utrzymały aktywność lityczną niemal w całym zakresie badanego pH (3 ÷ 12).
5. Zastosowanie koktajlu fagowego jako środka do utrwalania roślinnej matrycy żywnościowej zredukowało liczbę pałeczek *Salmonella* nawet o 2 rzędy logarytmiczne (99 %) w porównaniu z próbami kontrolnymi.
6. Przeżywalność fagów w określonych warunkach środowiskowych była cechą indywidualną, dlatego w utrwalaniu żywności minimalnie przetworzonej należy stosować fagi o stabilnych cechach i szerokim zakresie tolerancji na czynniki zewnętrzne.
7. Zastosowanie bakteriofagów litycznych może być jedną z biologicznych metod poprawiających bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności o minimalnym stopniu przetworzenia.

Badania zostały sfinansowane w ramach działalności statutowej IBPRS-PIB nr 144-01 pt. „Wykorzystanie bakteriofagów wobec Salmonella sp. jako innowacyjnej metody zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności”.

Literatura

- [1] Alves D., Cerqueira M.A., Pastrana L.M., Sillankorva S.: Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis. *Food Res. Int.*, 2020, 128, #108791.
- [2] Amarillas L., Lightbourn-Rojas L., Angulo-Gaxiola A.K., Heredia J.B., González-Robles A., León-Félix J.: The antimicrobiological effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of tomatoes. *J. Food Safety*, 2018, 36 (6), #e12571.
- [3] Aprea G., D'Angelo A.R., Prencipe V.A., Migliorati G.: Bacteriophage morphological characterization by using Transmission Electron Microscopy. *J. Life Sci.*, 2015, 9, 214-220.
- [4] Dos Santos A.M.P., Ferrari R.G., Conte-Junior C.A.: Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: The sagacity of a bacterium. *Curr. Microbiol.*, 2019, 76, 762-773.

- [5] Echeverría-Vega A., Morales-Vicencio P., Saez-Saavedra C., Gordillo-Fuenzalida F., Araya R.: A rapid and simple protocol for the isolation of bacteriophages from coastal organisms. *MethodsX*, 2019, 6, 2614-2619.
- [6] Eng S.K., Pusparajah P., Mutalib N.S.A., Ser H.L., Chan K.G., Lee L.H.: *Salmonella*: A review on pathogenesis epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.*, 2015, 8 (3), 284-293.
- [7] Islam M.S., Zhou Y., Liang L., Nime I., Yan T., Willias S.P., Mia M.Z., Bei W., Connerton I.F., Fischetti V.A., Li J.: Application of a broad range lytic phage LPST94 for biological control of *Salmonella* in foods. *Microorganisms*, 2020, 8 (2), #247.
- [8] Jamal M., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A., Hussain T., Ali M., Das C.R.: Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. *Life Sci.*, 2017, 190, 21-28.
- [9] Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A.: The influence of external factors on bacteriophages – review. *Folia Microbiol.*, 2011, 56, 191-200.
- [10] Kowalska M., Sokołowska B.: Wykorzystanie bakteriofagów w łańcuchu żywnościowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2016, 4 (107), 26-36.
- [11] Kurtz J.R., Goggins J.A., McLachlan J.B.: *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunol. Lett.*, 2017, 190, 42-50.
- [12] Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B.: Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46 (D1), D708-D717.
- [13] Luo Y., Yi W., Yao Y., Zhu N., Qin P.: Characteristic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* from gastroenteritis. *J. Infect. Chemother.*, 2018, 24 (4), 251-255.
- [14] Łoś J.M., Węgrzyn G.: Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC) i bakteriofagi kodujące toksyny Shiga. *Post. Mikrobiol.*, 2011, 50 (3), 175-190.
- [15] Mahmoud M., Askora A., Barakat A.B., Rabie O.E-F., Hassan S.E.: Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.*, 2018, 266, 8-13.
- [16] Międzybrodzki R., Kłak M., Jończyk-Matysiak E., Bubak B., Wójcik A., Kaszowska M., Weber-Dąbrowska B., Łobocka M., Górski A.: Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic staphylococcal bacteriophage A5/80. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, #467.
- [17] Mirzaei M.K., Nilsson A.S.: Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLOS ONE*, 2015, 10(5), #e0127606.
- [18] Moyer Z.D., Woolston J., Sulakvelidze A.: Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 2018, 10 (4), #205.
- [19] Nowicka P., Wojdyło A., Oszmiański J.: Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 2 (93), 5-18.
- [20] Oh H., Seo D.J., Jeon S.B., Park H., Jeong S., Chun H.S., Oh M., Choi C.: Isolation and characterization of *Bacillus cereus* bacteriophages from foods and soil. *Food Environ. Virol.*, 2017, 9, 260-269.
- [21] Pearl S., Gabay C., Kishony R., Oppenheim A., Balaban N.Q.: Nongenetic individuality in the host-phage interaction. *PLoS Biol*, 2008, 6(5), #e120.
- [22] Połaska M., Sokołowska B.: Bacteriophages – a new hope or huge problem in the food industry. *AIMS Microbiol.*, 2019, 5 (4), 324-346.
- [23] Roszko M.L., Sokołowska B., Juszczyk-Kubiak E., Świder O., Wójcicki M.: Bakteriofagi jako czynniki biokontroli *Listeria monocytogenes* w przemyśle spożywczym. W: *Listeria w przemyśle spożywczym*. [on line]. Foodfakty. Dostęp w Internecie [20.04.2021]: <https://foodfakty.pl/listeria-w-przemysle-spozywczym>

- [24] Shaheen A., Tariq A., Shehzad A., Iqbal M., Mirza O., Dmitry A., Maslov D.A., Rahman M.: Transcriptional regulation of drug resistance mechanisms in *Salmonella*: Where we stand and what we need to know. *World J. Microb. Biot.*, 2020, 36, #85.
- [25] Shahin K., Bouzari M.: Bacteriophages application for biocontrolling *Shigella flexneri* in contaminated foods. *J. Food Sci. Technol.*, 2018, 55(2), 550-559.
- [26] Sriitha K.S., Bhat S.G.: Genomics of *Salmonella* phage Φ Stp1: Candidate bacteriophage for biocontrol. *Virus Genes*, 2018, 54, 311-318.
- [27] Sváb D., Falgenhauer L., Rohde M., Szabó J., Chakraborty T., Tóth I.: Identification and characterization of T5-like bacteriophages representing two novel subgroups from food products. *Front. Microbiol.*, 2018, 9, #202.
- [28] Thung T.Y., Lee E., Mahyudin N.A., Anuradha K., Mazlan N., Kuan C.H., Pui C.F., Ghazali F.M., Rashid N.-K.M.A., Rollon W.D., Tan C.W., Radu S.: Evaluation of a lytic bacteriophage for biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in different food matrices. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2019, 105, 211-214.
- [29] Thung T.Y., Premarathne J.M.K.J.K., Chang W.S., Loo Y.Y., Chin Y.Z., Kuan C.H., Tan C.W., Basri D.F., Radzi C.W.J.W.M., Radu S.: Use of lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2017, 78, 222-225.
- [30] Tirpanalan O., Zunaboovic M., Doming K.J., Kneifel W.: Mini review: Antimicrobial strategies in the production of fresh-cut lettuce products. In: *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Research and Technological Advances*. Ed. A. Méndez-Vilas. Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 2011, pp.176-188.
- [31] Wang Q., Sabour P.M.: Encapsulation and controlled release of bacteriophages. In: *Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogens*. Eds. P.M. Sabour, M.M.W. Griffiths. ASM Press, Washington 2010, pp. 237-255.
- [32] Wemyss M.A., Pearson J.S.: Host cell death responses to non-typhoidal *Salmonella* infection. *Front. Immunol.*, 2019, 10, #1758.
- [33] Wójcicki M., Błażej S., Gientka I., Brzezicka K.: The concept of using bacteriophages to improve the microbiological quality of minimally-processed foods. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2019, 18 (4), 373-383.
- [34] Yu J.-G., Lim J.-A., Song Y.-R., Heu S., Kim G.H., Koh Y.J., Oh C.-S.: Isolation and characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 26 (2), 385-393.
- [35] Zhao J., He L., Pan L., Liu Y., Yao H., Bao G.: Effect of a lytic bacteriophage on rabbits experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *World Rabbit Sci.*, 2017, 25 (3), 273-279.
- [36] Zheng X.-F., Yang Z., Zhang H., Jin W.-X., Xu C.-W., Gao L., Rao S.-Q., Jiao X.: Isolation of virulent phages infecting dominant mesophilic aerobic bacteria in cucumber pickle fermentation. *Food Microbiology*, 2020, 86, #103330.

USING LYTIC PHAGES TO REDUCE THE NUMBER OF *SALMONELLA* RODS IN PLANT FOOD MATRIX

S u m m a r y

The object of the research study was to isolate bacteriophages from municipal wastewater and to determine the effectiveness of using them as a means to eliminate some selected *Salmonella* serovars from minimally processed food. Radish sprouts were a vegetable food matrix.

Four bacteriophages specific against bacteria of the *Salmonella* genus were isolated. Their lytic activity was determined, as well as morphology using Transmission Electron Microscopy (TEM) and tolerance to selected environmental factors (temperature and pH). A prepared phage cocktail was applied to the radish sprouts previously infected with bacteria of the *Salmonella* genus using a spraying method and an absorbent insert. All the phages isolated effectively shortened the logarithmic growth phase of the strains tested. Those isolated phages were characterised by a complex structure. Based on the morphological analysis, they were classified as a *Caudovirales* order. The sensitivity of phages to environmental factors is an individual feature, and when designing a bacteriophage preparation, there should be selected phages with stable features and a wide range of tolerance to external factors. It was shown that the temperature had a stronger effect on the inhibition of lytic activity of the phages tested than the active acidity of the environment. Compared to the control samples, the highest reduction of *Salmonella* rods, at a level of 99 %, was achieved when using an absorbent pad containing the phage cocktail.

The research study confirms the effectiveness of phages in ensuring the microbiological safety of minimally processed food. Although there are no EU legal rules ref. to lytic bacteriophages-based preparations, in the future they may become one of the biological methods to improve the microbiological safety of minimally processed foods. They can also be an effective disinfectant designed to clean production equipment.

Key words: bacteriophages (phages), lytic cycle, *Salmonella*, minimally processed food, sprouts, preservation of food ☒

PATRYCJA SKWAREK, JUSTYNA LIBERA

BEZPIECZEŃSTWO MIKROBIOLOGICZNE MIĘSA DROBIOWEGO W KRAJACH UE W LATACH 2019 - 2020

Streszczenie

Do najistotniejszych zagrożeń zdrowotnych w produkcji drobiarskiej zalicza się m.in. zanieczyszczenia mikrobiologiczne, pozostałości zanieczyszczeń chemicznych oraz leków, jak również zanieczyszczenia fizyczne. Mięso drobiowe cenione jest głównie jako źródło pełnowartościowego białka pochodzenia zwierzęcego. Jego duża wartość odżywcza wynika ze zróżnicowanego i cennego składu aminokwasowego. Oprócz białka mięso to dostarcza lipidów, składników mineralnych oraz witamin. Wartość odżywcza mięsa drobiowego oraz jego przystępna cena przyczyniają się do wzrostu popytu na ten surowiec i jego przetwory wśród konsumentów. Konsekwencją wzrostu produkcji mięsa drobiowego może być niekiedy nieprzestrzeganie odpowiednich standardów produkcji, co generuje zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia w nim zanieczyszczeń drobnoustrojami chorobotwórczymi lub ich toksynami.

Celem pracy była ocena bezpieczeństwa mikrobiologicznego mięsa drobiowego oraz produktów z mięsa drobiowego dostępnych na rynku Unii Europejskiej na podstawie powiadomień wygenerowanych z RASFF-Portal, pochodzących z dwóch lat (2019 - 2020). W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono, że dominująca część zgłoszeń (aż 95 %) dotyczyła wykrycia obecności bakterii z rodzaju *Salmonella* w mięsie drobiowym i stanowiła ona podstawowy, najczęściej odnotowywany problem mikrobiologiczny. W krajach UE opracowano nowe strategie i wprowadzono kompleksowe programy administracyjnego zwalczania salmonellozy. Podejmowane w kraju programy zwalczania salmonellozy już wywołują pozytywne zmiany, dzięki czemu problem ten z każdym rokiem jest w coraz większym stopniu niwelowany.

Słowa kluczowe: mięso drobiowe, zagrożenie mikrobiologiczne, bezpieczeństwo, RASFF

Wprowadzenie

Zarówno bezpieczeństwo żywności, jak i ochrona zdrowia ludzkiego są tematami wzbudzającymi bardzo duże zainteresowanie władz rządowych, społeczeństwa, organizacji pozarządowych a także różnego rodzaju stowarzyszeń zawodowych oraz orga-

Mgr inż. P. Skwarek, Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, dr inż. J. Libera, Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego i Gastronomii, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin.

Kontakt: patrycja.skwarek@up.lublin.pl

nizacji handlowych. Zapewnienie bezpieczeństwa żywności wymaga m.in. podejmowania określonych działań, które są ściśle ze sobą połączone. W Unii Europejskiej strategia ta obejmuje także system RASFF, nazywany Systemem Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach [13].

System RASFF służy do monitorowania bezpieczeństwa żywności na terenie Europy, głównie zagrożeń wykrytych w żywności, paszach oraz materiałach przeznaczonych do kontaktu z żywnością. W systemie tym wyróżnia się trzy kategorie powiadomień w zależności od stopnia zagrożenia [3]. Mogą mieć one charakter powiadomień informacyjnych, alarmowych lub wiadomości. Pierwsza z kategorii dotyczy produktów, które nie są bezpośrednim zagrożeniem, dlatego też kraje członkowskie nie są zobowiązane do podejmowania natychmiastowych działań w celu eliminacji zaistniałego zagrożenia. Powiadomienia alarmowe dotyczą natomiast produktów, które są obecne w obrocie handlowym i mogą stanowić poważne zagrożenie dla ludzi, dlatego też należy podejmować natychmiastowe działania, aby zostały wycofane z obrotu. W systemie RASFF zamieszczane są również wiadomości, które pełnią rolę informacji na temat produktów, które nie zostały zgłoszone ani jako powiadomienia alarmowe, ani jako informacyjne, jednak z uwagi na kontrole przeprowadzane przez państwa członkowskie mają istotne znaczenie. Zarówno powiadomienia alarmowe, jak i informacyjne publikowane są przez Komisję Europejską w postaci przeglądów tygodniowych [15]. System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach aktualizowany jest również w przypadku skarg otrzymanych od konsumentów, zgłoszeń dokonanych przez firmy oraz wystąpienia różnego rodzaju zatruc pokarmowych [13]. System ten umożliwia podjęcie natychmiastowych działań, które dotyczą zaistniałego zagrożenia. Pozwala m.in. na szybkie wyeliminowanie w obrębie Unii Europejskiej artykułów, które są niebezpieczne dla zdrowia człowieka i zapewnienie tym samym jednolitego poziomu bezpieczeństwa żywności na całym jej terytorium. Dane, które zostają wprowadzone do systemu, poddaje się szczegółowej analizie, co sprawia, że w późniejszym czasie stanowią podstawę do podjęcia określonych działań w zakresie prawa żywnościowego UE. Zagrożenia, które zostały wykryte w ostatnich latach, pozwoliły na wyciągnięcie wielu cennych wniosków dotyczących m.in. skuteczności oraz sprawności działania systemu. Spostrzeżenia te skutkowały wprowadzeniem platformy powiadomień online, jak również przeglądu istniejących standardowych procedur operacyjnych [5].

Rynek mięsa stanowi ważny segment gospodarki żywnościowej na całym świecie, a na szczególną uwagę zasługuje mięso drobiowe. Światowa produkcja mięsa systematycznie wzrasta. W ciągu ostatnich pięciu dekad produkcja mięsa ogółem zwiększyła się 4-krotnie – z 70,6 mln t do 285 mln t. Wzrost produkcji mięsa związany jest przede wszystkim z przemysłową hodowlą zwierząt. Jest to najszybciej rozwijający się

sektor mięsny na świecie, co wynika z rosnącego popytu na drób i jego przetwory [12]. Szacuje się, że do 2023 r. globalna produkcja drobiu może osiągnąć 130,7 mln t [28].

Mięso drobiowe produkowane jest z udomowionych gatunków drobiu, do których zalicza się m.in. kury, indyki, gęsi oraz kaczki. Podstawowym surowcem rzeźnym są kurczęta brojlery, które w skali globalnej stanowią ok. 86 % ptaków ubijanych na mięso. W Polsce mięso kurcząt rzeźnych stanowi ok. 68 % mięsa drobiowego, indycze – 21 %, gęsie – 2 % i kaczki – 1 %. W obrocie towarowym mięso drobiowe występuje w postaci tuszek oraz elementów kulinarnych, w tym piersi, nóg, ud, podudzi, skrzydeł [21].

Na wzrost spożycia mięsa drobiowego wpływają: niski koszt produkcji, przystępna cena, dostępność surowca, krótki czas przygotowania, tradycja spożywania oraz walory żywieniowe [1]. Tego rodzaju mięso odznacza się delikatnym smakiem, małą wartością energetyczną, niewielką zawartością tłuszczu. Jest ono źródłem wielu cennych składników mineralnych, głównie potasu, wapnia, sodu, żelaza, a przede wszystkim pełnowartościowego białka zwierzęcego. Składniki te są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego [28]. Drobiowy surowiec mięsny przeznaczony do handlu, jak i do przetwórstwa, musi spełniać wysokie wymagania jakościowe i być w pełni identyfikowalny [1]. Przy wielu korzyściach wynikających ze spożycia mięsa drobiowego należy jednak pamiętać, że stanowi ono również doskonałe środowisko do rozwoju drobnoustrojów. Mięso drobiowe może być nie tylko źródłem zanieczyszczeń fizycznych czy chemicznych, ale także mikrobiologicznych. W surowym mięsie drobiowym mogą być obecne mikroorganizmy saprofityczne, jak również chorobotwórcze [28]. Stanowiło to podstawę do poddania szczegółowej analizie tego rodzaju produktów z uwzględnieniem w nich ilości drobnoustrojów chorobotwórczych, które mogą być przyczyną wystąpienia wielu chorób niebezpiecznych dla człowieka. Kolejnym czynnikiem, który przyczynił się do analizy bezpieczeństwa mikrobiologicznego mięsa drobiowego w latach 2019 - 2020 było pojawienie się na świecie koronawirusa SARS-CoV-2. Pandemia COVID-19 nie tylko dotknęła ludzi na całym świecie, ale i sparaliżowała gospodarkę oraz życie społeczne. Łańcuchy dostaw zostały szczególnie ograniczone w roku 2020, co utrudniło międzynarodową wymianę handlową. Producenci drobiu zmagali się dodatkowo z ptasią gripą. Dla branży mięsnej nastąpiła kumulacja niekorzystnych czynników, które doprowadziły do zwiększonej niepewności odnośnie do sytuacji na rynku. W Polsce w okresie maj - wrzesień 2020 r. w kilku dużych zakładach mięsnych oraz drobiarskich wykryto wśród pracowników ogniska koronawirusa. Choroba pracowników i kwarantanna zachwiały organizacją procesów produkcyjnych [28]. Handel zagraniczny mięsem drobiowym oraz jego przetworami w pierwszej połowie 2020 r. był pod bardzo dużą presją wynikającą z wystąpienia w grudniu 2019 r. grypy ptaków, a w 2020 r. pandemii COVID-19, która – choć z pewnym opóźnieniem – spowodowała załamanie się sektora drobiarskiego [19].

Celem niniejszej pracy była ocena bezpieczeństwa mikrobiologicznego drobiu oraz produktów drobiowych dostępnych na rynku Unii Europejskiej w okresie dwóch lat, tj. 2019 i 2020 – na podstawie danych z systemu RASFF.

Material i metody badań

Analizom poddano dane dotyczące drobiu oraz produktów drobiowych wygenerowanych z systemu RASFF-Portal. Ten gatunek mięsa wybrano ze względu na wzrost jego produkcji, spożycia, jak również eksportu na terenie całej Europy. Uzyskane dane obejmowały wszystkie zgłoszenia z kategorii „drób i produkty drobiowe” z okresu 01.01.2019 - 31.12.2020. Dane z raportu dotyczyły wszystkich krajów Unii Europejskiej oraz punktów kontaktowych należących do sieci RASFF. Uzyskane wyniki poddano weryfikacji zarówno ze względu na czas zgłoszenia (każdy rok oddzielnie i oba lata łącznie), jak i po uwzględnieniu informacji podanych w zgłoszeniu, m.in. rodzaju powiadomienia czy kategorii powstałego zagrożenia.

Wyniki i dyskusja

W latach 2019 - 2020 w krajach Unii Europejskiej odnotowano łącznie 791 przypadków potencjalnie niebezpiecznego mięsa drobiowego oraz produktów z mięsa drobiowego. W roku 2019 ta liczba wynosiła 340, a w 2020 r. odnotowano 451 powiadomień dotyczących wykrycia niebezpiecznych patogennych bakterii obecnych w tego rodzaju mięsie. Można podkreślić, że w tym okresie było o 13 % mniej powiadomień niż w latach 2015 - 2018, które oceniali Stawczyk i wsp. [26]. Na podstawie analizy danych z raportów RASFF wymienieni autorzy podali, że w badanym przez nich okresie było łącznie 914 powiadomień. Autorzy ci zauważyli, że liczba powiadomień o zagrożeniach wykrytych w mięsie drobiowym wzrastała z każdym rokiem, począwszy od 121 powiadomień z 2015 r., przez 323 powiadomienia rok później i 561 powiadomień w 2018 r. Podobną tendencję zaobserwowano w badaniach własnych, gdyż w 2020 r. odnotowano o 111 zgłoszeń więcej niż w roku poprzedzającym.

Polska znajduje się w czołówce krajów, z których pochodziło mięso drobiowe i produkty drobiowe zgłoszone do RASFF-Portal jako niebezpieczne (tab. 1). Stanowiły one 16,3 % wszystkich zgłoszeń w latach 2019 - 2020. Według Majewskiego i Dziubdzieli [16], którzy analizowali powiadomienia dotyczące żywności pochodzenia zwierzęcego zgłoszone do RASFF przez Polskę, większość powiadomień z RASFF dotyczyła produktów pochodzących z Polski lub przetwarzanych w Polsce (76 %). Również według Stawczyka i wsp. [26] w trzyletnim podsumowaniu odnotowano zdecydowanie najwięcej (aż 229) powiadomień dotyczących żywności potencjalnie niebezpiecznej, która pochodziła z Polski.

Tabela 1. Kraje o największej i najmniejszej liczbie zgłoszeń dotyczących mięsa i produktów drobiowych według raportów wygenerowanych przez RASFF-Portal z okresu 01.01.2019 - 31.12.2020

Table 1. Countries with the highest and lowest number of notifications ref. to poultry meat and products according to reports from the period 01.01.2019 - 31.12.2020 generated by RASFF-Portal

Kraje o największej liczbie zgłoszeń Countries with the highest number of notifications	2019	2020	Wzrost lub zmniejszenie liczby powiadomień Increase or decrease in number of notifications [%]	Suma Total	Udział powiadomień zgłoszonych w ciągu 2 lat w stosunku do ogólnej sumy powiadomień z tego okresu Number of reported notifications of 2 years in proportion to total notifications in that period [%]
Polska / Poland	56	73	+30,4	129	16,3
Litwa / Lithuania	27	64	+137,0	91	11,5
Czechy / Czech Republic	58	28	-51,7	86	10,9
Francja / France	27	56	+107,4	83	10,5
Włochy / Italy	22	45	+104,5	67	8,5
Holandia / Netherlands	30	26	-13,3	56	7,1
Bułgaria / Bulgaria	3	33	+1000,0	36	4,6
Niemcy / Germany	16	9	-43,8	25	3,2
Pozostałe kraje UE Other countries UE	101	117	+15,8	218	27,6
W tym / Including:					
Kraje o najmniejszej liczbie zgłoszeń Countries with the lowest number of notifications	2019	2020	Wzrost lub zmniejszenie liczby powiadomień Increase or decrease in number of notifications [%]	Suma Total	Udział powiadomień zgłoszonych w ciągu 2 lat w stosunku do ogólnej sumy powiadomień z tego okresu Number of reported notifications of 2 years in proportion to total notifications in that period [%]
Finlandia / Finland	3	5	+66,7	8	1
Hiszpania / Spain	2	4	+100,0	6	0,8
Irlandia / Ireland	1	5	+400,0	6	0,8
Słowenia / Slovenia	3	2	-33,3	5	0,6
Norwegia / Norway	3	1	-66,7	4	0,5
Szwecja / Sweden	1	2	+100,0	3	0,4
Cypr / Cyprus	0	1	+100,0	1	0,1

Objaśnienie / Explanatory notes:

(+) – oznacza procentowy wzrost powiadomień w roku 2020 w stosunku do roku 2019 / represents percent increase in notifications in 2020 compared to 2019; (-) – oznacza procentowe zmniejszenie powiadomień w roku 2020 w stosunku do roku 2019 / represents percent reduction in notifications in 2020 compared to 2019.

Należy jednak uwzględnić, że Polska jest znaczącym producentem mięsa drobiowego. Z produkcją na poziomie ponad 1 mln t rocznie zajmuje piętnaste miejsce w świecie i piąte w Unii Europejskiej. Mięso drobiowe jest także bardzo ważnym składnikiem diety Polaków. W latach 2000 - 2007 jego roczna konsumpcja na osobę wzrosła aż o 63,3 % (z 14,7 do 24,0 kg), zaś udział w spożyciu mięsa ogółem zwiększył się z 14,7 do 22,2 %. W 2019 r. spożycie drobiu wyniosło 27,5 kg na mieszkańca i było o 0,5 kg (1,9 %) większe niż w 2018 r., natomiast w 2020 r. spożycie drobiu w Polsce zwiększyło się o 3,6 % do 28,5 kg na mieszkańca [25]. Według danych UE [cyt. za 19] w 2019 r. produkcja tego rodzaju mięsa osiągnęła 2,707 mln t, natomiast w roku 2020 produkcja ta wzrosła do 2,744 mln t. Polska należy także do największych eksporterów mięsa drobiowego. Na podstawie danych Izby Administracji Skarbowej [cyt. za 19] eksport mięsa i podrobów drobiowych wyrażony w masie produktu wzrósł w 2019 roku o 8,4 % w stosunku do roku poprzedzającego. O wzroście eksportu do Unii Europejskiej zdecydował przede wszystkim większy eksport do Niemiec (o 0,4,7 %), Wielkiej Brytanii (o 10,5 %), Holandii (o 17,8 %), Francji (o 5,2 %), Hiszpanii (o 18,8 %) oraz na Słowację (o 9,8 %).

Na podstawie danych z raportów systemu RASFF, dotyczących krajów o największej liczbie zgłoszeń, można stwierdzić, że mięso to pochodziło najczęściej z Litwy, Czech, Francji oraz Holandii, odpowiednio [%]: 11,5, 10,9, 10,5 i 7,1 wszystkich zgłoszeń. Uzyskane dane najprawdopodobniej były związane ze wzrostem produkcji oraz eksportu mięsa drobiowego, co zwiększyło liczbę przeprowadzanych kontroli, które wygenerowały nowe zgłoszenia.

Najmniej powiadomień odnotowano na Cyprze oraz w Szwecji (tab. 1). Wynika to najprawdopodobniej z małej produkcji mięsa i produktów drobiowych, gdyż mieszkańcy tych krajów w swojej codziennej diecie wykorzystują raczej ryby oraz mięso wieprzowe. Według danych z raportów Unii Europejskiej w 2019 r. produkcja mięsa drobiowego na Cyprze oraz w Szwecji wynosiła odpowiednio: 26,90 tys. t oraz 227, 14 tys. t rocznie. W 2020 r. produkcja ta jeszcze bardziej zmalała i wynosiła odpowiednio: 25,85 tys. t oraz 172,00 tys. t. W porównaniu z takimi krajami jak Polska czy Czechy jest to bardzo niski odsetek produkcji na skalę światową.

Klasyfikację powiadomień dotyczących mięsa i produktów drobiowych przedstawiono w tab. 2. W roku 2019 ich ogólna liczba wynosiła 340, rok później odnotowano wzrost aż o 32,6 %. W analizowanym okresie z 791 zgłoszeń ponad połowę (57,0 %) stanowiły powiadomienia o charakterze informacyjnym, na drugim miejscu (34,6 %) były powiadomienia alarmowe. Wśród analizowanych zgłoszeń 8,3 % dotyczyło zatrzymania partii produktu na granicy, co potwierdza skuteczność systemu RASFF.

Tabela 2. Ogólna klasyfikacja powiadomień dotyczących mięsa i produktów drobiowych według raportów wygenerowanych przez RASFF-Portal z okresu 01.01.2019 - 31.12.2020

Table 2. General classification of notifications ref. to meat and poultry products according to reports from the period 01.01.2019 - 31.12.2020 generated by RASFF-Portal

Klasyfikacja zgłoszenia Classification of the notification	2019	2020	Suma Total	[%]
Alarmowe / Alarm	100	174	274	34,6
Odrzucenie na granicy Border rejection	38	28	66	8,3
Informacyjne / Informational	202	249	451	57,0
Wszystkie zgłoszenia w ciągu badanego okresu All notifications during the period under examination	340	451	791	100,0

W ostatnich latach coraz więcej przypadków zatruc pokarmowych związanych jest z występowaniem w żywności nieznanymi dotąd mikroorganizmów i ich toksyn. Nowym niebezpieczeństwem dla konsumenta stają się również bakterie lekooporne. Spośród najważniejszych czynników etiologicznych przenoszonych przez żywność w raportach epidemiologicznych wymienia się: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* spp., *Coxiella burnetti* oraz werotoksyczne *Escherichia coli* (VTEC) i shigatoksyczne *E. coli* (STEC). Spośród wszystkich zakażeń mięsa drobiowego kluczowe miejsce zajmują jednak bakterie z rodzaju *Salmonella*. Coraz częściej pojawiają się szczepy *Salmonella* o nietypowych właściwościach antygenowych z genami zlokalizowanymi na plazmidach i transpozonach. Równie dobrym przykładem są bakterie *Campylobacter* spp., które w coraz większych ilościach występują w tego rodzaju mięsie głównie z powodu nadużywania antybiotyków. Można zaobserwować coraz większą częstotliwość pojawiania się szczepów o nowych cechach zjadliwości, czyli bardziej patogennych oraz lekoopornych. Kolejnym patogennym zagrożeniem mikrobiologicznym, które przekroczyło barierę gatunkową jest epizootyczny wirus ptasiej grypy typu A. Większość przypadków zakażenia wirusem ptasiej grypy u ludzi wiąże się z bezpośrednim lub pośrednim kontaktem z zakażonym żywym lub martwym drobiem. Kontrolowanie choroby u źródła zwierząt ma kluczowe znaczenie dla zmniejszenia ryzyka dla ludzi. Ptasia grypa typu A u ptaków nie tylko wpływa na produkcję zwierzęcą, ale także powoduje ryzyko zanieczyszczenia wirusem surowego mięsa i produktów drobiowych. Należy podkreślić, że wirus ginie w wysokiej temperaturze, jednak mimo to ma zdolność do przedostawania się do organizmu zwierząt poprzez skażoną wodę, paszę czy różnego rodzaju nawozy i powietrze. Wczesne wykrycie tego wirusa u drobiu ma kluczowe

znaczenie dla skutecznego ostrzegania i kontroli, jak również do zapewnienia bezpieczeństwa tego rodzaju mięsa [28].

Z powyższych względów w badaniach własnych przeanalizowano występowanie tych groźnych dla ludzi drobnoustrojów w mięsie drobiowym oraz jego produktach, zwłaszcza, że w grudniu 2019 r. stwierdzono na świecie wystąpienie wirusa ptasiej grypy.

Według badań, które przeprowadzili Maćkiw i wsp. [15], spośród wszystkich produktów spożywczych najczęściej kwestionowanymi rodzajami żywności były: mięso drobiowe i produkty z mięsa drobiowego oraz mięso i produkty z gatunków zwierząt innych niż drób. W powiadomieniach dotyczących występowania patogenów w żywności najczęściej notowano obecność *Salmonella* spp. Również Majewski i Dziubdziała [16] w większości przypadków (77 %) obserwowali obecność tego rodzaju pałeczek w świeżym lub mrożonym mięsie lub podrobach. W badaniach własnych, na podstawie danych z RASFF-Portal, potwierdzono wyniki podane przez innych autorów i wskazano, że aż 95 % wszystkich zgłoszeń było spowodowane obecnością tego niebezpiecznego drobnoustroju chorobotwórczego. Tym samym stanowił on podstawowe, najczęściej odnotowywane zagrożenie mikrobiologiczne (tab. 3). Wiąże się to prawdopodobnie ze wzrastającym spożyciem mięsa drobiowego. Według danych Unii Europejskiej w 2019 r. spożycie mięsa drobiowego kształtowało się na poziomie 11,834 tys. t rocznie, a w 2020 wzrosło do 12,225 tys. t. Znaczne zwiększenie produkcji mięsa drobiowego może skutkować pogorszeniem warunków chowu drobiu (przede wszystkim warunków higienicznych) oraz obniżeniem jakości jego przetwórstwa i łańcucha dostaw, a to stwarza zagrożenie w postaci wzrostu liczby zarażonych pokarmowych wywoływanych przez bakterie *Salmonella*. Głównym źródłem pałeczek *Salmonella* jest bowiem drób, a dominujące serotypy to *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium.

Tabela 3. Liczba powiadomień dotyczących wykrycia patogenów drobnoustrojów w mięsie drobiowym według raportów wygenerowanych przez RASFF-Portal z okresu 01.01.2019 - 31.12.2020

Table 3. Number of notifications regarding detection of pathogens in poultry meat according to reports from the period 01.01.2019 - 31.12.2020 generated by RASFF-Portal

Patogeny / Pathogens	2019	2020	Suma / Total	[%]
<i>Salmonella</i>	321	428	749	95
<i>Listeria monocytogenes</i>	16	22	38	8,4
<i>Campylobacter</i>	3	0	3	0,4
<i>Escherichia coli</i>	0	1	1	0,1

W ostatnich latach w wielu krajach, w tym w Polsce, obserwuje się poprawę sytuacji epidemiologicznej dotyczącej salmonellozy, pomimo to pałeczki *Salmonella ente-*

rica subsp. enterica są w dalszym ciągu jedną z głównych przyczyn zakażeń i zatruc pokarmowych pochodzenia bakteryjnego. Stanowi ona główną przyczynę chorób bakteryjnych, które przenoszone są przez zanieczyszczoną żywność [6]. Według danych Zakładu Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru oraz Departamentu Przeciwdemicznego i Ochrony Sanitarnej Granic GIS w Polsce w 2019 r. liczba zachorowań na salmonellozę osiągnęła 9234 tys., natomiast w 2020 r. – 5270 tys.

Ze względu na przebieg choroby, jak również późniejsze nosicielstwo tej bakterii, wzrost liczby zakażeń pałeczkami *Salmonella* jest szczególnie niepożądanym zjawiskiem. W celu eliminowania rozprzestrzeniania się oraz namnażania tych drobnoustrojów należy regularnie poddawać dokładnemu czyszczeniu i dezynfekcji powierzchnie, które mają bezpośredni kontakt z żywnością. Kolejnym sposobem zapobiegania zanieczyszczeniom jest przestrzeganie warunków higienicznych urządzeń chłodniczych i zamrażalniczych oraz środków transportu.

Listeria monocytogenes jest patogenem przenoszonym przez zanieczyszczoną żywność i odpowiada za ciężkie infekcje, m.in. zapalenie opon mózgowych oraz poronienia występujące zarówno wśród ludzi, jak i zwierząt [22]. Bakterię tę uznaje się za szczególnie niebezpieczną, gdyż jest zdolna do przenikania przez łożysko do płodu. Skutkiem tego może być zapalenie układu rozrodczego, a nawet obumarcie zarodka. Do najważniejszych źródeł *L. monocytogenes* należą przede wszystkim próżniowo pakowane wędliny (zanieczyszczone tą bakterią we wcześniejszych etapach produkcji), a także surowe mięso czy mrożonki. Najskuteczniejszą ochroną przed listeriozą jest przestrzeganie zasad higieny produkcji oraz odpowiednie przechowywanie produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego [7].

Wyniki dotyczące wykrycia *L. monocytogenes* w mięsie drobiowym w okresie 2019 - 2020 wskazują, że tylko w 8,4 % powiadomień informowano o jej obecności. Stwierdzono ją głównie w surowym mięsie oraz produktach gotowych z mięsa drobiowego, natomiast bakterie z rodzaju *Campylobacter* (*jejuni*, *coli* i spp.) oraz *Escherichia coli* były sporadycznie wykrywane w mięsie drobiowym (< 0,5 % wszystkich zgłoszeń) – tab. 3.

W badaniach przeprowadzonych przez Majewskiego i Dziubdzielę [16] *L. monocytogenes* została wykryta cztery razy, zarówno w surowym mięsie, jak i w produktach gotowych do spożycia. Z kolei według Stawczyka i wsp. [26] 15,7 % zgłoszeń dotyczyło wykrycia obecności *L. monocytogenes* głównie w surowym mięsie oraz wyrobach wieprzowych i wołowych, a tylko 4,17 % wszystkich zgłoszeń w analizowanym przedziale czasu dotyczyło obecności drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* (*jejuni*, *coli* i spp.). Zgłoszenia dotyczące produktów mrożonych, wędzonych, zanieczyszczonych enteropatogennymi bakteriami *Escherichia coli* stanowiły 1,57 % ogólnej liczby powiadomień. Zgłoszeń, które dotyczyły również *E. coli*, ale produkujących

inną toksynę, było natomiast 29,78 %. Przypadki te obejmowały również nietypowe produkty, takie jak skażone mięso kangura pochodzące z Australii.

W ciągu ostatnich trzech dziesięcioleci można zaobserwować pojawienie się coraz większej liczby gatunków należących do rodzaju *Campylobacter*, które stanowią duże zagrożenie dla zdrowia ludzkiego ze względu na możliwość wywołania ostrego bakteryjnego zapalenia jelit. Drób jest głównym źródłem przenoszenia kampylobakteriozy na ludzi, jednak bardzo częstymi czynnikami ryzyka zakażenia jest m.in. spożycie zanieczyszczonych produktów pochodzenia zwierzęcego oraz kontakt z chorymi zwierzętami czy podróżami międzynarodowymi [9].

Zgłoszenia dotyczące produktów z mięsa drobiowego zanieczyszczonych enteropatogennymi bakteriami *Escherichia coli* w badaniach własnych stanowiły 0,1 % ogólnej liczby powiadomień. *E. coli* jest dominującą niepatogenną fakultatywną florą jelita człowieka. Mimo tego niektóre szczepy tej bakterii wykazują również zdolność do wywoływania chorób układu pokarmowego, moczowego lub ośrodkowego układu nerwowego [17]. Enterotoksyczne (ETEC) szczepy *E. coli* są odpowiedzialne w 80 % za chorobę zwaną biegunką podróżnych. Najbardziej powszechną drogą zakażenia jest zanieczyszczona żywność, jak również niedokładna higiena rąk, zwłaszcza przed spożyciem posiłków [16].

Wnioski

1. W okresie 01.01.2019 - 31.12.2020 na terenie krajów Unii Europejskiej odnotowano łącznie 791 powiadomień dotyczących potencjalnie niebezpiecznego mięsa drobiowego oraz produktów z mięsa drobiowego. W 2019 r. liczba ta wynosiła 340, natomiast w 2020 r. – 451.
2. Polska znajduje się w czołówce krajów, z których pochodziło mięso drobiowe i produkty drobiowe zgłoszone w RASFF-Portal jako niebezpieczne. Produkty te stanowiły 16,3 % wszystkich zgłoszeń w latach 2019 - 2020. Należy jednak uwzględnić, że Polska jest znaczącym producentem oraz eksporterem mięsa drobiowego, co zwiększa skalę zjawiska.
3. Największym zagrożeniem były drobnoustroje z rodzaju *Salmonella*, której obecność dotyczyła aż 95 % wszystkich zgłoszeń dotyczących mięsa i przetworów z drobiu.
4. Mimo pandemii COVID-19, jak również ptasiej grypy, w badanym okresie nie stwierdzono zmniejszenia spożycia i eksportu tego rodzaju mięsa, a w mięsie odnotowano występowanie mikroorganizmów chorobotwórczych zagrażających życiu ludzkiemu.
5. Potwierdzono również zależność pomiędzy produkcją mięsa drobiowego a obecnością w nim patogenów chorobotwórczych. Wraz ze wzrostem produkcji zauważalny był wzrost wykrywania większej liczby mikroorganizmów chorobotwórczych.

6. Liczba zgłoszeń dotyczących zagrożeń mikrobiologicznych występujących w mięsie drobiowym oraz jego produktach była znacząca, jednak w odniesieniu do wielkości produkcji i spożycia tych produktów można stwierdzić, że bezpieczeństwo mikrobiologiczne drobiu oraz produktów drobiowych dostępnych na rynku europejskim plasuje się na wysokim poziomie.

Literatura

- [1] Augustyńska-Prejsnar A., Ormian M., Sokołowicz Z.: Cechy kształtujące jakość mięsa drobiowego. *Post. Tech. Przetw. Spoż.*, 2018, 2, 90-94.
- [2] Brenner F.W., Villar V.G., Agnulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B.: *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38 (7), 2465-2467.
- [3] Buszkowska M., Sadowski T., Gadomska J.: System wczesnego ostrzegania dotyczący żywności i pasz. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 2014, 3 (95), 550-555.
- [4] Ciecierska M., Sobocińska M.: Analiza zagrożeń fizycznych występujących w żywności na podstawie raportów Systemu Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznych Produktach Żywnościowych i Środkach Żywienia Zwierząt z lat 2008 - 2012. *Post. Tech. Przetw. Spoż.*, 2013, 2, 109-112.
- [5] Ćwiek-Ludwicka K., Stelmach A., Półtorak A.: Bezpieczeństwo wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością w systemie RASFF. *Rocz. PZH*, 2007, 4 (58), 599-607.
- [6] D'Aoust J.Y., Maurer J.: *Salmonella* Species. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 3rd ed. Eds. M.P. Doyle and L.R. Beuchat. ASM Press, Washington 2007, pp. 187-236.
- [7] Gliński Z., Kostro K.: Listerioza współczesnym zagrożeniem. *Życie Weterynaryjne*, 2012, 7 (87), 577-581.
- [8] Johnson J.L., Doyle M.P., Cassens R.G.: *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. *J. Food Prot.*, 1990, 1 (53), 81-91.
- [9] Kaakoush N.O., Castano-Rodríguez N., Mitchell H.M., Ming Man S.: Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, 28 (3), 687-720.
- [10] Koo H.-J., Woo G.J.: Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 145, 407-413.
- [11] Kowal K.: *Salmonella* w mięsie drobiowym. *Przemysł Spożywczy*, 2015, 69 (11), 9-11.
- [12] Kwasek M.: Tendencje w spożyciu mięsa na świecie. *Roczniki Ekonomiczne Kujawsko-Pomorskiej Szkoły Wyższej w Bydgoszczy*, 2013, 6, 265-284.
- [13] Ledzion E., Postupolski J., Rybińska K., Kurpińska-Jaworska J., Szczęsna M., Karłowski K.: System RASFF jako element strategii bezpieczeństwa żywności w zakresie mikotoksyn. *Bromatol. Chemia. Toksykol.*, 2010, 4, 533-538.
- [14] Mach T.: Biegunka podróżnych. *Gastroenterologia Kliniczna*, 2013, 3 (3), 121-126.
- [15] Maćkiw E., Stasiak M., Kowalska J., Kucharek K.: Jakość mikrobiologiczna żywności w krajach Unii Europejskiej. *Doniesienia RASFF. Przemysł Spożywczy*, 2017, 71 (11), 16-19.
- [16] Majewski M., Dziubdziela L.: Analiza powiadomień dotyczących żywności pochodzenia zwierzęcego zgłoszonych do RASFF przez Polskę. *Życie Weterynaryjne*, 2018, 3 (93), 181-183.
- [17] Michalska-Požoga I.: System RASFF a bezpieczeństwo żywności i żywienia w Unii Europejskiej. *Inżynieria Przetwórstwa Spożywczego*, 2013, 2/4 (6), 37-41.
- [18] Moorea J.E., Corcoran D., Dooley J., Fanning S., Lucey B., Matsuda M., McDowell D.A., Mégraud F., Millar B.CH., O'Mahony R., O'Riordan L., O'Rourke M., Rao J.R., Rooney P.J., Sails A., Whyte P.: *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 2005, 3 (36), 351-382.


- [19] Mroczek R.: Rynek mięsa w Polsce w dobie koronawirusa SARS-Cov-2. Zesz. Nauk. SGGW w Warszawie - Problemy Rolnictwa Światowego, 2020, 3, 53-65.
- [20] Nataro J.P., Kaper J.B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., 1998, 11 (1), 142-201.
- [21] Nowak M., Trziszka T.: Zachowania konsumentów na rynku mięsa drobiowego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2010, 1 (68), 114-120.
- [22] Pałkowska A.: Wpływ kontroli monitorowania warunków przechowywania i dostaw na optymalizację jakości mikrobiologicznej mięsa. Zesz. Nauk. AM w Gdyni, 2013, 80, 43-50.
- [23] Protasiewicz M., Iwaniak A.: Alergie pokarmowe i alergeny żywności. Bromatol. Chemia Toksykol., 2014, 2 (XLVII), 121-129.
- [24] Ragon M., Wirth T., Hollandt F., Lavenir R., Lecuit M., Le Monnier A., Brisse S.: A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. PLOS Pathogens, 2008, 4(9), #e1000146.
- [25] Rogalska Z.: Co w RASFF-ie piszczy? Przegląd powiadomień z 2016 roku. Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, 2016, 461, 188-198.
- [26] Stawczyk D., Libera J., Stasiak D.M.: Jakość produktów mięsnych pochodzących z krajów UE według raportów RASFF w okresie 2015 - 2018. Przegląd badań z zakresu żywienia i technologii żywności. W: Przegląd badań z zakresu żywienia i technologii żywności. Red. K. Maciąg i M. Maciąg. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2019, ss. 138-149.
- [27] Szczepańska B., Andrzejewska M., Śpica D., Klawe J.: *Campylobacter* spp. – niedoceniany w Polsce czynnik etiologiczny zakażeń przewodu pokarmowego. Problemy Higieny i Epidemiologii, 2014, 3 (95), 574-579.
- [28] Szosland-Fałtyń A., Bartodziejska B.: Nowe zagrożenia mikrobiologiczne mięsa drobiowego. [online]. FoodFakty, 2015. Dostęp w Internecie [6.08.2020]: <https://foodfakty.pl/nowe-zagrozenia-mikrobiologiczne-miesa-drobiowego>

MICROBIOLOGICAL SAFETY OF POULTRY MEAT IN EU COUNTRIES IN 2019 - 2020

Summary

The most critical health risks in the poultry production include, among others, microbial contamination, residues of chemical contamination and drugs, as well as physical contaminants. Poultry meat is valued primarily as a source of wholesome proteins of animal origin. Its high nutritional value derives from the varied and valuable amino acid composition. In addition to proteins this meat provides lipids, macro- and microelements, and vitamins. The nutritional value of poultry meat and its affordable price contribute to an increased demand for this raw material and its preparations among consumers. A consequence of the increase in the poultry meat production may be sometimes non-compliance with appropriate production standards, which generates a higher likelihood of contamination with pathogenic microorganisms or their toxins.

The objective of the research study was to assess the microbiological safety of poultry meat and poultry meat products available on the European Union market based on the notifications of the two years (2019 - 2020), that were generated by RASFF-Portal. As a result of the analysis it was found, that the dominant part of those notifications (as much as 95 %) involved the detection of presence of *Salmonella* bacteria in poultry meat and it was the main, most frequently recorded microbiological problem. In the EU countries new strategies were developed and comprehensive schemes were introduced to administratively combat salmonellosis. Implemented in the country salmonellosis combating schemes have already triggered positive changes, so that this problem has been increasingly overcome every year.

Key words: poultry meat, microbiological risk, safety, RASFF 

JOANNA MARKOWSKA, ELŻBIETA POLAK, ANNA DRABENT,
ALEKSANDRA ŻAK

KONOPIE SIEWNE *CANNABIS SATIVA* L. – ODMIANY, WŁAŚCIWOŚCI, ZASTOSOWANIE

Streszczenie

Konopie siewne (*Cannabis sativa* L.) to starożytne rośliny uprawne o wielu zastosowaniach, pochodzące z Azji Środkowej. W pracy przedstawiono przegląd piśmiennictwa dotyczącego konopi, związków czynnych w nich zawartych, aktywności biologicznej, właściwości leczniczych oraz możliwości wykorzystania w medycynie i żywności. Szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym znajdują nasiona konopne, które są dobrym źródłem białka, błonnika, witaminy E, żelaza, wapnia, cynku, fosforu i magnezu. Za smak i zapach konopi odpowiedzialne są węglowodory terpenowe, głównie β -kariofilen i α -humulen (seskwiterpeny) oraz monoterpen, mircen. Obecnie głównym obiektem zainteresowania przemysłu jest tłoczony z nasion olej bogaty w tokoferole, fitosterole, karotenoidy, polifenole i fosfolipidy. Olej konopny zawiera ponad 80 % NNKT, w tym kwasy γ -linolenowy (GLA), linolowy i α -linolenowy, przy optymalnym stosunku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6 do omega-3 w proporcji 3 : 1. Stosowanie oleju w technologii żywności jest ograniczone ze względu na intensywną jego barwę i smak. Inne związki aktywnie czynne identyfikowane w *Cannabis sativa* L. reprezentowane są przez kannabinoidy, dihydrostilbeny i spiroindany. Kannabinoidy charakteryzują się właściwościami przeciwzapalnymi, przeciwbakteryjnymi, przeciwbólowymi i przeciwdepresyjnymi. Produkty z nasion konopnych stanowią dodatki do herbat, kawy, wyrobów czekoladowych, napojów mlecznych, pieczywa i wyrobów cukierniczych, a także piwa, wina, miodu czy produktów dla sportowców. W artykule omówiono także wymagania prawne związane z możliwością zastosowań kannabinoidów w żywności oraz wprowadzaniem produktów spożywczych z ich udziałem do obrotu towarowego.

Słowa kluczowe: konopie siewne, kannabinoidy, THC, CBD, zastosowanie lecznicze i w żywności

Wprowadzenie

Od kilku lat obserwuje się wzrost zainteresowania żywieniowymi, użytkowymi i leczniczymi właściwościami konopi *Cannabis sativa* L. Rośliny te przez tysiące lat

Dr inż. J. Markowska, dr inż. E. Polak, mgr inż. A. Drabent, mgr inż. A. Żak, Zakład Technologii i Techniki Chłodnictwa, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź. Kontakt: joanna.markowska@ibprs.pl

miały znaczącą pozycję w żywieniu i medycynie ludowej. Sprzedaż produktów konopnych w USA w 2017 roku wyniosła 820 milionów dolarów. Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych w raporcie z 2019 r. przewiduje wzrost sprzedaży o 104 miliony dolarów do 2022 r. [37]. Prognozy wskazują, że rynek produktów certyfikowanych, pochodzących ze źródeł tzw. legalnych, do 2025 r. wzrośnie aż o 77 % i osiągnie wartość 166 mld dolarów [18].

Pierwsze wzmianki o użytkowaniu konopi spotyka się w chińskim rękopisie pochodzącym z XXVIII w. p.n.e. Przypuszcza się, że konopie były najstarszymi roślinami włóknistymi uprawianymi przez Japończyków, Mongołów i Tatarów. Prawdopodobnie gatunek *Cannabis* pochodzi z Azji Centralnej, skąd rozprzestrzenił się na tereny Azji Wschodniej i Południowej oraz na zachód do Europy [11, 25]. Obecnie konopie uprawiane są w ok. 30 krajach w Europie, Azji oraz Ameryce Północnej i Południowej [25]. Według danych Organizacji Narodów Zjednoczonych ogólnoswiatowy areal upraw konopi szacuje się na ok. 70 819 ha. Dane te nie obejmują jednak wszystkich krajów, w tym Kanady, która jest głównym producentem i eksporterem konopi. Całkowita wielkość upraw we wszystkich krajach europejskich wynosi ponad 28 327 ha, co stanowi ok. dwóch trzecich światowej produkcji zgłoszonej przez ONZ. Większość jest skupiona we Francji, Holandii, na Litwie i w Rumunii. Inne kraje z aktywnymi producentami konopi i/lub rynkami konsumenckimi to: Australia, Nowa Zelandia, Indie, Japonia, Korea, Turcja, Egipt, Chile i Tajlandia [25]. Produkcja obejmuje zarówno nasiona konopi, jak i odpady pouprawowe. Skład nasion może ulegać zmianom w zależności od odmiany, roku zbiorów, warunków klimatycznych czy lokalnych czynników agronomicznych [23]. Staroindyjska literatura wymienia konopie jako lecznicze rośliny narkotyczne. Z łodyg osobników męskich konopi pozyskiwano miękkie, trwałe, zbliżone do lnianego włókno, z którego wyrabiano tkaniny. Włókno z osobników żeńskich, jako grube, trwałe, niegnijące w wodzie, służyło za surowiec do wyrobu lin, powrozów, sznurów, dratwy, sprzętu rybackiego i olinowania statków, a także tkanin namiotowych, pędzli, uprząży i materiałów opatrunkowych. Z nasion pozyskiwano olej używany do oświetlenia, produkcji mydła, pokostu, farb i lakierów. Olej rafinowany używany był bezpośrednio do konsumpcji, a wytloki jako pasza treściwa dla zwierząt gospodarskich [7, 12, 44]. Uprawy konopi pozwalają na uzyskanie plonu słomy (suchej masy) w ilości ok. 10 t z 1 ha, z której uzyskać można ok. 2,5 t wysokiej jakości, długowłóknistej masy celulozowej. Biorąc pod uwagę wzrost populacji i związany z tym wzrost zapotrzebowania na celulozę (prawdopodobnie dwukrotny w ciągu najbliższych 30 lat), można przewidywać, że w najbliższych latach stale utrzymywać się będzie trend zainteresowania konopiami, zwłaszcza z uwagi na konieczność ograniczania wycinki lasów [27]. Wzrasta też zainteresowanie konopiami wśród producentów kosmetyków, żywności oraz suplementów diety [8].

Klasyfikacja konopi

Konopie siewne (*Cannabis sativa* L.) to jednoroczne, dwupienne rośliny należące do rzędu różowców (*Rosales*) z rodziny konopiowatych (*Cannabaceae*) [21]. Wyróżnia się 3 podgatunki konopi: *Cannabis sativa* subsp. *indica* (Lam.) E. Small and A. Cronquist, *Cannabis sativa* subsp. *sativa*, *Cannabis sativa* var. *ruderalis* (Janisch.) S.Z. Liou.

Konopie należą do najwcześniej uprawianych gatunków roślin [32]. Odmiany botaniczne różnią się składem chemicznym, morfologią roślin, agronomią i przydatnością do przetwórstwa przemysłowego (konopie przemysłowe) oraz farmaceutycznego (konopie medyczne) [64]. Za zapach konopi odpowiedzialne są związki terpenowe. One też w charakterystyczny sposób przyczyniają się do wyjątkowych właściwości smakowych produktów z konopi [5, 39]. Największa zawartość związków lotnych występuje w wiechach konopnych, a najmniejsza w łodygach, co jest zgodne z rozmieszczeniem gruczołów włoskowatych w roślinie. Głównymi węglowodorami seskwiterpenowymi są: β -kariofilen i α -humulen, a monoterpenowymi – mircen oraz α - i β -pinen [5]. Terpeny zawarte w konopiach wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i uspokajające [51].

Podgatunki *Cannabis sativa* subsp. *indica* (zwane konopiami indyjskimi, marihuaną) oraz *Cannabis sativa* subsp. *sativa* (zwane też konopiami włóknistymi) znalazły wiele zastosowań w medycynie. Znaczenie konopi indyjskich w tym sektorze gwałtownie wzrosło, gdy tzw. medyczna marihuana została zalegalizowana w ponad połowie stanów USA oraz w Australii, Kanadzie, Niemczech, RPA czy Urugwaju. Zmiany legislacyjne uitorowały drogę do rozwoju przemysłu konopnego, który jest jednym z najszybciej rozwijających się rynków na świecie [64].

Z powodu podobieństw pomiędzy konopiami włóknistymi a konopiami indyjskimi (o właściwościach narkotycznych) w większości krajów całkowicie zabroniono uprawy tych roślin. Jednak na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat wiele krajów ponownie zalegalizowało uprawę konopi włóknistych, przyczyniając się do rozwoju badań nad ich właściwościami zdrowotnymi [50, 56]. W Polsce uprawa tego rodzaju konopi jest dozwolona wyłącznie na potrzeby przemysłu włókienniczego, chemicznego, celulozowo-papierniczego, spożywczego, kosmetycznego, farmaceutycznego, materiałów budowlanych oraz nasiennictwa. Zakaz dotyczy uprawy i zbioru ziela lub żywicy konopi innych niż włókniste, przy czym wyjątek stanowią badania naukowe [61]. W Rejestrze Krajowym Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU) i we wspólnym Katalogu Odmian (CCA) znajduje się 7 odmian konopi włóknistych wyhodowanych w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu o nazwach: Białobrzeskie, Beniko, Tygra, Wielkopolskie, Wojko, Rajan, Henola. Są to konopie krajowe, jednopienne, typowo włókniste, tzn. zawierające mniej niż 0,2 % substancji psychoaktywnych w suchej masie ziela, o okresie wege-

tacji dostosowanym do rodzimych warunków klimatyczno-glebowych [27]. Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich posiada kolekcję składającą się ze 150 genotypów, w tym jednopiennych i dwupiennych form konopi, pochodzących z różnych regionów świata, lokalnych ekotypów i linii hodowlanych o stabilnym genotypie, unikalnych pod względem plenności, zawartości psychoaktywnego kannabinoidu – $\Delta 9$ -tetrahydrokannabinolu ($\Delta 9$ -THC lub THC), błonnika, a także kwasów tłuszczowych [36].

Charakterystyka nasion

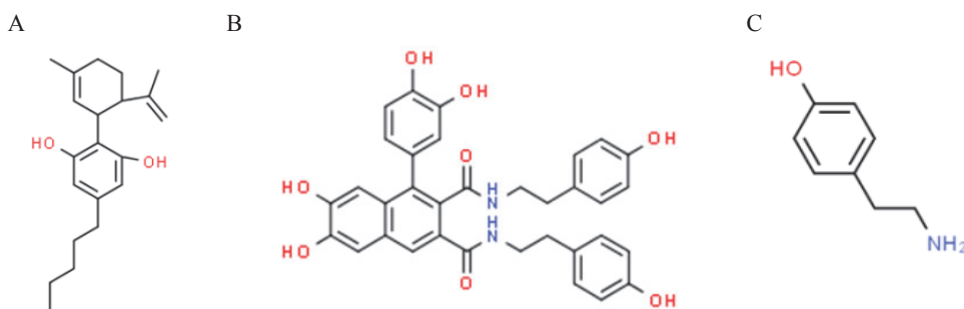
Konopie przemysłowe są uprawiane głównie na nasiona, używane do produkcji oleju konopnego i włókien konopnych mających zastosowanie w przemyśle. Nasiona zawierają cenne składniki odżywcze. Są bogatym źródłem białka (20 ÷ 25 %), węglowodanów (20 ÷ 30 %), na które składa się w większości błonnik (głównie nierozpuszczalny), tłuszczów (25 ÷ 35 %) o korzystnym profilu kwasów tłuszczowych i pożądanym stosunku kwasów omega-6 do omega-3 oraz innych biozwiązków (10 ÷ 15 %) [1, 10, 47, 50, 58]. Nasiona konopi zawierają wiele makro- i mikroelementów, takich jak: fosfor (11,2 ÷ 11,6 g·kg⁻¹), cynk (42,0 ÷ 94,0 mg·kg⁻¹), potas (4,63 ÷ 28,2 g·kg⁻¹), magnez (2,37 ÷ 6,94 g·kg⁻¹), wapń (1,44 ÷ 9,55 g·kg⁻¹), żelazo (1,13 ÷ 2,40 mg·kg⁻¹) [15, 23, 30, 42, 64].

Białko w nasionach konopi zlokalizowane jest głównie w wewnętrznych jego częściach, co zostało stwierdzone na podstawie większej jego zawartości w nasionach łuskanych niż niełuskanych [1, 20, 63]. Podstawowym białkiem nasion konopi jest edestyna (klasyfikowana do legumin), która stanowi 67 ÷ 75 % wszystkich białek zawartych w tych nasionach. W znacznych ilościach występują także albuminy (25 ÷ 37 %) [6, 7, 35]. Białko nasion konopi zasługuje na uwagę, gdyż zawiera wszystkie niezbędne aminokwasy, w tym znaczne ilości argininy i kwasu glutaminowego oraz metioniny i cysteiny [7, 30]. W porównaniu ze wzorcem zapotrzebowania na aminokwasy dla dzieci szkolnych zaproponowanym przez FAO/WHO (tzw. białko referencyjne) w nasionach w niedomiarze znajduje się lizyna, a także w mniejszym stopniu leucyna i tryptofan [20]. Białka nasion konopi są także wysokostrawne [7, 30]. Strawność białek determinowana jest przez ich strukturę, zawartość składników przeciwodżywczych oraz obróbkę wysokotemperaturową [20]. Białko niełuskanych nasion konopi charakteryzuje się strawnością na poziomie 85 %, natomiast łuskanych – 90,8 ÷ 97,5 %. Dla porównania strawność kazeiny wynosi 97,6 %. Włókna zawarte w łusce są prawdopodobnie przyczyną zmniejszenia strawności białek [20].

Girgih i wsp. [17] wykazali, że peptydy nasion konopi uczestniczą we wzmocnieniu systemu ochronnego enzymów antyoksydacyjnych, neutralizowaniu rodników i hamowaniu peroksydacji lipidów. Dodatek hydrolizatu białka z nasion konopi włók-

nistych do diety zwierząt może mieć działanie przeciwutleniające i potencjalnie terapeutyczne [64].

Do biozwiązków nasion konopi należą karotenoidy, związki fenolowe, tokoferole, fitosterole oraz peptydy [15, 23, 30, 42, 64]. Karotenoidy w nasionach konopi to przede wszystkim luteina oraz β -karoten i zeaksantyna w mniejszych ilościach [23]. Profil fenolowy tworzą głównie, zaliczane do lignanów, lignanoamidy i amidy fenolowe, a oprócz nich flawonoidy, takie jak: izoflawony, flawonole, flawanony, flawanole. Irakli i wsp. [23] stwierdzili, że dominującym amidem fenolowym jest *N-trans*-caffeoiltryamina, natomiast kannabizyna A jest dominującym lignanoamidem (rys. 1). Worobiej i wsp. [63] dowiedli, że zawartość polifenoli była większa w nasionach niełuskanych niż w łuskanych, a najwięcej tych związków odnotowali w mące konopnej.



Objaśnienia / Explanatory notes:

A – kannabidiol (CBD) / cannabidiol (CBD), B – kannabizyna A / cannabisin A, C – caffeoiltryamina / caffeoyltyramine.

Rys. 1. Struktury chemiczne wybranych związków biologicznie czynnych konopi przemysłowych

Fig. 1. Chemical structures of selected biologically active compounds of industrial hemp

Źródło / Source: [51]

Niewiele publikacji naukowych poświęcono tematyce związków przeciwżywniowych zawartych w nasionach konopi. Russo i Reggiani [52] wykazali obecność kwasu fitynowego, skondensowanych tanin, inhibitorów trypsyny, saponin i glikozydów cyjanogennych w mące pozyskanej przez mielenie i odfuszczenie nasion sześciu odmian z terenów Włoch i Francji. Poziom glikozydów cyjanogennych w trzech z przebadanych odmian autorzy określili jako zbyt wysoki i szkodliwy dla zdrowia. Zawartość kwasu fitynowego wynosiła $6 \div 7$ %, a np. soja zawiera 2 % tego kwasu. Zawartość saponin obecnych w nasionach scharakteryzowano jako mniejszą niż w nasionach soi [52]. Pojić i wsp. [45] w mące pozyskanej z mielenia odpadów po produkcji oleju konopnego zidentyfikowali inhibitory trypsyny, kwas fitynowy oraz skondensowane taniny, jednak ich ilość była mniejsza niż w próbkach, które przebadali Russo i Reggiani [52]. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, że próbki pochodzi-

ły z różnych rejonów Europy [45]. Przeciwwywniowe właściwości kwasu fitynowego wynikają z jego zdolności do zmniejszania biodostępności kationów magnezu i wapnia przez chelatowanie ich w kompleksy nierozpuszczalne w przewodzie pokarmowym. Kwas fitynowy może także doprowadzić do zmniejszenia strawności skrobi i białek poprzez hamowanie działania enzymów trawiennych, jak: pepsyna, trypsyna, β -glukozydaza i α -amylaza. Glikozydy cyjanogenne stają się natomiast niebezpieczne, kiedy dojdzie do kontaktu ich cząsteczki z β -glukozydazą. Pod jej wpływem z cząsteczki uwalniany jest cyjanek, który doprowadza do zniszczeń i nekrozy tkanek przez uniemożliwienie wykorzystania tlenu obecnego we krwi [14].

Olej z nasion konopi

Nasiona konopi bogate są w tłuszcze, a pozyskuje się je w postaci oleju. W aspekcie zastosowań przemysłowych tłuszcze stanowią najważniejszy składnik nasion [15]. Nierafinowany olej konopny ma ciemnozielone zabarwienie, które zawdzięcza obecności chlorofilu [35]. Zawartość oleju w nasionach, jego skład i jakość uzależnione są od czynników środowiskowych, takich jak: obszar uprawy, zabiegi agrotechniczne, odmiana, sposób przetwórstwa czy warunki przechowywania [29]. Kiralan i wsp. [29] wykazali, że zawartość tłuszczu w nasionach konopi pozyskanych z siedmiu prowincji w północno-zachodniej Turcji wahała się w zakresie $29,61 \div 36,47\%$, w zależności od rejonu upraw. Dwie próbki o największej zawartości tego składnika pochodziły z rejonów o umiarkowanym klimacie z zimną zimą i gorącym latem, natomiast próbka z najmniejszą zawartością pochodziła z rejonu wilgotnego z łagodnym klimatem [29]. W badaniach olejów konopnych dostępnych w Chorwacji stwierdzono, że zawartość kannabidiolu (CBD) wynosiła $4 \div 240 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Δ -9-tetrahydrokannabinolu (THC) – $3 \div 69,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a kannabinolu (CBN) – $2 \div 8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [44]. Świadczy to o dużej zmienności składu, chociaż wiele odmian przemysłowych jest źródłem oleju o wysokiej zawartości CBD [44].

Olej z nasion konopi charakteryzuje się bardzo korzystnym profilem kwasów tłuszczowych o małej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) i dużej – kwasów nienasyconych (PUFA) [29, 30]. Stosunek PUFA/SFA w produktach żywnościowych służy za wyznacznik ich wpływu na zdrowie układu sercowo-naczyniowego. Kwasy PUFA wpływają na zmniejszenie poziomu cholesterolu, natomiast SFA powodują jego zwiększenie, dlatego im wyższy jest ten indeks, tym jest to korzystniejsze [10]. Zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych w nasionach konopi oceniana jest na ok. 10% [29]. Irakli i wsp. [23] zbadali siedem odmian przemysłowych nasion konopi i odnotowali, że głównym SFA był kwas palmitynowy ($7,1 \div 9,1\%$), następnie kwas stearynowy ($2,1 \div 2,8\%$), a w mniejszych ilościach występowały kwasy: arachidowy, behenowy i lignocenowy. Najważniejszym kwasem jednonienasyconym był kwas oleinowy ($10,3 \div 17,9\%$). Stwierdzono również obecność kwasu eikozenowego

w małych ilościach. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe reprezentowane były przede wszystkim przez kwas linolowy (51,6 ÷ 54,2 %) oraz kwas α -linolenowy (10,5 ÷ 15,3 %), a w mniejszych ilościach – γ -linolenowy (1,9 ÷ 5,0 %) [23]. Kiralan i wsp. [29] uzyskali podobne wyniki odnoszące się do olejów z nasion konopi z północno-zachodniej Turcji. Kwas linolowy określili na poziomie 55,42 ÷ 56,94 %, α -linolenowy – 16,51 ÷ 20,40 %. Potwierdzili obecność niewielkich ilości kwasów γ -linolenowego (0,64 ÷ 1,10 %) i stearydynowego (0,34 ÷ 0,47 %). Chen i Liu [10] oraz Kiralan i wsp. [29] podają, że zawartość kwasu γ -linolenowego jest większa w ziarnach pochodzących z upraw z rejonów o klimacie umiarkowanym i zimnym niż tych pochodzących z obszarów o klimacie łagodnym i ciepłym. Zdaniem wymienionych autorów zawartość kwasu oleinowego oscylowała w granicach 11,40 ÷ 15,88 %, a stosunek PUFA/SFA wynosił 8,6 ÷ 9,7. Dla porównania PUFA/SFA oleju słonecznikowego mieści się w zakresie 4,75 ÷ 4,94.

Inną zaletą oleju konopnego jest korzystny stosunek kwasów omega-6 (kwasu linolowego) do kwasów omega-3 (kwasu α -linolenowego) [13, 16, 29]. Stosunek ten, szacowany na 3 : 1, może się zmieniać w zależności od szeregu czynników, w tym genotypu rośliny czy roku zbiorów [22, 41]. Irakli i wsp. [23] wykazali, że może wynosić 3,9 ÷ 5,5, natomiast Kiralan i wsp. [29] odnotowali 2,8 ÷ 3,4 i ich zdaniem jest on zależny od metody tłoczenia. Z tego względu zaleca się tłoczenie oleju na zimno w celu zachowania jego najkorzystniejszych proporcji [23, 29, 55].

W oleju konopnym, w ilości mniejszej niż 2 %, występują frakcje niezmydlające zawierające tokoferole, fitol oraz w ok. 15 % fitosterole [34]. Spośród tokoferoli wyróżnia się izomery γ (w przewodzie) oraz δ , α i β [3, 62]. Fitosterole reprezentowane są przez β -sitosterol. Związek ten wykazuje wysoką efektywność w hamowaniu wchłaniania cholesterolu, a co ważne, aktywność ta nie ulega zmniejszeniu nawet przy długotrwałym podawaniu związku. Brak toksyczności, niewielkie lub żadne skutki uboczne sprawiają, że β -sitosterol jest związkiem stosowanym w przypadku długotrwałej terapii zmniejszającej poziom cholesterolu [35].

Dzięki obecności kwasu γ -linolenowego (GLA) – do 4 % – będącego cennym składnikiem nowoczesnych diet oraz znacznej ilości kwasu linolowego i α -linolenowego, a także optymalnemu stosunkowi wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6 do omega-3 olej konopny ma wielostronne zastosowanie jako środek spożywczy, farmaceutyczny i kosmetyczny, a także do produkcji tuszu do drukarek, środków do konserwacji drewna czy detergentów [27, 42]. Zabieg mikrofalowy zwiększa stężenie karotenoidów i innych barwników w oleju z nasion konopi, jednocześnie obniżając jego liczbę anizydynową. Olej z nasion konopi charakteryzuje się dużą stabilnością kinetyczną podczas grzania i chłodzenia [42].

Fitochemia konopi

Właściwości lecznicze konopi i pochodnych są szeroko rozpowszechnione i nadal wzbudzają wiele kontrowersji. W badaniach przedklinicznych wykazano, że marihuana lecznicza zapewnia korzyści zdrowotne, ma właściwości przeciwbólowe, łagodzi cierpienie pacjentów, którzy doświadczają przewlekłego bólu [40, 63]. W *Cannabis sativa L.* zidentyfikowano ponad 500 związków z różnych grup, jak: flawonoidy, dihydrostilbeny, fenantreny, spiroindany, ale najbardziej charakterystyczne dla tej rośliny są kannabinoidy (CD) [16, 33, 54].

Kannabinoidy

Konopie zawierają ok. 60 kannabinoidów i ponad 140 terpenów [16, 33, 54]. Kannabinoidy, wydzielane przez gruczoły włosnikowe znajdujące się głównie na powierzchni liści, nazywane są egzokannabinoidami lub fitokannabinoidami. W latach 50. XIX w. wyizolowano z konopi pierwsze kannabinoidy – kannabinol (CBN) (budowa chemiczna została poznana dopiero w latach 30. ubiegłego wieku) i kannabidiol (CBD). W późniejszych latach zidentyfikowano m.in. Δ^9 -tetrahydrokannabinol (THC), kannabigerol (CBG), kannabichromen (CBC) oraz ich homologi: kannabidiwarin (CBDV), delta-9-tetrahydrokannabiwarin (THCV), kannabigerowarin (CBGV), kannabiwarichromen (CBCV) oraz formy kwasowe, np. kwas delta-9-tetrahydrokannabinolowy (THCA). Zawartość wymienionych związków w materiale roślinnym zależy od warunków agrotechnicznych, terminu i warunków zbioru oraz odmiany konopi [26, 53]. W przeciwieństwie do konopi przemysłowych, konopie *Cannabis sativa* subsp. *indica* są uprawiane głównie dla pozyskania żeńskich kwiatów (pąków), które są bogate w kwas tetrahydrokannabinolowy (THCA, prekursor THC). Kwas ten jest również ekstrahowany z liści, chociaż zawartość THCA w liściach jest 10-krotnie mniejsza niż w kwiatach (o ok. 1 ÷ 2 %). W konopiach indyjskich stężenie THCA waha się w granicach 10 ÷ 30 % i jest znacznie wyższe niż w konopiach przemysłowych. Konopie, których kwiaty i liście są używane w przemyśle farmaceutycznym zalicza się do upraw ogrodniczych. Rośliny te charakteryzują się dużą zawartością THCA i małą zawartością kwasu kannabidiolowego (CBDA). Konopie o małej zawartości THCA i dużej zawartości CBDA są uprawiane w celu pozyskania nasion. Konopie przemysłowe charakteryzują się małą (poniżej 1 %) zawartością THCA i stosunkiem CBD : THC wyższym niż 1 [64].

Konopie przemysłowe charakteryzują się stosunkowo wysokim poziomem kannabidiolu. Mieszanka CBD i THC może powodować korzyści zdrowotne, ponieważ kannabidiol (CBD) zmniejsza psychoaktywne skutki THC, jednak wysokie stężenia CBD nie są pożądane w produktach farmaceutycznych. Wyniki badań dotyczące poziomu CBD, stosunku CBD : THC i zdolności CBD do zmniejszania psychoaktywnych skutków THC są niejednoznaczne [64]. Appendino i wsp. [2] potwierdzili, że

powyższe kannabinoidy są silnymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi przeciwko różnym szczepom *Staphylococcus aureus* (MRSA) opornym na metycylinę. Podobne wyniki przedstawił Bancroft [4], który stwierdził, że niepsychotropowe kannabinoidy mogą być stosowane jako ogólnoustrojowe środki przeciwbakteryjne. Kombinacja kannabinoidów może być również używana jako surowiec do produkcji kosmetyków [33].

Fitokannabinoidy w leczeniu

Do celów leczniczych wykorzystywane są naturalne fitokannabinoidy – THC i CBD. Sugeruje się, że kannabidiol może działać neuroprotekcynie poprzez ochronę osłonki mielinowej włókien nerwowych. Ponadto istnieją doniesienia o tym, że kannabidiol może działać przeciwzapalnie w różnych schorzeniach [54]:

- niedokrwiennej niewydolności wątroby, która może występować po przeszczepie, operacji na wątrobie oraz we wstrząsie,
- zapaleniu mózgu związanym z posocznicą, gdzie zaobserwowano efekt przeciwzapalny oraz stabilizacji naczyń krwionośnych,
- kardiomiopatii związanej z cukrzycą typu-1 oraz w cukrzycy typu-2,
- pneumokokowym zapaleniu opon mózgowych przez działanie przeciwzapalne i zmniejszanie niepożądanych zmian funkcji poznawczych,
- chorobie nowotworowej.

Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) czysty CBD jest dobrze tolerowany oraz charakteryzuje się odpowiednim profilem bezpieczeństwa. Skutki uboczne można przypisać interakcji między CBD a innymi lekami przyjmowanymi przez pacjenta. Kilka krajów zmieniło przepisy, aby umieścić CBD na liście produktów leczniczych [57].

Układ endokannabinoidowy składa się z receptorów (CB1 i CB2) w układzie nerwowym mięśni, kości, mózgu, w układzie odpornościowym, narządach wewnętrznych. Specyficzne receptory kannabinoidów różnią się powinowactwem do określonych substancji i lokalizacją (CB1 – dominują w ośrodkowym układzie nerwowym oraz zakończeniach nerwów obwodowych, CB2 – dominują w komórkach układu odpornościowego) [16, 31, 39].

THC, poza działaniem psychoaktywnym, oddziałuje na kanały jonowe oraz enzymy. Efektem tego jest działanie przeciwbólowe, pobudzające, przeciwwymiotne, zwiększające apetyt, obniżające ciśnienie śródgałkowe. CBD nie wykazuje działania psychoaktywnego, lecz przeciwzapalne, przeciwbólowe, zapobiegające nudnościom, przeciwwymiotne, antypsychotyczne, zapobiegające niedokrwieniu, anksjolityczne oraz przeciwpadaczkowe. CBD prawdopodobnie nasila również działanie endokannabinoidów [39]. CBD wykazuje skuteczność w leczeniu niektórych chorób w połączeniu z THC. Mechanizm działania CBD nie został dostatecznie dobrze poznany. Skutki

uboczne przyjmowania CBD obejmują nudności, zmęczenie i drażliwość. CBD może zwiększać stężenie niektórych leków we krwi poprzez taki sam mechanizm, jak ma miejsce w przypadku soku grejpfrutowego [41, 59, 60]. W wielu przypadkach samo określenie odpowiedniej dawki CBD stanowi wyzwanie. Preparaty lecznicze z konopi zazwyczaj są dobrze tolerowane, jednak istnieje szereg przeciwwskazań do ich stosowania, np. choroby psychiczne, leczenie środkami psychotropowymi, uzależnienia. Kryterium wyboru preparatu zawsze powinno stanowić dobro pacjenta, wynikające z danych naukowych. Z tych danych wynika, że CBD nie wykazuje działania uzależniającego i nie dowiedziono dotychczas, aby jego spożywanie (również w czystej postaci) wiązało się z istotnym ryzykiem dla zdrowia publicznego. W Unii Europejskiej żaden kraj, który zezwala na medyczne stosowanie preparatów konopnych, nie zaleca ich aplikowania drogą wziewną [39].

Kannabidiol (CBD) dostępny jest na rynku głównie jako ekstrakt z kwiatów lub liści konopi siewnych, jak również w formie rozpuszczonej w olejach jadalnych (tzw. olej CBD), np. słonecznikowym, konopnym tłoczonym na zimno czy oliwie z oliwek, [19]. CBD oferowany jest także w postaci izolatów oraz form syntetycznych [9]. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (*U.S. Food and Drug Administration*) zaaprobowała tylko jeden produkt na bazie oczyszczonego CBD pod nazwą Epidiolex. To lek doustny do stosowania w leczeniu napadów padaczkowych związanych z zespołem Lennox-Gastaut i zespołem Dravet [60].

Nowelizacją Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii z 2017 r. dokonano zmiany klasyfikacji konopi innych niż włókniste na surowiec farmaceutyczny dozwolony do sporządzania leków recepturowych. Dotyczy to również ziela, wyciągów, nalewek farmaceutycznych [61].

Kannabidiol jako składnik żywności

Wytworzenie produktu zawierającego wyciąg z konopi z określoną zawartością CBD wymaga badań i wiedzy o surowcu. Jakość wyciągu z konopi zależy od odmiany rośliny, warunków uprawy, czasu zbioru oraz metod ekstrakcji. Wskazuje to na konieczność pełnej analizy składu celem zachowania standardów jakości produktu. Może to również przyczynić się do przedkładania stosowania izolatów oraz syntetycznego CBD nad ekstraktami [28].

Warunki ekstrakcji oraz użyte rozpuszczalniki mają znaczący wpływ na smak, barwę i lepkość uzyskanego produktu, ponieważ wiele innych substancji obecnych w materiale roślinnym ulega współekstrakcji. W celu poprawy parametrów ekstraktu poddaje się go często tzw. winteryzacji polegającej na wymrażaniu w temp. $-20 \div -80$ °C komponentów o wyższej temperaturze topnienia, takich jak woski czy triacyloglicerole. W tym procesie strąceniu ulega również chlorofil. Pozwala to następnie usunąć te związki z użyciem filtracji lub odwirowania [46]. Kannabinoidy z czasem ulega-

ją chemicznej transformacji pod wpływem ogrzewania, utleniania oraz interakcji z innymi składnikami żywności, w tym z enzymami. Z tego powodu należy oszacować stopień degradacji składników aktywnych oraz przydatność do spożycia, aby zapewnić dokładne dawkowanie w produkcie spożywczym zanim zostanie on wprowadzony na rynek [6, 28].

Przygotowanie produktów spożywczych może stanowić wyzwanie technologiczne, ponieważ dostępne na rynku „oleje” z konopi są gorzkie w smaku oraz charakteryzują się dużą lepkością i smolistą konsystencją [28]. Oprócz podstawowego zastosowania nasion konopi w postaci oleju są one używane w formie zmielonej jako źródło białka roślinnego i błonnika pokarmowego w produktach spożywczych, takich jak: batony energetyczne, napoje mleczne, pieczywo i wyroby cukiernicze, sosy [1, 50]. Mąka z nasion konopi stosowana w żywności funkcjonalnej pomaga w zapobieganiu niektórych chorób poprzez zwiększanie poziomu lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) i stabilizowanie poziomu innych acylogliceroli oraz lipoprotein [50]. Opracowano proces otrzymywania mleka konopnego, które nie zmieniało barwy i nie nabierało goryczy po poddaniu pasteryzacji. Ekstrakty z konopi dodawane są do takich produktów, jak: herbata, kawa, pizza, lizaki, płatki śniadaniowe, żelki, wyroby czekoladowe, suszona wołowina, a nawet piwo, wino, bezalkoholowe napoje na bazie jęczmienia, miód czy produkty dla sportowców. Chociaż najbardziej popularną częścią rośliny konopi są nasiona, to kielki, liście i kwiaty mogą być również spożywane w postaci dodatku do soków lub sałatek [50].

Wątpliwości dotyczące produktów CBD związane są z zapewnieniem bezpieczeństwa i interesów konsumentów, które są priorytetem unijnego prawa. Do europejskiego systemu wczesnego ostrzegania o niebezpiecznej żywności i paszach (RASFF, ang. *Rapid Alert System for Food and Feed*) od lutego 2020 r. do stycznia 2021 r. wpłynęły 53 powiadomienia w sprawie obecności CBD jako nieautoryzowanej żywności [48]. W USA wykazano, że prawie 70 % analizowanych produktów z rynku amerykańskiego było oznakowanych niezgodnie z przepisami (sugerowanie właściwości leczniczych), a stężenia składnika aktywnego były inne niż deklarowano na etykiecie. Niektóre produkty zawierały również THC, co stanowi naruszenie prawa konsumentów do bezpieczeństwa nabywanej żywności [39]. Na podstawie stanowiska Komisji Europejskiej Komisja Bezpieczeństwa Żywności i Żywienia Rady Sanitarnej-Epidemiologicznej przy Głównym Inspektorze Sanitarnym wyraziła 27.05.2019 r. opinię [22], że niektóre produkty pochodzące z *Cannabis sativa* L., takie jak: nasiona, olej z nasion, mąka z nasion konopi, odtłuszczone nasiona konopi, mające odnotowaną historię spożycia przed 15 maja 1997 r., nie powinny być traktowane jako tzw. nowa żywność. Wszelkie modyfikacje tradycyjnego procesu produkcji olejów konopnych, w tym programowana hodowla roślin, nowoczesne metody ekstrakcji, koncentracji, oczyszczania lub wzbogacania w celu podwyższenia zawartości CBD może skutkować

tym, że produkt będzie postrzegany jako *novel food*. Wówczas jego obecność na rynku będzie nieuprawniona do czasu udzielenia przez Komisję Europejską zgody na wprowadzenie na rynek zgodnie z Rozporządzeniem 2015/2283 [49].

GIS stwierdza, że do czasu uzyskania autoryzacji obecność CBD w charakterze żywności na krajowym rynku jest nieuprawniona i niezbędne jest przeprowadzenie postępowania właściwego dla nowej żywności. Państwowa Inspekcja Sanitarna może poprosić przedsiębiorcę o przedłożenie dokumentacji, która potwierdzałaby historię spożycia takich produktów w UE przed 15 maja 1997 roku. Według GIS-u przedsiębiorca wprowadzający do sprzedaży jakiś środek, powinien dysponować danymi mówiącymi o jego bezpieczeństwie dla zdrowia i życia konsumentów. Polskimi placówkami naukowo-badawczymi, które mogą dokonać oceny nowej żywności są: Instytut Żywności i Żywienia, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny. Z uwagi na to, że niektóre produkty o dużym poziomie CBD zawierały psychoaktywny THC mogący powodować zatrucia, konieczne jest przeprowadzanie badań potwierdzających nieobecność tych substancji [22, 24, 49]. Znakowanie produktów otrzymywanych z konopi siewnych oraz informacje towarzyszące wprowadzaniu tych produktów do obrotu nie mogą wskazywać na działanie lecznicze, w tym na obecność związków o działaniu terapeutycznym, takich jak kannabidiol. W przypadku stwierdzenia w produktach konopi siewnych Δ^9 -tetrahydrokannabinolu (Δ^9 -THC lub THC) konieczne jest każdorazowe dokonanie oceny ryzyka na podstawie przyjętej przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności ostrej dawki referencyjnej (ARfD) – 1 μg Δ^9 -THC/kg m.c. Za bezpieczeństwo środka spożywczego odpowiedzialność ponosi producent, zatem Komisja ds. Bezpieczeństwa Żywności i Żywienia zaleca, aby wymagania dotyczące zanieczyszczenia przez THC produktów otrzymanych na bazie konopi były wdrożone do systemu HACCP [43]. Stanowisko Komisji nie zwalnia producentów z obowiązku przestrzegania innych przepisów prawa w tym Ustawy z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii [61].

Literatura

- [1] Apostol L., Popa M., Mustatea G.: *Cannabis sativa* L. partially skimmed flour as source of bio-compounds in the bakery industry. Rom. Biotechnol. Lett., 2015, 20 (5), 10835-10844.
- [2] Appendino G., Gibbons S., Giana A., Pagani A., Grassi G., Stavri M., Smith E., Rahman M.: Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure – activity study. J. Nat. Prod., 2008, 71, 1427-1430.
- [3] Bağcı E., Brühl L., Aitzetmülle, K., Altan Y.: A chemotaxonomic approach to the fatty acid and tocopherol content of *Cannabis sativa* L. (*Cannabaceae*). Tur. J. Bot., 2003, 27 (2), 141-147.
- [4] Bancroft E.A.: Antimicrobial resistance: It's not just for hospitals. J. Am. Med. Assoc., 2007, 298 (15), 1803-1804.
- [5] Booth J.K., Page J.E., Bohlmann J.: Terpene synthases from *Cannabis sativa*. PLoS ONE, 2017, 12 (3), #e0173911.

- [6] Brenneisen R.: Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other cannabis constituents. In: Marijuana and the Cannabinoids. Ed. M.A. ElSohly. Humana Press Inc., Totowa 2007, pp. 17-49.
- [7] Callaway J.C.: Hempseed as a nutritional resource: An overview. Euphytica, 2004, 140, 65-72.
- [8] Cannabis infused edible products market-growth, trends, COVID-19 impact and forecasts (2021 - 2026). [on line]. Mordor Intelligence. Dostęp w Internecie [12.04.2021]: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/cannabis-infused-edible-products-market>
- [9] CBDepot files application on trans-Cannabidiol manufactured by chemical synthesis as a novel food. [on line]. CBDepot. Dostęp w Internecie [10.02.2021]: <https://www.cbdepot.eu/pages/blog/cbdepot-files-application-on-trans-cannabidiol-manufactured-by-chemical-syn>
- [10] Chen J., Liu H.: Nutritional indices for assessing fatty acids: A mini – review. Int. J. Mol. Sci., 2020, 21 (16), #5695.
- [11] Clarke R.A., Merlin M.D.: Cannabis: Evolution and ethnobotany. University of California Press, Berkeley 2013.
- [12] Czikiw P., Łaptiew J.: Rośliny lecznicze i bogate w witaminy. PWRiL, Warszawa 1987, ss. 169-172.
- [13] Dąbrowski G., Skrajda M.: Frakcja lipidowa i białkowa nasion konopi siewnych (*C. sativa* L.) oraz jej korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Educat. Health Sport., 2016, 6 (9), 357-366.
- [14] Dolan L.C., Matulka R.A., Burdock G.A.: Naturally occurring food toxins. Toxins, 2010, 2 (9), 2289-2332.
- [15] Farinon B., Molinari R., Costantini L., Merendino N.: The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. Nutrients, 2020, 12 (7), #1935.
- [16] Firenzuoli F., Epifani F., Loiacono I.: Konopie dla wszystkich. Lecznicze zastosowanie marihuany. Esteri, Wrocław 2016, ss. 17-23.
- [17] Girgih A.T., Alashi A.M., He R., Malomo S.A., Raj P., Netticadan T., Aluko R.E.: A novel hemp seed meal protein hydrolysate reduces oxidative stress factors in spontaneously hyper tensive rats. Nutrients, 2014, 6 (12), 5652-5666.
- [18] Here comes cannabis: How legalisation will disrupt global industries. [on line]. Euromonitor International. Dostęp w Internecie [12.04.2021]: <https://go.euromonitor.com/white-paper-cannabis-2019-here-comes-cannabis-how-legalisation-will-disrupt-global-industries.html>
- [19] Hazekamp A.: The trouble with CBD oil. Med. Cannabis Cannabinoids, 2018, 1, 65-72.
- [20] House J.D., Neufeld J., Leson G.: Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. J. Agric. Food Chem., 2010, 58 (22), 11801-11807.
- [21] Integrated Taxonomic Information System [on-line]. Dostęp w Internecie [19-03-2021]: <http://www.itis.gov>
- [22] Informacja Głównego Inspektora Sanitarnego w sprawie substancji kannabidiol (CBD). [on-line]. GIS 2018. Dostęp w Internecie [10.02.2021]: <https://gis.gov.pl/wp-content/uploads/2018/12/Informacja-w-sprawie-CBD.pdf>
- [23] Irakli M., Tsaliki E., Kalivas A., Kleisariis F., Sarrou E., Cook C.: Effect of genotype and growing year on the nutritional, phytochemical, and antioxidant properties of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. Antioxidants, 2019, 8 (10), #491.
- [24] Jeżyk W.: CBD może niedługo zniknąć ze sklepów. [on-line]. Dostęp w Internecie [09.04.2021]: <https://medycnamarihuana.com/cbd-moze-niedlugo-zniknac-ze-sklepow>
- [25] Johnson R.: Hemp as an agricultural commodity. [on-line]. Congressional Research Service 2018. Dostęp w Internecie [26.03.2021]: <https://sgp.fas.org/crs/misc/RL32725.pdf>
- [26] Kaniewski R., Jankowiak J., Zajączek K.: Len i konopie w profilaktyce i leczeniu. Postępy Fito-terapii, 2020, 21 (2), 100-103.

- [27] Kaniewski R., Pniewska I., Kubacki A., Strzelczyk M., Chudy M., Oleszak G.: Konopie siewne (*Cannabis sativa L.*) – wartościowa roślina użytkowa i lecznicza. *Postępy Fitoterapii*, 2017, 18 (2), 139-144.
- [28] King J.W.: The relationship between cannabis/hemp use in foods and processing methodology. *Current Opinion Food Sci.*, 2019, 28, 32-40.
- [29] Kiralan M., Gul V., Kara S.: Fatty acid composition of hempseed oils from different locations in Turkey. *Span. J. Agric. Res.*, 2010, 8 (2), 385-390.
- [30] Kolodziejczyk P., Ozimek L., Kozłowska J.: The application of flax and hemp seeds in food, animal feed and cosmetics production. *Handbook of natural fibres: Processing and Applications*. Vol. 2. Woodhead Publishing, Duxford 2012, pp. 329-366.
- [31] Komorowski J., Stępień H.: Rola układu endokannabinoidowego w regulacji czynności dokrewnej i kontroli równowagi energetycznej człowieka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007, 61, 99-105.
- [32] Koren A., Sikora V., Kiprovski B., Brdar-Jokanovic M., Acimovic M., Konstantinovic B., Latkovic D.: Controversial taxonomy of hemp. *Genetika*, 2020, 52 (1), 1-13.
- [33] Kurek-Górecka A., Balwierz R., Mizera P., Nowak M., Żurawska-Płaksej E.: Znaczenie terapeutyczne i kosmetyczne oleju konopnego. *Farmacja Polska*, 2018, 74 (12), 704-708.
- [34] Leizer C., Ribnicky D., Poulev A., Dushenkov V., Raskin I.: The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *J. Nutraceut., Funct. Med. Foods*, 2000, 2 (4), 35-53.
- [35] Leonard W., Zhang P., Ying D., Fang Z.: Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2020, 19 (1), 282-308.
- [36] Mańkowska G., Grabowska L.: Genetic resources of *Cannabis sativa L.* at the Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants in Poznań. *Herba Polonica*, 2009, 55 (3), 178-184.
- [37] Market overview. [on line]. Hempalta. Dostęp w Internecie [9.04.2021]: <https://www.hempalta.com/market-overview/>
- [38] Mediavilla V., Steinemann S.: Essential oil of *Cannabis sativa L.* strains. *J. Int. Hemp. Assoc.*, 1997, 4 (2), 80-82.
- [39] Mirosz P.: Konopie i CBD: Superżywność czy lek? Korzyści, zagrożenia, status prawny w Unii Europejskiej. *Współczesna Dietetyka*, 2019, 23, 74-80.
- [40] Murnion B.: Medicinal cannabis. *Australian Prescriber*, 2015, 38 (6), 212-215.
- [41] National Center for Complementary and Integrative Health: Cannabis (Marijuana) and Cannabinoids: What You Need to Know. [on line]. Dostęp w Internecie [10.02.2021]: <https://www.nccih.nih.gov/health/cannabis-marijuana-and-cannabinoids-what-you-need-to-know>
- [42] Oomah B.D., Busson M., Godfrey D.V., Drover J.C.G.: Characteristics of hemp (*Cannabis sativa L.*) seed oil. *Food Chem.*, 2002, 76, 33-43.
- [43] Opinia Komisji ds. Bezpieczeństwa Żywności i Żywnienia z dnia 27.05.2019 r. w sprawie bezpieczeństwa stosowania konopi siewnych w żywności ze względu na obecność THC i CBD. [on line]. Dostęp w Internecie [14.04.2021]: <https://gis.gov.pl/wp-content/uploads/2019/07/Opinia-Komisji-B%5c%bb%5c%bb-RSE-Konopie.pdf>
- [44] Petrowić M., Debeljak Ž., Kezić N., Džidara P.: Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils. *Food Chem.*, 2015, 170, 218-225.
- [45] Pojić M., Misan A., Sakac M., Dapcević Hadnadev T., Sarić B., Milovanović I., Hadnadev M.: Characterization of by-products originating from hemp oil processing. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, 62 (51), 12436-12442.
- [46] Puri P.S.: Winterization of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1980, 57, A848-A850.
- [47] Ranalli P., Venturi G.: Hemp as a raw material for industrial applications. *Euphytica*, 2004, 140, 1-6.
- [48] RASFF Portal. [on line]. Dostęp w Internecie [10.02.2021]: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>

- [49] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 r. w sprawie nowej żywności, zmieniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1852/2001. Dz. U. L 327, ss. 1-22, z 11.12.2015.
- [50] Rupasinghe H.P.V., Davis A., Kumar S.K., Murray B., Zheljazkov V.D.: Industrial hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) as an emerging source for value-added functional food ingredients and nutraceuticals. *Molecules*, 2020, 25 (18), #4078.
- [51] Russo E.B.: Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Brit. J. Pharmacol.*, 2011, 163, 1344-1364.
- [52] Russo R., Reggiani R.: Variability in antinutritional compounds in hempseed meal of Italian and French varieties. *Plant*, 2013, 1 (2), 25-29.
- [53] Rymanowski M.: Konopie, przegląd zagadnień związanych z oznaczaniem sumarycznej zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu (D-9-THC) oraz kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (D-9-THCA-A). *Probl. Kryminalist.*, 2014, 258 (3), 2-23.
- [54] Siudem P., Wawer I., Paradowska K.: Konopie i kannabinoidy. *Farmacja Współczesna*, 2015, 8, 1-8.
- [55] Spano M., Di Matteo G., Rapa M., Ciano S., Ingallina C., Cesa S., Menghini L., Carradori S., Giusti A.M., Di Sotto A., Di Giacomo S., Sobolev A.P., Vinci G., Mannina L.: Commercial hemp seed oils: A multimethodological characterization. *Applied Sciences*, 2020, 10 (19), #6933.
- [56] Struik P.C., Amaducci S., Bullard M.J., Stutterheim N.C., Venturi G., Cromack H.T.H.: Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industr. Crops Products*, 2000, 11, 107-111.
- [57] World Health Organization, Expert Committee on Drug Dependence: Cannabidiol (CBD) Critical Review Report. [on line]. WHO, Geneva 2018. Dostęp w Internecie [10.02.2021]: <https://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/CannabidiolCriticalReview.pdf>
- [58] Taura F., Sirikantaramas S., Shoyama Y., Yoshikai K., Shoyama Y., Morimoto S.: Cannabidiolic acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Letters*, 2007, 581 (16), 2929-2934.
- [59] U.S. Food and Drug Administration: What you need to know (and what we're working to find out) about products containing cannabis or cannabis-derived compounds, including CBD. [on line]. FDA. Dostęp w Internecie [10.02.2021]: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/what-you-need-know-and-what-were-working-find-out-about-products-containing-cannabis-or-cannabis>
- [60] U.S. Food and Drug Administration: FDA approves first drug comprised of an active ingredient derived from marijuana to treat rare, severe forms of epilepsy. [on line]. FDA 2018. Dostęp w Internecie [10.02.2021]: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuana-treat-rare-severe-forms>
- [61] Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii. Dz.U. 2005 r. Nr 179, poz. 1485.
- [62] Vonapartis E., Aubin M.-P., Seguin P., Mustafa A., Charron J.-B.: Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *J. Food Compos. Anal.*, 2015, 39, 8-12.
- [63] Worobiej E., Mądrzak J., Piecyk M.: Zawartość wybranych składników odżywczych i związków biologicznie aktywnych w produktach z konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.) oraz kasztanów jadalnych (*Castanea sativa* Mill.). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2015, 48 (3), 573-577.
- [64] Żuk-Gołaszewska K., Gołaszewski J.: *Cannabis sativa* L. – cultivation and quality of raw material. *J. Elem.*, 2018, 23 (3), 971-984.

HEMP *CANNABIS SATIVA L.* – TYPES, PROPERTIES, USES

S u m m a r y

Hemp (*Cannabis sativa L.*) is an ancient cultivated plant originating from Central Asia with a wide range of applications. The article presents a review of the literature on hemp, its active compounds, biological activity, medicinal properties and potential use in medicine and food. Hemp seeds are widely used in food industry as they are a good source of protein, fibre, vitamin E, iron, calcium, zinc, phosphorus and magnesium. Terpene hydrocarbons account for the taste and smell of hemp, mainly β -caryophyllene and α -humulene (sesquiterpenes) and monoterpene, myrcene. Currently the main focus of the industry is the seed-pressed oil rich in tocopherols, phytosterols, carotenoids, polyphenols and phospholipids. Hemp oil contains over 80 % of EFAs, including γ -linolenic (GLA), linoleic and α -linolenic acids, with an optimal 3 : 1 ratio of omega-6 to omega-3 polyunsaturated fatty acids. The use of oil in the food technology is limited owing to its intense colour and taste. Other active compounds identified in *Cannabis sativa L.* are cannabinoids, dihydrostilbenes and spiroindanes. Cannabinoids are characterised by anti-inflammatory, antibacterial, analgesic and antidepressant properties. Hemp seed products are additives for tea, coffee, chocolate products, milk drinks, bakery and confectionery products and also beer, wine, honey or products for sportsmen. In the article there are also discussed legal requirements referring to possible uses of cannabinoids in food and introduction of food products containing cannabinoids to the market.

Key words: hemp, cannabinoids, THC, CBD, food and medicinal use 

JOANNA KAPUSTA-DUCH, ANNA WISŁA-ŚWIDER, EWELINA NOWAK

OCENA ZAWARTOŚCI AZOTANÓW(V) I AZOTANÓW(III) W KAPUŚCIE KISZONEJ BIAŁEJ CHŁODNICZO SKŁADOWANEJ, POCHODZĄCEJ Z UPRAW KONWENCJONALNYCH I EKOLOGICZNYCH

Streszczenie

Żywność ma zasadniczy wpływ na zdrowie człowieka, a tym samym na długość jego życia. Wzrost zainteresowania naukowców sposobami zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego wytwarzanej żywności w istotny sposób wpłynął na zwiększenie świadomości konsumenta. Zaczął on poszukiwać żywności bezpiecznej, której proces produkcji byłby kontrolowany, czyli żywności, która by nie wpływała negatywnie ani na zdrowie człowieka, ani na środowisko naturalne. Azotany(III) są dużo bardziej toksyczne dla zdrowia człowieka niż azotany(V). Związki te są prekursorami N-nitrozozwiązków, które charakteryzują się właściwościami kancerogennymi, mutagennymi i embriotoksycznymi. Rolnictwo ekologiczne to system produkcji rolniczej wykluczający stosowanie chemicznych środków ochrony roślin, jak również eliminujący wpływ zanieczyszczeń środowiskowych. Głównym celem gospodarstw ekologicznych jest zatem produkcja żywności o dużej wartości biologicznej. Celem pracy była ocena zmian zawartości azotanów(V) i azotanów(III) w kapuście kiszzonej białej pochodzącej z upraw konwencjonalnych i ekologicznych, chłodniczo składowanej przez 3 miesiące w niestandardowych opakowaniach z polietylenu niskiej gęstości, zaopatrzonych dodatkowo w specjalne wentyle umożliwiające odprowadzanie gazów powstających w czasie fermentacji. Tuż po zakupie istotnie większą (o ok. 58 %) zawartość azotanów(III) stwierdzono w kapuście kiszzonej konwencjonalnej w porównaniu z kapustą kiszoną ekologiczną. Zarówno w kiszonce konwencjonalnej, jak i ekologicznej zaobserwowano statystycznie istotny wzrost zawartości azotanów(V) w porównaniu z kiszonką tuż po zakupie. Po 3 miesiącach chłodniczego składowania w kiszonkach nie wykryto zawartości azotanów(III).

Słowa kluczowe: kapusta kiszona biała, zanieczyszczenia chemiczne, azotany(V), azotany(III), chłodnicze przechowywanie

Wprowadzenie

Na jakość zdrowotną żywności składa się bezpieczeństwo produktu oraz jego wartość odżywcza, w tym dietetyczna i energetyczna. Nadmierny poziom azota-

Dr hab. inż. J. Kapusta-Duch, prof. URK, Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki, dr A. Wisła-Świder, dr inż. E. Nowak, Katedra Chemii, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków. Kontakt: joanna.kapusta-duch@urk.edu.pl

nów(III), a pośrednio azotanów(V), w żywności może stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka. Według ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oraz Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) dopuszczalne dzienne pobranie (ADI) jonu azotanowego(V) wynosi 3,7 mg/kg masy ciała, a jonu azotanowego(III) – 0,06 mg/kg masy ciała [11]. W Rozporządzeniu Komisji (UE) nr 1258/2011 z 2 grudnia 2011 r. określono najwyższe dopuszczalne poziomy azotanów(V) jedynie dla wybranych warzyw, m.in. dla świeżego i mrożonego szpinaku, świeżej sałaty, sałaty lodowej czy rokiety siewnej (rukoli) [37].

O możliwości kumulowania azotanów (NO_3^-) w roślinach decyduje wiele czynników, m.in. intensywność nawożenia, warunki klimatyczne, zawartość niektórych makro- i mikroelementów w glebie, działanie wybranych herbicydów, porażenie roślin przez grzyby czy sposób przechowywania produktów. Różnice w poziomie azotanów w różnych częściach użytkowych warzyw wiążą się zarówno z translokacją, jak i nasileniem ich metabolizmu [19]. Tendencje wzrostowe zawartości azotanów(V) zaobserwowano w roślinach we wczesnych stadiach rozwojowych, przy niedostatecznym nasłonecznieniu, kwaśnym odczynie gleby, małej wilgotności, braku składników odżywczych takich jak molibden i magnez oraz przy stosowaniu herbicydów [4]. Największą zdolność do kumulowania azotanów(V) mają takie warzywa, jak: pietruszka, sałata, szpinak, rzodkiewka, buraki, seler, por [19]. Toksyczne działanie azotanów(III) polega m.in. na wywoływaniu methemoglobinemii (sinica). Za utlenianie jonu Fe^{2+} hemoglobiny do jonu Fe^{3+} jest odpowiedzialny jon azotanowy(III) powstały w wyniku redukcji azotanów(V) [19, 48]. Azotany(III) mają zdolność do tworzenia nitrozoamin, trwałych związków o silnym działaniu toksycznym, mutagennym, teratogennym i kancerogennym [1]. Z drugiej strony prowadzone są badania kliniczne nad pozytywnym wpływem tlenu azotu na przebieg chorób sercowo-naczyniowych. Związek ten jest najmniejszą aktywną biologicznie cząsteczką, która rozszerza naczynia krwionośne, hamuje agregację płytek krwi oraz przekazuje informacje pomiędzy komórkami. Pozytywnie wpływa na organizm poprzez obniżanie ciśnienia tętniczego krwi, a także zwiększenie wydolności, głównie w czasie wysiłku fizycznego [40].

Spośród warzyw kapustne charakteryzują się średnim (kapusta głowiasta biała) lub niskim (kalafior, kapusta brukselska) stopniem kumulowania tych związków, ale ze względu na masę spożycia mogą one stanowić istotne ich źródło w całodziennej racji pokarmowej. Są to warzywa sezonowe. Niektóre z nich mogą być konsumowane w postaci surowej bądź po uprzednim utrwaleniu przez kwaszenie lub mrożenie [13]. Zawartość azotanów(V) i azotanów(III) w surowcach roślinnych nie może być wykładnikiem faktycznego ich pobrania. Zarówno obróbka wstępna warzyw (mycie i obieranie) jak i procesy kulinarno-technologiczne mogą wpływać na zawartości tych związków [18, 22].

Terminem rolnictwo ekologiczne określa się system produkcji rolniczej wykluczający stosowanie chemicznych środków ochrony roślin, jak również eliminujący wpływ zanieczyszczeń środowiskowych. Głównym celem gospodarstw ekologicznych jest produkcja żywności o dużej wartości biologicznej. Produkcja żywności metodami naturalnymi odbywa się zgodnie z ustalonymi ścisłymi wytycznymi, których przestrzeganie jest nadzorowane przez odpowiednie instytucje. Zgodnie z Rozporządzeniem Rady WE nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. [39] w *sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych* produkcja ekologiczna jest ogólnym systemem zarządzania gospodarstwem i produkcją żywności, łączącym najkorzystniejsze dla środowiska praktyki, wysoki stopień różnorodności biologicznej, ochronę zasobów naturalnych, stosowanie wysokich standardów dotyczących dobrostanu zwierząt i metodę produkcji odpowiadającą wymaganiom niektórych konsumentów preferujących wyroby wytwarzane przy użyciu substancji naturalnych i naturalnych procesów. Rozporządzenie określa podstawowe wymagania w zakresie produkcji, znakowania i kontroli produktów ekologicznych w sektorze uprawy roślin i chowu zwierząt. Szczegółowe zasady stosowania tych wymagań określa natomiast Rozporządzenie Komisji WE nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 r. [38].

Warzywa z upraw ekologicznych zawierają na ogół mniej azotanów(V) niż pochodzące z upraw konwencjonalnych, o czym świadczą wyniki badań z lat 90. Borowskiej i wsp. [1], Leszczyńskiej [26] oraz Rembiałkowskiej [35]. Potwierdzeniem tej obserwacji są kolejne wyniki badań Rembiałkowskiej i wsp. [34] oraz Hallmann i wsp. [14]. Rembiałkowska [36] w pracy przeglądowej na podstawie badań własnych oraz innych autorów wskazuje jednoznacznie, że stosowanie surowców ekologicznych pozwala na zmniejszenie zawartości azotanów(V) i (III) w przeciętnej racji pokarmowej nawet o 50 %. Niezmiernie ważne, zarówno ze strony producenta, jak i konsumenta jest zatem przekonanie, że produkt ekologiczny charakteryzuje najwyższa jakość zdrowotna.

Celem pracy była ocena zmian zawartości azotanów(V) i azotanów(III) w kapuście kiszzonej białej pochodzącej z upraw konwencjonalnych i ekologicznych, chłodniczo składowanej przez 3 miesiące w innowacyjnych opakowaniach strunowych z polietylenu niskiej gęstości (PE-LD), zaopatrzonych dodatkowo w specjalne wentyle umożliwiające odprowadzanie gazów powstające w czasie procesu fermentacji. Dodatkowym celem było poszerzenie i ugruntowanie wiedzy konsumentów na temat bezpieczeństwa zdrowotnego kapusty kiszzonej białej, pochodzącej z uprawy konwencjonalnej i ekologicznej, szczególnie w zakresie obecności zanieczyszczeń chemicznych, takich jak azotany(V) i azotany(III).

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiła kapusta kiszona biała odmiany 'Kamienna Głowa' pochodząca z uprawy konwencjonalnej oraz ekologicznej, zapakowana w szczelnie zamknięte opakowania z polietylenu niskiej gęstości, zaopatrzone dodatkowo w specjalne wentyle umożliwiające odprowadzanie gazów powstających w czasie fermentacji. Analizowany material pochodził z końca września 2019 r., a doświadczenie prowadzono przez 3 miesiące. Próbkę kapusty kiszonej (4 opakowania kapusty kiszonej konwencjonalnej i 4 opakowania kapusty kiszonej ekologicznej) pochodziły z tej samej partii produkcyjnej i od tego samego producenta z tzw. zagłębia kapuścianego, czyli gminy Charsznica. Producent posiadał certyfikat gwarantujący, że do produkcji kapusty kiszonej ekologicznej zostały użyte warzywa z upraw ekologicznych oraz że produkt spełniał wymagania określone w Rozporządzeniach Rady (WE) nr 834/2007 i 889/2008 w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych [38, 39]. Próbkę kapusty kiszonej konwencjonalnej i ekologicznej zakupiono w wybranych punktach sprzedaży bezpośredniej na terenie miasta Krakowa. Tuż po zakupie kapusty kiszonej otwarto 1 z 4 opakowań zawierających kapustę kiszoną ekologiczną oraz 1 z 4 opakowań, w których znajdowała się kapusta kiszona konwencjonalna. W materiale tym oznaczano omawiane związki. Analizy wykonywano także po 1, 2 i 3 miesiącach chłodniczego składowania próbek (w temp. 4 - 5 °C) w chłodziarce Whirlpool. Po każdym założonym okresie przechowywania otwierano kolejne opakowania zawierające odpowiedni rodzaj badanej kiszonki.

W średnich, reprezentatywnych próbkach kapusty wykonywano oznaczenia zawartości: suchej masy metodą suszarkową, zgodnie z PN-A-79011-3:1998 [33] oraz azotanów(V) i azotanów(III) zgodnie z PN-A-75112:1992 [32]. Zasada oznaczania azotanów(V) i azotanów(III) polegała na wywołaniu reakcji barwnej azotanów(III) z dwuchlorowodorkiem N-[1-naftylo]etylenodwuaminy w środowisku kwaśnym poprzez dodanie do analizowanego roztworu odczynników Griessa I (sulfanilamid w określonym roztworze kwasu solnego) i Griessa II (roztwór wodny dwuchlorowodorku N-[1-naftylo]etylenodwuaminy), a następnie kolorymetrycznym pomiarze powstałego kompleksu przy długości fali $\lambda = 538$ nm za pomocą spektrofotometru UV/VIS RayLeigh (Beijing RayLeigh Analytical Instrument Co. Ltd., Chiny). Azotany(V) uprzednio zredukowano do azotanów(III) bezpośrednio sproszkowanym kadmem.

Wszystkie oznaczenia wykonywano w 3 równoległych powtórzeniach ($n = 3$), obliczano wartości średnie i odchylenia standardowe (SD). W celu sprawdzenia istotności różnic między zawartością suchej masy, azotanów(V) i azotanów(III) w badanych próbkach w zależności od: czasu chłodniczego składowania oraz rodzaju analizowanej kapusty (konwencjonalna oraz ekologiczna), przeprowadzono dwuczynnikową analizę

wariancji. Obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistica 9.1. PL. W celu sprawdzenia istotności różnic zastosowano test rozstępu Duncana ($p \leq 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Zawartość suchej masy w próbkach kapusty kiszzonej konwencjonalnej i ekologicznej w zależności od czasu ich przechowywania przedstawiono w tab. 1. Zawartość azotanów(V) i azotanów(III) w próbkach przedstawiono w przeliczeniu na jednostkę masy odpowiadającą sumie jednego kilograma świeżej masy (ś.m.) materiału wyjściowego i ilości wchłoniętej/utraczonej wody w wyniku zastosowanej obróbki technologicznej (tab. 2 i 3). Omówienie wyników przeprowadzono także w przeliczeniu na jednostkę suchej masy (s.m.). Wyeliminowano w ten sposób wpływ rozcieńczenia wodą na zmiany zawartości składnika w jednostce masy materiału doświadczalnego, a wykazano jedynie wpływ zastosowanego procesu technologicznego.

W przypadku kapusty kiszzonej konwencjonalnej zawartość suchej masy na ogół wzrastała statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) wraz z czasem przechowywania w stosunku do kiszonki analizowanej tuż po zakupie (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość suchej masy w kapuście kiszzonej konwencjonalnej i ekologicznej, w zależności od czasu chłodniczego przechowywania

Table 1. Content of dry mass in conventional and organic sauerkraut, depending on refrigerated storage time

Okres przechowywania Storage period [miesiąc / month]	Zawartość suchej masy Content of dry mass [g/100 g]	
	Kapusta kiszona / Sauerkraut	
	Konwencjonalna Conventional	Ekologiczna Organic
0 (tuż po zakupie) (immediately after purchase)	7,0 ^c ± 1,5	6,2 ^{de} ± 0,1
1	6,7 ^{cd} ± 0,05	6,1 ^e ± 0,2
2	7,8 ^b ± 0,01	5,9 ^e ± 0,1
3	8,7 ^a ± 0,1	5,8 ^e ± 0,3

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; a, b, ... – wartości średnie oznaczone różnymi literami różną się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values denoted by different letters differ statistically significantly ($p \leq 0,05$).

Zaobserwowano, że niezależnie od czasu chłodniczego składowania kapusta kiszona konwencjonalna charakteryzowała się istotnie ($p \leq 0,05$) większą zawartością suchej masy w porównaniu z kapustą kiszoną ekologiczną. Zawartość suchej masy w kapuście kiszzonej konwencjonalnej wynosiła w kolejnych okresach przechowywa-

nia: 7,0 % (tuż po zakupie), 6,7 % (po 1 miesiącu), 7,8 % (po 2 miesiącach) oraz 8,7 % (po 3 miesiącach) – tab. 1.

Czynnikiem warunkującym zawartość suchej masy w produkcie fermentowanym jest przede wszystkim jego zawartość w surowcu, a także odmiana warzywa, termin zbioru, a tym samym długość okresu wegetacji, sposób nawożenia oraz wielkość główek [29]. Wyniki zawartości suchej masy w kiszonkach tuż po zakupie w badaniach własnych korespondują na ogół z danymi literaturowymi [24, 46]. Martinez-Villaluenga i wsp. [29] stwierdzili, że zawartość suchej masy w kapuście kiszzonej z sezonu jesiennego wynosiła 10,51 %, a z sezonu letniego – 8,88 %, średnio zawartość s.m. kształtowała się na poziomie 7,8 %. Wartości te są nieznacznie wyższe w stosunku do wyników, które odnotowano w ciągu 3 miesięcy chłodniczego składowania kiszonek w niniejszej pracy. Z kolei Casado i wsp. [5] wykazali, że zawartość suchej masy w kapuście kiszzonej wynosiła 7,48 %. Podobną wartość (7,88 %) podają Drašković i wsp. [9], a Martinez-Villaluenga i wsp. [29] uznali, że zawartość suchej masy w kiszzonej kapuście kształtuje się na poziomie 7,8 %. Podobne wyniki w badaniach własnych zaobserwowano w kapuście kiszzonej konwencjonalnej po 2 miesiącach chłodniczego składowania. W badaniach Kapusty-Duch i wsp. [21] zawartość suchej masy, nie w kiszonce, ale w kapuście głowiastej białej mieściła się w zakresie $6,63 \div 7,35$ g/100 g w zależności od jej pochodzenia (konwencjonalna versus pochodząca z byłej strefy ochronnej Huty im. T. Sendzimira (obecnie ArcelorMittal Poland, Oddział w Krakowie).

W trakcie przechowywania warzyw następują zmiany zawartości suchej masy. W wyniku procesu oddychania warzyw obserwuje się zmniejszenie zawartości omawianego składnika, z równoczesną stratą wody podczas transpiracji. Biorąc pod uwagę zachodzenie obu procesów w roślinie, po składowaniu może także nastąpić przyrost suchej masy w stosunku do wartości wyjściowej [31], co także zostało zaobserwowane.

Nath i wsp. [30] zaobserwowali mniejsze straty zawartości suchej masy (o 5,51 %) w brokułach przechowywanych chłodniczo przez 144 h w woreczkach polipropylenowych (PP) z mikroperforacją w porównaniu z warzywami składowanymi na perforowanych tackach z tworzywa sztucznego (strata o 27 %). W badaniach Wojciechowskiej i Rożka [46] zawartość suchej masy w główkach czerwonej kapusty długotrwanie przechowywanej w warunkach chłodniczych zmalała o $5,5 \div 8,9$ % w zależności od zastosowanej formy azotu nawozowego. W pomidorach wartość tego parametru nie zmieniała się statystycznie istotnie podczas chłodniczego składowania (temp. 7 °C) przez 10 dni [42]. Olszówka i Perucka [31] zaobserwowały zmniejszenie zawartości suchej masy o 2 % w sałacie masłowej przechowywanej w warunkach chłodniczych w woreczkach polietylenowych (PE-LD) przez 7 dni, natomiast po 14

dniach składowania odnotowano nieznaczny wzrost badanego parametru, jednak zmiany te nie były statystycznie istotne.

Po zakupie stwierdzono zbliżoną ($p > 0,05$) zawartość azotanów(V) zarówno w kapuście kiszzonej ekologicznej, jak i konwencjonalnej (tab. 2).

Tabela 2. Zawartość azotanów(V) w kapuście kiszzonej konwencjonalnej i ekologicznej, w zależności od czasu chłodniczego przechowywania (w przeliczeniu na jony NO_3^-)

Table 2. Content of nitrates in conventional and organic sauerkraut, depending on refrigerated storage time (expressed as NO_3^- ions)

Okres przechowywania Storage period [miesiąc / month]	Zawartość azotanów(V) jako NO_3^- Content of nitrates expressed as NO_3^- ions [mg/kg s.m. / mg/kg d.m.]	
	Kapusta kiszona / Sauerkraut	
	Konwencjonalna Conventional	Ekologiczna Organic
0 (tuż po zakupie) (immediately after purchase)	$340^d \pm 21$	$290^d \pm 31$
1	$620^b \pm 18$	$480^c \pm 40$
2	$310^d \pm 9$	$620^b \pm 12$
3	$550^e \pm 40$	$1005^a \pm 96$

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

W przypadku kapusty kiszzonej konwencjonalnej zaobserwowano statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) wzrost zawartości azotanów(V) po 1 i 3 miesiącach chłodniczego przechowywania w porównaniu z kiszonką tuż po zakupie (tab. 2). Podobnie w kapuście kiszzonej ekologicznej zaobserwowano statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) zwiększenie omawianych związków zarówno po 1, 2, jak i 3 miesiącach chłodniczego przechowywania w porównaniu z kiszonką tuż po zakupie. Po 3 miesiącach chłodniczego przechowywania stwierdzono niemal 2-krotnie większą zawartość azotanów(V) w kapuście kiszzonej ekologicznej w stosunku do kapusty kiszzonej konwencjonalnej.

Hallmann i wsp. [14] podczas 2-letniego eksperymentu porównali kapustę białą odmiany 'Sufama' pochodzącą z upraw konwencjonalnych i ekologicznych. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały na istotnie mniejszą zawartość azotanów(V) w kapuście pochodzącej z upraw ekologicznych, w porównaniu z kapustą uprawianą konwencjonalnie. W kolejnych 2 latach wymienieni autorzy wykazali bardzo małe zawartości omawianych związków w kapuście pochodzącej z upraw ekologicznych odpowiednio: 0,50 i 0,47 g/kg ś.m. Mniejszą zawartość azotanów(V) w kapuście głowiastej białej ekologicznej w porównaniu z pochodzącą z upraw konwencjonalnych odnotowali również Leszczyńska [26] oraz Wawrzyniak i wsp. [43].

Wyniki dotyczące zawartości azotanów(V) w kiszonkach tuż po zakupie, otrzymane w toku tej pracy, korespondują na ogół z danymi literaturowymi dotyczącymi

zawartości tych związków, ale w świeżej, a nie ukiszonej kapuście głowiastej białej i czerwonej. Gajewska i wsp. [12] zaobserwowali, że zawartość azotanów(V) w kapuście głowiastej białej z okresu wiosenno-letniego mieściła się w granicach $75,0 \div 915,2$ mg NaNO_3/kg ś.m., natomiast z sezonu jesienno-zimowego – $30,5 \div 655,4$ mg NaNO_3/kg ś.m. Zawartość azotanów(V) w analizowanej w toku tej pracy białej kapuście kiszzonej wynosiła $50,6$ mg/kg ś.m. w przeliczeniu na jony NO_3^- , a przedstawiając wynik jako ilość NaNO_3 , wartość ta wynosiła $69,3$ mg/kg ś.m. Du i wsp. [10] raportowali o zawartości azotanów(V) w kapuście białej na poziomie $259 \div 1250$ mg NO_3^-/kg ś.m., co przewyższa wyniki uzyskane w badaniach własnych. Wojciechowska i Rożek [46] podają, że zawartość azotanów(V) w świeżej kapuście głowiastej czerwonej była równa $958,7$ mg NO_3^-/kg ś.m., co jest wynikiem niższym od uzyskanego w niniejszej pracy. Zdolność kumulowania azotanów(V) przez warzywa może wynikać z czynników genetycznych i jest cechą charakterystyczną dla danego gatunku lub konkretnej odmiany roślin uprawnych, stąd zapewne znaczne rozbieżności pomiędzy wartościami podawanymi przez różnych autorów [12].

W niniejszej pracy zaobserwowano na ogół statystycznie istotne wahania zawartości azotanów(V) w próbkach kiszzonej kapusty składowanych chłodniczo przez 3 miesiące. Podobne, niejednoznaczne tendencje opisują autorzy w odniesieniu do różnych gatunków warzyw. W badaniach Kapusty-Duch i Leszczyńskiej [20] zawartość azotanów(V) w kiszzonej kapuście (bezpośrednio po zakupie) wynosiła 522 mg/kg s.m. Po miesiącu przechowywania kiszonki w torebce strunowej (PE-LD) ilość tych związków wynosiła $84,9$ mg/kg s.m. Po 2 i 3 miesiącach chłodniczego składowania w opakowaniu z PE-LD zawartość analizowanego składnika wynosiła odpowiednio: 247 i 176 mg/kg s.m., co znacznie przewyższa wyniki uzyskane w toku niniejszej pracy. W przypadku kiszzonek przechowywanych w torbach wykonanych z metalizowanego PET (PET met/PE) zawartość azotanów(V) po 1, 2 i 3 miesiącach chłodniczego przechowywania wynosiła odpowiednio: 139 , 520 i 156 mg/kg s.m. kiszonki. Wojciechowska i Rożek [46] odnotowali wzrost o $22,3$ % zawartości azotanów(V) w czerwonej kapuście głowiastej przechowywanej chłodniczo przez 4 miesiące. Są to wyniki dużo wyższe od uzyskanych w niniejszej pracy. W przypadku sałaty masłowej przechowywanej chłodniczo przez 14 dni w woreczkach polietylenowych (PE) zaobserwowano po 7 dniach wzrost o $36,4$ % omawianych związków, a następnie ich zmniejszenie o $6,8$ % po 14 dniach składowania w stosunku do warzywa przed zapakowaniem [31]. Duży ubytek omawianych związków ($46 \div 49$ %) w różnych odmianach amarantusa przechowywanego w temp. 4 °C zauważyli Chew i wsp. [7]. Zmniejszenie zawartości azotanów(V) w przechowywanych warzywach mogło być spowodowane ich przekształcaniem do azotanów(III). Niewłaściwe warunki składowania surowców roślinnych, w tym wyższa niż zalecana temperatura oraz brak dostępu tlenu mogą być przy-

czyną niepożądanych przemian biochemicznych, które mogą wpływać na zmiany zawartości azotanów(V) [25].

Warzywa uprawiane w warunkach ekologicznych zawierają zdecydowanie mniej azotanów(V) i azotanów(III), czego dowiedli w swoich badaniach Woese i wsp. [45], Worthington [47], Bourn i Prescott [2], Westerveld i wsp. [44], Chen [6] oraz w 2017 r. Li i wsp. [27]. Wymienieni autorzy stwierdzili również, że wpływ systemu uprawy na zawartość azotanów zaznacza się szczególnie silnie w warzywach liściastych. W przypadku niektórych gatunków warzyw pochodzących z upraw ekologicznych i konwencjonalnych różnice zawartości azotanów(V) nie są duże. Łatwo rozpuszczalne i dostępne formy nawozów azotowych i amonowych są szybko przyswajane przez rośliny i odkładane w ich tkankach w postaci azotanów. Z kolei nawożenie organiczne powoduje mniejszą akumulację azotanów niż mineralne. Na stopień kumulacji azotanów(V) w warzywach mogą również wpływać: rodzaj, zasobność i odczyn gleby, ilość opadów w czasie wegetacji oraz nasłonecznienie [4, 34]. Poziom azotanów(V) w warzywach zależy nie tylko od warunków uprawy, ale również od ich biologicznych cech. Poszczególne fragmenty rośliny kumulują zróżnicowane zawartości azotanów(V). Z korzeni są one transportowane przede wszystkim do liści. Tam zachodzi ich biotransformacja, dlatego w warzywach liściastych jest ich na ogół więcej niż w innych. Najwięcej azotanów(V) gromadzi się w roślinach w pierwszych dniach po nawożeniu azotem, a także w roślinach, w których nastąpiło ograniczenie procesu fotosyntezy, dlatego w porze rannej zawartość azotanów(V) w roślinach jest większa niż po południu. Azotany(V) i azotany(III) mogą także powstawać podczas przechowywania produktów (warzyw) w chłodniach i zamrażalnicach na drodze przekształcania związków azotowych [23].

W niniejszych badaniach wszystkie opakowania z kiszonkami były przechowywane w jednakowych warunkach. Identyfikacyjnie pobierano próbki z opakowań oryginalnie zamkniętych. Przyczyną istotnie większych zawartości azotanów(V) w kapuście kiszzonej ekologicznej po 3 miesiącach chłodniczego składowania być może było zalanie wentyli odprowadzających gazy na etapie dystrybucji produktów od producenta do punktu sprzedaży bezpośredniej, co przyczyniło się do tak dużych wzrostów omawianych związków.

Zawartość azotanów(III) oznaczono zarówno w kiszonce ekologicznej, jak i konwencjonalnej bezpośrednio po zakupie, a po 2 miesiącach chłodniczego składowania w kapuście kiszzonej ekologicznej (tab. 3). Konwencjonalna kapusta kiszona tuż po zakupie zawierała statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) więcej azotanów(III) niż kiszonka ekologiczna. W badaniach przeprowadzonych po 1 i 3 miesiącach chłodniczego składowania potwierdzono brak potencjalnie niebezpiecznych azotanów(III) w analizowanych kapustach kiszonych, niezależnie od ich pochodzenia.

Poziom azotanów(III) w świeżych, nieuszkodzonych i prawidłowo przechowywanych warzywach jest niski prawdopodobnie dzięki zachowanej równowadze pomiędzy reduktazą azotynową a reduktazą azotanową. Podczas fermentacji zawartość azotanów(III) wzrasta w wyniku mikrobiologicznego rozkładu azotanów(V) i działania endogennej reduktazy azotanowej. Na ilość tych związków wpływa liczba i rodzaj szczepów bakterii kwasu mlekowego. Podczas chłodniczego przechowywania akumulacja azotanów(III) może zostać zahamowana [10].

Tabela 3. Zawartość azotanów(III) w kapuście kiszzonej konwencjonalnej i ekologicznej, w zależności od czasu chłodniczego przechowywania (w przeliczeniu na jony NO_2^-)

Table 3. Content of nitrites in conventional and organic sauerkraut, depending on refrigerated storage time (expressed as NO_2^- ions)

Okres przechowywania Storage period [miesiąc / month]	Zawartość azotanów(III) jako NO_2^- Content of nitrites expressed as NO_2^- ions [mg/kg s.m. / mg/kg d.m.]	
	Kapusta kiszona / Sauerkraut	
	Konwencjonalna Conventional	Ekologiczna Organic
0 (tuż po zakupie) (immediately after purchase)	27,3 ^a ± 2,1	11,5 ^b ± 3,2
1	0,0 ^d ± 0,00	0,0 ^d ± 0,00
2	0,0 ^d ± 0,00	6,8 ^c ± 0,04
3	0,0 ^d ± 0,00	0,0 ^d ± 0,00

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Hallmann i wsp. [14] przeprowadzili dwuletni eksperyment, podczas którego porównano kapustę białą odmiany ‘Sufama’ pochodzącą z upraw konwencjonalnych i ekologicznych. Uzyskane wyniki, podobnie jak w przypadku omówionych wcześniej azotanów(V), jednoznacznie wskazały na istotnie mniejszą zawartość azotanów(III) w kapuście pochodzącej z upraw ekologicznych (w 2 latach odpowiednio: 0,55 i 0,45 mg/kg ś.m.) w porównaniu z kapustą uprawianą konwencjonalnie (w 2 latach odpowiednio: 0,78 i 0,64 mg/kg ś.m.).

Hou i wsp. [16] określili zawartość azotanów(III) w kapuście kiszzonej zapakowanej (3,08 mg/kg ś.m.) oraz niezapakowanej (6,41 mg/kg ś.m.). Wartości te były zdecydowanie większe od wyników uzyskanych w niniejszej pracy. Hord i wsp. [15] podali, że kapusta głowiasta biała odznaczała się zawartością azotanów(III) na poziomie $0 \div 0,041$ mg/100 g ś.m. Są to wartości mniejsze w porównaniu z uzyskanymi w niniejszej pracy. Czech i wsp. [8] odnotowali natomiast, że w kapuście głowiastej białej pochodzącej z Lublina zawartość azotanów(III) wynosiła 0,64 mg/kg ś.m., a z Katowic – 0,76 mg/kg ś.m. Zawartość azotanów(III) w surowych warzywach z rodziny krzyżowych przedstawiona przez Leszczyńską [26] wahała się od 1,47 mg/kg ś.m. w zielo-

nym kalafiorze do 3,49 mg/kg ś.m. w białym kalafiorze. Zbliżone wartości do uzyskanych w badaniach własnych deklarowała Śmiechowska [41] – 0,2 ÷ 3,3 mg/kg ś.m. Według Gajewskiej i wsp. [12] w białej kapuście z okresu wiosenno-letniego zawartość azotanów(III) wynosiła 0,9 mg NaNO₂/kg ś.m., a w okresie jesienno-zimowym – 1,1 mg NaNO₂/kg ś.m. Wartości te są nieznacznie wyższe od uzyskanych w badaniach własnych. Du i wsp. [10] stwierdzili w kapuście głowiastej białej zawartość azotanów(III) mieszczącą się w granicach 0,00 ÷ 0,41 mg NO₂⁻/kg ś.m., czyli minimalnie niższą od wartości uzyskanej w toku tej pracy. Większą ilość tych związków stwierdzono w sałacie i to zarówno w okresie wiosenno-letnim, jak i jesienno-zimowym (odpowiednio: 2,3 i 2,9 mg NaNO₂/kg ś.m.), a także w burakach ćwikłowych z tych samych okresów (odpowiednio: 1,5 i 1,8 mg NaNO₂/kg ś.m.). Wykazano niewielkie zdolności kumulowania tych składników w pomidorach, marchwi i ogórkach (ok. 0,6 mg NaNO₂/kg ś.m.) [12]. W niektórych pracach autorzy w ogóle nie stwierdzili obecności azotanów(III) w badanych warzywach, jak Hsu i wsp. [17] w szpinaku angielskim, kapuście chińskiej, czy sałacie lodowej, Huarte-Mendicoa i wsp. [18] w brokułach, co pokrywa się z częścią wyników uzyskanych w toku tej pracy.

Kapusta-Duch i wsp. [20] podają, że zawartość azotanów(III) w kapuście kiszzonej przed przechowywaniem wynosiła 0,60 mg/kg s.m., co pokrywa się z wartością oznaczoną w niniejszej pracy w przypadku kiszonki ekologicznej tuż po zakupie. Z badań Kapusty-Duch i wsp. [20] wynika, że kiszonki przechowywane chłodniczo w torebkach z PEL-LD z zamknięciem strunowym przez 1, 2 i 3 miesiące zawierały azotany(III) w ilościach odpowiednio: 0,70, 1,10 i 0,60 mg/kg s.m. Z kolei w kiszonkach przechowywanych w torebkach z metalizowanego PET (PET met/PE) wartości te kształtowały się następująco: po 1 miesiącu – 0,80 mg/kg s.m., po 2 miesiącach – 1,80 mg/kg s.m., a po 3 miesiącach chłodniczego składowania – 1,10 mg/kg s.m. warzywa. W badaniach własnych w kapuście kiszzonej konwencjonalnej tuż po zakupie zaobserwowano większą zawartość azotanów(III) w porównaniu z podanymi wyżej wartościami. Podczas 3 miesięcy przechowywania kiszzonek nie wykryto na ogół azotanów(III). Wyjątkiem była kiszonka ekologiczna po 2 miesiącach chłodniczego przechowywania. Mniejsze straty zawartości azotanów(III) – o 27,5 % – stwierdzono w sałacie masłowej przechowywanej chłodniczo przez 14 dni [31]. Wzrost zawartości azotanów(III) w granicach 54 ÷ 70 % w blanszowanym amarantusie po 4 dniach chłodniczego składowania odnotowali Chew i wsp. [7]. Hou i wsp. [16] zaobserwowała, że obecność opakowania wpływa istotnie na zawartość omawianych związków. W warzywach zapakowanych ich ilość była 2-krotnie mniejsza niż w surowcach bez opakowań.

Brak danych w publikacjach innych autorów dotyczących wpływu chłodniczego przechowywania kapusty kiszzonej w tego typu innowacyjnych opakowaniach (z wen-

tylem) na zmiany zawartości azotanów(V) i azotanów(III) nie pozwolił na wyczerpujące zweryfikowanie otrzymanych wyników.

Wnioski

1. Kapusta kiszona konwencjonalna charakteryzowała się istotnie większą zawartością suchej masy w porównaniu z kapustą kiszoną ekologiczną. W kapuście kiszonej ekologicznej zawartość suchej masy przez cały okres trwania doświadczenia była zbliżona, a w kiszonce konwencjonalnej na ogół wzrastała statystycznie istotnie wraz z czasem przechowywania.
2. Zarówno w przypadku kiszunki konwencjonalnej, jak i ekologicznej zaobserwowano na ogół statystycznie istotny wzrost zawartości azotanów(V) w porównaniu z kiszunką tuż po zakupie. Po 3 miesiącach przechowywania stwierdzono niemal 2 razy większą zawartość azotanów(V) w kapuście kiszonej ekologicznej w stosunku do kapusty kiszanej konwencjonalnej. Najprawdopodobniej wynikało to z zalania wentyli odprowadzających gazy podczas transportu kiszonek od producenta do punktów sprzedaży bezpośredniej.
3. Tuż po zakupie istotnie większą (o ok. 58 %) zawartość azotanów(III) stwierdzono w kapuście kiszanej konwencjonalnej w porównaniu z kapustą kiszoną ekologiczną. Podczas 3 miesięcy przechowywania w kiszunkach nie stwierdzono obecności azotanów(III) poza jednym wyjątkiem, którym była kiszunka ekologiczna po 2-miesięcznym okresie chłodniczego przechowywania.

Literatura

- [1] Borowska M., Omieljaniuk N., Rostowski J., Otlog T., Hamid F.: Zawartość azotanów i azotynów w wybranych warzywach i ziemniakach dostępnych w handlu Białegostoku w latach 1991 - 1992. *Rocz. PZH*, 1994, 45, 89-96.
- [2] Bourn D., Prescott J.: A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2002, 42 (1), 1-34.
- [3] Bryan N.S., Ivy J.L.: Inorganic nitrite and nitrate: Evidence to support consideration as dietary nutrients. *Nutr. Res.*, 2015, 35 (8), 643-654.
- [4] Brzozowska A.: Toksykologia żywności. Wyd. SGGW, Warszawa 2004.
- [5] Casado F.J., Lopez A., Rejano L., Sanchez A.H., Montano A.: Nutritional composition of commercial pickled garlic. *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, 219, 355-359.
- [6] Chen C.M.: Organic fruits and vegetables: Potential health benefits and risks. *Nutrition Noteworthy*, 2005, 7 (1), #0c6386bt.
- [7] Chew S.C., Prasad K.N., Bao Y., Ismail A.: Changes in nitrate and nitrite levels of blanched amaranthus during refrigeration storage. *Malaysian J. Health Sci.*, 2011, 9 (1), 29-34.
- [8] Czech A., Pawlik M., Rusinek E.: Contents of heavy metals, nitrates, and nitrites in cabbage. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2012, 21 (2), 321-329.

- [9] Drasković M., Tepić Horecki A., Sumić Z., Malbasa R., Vitas J., Pavlič B., Vakula A.: Variation of bioactive compounds content in fermented cabbage: Influence of fermentation temperature. *J. Proc. Energy Agric.*, 2017, 21 (3), 136-141.
- [10] Du S., Zhang Y., Lin X.: Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications of human health. *Agric. Sci. China.*, 2007, 6 (10), 1246-1255.
- [11] FAO/WHO: Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series, 2003, 50, 1053-1071.
- [12] Gajewska M., Czajkowska A., Bartodziejska B.: Zawartość azotanów(III) i (V) w wybranych warzywach dostępnych w handlu detalicznym regionu łódzkiego. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 2009, 40, 388-395.
- [13] Gębczyński P.: Zmiany ilościowe wybranych składników chemicznych w procesie mrożenia i zamrażalniczego składowania głównych i bocznych róż brokołu. *Technol. Alim.*, 2003, 2 (1), 31-39.
- [14] Hallmann E., Kazimierzczak R., Marszałek K., Drela N., Kiernożek E., Toomik P., Matt D., Luik A., Rembiałkowska E.: The nutritive value of organic and conventional white cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) and anti-apoptotic activity in gastric adenocarcinoma cells of sauerkraut juice produced thereof. *J. Agric. Food Chem.*, 2017, 65, 8171-8183.
- [15] Hord N.G., Tang Y., Bryan N.S.: Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, 90 (1), 1-10.
- [16] Hou J.C., Jijang C., Long Z.: Nitrite level of pickled vegetables in Northeast China. *Food Control.*, 2013, 29, 7-10.
- [17] Hsu J., Arcot J., Lee N.A.: Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chem.*, 2009, 115, 334-339.
- [18] Huarte-Mendicoa J.C., Astiasaran I., Bello J.: Nitrate and nitrite levels in fresh and frozen broccoli. Effect of freezing and cooking. *Food Chem.*, 1997, 58 (1-2), 39-42.
- [19] Iammarino M., Di Taranto A., Cristino M.: Monitoring of nitrites and nitrate levels in leafy vegetables (spinach and lettuce): A contribution to risk assessment. *J. Sci. Food Agric.*, 2014, 15, 773-778.
- [20] Kapusta-Duch J., Leszczyńska T., Boreczak B.: Effect of packages on nitrates and nitrites contents in sauerkrauts. *Ecol. Chem. Eng. A.*, 2016, 23 (1), 89-99.
- [21] Kapusta-Duch J., Leszczyńska T.: Comparison of vitamin C and β -carotene in cruciferous vegetables grown in diversified ecological conditions. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2013, 22, 167-173.
- [22] Kmiecik W., Lisiewska Z., Słupski J.: Effects of freezing and storing of frozen products on the content of nitrates, nitrites, and oxalates in dill (*Anethum graveolens* L.). *Food Chem.*, 2004, 86, 105-111.
- [23] Kośla T.: Biologiczne i chemiczne zanieczyszczenia produktów rolniczych. Wyd. SGGW, Warszawa 1999.
- [24] Kunachowicz H., Nadolna I., Iwanow K., Przygoda B.: Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2017.
- [25] Leszczyńska T., Filipiak-Florkiewicz A., Cieślik E., Sikora E.: Effects of some processing methods on nitrate and nitrite changes in cruciferous vegetables. *J. Food Comp. Anal.*, 2009, 22, 315-321.
- [26] Leszczyńska T.: Azotany i azotyny w warzywach pochodzących z upraw konwencjonalnych i ekologicznych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1996, 29, 289-293.
- [27] Li S., Li J., Zhang B., Li D., Li G., Li Y.: Effect of different organic fertilizers application on growth and environmental risk of nitrate under a vegetable field. *Sci. Rep.*, 2017, 7, #17020.
- [28] Lucarini M., D'Evoli L., Tufi S., Gabrielli P., Paoletti S., Di Ferdinando S., Lombardi-Boccia G.: Influence of growing system on nitrate accumulation in two varieties of lettuce and red radicchio of Treviso. *J. Sci. Food Agric.*, 2012, 92, 2796-2799.
- [29] Martinez-Villaluenga C., Penas E., Frias J., Ciska E., Honke J., Piskula M.K., Kozłowska H., Vidal-Valverde C.: Influence of fermentation conditions on glucosinolates, ascorbigen, and ascorbic acid

- content in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Taler) cultivated in different seasons. *J. Food Sci.*, 2009, 74 (1), 62-67.
- [30] Nath A., Bagchi B., Misra L.K., Deka B.C.: Changes in post-harvest phytochemical qualities of broccoli florets during ambient and refrigerated storage. *Food Chem.*, 2011, 127, 1510-1514.
- [31] Olszówka K., Perucka I.: The effect of CaCl_2 foliar treatment (before harvest) on the accumulation of nitrates and nitrites in fresh and stored butterhead lettuce. *Acta Sci. Pol. Hort. Cult.*, 2011, 10 (4), 27-35.
- [32] PN-A-75112:1992. Owoce, warzywa i ich przetwory. Oznaczanie zawartości azotynów i azotanów.
- [33] PN-A-79011-3:1998. Koncentraty spożywcze. Metody badań. Oznaczanie zawartości wody.
- [34] Rembiałkowska E., Kacprzak H., Sokołowska J.: Jakość zdrowotna warzyw ekologicznych i konwencjonalnych z dawnego woj. kieleckiego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2001, 34, 49-57.
- [35] Rembiałkowska E.: Comparison of the contents of nitrates, lead, cadmium and vitamin C in potatoes from conventional and ecological farms. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1999, 8, 17-26.
- [36] Rembiałkowska E.: Jakość żywności pochodzącej z gospodarstw organicznych. Jakość żywności a rolnictwo ekologiczne. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2002.
- [37] Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1258/2011 z dnia 2 grudnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów azotanów w środkach spożywczych. *Dz. U. L 320*, ss. 15-17, z 3.12.2011.
- [38] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 r. ustanawiające szczegółowe zasady wdrażania rozporządzenia Rady (WE) nr 834/2007 w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych w odniesieniu do produkcji ekologicznej, znakowania i kontroli. *Dz. U. L 250*, ss. 1-84, z 18.09.2008.
- [39] Rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych i uchylające rozporządzenie (EWG) nr 2092/91. *Dz. U. L 189*, ss. 1-23, z 20.07.2007.
- [40] Sindler A.L., Devan A.E., Fleenor B.S., Seals D.R.: Inorganic nitrite supplementation for healthy arterial aging. *J. Appl. Physiol.*, 2014, 116 (5), 463-477.
- [41] Śmiechowska M.: Studia nad produkcją, jakością i konsumpcją żywności ekologicznej. Zawartość azotanów i azotynów w warzywach. *Prace naukowe. Wyd. Akademii Morskiej, Gdynia 2002*, ss. 104-110.
- [42] Toor R.K., Savage G.P.: Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chem.*, 2006, 99, 724-727.
- [43] Wawrzyniak A., Hamułka J., Gołębiewska M.: Ocena zawartości azotanów(V) i azotanów(III) w wybranych warzywach uprawianych konwencjonalnie i ekologicznie. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2004, 37, 341-345.
- [44] Westerveld S.M., McKeown A.W., Scott-Dupre C.D., McDonald M.R.: Assessment of chlorophyll and nitrate matters as field tissue N test for cabbage, onion and carrots. *Hort. Technol.*, 2004, 14, 179-188.
- [45] Woese K., Lange D., Boess C., Bogl K.W.: A comparison of organically and conventionally grown foods. Results of a review of the relevant literature. *J. Sci. Food Agric.*, 1997, 74, 281-293.
- [46] Wojciechowska R., Rożek S.: Zawartość wybranych składników w plonie kapusty czerwonej w zależności od formy azotu nawozowego. *Zesz. Prob. Post. Nauk Roln.*, 2009, 539, 759-764.
- [47] Worthington V.: Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables and grains. *J. Alter Compl. Med.*, 2001, 7, 161-173.
- [48] Xu J., Hao Z., Xie C., Lv X., Yang Y., Xu X.: Promotion effect of Fe^{2+} and Fe_3O_4 on nitrate reduction using zero-valent iron. *Desalination.*, 2012, 284, 9-13.

**CONTENT EVALUATION OF NITRATES AND NITRITES IN WHITE
SAUERKRAUT KEPT IN COLD STORAGE AND PRODUCED FROM
CONVENTIONAL AND ORGANIC CULTIVATION**

S u m m a r y

Food has a fundamental impact on human health and therefore on the length of human life. Consumer awareness has significantly increased owing to the growing interest of scientists in the methods to ensure health safety of the produced food. Consumers have begun to look for safe food, which production process would be monitored from the beginning to the end, i.e. for the food that would not adversely affect human health or the natural environment. Nitrites are much more toxic to human health than nitrates. Those compounds are N-nitro compounds precursors characterised by carcinogenic, mutagenic and embryotoxic features. Organic farming is an agricultural production system to exclude the use of chemical plant protection products and to eliminate the impact of environmental pollution. Therefore, the main goal of organic farms is to produce foods of a high biological value. The objective of the research study was to compare changes in the content of nitrates and nitrites in white sauerkraut produced from conventional and organic cultivation, kept in cold storage during 3 consecutive months in non-standard packets made of low-density polyethylene and additionally equipped with special valves to enable the discharge of gases generated during fermentation. Immediately after purchase a significantly higher (ca. 58 %) content of nitrites was found in the conventional sauerkraut compared to the organic sauerkraut. Both in the conventional and the organic sauerkraut a statistically significant increase was reported in the content of nitrates compared to the sauerkraut immediately after purchase. After a 3-month period of cold storage no nitrites were detected in the sauerkrauts analysed.

Key words: white sauerkraut, chemical contamination, nitrates, nitrites, refrigerated storage ☒

ANNA S. TARCZYŃSKA

SKALA MARNOWANIA ŻYWNOSCI WŚRÓD STUDENTÓW UNIwersYTETU WARMIŃSKO-MAZURSKIEGO W OLSZTYNIE

Streszczenie

Marnotrawstwo żywności związane jest z nieracjonalnymi procesami gospodarowania zachodzącymi na różnych etapach łańcucha żywnościowego. Szacuje się, że skala marnotrawstwa żywności jest największa wśród gospodarstw domowych w porównaniu z innymi etapami tego łańcucha. Celem niniejszej pracy było określenie skali marnotrawstwa żywności wśród studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (UWM), zidentyfikowanie przyczyn marnowania żywności, określenie częstości występowania tego zjawiska, zidentyfikowanie najczęściej marnowanych produktów oraz określenie poziomu świadomości studentów w odniesieniu do problemu marnotrawstwa żywności. Badania przeprowadzono z użyciem kwestionariusza ankiety oraz tygodniowego wywiadu. Udział w ankiecie wzięło 225 studentów, a w tygodniowym projekcie – 20. Ponad 90 % ankietowanych przyznało, że wyrzuca żywność. Najczęstszą przyczyną marnowania żywności przez studentów UWM był upływ terminu jej przydatności do spożycia, zepsucie lub utrata świeżości. Najczęściej wyrzucanymi produktami były: pieczywo, dania gotowe, owoce i warzywa. Pod względem ilościowym najwięcej żywności wyrzucano na skutek przygotowywania zbyt dużych porcji posiłku. Wyrzucanie różnych produktów spożywczych raz w tygodniu bądź raz w miesiącu jest potwierdzeniem systematycznego marnowania żywności. Stwierdzono, że studenci są świadomi problemu marnotrawstwa żywności na skalę globalną, ale ich postawy nie przyczyniają się do ograniczania tego marnotrawstwa.

Słowa kluczowe: gospodarstwo domowe, studenci, marnotrawstwo żywności, skala marnotrawstwa żywności, przyczyny marnotrawstwa żywności

Wprowadzenie

Zachodzące zmiany cywilizacyjne oraz globalizacja rynków żywnościowych powodują wiele zmian w sferze produkcji i konsumpcji żywności. Wśród pozytywnych aspektów globalizacji należy wymienić nowe rynki zbytu, dostęp do nowych surowców, wyrobów i technologii przetwórstwa oraz zwiększenie dostępności produktów

*Dr hab. inż. A.S. Tarczyńska, prof. UWM, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. M. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn.
Kontakt: sylwiaol@uwm.edu.pl*

spożywczych o zróżnicowanych cechach jakościowych [7, 19]. Negatywnymi przejawami zachodzących zmian są przede wszystkim nadkonsumpcja i marnotrawienie żywności występujące w krajach rozwiniętych. Niezrównoważona produkcja i konsumpcja nieuchronnie prowadzą do marnotrawienia żywności. Szacuje się, że w skali świata jedna trzecia wyprodukowanej żywności jest marnotrawiona. Co roku w Unii Europejskiej marnotrawi się ok. 88 mln ton żywności, czyli na mieszkańca UE przypada średnio 173 kg. Polska znajduje się na niechlubnym piątym miejscu w rankingu marnotrawionej żywności ze wskaźnikiem 247 kg na mieszkańca rocznie. Wyprzedzają nas tylko Holandia (541 kg/osobę/rok), Belgia (345 kg/osobę/rok), Cypr (327 kg/osobę/rok) oraz Estonia (265 kg/osobę/rok). Największy udział w marnowaniu żywności mają gospodarstwa domowe – w zależności od źródeł waha się on w zakresie $42 \div 53$ % [1, 8, 9, 10, 13].

Strategia od „pola do stołu” przedstawiona przez Komisję Europejską 20 maja 2020 r. jest jednym z kluczowych elementów Zielonego Ładu. Celem tej strategii jest dążenie do neutralności klimatycznej między innymi poprzez przejście na zrównoważony model gospodarki żywnościowej, zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego, ochronę bioróżnorodności. Priorytetem jest bezpieczeństwo żywnościowe, dlatego też należy podjąć działania umożliwiające zapewnienie ludziom wystarczającej i zróżnicowanej oferty bezpiecznych, pełnowartościowych i przystępnych cenowo artykułów spożywczych przez cały czas, zwłaszcza w okresie kryzysu. W strategii „od pola do stołu” zwrócono uwagę na problem strat i marnotrawienia żywności. Wskazano, że odpady żywnościowe odpowiadają co najmniej za 227 mln ton ekwiwalentu dwutlenku węgla rocznie, tj. za ok. 6 % całkowitej emisji w UE w 2012 r. Formułując cel 12.3 zrównoważonego rozwoju Komisja zobowiązała się do zmniejszenia o połowę ilości odpadów żywnościowych na mieszkańca na poziomie detalicznym i konsumenckim do 2030 r. [11].

Celem pracy było określenie skali marnotrawstwa żywności wśród studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, zidentyfikowanie przyczyn marnowania żywności, określenie częstości występowania tego zjawiska, zidentyfikowanie najczęściej marnowanych produktów oraz określenie poziomu świadomości studentów w odniesieniu do problemu marnotrawstwa żywności.

Material i metody badań

Badania przeprowadzono wśród studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (UWM) w Olsztynie. Pierwszym narzędziem badawczym był internetowy kwestionariusz ankiety. Link do ankiety wraz z zaproszeniem do udziału w badaniach został umieszczony na stronach mediów społecznościowych wydziałów UWM w Olsztynie. Badanie ankietowe zrealizowano w miesiącach październik – grudzień 2019 r. Kwestionariusz ankiety składał się z 19 pytań merytorycznych i 6 określają-

cych cechy socjodemograficzne respondentów. Uzyskano 225 poprawnie wypełnionych kwestionariuszy. Wśród respondentów kobiety stanowiły 62,67 %, mężczyźni – 37,33 %. W wieku 19 - 22 lata było 28,00 % badanych, 23 - 24 lata – 24,44 %, powyżej 24 lat – 47,56 %. Swoją sytuację materialną jako bardzo dobrą oceniło 33,33 %, jako dobrą – 64,00 %, jako złą tylko 2,67 % respondentów. Jako obecne miejsce zamieszkania 20 % badanych wskazało akademik, stancję – 35,55 %, a dom rodzinny – 44,45 %. Samotnie mieszkało 7,56 % badanych, mieszkanie z jedną osobą dzieliło 16,89 %, z dwiema osobami – 32,00 %, najwięcej respondentów wskazało odpowiedź „trzy lub więcej” – 43,56 %. Wśród osób wskazujących odpowiedź „trzy lub więcej” 24,44 % mieszkało w domu rodzinnym. Większość respondentów stanowiły osoby studiujące kierunek niezwiązany z nauką o żywności – 77,33 %.

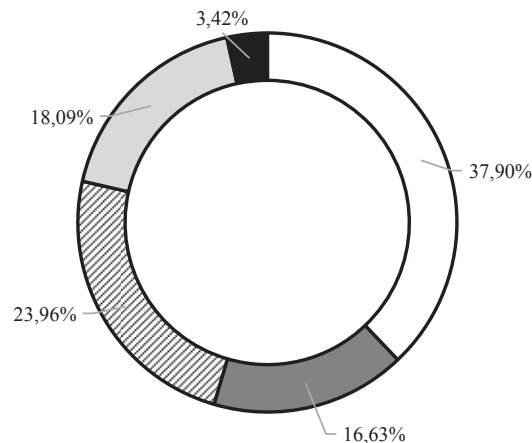
W drugim etapie badań 20 studentów zostało poproszonych o wypełnianie przez 7 dni kwestionariusza dotyczącego wyrzucanej przez nich żywności. Kwestionariusz wywiadu tygodniowego zawierał 7 pytań merytorycznych (w każdym dniu takie same pytania) oraz 5 pytań metryczkowych. Badanie to przeprowadzono w styczniu 2020 r. W tygodniowym projekcie udział wzięło 16 kobiet i 4 mężczyzn. Na stacji mieszkało 14 respondentów, 5 – w domu rodzinnym, a 1 osoba w akademiku. Ankietowani określili swoją sytuację materialną jako dobrą (18 osób). Osoby, biorące udział w tygodniowym projekcie mieszkały z dwoma współlokatorami (8 osób.), trzema i więcej (7 osób) oraz z jednym współlokatorem (5 osób).

Analizę statystyczną materiału źródłowego przeprowadzono z zastosowaniem pakietu Statistica 13 oraz arkusza kalkulacyjnego Excel z pakietu MS Office 365. Uzyskane dane zestawiano w tabelach kontyngencji. Po przeanalizowaniu tabel kontyngencji weryfikowano hipotezę o niezależności badanych zmiennych jakościowych za pomocą testu χ^2 ($p = 0,05$). W przypadku odrzucenia hipotezy zerowej obliczano współczynnik Yule'a [6, 18].

Wyniki i dyskusja

Pierwsza grupa pytań zawartych w kwestionariuszu ankiety dotyczyła rozumienia pojęcia i postaw wobec marnowania żywności. Wskazania respondentów przedstawiono na rys. 1. Do wyrzucania żywności przyznało się 92,44 % ankietowanych. Na postrzeżenie marnowania żywności jako kupowanie nadmiernej ilości istotny wpływ miał wiek ($\phi = 0,1778$) oraz miejsce zamieszkania ($\phi = 0,2335$). Wśród respondentów, którzy uznali kupowanie nadmiernej ilości żywności za przejaw marnotrawstwa 36,44 % stanowiły osoby powyżej 24 lat. Im młodsi byli respondenci, tym odsetek wskazań był mniejszy. Spośród ankietowanych udzielających tej odpowiedzi 34,67 % mieszkało w domu rodzinnym, 24,44 % – na stacji, a 9,78 % – w akademiku. Resztki, takie jak obierki, jako przejaw marnotrawstwa wskazało natomiast 6,22 % badanych. Na wybór tej odpowiedzi istotny wpływ miał wiek respondentów ($\phi = 0,03462$). Z badań prze-

prowadzonych przez Łabę i wsp. [12] na próbie 500 gospodarstw domowych wynika, że w każdym polskim gospodarstwie domowym wyrzucano ok. 3,9 kg żywności, w tym części jadalne i niejadalne.

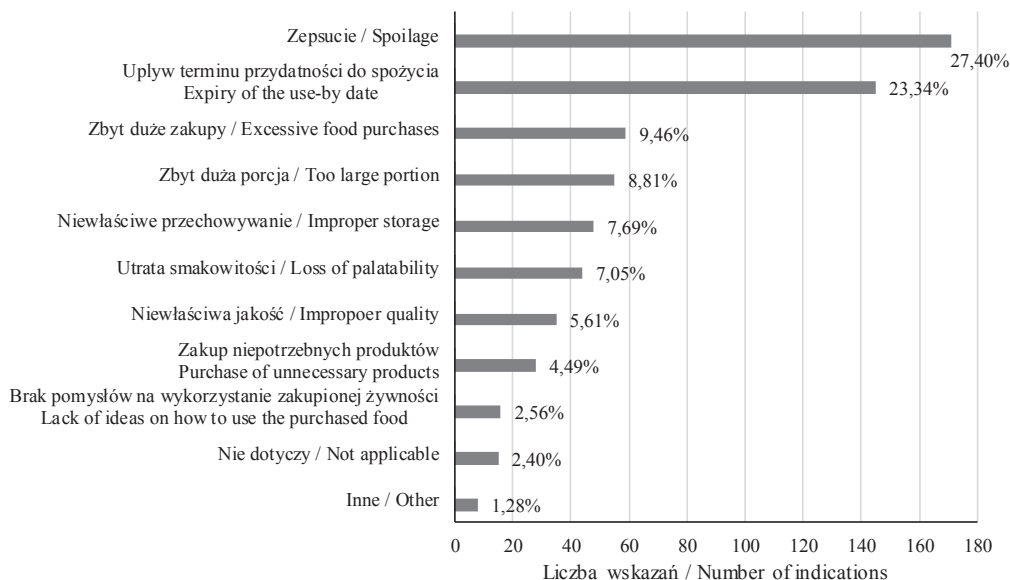


- Kupowanie nadmiernej ilości żywności / Buying too much food
- Wyrzucanie żywności po upływie terminu przydatności do spożycia / Throwing food after the expiry date
- Przygotowywanie zbyt dużych porcji / Preparing too large meal portions
- Niewłaściwe przechowywanie / Improper storage
- Resztki jedzenia, np. obierki / Food leftovers, e.g. peelings

Rys. 1. Rozumienie pojęcia marnotrawienia żywności

Fig. 1. Understanding of food waste concept

Najczęstszymi przyczynami wyrzucania żywności było zepsucie i upływ terminu przydatności do spożycia (rys. 2). Wskazanie przekroczenia terminu przydatności do spożycia było istotnie różnicowane płcią respondentów ($\varphi = 0,2137$). Odpowiedź tę wybrało 45,33 % kobiet i tylko 19,11 % mężczyzn. Z powodu zepsucia żywność najczęściej wyrzucały osoby mieszkające w domu rodzinnym (35,11 %). Zbyt duże zakupy, jako przyczynę marnowania żywności, dwukrotnie częściej wskazywały osoby studiujące kierunek niezwiązany z nauką o żywności ($\varphi = 0,1841$). Utrata smakowitości była uzależniona od miejsca zamieszkania respondenta ($\varphi = 0,1961$). Do wyrzucania żywności z powodu utraty smakowitości przyznało się najwięcej osób mieszkających na stacjach (8,92 %). Respondenci mieszkający w domu rodzinnym (39,56 %) nie wyrzucali żywności z powodu utraty smakowitości.



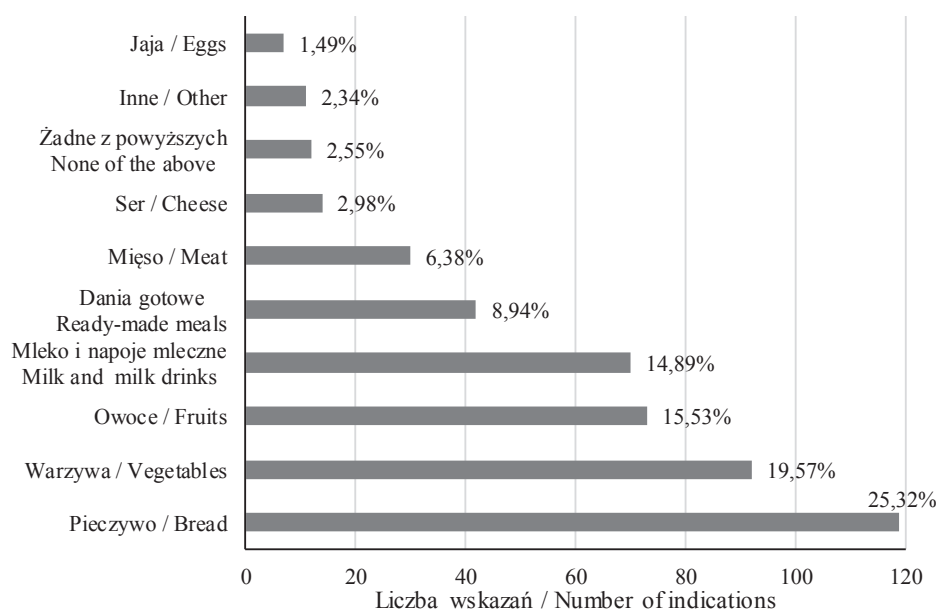
Rys. 2. Przyczyny wyrzucania żywności przez respondentów

Fig. 2. Reasons why the respondents throw out food

Wyniki własne różnią się od wyników uzyskanych przez Bilską i wsp. [1]. Wykazali oni, że ponad połowa ankietowanych przyznała, że zdarza się jej wyrzucać żywność, a 2/3 z nich jako przyczynę podało przekroczenie terminu ważności. Niewłaściwe przechowywanie wskazało 15 %, zbyt duże zakupy – 13 %, zepsucie – 3 %, a niewłaściwą jakość – 1 % [1]. Występujące różnice mogą wynikać ze specyfiki badanej grupy, którą w niniejszych badaniach stanowili studenci. Wielu z nich nie prowadzi własnych gospodarstw domowych, korzysta z żywności zakupionej i przygotowanej przez rodziców i nie przygotowuje regularnych posiłków w miejscu zamieszkania. Wyniki badań własnych są bardziej zbliżone do wyników opublikowanych w Raplocie Federacji Polskich Banków Żywności „Nie marnuj jedzenia 2020”, w którym wskazano, że najczęstszym powodem wyrzucania żywności jest: zepsucie (65,2 %), przeoczenie daty ważności (42 %), przygotowanie zbyt dużej ilości jedzenia (26,5 %) oraz zbyt duże zakupy (22,2 %) [17].

Jedna czwarta ankietowanych studentów wyrzucała pieczywo, a ok. 1/5 – warzywa (rys. 3). Zaznaczenie odpowiedzi „żadne z powyższych” oznaczało, że dana osoba nie wyrzucała żywności (2,55 %). Do wyrzucania owoców, mleka i napojów mlecznych przyznało się ok. 15 % badanych. Prawie 9 % ankietowanych studentów zaznaczyło, że wyrzuca dania gotowe. Najbardziej marnowanymi produktami były jaja (1,49 %), sery (2,98 %) oraz mięso (6,38 %). Pieczywo najbardziej wyrzucały osoby zamieszkujące w domu rodzinnym (23,11 %). Warzywa i owoce częściej wyrzucały

kobiety ($\varphi = 0,1423$). Wyrzucanie dań gotowych było zależne od wieku respondentów ($\varphi = 0,2099$), sytuacji materialnej ($\varphi = 0,2191$) i kierunku studiów ($\varphi = -0,1492$). Im młodszy byli respondenci, tym częściej przyznawali, że wyrzucają dania gotowe. Respondenci określający swoją sytuację materialną jako dobrą (48 %) i bardzo dobrą (30,67 %) nie wyrzucali dań gotowych zbyt często. Studenci uczący się na kierunkach niezwiązanych z nauką o żywności częściej przyznawali, że wyrzucają gotowe dania (12 %), podczas gdy osoby studiujące na kierunkach żywnościowych stanowiły 7 %.



Rys. 3. Produkty żywnościowe najczęściej wyrzucane przez respondentów

Fig. 3. Type of food products most often discarded by respondents

Według Raportu Federacji Polskich Banków Żywności "Nie marnuj jedzenia 2016" do najczęściej wyrzucanych produktów zalicza się: wędliny (43 %), pieczywo (36 %), warzywa (32 %), owoce (27 %), jogurty (23 %), ziemniaki (20 %), a także mięso (17 %) [16]. Struktura wyrzucanych produktów jest podobna do przedstawionej przez Bilską i wsp. [1, 2, 4].

Respondenci zostali poproszeni o wskazanie etapów gospodarowania żywnością, w których według nich występuje największe marnotrawstwo. Według prawie połowy ankietowanych studentów najwięcej żywności marnuje się z powodu niezjedzenia posiłku do końca – tzw. resztki talerzowe (48,44 %), następnie przechowywania gotowych posiłków (23,11 %), przechowywania surowców i półproduktów (20 %). Najmniej wskazań dotyczyło przygotowania samego posiłku (8,44 %). Odpowiedzi na to

pytanie były uzależnione od płci ($\varphi = 0,2265$) oraz liczby osób mieszkających z respondentem ($\varphi = 0,2801$). Według prawie połowy kobiet największe marnotrawstwo ma miejsce na etapie samej konsumpcji – resztek talerzowych. Uważa tak tylko ok. 15 % mężczyzn. Zdaniem osób mieszkających z dwiema (13,78 %) oraz trzema i więcej osobami (24,89 %) resztki talerzowe stanowią największy problem. Ankietowani, którzy mieszkali sami zaznaczyli, że najwięcej żywności marnują na etapie przechowywania produktów. Segmentacja konsumentów przeprowadzona przez Bilską i wsp. [3] wskazuje, że jednoosobowe i dwuosobowe gospodarstwa domowe bez dzieci cechują się wysoką częstotliwością wyrzucania żywności z powodu zbyt dużego opakowania. Ponad 65 % badanych wskazała, że stara się zagospodarować nadwyżki żywności. Połowa respondentów określiła, że nadwyżki żywności najczęściej były przeznaczane na dokarmianie zwierząt. Mrożenie lub suszenie żywności wskazało 30 % badanych, a po 10 % zadeklarowało, że dzieli się z rodziną, znajomymi lub dokarmia ptaki. Sposób wykorzystania nadwyżek żywności różnicowały wiek ($\varphi = 0,2949$) i miejsce zamieszkania respondentów ($\varphi = 0,2970$). Osoby w wieku 20 - 22 lata mieszkające w akademikach nadwyżki żywnościowe wykorzystują głównie do dokarmiania zwierząt, natomiast starsi respondenci mieszkający w domach rodzinnych częściej mrozą lub suszą nadwyżki żywności.

Przygotowywanie zbyt dużej ilości potraw w gospodarstwach domowych to jedna z przyczyn marnotrawstwa, na którą zwracali uwagę Beretta i wsp. [4] oraz Papargyropoulou i wsp. [14]. Bilską i wsp. podali, że 41 % ankietowanych deklaruje przygotowywanie z niespożytej żywności innych potraw, 1/3 ankietowanych taką żywność wyrzucała, 1/4 osób – mroziła, a tylko 5 % badanych dokarmiało zwierzęta [1, 2]. Studenci mieszkający poza domem rodzinnym często mają ograniczone możliwości przechowywania żywności mrożonej, dlatego prawdopodobnie częściej dokarmiają nią zwierzęta.

Kolejna grupa pytań w kwestionariuszu ankietowym dotyczyła zachowań respondentów. Ponad 94 % badanych zadeklarowało, że rozumie termin "należy spożyć do". Jednocześnie 90 % ankietowanych, w tym ponad połowa kobiet (58,67 %) i 31,56 % mężczyzn stwierdziło, że zawsze lub prawie zawsze zwraca uwagę na termin przydatności do spożycia podczas zakupów. Listę zakupów przygotowuje 1/5 studentów, czasami – 44 % studentów, a nie robi jej nigdy – 15,89 % badanych. Uzyskane wyniki różnią się od wyników badań Bilskiej i wsp. [1], którzy określili, że ponad połowa ankietowanych przygotowuje listę zakupów, zaś 35 % robi to czasami.

Ostatnia grupa pytań dotyczyła świadomości studentów w zakresie marnotrawienia żywności. Prawie 90 % badanych uznało, że w Polsce mamy do czynienia z wysokim poziomem marnotrawstwa żywności. Odpowiedzi istotnie różnicowały płeć respondentów ($\varphi = 0,2855$). Ponad 8 % mężczyzn stwierdziło, że nie ma w Polsce problemu marnotrawstwa żywności. Takiej odpowiedzi nie udzieliła żadna kobieta.

Marnotrawstwo żywności uznano za problem światowy 91,11 % studentów (tak – 67,11 %, raczej tak – 24,00 %), ale 7,11 % nie miało zdania na ten temat. Za najbardziej negatywne skutki marnowania żywności studenci uznali skutki społeczne (37,78 % wskazań) i ekonomiczne (31,11 %). Skutki środowiskowe wskazało 21 % ankietowanych. Dąbrowska i Janoś-Kresło [5] podkreśliły, że Polacy marnują dużo żywności, jednak ponad 66 % z nich dostrzega w marnotrawstwie problem. Zdaniem studentów najwięcej żywności jest marnotrawionej w gastronomii (31 %), gospodarstwach domowych (24,5 %) i w handlu (23,1 %). Istotny wpływ na odpowiedzi ankietowanych miała sytuacja materialna ($\varphi = 0,2869$). Respondenci, oceniający swoją sytuację materialną jako bardzo dobrą, uważali, że najwięcej żywności jest marnowanej w gospodarstwach domowych, natomiast studenci oceniający swoją sytuację materialną jako dobrą największy poziom marnotrawstwa przypisywali gastronomii. Według ankietowanych na etapie transportu dochodzi do najmniejszego marnotrawstwa żywności (5,8 %). Według danych Komisji Europejskiej [17] straty żywności w sektorze handlu to ok. 5 % ogółu marnowanej żywności. W Polsce obowiązuje Ustawa z dnia 19 lipca 2019 r. o przeciwdziałaniu marnowaniu żywności [20], która określa zasady postępowania z żywnością oraz obowiązki sprzedawców żywności w celu przeciwdziałania marnowaniu żywności oraz negatywnym skutkom społecznym, środowiskowym i gospodarczym. Nakłada ona obowiązek na sprzedawców żywności do zawarcia umowy z organizacją pozarządową dotyczącą nieodpłatnego przekazywania żywności spełniającej wymogi prawa żywnościowego, a nieprzeznaczonej do sprzedaży, w szczególności ze względu na wady wyglądu żywności lub jej opakowań.

Zdaniem ankietowanych studentów ograniczaniem marnotrawstwa żywności powinni zająć się konsumenci (46,2 %), zakłady przetwórstwa żywności (15,6 %), służby państwowe (14,2 %), gastronomia (8,9 %), sklepy (4 %) i rolnicy (1,8 %). Inni ankietowani nie mieli na ten temat zdania. Wskazania te istotnie różnicowało miejsce zamieszkania ($\varphi = 0,3118$) studenta. Respondenci mieszkający w akademiku wskazali, że w pierwszej kolejności to konsumenci powinni ograniczać ilość marnowanej żywności, w następnej – zakłady przetwórstwa żywności. W opinii osób mieszkających w domu rodzinnym marnotrawstwem żywności powinny się zająć konsumenci oraz służby państwowe. Odpowiedzi dotyczące miejsca łańcucha żywnościowego, w którym jest najwięcej marnowanej żywności, w zestawieniu ze wskazaniami, kto powinien się tym zająć, nie są spójne. Branża gastronomiczna została wskazana jako ta, która marnuje najwięcej żywności (31 %), ale tylko 8,9 % respondentów stwierdziło, że to gastronomia powinna zająć się ograniczaniem marnotrawstwa. Cechą istotnie różnicującą wskazania respondentów był kierunek studiów. Osoby studiujące na kierunkach związanych z nauką o żywności w pierwszej kolejności wskazywały konsumentów jako podmiot, który powinien podjąć działania zmierzające do ograniczania marnotrawstwa, w drugiej kolejności służby państwowe. Ankietowani studiujący na kierunkach niezwiązanych

nych z żywnością stwierdzili, że to konsumenci powinni ograniczyć marnowanie żywności, a następnie zakłady przetwórstwa żywności. Z badań przeprowadzonych przez Federację Polskich Banków Żywności wynika, że konsumenci (57 %) są wskazywani jako podmiot, który powinien podjąć działania w celu ograniczenia marnowania żywności w Polsce, następnie sieci handlowe (35 %), producenci żywności (34 %), rząd (29 %), organizacje społeczne (21 %) oraz rolnicy (4 %) [15].

Na podstawie analizy odpowiedzi zawartych w kwestionariuszu tygodniowym wykazano, że na początku tygodnia ankietowani konsumowali posiłki w domu (18 osób) oraz korzystali z usług lokali gastronomicznych (7 osób). W poniedziałek ponad połowa ankietowanych nie wyrzuciła żywności. Wtorek jest jednym z dni tygodnia, w którym ponad połowa konsumentów wyrzuciła żywność do kosza. Osoby, które przyznały się do wyrzucenia żywności wskazywały, że było to pieczywo, napoje mleczne, owoce i warzywa. Powodem było zepsucie, utrata świeżości, przekroczenie terminu przydatności do spożycia oraz niewłaściwie warunki przechowywania. Ponad połowa badanych, spożywająca posiłki u znajomych lub w lokalach gastronomicznych, nie zjadła całego posiłku, który później wyrzuciła do kosza. W piątek połowa ankietowanych wyrzuciła żywność. W koszu znalazło się pieczywo, owoce, warzywa, wędliny oraz napoje mleczne. W sobotę najczęściej marnowano dania gotowe. Powodem była zbyt duża porcja talerzowa. Żywność była najczęściej wyrzucana we wtorki i w piątki. Przyczyny wyrzucania żywności i produkty najczęściej wyrzucane przez studentów biorących udział w badaniu są analogiczne do wskazanych przez Bilską i wsp. [3], którzy przeprowadzili w 2019 r. badanie ankietowe na grupie 1115 dorosłych Polaków.

Wnioski

1. Najczęstszą przyczyną wyrzucania żywności przez studentów UWM był wpływ terminu jej przydatności do spożycia, zepsucie lub utrata świeżości. Najczęściej wyrzucane były: pieczywo, warzywa, owoce oraz mleko i napoje mleczne.
2. Pod względem ilościowym najwięcej żywności wyrzucano na skutek przygotowania zbyt dużej porcji posiłku.
3. Wyrzucanie różnych produktów spożywczych raz w tygodniu bądź raz w miesiącu jest potwierdzeniem systematycznego marnowania żywności.
4. Studenci UWM mają świadomość, że marnotrawstwo żywności to problem światowy. Zdecydowana większość studentów jest też świadoma skutków marnowania żywności.

Literatura


- [1] Bilaska B., Grzesińska W., Tomaszewska M., Rudziński M.: Marnotrawstwo żywności jako przykład nieefektywnego zarządzania w gospodarstwach domowych. *Rocz. Nauk. Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, 2015, 4 (17), 39-43.
- [2] Bilaska B., Tomaszewska M., Kołożyn-Krajewska D.: Analysis of behaviours of Polish consumers in relation to food waste. *Sustainability*, 2020, 12 (1), #304.
- [3] Bilaska B., Tomaszewska M., Kołożyn-Krajewska D.: Segmentation of Polish households taking into account food waste. *Foods*, 2020, 9, #379.
- [4] Beretta C., Stoessel F., Baier U., Hellweg S.: Quantifying food losses and the potential for reduction in Switzerland. *Waste Management*, 2013, 33, 764-773.
- [5] Dąbrowska A., Janoś-Kresło M.: Marnowanie żywności jako problem społeczny. *Handel Wewnętrzny*, 2013, 4 (9345), 14-26.
- [6] Dobosz M.: Wspomagana komputerowo statystyczna analiza wyników badań. Akad. Ofic. Wyd. EXIT, Warszawa 2001.
- [7] Garbowska B., Radzymińska M., Tarczyńska A.S.: Marnotrawstwo żywności – studium zarządzania łańcuchem żywnościowym. Instytut Badań Gospodarczych, Olsztyn 2021.
- [8] Gustavsson J., Cedreberg Ch., Sonesson U., van Otterdijk R., Mebeck A.: *Global Food Losses and Food Waste*. FAO, Rome 2011.
- [9] Gustavsson J., Cedreberg Ch., Sonesson U., Emanuelsson A.: *Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention*. [on line]. SIK – The Swedish Institute for Food and Biotechnology, Lund, Sweden 2013. Dostęp w Internecie [4.04.2021]: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:944159/FULLTEXT01.pdf>
- [10] Katsarova I.: *Tackling food waste – The EU's Contribution to a Global Issue*. [on line]. European Parliamentary Research Service, 2014. Dostęp w Internecie [4.04.2021]: [https://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2014/130678/LDM_BRI\(2014\)130678_REV1_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2014/130678/LDM_BRI(2014)130678_REV1_EN.pdf)
- [11] Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady, Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów: Strategia „od pola do stołu” na rzecz sprawiedliwego, zdrowego i przyjaznego dla środowiska systemu żywnościowego. [on line]. Komisja Europejska. Dostęp w Internecie [4.04.2021]: https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:ea0f9f73-9ab2-11ea-9d2d-01aa75ed71a1.0015.02/DOC_1&format=PDF
- [12] Łaba S., Bilaska B., Tomaszewska M., Szczepański K., Tul-Krzyszczuk A., Kosicka-Gębska M., Kołożyn-Krajewska D.: Próba oszacowania strat i marnotrawstwa żywności w Polsce. *Przem. Spoż.*, 2020, 11 (74), 10-18.
- [13] Parlament Europejski: Marnowanie żywności w UE: Miliony ton jedzenia do kosza. [on line]. Dostęp w Internecie [4.04.2021]: https://www.euractiv.pl/section/rolnictwowpr/infographic/_marnowanie-zywnosci-w-ue-miliony-ton-jedzenia-kosza/
- [14] Papargyropoulou E., Lozano R., Steinberger J.K., Wright N., Ujang Z.: The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *J. Cleaner Prod.*, 2014, 76, 106-115.
- [15] Raport Federacji Polskich Banków Żywności „Nie marnuj jedzenia 2012” [on line]. Dostęp w Internecie [4.04.2021]: http://www.niemarnuje.pl/files/sdz_2012_10_16_raport_marnowanie_fpbz.pdf
- [16] Raport Federacji Polskich Banków Żywności „Nie marnuj jedzenia 2016” [on line]. Dostęp w Internecie [4.04.2021]: https://bzsos.pl/wp-content/uploads/2016/10/Raport-Nie-marnuj-jedzenia-2016-_-cz%C4%99%C5%9B%C4%87-1-.pdf
- [17] Raport Federacji Polskich Banków Żywności „Nie marnuj jedzenia 2020” [on line]. Dostęp w Internecie [4.04.2021]: https://bankizywnosci.pl/wp-content/uploads/2020/10/Raport_NieMarnujJedzenia_2020.pdf

- [18] Stanisław A.: Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. Tom 1. Statystyki podstawowe. StatSoft, Kraków 2006.
- [19] Śmiechowska M.: Zrównoważona konsumpcja a marnotrawstwo żywności. *Ann. Acad. Med. Gedanensis*, 2015, 45, 89-97.
- [20] Ustawa z dnia 19 lipca 2019 r. o przeciwdziałaniu marnowaniu żywności. *Dz. U.* 2019, poz. 1680. Tekst jednolity z dnia z dnia 16 września 2020 r. *Dz. U.* 2020, poz. 1645.

THE SCALE OF FOOD WASTE AMONG STUDENTS OF THE UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN

Summary

Food waste is associated with irrational management processes that take place at different stages of the food chain. It is estimated that the scale of food waste among households is the highest compared to other stages of this chain. The main objective of the research study was to determine the scale of food waste among students of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (UWM), to identify the food waste reasons, to determine the frequency of that phenomenon, to pinpoint the most frequently wasted products and to gauge the level of student awareness of the food waste issue. The research study was conducted based on a survey questionnaire and a week-lasting interview. In the survey participated 225 students and in the one week-lasting project – 20. Over 90 % of the respondents admitted they threw out food. The most frequent reasons why the UWM students wasted food were the expiration of the use-by date of the product, spoilage of the food product or loss of food product freshness. The most often thrown out food products were: bread, ready-made meals, fruits and vegetables. Regarding the quantity, the most food products were thrown out because of the too large portions prepared for meals. Various food products were thrown out once a week or once a month and this confirmed the phenomenon of regular food waste. It was proved that the students were aware of the food waste problem at the global scale, however their attitudes did not contribute to reducing this waste.

Key words: household, students, food waste, scale of food waste, causes of food waste 

MAGDALENA NIEWCZAS-DOBROWOLSKA

PREFEROWANE ŹRÓDŁA INFORMACJI DOTYCZĄCEJ ŻYWNOŚCI W OPINII KONSUMENTÓW

Streszczenie

Konsumenci są zainteresowani problematyką żywności i żywienia, więc chętnie i często poszukują informacji o żywności. Mogą korzystać w tym celu z wielu źródeł: Internetu, mediów społecznościowych, telewizji, książek, czasopism i innych. W pracy przedstawiono wyniki badań wśród reprezentatywnej grupy 2000 konsumentów na temat preferowanych źródeł informacji o żywności. Badania zostały przeprowadzone metodą CAWI w 2020 roku. Konsumenci podczas badania ankietowego zostali poproszeni o wskazanie preferowanych przez nich źródeł informacji o żywności spośród: Internetu, telewizji, radia, książek, czasopism kolorowych, czasopism specjalistycznych, znajomych, mediów społecznościowych. Mogli również wybrać odpowiedź świadczącą o braku zainteresowania takimi informacjami i/lub wskazać inne źródła informacji na temat żywności.

Najczęściej wybieranymi źródłami informacji o żywności w opinii konsumentów były: Internet (86,4 % wskazań), telewizja (63,5 % wskazań) oraz znajomi (57,1 % wskazań). Tylko 4 % konsumentów przyznało, że w ogóle nie poszukuje informacji o żywności. Internet jako źródło informacji o żywności był wskazywany najczęściej przez młodych konsumentów (91,1 % wskazań), jednocześnie liczba wskazań wśród najstarszych konsumentów (70+) stanowiła 77,2 %. Osoby młode częściej niż pozostałe poszukiwały informacji na temat żywności w mediach społecznościowych. Dla osób z wyższym wykształceniem książki stanowiły preferowane źródło informacji o żywności częściej niż dla pozostałych.

Słowa kluczowe: informacja, konsumenci, żywność, źródła informacji

Wprowadzenie

Liczne źródła informacji powodują, że do człowieka dociera codziennie bardzo dużo informacji o różnym znaczeniu, stąd mówi się o społeczeństwie informacyjnym, w którym informacja ma określoną wartość. Obok wiadomości dotyczących np. zdrowia, ekonomii, polityki i innych poszukiwane są bardzo często informacje z zakresu żywności i żywienia. Wzrost świadomości wpływu właściwego odżywiania się na zdrowie skłania konsumentów do poszukiwania informacji związanych z tą problema-

tyką, w tym na temat jakości żywności, składników odżywczych i aktywnych biologicznie, nowych produktów żywnościowych, stosowanych technologii czy sposobów przygotowywania potraw.

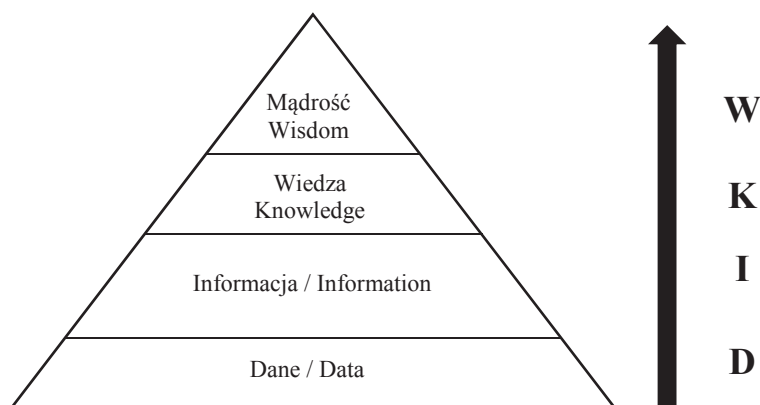
W literaturze przedmiotu istnieje wiele definicji informacji. Informacja (łac. *informatio*) oznacza przedstawienie, wizerunek (łac. *informare* oznacza kształtować, przedstawiać). Według Machury [12] informacja jest pojęciem interdyscyplinarnym, ale odmiennie postrzeganym w różnych dziedzinach nauki. Informacja jest przydatna w wielu dziedzinach działalności ludzkiej i oznacza dane, które mogą być przekazywane, przetwarzane i magazynowane. Pod względem ekonomicznym postrzega się ją jako zasób [12]. Zdobywanie informacji powoduje koszty, często też można spotkać się z powiedzeniami „kto ma informacje, ten ma władzę” lub „informacja kosztuje”. Ejdys [5] podaje, że funkcją informacji jest odwzorowywanie rzeczywistości. Stanowi ona również miarę złożoności i różnorodności oraz czynnik sprawczy i sterujący. Dzięki informacji możliwe jest zredukowanie stanu niewiedzy i niepewności w danej sytuacji decyzyjnej. Informacje kształtują rzeczywistość, opinie i zachowania konsumentów, również preferencje i zachowania na rynku produktów spożywczych. Informacja jest podstawowym czynnikiem mającym wpływ na podejmowane decyzje [7]. Liedel i wsp. [11] uważają, że o przydatności informacji decydują jej cechy. Pierwszą z nich jest aktualność – ściśle związana z szybkością przepływu informacji od źródła do odbiorcy. Informacje „starzeją się” bardzo szybko, a decyzje podejmowane na ich podstawie mogą wywołać znaczne szkody. Informacja nieaktualna jest tak samo nieprzydatna jak ta nieprawdziwa. Kolejną cechą informacji to dostępność – wskazująca, jak wiele czasu, trudu i pieniędzy trzeba poświęcić, aby ją uzyskać. Informacje cechują się również różnym stopniem uszczegółowienia (dokładnością). Ważne, aby informacja była kompletna oraz celowa, co oznacza, że powinna komuś i czemuś służyć, stąd musi istnieć racjonalna przesłanka jej gromadzenia, przetwarzania i wykorzystania. Informacja ma również cenę. Wykorzystanie informacji musi generować korzyści pokrywające przynajmniej nakłady poniesione na jej pozyskanie.

Informacje nie muszą przekładać się na wiedzę, gdyż informacja i wiedza nie są pojęciami tożsamymi. Zależności te przedstawiono jako hierarchię DIKW [1] (rys. 1).

Różnice między informacją a wiedzą przedstawiono w tab. 1.

Konsumenci mają do dyspozycji różne źródła informacji o żywności, w tym Internet, telewizję, radio, książki, czasopisma, opinie ekspertów czy też instytucji nadzorujących jakość i bezpieczeństwo żywności. Informacji dostarczają również producenci, rolnicy, media społecznościowe, opakowania produktów spożywczych, znajomi, rodzina. Internet jest najpowszechniejszym źródłem informacji o żywności, co jest związane z łatwością dostępu do informacji. Jest on najbardziej popularnym źródłem informacji przede wszystkim wśród młodych konsumentów. Konsumenci rzadziej niż z Internetu korzystają z książek, radia, czasopism w celu uzyskania

informacji na temat żywności. Oprócz łatwości dostępu do informacji o żywności należy zwrócić uwagę na jej wiarygodność. W tym przypadku kanały medialne nie są w czołówce źródeł. Większą wiarygodność konsumenci przypisują specjalistom, naukowcom, lekarzom/dietetykom.



Rys. 1. Hierarchia DIKW

Fig. 1. DIKW hierarchy

Źródło / Source: opracowanie własne na podstawie [7] / the author's own study based on [7]

Tabela 1. Różnice między informacją a wiedzą

Table 1. Differences between information and knowledge

Informacja / Information	Wiedza / Knowledge
Prawdziwa lub fałszywa / True or false	Prawdziwa / True
Charakter fizyczny lub semantyczny Physical or semantic nature	Charakter semantyczny Semantic nature
Nie musi być spersonalizowana It doesn't have to be personalized	Spersonalizowana Personalized

Źródło / Source: opracowane własne na podstawie [17] / the author's own study based on [17]

Celem pracy było określenie głównych, preferowanych źródeł informacji na temat żywności oraz określenie różnic w tych preferencjach wśród konsumentów ze względu na ich cechy socjodemograficzne, co stanowi istotną informację o kanałach przekazywania treści o żywności do różnych grup konsumentów.

Material i metody badań

Badanie opinii konsumentów przeprowadzono w 2020 r. przy użyciu kwestionariusza ankiety zawierającego 23 pytania oraz 7 pytań dotyczących cech socjodemograficznych. Pytania w większości były typu zamkniętego, najczęściej z możliwością

wskazania wielu odpowiedzi lub oceny danej cechy na skali 5-punktowej. Dotyczyły one zachowania, preferencji konsumentów żywności oraz postrzegania zagrożeń bezpieczeństwa żywności. Badanie przeprowadzone zostało przy użyciu techniki CAWI (ang. *Computer Assisted Web Interviewing*) polegającej na przeprowadzeniu ankiety internetowej nadzorowanej komputerowo. Jako poziom istotności przyjęto wartość 0,05. Obliczenia wykonano w programie R (wer. 3,5) [19].

W analizie statystycznej wyników zastosowano test χ^2 Pearsona. Jest on najczęściej stosowanym w różnych dyscyplinach testem nieparametrycznym [15]. Polega na porównaniu ze sobą wartości obserwowanych (uzyskanych w badaniu) z wartościami oczekiwanymi, gdyby nie było żadnego związku między zmiennymi. W przypadku, gdy różnica między wartościami obserwowanymi a oczekiwanymi jest duża, tj. statystycznie istotna, wnioskuje się, że zachodzi relacja między zmiennymi.

Próba badana liczyła 2000 osób dobranych z uwzględnieniem miejsca zamieszkania (województwo), płci i wieku. Respondentów scharakteryzowano także pod względem wykształcenia oraz statusu materialnego. Dokładny rozkład próby uwzględniający płeć, wiek oraz miejsce zamieszkania przedstawiono w tab. 2. Oddaje on strukturę populacji pełnoletnich Polaków zamieszkałych w kraju.

Wśród badanych 42,4 % stanowiły osoby będące wyłącznymi decydentami w zakresie zakupów produktów spożywczych. Około 49,7 % respondentów określiło, że podejmuje większość decyzji związanych z zakupami do gospodarstwa domowego. Najmniej liczną grupę (7,9 %) stanowiły osoby, za które ktoś inny podejmuje większość decyzji zakupowych.

Respondenci podawali również swoje wykształcenie, wielkość miejsca zamieszkania oraz dochód netto na jednego członka rodziny. Najwięcej respondentów posiadała wykształcenie średnie (32,2 %) oraz zasadnicze zawodowe (30,7 %). Osoby z wykształceniem wyższym stanowiły 26,9 %, a pozostałe 10,3 % respondentów miało wykształcenie podstawowe/gimnazjalne.

Osoby o dochodzie netto nieprzekraczającym 1200 zł na osobę stanowiły ok. 19,1 % ogółu respondentów. Jedna piąta uczestników badania (20,0 %) wskazywała na dochód w granicach 1201 ÷ 1600 zł, a respondenci deklarujący dochód na osobę 1601 ÷ 2000 zł netto stanowili 20,7 % wszystkich ankietowanych. Na dochód w wysokości 2001 ÷ 2400 zł wskazywało 19,5 % badanych, a 20,9 % respondentów posiadało dochód na jedną osobę przekraczający 2400 zł netto.

Osoby zamieszkujące wieś stanowiły 19,9 % ogółu, podczas gdy 23,0 % badanych było mieszkańcami miast do 50 tysięcy osób. Mieszkańcy miast od 50 do 250 tysięcy stanowili 29,0 % respondentów, a 14,7 % mieszkało w miastach liczących od 250 do 500 tysięcy mieszkańców. Najmniej, bo 13,5 % badanych, mieszkało w miastach skupiających powyżej 500 tysięcy mieszkańców.

Tabela 2. Struktura badanej populacji próbnej
 Table 2. Structure of surveyed sample of population

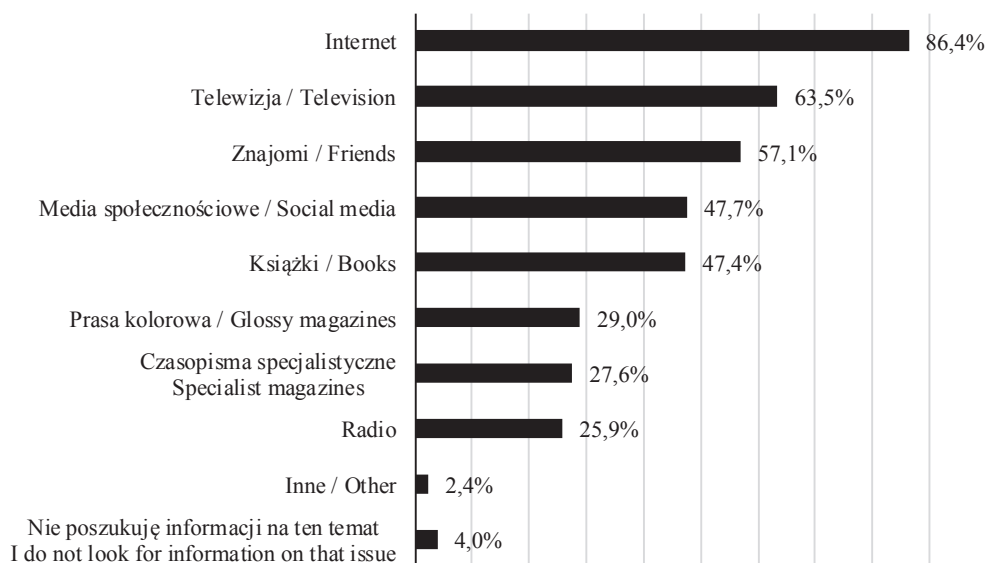
Województwo Voivodeship	Kobieta / Woman [lata / years]						Mężczyzna / Man [lata / years]						Suma Total
	18 - 29	30 - 39	40 - 49	50 - 59	60 - 69	70+	18 - 29	30 - 39	40 - 49	50 - 59	60 - 69	70+	
Dolnośląskie	12	16	13	11	15	13	12	16	13	11	13	8	153
Kujawsko-pomorskie	10	10	9	9	10	9	10	11	9	8	8	5	108
Lubelskie	10	10	9	9	10	10	10	11	9	8	8	6	110
Lubuskie	4	5	5	4	5	4	5	5	5	4	4	2	52
Łódzkie	11	12	11	10	13	13	11	12	11	9	10	7	130
Małopolskie	16	18	15	13	14	15	16	18	15	13	12	9	174
Mazowieckie	23	29	25	20	25	25	23	28	25	19	20	14	276
Opolskie	4	5	5	4	5	5	4	5	5	4	4	3	53
Podkarpackie	10	11	9	9	9	9	11	11	10	9	8	5	111
Podlaskie	6	6	5	5	5	6	6	6	5	5	4	3	62
Pomorskie	11	12	10	9	10	9	11	12	11	9	9	6	119
Śląskie	19	23	21	20	22	21	20	23	21	19	19	13	241
Świętokrzyskie	6	6	5	5	6	6	6	6	6	5	5	4	66
Warmińsko-mazurskie	7	7	6	6	7	6	7	8	6	6	6	3	75
Wielkopolskie	16	18	16	14	16	14	16	19	16	13	13	8	179
Zachodnio-pomorskie	7	9	8	7	9	7	8	9	8	7	8	4	91
Suma / Total	172	197	172	155	181	172	176	200	175	149	151	100	2000

Objaśnienie / Explanatory note:
 n = 2000.

Respondenci zostali poproszeni o wskazanie preferowanych przez nich źródeł informacji o żywności. Mogli wybrać z następujących odpowiedzi: Internet, telewizja, znajomi, media społecznościowe, książki, prasa kolorowa, czasopisma specjalistyczne, radio lub wskazać inne preferowane przez nich źródła. Do wyboru była również odpowiedź, że nie poszukują informacji o żywności.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań dotyczące preferowanych przez konsumentów źródeł informacji o żywności przedstawiono na rys. 2. Najczęściej wskazywanymi jako preferowane źródła informacji o żywności były: Internet, telewizja oraz znajomi, odpowiednio [% wskazań]: 86,4, 63,5 i 57,1. Jako najmniej preferowane można wymienić czasopisma specjalistyczne oraz radio. Tylko 4 % respondentów przyznało, że nie poszukuje informacji na temat żywności. W kategorii źródeł innych („inne, jakie?”) wymieniani byli lekarze oraz dietetycy.



Rys. 2. Preferowane przez konsumentów źródła informacji o żywności

Fig. 2. Sources of food information preferred by consumers

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano różnice w sposobie pozyskiwania informacji o żywności a cechami socjodemograficznymi. Najsilniejsze zależności stwierdzono ze względu na: płeć, wiek, poziom wykształcenia oraz

Tabela 3. Wyniki testu χ^2 dotyczące zależności preferowanych źródeł informacji o żywności od cech socjodemograficznych
 Table 3. Results of χ^2 test concerning relationship between preferred sources of information on food and socio-demographic characteristics

Odpowiedzi Responses	Cecha socjodemograficzna/wartość testu χ^2 / Socio-demographic characteristic/value of χ^2 test						
	Płeć Gender	Wiek Age	Wykształcenie Education	Województwo Voivodeship	Miejsce zamieszkania Place of residence	Dochód Income	Decyzyjność Decision- making
Internet	0,1569	6,49E-06***	0,0089**	0,8036	0,0197*	0,0087**	0,0170*
Telewizja / Television	0,4355	0,0515	0,7377	0,0254*	0,0780	0,1343	0,0003***
Znajomi / Friends	0,2380	0,3172	0,4429	0,0135*	0,1438	0,4328	0,2887
Media społecznościowe Social media	0,0214*	0,0009***	0,0637	0,1669	0,1242	0,2810	0,0391*
Książki / Books	0,0018**	0,3828	6,93E-05***	0,2366	0,0477	0,0175*	0,0294*
Prasa kolorowa Glossy magazines	2,35E-06***	0,033*	0,2258	0,9911	0,2870	0,0401*	3,42E-15***
Czasopisma specjalistyczne Specialist magazines	0,4216	0,033*	0,1181	0,9574	0,0613	0,2980	3,09E-06***
Radio	0,3228	0,2502	0,1467	0,6371	0,2556	0,0877	0,0011**
Inne / Other	1	0,0004***	0,4923	0,5392	0,8862	0,4771	0,3513
Nie poszukuję informacji na ten temat / I do not look for information on that issue	0,9163	0,6660	0,1656	0,3905	0,0019**	0,2419	0,0177*

Objaśnienia / Explanatory notes:

(*), (**), (***) – oznacza siłę zależności między zmiennymi / shows strength of relationship between characteristics; E – zapis bardzo małych liczb / notation of very small numbers.

decyzyjność w gospodarstwie domowym (tab. 3). Kobiety, częściej niż mężczyźni, wskazywały książki oraz kolorową prasę jako źródła informacji o żywności, odpowiednio: 50,7 % i 33,6 % kobiet oraz 43,6 % i 23,9 % mężczyzn – tab. 4. Internet wskazywany był częściej przez osoby z młodszych grup wiekowych. Podczas gdy osoby mające 18 - 29 lat wskazywały Internet w 91,1 % przypadków, w grupie osób powyżej 70. roku życia odpowiedź tę wskazało 77,2 % respondentów (tab. 5), co wskazuje na coraz większą dostępność Internetu oraz umiejętność korzystania również wśród starszych konsumentów. Osoby młodsze (18 - 29 lat) częściej jako miejsce poszukiwania informacji wskazywały media społecznościowe (56,9 % respondentów), podczas gdy w grupach starszych odsetek ten był niższy (w zakresie 48,4 ÷ 39,7 %), osoby z wykształceniem wyższym częściej od pozostałych uczestników badania odpowiadały, że czerpią informację o żywności z książek (55,5 %) – tab. 6.

Tabela 4. Preferowane źródła informacji o żywności ze względu na płeć respondentów

Table 4. Preferred sources of food information depending on gender of respondents

Odpowiedzi / Responses	n	Ogółem Total [%]	Kobieta Woman [%]	Mężczyzna Man [%]
Internet	1728	86,4	85,3	87,6
Telewizja / Television	1270	63,5	64,3	62,6
Znajomi / Friends	1141	57,1	58,3	55,6
Media społecznościowe / Social media	953	47,7	50,1	44,9
Książki / Books	947	47,4	50,7	43,6
Prasa kolorowa / Glossy magazines	579	29,0	33,6	23,9
Czasopisma specjalistyczne / Specialist magazines	552	27,6	26,8	28,5
Radio	517	25,9	24,9	26,9
Inne / Other	48	2,4	2,4	2,4
Nie poszukuję informacji na ten temat I do not look for information on that issue	80	4,0	3,9	4,1

Z badań Jakubowskiej i wsp. [8], Chana i wsp. [3], Cyrka [4], Staniewskiej i Bartyk [16], Olejniczak [13], Kowalskiej [10], Eurobarometru 2019 (badanie ankietowe wśród mieszkańców Unii Europejskiej dotyczące różnych aspektów bezpieczeństwa żywności) [6], Rupprechta i wsp. [14] oraz Bordy i wsp. [2] wynika, że konsumenci czerpią informacje o żywności z różnych źródeł. Najczęściej wskazywanym źródłem tych informacji był Internet. Kołajtis-Dołowy i wsp. [9] zwracają uwagę, że oprócz Internetu wzrasta znaczenie mediów społecznościowych jako źródła informacji o żywności, zwłaszcza wśród młodzieży. Konsumenci są zainteresowani pozyskiwaniem informacji o żywności. Jakubowska i wsp. [8] zauważyli, że spośród wielu dostępnych

Tabela 5. Preferowane źródła informacji o żywności ze względu na wiek respondentów

Table 5. Preferred sources of food information depending on age of respondents

Odpowiedzi Responses	n	Ogółem Total [%]	Wiek / Age					
			18 - 29	30 - 39	40 - 49	50 - 59	60 - 69	70+
			[% wskazań / % of indications]					
Internet	1728	86,4	91,1	89,2	88,8	84,9	84,6	77,2
Telewizja / Television	1270	63,5	59,2	64,7	70,0	62,8	63,3	59,9
Znajomi / Friends	1141	57,1	62,4	56,4	55,9	54,9	57,8	54,0
Media społecznościowe Social media	953	47,7	56,9	48,4	47,8	44,1	46,7	39,7
Książki / Books	947	47,4	44,0	48,1	45,0	48,7	47,3	52,2
Prasa kolorowa Glossy magazines	579	29,0	23,9	28,7	26,5	28,9	31,9	35,3
Czasopisma specjalistyczne Specialist magazines	552	27,6	24,4	30,0	25,9	24,7	26,5	34,9
Radio	517	25,9	21,0	27,2	28,2	24,3	27,1	27,2
Inne / Other	48	2,4	1,1	1,8	0,9	1,3	4,8	5,1
Nie poszukuję informacji na ten temat / I do not look for information on that issue	80	4,0	3,7	3,0	3,7	4,6	5,4	3,7

Tabela 6. Preferowane źródła informacji o żywności ze względu na wykształcenie respondentów

Table 6. Preferred sources of food information depending on level of education of respondents

Odpowiedzi Responses	n	Ogółem Total [%]	Wykształcenie / Level of education			
			Podstawowe/ gimnazjalne Basic	Zasadnicze zawodowe Vocational	Średnie Secondary	Wyższe Higher
			[% wskazań / % of indications]			
Internet	1728	86,4	89,8	84,0	84,8	89,8
Telewizja / Television	1270	63,5	66,0	64,2	62,1	63,5
Znajomi / Friends	1141	57,1	55,8	54,7	59,1	57,7
Media społecznościowe Social media	953	47,7	44,7	44,5	48,1	52,0
Książki / Books	947	47,4	45,6	42,0	46,2	55,5
Prasa kolorowa Glossy magazines	579	29,0	23,3	29,3	30,8	28,5
Czasopisma specjalistyczne Specialist magazines	552	27,6	29,6	24,6	27,2	30,7
Radio	517	25,9	21,8	25,2	24,9	29,2
Inne / Other	48	2,4	2,4	1,6	2,8	2,8
Nie poszukuję informacji na ten temat / I do not look for information on that issue	80	4,0	2,9	5,2	4,2	2,8

źródeł konsumenci wybierają te, które uważają za wiarygodne. Największym zaufaniem darzą książki. Na książki jako źródło informacji o żywności o największym zaufaniu wskazują również Borda i wsp. [2], przy czym podkreślają, że konsumenci najczęściej poszukują informacji o żywności w mediach. Chan i wsp. [3] na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili, że największe zaufanie odnośnie do informacji o żywności konsumenci mają do lekarzy/dietetyków oraz naukowców, a najmniejsze do mediów społecznościowych.

Zdaniem Cyrka [4], Kowalskiej [10] oraz Rupprechta i wsp. [14] jednym ze źródeł informacji na temat żywności jest opakowanie. Informacja na opakowaniu produktu spożywczego jest najłatwiej dostępna, nie potrzeba czasu ani wysiłku, by ją otrzymać. Szkiel [18] także zwraca uwagę na rolę opakowania jako źródła informacji o żywności. Informacje zawarte na opakowaniu produktu spożywczego są przydatne również dla innych uczestników łańcucha żywnościowego.

Olejniczak [13] podaje, że konsument ma najczęściej do czynienia z marketingowymi źródłami informacji o produktach, do których można zaliczyć: reklamę żywności, sprzedawcę oraz sam produkt żywnościowy dostarczający informacji poprzez swoje opakowanie. Zwraca również uwagę na efektywność źródeł informacji na temat żywności – najbardziej efektywne są źródła tzw. personalne, czyli takie, które pochodzą m.in. od rodziny, znajomych, przyjaciół, względnie których dostarczają np. sprzedawcy, przedstawiciele producentów i dystrybutorów żywności.

Wyniki badań własnych są zbieżne z opisanymi wyżej rezultatami. Autorzy podkreślają, że Internet jest najpowszechniejszym źródłem informacji o żywności. Na podstawie odpowiedzi respondentów można zauważyć, że Internet stał się źródłem informacji także dla osób starszych, natomiast wśród osób młodych popularne są media społecznościowe. Zaletą Internetu jest łatwość dostępu, łatwość wyszukiwania informacji o żywności, komunikowania się. Z drugiej strony ta łatwość umieszczania informacji stanowi wadę Internetu, ponieważ każdy może zamieszczać różne informacje o żywności, niekoniecznie te prawdziwe i obiektywne. Aby Internet był nie tylko powszechnym, ale też wartościowym źródłem informacji o żywności, istnieje potrzeba profesjonalnie prowadzonych stron internetowych, blogów itp., na których będą umieszczane rzetelne i prawdziwe informacje. Jest duże zapotrzebowanie na właściwe informacje o żywności, gdyż jedynie 4 % respondentów nie była zainteresowana poszukiwaniem informacji na ten temat.

Wnioski

1. Informacje o żywności stanowią obszar zainteresowania większości konsumentów, gdyż tylko 4 % respondentów nie wykazywało chęci poszukiwania informacji na temat żywności.

2. Internet został wybrany (86,4 % wskazań) przez respondentów jako preferowane źródło informacji o żywności.
3. W największym stopniu (91,1 % wskazań) Internet był preferowany jako źródło informacji o żywności przez ludzi młodych mających 18 - 29 lat, ale również osoby w wieku 70+ często wybierały to źródło informacji (77,2 %).
4. Młodzi konsumenci dodatkowo wskazywali media społecznościowe jako źródło informacji o żywności.
5. Najmniejszą uwagę zwracano na radio oraz czasopisma specjalistyczne jako źródło wiedzy o żywności.
6. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wirtualne źródła informacji na temat żywności przewyższają popularnością źródła tradycyjne, jak np. książki.

Publikacja została sfinansowana przez Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie w ramach programu Potencjał, nr 68/ZJO/2020/POT.

Literatura

- [1] Bereziński M., Hołubiec J., Wagner D.: Hierarchiczna struktura poznania – piramida wiedzy. *Studia i Materiały Polskiego Stowarzyszenia Zarządzania Wiedzą*, 2009, 19, 5-16.
- [2] Borda D., Mihalache O.A., Dumitrascu L., Gafitianu D., Nicolau A.I.: Romanian consumers' food safety knowledge, awareness on certified labelled food and trust in information sources. *Food Control*, 2021, 120, #107544.
- [3] Chan C., Pereira S., Kam B.H., Coulthard D., Button P.D.: *Consumer Trust of Food Product Information and Its Sources*. RMIT University, Melbourne 2012.
- [4] Cyrek P.: Opakowanie jako źródło informacji o produktach żywnościowych. *Problemy Zarządzania, Finansów i Marketingu*, 2015, 39, 9-22.
- [5] Ejdys S.: Informacja we współczesnym świecie – próba systematyzacji wiedzy. *Roczniki Kolegium Analiz Ekonomicznych, SGH*, 2017, 44, 11-22.
- [6] European Food Safety Authority: *Food Safety in the EU*. EFSA, Parma 2019.
- [7] Grabowska M., Zając A.: Dane, informacja, wiedza – próba definicji. [on line]. Dostęp w Internecie [01.05.2021]: https://www.cri.agh.edu.pl/uczelnia/tad/APSI/cwiczenia/Dane_informacje_wiedza.pdf
- [8] Jakubowska D., Staniewska K., Staniewski B.: Rola informacji o żywności i żywieniu w kształtowaniu wyborów konsumenckich. *Przem. Spoż.*, 2014, 8, 73-75.
- [9] Kołajtis-Dołowy A., Pyza J., Jeruszka-Bielak M.: Źródła informacji o żywieniu. W: *Znaczenie racjonalnego żywienia w edukacji zdrowotnej*. Red. A. Wolska-Adamczyk. WSiLiZ, Warszawa 2015, ss. 7-22.
- [10] Kowalska A.: Wiedza konsumentów na temat bezpieczeństwa żywności i stosowane przez nich sposoby ograniczania ryzyka zagrożenia. *Handel Wewnętrzny*, 2018, 373, 246-260.
- [11] Liedel K., Piasecka P., Aleksandrowicz T.: *Analiza informacji. Teoria i praktyka*. Difin, Warszawa 2012, ss. 45-46.

- [12] Machura E.: Informacja i jej znaczenie we współczesnym świecie w kontekście ochrony informacji niejawnych w Polsce. *Obronność – Zesz. Nauk. Wydziału Zarządzania i Dowodzenia Akademii Obrony Narodowej*, 2013, 1 (5), 155-167.
- [13] Olejniczak M.: Zróżnicowanie źródeł informacji konsumenckiej o żywności prozdrowotnej. *Handel Wewnętrzny*, 2017, 6 (371), 257-265.
- [14] Rupperecht C.D.D., Fujiyoshi L., McGreevy S.R., Tayasu I.: Trust me? Consumer trust in expert information on food product labels. *Food Chem. Toxicol.*, 2020, 137, #111170.
- [15] Słowińska M.: Wykorzystanie testu chi-kwadrat w badaniu preferencji żywieniowych konsumentów. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 2019, 1 (32), 24-38.
- [16] Staniewska K., Batyk I.: Medialne i niemedialne źródła informacji żywieniowej w opinii młodych konsumentów – badania pilotażowe. *Zesz. Nauk. Akademii Morskiej w Gdyni*, 2016, 93, 185-190.
- [17] Stępnik A.: Różnice pomiędzy informacją a wiedzą w kontekście zarządzania. *Studia Metodologiczne*, 2014, 32, 29-47.
- [18] Szkiel A.: Ocena wiedzy konsumentów dotyczącej oświadczeń żywieniowych. *Studia Ekonomiczne. Zesz. Nauk. Uniwersytetu Ekonomicznego w Katowicach*, 2018, 357, 196-206.
- [19] The R Development Core Team: *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna 2019.

PREFERRED SOURCES OF FOOD INFORMATION IN THE OPINION OF CONSUMERS

Summary

Consumers are interested in food and nutrition issues, so they often look for information on food. For this purpose they may use many different sources of information: the Internet, social media, television, books, magazines and the others. The paper presents the results of research on a representative sample of 2000 consumers regarding the preferred sources of food information. The research survey was conducted in 2020 with the use of a CAWI method. During the research survey consumers were requested to indicate the preferred sources of food information from the following: Internet, television, radio, books, glossy magazines, specialist magazines, friends and social media. They could also select the response showing the lack of interest in that issue and/or indicate other sources of food information.

The most often selected sources of food information in the opinion of the consumers were: Internet (86.4 % of indications), television (63.5 % of indications) and friends (57.1 % of indications). Only 4 % of the consumers admitted they did not look for food information at all. Internet as a source of food information was indicated most often by young consumers (91.1 % of indications), at the same time the amount of indications among the oldest consumers (70+) accounted for 77.2 %. Young people looked for food information in social media more often than others. As for people with higher education, books were the preferred source of food information more often than for the others.

Key words: information, consumers, food, information sources 

GRAŻYNA MORKIS

PROBLEMATYKA ŻYWNOŚCIOWA W USTAWODAWSTWIE POLSKIM I UNIJNYM

Publikujemy kolejny przegląd aktów prawnych, które ukazały się w Dzienniku Ustaw RP oraz Dzienniku Urzędowym UE. Poniższe zestawienie zawiera akty prawne dotyczące szeroko omawianej problematyki żywnościowej według stanu na dzień 31 maja 2021 r.

Polskie akty prawne

1. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 17 grudnia 2020 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa (Dz. U. 2021 r., poz. 147).
Obwieszczenie zawiera jednolity tekst ustawy z dn. 13 lutego 2020 r. o Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Ustawa określa:
 - zadania, organizację i zasady funkcjonowania Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa,
 - zasady wykonywania zadań przez Inspekcję,
 - organizację i zasady funkcjonowania laboratoriów przeprowadzających badania laboratoryjne na potrzeby zadań Inspekcji.
2. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 20 stycznia 2021 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o Państwowej Inspekcji Sanitarnej (Dz. U. 2021 r., poz. 195).
Został ogłoszony jednolity tekst ustawy z dn. 14 marca 1985 r. o Państwowej Inspekcji Sanitarnej. Państwowa Inspekcja Sanitarna jest powołana do realizacji zadań z zakresu zdrowia publicznego, w szczególności poprzez sprawowanie nadzoru nad warunkami: higieny środowiska, higieny pracy w zakładach pracy, higieny radiacyjnej, higieny procesów nauczania i wychowania, higieny wypoczynku i re-

- kreacji, zdrowotnymi żywności, żywienia i produktów kosmetycznych, higieniczno-sanitarnymi, jakie powinien spełniać personel medyczny, sprzęt oraz pomieszczenia, w których są udzielane świadczenia zdrowotne.
3. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej z dn. 20 stycznia 2021 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o rejestracji i ochronie nazw i oznaczeń produktów rolnych i środków spożywczych oraz o produktach tradycyjnych (Dz. U. 2021 r., poz. 224).
Obwieszczenie zawiera jednolity tekst ustawy z dn. 17 grudnia 2004 r. o rejestracji i ochronie nazw i oznaczeń produktów rolnych i środków spożywczych oraz o produktach tradycyjnych. Ustawa reguluje:
- zadania oraz właściwość organów w zakresie oceny wniosków o rejestrację nazw pochodzenia, oznaczeń geograficznych i gwarantowanych tradycyjnych specjalności produktów rolnych lub środków spożywczych,
 - warunki tymczasowej ochrony na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej nazw pochodzenia oraz oznaczeń geograficznych produktów rolnych i środków spożywczych,
 - zadania oraz właściwość organów i jednostek organizacyjnych w zakresie kontroli i certyfikacji produktów rolnych i środków spożywczych posiadających chronioną nazwę pochodzenia, chronione oznaczenie geograficzne albo będących gwarantowanymi tradycyjnymi specjalnościami,
 - zasady oraz tryb kontroli produktów rolnych i środków spożywczych posiadających chronioną nazwę pochodzenia, chronione oznaczenie geograficzne albo będących gwarantowanymi tradycyjnymi specjalnościami,
 - warunki prowadzenia listy produktów tradycyjnych.
4. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 22 stycznia 2021 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o ochronie konkurencji i konsumentów (Dz. U. 2021 r., poz. 275).
Ustawa z dn. 16 lutego 2007 r. o ochronie konkurencji i konsumentów określa:
- warunki rozwoju i ochrony konkurencji oraz zasady podejmowanej w interesie publicznym ochrony interesów przedsiębiorców i konsumentów,
 - reguluje zasady i tryb przeciwdziałania praktykom ograniczającym konkurencję, praktykom naruszającym zbiorowe interesy konsumentów oraz stosowaniu niedozwolonych wzorców umów, a także przeciwdziałania antykonkurencyjnym koncentracjom przedsiębiorców i ich związków, jeżeli te praktyki wywołują lub mogą wywoływać skutki na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej,
 - organy właściwe w sprawach ochrony konkurencji i konsumentów.
5. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 22 stycznia 2021 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o paszach (Dz. U. 2021 r., poz. 278).

Ustawa z dn. 22 lipca 2006 r. o paszach określa właściwość organów w zakresie higieny i urzędowej kontroli pasz oraz dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.

6. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 22 stycznia 2021 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz. U. 2021 r., poz. 306).

Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej. Ustawa określa:

- zadania, organizację, tryb działania oraz zasady finansowania Inspekcji Weterynaryjnej,
- zasady współpracy organów Inspekcji z organami centralnymi państw członkowskich Unii Europejskiej odpowiedzialnymi za stosowanie prawodawstwa weterynaryjnego lub przepisów dotyczących bezpieczeństwa żywności,
- zasady wystawiania świadectw zdrowia.

7. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 1 marca 2021 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych (Dz. U. 2021 r., poz. 630).

Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych. Ustawa reguluje sprawy jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych oraz organizację i zasady działania Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. Przepisy ustawy nie dotyczą: artykułów rolno-spożywczych wytwarzanych na własny użytek, materiału siewnego roślin rolniczych, ogrodniczych i zielarskich w rozumieniu przepisów o nasiennictwie.

8. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 15 kwietnia 2021 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o oznakowaniu produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych jako wolnych od tych organizmów (Dz. U. 2021 r., poz. 763).

Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 13 czerwca 2019 r. o oznakowaniu produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych jako wolnych od tych organizmów. Ustawa określa:

- zasady oznakowania żywności i pasz,
- obowiązki podmiotów wprowadzających na rynek żywność lub pasze oznakowane jako wolne od GMO,
- zasady przeprowadzania kontroli przestrzegania przepisów ustawy,
- zasady odpowiedzialności za naruszenie przepisów ustawy.

Unijne akty prawne

1. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/882 z dn. 1 czerwca 2021 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek suszonych larw *Tenebrio molitor* jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470 (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. 2021 r., 194, s. 16).

Do unijnego wykazu nowej żywności dodano „suszone larwy *Tenebrio molitor*”. Przez okres pięciu lat od dnia wejścia w życie rozporządzenia wyłącznie pierwotny wnioskodawca, tj. przedsiębiorstwo SAS EAP Group (Francja) otrzymuje zezwolenie na wprowadzanie na rynek UE tej nowej żywności. ☒

**XXV JUBILEUSZOWA SESJA NAUKOWA
SEKCJI MŁODEJ KADRY NAUKOWEJ PTTŻ
„Przyszłość w żywności – żywność w przyszłości”**



**VIII INTERNATIONAL SESSION OF YOUNG
SCIENTIFIC STAFF
„The future in food - food in the future”**

20 - 21 maja 2021, Wrocław

W dniach 20 - 21 maja br. już po raz 25. młodzi naukowcy zrzeszeni w Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ spotkali się na cyklicznej konferencji naukowej. Pierwotnie termin Jubileuszowej Sesji przypadał na rok 2020, jednak ze względów pandemicznych ostatecznie przesunięto go na rok 2021. Tym razem Jubileuszowa Sesja Młodej Kadry Naukowej pt. „Przyszłość w żywności – żywność w przyszłości” odbyła się w formule spotkania online, co także wynikało z wymogów związanych z pandemią COVID-19. Za sprawą Komitetu Organizacyjnego na czele z dr inż. Anną Kancelistą i Gospodarzami miejsca – Wrocławskim Oddziałem PTTŻ, którzy z ogromną elastycznością dostosowywali działania organizacyjne do zmieniających się obostrzeń sanitarnych, to znaczące spotkanie naukowe odbyło się w wartościowym wymiarze. Organizatorzy wykorzystali powszechne już środki zdalnej komunikacji i stworzyli bardzo sprawną platformę do wymiany doświadczeń i poglądów w zakresie nauk o żywności i żywieniu, ułatwiając tym samym dalszą integrację środowiska młodych naukowców. A ten właśnie cel od lat przyświeca Sesjom Młodych.

W tegorocznym spotkaniu udział wzięło 54 uczestników z kraju (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Uniwersytet Rzeszowski, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Politechnika Łódzka, Instytut Innowacji Przemysłu Mleczarskiego, Mondelez International RDQ Centrum Badań i Rozwoju we Wrocławiu). Sesję wsparli również przedstawiciele firmy POLYGEN z wykładami „Zastosowanie detektora Corona CAD w analizach żywności” i „Nowa linia chromatografów ciecz-

wych HPLC i UHPLC serii Vanquish firmy Thermo Scientific”. Sponsorami Konferencji byli: Alchem Grupa Sp. z o.o., Eppendorf, Polygen.

Temat wiodący Sesji w dużej mierze nawiązywał do działań proekologicznych, zapobiegania marnotrawieniu żywności i optymalizacji procesów technologicznych w obszarze produkcji żywności. Pierwszego dnia Sesji w tematykę tę uczestników Sesji wprowadził wykład inauguracyjny prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej i dr hab. Moniki Trzaskowskiej pt. „Przyczyny i możliwości ograniczania marnowania żywności w Polsce”, podczas którego omówiono aktualny stan tego zjawiska w Polsce i działania prowadzące do jego minimalizacji. Prezentowane tematy doniesień wskazywały, że młodym naukowcom takie zagadnienia jak „zero waste” czy recycling produktów ubocznych przemysłu spożywczego nie jest obojętny i dotyczy coraz większej liczby realizowanych prac badawczych. Drugi dzień Sesji rozpoczął wykład plenarny dra inż. Artura Wiktora pt. „Pulsacyjne pole elektryczne w technologii żywności – podstawy i zastosowanie”, nadając obradom kierunek – rozwój szeroko rozumianej technologii żywności w przyszłości.

Tradycyjnie Sesja Młodych mogła korzystać z wiedzy doświadczonych naukowców tworzących Komitet Naukowy. W skład Komitetu Naukowego weszli: prof. dr hab. Agnieszka Kita (Prezes PTTŻ, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu), prof. dr hab. Małgorzata Nogala-Kałucka (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie), prof. dr hab. Joanna Kawa-Rygielska (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu), prof. dr hab. Tadeusz Sikora (Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie), prof. dr hab. Edward Pospiech (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), prof. dr hab. Lesław Juszcak (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie), prof. UR dr hab. Małgorzata Dżugan (Uniwersytet Rzeszowski), prof. UPP dr hab. Dorota Piasecka-Kwiatkowska (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), prof. UPWr dr hab. inż. Anna Czubaszek (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu), prof. UPWr dr hab. inż. Anna Gliszczyńska (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu), prof. UE dr hab. inż. Małgorzata Krzywonos (Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu), dr hab. inż. Katarzyna Marciniak-Łukasiak (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie).

W ciągu dwóch dni wysłuchano 25 referatów i zapoznano się z 31 e-posterami. Referaty wygłaszano w języku polskim i angielskim. Spośród doniesień z sesji referatowej i z sesji posterowej Komitet Naukowy wytypował i nagrodził najlepsze prace.

W sesji referatowej nagrodzono:

- I miejsce – Alicja Barańska (SGGW w Warszawie) za ”Niskotemperaturowe suszenie rozpyłowe koncentratu soku wiśniowego w celu uzyskania produktu „zero waste” o czystej etykiecie”;
- II miejsce – Jessica Brzezowska (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) za „Wpływ suszenia na profil polifenolowy proszków z ekstraktów owocowych”;

- III miejsce – Natalia Tomasz (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) za „Antiquorum sensing potential of spice-derived essential oils against *Pseudomonas psychrophila* isolated from fish”

Wyróżniono: Martę Waszkiewicz (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) za „Extracts from honeysuckle berry – a rich source of bioactive compounds”, Kamilę Szudere-Kończal (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) za „Biosynteza związków zapachowych przez pleśń *Galactomyces geotrichum*” oraz Joannę Grzelczyk (Politechnika Łódzka) za „Wpływ trawienia *in vitro* naparów kawy o różnym stopniu prażenia na biodostępność agonistów PPAR- γ ”.

Nagroda publiczności przypadła Aleksandrze Grudniewskiej (UPWR) za „Zastosowanie rozpuszczalników głęboko eutektycznych do waloryzacji produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego”.

W sesji e-posterowej nagrodzono:

- I miejsce – Andrzej Jaśkiewicz (Politechnika Łódzka) za „Aktywność przeciwdrobnoustrojowa biodegradowalnej folii skrobiowej z dodatkiem ekstraktu z cykorii podróżnik (*Cichorium intybus* L.) do pakowania żywności”;
- II miejsce – Ewa Raczkowska (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) za „Wpływ wieku na odpowiedź glikemiczną po spożyciu wybranych potraw wegetariańskich”;
- III miejsce – Natalia Mikołajczak (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) za „Impact of ferulic acid derivatives addition on the quality of stored cold pressed flaxseed oil with different water content”.

Wyróżniono Patrycję Sowę (Uniwersytet Rzeszowski) za „Ocena przydatności przetwórczej owoców pomidora w oparciu o zawartość likopenu oraz aktywność wybranych glikozydaz”, a nagrodę publiczności przyznano Andrzejowi Jaśkiewiczowi (Politechnika Łódzka) za „Aktywność przeciwdrobnoustrojowa biodegradowalnej folii skrobiowej z dodatkiem ekstraktu z cykorii podróżnik (*Cichorium intybus* L.) do pakowania żywności”.

Kolejne obrady Sesji Młodej Kadry Naukowej będą gościć w Poznaniu. Już dziś zapraszamy do zarezerwowania w kalendarzu dat 19 - 20 maja 2022 roku na udział w tych obradach.

dr inż. Monika Przeor
Przewodnicząca Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ
Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

TECHNOLOG ŻYWNOSCI

INFORMATOR POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI

Rok 31 Nr 2

czerwiec 2021

DZIAŁALNOŚĆ TOWARZYSTWA

Zarząd Główny

W dniu 26 maja 2021 r. odbyło się zebranie Zarządu Głównego PTTŻ XI kadencji w trybie online poprzez platformę Zoom. Po przywitaniu członków Zarządu i gości Prof. Agnieszka Kita, przewodnicząca ZG, otworzyła zebranie i przedstawiła sprawozdanie z działalności Prezydium ZG. W dalszej kolejności omówiono, wcześniej przesłane do członków ZG, sprawozdania: merytoryczne i finansowe z działalności ZG PTTŻ za 2020 r. Po jednogłosem głosowaniu obydwie sprawozdania zostały zaakceptowane przez obecnych członków ZG. Następnie przekazano informacje o dofinansowaniu działalności popularyzującej naukę w roku 2021 i w roku 2022, zapoznano się z informacjami na temat realizowanego Programu PROM oraz podjęto dyskusję nad kierunkami rozwoju i działalnością Wydawnictwa Naukowego PTTŻ. W dalszej części zebrania przekazano informacje o konkursie PTTŻ na najlepszą pracę doktorską z zakresu nauk o żywności oraz na najlepszą publikację w ŻNTJ w 2020 r. Następnie wysłuchano informacji o działalności oddziałów i sekcji zaplanowanej na rok 2021. Na koniec omówiono sprawy związane z przygotowaniem do wyborów w Oddziałach, a następnie do ZG.

WAŻNIEJSZE KRAJOWE I ZAGRANICZNE KONFERENCJE NAUKOWE W ROKU 2021

Ze względu na zaistniałą sytuację epidemiczną kalendarz konferencji krajowych i zagranicznych ulega ciągłym zmianom. W sprawie szczegółów prosimy o sprawdzanie aktualnych informacji na stronach odpowiednich konferencji lub kontakt z organizatorami.

Czerwiec

23 - 24 WARSZAWA = II Międzynarodowa Konferencja Naukowa z cyklu „Dylematy nauki o żywieniu człowieka – dziś i jutro” pt. „Żywność a jakość życia osób starszych”

Organizatorzy: Katedra Żywienia Człowieka SGGW, Polskie Towarzystwo Nauk Żywnościowych – Oddział Warszawski
Informacje: http://konferencja_senior2020.sggw.pl/
Kontakt: dr inż. Katarzyna Kozłowska, tel. (22) 59-37-115
dr inż. Monika Zielińska, tel. (22) 59-37-122
e-mail: konferencja_senior2020@sggw.pl

Lipiec

- 1 - 2 GDAŃSK = XLV Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN pt. „Żywność w strategii Zielonego Ładu”**
Organizatorzy: Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, Oddział Gdański PTTŻ, Komitet Nauk o Żywności i Żywieniu PAN
Informacje: <https://chem.pg.edu.pl/xlv-sesja-naukowa-knoziz-pan>
Kontakt: dr hab. inż. Edyta Malinowska-Pańczyk, prof. PG, tel. (58) 347-26-56
dr inż. Izabela Sinkiewicz, prof. PG, tel. (58) 347-13-95
e-mail: xlvsesjanaukowa.wch@pg.edu.pl; kom. 504-024-607

Wrzesień

- 16 - 17 KRAKÓW = XIV Konferencja Naukowa z cyklu „Żywność XXI wieku“ nt. "Żywność a oczekiwania współczesnego konsumenta"**
Organizatorzy: Oddział Małopolski PTTŻ, Wydział Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Informacje: <http://www.pttzm.org>
Kontakt: dr hab. inż. Stanisław Kowalski, prof. UR
e-mail: zywnoscxxi@pttzm.org; tel. (12) 662-47-47
- 22 - 23 KRAKÓW = XIII Międzynarodowa Konferencja Naukowa pt. „Wiedza – Gospodarka – Społeczeństwo” (online)**
Organizatorzy: Kolegium Nauk o Zarządzaniu i Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie, Fundacja Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie
Informacje: <https://cmq.uek.krakow.pl/>
Kontakt: prof. Janusz Nesterak
e-mail: cmq@uek.krakow.pl ; tel. (12) 293-57-24; (12) 293-54-64

Październik

- 6 - 7 BARCELONA, Spain = 25th International Conference on Food Technology and Processing with the theme “Impacts of COVID-19 on the global food technology and processing units in food industry”**
Organizator: Conference Series LLC Ltd

Informacje: <https://foodtechnology.insightconferences.com>

Kontakt: foodtechnology@brainstormingmeetings.com; tel. +44 2033180199

Listopad

21 - 23 ŠTRBSKÉ PLESO, Slovakia = Hygiena Alimentorum XLI International Scientific Conference "New trends in improving the quality and safety of meat and meat products"

Organizatorzy: Department of Food Hygiene and Technology of the University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice; State Veterinary and Food Administration of the Slovak Republic; EFSA National Focal Point on Technical and Scientific Matters; Slovak Meat Processors Association; Slovak Society for Agriculture, Forestry, Food and Veterinary Sciences at SAS in Bratislava

Informacje: <http://hygiena-alimentorum.uvlf.sk/>

Kontakt: hygiena.alimentorum@uvlf.sk

tel. +421 905-910-221; +421 915-984-752

WAŻNIEJSZE KRAJOWE I ZAGRANICZNE KONFERENCJE NAUKOWE W ROKU 2022

Maj

19 - 20 POZNAŃ = XXVI Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ
Organizatorzy: Oddział Wielkopolski PTTŻ

Czerwiec

9 - 10 KRAKÓW = XI Krajowa i III Międzynarodowa Konferencja Naukowa pt. „Jakość przyszłości, przyszłość jakości”

Organizator: Katedra Zarządzania Jakością Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie

Kontakt: dr hab. Joanna Dziadkowiec, prof. UEK

e-mail: qffq@uek.krakow.pl, balonu@uek.krakow.pl

Tel. (012) 293-55-83, (012) 293-55-89

9 - 10 POZNAŃ = III Wielkopolska Konferencja Nauka Gospodarce pt. „Partnerstwo nauki i przemysłu źródłem rozwoju”

Organizatorzy: Oddział Wielkopolski PTTŻ, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Informacje: <http://pttzow.up.poznan.pl/konferencja>

Kontakt: NaukaGospodarce@up.poznan.pl; tel. (61) 848-72-97

Lipiec

- 4 - 8 **KRAKÓW = Konferencja Europejskiego Stowarzyszenia Badaczy Ziemniaka 21st EAPR Triennial Conference**
Organizatorzy: European Association for Potato Research, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Informacje: <https://www.eapr2020.pl>
Kontakt: Magdalena Owczarek, tel. (12) 651-90-54
e-mail: eapr2020@targi.krakow.pl

Październik

- 5 - 6 Zurich, Switzerland = 26th International Conference on Food Technology and Processing
Organizator: Conference Series LLC Ltd
Informacje: <https://foodtechnology.insightconferences.com>
Kontakt: foodtechnology@brainstormingmeetings.com; tel. +44 2033180199

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY POLSKIEGO TOWARZYSTWA
TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI

Przy Zarządzie Głównym: **TCHIBO – WARSZAWA Sp. z o.o. Marki, HORTIMEX Sp. z o.o. Konin, BUNGE POLSKA Sp. z o.o. Karczew.**
Przy Oddziale Małopolskim: **ZAKŁADY PRZEMYSŁU TŁUSZCZOWEGO BIELMAR Sp. z o.o. Bielsko-Biała.**

KOMUNIKATY

Informacje dla Autorów oraz wymagania redakcyjne publikujemy na stronie internetowej <http://www.wydawnictwo.pttz.org>

Przypominamy Państwu o aktualnym adresie internetowym Wydawnictwa – e-mail: redakcja@pttz.org

**Adresy Zarządu Głównego, Oddziałów i Sekcji
Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności**

PREZES / ODDZIAŁ	ADRES
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Kita Prezes PTTŻ	UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-62; e-mail: agnieszka.kita@upwr.edu.pl
Dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk Sekretarz PTTŻ	PŁ, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 ŁÓDŹ Tel.: (42) 631-27-77; e-mail: krzysztof.kolodziejczyk@p.lodz.pl
Dr hab. inż., prof. UMG Aleksandra Wilczyńska Oddział Gdański	UM, ul. Morska 81-87, 81-225 GDYNIA Tel.: (58) 558-62-81; e-mail: a.wilczyńska@wpit.umg.edu.pl
Dr hab. inż., prof. UP Małgorzata Karwowska Oddział Lubelski	UP, ul. Skromna 8, 20-704 LUBLIN; Tel.: (81) 462-33-41; e-mail: malgorzata.karwowska@up.lublin.pl
Dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk Oddział Łódzki	PŁ, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 ŁÓDŹ Tel.: (42) 631-27-77; e-mail: krzysztof.kolodziejczyk@p.lodz.pl
Dr hab. inż., prof. UR Mariusz Witczak Oddział Małopolski	UR, ul. Balicka 122, 30-149 KRAKÓW Tel.: (12) 662-48-35; e-mail: rrwiczka@cyf-kr.edu.pl
Prof. dr hab. inż. Iwona Konopka Oddział Olsztyński	UWM, Pl. Cieszyński 1, 10-726 OLSZTYN Tel.: (89) 523-34-66; e-mail: iwona.konopka@uwm.edu.pl
Dr hab. inż., prof. UR Małgorzata Dżugan Oddział Podkarpacki	UR w Rzeszowie, ul. M. Ćwiklińskiej 2, 35-601 RZESZÓW Tel.: (17) 872-16-19; e-mail: mdzugan@ur.edu.pl
Dr hab., prof. ZUT Izabela Dmytrów Oddział Szczeciński	ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 4, 71-550 SZCZECIN Tel.: (91) 449-65-00; e-mail: izabela.dmytrow@gmail.com
Dr hab. inż., prof. SGGW Ewa Jakubczyk Oddział Warszawski	SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA Tel.: (22) 593-75-62; e-mail : ewa_jakubczyk@sggw.pl
Dr hab. inż. Małgorzata Gumienna Oddział Wielkopolski	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 848-72-67; e-mail: gumienna@up.poznan.pl
Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska Oddział Wrocławski	UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-64; e-mail: pttz_ow@wnoz.up.wroc.pl joanna.kawa-rygielska@upwr.edu.pl
SEKCJE	
Dr Karol Krajewski Ekonomiczna	Politechnika Koszalińska, ul. Kwiatkowskiego 6e, 75-343 KOSZALIN Tel.: 609-807-618; e-mail: janjasienczyk@poczta.onet.pl
Dr inż. Arkadiusz Żych Technologii Mięsa	ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 4, 71-550 SZCZECIN Tel.: (91) 449-66-00 wew. 6583; e-mail: arkadiusz.zych@zut.edu.pl
Dr hab. inż., prof. UP Magdalena Rudzińska Chemii i Technologii Tłuszczów	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 848-72-76; e-mail: magdar@up.poznan.pl
Prof. dr hab. inż. Antoni Golachowski Technologii Węglowodanów	UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-68; e-mail: antoni.golachowski@upwr.edu.pl
Dr hab. inż. Dorota Walkowiak-Tomczak Technologii Owoców i Warzyw	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 846-60-43; e-mail: dorota.walkowiak@up.poznan.pl
Dr inż. Monika Przeor Młodej Kadry Naukowej	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 848-73-30; e-mail: monika.przeor@up.poznan.pl