

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### Zmiany zawartości ergosterolu podczas przechowywania pszenicy durum

KINGA STUPER<sup>1</sup>, MARZENA GAWRYSIAK–WITULSKA<sup>2</sup>, GRZEGORZ SZWED<sup>3</sup>,  
JULIUSZ PERKOWSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Chemii

<sup>2</sup>UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Zakład Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego

<sup>3</sup>Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie

#### STRESZCZENIE

Celem przedstawianych badań, było monitorowanie zmian zawartości grzybów mikroskopowych mierzonej stężeniem ERG w czasie przechowywania ziarna pszenicy twardej w warunkach różnej wilgotności ziarna, w warunkach niskiej temperatury, przy wysokiej wilgotności oraz wysokiej temperaturze i niskiej wilgotności. W pierwszym doświadczeniu materiał badany stanowiło ziarno krajowej pszenicy ozimej, hodowlanej linii Desf. *Triticulum durum* LGR 626b/99/4, wyprowadzonej w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin AR w Lublinie. Ziarno o wilgotności 9%, 14% oraz 18%, przechowywano w temperaturze 20°C przez okres 3 miesięcy. Pobrąną próbę rozdrabniano i oznaczano stężenie ERG. Zawartość ERG w próbie kontrolnej wynosiła 1,72 mg/kg. W przypadku wszystkich badanych prób o różnej, przedstawionej powyżej wilgotności liczebność grzybów zmieniała się w czasie. Po 3 miesiącach przechowywania stężenie ERG (w mg/kg) wynosiło odpowiednio dla 9% 2,27, 14% 5,88, dla 18% natomiast 11,15.

W drugim doświadczeniu badano ziarno pochodzące z punktów skupu zbóż znajdujących się na terenie zachodnio – południowej Polski. Ziarno o wilgotności 14% przechowywano w różnych warunkach. Stanowisko A: temperatura 18°C oraz wilgotność względna powietrza 45% oraz stanowisko B: temperatura 10°C oraz wilgotność względna powietrza 80%.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż nawet niewielki wzrost wilgotności ziarna zbóż, przy zachowaniu stałej temperatury, wpływa w istotny sposób na poziom grzybów mikroskopowych w czasie przechowywania prób pszenicy durum. Stwierdzono również, iż wilgotność względna powietrza w miejscu przechowywania istotniej niż temperatura wpływa na rozwój pleśni.

## ABSTRACT

The aim of the presented investigations was to monitor changes in contents of mycoflora measured by ERG concentration during storage of durum wheat grain under conditions of different grain moisture content, maintaining constant temperature, and under low temperature conditions at high moisture content and low humidity.

In the first experiment the experimental material consisted of spring wheat grain grown in Poland, of a breeding line Desf. *Triticum durum* LGR 626b/99/4, produced at the Institute of Genetics and Plant Breeding, the Agricultural University in Lublin. Grain with moisture content of 9%, 14% and 18% was stored at 20°C for 3 months. Collected samples were milled and ERG concentration was determined. The content of ERG in the control was 1.72 mg/kg. In case of all tested samples with different moisture contents, presented above, the level of mycoflora changed in time. After 3-month storage ERG concentration (in mg/kg) for 9% moisture content was 2.27, for 14% it was 5.88, while for 18% it was 11.15 mg/kg.

In the second experiment analyses were conducted on grain coming from grain purchasing centres in south-western Poland. Grain with moisture content of 14% was stored under different conditions. Station A: temperature 18°C and relative humidity 45%, and station B: temperature 10°C and relative humidity 80%.

Based on results it was found that even a slight increase in moisture content of grain when maintaining constant temperature has a significant effect on the level of mycoflora during storage of durum wheat samples. It was also found that relative humidity in the storage site has a more significant effect on the development of mycoflora than temperature does.

## 1. WSTĘP

Jednymi z najważniejszych czynników warunkujących bezpieczne składowanie ziarna jest jego wilgotność, temperatura, kontakt z powietrzem oraz stan ziarna (stopień uszkodzenia). Ziarno o dużej wilgotności podlega niekorzystnym procesom, obniżającym jego jakość. Wzrost wilgotności i temperatury stwarza dogodne warunki dla rozwoju grzybów mikroskopowych. Szczególnie podatne na ich działanie są ziarna z naruszoną tkanką okrywającą, popękane i uszkodzone. W trakcie magazynowania psucie ziarna powodują głównie grzyby przechowalnicze, należące do tzw. mikroflory wtórnej [1]. Zasadlają one powierzchnię ziarniaka, wnikają pod pokrywą nasienną i powodują jego psucie. W wyniku rozwoju grzybów mikroskopowych następuje m. in. uszkodzenie zarodka, obniżenie zdolności kiełkowania, zmiana barwy i zapachu [2]. Pod ich wpływem następują również zmiany biochemiczne w ziarnie, powodując obniżenie wartości odżywczej oraz zwiększenie aktywności proteolitycznej ziarna i osłabienia glutenu.

Wśród związków produkowanych przez grzyby na szczególną uwagę zasługują związki terpenowe. Decyduje o tym aktywność niektórych terpenów w stosunku do innych organizmów, w tym ludzi i zwierząt. Do grupy tej zalicza się także mikotoksyny, które są drugorzędowymi metabolitami grzybów. Już w małych dawkach wykazują one toksyczne działanie w stosunku do zwierząt i ludzi [3]. Związki te mogą występować wewnątrz komórek grzybowych i być uwalniane po ich śmierci albo być wydzielane przez

strzępki grzybni do środowiska zewnętrznego. Co więcej, w zależności od rozpuszczalności w materiale stanowiącym to środowisko, mogą one przemieszczać się daleko od miejsca wzrostu grzyba powodując skażenie całej żywności porośniętej grzybem [2]. Mikotoksyny są termoopornymi związkami, w związku z czym wykazują również odporność na destrukcję bądź dezaktywację w trakcie powszechnie stosowanych procesów obróbki żywności. Tym samym ich oddziaływanie może następować długo po usunięciu lub obumarciu tworzącej je grzybni. Rozwój mikroflory na ziarnie prowadzi do samozagrzewania się ziarna. Zjawisko to polega na podwyższeniu temperatury ziarna do kilkudziesięciu stopni głównie w wyniku oddychania i rozwoju mikroflory [4] oraz oddychania ziarniaków i fauny ziarnistej [5]. Na samozagrzewanie najbardziej narażone jest ziarno świeżo zebrane z pola lub ziarno, które podczas nieprawidłowego magazynowania ulega zleganiu. Powtórnemu nawilżeniu sprzyja zła izolacja magazynów oraz nierównomierne nagrzewanie lub ochładzanie różnych części magazynowanych partii zboża podczas przechowywania [6]. Jak podaje Horabik [7], jedną z przyczyn jest między innymi szybki wzrost pola powierzchni (w wyniku deformacji) kontaktu ziaren ze wzrostem wilgotności. W przedziale 10-20% wilgotności wzrost ten jest wykładniczy, a siły wiązań powierzchniowych rosną gwałtownie w miarę upływu czasu składowania [8]. Odkształcanie ziaren zwiększa ich powierzchnię kontaktu, sprzyjając tym samym rozprzestrzenianiu się mikroorganizmów. Według Grzesiuka i Kulki [5] oprócz rozwoju grzybów mikroskopowych zjawisko

samoogrzewania wywołuje duże ciśnienie górnych warstw ziarna na warstwy dolne oraz zagrzewanie i zamrażanie wilgotnego ziarna.

Celem przedstawianych badań, było monitorowanie zmian zawartości grzybów mikroskopowych mierzonej stężeniem ergosterolu (ERG) [9, 10] w czasie przechowywania ziarna pszenicy twardej w warunkach różnej wilgotności ziarna, przy zachowaniu stałej temperatury. Zbadano również wpływ niskiej temperatury, przy wysokiej wilgotności względnej powietrza oraz wysokiej temperatury i niskiej wilgotności względnej powietrza na rozwój grzybów.

## 2. MATERIAŁ I METODY

### 2.1. Materiał badany

Materiał badany w doświadczeniu pierwszym stanowiło ziarno krajowej pszenicy ozimej, hodowlanej linii Desf. *Triticum durum* LGR 626b/99/4, wyprowadzonej w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin AR w Lublinie. Ziarno pochodziło ze zbioru 2007 roku, w Gospodarstwie Doświadczalnym AR w Czesławicach k/Natęczowa. Przed doświadczeniem ziarno sztucznie nawilżano do wilgotności 9%, 14% i 18%. W tym celu partię pszenicy o masie 10 kg zraszano wodą, a następnie mieszano przez 10 minut w mieszarce bębnowej. Nawilżone ziarno umieszczano w plastikowych, szczelnie zamkniętych workach i przechowywano przez 48 godzin w celu wyrównania wilgotności ziarna. Po tym zabiegu sprawdzano wilgotność pszenicy wykorzystując suszarkę firmy Brabender. Po uzyskaniu żądanej wilgotności pobierano 2,5 kg próby, które umieszczano w pojemnikach lateksowych. Ziarno przechowywano w temperaturze 20°C przez 30 dni. Po tym okresie pobrano próbę o masie 10 g, rozdrobniono i analizowano zawartość ergosterolu (ERG). W drugim doświadczeniu przebadano 12 prób ziarna pszenicy durum pochodzącego z punktów skupu zbóż znajdujących się na terenie zachodnio-południowej Polski. Ziarno o wilgotności 14% przechowywano w różnych warunkach: stanowisko A: temperatura 18°C oraz wilgotność względna powietrza 45% oraz stanowisko B: temperatura ok. 10°C oraz wilgotność względna powietrza 80%. Ziarno przechowywano przez 3 miesiące.

### 2.2. Analiza zawartości ergosterolu

Analizę zawartości ergosterolu przeprowadzono wg metodyki opisanej w pracy Perkowski i in. [11, 12]. Do analizy pobrano próby o masie ok. 10 g, które następnie rozdrobniono za pomocą młynka laboratoryj-

nego. Do dalszych analiz odważono 0,1 g zmielonego ziarna i umieszczono w zakręcanych probówkach do kultur, w których przeprowadzono ekstrakcję ergosterolu z jednoczesnym zmydleniem. Procesy te przebiegały pod wpływem promieniowania mikrofalowego. Następnie próby zubożniono za pomocą 1 molowego wodnego roztworu kwasu solnego i przeprowadzono ekstrakcję ergosterolu za pomocą pentanu (3x4 cm<sup>3</sup>). Zebrane ekstrakty pentanowe odparowano do sucha w strumieniu azotu. Analizę zawartości ergosterolu przeprowadzono za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczonego z detektorem absorbcyjometrycznym, jako fazę wymywiającą zastosowano mieszaninę metanolu i acetonitrylu w stosunku 90:10 (v/v). Pomiar stężenia ergosterolu następował przy użyciu wzorca zewnętrznego przy długości fali  $\lambda = 282$  nm.

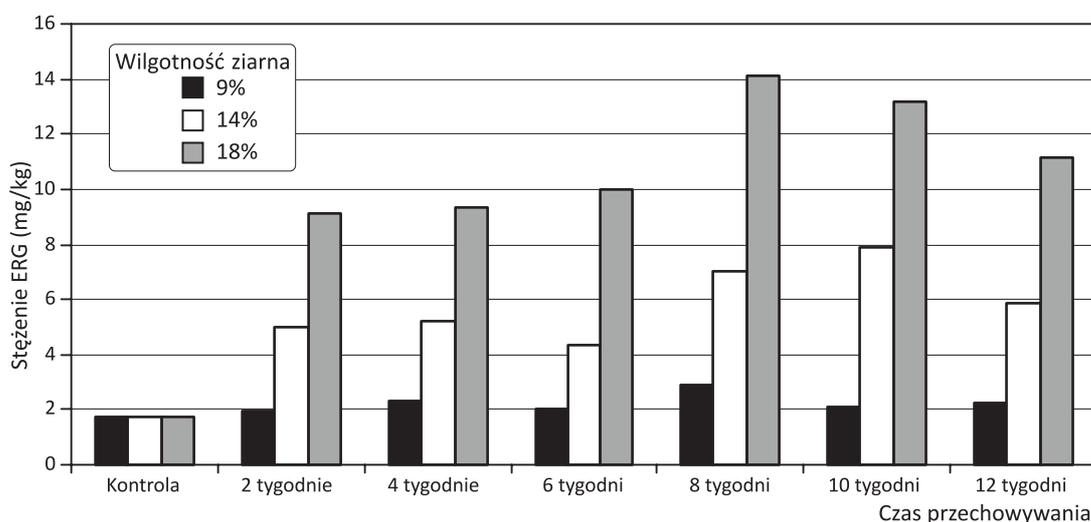
## 3. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  przy wykorzystaniu programu Statistica firmy Stasoft. Na podstawie analizy wariancji stwierdzono, iż wilgotność ziarna wpływała w istotny sposób na zawartość ERG jedynie podczas przechowywania ziarna w wyższej wilgotności.

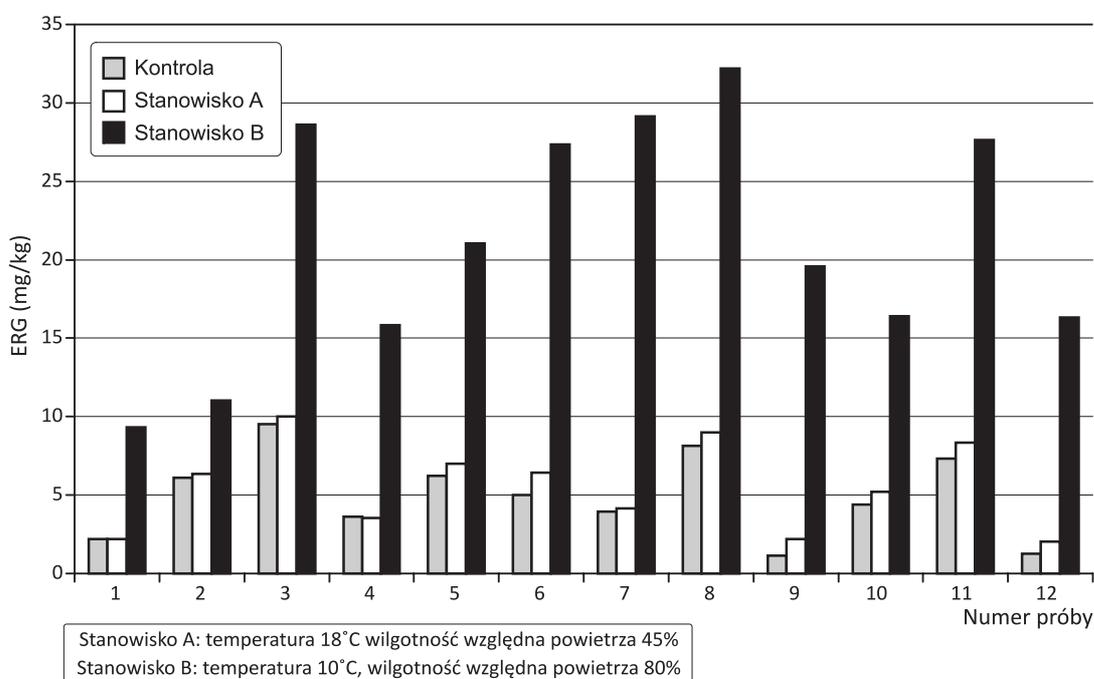
W pierwszym doświadczeniu warunki przechowywania ziarna pszenicy o wilgotności 9% w temperaturze 20°C nie wpłynęły istotnie na stężenie ergosterolu w badanym ziarnie (Rys. 1). Przechowywanie ziarna w tej samej temperaturze o wilgotności 14% i 18% powodowało istotny wzrost stężenia ergosterolu w stosunku do próby kontrolnej, w której oznaczone stężenie analizowanego metabolitu wynosiło 1,72 mg/kg. Po 3 miesiącach przechowywania stężenie ERG (w mg/kg) wynosiło odpowiednio dla 9% 2,27, 14% 5,88, dla 18% natomiast 11,15. Abramson i in. [13] oznaczył stężenie ERG w próbach ziarna pszenicy durum o wilgotności 16% oraz 20%. Zakres oznaczonych stężeń dla niższej wilgotności wynosił od 3,90 do 8,40 mg/kg, natomiast dla wyższej wilgotności minimalne stężenie ERG wynosiło 3,9 mg/kg natomiast maksymalne 55,5 mg/kg.

W czasie przechowywania analizowanego ziarna wzrost stężenia ERG nie był prostoliniowy, maksimum zawartości tego metabolitu przypadało na 8 oraz 10 tydzień i wynosiło dla ziarna od najniższej wilgotności do najwyższej odpowiednio: 2,92 mg/kg, 7,89 mg/kg oraz 14,12 mg/kg.

Średnie stężenie ERG w ziarnie kontrolnym pszenicy durum w drugim doświadczeniu wynosiło średnio 4,9 mg/kg, a zakres oznaczonych stężeń wynosił od



Rysunek 1. Zmiany zawartości ERG podczas przechowywania pszenicy durum



Rysunek 2. Zawartość ERG w próbach pszenicy durum: kontrolnej oraz po przechowywaniu w różnych warunkach wilgotności i temperatury

1,14 do 9,51 mg/kg. (Rys. 2). Stężenie tego metabolitu było wyższe w analizowanych próbach niż w ziarnie pszenicy durum badanym przez Schnürera i Jonssona [14], gdzie średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 0,32 mg/kg.

Po 3 miesiącach przechowywania na stanowisku A zawartość tego metabolitu wzrosła od 2,02 mg/kg do 10,01 mg/kg, natomiast po przechowywaniu na stanowisku B stężenie ERG wynosiło od 32,19 mg/kg do 9,32 mg/kg. Dla poszczególnych prób tendencja wzrostu stężenia ERG w czasie przechowywania była

podobna. Najwyższe stężenie tego metabolitu po przechowywaniu na stanowisku B stwierdzono dla próby 3, 6, 7, 8 oraz 11 wynoszące odpowiednio 28,61 mg/kg, 27,33 mg/kg, 29,12 mg/kg, 32,19 mg/kg oraz 27,64 mg/kg. Po przechowaniu na tym stanowisku poziom badanego metabolitu zwiększył się średnio sześciokrotnie. Podczas przechowywania na stanowisku A zmiany zawartości ERG w porównaniu z próbą kontrolną nie były skorelowane

#### 4. WNIOSKI

Wśród trzech najistotniejszych czynników wpływających na dynamikę rozwoju grzybów mikroskopowych podczas przechowywania pszenicy durum jakimi są wilgotność ziarna, wilgotność względna powietrza oraz temperatura, wilgotność względna powietrza miały największy wpływ na ich rozwój.

Stwierdzono również, iż wilgotność względna powietrza miejsca, w którym ziarno było przechowywane miało istotny wpływ na wzrost grzybów, przy czym drugi badany czynnik jakim była temperatura nie miał istotnego wpływu na badany parametr.

#### LITERATURA

- [1] Gawrysiak-Witulska M., Wawrzyniak J., Ryniecki A., Perkowski J.: Relationship of ergosterol content and fungal contamination and assessment of technological quality of malting barley preserved in a metal silo using the near-ambient method. *J. Stored Prod. Research*, 44 (4), 360-365, 2008.
- [2] Jeleń H., Wąsowicz E.: Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Rev. Int.*, 14, 391-426, 1998.
- [3] Hussein H. S., Brasel J. M.: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology.*, 167, 101-134, 2001.
- [4] Saxena J., Munimbazi, C., and Bullerman, L. B.: Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 29-34, 2001.
- [5] Grzesiuk S., Kulka K.: *Biologia ziarniaków zbóż*. Warszawa, 1988.
- [6] Bulsiewicz T., Matzke W., Smarzyński E., Świątek H.: *Magazynowanie ziarna zbóż nasion strączkowych i oleistych.*, WNT, Warszawa, 1977.
- [7] Horabik J.: Charakterystyka właściwości fizycznych roślinnych materiałów sypkich istotnych w procesach składowania. *Acta Agrophysica*, 54, 2001.
- [8] Schwadorf K., Müller H. M.: Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 72, 457-462, 1989.
- [9] Müller H.M., Schwadorf K.: Ergosterol and fungal count in cereal by-products. *J. Anim. Physiol. a Anim. Nutr.*, 64, 215-219, 1990.
- [10] Seitz I.M, Mohr H.E., Rurroughs R., Sauer D.B.: Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.*, 54, 1207-1217, 1977.
- [11] Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Szwajkowska-Michałek L.: Concentration of ergosterol in small – grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia*, 63(4), 542 -547, 2008.
- [12] 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 in. *Food Add & Contamin.*, 24(11), 1292 – 1298, 2003.
- [13] Abramson D., Hulasare R., York R. K., White N. D. G., Jayas D. S.: Mycotoxins, ergosterol, and odor volatiles in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content. *J. Stored Prod. Research.*, 41, 67-76, 2005.
- [14] 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, 240-245, 1992.