

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Zanieczyszczenie grzybami mikroskopowymi bułki tartej w zależności od warunków przechowywania

KINGA STUPER-SZABLEWSKA, ANNA OSTROWSKA, ANNA MATYSIAK, JULIUSZ PERKOWSKI
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU, WYDZIAŁ TECHNOLOGII DREWNA, KATEDRA CHEMII

Słowa kluczowe: bułka tarta, ergosterol, grzyby mikroskopowe, HPLC

STRESZCZENIE

Celem przedstawionych badań było określenie wpływu wilgotności względnej powietrza na zmiany stężenia ergosterolu, w czasie przechowywania bułki tartej. Przebadano 40 prób bułki tartej zakupionych w sieci handlowej sklepów spożywczych na terenie Poznania. Stężenie ERG w grupie kontrolnej (65% wilgotności, 20°C) wynosiło w początkowym okresie przechowywania 8,42 mg/kg, a po 2 tygodniach wynosiło 25,27 mg/kg. W próbach przechowywanych w obniżonej wilgotności nie zanotowano istotnej zmiany stężenia ERG, natomiast w próbach przechowywanych w podwyższonej temperaturze i wilgotności stwierdzono najwyższe stężenie ERG po upływie 2 tygodni, wynoszące aż 89,73 mg/kg. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, iż wilgotność względna powietrza ma istotny wpływ na rozwój i poziom mikoflory w czasie przechowywania bułki tartej.

Contamination of microscopic fungi in breadcrumbs according to the terms of storage

Keywords: bread crumbs, ergosterol, microscopic fungi, HPLC

ABSTRACT

The main objective of this study was to determine the effect of changes in humidity on fungal biomass content measured the concentration of the ERG, the storage bread crumbs. We examined 40 trials breadcrumbs retail chain purchased in Poznan. ERG concentration in the control (65% humidity, 20°C) group was stored in the initial period of 8,42 mg/kg, and after 2 weeks was 25,27 mg/kg. The samples are stored at low humidity there were no significant changes in the concentration of ERG, whereas in the samples belonging to the third group the highest concentrations ERG after 2 weeks amounting to 89,73 mg/kg. Based on the study it can be concluded that the relative humidity the air has a significant influence on the development and the level in storage micoflora crumbs.

1. WSTĘP

Bułka tarta jest produktem spożywczym powstałym wskutek pocięcia, zmielenia lub starcia suchego pieczywa. Ze względu na wykorzystany do jej produkcji surowiec rozróżniamy następujące rodzaje bułki tartej: jasna, biała, ruda, z chleba żytniego oraz z sucharów biszkoptowych. Bułka tarta znalazła szerokie zastosowanie w gastronomii oraz jako pasza i zanęta na ryby. Wykorzystywana jest głównie jako składnik panierki, a dosypywanie określonych ilości tartej bułki do półgotowych produktów kulinarnych zwiększa ich gęstość. Czas oraz warunki przechowywania są ściśle określone przez producenta i dla każdego rodzaju bułki tartej mogą się różnić. Polska Norma PN-A-74113 „Wyroby piekarskie. Bułka tarta.” [1] podaje wymagania jakościowe dla bułki tartej. Powinny one obejmować m.in. kryteria mikrobiologiczne: liczba pleśni (do 5×10^3 JTK/g) i *Salmonella* (nieobecność w 25 g). Na jakość mikrobiologiczną produktu ma wpływ jakość surowca, z którego jest produkowana, warunki produkcji oraz warunki przechowywania gotowego produktu. Bułkę tartą wytwarza się zazwyczaj z pieczywa niesprzedanego, pozostałego w piekarni lub pochodzącego ze zwrotów sklepowych. Pieczywo to powinno być przed przerobem poddane bardzo wnikliwej ocenie m.in. pod kątem występowania oznak pleśnienia. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż bardzo często grzyby mikroskopowe rozwijając się nawet w niewielkim stopniu na surowcu mogą produkować mikotoksyny. Z uwagi na higroskopijność bułki tartej podaje się, iż powinna być ona przechowywana w pomieszczeniach, w których utrzymana jest wilgotność względna powietrza ok. 65% i temperatura ok. 18°C. Podwyższona wilgotność względna powietrza i temperatura sprzyja rozwojowi mikoflory, co z kolei jest związane z występowaniem mikotoksyn [2, 3]. W niniejszej pracy oznaczono mikoflorę bułki tartej pod względem jakościowym i ilościowym. W oznaczeniach jakościowych zastosowano klasyczną metodę identyfikacji opartą na obserwacji grzybów mikroskopowych w preparacie przeżyciowym pod mikroskopem. Oznaczenia ilościowe wykonano następującymi metodami: klasyczną metodą hodowli i oznaczania liczby grzybów mikroskopowych (JTK) oraz chemiczną metodą analizy zawartości jednego z grzybowych metabolitów jakim jest ergosterol (ERG) – składnik ściany komórkowej grzybów mikroskopowych określają-

cy poziom zarówno żywej, jak i martwej mikoflory [4, 5]. Brak w przedmiotowej literaturze danych na temat zawartości ERG w bułce tartej, a informacje dotyczące mikoflory tego produktu są nieliczne. Dlatego pierwszym założeniem niniejszej pracy było określenie poziomu mikoflory grzybowej mierzonej stężeniem ERG w bułce tartej dostępnej w sieci handlowej.

Obok temperatury głównym czynnikiem wpływającym na rozwój mikoflory jest wilgotność względna powietrza. Trudno ją kontrolować w warunkach domowego przechowywania. Właśnie z uwagi na ten fakt, celem przedstawionych badań było również określenie wpływu wilgotności na zmiany zawartości biomasy grzybowej mierzonej stężeniem ERG, w czasie przechowywania bułki tartej.

2. MATERIAŁ I METODY

Badania mające na celu określenie poziomu mikoflory w bułce tartej przeprowadzono dwutorowo: pierwsza część dotyczyła wstępnych badań prób bułki tartej różnych rodzajów dostępnej w sieciach handlowych na terenie Wielkopolski (40 prób). Analizowano po 10 prób następujących rodzajów tego produktu: jasna, biała, z chleba żytniego, z dodatkami.

Drugim etapem było przeprowadzenie doświadczenia modelowego, do którego wykorzystano próby świeżo przygotowanej bułki tartej pochodzącej z piekarni znajdującej się na terenie Poznania. Produkt przechowywano w warunkach chronionych w komorach termo- i higrostatycznych, w stałej temperaturze 20°C oraz trzech wilgotnościach względnych powietrza: 35%, 65% i 95%. Czas przechowywania wynosił 14 dni, a próby pobierano w odstępach 12-godzinnych.

2.1 Analiza zawartości ergosterolu (ERG)

W przeprowadzonych badaniach w celu oznaczenia ilościowego mikoflory stosowano głównie zmodyfikowaną metodę oznaczania ERG opisaną szczegółowo w pracy Perkowskiego i wsp. [5, 6] polegającą na uwolnieniu tego metabolitu z badanego materiału biologicznego za pomocą saponifikacji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym z jednoczesną ekstrakcją. Analizę ERG prowadzono za pomocą HPLC z detektorem absorpcyjometrycznym. Pomiar stężenia ERG następował przy długości fali $\lambda = 282$ nm przy użyciu wzorca zewnętrznego. Identyfikacja związku od-

bywała się na podstawie porównania czasu retencji badanego pliku z czasem retencji standardu oraz poprzez dodanie do badanej próbki określonej ilości standardu i powtórny analizę. Odzysk ERG wynosił 97%, natomiast poziom wykrywalności 0,02 mg/kg.

2.2 Analiza ilościowa i jakościowa grzybów mikroskopowych

Stężenie oraz skład gatunkowy grzybów pleśniowych określono metodą rozcieńczeń płytkowych: 1 g każdej próby zawieszono w 9 mL wody peptonowej. Otrzymano rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-10} . 0,1 mL z każdego rozcieńczenia wysiano na 3 płytki z podłożem (Róż Bengalski z chloramfenikolem). Próby inkubowano w temperaturze 25°C przez 72 godziny. Po inkubacji policzono wyrosłe kolonie i na tej podstawie obliczono liczbę grzybów w 1 g próby, wyrażając je w jednostkach JTK/g badanej próby. Izolowane szczepy grzybów oznaczono na podstawie morfologii kolonii i preparatów mikroskopowych, stosując podręczniki Thoma i Rapera.

2.3 Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddane zostały analizie statystycznej w programie STATISTICA v 8.0. W celu porównania zawartości poszczególnych analizowanych parametrów w próbach zastosowano procedurę porównań wielokrotnych metodą Tukeya. Wyznaczono także wartości współczynników korelacji liniowej Pearsona z uwzględnieniem następujących poziomów istotności: $\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$, $\alpha=0,001$ (*, **, ***) między stężeniem ERG oraz ilością JTK. W celu określenia wpływu warunków przechowywania na poziom zanieczyszczenia

prób bułki tartej mikoflorą zastosowano regresję wielokrotną oraz określono współczynnik korelacji liniowej Pearsona na poziomie istotności $\alpha=0,05$ między badanymi czynnikami.

3. WYNIKI I DISKUSJA

W wyniku przeprowadzonej chemicznej analizy zawartości ERG oraz analizie statystycznej otrzymanych wyników stwierdzono, że zawartość mikoflory w bułce tartej zależy w istotny sposób od surowca zastosowanego do jej produkcji. Stężenie ERG w próbach czterech rodzajów bułki tartej było zróżnicowane (Tab. 1). Najwyższą zawartość tego metabolitu stwierdzono w bułce tartej z dodatkami i wynosiła ona 42,67 mg/kg, natomiast najniższą wynoszącą 1,82 mg/kg oznaczono w bułce tartej z chleba żytniego. Na podstawie badań własnych oraz danych literaturowych stwierdza się istotną korelację stężenia ERG z zawartością mikotoksyn oraz liczbą grzybów mikroskopowych [5, 7-9]. Badacze europejscy przyjęli, że stężenie ERG powyżej 9 mg/kg świadczy z dużym prawdopodobieństwem o występowaniu mikotoksyn w badanym produkcie pochodzenia zbożowego, a produkt ten nie powinien być spożywany. Analizując otrzymane wyniki stężenia ERG można stwierdzić, iż bułka tarta jest produktem wysoce podatnym na zakażenie grzybami mikroskopowymi. Zwłaszcza, że zdolność do chłonięcia wilgotności oraz składniki odżywcze wchodzące w jej skład stwarzają doskonałe warunki do wzrostu pleśni.

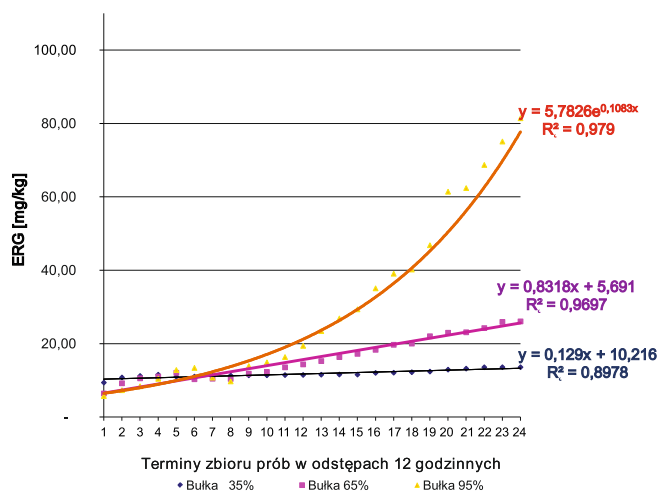
Podczas doświadczenia przechowalniczego bułki tartej stężenie ERG w próbach przechowywanych w 35% wilgotności względnej powietrza wynosi-

Tabela 1 Zawartość ERG (mg/kg) oraz liczby grzybów mikroskopowych w różnych rodzajach próbek bułki tartej zakupionej w sieci handlowej sklepów spożywczych (wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p < 0,05$)

Table 1 Concentration of ERG (mg/kg) and count of colony forming units (CFU) in bread crumbs samples purchased in retail chains (values in the columns marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$)

Rodzaj bułki tartej Bread crumbs typer	Stężenie ERG (mg/kg) Concentration of ERG (mg/kg)		Liczba grzybów (log JTK/g) Count of colony forming units (log CFU/g)	
	Zakres / Range	Średnia / Mean	Zakres / Range	Średnia / Mean
Biała / White	2,47 – 10,44	6,92 ^a	0,21 – 0,46	0,37 ^a
Jasna / Light	3,78 – 21,36	13,84 ^b	0,33 – 0,72	0,51 ^b
Z chleba żytniego / Rye bread	1,82 – 32,08	16,77 ^{bc}	0,84 – 1,59	1,25 ^c
Z dodatkami / With additives	2,41 – 42,67	25,12 ^d	1,45 – 2,77	1,98 ^d

ło w początkowym okresie przechowywania 7,17 mg/kg i po 2 tygodniach nie zmieniło się w istotny sposób (Rys. 1). W przypadku prób umieszczonych w komorze o 65% wilgotności stężenie tego metabolitu wzrosło z 8,42 mg/kg do 25,27 mg/kg. W próbach przechowywanych w najwyższej wilgotności stwierdzono najwyższe stężenie ERG po upływie 2 tygodni wynoszące aż 89,73 mg/kg. W wyniku analizy statystycznej stwierdzono, iż podwyższona wilgotność wpływa w istotny sposób na zawartość ERG w badanych próbach, a wzrost stężenia badanego metabolitu w analizowanym materiale ma postać wykładniczą opisaną równaniem: $y = 5,7826e^{0,1083x}$. W przypadku niższych wilgotności tj. 65% oraz 35% wzrost jest prostoliniowy i nie obserwuje się istotnych różnic pomiędzy zmianami zawartości oznaczanego metabolitu.



Rysunek 1 Zmiany zawartości ERG (mg/kg) w próbach bułki tartej w czasie 14 dni (1-24 terminy poboru prób co 12 godzin), w zależności od wilgotności względnej powietrza (Bułka 35% – bułka tarta przechowywana w 35% wilgotności względnej powietrza; Bułka 65% – bułka tarta przechowywana w 65% wilgotności względnej powietrza; Bułka 95% – bułka tarta przechowywana w 95% wilgotności względnej powietrza)

Figure 1 Changes in the content of ERG (mg/kg) in the samples crumbs the during 14 days (1-24 sampling periods every 12 hours), depending on the relative humidity of the storage area (Bread crumbs 35% – bread crumbs stored at 35% relative humidity; Bread crumbs 65% – bread crumbs stored at 65% relative humidity; Bread crumbs 95% – bread crumbs stored at 95% relative humidity)

Po upływie 2 tygodni oznaczono również poziom jednostek tworzących kolonie (JTK) w gramie produktu. W przypadku wilgotności 35% zawartość pleśni nie zmieniła się istotnie i wynosiła 2×10^1 JTK/g, dla wilgotności 65% wzrosła z 4×10^1 JTK/g do 9×10^2 JTK/g. Natomiast w przypadku wilgot-

ności 95% wzrosła znacznie z 4×10^1 JTK/g do 5×10^6 JTK/g. Wyniki uzyskane przez Huanga i in. [10], którzy oznaczyli liczbę pleśni w bułce tartej zakupionej w różnych opakowaniach, charakteryzowały się podobnym poziomem zakażenia pleśniami. Najwyższą zawartość wynoszącą ok. 1×10^7 JTK/g stwierdzili oni w bułce tartej przechowywanej w torebkach papierowych, natomiast najniższą wynoszącą 1×10^2 JTK/g w foliowych torebkach wypełnionych atmosferą modyfikowaną. Obok oznaczeń ilościowych dokonano również identyfikacji składu rodzajowego mikoflory po zakończeniu przechowywania. Stwierdzono w bułce tartej przechowywanej w 35% wilgotności względnej powietrza jedynie niewielką ilość grzybów z rodzaju *Aspergillus*, w próbce pozostawionej w wilgotności 65% obok grzybów z rodzaju *Aspergillus* stwierdzono również obecność *Penicillium*. W próbach bułki tartej przechowywanej w najwyższej wilgotności zaobserwowano grzyby z rodzaju *Penicillium* oraz bardzo agresywny wzrost grzyba z rodzaju *Rhizopus* [10]. Przedstawione wyniki są przesłanką do stwierdzenia, iż niewłaściwe przechowywanie bułki tartej stwarza istotne zagrożenie dla konsumentów. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż zachowanie odpowiedniej wilgotności w warunkach domowych jest bardzo trudne, a produkowane przez grzyby mikroskopowe mikotoksyny są odporne na działanie nawet wysokiej temperatury [11, 12]. Należy zatem stosować się ściśle do zaleceń producenta dotyczących warunków oraz czasu przechowywania otwartego produktu. W związku z powyższym przewiduje się dalsze badania w warunkach konsumenckich.

4. PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że wilgotność względna powietrza ma istotny wpływ na rozwój i poziom mikoflory w czasie przechowywania bułki tartej. Po przekroczeniu wilgotności określonej przez Polską Normę PN-A-74113 następuje gwałtowny wzrost zawartości mikoflory w bułce tartej. Stwarza to istotne zagrożenie dla konsumentów przechowujących bułkę tartą w warunkach wysokiej wilgotności, która jest charakterystyczna dla warunków związanych z przygotowaniem potraw.

LITERATURA

- [1] PN–A–74113. 1997/Az1:1999. Wyroby piekarskie. Bułka tarta.
- [2] Maupetit P., Gatel F., Cahagnier B., Botorel G., Charlier M., Collet B., Dauvillier P., Laffiteau J., Roux G., Quantitative estimation of fungal infestation of feedstuffs by determining ergosterol content. 44th Annual Meeting of EAAP Aarhus Denmark, 1993, 16-19.
- [3] Miedaner T., Perkowski J., Correlations among *Fusarium culmorum* head blight resistance, fungal colonization and mycotoxin contents in winter rye. *Plant Breed.*, 115, 1996, 347-351.
- [4] Müller H. M., Metzger K. U., Modi R., Reimann J. J., Ergosterin und Fusarientoxine in Weizenkleie und Weizen. *J. Anim. Physiol. a Anim. Nutr.*, 7, 1994, 48-55.
- [5] Perkowski J., Wiwart M., Buśko M., Laskowska M., Berthiller F., Kandler W., Krska R., Fusarium toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland. *Food Add. & Contamin.*, 11 (24), 2003, 1292-1298.
- [6] Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Sz wajkowska-Michałek L., Concentration of ergosterol in small – grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia*, 63/4, 2008, 542-547.
- [7] Stuper K., Perkowski J., Zawartość ergosterolu w zbożowych produktach spożywczych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5(60), 2008, 71-77.
- [8] Saxena J., Munimbazi C., and Bullerman L. B., Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 2001, 29-34.
- [9] Schnürer J., Jonsson A., Ergosterol levels and mould colony forming units in Swedish grain of food and feed grade. *Acta Agric. Scan., Sect. B, Soil and Plant Sci.*, 42, 1992, 240-245.
- [10] Huang Y., Hocking A., Jensen N., Miskelly D., Studies on the microbiological safety of breadcrumb product – Part 3. VAWCRC Report, 43 (7), 2004.
- [11] Perkowski J., Tworzenie mikotoksyn w zbożach przez grzyby rodzaju *Fusarium*. *Post. Nauk Rol.*, 242, 1993, 67-82.
- [12] Müller H. M., Schwadorf K., Ergosterol and fungal count in cereal by-products. *J. Anim. Physiol. a Anim. Nutr.*, 64, 1990, 215-219.