

JAKOŚĆ I BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOŚCI



NOWOCZESNE METODY ANALITYCZNE W ZAPEWNIANIU JAKOŚCI I BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOŚCI

pod redakcją

Doroty Witrowej-Rajchert i Agaty Marzec

Wydawnictwo SGGW

Warszawa 2008

© Polskie Towarzystwo Technologów Żywności – Oddział Warszawski
Warszawa 2008

Opiniodawca: prof. dr hab. Janusz Czapski

Monografia dofinansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego

ISBN 978-83-7583-056-9

Wydawnictwo SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa
tel. (022) 593 55 20 (-22, -25 – sprzedaż), fax (0 22) 593 55 21
e-mail: wydawnictwo@sggw.pl
www.wydawnictwosggw.pl

Druk: Agencja Reklamowo-Wydawnicza A. Grzegorzcyk, www.grzeg.com.pl

SPIS TREŚCI

CZĘŚĆ I.	NOWOCZESNE METODY ANALITYCZNE W BADANIACH ŻYWNOŚCI	
1.	Molekularny poziom bezpieczeństwa żywności HENRYK KOSTYRA, ANNA WACIÓR	11
2.	Nowoczesne metody badania zawartości pierwiastków w świetle aktualnych wymagań Unii Europejskiej RENATA JĘDRZEJCZAK	19
3.	Analiza mikotoksyn i jej powiązania jako narzędzia tworzenia jakości i bezpieczeństwa żywności LUDWIK CZERWIECKI	35
4.	Postępy w technikach separacyjnych stosowanych w analizie żywności MIECZYŚLAW OBIEDZIŃSKI	51
5.	Organizmy genetycznie zmodyfikowane i metody ich identyfikacji HELENA KUBICKA	59
6.	Wykorzystanie kompletnej dwuwymiarowej chromatografii gazowej (GCxGC) do analizy lotnych produktów utleniania lipidów HENRYK JELEŃ	81
7.	Występowanie i metody analizy biotoksyn w owocach morza MIROŚLAW M. MICHALSKI	95

CZĘŚĆ II.	INSTRUMENTALNE METODY BADANIA TEKSTURY SUROWCÓW I PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH	
8.	Nowoczesne metody badania mikrostruktury i mechaniki surowców roślinnych KRYSTYNA KONSTANKIEWICZ	105
9.	Emisja akustyczna w badaniach żywności ZBIGNIEW RANACHOWSKI	135
CZĘŚĆ III.	WYBRANE ASPEKTY ZAPEWNIENIA JAKOŚCI I BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOSCI	
10.	Komunikacja z klientem elementem budowy zaufania do marki i firmy ANDRZEJ CZUBAŁA	163
11.	Weryfikacja systemów zapewniania jakości na przykładzie przedsiębiorstwa branży cukierniczej JOLANTA KOWALSKA, KATARZYNA GÓJSKA	175
12.	Jakość i bezpieczeństwo jako atrybuty żywności JOLANTA KOWALSKA, KATARZYNA SZUSTKIEWICZ	183

AUTORZY

CZERWIECKI LUDWIK, DOC. DR HAB., Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, Zakład Analizy Żywności

CZUBAŁA ANDRZEJ, MGR INŻ., Centrum Jakości AgroEko sp. z o.o.

GÓJSKA KATARZYNA, MGR INŻ., Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Zakład Oceny Jakości Żywności

JELEŃ HENRYK, PROF. DR HAB. Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

JĘDRZEJCZAK RENATA, DOC. DR HAB., Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, Zakład Analizy Żywności

KONSTANKIEWICZ KRYSZYNA, PROF. DR HAB., Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie, Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów

KOSTYRA HENRYK, PROF. DR HAB., Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

KOWALSKA JOLANTA, DR INŻ., Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Zakład Oceny Jakości Żywności

KUBICKA HELENA, DOC. DR HAB., Ogród Botaniczny PAN w Powsinie - Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej

MICHALSKI MIROSŁAW, DR INŻ., Państwowy Instytut Weterynaryjny Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego

OBIEDZIŃSKI MIECZYŚLAW W., PROF. DR HAB., Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Zakład Oceny Jakości Żywności

RANACHOWSKI ZBIGNIEW, DOC. DR HAB., Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN w Warszawie, Pracownia Analizy Sygnału Emisji Akustycznej

SZUSTKIEWICZ KATARZYNA, INŻ., Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Zakład Oceny Jakości Żywności

WACIÓR ANNA, DR INŻ., Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

Wstęp

W ostatnim dziesięcioleciu zaobserwowano ogromny postęp w przemyśle żywnościowym, szczególnie w zakresie przestrzegania technologicznej jakości produktu i jego bezpieczeństwa. Wiele trudu włożono w stworzenie systemów zapewnienia jakości i zagwarantowania bezpieczeństwa. Utrzymanie wysokiej jakości produktów nie jest możliwe bez wprowadzania nowoczesnych, wiarygodnych i szybkich metod analitycznych, dzięki którym możliwe jest kontrolowanie, również on-line, procesu wytwórczego. Dlatego oddajemy w Państwa ręce trzecią monografię, której rozdziały powstały na bazie referatów wygłoszonych na VI Konferencji Naukowej „Jakość i Bezpieczeństwo Żywności”, zorganizowanej przez Oddział Warszawski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, przy współpracy Wydziału Nauk o Żywności (dawniej Wydział Technologii Żywności) SGGW w 2007 roku. Tematem wiodącym konferencji były: „Nowoczesne metody analityczne w zapewnianiu jakości i bezpieczeństwa żywności”.

Zachęcamy do wnikliwej lektury niniejszej monografii, mając nadzieję, że przyczyni się ona do dalszego pogłębienia wiedzy i świadomości różnorodności aspektów związanych z zapewnieniem wysokiej jakości żywności i wymaganego poziomu bezpieczeństwa produktu żywnościowego.

Dorota Witrowa-Rajchert i Agata Marzec

CZĘŚĆ I

**NOWOCZESNE METODY ANALITYCZNE
W BADANIACH ŻYWNOŚCI**

1. Molekularny poziom bezpieczeństwa żywności **HENRYK KOSTYRA, ANNA WACIÓR**

Żywność jest złożoną kompozycją związków, w której skład wchodzi substancje odżywcze, przeciwżywniowe oraz naturalnie występujące toksyny. Żywność jest również kompozycją związków o różnym stopniu interaktywności, zależnej od środowiska chemicznego, fizycznego i mikrobiologicznego. Osobny rodzaj żywności stanowią produkty spożywcze zawierające genetycznie zmodyfikowane składniki. Określenie stopnia bezpieczeństwa żywności jest trudnym zadaniem, determinowanym walorami (pro)zdrowotnymi jak i spektrum i dokładnością metod analitycznych. Bezpieczeństwo żywności można określać przyjmując różne kryteria, które jednostkowo określają rodzaj tego bezpieczeństwa, a w całości przybliżają to bezpieczeństwo do kompleksowej, rzeczywistej wartości. Strategie określania bezpieczeństwa żywności mogą być różne w zależności od potrzeb. W tym artykule bezpieczeństwo żywności sklasyfikowano według następujących kategorii: fizjologiczne, dietozależne, funkcjonalne, mikrobiologiczne, toksykologiczne i sensoryczne (Rys.1). Ponieważ jest to dość nietypowa klasyfikacja, niespotykana w literaturze z tego obszaru badań, istnieje potrzeba wyjaśnienia tych pojęć.

Na szczególne omówienie zasługuje pojęcie bezpieczeństwa fizjologicznego, które wymaga spojrzenia na składniki żywności, jako źródło nie tylko składników odżywczych, budulcowych, ale również prekursorów biologicznie aktywnych związków. Ich biologiczna aktywność dotyczy funkcji regulatorowej metabolizmu komórkowego, wpływu na równowagę ekosystemu mikrobiologicznego przewodu pokarmowego, funkcję psychoaktywną i immunogenną. Ten fakt jest zgodny z współczesnymi poglądami na funkcję niektórych składników żywności, jako stymulatorów ekspresji genów, a więc potencjalnej syntezy prozdrowotnych lub prochorobotwórczych białek,

enzymów w organizmie człowieka. Adekwatnym określeniem tego procesu jest nutrigenomika. Spektakularnym przykładem tego zjawiska mogą być białka mleka krowiego, które są prekursorami biologicznie aktywnych peptydów uwalnianych w produktach spożywczych oraz przewodzie pokarmowym człowieka. Wykazują one takie aktywności biologiczne jak: opioidowa [4], inhibitorowa w stosunku do multifunkcyjnego enzymu konwertazy angiotensyny, regulującego obwodowe ciśnienie krwi [6, 8], immunomodulacyjna [3], antymikrobiologiczna [10], przeciwzakrzepowa i transportowa, związana z transportem makroelementów do krwi [7].

BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOSCI

FIZJOLOGICZNE

DIETOZALEŻNE

JAKOŚĆ FUNKCJONALNA

SENSORYCZNA

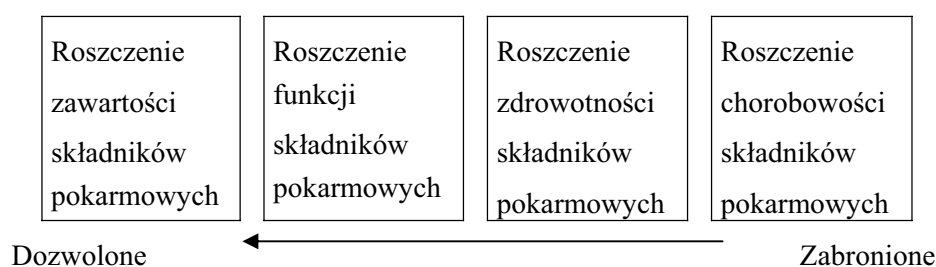
MIKROBIOLOGICZNA

TOKSYKOLOGICZNA

Rys. 1. Klasyfikacja rodzajów bezpieczeństwa żywności

Jest to przykład bezpieczeństwa molekularnego, związanego z podażą tych peptydów w organizmie człowieka. Nie do końca jest rozpoznane ryzyko ilościowego bezpieczeństwa zawartości bioaktywnych składników obecnych w żywności lub uwalnianych w przewodzie pokarmowym człowieka z prekursorów znajdujących się w żywności. Bezpieczeństwo fizjologiczne żywności sugeruje potrzebę wprowadzenia nowych wyróżników jakości żywności, uwzględniających jej aktywność biologiczną. Przytoczony przykład obecności w żywności peptydów opioidowych jasno dowodzi, że znacznie zmalała granica pomiędzy klasycznym pojęciem żywności a lekiem. Powstaje więc pytanie czy produkt spożywczy zawierający bioaktywne związki o terapeutycznej funkcji należy uważać za klasyczną żywność, czy suplement dietetyczny, medyczny produkt żywnościowy lub po prostu nutraceutyk. Każde

określenie jest limitowane stopniem zagrożenia zaistnienia ujemnych skutków, jakie występują w wyniku spożywania takiego produktu w wymiarze populacyjnym. Niemniej fakt ten rodzi potrzebę nowych definicji produktów żywnościowych oraz unormowań prawnych zasad ich produkcji. W najbliższej przyszłości należy spodziewać się, że nutraceutyki zawierające bioaktywne peptydy będą ekspansywnie wkraczały na rynek żywnościowy i farmaceutyczny [7]. Pewnym ograniczeniem tej ekspansji jest istnienie nadal tzw. „zielonej strefy”, która tworzy graniczną przestrzeń pomiędzy roszczeniową zawartością składników żywności a zakazanymi roszczeniami zdrowotnymi [1] (Rys. 2). Roszczenia zdrowotne oznaczają istniejącą zależność pomiędzy żywnością lub składnikami żywności a chorobą lub warunkiem zdrowia.



Rys. 2. Schematyczna prezentacja połączenia pomiędzy dozwolonymi i zabronionymi roszczeniami. Roszczenia dotyczące składników żywności oznaczają zależność występującą pomiędzy żywnością, składnikami żywności lub nutraceutykami obecnymi w żywności a warunkiem odpowiadającym zdrowiu lub chorobie [1]

Kolejnym pojęciem, które wymaga objaśnienia jest bezpieczeństwo żywności związane z chorobami dietozależnymi. W tym przypadku bezpieczeństwo żywnościowe nie dotyczy jakości żywności, ale stanu zdrowotnego konsumenta. Konsument cierpiący lub chorujący z powodu spożywania powszechnie dostępnych produktów żywnościowych jest najczęściej osobnikiem z wadą genetyczną lub niewydolnością układu immunologicznego (celiakia, cukrzyca, alergia pokarmowa). Specjalne wymagania takiego

konsumenta powodują konieczność produkcji żywności pozbawionej szkodliwego składnika, jak również precyzyjnej informacji na produkcie żywnościowym o jego obecności w zasadniczym produkcie lub produktach z jego dodatkiem. Odżywianie się tak spreparowaną żywnością niesie niebezpieczeństwo wystąpienia niedoborów żywieniowych spowodowanych brakiem w diecie pełnego spektrum składników odżywczych.

Bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności najczęściej zawężane jest do obecności w żywności mikroflory patogennej lub wytwarzanych przez nią toksyn, np. aflatoksyn. Współczesna wiedza skłania do poszerzenia pojęcia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. Prozdrowotne działanie żywności polega między innymi na zachowaniu korzystnej dla organizmu człowieka równowagi ekosystemu mikrobiologicznego przewodu pokarmowego. Podaż w diecie pro- pre- synbiotyków staje się elementem jakości diety, co wiąże się między innymi z immunostymulacją wpływającą na poziom zdrowotności człowieka.

Najmniej zrozumiałym może wydawać się pojęcie bezpieczeństwa funkcjonalnego żywności. Istotnie, większość badań, które wiążą się z bezpieczeństwem żywności nie uwzględnia wpływu matrycy na aktywność biologiczną związków obecnych w żywności, a jej rola nie powinna być pomijana. Po pierwsze, może ona pełnić funkcję stymulującą pracę przewodu pokarmowego (błonnik). Ponadto może być czynnikiem detoksykacyjnym dzięki zdolności absorpcji substancji toksycznych. Matryca może również modyfikować potencjał immuno-alergenny składników żywności. Nie do przecenienia jest również jej rola jako czynnika modyfikującego środowisko interakcji składników żywności, mogących ulegać synergicznym lub antagonistycznym efektom, np. zmiana potencjału przeciwutleniającego.

Zaskakujące może również wydawać się określenie bezpieczeństwa sensorycznego żywności. W zasadzie panuje zgodna opinia, że żywność charakteryzująca się dobrą smakowitością jest bezpieczna. Założenie to byłoby całkowicie słuszne, gdyby nie fakt, że pozytywne wrażenia smakowe i zapachowe kojarzą się z naturalnymi i bezpiecznymi składnikami żywności, a nie zawsze tak jest. Niestety smak lub zapach związku chemicznego zależy od

jego struktury, a nie źródła pochodzenia. Ten fakt powoduje, że istnieje możliwość modyfikowania smakowości żywności za pomocą substancji syntetycznych, co wcale nie musi być jednoznaczne z zachowaniem jej wysokiej wartości żywieniowej. Skrajnie można przyjąć, że istnieje potencjalne niebezpieczeństwo maskowania jakości żywności poprzez dodatek do niej substancji intensyfikujących jej pożądaną smakowość, *de facto* maskujących jej gorszą jakość.

Bezpieczeństwo toksykologiczne żywności jest kategorią najbardziej zrozumiałą, ponieważ dotyczy obecności w żywności substancji toksycznych.

Na tle przedstawionych różnych kategorii bezpieczeństwa żywności rodzi się pytanie czy w ogóle jest możliwe wyprodukowanie całkowicie bezpiecznej żywności, tzn. pozbawionej substancji przeciwżywniowych i toksycznych. Na to pytanie niestety pozostaje tylko odpowiedź negatywna, czego znakomitym dowodem jest proces nieenzymatycznej glikozylacji białek zachodzący podczas przechowywania i przetwarzania surowców spożywczych.

Nieenzymatyczna glikozylacja białek (glikacja) – reakcja Maillarda jest reakcją spontaniczną zachodzącą pomiędzy wolnymi grupami aminowymi aminokwasów, peptydów, białek, kwasów nukleinowych i niektórych fosfolipidów [5,9] (Rys.3). Taki charakter glikacji powoduje, że jest ona powszechnie spotykana w żywności, a jej zakres zależy od warunków środowiska, tj. pH, wilgotność, temperatura i czas. Jest reakcją nie do uniknięcia podczas produkcji żywności. Interesujące staje się więc pytanie o naturę powstających podczas tej reakcji produktów, szczególnie w aspekcie bezpieczeństwa żywności. Produkty reakcji Maillarda można zakwalifikować do 4 podstawowych grup:

1. związki barwne,
2. związki kształtujące pożądaną bądź niepożądaną smakowość żywności,
3. związki toksyczne np. kancerogenne akrylamidy,
4. produkty interakcji, tj. zglikolizowane aminokwasy obniżające wartość żywieniową lub artefakty enzymów ze związkami melanoidowymi, chelatowe metalokompleksy oraz produkty zaawansowanej glikacji, np. neoalergeny.

Przytoczone fakty dowodzą, że osiągnięcie absolutnego bezpieczeństwa żywności jest niemożliwe, co wynika również z ewolucyjnego rozwoju ekosystemowego przyrody. Bezpieczeństwo żywności jest więc wypadkową pomiędzy jej walorami (pro) zdrowotnymi i naturalnie występującymi lub powstającymi podczas produkcji substancjami przeciwżywniowymi i toksycznymi.

Pierwszorzędowa

grupa aminowa P - NH₂ + cukier redukujący

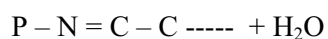
białek



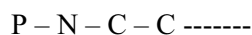
Zasada



Schiffa



Ketoamina



SUBSTANCJE BARWNE

SUBSTANCJE SMAKOWO-ZAPACHOWE

SUBSTANCJE TOKSYCZNE

PRODUKTY ZAAWANSOWANEJ GLIKACJI

Rys. 3. Początkowy mechanizm reakcji Maillarda oraz powstające produkty

Pewnym podsumowaniem przedstawionej problematyki bezpieczeństwa żywności może być definicja zaproponowana w raporcie OECD z 1993 roku brzmiąca następująco:

„Bezpieczeństwo żywności spożywanej przez ludzi oparte jest na sensownie sformułowanym pojęciu stwierdzającym, że żywność nie powoduje szkody dla zdrowia i jest w zamierzony sposób i w zamierzonych warunkach spożycia wykorzystywana. Z perspektywy historii, jedzenie przygotowane i wykorzystane w sposób tradycyjny jest uważane za bezpieczne w oparciu o długoletnie doświadczenie, chociaż może ono zawierać substancje przeciwżywniowe i toksyczne. Zakłada się, że żywność jest bezpieczna, jeśli nie zidentyfikowano znaczącego niebezpieczeństwa jej spożycia” [2].

Podsumowanie

Przedstawione różne aspekty i możliwe kryteria oceny bezpieczeństwa żywności skłaniają do wyrażenia poglądu, że żywność jest dynamiczną kompozycją składników odżywczych, budulcowych, biologicznie aktywnych i nieodżywczych, w tym również przeciwżywniowych i toksycznych. W tym kontekście, bezpieczna żywność to taka, której potencjał biologiczny sprzyja prawidłowemu psycho-fizycznemu rozwojowi człowieka, a zawarte w niej składniki niekorzystne dla zdrowia mieszczą się w dopuszczalnych granicach ryzyka pomiędzy zdrowiem człowieka a jego chorobą. Osiągnięcie wymaganego standardu bezpieczeństwa żywności wymaga zastosowania do jej kontroli szerokiego spektrum metod analitycznych, opartych na pomiarach fizycznych, chemicznych, fizyko-chemicznych, fizjologicznych, immunometrycznych, chromatograficznych i bioinformatycznych.

Literatura

1. Coussement P.: Marketing aspects of functional foods based on oligofructose. Presentation on Functional Foods Conference – Commercial and Technical Trends and Developments, 1995, 11-12 October, Paris. ADRIA and Leatherhead Food, RA.

2. GNE, Group of National Experts on Safety in Biotechnology: Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology: concepts and principles. The OECD Environment Directorate and Directorate for science. Technology and Industry, 1993, Paris, 79.
3. Jolles P., Lévy-Toledano S., Fiat A.M., Soria G., Gillessen D., Thomaidis A.: Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function. *Eur. J. Bioch.*, 1986, 158, 379-382.
4. Kostyra E., Sienkiewicz-Szłapka E., Jarmołowska B., Krawczuk S., Kostyra H.: Opioid peptides derived from milk proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2004, Vol. 13/54, SI 1, 25-352.
5. Krajčovičová-Kudláčková M., Šebeková K., Schinzel R., Klvanová J.: Advanced glycation and products and nutrition. *Physiol. Res.*, 2002, 51, 313-316.
6. Maruyama S., Suzuki H.: A peptide inhibitor of angiotensinI-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46, 1393-1394.
7. Meisel H.: Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science*, 1997, 50, 125-138.
8. Mullally M.M., Meisel H., Fitz Gerald R.J.: Syntetic peptides corresponding to α -lactoalbumin and β lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1996, 377, 259-260.
9. Nursten H.: The Maillard reaction (chemistry, biochemistry and implications). Published by the Royal Society Chemistry 2005.
10. Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K.: Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bivariate lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, 1991, 74, 4137-4142.

2. Nowoczesne metody badania zawartości pierwiastków w świetle aktualnych wymagań Unii Europejskiej

RENATA JĘDRZEJCZAK

Wymagania i zalecenia normatywne

Żywnością/środkiem spożywczym jest każda substancja lub produkt, przetworzony, częściowo przetworzony lub nieprzetworzony, przeznaczony do spożycia przez ludzi lub którego spożycia przez ludzi można się spodziewać. Do żywności zalicza się również napoje, gumę do żucia i wszelkie substancje, łącznie z wodą, świadomie do niej dodane podczas jej wytwarzania, przygotowania lub obróbki [11]. Zadaniem żywności jest dostarczanie organizmowi człowieka niezbędnych substancji odżywczych potrzebnych do jego prawidłowego funkcjonowania i rozwoju. W żywności jednakże mogą znajdować się także różne substancje niepożądane, które w postaci zanieczyszczeń mogą być do niej wprowadzone na różnych etapach produkcji, a które w konsekwencji stałego narażenia mogą być przyczyną szeregu negatywnych skutków zdrowotnych u ludzi. Te kwestie stały się podstawą prawa żywnościowego w zakresie bezpieczeństwa żywności od producenta do konsumenta, ustanowionego w 2006 roku przez Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności Unii Europejskiej. Obejmuje ono wszystkie elementy łańcucha żywnościowego oraz obowiązek kontroli jakości żywności głównie pod względem zdrowotności i higieny, w tym zawartości substancji szkodliwych dla zdrowia, takich jak: azotany, mikotoksyny, pestycydy i metale [5]. Tak więc, obecność substancji zanieczyszczających, będących jednym z podstawowych kryteriów oceny bezpieczeństwa żywności, jest limitowana. Dotyczy to między innymi metali o udowodnionej szkodliwości dla organizmu człowieka, takich jak ołów, kadm i rtęć, których występowanie w żywności uznaje się za niepożądane. Działanie toksyczne tych metali związane jest w dużej mierze z ich tendencją do

bioakumulacji w organizmie i możliwością uszkodzenia lub obniżenia funkcjonowania mózgu i centralnego układu nerwowego, uszkodzenia układu krwionośnego, płuc, nerek, wątroby i innych organów. Długotrwałe narażenie na te metale może powodować powolny progresywny fizyczny i neurologiczny proces zwyrodnieniowy imitujący chorobę Alzheimera, Parkinsona, zanik mięśni oraz stwardnienie rozsiane i autyzm. Alergie są również spotykane w przypadkach długotrwałego kontaktu z niektórymi metalami, które mogą przyczyniać się do powstawania chorób nowotworowych [8, 13, 14]. Uwzględniając w szczególności wyniki badań toksykologicznych, w 2006 Unia Europejska wydała Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy (NDP) ołowiu, kadmu, rtęci i cyny w środkach spożywczych [6]. Dla wybranych produktów żywnościowych przedstawia je poniższa tabela 1.

Tab. 1. Najwyższe dopuszczalne zawartości Pb, Cd i Hg w wybranych produktach żywnościowych

Środek spożywczy	Pb [mg/kg]	Cd [mg/kg]	Hg [mg/kg]
Mięso wołowe, Wieprzowe, drobiowe	0,10	0,050	-
Podroby	0,50	0,50-1,0	-
Mięso ryb, skorupiaki, Głowonogi, małże	0,30-1,5	0,05-1,0	1,0
Zboża	0,10	0,10	-
Warzywa, owoce	0,10-0,30	0,03-0,20	-
Soki owocowe, nektary	0,050	-	-
Wina, napoje winopodobne	0,20	-	-

Wymagania odnośnie najwyższych dopuszczalnych zawartości cyny zostały ograniczone do produktów dla niemowląt i małych dzieci (50 mg/kg), napojów w puszkach, soków owocowych i warzywnych (100 mg/kg), żywności w puszkach z wyjątkiem napojów (200 mg/kg). Zawartość arsenu w żywności nie jest limitowana.

Oprócz pierwiastków szkodliwych dla zdrowia, w żywności mogą również występować inne makro- i mikroelementy, które pełnią w organizmie człowieka wiele istotnych funkcji potrzebnych do utrzymania życia i prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, stąd ich obecność w żywności uważa się za pożądaną. Zalicza się je do pierwiastków niezbędnych, a ze względu na to, że organizm człowieka nie posiada układów biologicznych zdolnych do ich syntezy, muszą być one dostarczane w odpowiednich ilościach i proporcjach, najkorzystniej wraz z żywnością.

Do makroelementów, których zapotrzebowanie codzienne przekracza 100 mg należą wapń (Ca), magnez (Mg), potas (K), sód (Na), chlor (Cl), fosfor (P). Elementy te stanowią materiał budulcowy układu kostnego (Ca, P, Mg), pełnią podstawową rolę w gospodarce wodno-elektrolitowej (Na, K, Cl) czy utrzymaniu równowagi kwasowo-zasadowej i pobudliwości nerwowo-mięśniowej, a także przewodnictwa nerwowo-mięśniowego (Ca, Mg).

Pośród mikroelementów, nazywanymi również pierwiastkami śladowymi, tylko niewielkie ilości potrzebne są do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Do niezbędnych zalicza się: cynk (Zn), miedź (Cu), żelazo (Fe), selen (Se), chrom (Cr), mangan (Mn), kobalt (Co); ich zapotrzebowanie codzienne jest mniejsze niż 100 mg. Elementy te wykazują korzystne działanie tylko w określonych granicach, a zarówno ich nadmiar jak i niedobór może być szkodliwy dla organizmu. Zalecane normy spożycia makro- i mikroelementów podaje tabela 2 [15].

Znaczenie pierwiastków dla zdrowia człowieka powoduje, że ich obecność w żywności wzbudza zainteresowanie nie tylko od strony przepisów prawa żywnościowego, mającego na względzie konieczność ograniczenia obecności metali szkodliwych dla zdrowia w żywności i w konsekwencji ich negatywnego wpływu na organizm człowieka, ale również od strony żywieniowej, dla potwierdzenia obecności pierwiastków niezbędnych, korzystnych dla zdrowia. Do tego celu potrzebne są odpowiednie metody analityczne, pozwalające na wiarygodne oznaczanie pierwiastków w żywności.

Tab. 2. Zalecane dzienne normy spożycia makro- i mikropierwiastków dla młodzieży i osób dorosłych

Makropierwiastki	mg/osobę	Mikropierwiastki	mg/osobę
Wapń	900-1200	Żelazo	13-26
Fosfor	700-900	Cynk	16-21
Magnez	300-380	Miedź**	2,0-2,7
Potas*	2000-3500	Fluor**	1,5-4,0
Sód*	500-625	Jod	0,16-0,20
Chlor*	650-800	Selen	0,060-0,075

* minimalna norma spożycia

** zalecany poziom bezpieczny

Wytyczne w tym względzie zostały zawarte w wydanym przez Unię Europejską kolejnym rozporządzeniu Komisji (WE) Nr 333/2007 z 28.03.2007 ustanawiającym szczegółowe zasady odnośnie metod analiz do celów urzędowej kontroli poziomów m.in. ołowiu, kadmu, rtęci i cyny nieorganicznej w środkach spożywczych [7]. Podstawową zasadą, którą to rozporządzenie wprowadza, jest brak określenia konkretnych metod analiz, natomiast możliwe jest stosowanie dowolnej zwalidowanej metody analitycznej w oparciu o badanie certyfikowanego materiału odniesienia. Metody te powinny spełniać określone kryteria podane w tabeli 3.

Tab. 3. Kryteria wyboru metod oznaczania ołowiu, kadmu, rtęci i cyny nieorganicznej

Parametr	Wartość/komentarz
Zakres stosowania	Środki spożywcze wymienione w rozporządzeniu (WE) nr 1881/2006
LOD	1/10 NDP i 1/5 NDP dla Pb, gdy NDP jest <0,10 mg/kg; dla Sn <5 mg/kg
LOQ	1/5 NDP i 2/5 NDP dla Pb, gdy NDP jest <0,10 mg/kg; dla Sn <10 mg/kg
Precyzja	wartości $HORRAT_T/HORRAT_R < 2$
Odzysk	80% – 120%
Specyficzność	Wolna od interferencji matrycowych i spektralnych

LOD – granica wykrywalności (najmniejsza zawartość, którą można zmierzyć z należytą pewnością statystyczną); wyrażona liczbowo jako 3-krotne odchylenie standardowe wartości średniej próbki ślepej (liczba oznaczeń >20)

LOQ – granica oznaczalności; wyrażona liczbowo jako 6-10-krotne odchylenie standardowe wartości średniej próbki ślepej (liczba oznaczeń >20)

$HORRAT_T$ – uzyskane względne odchylenie RSD_T podzielone przez RSD_T obliczone z równania Horwitza

$HORRAT_R$ – uzyskane względne odchylenie RSD_R podzielone przez RSD_R obliczone z równania Horwitza

NDP – najwyższa dopuszczalna zawartość

Metody analizy żywności

Zalecenia Unii Europejskiej odnośnie wyboru metod oznaczania metali dokładnie odzwierciedlają tendencje w analizie pierwiastkowej żywności, w której brak jest uniwersalnych metod analitycznych umożliwiających oznaczanie wszystkich pierwiastków z możliwie najlepszą precyzją, dokładnością, wykrywalnością i niskich kosztach. Najbardziej popularne

i najczęściej stosowane techniki analityczne w analizie pierwiastkowej żywności przedstawia tabela 4 [1, 2, 3, 9, 10, 12].

Tab. 4. Najczęściej stosowane techniki analityczne w analizie pierwiastkowej

AAS - FAAS/FAES - ETAAS - HGAAS - CVAAS	atomowa spektrometria absorpcyjna AAS z atomizacją w płomieniu AAS z atomizacją elektrotermiczną AAS z generacją wodorków AAS z generacją zimnych par
AFS - HGAFS - CVAFS	atomowa spektrometria fluorescencyjna AFS z generacją wodorków AFS z generacją zimnych par
ICP-OES - HG-ICP-OES - CV-ICP-OES - ETV-ICP-OES - LA-ICP-OES ICP-MS	optyczna spektrometria emisyjna z plazmą sprzężoną indukcyjnie ICP-OES z generacją wodorków ICP-OES z generacją zimnych par ICP-OES z elektrotermicznym odparowaniem ICP-OES z ablacją laserową spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie
NAA - INAA - RNAA	neutronowa analiza aktywacyjna instrumentalna neutronowa analiza aktywacyjna radiochemiczna neutronowa analiza aktywacyjna
Techniki łączone	rozdział: HPLC, GC, HG, CV detekcja: AAS, AFS, ICP, MIP

Absorpcyjna spektrometria atomowa (AAS), zwłaszcza płomieniowa jest jedną z najstarszych i najczęściej stosowanych technik w analizie pierwiastkowej; jest w miarę prosta i ekonomiczna. Pozwala na oznaczanie około 65 pierwiastków, ale jej czułość jest różna i nie zawsze wystarczająca do oznaczania niektórych pierwiastków takich jak Cd, Pb, Hg, As itp. na poziomach ich występowania w żywności. Dążenie do poprawy czułości tej techniki,

przyczyniło się do jej rozwoju i powstania alternatywnych sposobów atomizacji, jak np. AAS z atomizacją elektrotermiczną (ETAAS) dla pierwiastków takich jak Cd, Pb, As, Sn i in.; AAS z generacją wodorków (HGAAS) dla pierwiastków np. As, Hg, Se, Sn; AAS z generacją zimnych par (CVAAS) do oznaczania Hg.

Interferencje chemiczne i spektralne występujące w różnych wersjach tej techniki minimalizowane są poprzez stosowanie m.in. odpowiednich modyfikatorów i korekcji tła. Głównym ograniczeniem tej techniki jest to, że jest to z zasady technika jednopierwiastkowa, chociaż wprowadzane są również pewne systemy wielopierwiastkowe jak np. lampy wielopierwiastkowe. Większość systemów spektrometrii atomowej wymaga, aby analizowane próbki były w stanie ciekłym, ale mogą być także podawane w stanie stałym i w postaci zawiesin, głównie w zastosowaniu do ETAAS.

Emisyjna spektrometria atomowa płomieniowa (FAES), w której do analizy wykorzystywany może być płomieniowy spektrometr absorpcji atomowej, ale pracujący w systemie emisyjnym, stosowana jest do oznaczania około 10 pierwiastków ulegających łatwo wzbudzeniu, głównie metali alkalicznych, np. K, Na, Li [1, 2, 4, 10].

Fluorescencyjna spektrometria atomowa (AFS) jest bardzo czułą, selektywną i o dużym zakresie pomiarowym techniką analityczną, ale stosunkowo rzadko stosowaną zwłaszcza w analizie śladowej. W połączeniu z techniką generacji wodorków i zimnych par pozwala również na oznaczanie analogicznych pierwiastków jak w AAS. Do wad tej techniki zalicza się brak efektywnych źródeł wzbudzania, konieczność całkowitego zmineralizowania próbki przed analizą, co w przypadku złożonych matryc produktów spożywczych może stanowić poważny problem, a także interferencje spektralne i matrycowe oraz wysokie koszty aparatury [1, 2, 10].

Optyczna spektrometria emisyjna/spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-OES/ICP-MS) zaliczane są obecnie do najnowocześniejszych technik instrumentalnych, umożliwiających oznaczanie około 70 pierwiastków. ICP-OES / ICP-MS cechują się, co najmniej dobrą wykrywalnością dla większości pierwiastków, szerokim zakresem oznaczania oraz możliwością analizy wielopierwiastkowej. Te cechy powodują, że techniki

ICP-OES i ICP-MS stają się coraz bardziej popularne w zastosowaniu do analizy pierwiastkowej żywności, pomimo pewnych problemów z wprowadzaniem próbki do plazmy oraz występowaniem interferencji spektralnych i matrycowych. ICP-OES stosowana jest również w połączeniu z generacją wodoroków i generacją zimnych par do oznaczania pierwiastków analogicznych jak w AAS. W większości zastosowań próbki analizowane są w stanie ciekłym, jednak możliwa jest analiza próbek stałych przy zastosowaniu elektrotermicznego odparowania (ETV-ICP-OES) lub laserowej ablacji (LA-ICP-OES) [1, 3, 4, 10].

Neutronowa analiza aktywacyjna (NAA) - to technika wykorzystująca do oznaczania pierwiastków reakcje jądrowe wywoływane przez neutrony. Do największych zalet tej techniki można zaliczyć: wysoką czułość i niską wykrywalność dla około 50-60 pierwiastków możliwych do jednoczesnego oznaczenia tą techniką, bez konieczności wstępnego przygotowania próbki do oznaczeń (mineralizacji). Zarówno w wersji INAA jak i RNAA technika ta określana jest jako definitywna i wykorzystywana jest do sprawdzania wiarygodności innych metod analitycznych oraz certyfikacji materiałów odniesienia. Jej wadą jest duża praco- i czasochłonność, słaba czułość w odniesieniu do np. Cd, Sn, a także trudności w oznaczaniu niektórych pierwiastków, np. Pb oraz wysoki koszt aparatury [1, 9, 10].

Techniki łączone - nabierają w analizie pierwiastkowej coraz większego znaczenia, ze względu na to, że umożliwiają przeprowadzanie analizy specjacyjnej, czyli oznaczania różnych form pierwiastków występujących w żywności. Rozdziału form dokonuje się w układzie chromatograficznym gazowym lub cieczowym (GC, HPLC), natomiast jako detektory mogą być stosowane wymienione w tabeli 4 różne techniki instrumentalne [1, 10].

Przygotowanie próbek do badań

Jak wcześniej wspomniano, z wyjątkiem INAA czy niektórych analizatorów do oznaczania np. Hg, umożliwiających analizę próbek w stanie stałym, większość wymienionych w tabeli 5 metod wymaga wstępnego przygotowania próbek do analizy, tj. przeprowadzenia do roztworu i rozkładu substancji

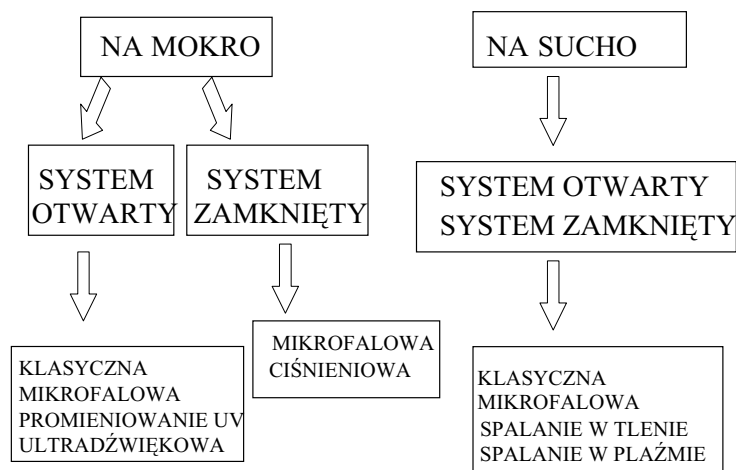
organicznych wchodzących w skład analizowanej próbki. Do tego celu służy mineralizacja, stosowana w dwóch podstawowych rodzajach: na sucho i na mokro (Rys. 1).

Mineralizacja klasyczna:

- sucha – próbka spalana jest w piecu muflowym – temp. 450°C - 550°C
- mokra – próbka z dodatkiem kwasów mineralnych spalana jest na płycie grzejnej w temp. do 300°C;

Mineralizacja „nowoczesna”:

- mineralizacja w tlenie (bomba tlenowa);
- mineralizacja w plazmie (niskotemperaturowa);
- mineralizacja promieniami UV,
- mineralizacja z ultradźwiękami;
- mineralizacja ciśnieniowa;
- mineralizacja mikrofalowa.



Rys. 1. Rodzaje mineralizacji na sucho i na mokro

Mineralizacja na sucho preferowana jest dla technik analitycznych charakteryzujących się słabą wykrywalnością oznaczanych pierwiastków, ze

względu na to, że istnieje możliwość stosowania relatywnie dużej próbki (np. 25 g), w porównaniu do systemów nowoczesnych (~1 g). Zaletą tej techniki są również ograniczone możliwości zanieczyszczenia próbki (mała ilość odczynników) i małe wymagania obsługowe. Wadą natomiast jest możliwość strat oznaczanych pierwiastków, które są lotne w wysokich temperaturach, a także długi czas procesu trwającego niekiedy nawet kilka dni.

Mineralizacja na mokro preferowana jest w odniesieniu do technik charakteryzujących się dobrą wykrywalnością oznaczanych pierwiastków, ze względu na ograniczoną masę próbki do kilku gramów, a w przypadku systemów mikrofalowych nawet do 1 g. Najczęściej stosowanymi kwasami mineralnymi są: HCl, HNO₃, H₂SO₄, HClO₄ pojedynczo lub w mieszaninach oraz z dodatkiem innych utleniaczy, np. H₂O₂. Do zalet mineralizacji na mokro można zaliczyć ograniczenie strat lotnych pierwiastków i krótszy czas analizy, zwłaszcza w systemach mikrofalowych zamkniętych, wadą natomiast jest ograniczona wielkość próbki, możliwość wprowadzenia zanieczyszczeń wraz z kwasami, straty analitu zwłaszcza w systemach otwartych i większe wymagania związane z obsługą i nadzorem procesu.

W ostatnich latach mineralizacja mikrofalowa, w szczególności na mokro w układzie zamkniętym i systemach zautomatyzowanych, zdobywa coraz większą popularność w laboratoriach badających żywność. Zaletami tego rodzaju postępowania jest: ograniczenie zanieczyszczenia próbki z otaczającego środowiska i kwasów stosowanych w małych ilościach, strat wywołanych lotnością, a także krótki czas mineralizacji. Ponadto korzystna jest możliwość stosowania pojedynczego kwasu, np. HNO₃, który staje się dobrym utleniaczem w wyższych temperaturach, uzyskiwanych dzięki zwiększonemu ciśnieniu w trakcie prowadzenia procesu, a powstająca prosta matryca jest odpowiednia dla większości technik analitycznych takich jak: ETAAS, ICP-OES, ICP-MS. Wadami natomiast są: ograniczona wielkość próbki i wysoki koszt urządzenia oraz materiałów eksploatacyjnych [1, 4].

Kryteria wyboru metod w analizie pierwiastkowej żywności

Przy wyborze techniki analitycznej do oznaczania pierwiastków w żywności uwzględnić należy szereg czynników, charakterystycznych dla każdej z nich, takich jak:

- przygotowanie próbki do badań – nie jest wymagane w technice INAA, natomiast wymagane w FAAS, ETAAS, ICP-OES, ICP-MS i technikach łączonych z generacją wodoroków i zimnych par; w zależności od stosowanej techniki pomiarowej stosowane są różne sposoby mineralizacji, z tym że końcowa matryca analizowanej próbki powinna być kompatybilna z daną techniką pomiarową, w celu ograniczenia interferencji podczas oznaczania, np. HNO_3 jest preferowany dla AAS, ICP-OES, ICP-MS,
- wykrywalność (LOD – limit of detection), która zależy głównie od możliwości danej techniki analitycznej, optymalizacji warunków oznaczania, ale także od wieku wyposażenia czy stopnia zużycia poszczególnych elementów; dla poszczególnych technik kształtuje się następująco: ICP-MS > GFAAS > ICP-OES > FAAS > FAES.

Przykładowe granice wykrywalności dla makro- i mikropierwiastków uzyskiwane za pomocą różnych technik przedstawia tabela 5 [1].

Tab. 5. Granice wykrywalności makropierwiastków i pierwiastków śladowych w [$\mu\text{g/l}$] oznaczonych różnymi technikami

Pierwiastek	FAAS	FAES	ETAAS	ICP-OES	ICP-MS
Ca	0,5	0,1	0,01	0,07	2
K	2	3	0,1	20	0,0002
Zn	0,5	200	0,01	0,6	0,01
Fe	5	50	0,02	0,7	0,01
Cd	1	2000	0,01	0,5	0,001
Pb	10	200	0,05	10	0,001
Sn	30	300	0,2	10	0,001

Tabela 6 przedstawia natomiast granice wykrywalności wybranych pierwiastków, tworzących lotne wodorki bądź zimne pary w określonych warunkach, uzyskiwane różnymi metodami [2]. Jak można zauważyć, tylko techniki wykorzystujące tę wyjątkową cechę niektórych pierwiastków umożliwiają oznaczanie takich pierwiastków jak rtęć, arsen, selen na poziomach uzyskiwanych z zastosowaniem ICP-MS.

Tab. 6. Granice wykrywalności Hg, As i Se oznaczanych w [$\mu\text{g/l}$] różnymi technikami

Pierwiastek	FAAS	ETAAS	ICP-OES	ICP-MS	HG-AAS	HG-AFS	CVAAS CVAFS
Hg	140	0,2	1	0,01	-	-	0,0001
As	150	0,5	30	0,03	0,01	0,01	-
Se	100	0,7	90	0,03	0,08	0,01	-

Czas analizy – możliwość jednoczesnej wielopierwiastkowej analizy posiadają: INAA, ICP-OES, ICP-MS, co znacznie skraca czas analizy w porównaniu z jednopierwiastkową analizą AAS, czy sekwencyjną ICP-OES;

Dynamiczny zakres oznaczania – jest największy w technice ICP-MS i INAA, a najmniejszy w technice AAS, co stwarza konieczność rozcieńczania próbki, o ile stężenia oznaczanego pierwiastka ten zakres przekraczają; duży zakres oznaczania daje większe korzyści czasowe niż analiza wielopierwiastkowa,

Prostota w zakresie przygotowania próbki, oprogramowania, wzorcowania, obsługi; automatyzacja nie tylko zwiększa szybkość analizy, ale także poprawia precyzję, jak np. w ETAAS,

Interferencje – są niewielkie w technice FAAS ze względu na duże rozcieńczenie próbki i obecność potencjalnych substancji interferujących,

a jeszcze mniejsze w technikach wodorkowych i zimnych par, w których analit – oznaczany pierwiastek, jest oddzielony od potencjalnie interferującej matrycy; największe interferencje występują natomiast w technice ETAAS, z tym że mogą być one eliminowane lub ograniczane poprzez stosowanie odpowiedniej korekcji tła (interferencje spektralne) i matrycy (modyfikatory).

Koszt aparatury, który układa się następująco: **INAA > ICP-MS > ICP-OES > ETAAS > FAAS > FAES**

Zestawienie parametrów charakteryzujących poszczególne techniki pomiarowe i możliwości ich zastosowań w analizie pierwiastkowej przedstawia tabela 7.

Tab. 7. Porównanie charakterystycznych parametrów wybranych technik analitycznych oznaczania metali

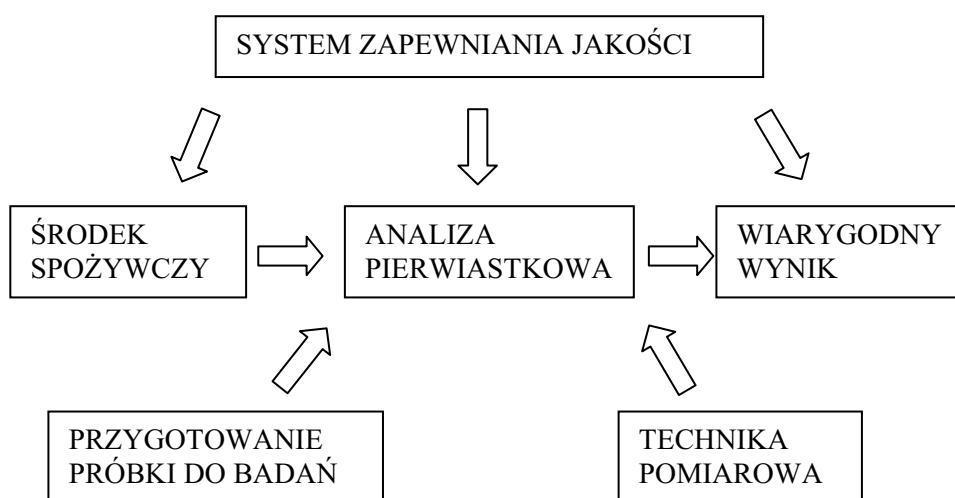
Parametr	FAAS	ETAAS	ICP -OES	ICP -MS	INAA
LOD [µg/l/mg/kg]*	1-500	0,005-0,01	0,1 -100	0,0001 -0,01	0,005 -1000*
Liniowość	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁸	10 ⁴ - 10 ⁵
Precyzja [%]	0,1-10	0,5-10	0,1-5	0,5-5	0,1-10
Interferencje spektralne	<<	>>	>	<	<
chemiczne	>	>>	<<	<	-
Czas analizy ogólny/ analiza wielopierwiastkowa	>	>>	<	<	<
Wielkość próbki [ml]	-	-	+	+	+
Koszt aparatury	>>	<<	<	<	<
	<	<	>	>>	>>

Legenda: >> bardzo duże, > - duże, < - średnie, < - małe, << - bardzo małe

Decydując się na wybór nowoczesnej techniki analitycznej do oznaczania określonych pierwiastków w żywności ostatecznie musimy ustalić, czy metoda oparta na danej technice jest:

- odpowiednia do zamierzonego zastosowania,
- charakteryzuje się odpowiednią wykrywalnością, precyzją i dokładnością,
- elastyczna, a więc odporna na efekty matrycowe, spektralne,
- niezawodna,
- uznawalna (np. akredytowana).

Ostatecznym celem podejmowanych przez analityka działań związanych z przeprowadzeniem analizy pierwiastkowej żywności jest uzyskanie wiarygodnego wyniku, przy sprawnie działającym na poszczególnych etapach tej analizy systemie zapewnienia jakości badań, tak aby na podstawie uzyskanego wyniku można było podjąć właściwe decyzje związane z bezpieczeństwem żywności. Schemat takiego procesu analitycznego przedstawia rysunek 2:



Rys. 2. Schemat analizy pierwiastkowej

Tak więc, nie jest najbardziej istotne jaką aparaturę analityczną w analizie pierwiastkowej stosujemy, która stanowi jeden z elementów procesu

analitycznego, na początku, w trakcie i na końcu którego zawsze stoi analityk, od którego wiedzy, umiejętności i doświadczenia zależy końcowy rezultat podejmowanych w tym zakresie decyzji i działań.

Literatura

1. Aras N.K. Ataman O.Y.: Trace element analysis of food and diet. RSC Publishing 2006.
2. Crock, J.G., Lamothe, P.J.: A short review of the current environmental analytical chemistry of As, Sb, Se, Te, and Bi: Ninth Conference on analytical Chemistry in Geoscience and the Environment, Polish Geological Institute, 2001, Warsaw, Poland, November 7-9.
3. Cubadda F.: Inductively coupled plasma – mass spectrometry for the determination of elements and elemental species in food: a review. Journal AOAC, 2004, 173-204
4. Cygański A.: Metody spektroskopowe w chemii analitycznej. WNT, 1997, Warszawa.
5. Dz.U.06.171.1225. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia.
6. Dz.U. L 364/5 z 20.12.2006. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1881/2006 z 9.12.2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (zastępuje rozporządzenie (WE) nr 466/2001).
7. Dz.U. L 88/29 z 29.3.2007. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 333/2007 z 8.03.2007 ustanawiające metody pobierania próbek i metody analiz do celów urzędowej kontroli poziomów ołowiu, kadmu, rtęci, cyny nieorganicznej, 3-MCPD i benzo(a)pirenu w środkach spożywczych.
8. Gertig H., Przysławski J. Bromatologia. Zarys nauki o żywności i żywieniu. Wyd. Lekarskie PZWL, 2006, Warszawa.
9. Moitinho I.M., Medeiros A., Zamboni C.B., Goncalves de Medeiros J.A., Rizzutto M., Addend N., Tabacniks M.H.: Multielemental analysis of

- genetically modified food Rusing ANAA and PIXE techniques. *Brazilian Journal of Physics*, 2005, 35(3B), 814-817.
10. Niedzielski P., Siepak M.: Analytical methods for determining arsenic, antimony and selenium in environmental samples. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2003, 12(6), 633-667.
 11. OJ L 31/1 28.1.2002. Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. Ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności.
 12. Sanz-Medel A.: Toxic trace metal speciation: importance and tools for environmental and biological analysis. *Pure & App. Chem.*, 1998, 70(12), 2281-2285.
 13. Stanley T.O.: Food contamination and safety. W: Food and nutritional toxicology. CRC Press 2004.
 14. Watson D.H.: Food chemical safety. Vol. 1. Contaminants. CRC Press 2000
 15. Ziemiański Ś., Bułhak-Jachymczyk B., Budzyńska-Topolowska J., Panczenko-Kresowska B., Wartanowicz M.: Normy żywienia dla ludności w Polsce (energia, białko, tłuszcz, witaminy i składniki mineralne). *Nowa Medycyna*, 1998, 4/98, 1-26.

3. Analiza mikotoksyn i jej powiązania jako narzędzia tworzenia jakości i bezpieczeństwa żywności

LUDWIK CZERWIECKI

Wstęp

Żywność bezpieczna to żywność, która nie zagraża zdrowiu konsumenta; ogół cech takiej żywności przekłada się na jej wysoką jakość. Bezpieczeństwo żywności zależy od bardzo wielu czynników, a generalnie od stopnia skażenia produktów spożywczych i płodów rolnych zanieczyszczeniami szkodliwymi dla zdrowia. Zagadnienia z tym związane ujmuje szczegółowo ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia z dnia 25 sierpnia 2006 roku [29].

Wśród wielu zanieczyszczeń żywności, bądź surowców przeznaczonych do jej wytwarzania, wymieniane są mikotoksyny, jako wtórne metabolity grzybów mikroskopowych określanymi potocznie mianem pleśni. Mikotoksyny stanowią ważną grupę ksenobiotyków środowiskowych występujących w żywności, ponieważ oprócz swojej wysokiej toksyczności są trudne do wyeliminowania; wszelkie podejmowane działania prewencyjne posiadają względnie ograniczoną skuteczność. Wynika to m.in. ze specyfiki tych substancji, które wytwarzane są przez mikroorganizmy saprofityczne, niezbędne dla funkcjonowania ekosystemów. Oprócz przestrzegania dobrej praktyki rolnej i produkcyjnej dysponujemy dzisiaj różnego rodzaju środkami pozwalającymi jedynie na minimalizowanie skutków zdrowotnych wynikających z obecności mikotoksyn w produktach spożywczych. Może bardziej właściwe będzie zastąpienie słowa „środki”- słowem „działania”, których obszary sprowadzają się do:

- 1) stosowania odpowiednich metod oznaczania tych związków,
- 2) rewizji i uaktualniania informacji z zakresu toksykologii mikotoksyn,

3) aktywności w sferze legislacyjnej.

Należy przy tym zaznaczyć, że tylko harmonijne współdziałania trzech wymienionych obszarów pozwala na uzyskanie optymalnych efektów w ochronie zdrowia konsumenta żywności. Poniżej zostaną przedstawione możliwości jakimi dysponujemy w chwili obecnej w omawianej dziedzinie, przy czym z oczywistych względów, pierwszeństwo będą miały zagadnienia analityczne.

Metody analityczne

Współczesne metody analizy ilościowej mikotoksyn zdominowała wysokosprawna chromatografia cieczowa - HPLC [10, 13, 16, 18, 21], która zdetrzonizowała historyczną już niemal chromatografię cienkowarstwową - TLC.

Chromatografia gazowa - GC wykorzystywana jest jedynie sporadycznie i jej zastosowanie ogranicza się do oznaczania mikotoksyn z grupy trichotecenów [17, 19], ale i tu daje znać o sobie dominujący wpływ HPLC skutecznie wypierającej chromatografię gazową. Do celów analizy półilościowej stosuje się przesiewowe testy immunoenzymatyczne, np. ELISA pozwalające na szybką, ale tylko orientacyjną ocenę badanego produktu pod względem stopnia jego skażenia mikotoksynami i dlatego metody te nie są rekomendowane przez Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN), jako narzędzia urzędowej kontroli żywności [2]. Jeśli chodzi o wysokosprawną chromatografię cieczową, to obecnie prawie wyłącznie stosowana jest jej wersja w odwróconym układzie faz, tzw. RP-HPLC, gdzie fazę stacjonarną stanowi żel krzemionkowy modyfikowany węglowodorami o długości łańcuchów węglowych od C8 do C18, a fazy ruchome są na bazie wody z dodatkiem modyfikatorów takich jak metanol czy acetonitryl. Zaznaczyć należy, że obserwuje się ciągły postęp w doskonaleniu wypełnień chromatograficznych, jak i samej konstrukcji kolumn i oczywiście aparatury.

Detekcja

Prócz zapewnienia odpowiednio selektywnego rozdziału na kolumnie chromatograficznej niezwykle ważny jest dobór detektora; zależny jest on m.in. od właściwości fizykochemicznych analizowanych związków. Bezdyskusyjnie najważniejszy w analizie mikotoksyn był i jest detektor fluorymetryczny, zwany również fluorescencyjnym (FLD); prócz niego stosowane są niekiedy detektory: UV, UV-DAD oraz różne typy detektorów mas: kwadrupol i jego niejako rozszerzenie - pułapka jonowa.

Detektor fluorymetryczny stosuje się do analizowania w pierwszej kolejności mikotoksyn wykazujących fluorescencję wzbudzaną promieniowaniem ultrafioletowym. Odznacza się on bardzo wysoką czułością oraz specyficnością przy dużej wrażliwości na interferujące zanieczyszczenia; wymaga dlatego bardzo starannej obróbki wstępnej badanego materiału, m.in. odpowiedniego oczyszczania próby (*clean-up*). Do fluoryzujących natywnie mikotoksyn zaliczyć można aflatoksyny B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, ochratoksynę A i zearalenon z jego licznymi pochodnymi - metabolitami. W obrębie wymienionej grupy mikotoksyn, jaką tworzą aflatoksyny, istnieje możliwość wywołania/wzmocnienia fluorescencji przez odpowiednie chemiczne przekształcenie cząsteczki analizowanego związku - dotyczy to przede wszystkim aflatoksyny B₁ oraz G₁. Tak się bowiem składa, że aflatoksyny te fluoryzują niezwykle intensywnie na stałych podłożach, np. na żelu krzemionkowym (co było i jest wykorzystywane w chromatografii cienkowsarstwowej i jej odmianach - TLC/HPTLC), natomiast w roztworach, szczególnie o dużym udziale fazy wodnej, znacznie słabiej. W celu wzmocnienia fluorescencji aflatoksyn B₁ oraz G₁ oznaczanych techniką HPLC przekształca się je w hemiacetalowe pochodne z kwasem trifluorooctowym (TFA) w reakcji prekolumnowej [28] lub tworzy ich połączenia z bromem lub jodem; te ostatnie to reakcje postkolumnowe [1, 18]. Na szczególną uwagę, ze względu na prostotę i wygodę, zasługuje reakcja aflatoksyn z bromem generowanym elektrochemicznie z KBr, który jest rozpuszczony w fazie ruchomej [18].

Do mikotoksyn, których cząsteczki nie wykazują samoistnej fluorescencji należy duża grupa trichotecenów (m.in.: deoksyniwalenol (CDON), niwalenol,

toksyna T-2 czy HT-2) oraz fumonizyny B₁, B₂ etc. Analizowanie tych związków za pomocą detektora FLD wymaga zatem odpowiedniej reakcji, w wyniku której powstaną pochodne intensywnie fluoryzujące w ultrafiolecie. Informacje o fluorescencji wybranych mikotoksyn zebrano w tabeli 1 [5, 6, 10, 12, 20, 26].

Tab. 1. Fluorescencja mikotoksyn i niektóre reakcje tworzenia fluoryzujących pochodnych

Mikotoksyna	Fluorescencja zw. macierzystego	Reagent	Ex/Em [nm]	Typ reakcji
Aflatoksyny B ₁ ,G ₁	słaba	TFA Br J	370/418-700 362/425-455 360/440	Prekolumnowa Postkolumnowa Postkolumnowa
Aflatoksyny B ₂ ,G ₂	silna	-	360/440.	-
Aflatoksyna M ₁	silna	-/TFA	360/435	-/Prekolumnowa
Ochratoksyna A	silna	-	330/460	-
Fumonizyny B ₁ , B ₂	brak	NBD-F	460/500	Prekolumnowa
Toksyna T-2, HT-2	brak	1-AN, DMAP	381/470	Prekolumnowa
Zearalenon	silna	-	274/446	-

Legenda: Ex/Em – wzbudzenie/emisja, TFA - kwas trifluorooctowy,

NBD-F – 4-flouoro-7-nitrobenzofurazan, 1-AN – 1-antrylonitryl,

DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna

Uwaga: fluorescencję ochratoksyny A można wzmocnić dodatkowo NH₃, jednak wobec coraz nowocześniejszych detektorów fluorymetrycznych zabieg ten wydaje się zbędny; jego zastosowanie jest też dosyć kłopotliwe, ponieważ wymaga dodatkowej pompy, tłoczącej roztwór amoniaku, wolnej od pulsacji.

Wymienione wcześniej detektory UV oraz UV-DAD charakteryzują się zarówno stosunkowo małą czułością i dosyć słabą selektywnością; ta ostatnia niekorzystna cecha dotyczy klasycznego detektora UV, dlatego nigdy nie był on często stosowany w tej dziedzinie analizy, chociaż oddaje on znakomite usługi np. w przypadku oznaczania patuliny w sokach jabłkowych [27]; wykorzystywany jest też niekiedy w analizie DON [9].

Detektorem niewątpliwie o najwyższej specyficzności, ale za to dość małej czułości i znacznej wrażliwości na oddziaływanie tzw. tła, jest detektor masowy stosowany ostatnio w tandemie LC-MS/MS zamiast GC-MS do oznaczania przede wszystkim mikotoksyn z grupy trichotecenów [3, 4]. W praktyce znajduje on zastosowanie głównie do potwierdzania wyników pozytywnych uzyskanych innymi technikami analitycznymi i przy użyciu różnych detektorów. Jego wadą jest również nadal bardzo wysoka cena. Najważniejsze odmiany tego detektora to kwadrupol i pułapka jonowa. Pierwszy, w najogólniejszym ujęciu, nadaje się bardziej do oznaczeń ilościowych, pułapka jonowa jest natomiast detektorem o lepszej rozdzielczości, wykrywalności i czułości, jednak jej przydatność w analizie ilościowej mikotoksyn jest zdecydowanie mniejsza. Nie wnikając w szczegóły techniczne do celów analizy mikotoksyn za pomocą tych detektorów wykorzystuje się typ jonizacji w trybie jonów dodatnich bądź ujemnych z rozpyleniem w polu elektrycznym (ESI - electrospray ionization).

Przygotowywanie próbek do analizy

Problem odpowiedniego przygotowania próbek - ich oczyszczenia, a właściwie oczyszczenia ekstraktów i to w sposób zapewniający minimalne straty oznaczanej substancji, pozostaje dla analityka zawsze niezmiernie istotny. Dzisiaj, kiedy dominuje HPLC z bardzo czułymi i dlatego wymagającymi detektorami (detektor fluorymetryczny) oraz wobec ustanawiania na ogół coraz niższych dopuszczalnych poziomów mikotoksyn w żywności, zagadnienie odpowiedniej czystości ekstraktów odgrywa jeszcze większą rolę niż w czasach chromatografii cienkowarstwowej. Współczesne techniki clean-up koncentrują się na małych kolumnach i niewielkich objętościach (od 0,5 do 1 ml) cieczy elucyjnych, zarówno do eliminacji substancji interferujących, jak i elucji

oznaczanych, mikotoksyn; odchodzi się już prawie zupełnie od ekstrakcji cieczy, jako jednej z metod oczyszczania/odtłuszczenia ekstraktów. Oprócz techniki ekstrakcja do fazy stałej (SPE) [21] oczyszczania ekstraktów ogromne uznanie zyskała chromatografia na kolumnach powinowactwa immunologicznego (IAC) polegająca na przejściowym wiązaniu analizowanych mikotoksyn (antygenów) przez specyficzne przeciwciała osadzone na złożu kolumny [1, 10, 11, 16].

Do korzyści tego sposobu oczyszczania (*clean-up*) należą:

- 1) znaczne zmniejszenie objętości rozpuszczalników z równoczesną eliminacją najbardziej toksycznych (CHCl_3 , C_6H_6),
- 2) skrócenie czasu analizy do kilkunastu minut,
- 3) poprawa wykrywalności, oznaczalności oraz specyficzności metody.

Istnieją oczywiście również ograniczenia i niedogodności, jakie związane są z wyborem omawianego sposobu oczyszczania; należą do nich: niecałkowita specyficzność przeciwciał, możliwość niekorzystnego oddziaływania składników matrycy na funkcjonowanie przeciwciał (straty oznaczanego składnika); wykazały to m.in. badania własne nad przyprawami kulinarnymi [14], wreszcie trudności technologiczne przy pozyskiwaniu specyficznych, monoklonalnych przeciwciał dla możliwie szerokiej gamy oznaczanych mikotoksyn. Aktualnie możliwe jest zastosowanie tej metody oczyszczania ekstraktów różnych matryc do oznaczania: aflatoksyn B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 , ochratoksyny A, cytryniny, fumonizyn B_1 , B_2 , zearalenonu, DON i toksyny T-2 oraz HT-2.

Ocena skuteczności metod analitycznych

Ponieważ mikotoksyny występują w różnorodnych surowcach i produktach spożywczych przede wszystkim pochodzenia roślinnego, dlatego metody oznaczania tych związków muszą uwzględniać tę różnorodność matrycową oraz korespondować w zakresie m.in. limitów detekcji i oznaczenia ilościowego z ich ustalonymi dopuszczalnymi maksymalnymi poziomami w żywności. Choć nie istnieje konieczność obligatoryjnego stosowania określonych procedur

analitycznych oznaczania mikotoksyn, np. w oparciu o normy; metody stosowane w urzędowej kontroli żywności muszą spełniać pewne wymagania odnoszące się do ich parametrów analitycznych - niezależnie od użytej techniki analitycznej, powinny posiadać określoną sprawność (skuteczność). Aktualnie obowiązuje w tej dziedzinie Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 401/2006 z 23 lutego 2006 roku [23], które zastępuje poprzednie akty prawne odnoszące się do poszczególnych mikotoksyn.

Kryteria skuteczności metod, niezależnie od rodzaju mikotoksyny i badanego produktu, obejmują:

- 1) odzysk w %, w określonym przedziale stężeń,
- 2) precyzję RSD_r/RSD_R , w %, również w zależności od poziomu.

Najczęściej stosowane definicje, które muszą być uwzględniane przez laboratoria to:

- 1) powtarzalność (r),
- 2) odchylenie standardowe (s_r) w warunkach powtarzalności,
- 3) odchylenie standardowe względne (RSD_r) w warunkach powtarzalności,
- 4) odtwarzalność (R),
- 5) odchylenie standardowe (s_R) w warunkach odtwarzalności,
- 6) odchylenie standardowe względne (RSD_R) w warunkach odtwarzalności [23].

W tabeli 2 przedstawiono szczegółowe kryteria skuteczności metod dla wybranych mikotoksyn. Uważny czytelnik zauważy w tabeli brak parametrów wykrywalności i oznaczalności – LOD i LOQ; obecnie nie jest wymagane podawanie ich wartości pod warunkiem zdefiniowania precyzji dla poziomów ($\mu\text{g}/\text{kg}$) mikotoksyn wymienionych w cytowanym rozporządzeniu.

Jednak zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej parametry LOD i LOQ muszą być niższe, co najmniej o rząd wielkości, niż maksymalne dopuszczalne poziomy mikotoksyn określone w Rozporządzeniach Nr 1881/2006 [24] oraz 1126/2007 [25]. W praktyce, w laboratoriach akredytowanych i zajmujących się nie tylko badaniami rutynowymi, istnieje

słuszną tendencją do precyzyjnego określania zarówno LOD jak i LOQ oraz zakresów stężeń (zakres roboczy) stosowanych metod oznaczania mikotoksyn.

Tab. 2. Kryteria skuteczności metod analitycznych dla mikotoksyn [23]

Mikotoksyna	Poziom μg/kg	RSD _r %	RSD _R %	Odzysk %
<i>Aflatoksyny</i> <i>B₁, B₂, G₁, G₂</i> <i>M₁</i>	<1,0 1-10 >10 0,01-0,05 >0,05	} 0,66 RSD _R	} Wg równania Horowitza RSD _R =2 ^(1-0,5 log C)	50-120 70-110 80-110 60-120 70-110
<i>Ochratoksyna A (OTA)</i>	<1,0 1-10			≤40 ≤20
Zearalenon (ZEA)	≤50 >50	≤40 ≤25	≤50 ≤40	60-120 70-120
Deoksyniwalenol (DON)	>10≤500 >500	≤20 ≤20	≤40 ≤40	60-110 70-120
Fumonizyny B ₁ , B ₂	≤500 >500	≤30 ≤20	≤60 ≤30	60-120 70-110
Patulina	<20 20-50 >50	≤30 ≤20 ≤15	≤40 ≤30 ≤25	50-120 70-105 75-105

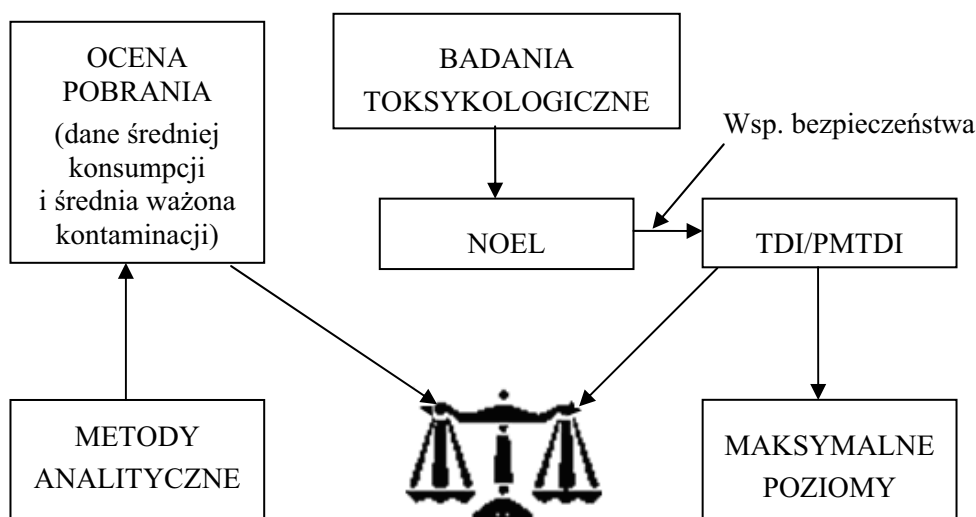
Objaśnienia do tabeli: C - stężenie wyrażone wykładnikiem potęgi przy podstawie 10, jako stosunek - np. 1 mg/kg = 10⁻⁶

Niektóre aspekty toksykologiczne związane z obecnością mikotoksyn w żywności i konsekwencje natury legislacyjnej.

Jak wspomniano we wstępie, obszary badań związane z toksykologią, jak i analityką są w sposób oczywisty współzależne od siebie i stymulują się nawzajem, co oprócz rozwoju tych dwóch dziedzin owocuje również tworzeniem aktów ustawodawczych związanych z bezpiecznymi poziomami mikotoksyn w środkach spożywczych. W tym kontekście nie ma potrzeby omawiania właściwości mikotoksyn w kategoriach toksyczności ostrej, czy przewlekłej -

fakty te są dobrze poznane i udokumentowane. Należy jedynie przypomnieć, że efektem praktycznym badań toksykologicznych, m.in. toksyczności przewlekłej mikotoksyn na zwierzętach, jest m.in. możliwość określenia bezpiecznego poziomu substancji (NOEL - No Observed Effect Level); bardziej precyzyjnie - najwyższej dawki danej mikotoksyny wyrażonej w mikrogramach na kg masy ciała zwierzęcia/dzień, która nie powoduje objawów toksycznych u zwierząt doświadczalnych, a następnie ustalenie na tej podstawie, po uwzględnieniu odpowiednich współczynników bezpieczeństwa (przeniesienie dawki na człowieka), wartości tolerowanego dziennego pobrania/tymczasowego tolerowanego maksymalnego dziennego pobrania mikotoksyn z żywnością przez człowieka czyli, odpowiednio - TDI/PMTDI w $\mu\text{g}/\text{kg}$ masy ciała/dzień. (Określenia te są stosowane przez SCF/JECFA; istnieje jeszcze wariant t -TDI (temporary) - dla zaznaczenia tymczasowego charakteru parametru). Oczywiście przy ustalaniu takiej dawki wykorzystuje się również inne wyniki badań, np. rakotwórczości, mutagenności i badań epidemiologicznych w odniesieniu do człowieka, o ile takowe są dostępne, a stąd już krok do stworzenia odpowiednich aktów prawnych służących ochronie konsumenta przed żywnością szkodliwą dla zdrowia. Warto jeszcze wspomnieć, że dla ochratoksyny A zamiast TDI stosuje się PTWI (tymczasowe tolerowane pobranie tygodniowe, ponieważ mikotoksyna ta może się kumulować).

Niezbędne są również starania, które pozwolą zapewnić nieprzekraczalność ustalonych wartości pobrania mikotoksyn z żywnością poprzez stworzenie odpowiednich warunków produkcji żywności na każdym etapie, włącznie z przechowywaniem. W celu oceny czy faktyczne dzienne pobranie mikotoksyn z dietą nie przekracza PMTDI/TDI niezbędne jest dysponowanie odpowiednio licznymi danymi odnoszącymi się do zawartości mikotoksyn w możliwie szerokiej grupie produktów spożywczych. Dane takie powstają w wyniku m.in. badań monitoringowych w oparciu o wiarygodne metody analityczne. Powyższe informacje, jako wartości średnie kontaminacji ksynami badanych produktów, w połączeniu z danymi określającymi wielkość konsumpcji określonych produktów w danej grupie populacyjnej umożliwiają taką ocenę. Opisane praktyczne aspekty badań toksykologicznych i ich wpływ na bezpieczeństwo żywności przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Niektóre praktyczne aspekty badań toksykologicznych

W krajach Unii Europejskiej odpowiednie akty prawne, m.in. rozporządzenia, określają dopuszczalne poziomy poszczególnych mikotoksyn w żywności. Obecnie w Polsce obowiązuje Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych w żywności i jej składnikach [22]; znajdują się tam odniesienia do dokumentów w randze rozporządzeń obowiązujących w krajach obszaru Unii Europejskiej, a dotyczących m.in. maksymalnych poziomów mikotoksyn w różnych surowcach bądź produktach spożywczych. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 roku, ujmuje całościowo tę problematykę [24], przy czym najnowszym dokumentem uzupełniającym jest Rozporządzenie (WE) Nr 1126/2007 z dnia 28 września 2007 roku [25]. W rozporządzeniach tych uwzględniono następujące mikotoksyny: aflatoksyny B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, ochratoksynę A, patulinę, deoksyniwalenol, zearalenon i fumonizyny B₁, B₂. W przygotowaniu są limity dla toksyny T-2 i HT-2. W tabeli 3 przedstawiono przykładowo dopuszczalne poziomy niektórych mikotoksyn w wybranych produktach.

Tab. 3. Najwyższe dopuszczalne poziomy wybranych mikotoksyn w niektórych środkach spożywczych i surowcach roślinnych

Surowiec/produkt	Rodzaj mikotoksyn	Zawartość [µg/kg]
Wszystkie zboża i wszystkie produkty otrzymane ze zbóż w tym produkty zbożowe z wyjątkiem kukurydzy przeznaczonej do sortowania i produktów specjalnego przeznaczenia	Aflatoksyna B ₁ /Σ aflatoksyn B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂	2,0/4,0
Orzechy arachidowe i orzechy oraz przetworzone produkty z orzechów przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi		2,0/4,0
Nieprzetworzone zboża/wszystkie produkty z nieprzetworzonych i przetworzonych zbóż oraz zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi z wyjątkiem środków spożywczych specjalnego przeznaczenia	Ochratoksyna A	5,0/3,0
Kawa palona/kawa rozpuszczalna		5,0/10,0
Nieprzetworzone zboża inne niż pszenica durum, owies i kukurydza/zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa (w tym m.in. kukurydziana, płatki kukurydziane) i inne produkty do bezpośredniego spożycia przez ludzi z wyjątkiem środków spożywczych specjalnego przeznaczenia	Deoksyniwalenol (DON)	1250/750
Nieprzetworzone zboża inne niż kukurydza/zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa i inne produkty do bezpośredniego spożycia przez ludzi z wyjątkiem środków spożywczych specjalnego przeznaczenia	Zearalenon	100/75

Występowanie mikotoksyn w żywności w Polsce

Problem obecności mikotoksyn w żywności i w surowcach rolniczych w Polsce był badany przez ostatnie cztery dziesięciolecia ubiegłego wieku

z różnym natężeniem; od drugiej połowy lat 90-tych daje się zaobserwować wyraźną intensyfikację poczynań w tej dziedzinie. Jest to rezultatem, m.in. poprawy sytuacji materialnej laboratoriów i placówek badawczych, ale przede wszystkim postępu w dziedzinach analityki, toksykologii żywności i prac ustawodawczych. Badanie zbóż i ich przetworów oraz innych produktów i surowców pochodzenia roślinnego na obecność wymienionych mikotoksyn jest obligatoryjne od momentu wstąpienia Polski do Unii Europejskiej, a dopuszczalne maksymalne ich poziomy regulowane są wspomnianymi poprzednio rozporządzeniami [24, 25].

Generalnie, niezależnie od szczegółowych wyników badań stwierdzić można, że do mikotoksyn zasługujących na szczególną uwagę, jeśli chodzi o występowanie w surowcach rolniczych i żywności w warunkach klimatycznych Polski, należą: ochratoksyna A wykrywana w zbożach i przetworach zbożowych, deoksyniwalenol (DON), a w następnej kolejności: toksyna T-2, HT-2, zearalenon i fumonizyny B₁ i B₂. Wymienione poprzednio mikotoksyny (oprócz toksyny T-2, HT-2 i fumonizyn, co do których istnieje zbyt mało danych) występowały w badanych próbkach zbóż i ich przetworach, a także w innych produktach w ilościach umiarkowanych - przekroczenia maksymalnych dopuszczalnych poziomów zdarzały się stosunkowo rzadko [15].

Aflatoksyny natomiast, jako toksyny klimatu tropikalnego i subtropikalnego, mogą stwarzać pewne potencjalne zagrożenie w produktach z importu takich jak: orzechy - szczególnie arachidowe i przyprawy kulinarne oraz zboża z importu - głównie kukurydza. Jako ciekawostkę należy wspomnieć o badaniach zbóż (żyto, pszenica, jęczmień) pochodzących z upraw konwencjonalnych i ekologicznych zrealizowanych przez Zakład Analizy Żywności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego przeprowadzonych w latach 1997-1998 [7, 8]. Otóż wynika z nich, że zawartości ochratoksyny A nie różniły się istotnie w zbożach z obu rodzajów upraw.

Na zakończenie należy podkreślić, że rozwój analityki żywności, wiedzy toksykologicznej i postępy prac legislacyjnych są procesami ciągłymi, dlatego dopuszczalne poziomy mikotoksyn będą podlegały rewizji, co powinno stanowić gwarancję odpowiedniej jakości i bezpieczeństwa żywności.

Literatura

1. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie aflatoksyny B₁ i sumy aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ w zbożach, orzechach i produktach z nich otrzymanych. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z uzyskaniem pochodnej po rozdziale na kolumnie i oczyszczaniu na kolumnie powinowactwa immunologicznego. Polska Norma PN-EN 12955, czerwiec 2001.
2. Benford D., Boyle C., Dekan W. et al.: Ochratoxin A: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series, 2001, 47, 331.
3. Biancardi A., Gasparini M., Dall'Asta C., Marchelli R.: A rapid multiresidual determination of type A and B trichothecenes in wheat flour by HPLC-ESI-MS. Food Add. Contam., 2005, 22, 251-258.
4. Biselli S., Hummert C.: Development of a multicomponent method for *Fusarium* toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. Food Add. Contam., 2005, 22, 752-760.
5. Czerwiecki L., Szymczyk K.: Oznaczanie aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ w orzechach arachidowych za pomocą chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej. Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż., 49, 1994, 55-62.
6. Czerwiecki L.: Oznaczanie wybranych mikotoksyn w żywności. Cz. I. Dobór optymalnych warunków oznaczania aflatoksyny M₁ w mleku metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Roczn. PZH, 1998, 49, 1-11.
7. Czerwiecki L., Cajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.: On ochratoxin A in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. Food Add. Contam., 2002, 19, 470-477.
8. Czerwiecki L., Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.: On ochratoxin A in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. Food Add. Contam., 2002, 19, 1051-1057.
9. Czerwiecki L., Wilczyńska G.: Determination of deoxynivalenol in cereals by HPLC-UV. Mycotoxin Research, 2003, 19, 31-34.

10. Czerwiecki L., Czyżyk K., Kwiecień A.: Kolumny powinowactwa immunologicznego w analizie ochratoksyny A w zbożach techniką HPLC. Cz. I. Ocena metody ekstrakcji metanolem z wodą. Roczn. PZH, 2004, 55, 133-138.
11. Czerwiecki L., Czyżyk K., Kwiecień A.: Kolumny powinowactwa immunologicznego w analizie ochratoksyny A w zbożach techniką HPLC. Cz. II. Ocena metody ekstrakcji acetonitrylem z wodą. Roczn. PZH, 2004, 55, 249-253.
12. Czerwiecki L., Wilczyńska G.: Oznaczanie zearalenonu (ZEA) w zbożach i produktach zbożowych. Sprawozdanie IBPRS 4.5.5, Warszawa, 2005, 1-30.
13. Czerwiecki L., Wilczyńska G., Kwiecień A.: Ochratoxin A: an improvement clean-up and HPLC method used to investigate wine and grape juice on the Polish market. Food Add. Contam., 2005, 22, 158-162.
14. Czerwiecki L., Wilczyńska G.: Oznaczanie ochratoksyny A w przyprawach kulinarnych. Roczn. PZH, 2005, 45, 323-330.
15. Czerwiecki L., Wilczyńska G., Kwiecień A.: Mycotoxins in several Polish food products in 2004-2005. Mycotoxin Research, 2006, 22, 159-162.
16. Fazekas B., Tar A.: Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. J. AOAC. Int., 2001, 84, 1453-1459.
17. Kienz CH., Verweij A.: Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatography analysis on fused silica capillary column. J. Chromatogr., 1986, 355, 229-234.
18. Kok W. Th., van Neer C. H., Traag W. A *et al.*: Determination of aflatoxins in cattle feed by liquid chromatography and post-column derivatization with electrochemically generated bromine. J. Chromatogr., 1986, 367, 231-236.
19. Noonpugdee CH., Böhm J., Abdelhamid A. M. *et al.*: Über das Vorkommen von Deoxynivalenol (Vomitoxin, DON) in Futtermitteln für österreichische Nutztierbestände in Zeitraum von 1979 bis 1985. Die Bodenkultur, 1986, 37, 87-94.

20. Pascale M., Haidukowski M., Visconti A.: Determination of toxin T-2 in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anhrhrylonitrile. *J. Chromatography A*, 2003, 989, 257-264.
21. Roch O. G., Blunder G., Coker R. D. *et al.*: The development and validation of solid phase extraction, HPLC method for the determination aflatoxins in groundnut meal. *Chromatographia*, 1992, 33, 208-212.
22. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 22.12.2004r. zmieniające Rozporządzenie w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności. *Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej* z 6.01.2005r.
23. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 401/2006 z 23.02.2006r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych.
24. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1881/2006 z 19.12.2006r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych.
25. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1126/2007 z 28.08.2007r. zmieniające Rozporządzenie (WE) No 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do toksyn *Fusarium* w kukurydzy i w jej przetworach.
26. Scott P. M., Lawrence G. A.: Liquid chromatographic determination of fumonisin with 4-fluoro-7-nitrobenzenofurazone. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 75, 1992, 829-834.
27. Tanner H., Zanier C.: Amtliche Methoden zur Bestimmung von Patulin. *Mitt. Gebiete. Lebensm. Hyg.*, 1984, 75, 506-508.
28. Tarter E. J., Hanchay J-P., Scott P. M.: Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 1984, 67, 597-600.

Analiza mikotoksyn i jej powiązania jako narzędzia tworzenia jakości.....

29. Ustawa z 25.08.2006r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Dziennik
Ustaw Nr 71, 2006, poz. 1215.

4. Postępy w technikach separacyjnych stosowanych w analizie żywności

MIECZYŚLAW OBIEDZIŃSKI

W skład żywności wchodzi zarówno składniki pożądane, jak i niepożądane. Składnikami są substancje odżywcze, niezbędne dla zdrowia, składniki przeciwożywcze, bioaktywne – nieżywniowe, toksyczne i zanieczyszczenia i inne, potencjalnie użyteczne lub szkodliwe. Często zadaniem technologii jest usunięcie jednych, a zwiększenie zawartości innych - tych pożądanych.

Mając na uwadze bezpieczeństwo żywności, przyjęto powszechnie stosowanie analizy ryzyka do zarządzania zagrożeniami, które mogą stanowić niebezpieczeństwo dla zdrowia konsumenta i jego dobrostanu. Powszechnie stosowanymi sposobami zarządzania zagrożeniami dla jakości i bezpieczeństwa żywności to systemy HACCP, ISO 22000 czy standardy BRC, QS, GAP i inne. W ostatnich latach zmieniło się również podejście do substancji odżywczych, żywieniowych. W niedawnej przeszłości za składniki odżywcze uważano takie, które są niezbędne do pobrania z otoczenia dla zachowania wzrostu, zdrowia i utrzymania funkcji życiowych. Obecnie wiele składników żywności, jak np. polifenole, isoflawony, karotenoidy, nie będące prowitaminą A, glukozytolany czy fitosterole są uważane za składniki żywieniowe, istotne dla procesów metabolicznych, detoksyfikacji, ogólnie o działaniu prozdrowotnym, np. antykancerogennym. Kilka z tych związków, jeszcze parę lat temu uważano za anty-żywniowe. Wiadomo również, że na ich działanie w organizmie ma wpływ obecność innych składników diety i może mieć charakter antagonistyczny, synergistyczny i zależy to od ich wzajemnych relacji. Już te fakty wskazują na konieczność rozważania lub co najmniej uwzględnienia w analizie ryzyka również analizy korzyści, aby można dokonać kompleksowej oceny składników żywności pod względem korzyści i ryzyka.

Z podobnych powodów istnieje konieczność kompleksowego podejścia do problematyki jakości i bezpieczeństwa żywności w rozwiązaniach prawnych nadzoru nad łańcuchem żywnościowym od pola do stołu, mając na względzie odpowiedzialność wszystkich uczestników ogniw łańcucha, mających wpływ na bezpieczeństwo oraz zdrowotną i żywieniową jakość żywności. Należy sobie zdawać sprawę, że przyjęcie ramowego podejścia do łańcucha żywnościowego wychodzi poza problematykę bezpieczeństwa żywności. Jednocześnie sprzyja podejściu systemowemu do jakości w sektorze rolno-spożywczym, wspieraniu systemów zarządzania jakością i bezpieczeństwem w całym łańcuchu żywnościowym, które wymagają zaangażowania władzy publicznej, producentów i przetwórców, jak również konsumentów – społeczeństwa. Nadchodzące zmiany w polityce rolnej – regulacje dotyczące współzależności „cross compliance”, idą właśnie w tym kierunku. Można się zatem spodziewać, a trend ten jest ewidentnie widoczny w wielu krajach członkowskich Unii Europejskiej, wzajemnego przenikania się problematyki jakości i bezpieczeństwa żywności wyrażonej między innymi tworzeniem zintegrowanych instytucji nadzoru nad bezpieczeństwem i jakością żywności (urzędowa kontrola żywności). Zatem konieczne jest holistyczne podejście do jakości i bezpieczeństwa żywności w cyklu „od pola do stołu” i powinno ono być wsparte nowoczesnymi technikami analitycznymi. Skład, specjacja składników i analiza żywności są niezbędne do oceny wszystkich nierozłącznych składowych i tych dodanych celowo komponentów lub występujących przypadkowo, w tym pochodzących ze środowiska - otoczenia ogniw łańcucha, włączając kontaminanty i pozostałości chemiczne, dodatki i substancje bioaktywne nie – odżywcze. Konieczne są również do oceny zmienności ich relacji i oddziaływania w procesach technologicznych łańcucha, a w szczególności organizmach konsumentów.

Ważną kwestią jest problematyka identyfikowalności (traceability) i autentyczności produktów spożywczych. Problematyka „traceability”, obowiązkowa dla bezpieczeństwa żywności, staje się również istotna dla jakości żywności. Nowym wyzwaniem, aczkolwiek znanym od wielu wieków jest zagadnienie autentyczności produktów spożywczych. Rozwojowi cywilizacji towarzyszył postęp technologiczny, a temu z kolei rozwój sposobów

fałszowania i podrabiania żywności oraz napojów. Prawie 2000 lat temu w Indiach znano zarówno sposoby fałszowania produktów z ziarna roślin zbożowych i olejów jadalnych, jak i sposoby ich wykrywania. W prawie rzymskim opisano sposoby fałszowania oliwy z oliwek oraz wina. W kolejnych stuleciach opisano sposoby wykrywania oraz przeciwdziałania fałszowaniu autentyczności przypraw. Wykrywanie zafałszowań i podrabiania żywności oraz napojów wymaga stosowania różnorodnych technik analitycznych. Obecnie obserwowany trend powrotu do tradycyjnych produktów spożywczych, produktów o deklarowanym pochodzeniu geograficznym, wymaga stosowania różnorodnych technik, aby wykryć ewentualne zafałszowania pochodzenia czy technologii.

Postęp wiedzy o żywności, o jej jakości i bezpieczeństwie, następuje w wyniku rozwoju takich dziedzin jak proteomika, lipidomika, genomika, metabolomika, a od technologia żywności wymaga się ich zintegrowania.

Obserwowany jest zdecydowany postęp w przygotowaniu próbek do badań. Coraz częściej stosuje się metody o znacząco zredukowanej ilości rozpuszczalników organicznych lub bezrozpuszczalnikowych, takich jak:

- ekstrakcja do fazy stałej (*solid phase extraction - SPE*),
- mikroekstrakcja fazy nadpowierzchniowej (*solid phase microextraction - SPME*),
- wykorzystania membran półprzepuszczalnych (*SPMD – semipermeable membrane devices*),
- ekstrakcji do jednej kropli,
- chromatografia dyspersyjna i wielu innych.

Ekstrakcyjne przygotowanie próbek typu Soxhleta, zostało zastąpione przez:

- przyspieszoną, wymuszoną ekstrakcję,
- ekstrakcję w podwyższonej temperaturze i/lub ciśnieniu,
- ekstrakcję cieczą w stanie nadkrytycznym z ewentualnymi modyfikatorami.

Do usuwania związków tła stosuje się ekstrakcję:

- do fazy stałej z wykorzystaniem sorbentów z nadrukiem molekularnym (*molecularly imprinted solid phase extraction* - MISPE),
- do fazy stałej z wykorzystaniem immunosorbentów (*immuno* - SPE),
- rozpuszczalnikami wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (*microwave assisted extraction*, MAE),
- za pomocą rozpuszczalników z próbki rozproszonej w fazie stałej (*matrix solid phase extraction*, MSPD) i mieszadeł z fazą stacjonarną stir bar.

Zastosowanie tych technik jest w szczególności korzystne do wyodrębniania z matrycy żywnościowej i jednoczesnego zagęszczania związków bioaktywnych, występujących w mikro-ilościach w surowcach i artykułach rolno-spożywczych.

Istotną rolę w badaniach żywności odgrywają techniki rozdzielcze, w szczególności chromatograficzne. Postęp w ostatniej dekadzie w chromatografii gazowej i cieczowej oraz w technikach elektro-separacyjnych (w rozwoju kolumn, faz stacjonarnych termostabilnych odpornych na degradację i zmienne pH), a w szczególności doskonalenie istniejących sposobów detekcji umożliwia również badania mikro-próbek i mikro-ilości oraz selektywność detekcji.

Szczególnie w ostatnich pięciu latach rozwijane jest zastosowanie technik sprzężonych typu chromatografia cieczowa – chromatografia gazowa (LC-GC) czy LC-LC, wyczerpująca dwuwymiarowa chromatografia gazowa czy selektywne on-line wycinanie określonych frakcji rozdzielanych mieszanin i powtórny ich rozdział. W sprzężonych technikach wykorzystuje się wycinanie określonych frakcji rozdzielanych na pierwszej kolumnie i ich przeniesienie w czasie rzeczywistym na drugą kolumnę (np. o odmiennej polarności), w celu dokonania skutecznego rozdziału. Odmianą tej techniki jest wysokorozdzielcza i wielowymiarowa chromatografia gazowa (WRGC), gdzie w czasie rzeczywistym stosowane są dwie kolumny kapilarne połączone poprzez modulator. Wielowymiarowość tych technik uzyskuje się dzięki zastosowaniu różnych i specyficznych detektorów lub sprzężeniu ze spektrometrią masową.

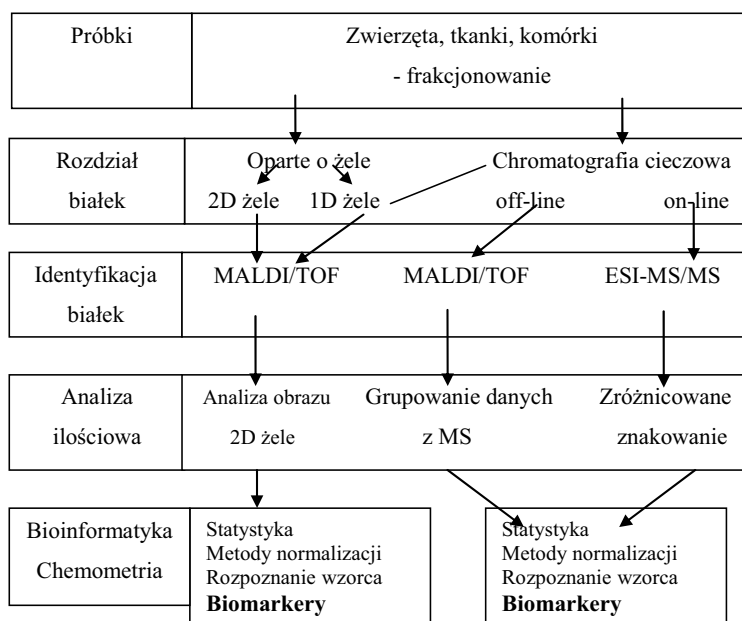
Chromatograficzne i elektroforetyczne techniki rozdziału i izolacji badanych związków, sprzężone ze spektrometrią masową, są standardem w badaniach przypraw, dodatków zapachowych, dodatków do żywności, wykrywaniu skażeń i pozostałości chemicznych żywności, a wręcz są niezbędne do badań wskaźników autentyczności lub identyfikowalności żywności. Dla przykładu, techniką wysokorozdzielczej i wielowymiarowej chromatografii gazowej (WRGC) można się posłużyć dla stwierdzenia autentyczności naturalnych zapachów lub mieszanek zapachowych, miodów, win, napojów alkoholowych czy serów dojrzewających, soków i napojów owocowych.

W badaniach nad pochodzeniem - autentycznością produktów, ważną rolę odgrywają techniki elektroforetyczne i rozwijająca się dynamicznie elektroforeza kapilarna. Poprzez analizę składu białek można tymi technikami identyfikować pochodzenie gatunkowe mięsa, mleka, odmian pszenicy, jęczmienia. W badaniach zastosowanie ma dwuwymiarowa elektroforeza (2-DE), wprowadzona do stosowania w latach 70. ubiegłego stulecia, w szczególności w badaniach białek, obecnie proteomice - badaniach nad ekspresją białek komórkowych, ujawniając w ten sposób funkcje genów. Niewątpliwie badania genomu - sekwencjonowanie DNA - dla wyjaśnienia funkcji genów, poprzez zastosowanie m.in. spektrometrii masowej, uutorowały drogę do szerokiego zastosowania tej techniki w badaniach białek i peptydów.

Możliwości sprzężenia technik separacyjnych i spektrometrii masowej w badaniach białek mięsa i ich funkcji przedstawiono na rysunku 1. Należy pamiętać, że w próbkach tkanek ssaków zazwyczaj występuje od 10 do 30 tys. różnych białek i konieczne jest stosowanie różnorodnych technik, w celu ich wyodrębnienia, rozdziału i ilościowego określenia. Stosowane technologie mają swoje zalety, wady i ograniczenia, zatem dobór techniki zależy od badacza i dostępności narzędzi analitycznych.

Od wczesnych lat 70-tych ubiegłego stulecia obserwuje się szybki postęp w biologii molekularnej i genetyce oraz ich zastosowaniach w szybkiej diagnostyce. Techniki biologii molekularnej są stosowane z powodzeniem w analizie żywności, identyfikacji gatunkowej, odmianowej, pochodzenia geograficznego, składu surowców i produktów, patogenów mikrobiologicznych,

autentyczności i tym podobnych. Nowe techniki inżynierii genetycznej, izolacji genów, wykorzystanie rekombinowanego DNA, hybrydyzacji umożliwiły rozwój technik immunochemicznych, biosensorów, próbników DNA czy reakcji PCR (*polymerase chain reaction*) do opracowania szybkich i pewnych metod analizy żywności.



Źródło: E. Bendixen/Meat Science 71 (2005) 138-149

Objaśnienia: MALDI/TOF; ESI – MS/MS: jonizacja laserowa z matrycy/spektrometria masowa czasu przelotu; jonizacja poprzez elektrorozpraszanie – podwójna spektrometria masowa.

Rys. 1. Przykładowe techniki stosowane w analizie białek mięsa i ich funkcji

Metody chemiczne oznaczania substancji śladowych w żywności zostały wsparte metodami enzymatycznymi – specyficznymi dla analitów, pozwalającymi na stosowanie tanich metod przesiewowych (i zautomatyzowanych) w badaniach skażeń i pozostałości chemicznych w żywności. Notuje się burzliwy rozwój biosensorów, zawierających

biologiczny selektywny element rozpoznania, taki jak enzym (immobilizowany), przeciwciało lub mikroorganizm, połączony z przekaźnikiem chemicznym lub fizycznym – elektrochemicznym - elektrodą, kryształem piezoelektrycznym, optycznym czy termicznym, fluorymetrycznym i lumenometrycznym, z wykorzystaniem technologii światłowodowej.

Przedstawiając powyższe rozważania dotyczące postępu w metodach separacyjnych stosowanych w analizie żywności, należy podkreślić, że chociaż udział żywności o obniżonej jakości, z powodu rozbieżności pomiędzy deklaracją producenta a stanem rzeczywistym nie jest duży, to jednak badania te są konieczne i potrzebne dla ochrony interesów ekonomicznych konsumenta, a czasami również jego zdrowia. Postęp techniczny z jednej strony sprzyja doskonaleniu produktów żywnościowych w aspekcie ich jakości i zdrowotności, z drugiej natomiast stwarza możliwość nieuczciwego podrabiania żywności i jej autentyczności. Z tych powodów, w celu weryfikacji jakości żywności, konieczne jest stosowanie coraz bardziej wysublimowanych metod i często drogiego instrumentarium analitycznego. Pamiętać należy, aby stosowane metody były wiarygodne, a wyniki mogły być potwierdzone innymi technikami.

Obecny postęp technologiczny wskazuje na ogromne możliwości jakościowego skoku w zakresie kontroli jakości i bezpieczeństwa żywności. Wynika to z postępu badań naukowych związanych z nanotechnologiami, badaniami instrumentalnymi, jak i biotechnologicznymi metodami kontroli jakości i bezpieczeństwa żywności, poprzez działania zarówno „on i off-line”. Dla wielu perspektywa automatycznej kontroli krytycznych punktów procesów technologicznych istotnych dla jakości, w tym jej bezpieczeństwa, staje się coraz bliższa. W teorii można również rozważyć możliwość realizacji starej teorii 100% inspekcji produktów, w warunkach, gdy spełniają one wymogi określonej specyfikacji, aczkolwiek należy pamiętać, że spełnienie krytycznych limitów dla tych specyfikacji nie zawsze gwarantuje wysoką jakość i bezpieczeństwo. Zatem rozważa i wiedza ludzka dotycząca oceny wyników badań i pomiarów jest i będzie potrzebna.

5. Organizmy genetycznie modyfikowane i metody ich identyfikacji

HELENA KUBICKA

Wstęp

Od wieków człowiek poprawiał otaczającą go naturę. Początkowo udomawiał zwierzęta w celu zaspokojenia rosnących potrzeb. Następnie wybierał najdorodniejsze okazy zarówno wśród roślin jak i zwierząt, które poddawał procesom hodowlanym takim jak: krzyżowanie i selekcja pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami. W ten sposób tworzył nowe, odporniejsze i wydajniejsze odmiany roślin i rasy zwierząt.

Przełomem w sposobie otrzymywania nowych (nieistniejących w przyrodzie) organizmów były następujące odkrycia w genetyce:

- ogłoszenie teorii totipotencji komórek roślinnych (czyli wykazanie, że każda żywa komórka jest zdolna do odtworzenia całego organizmu) oraz opracowanie składu uniwersalnej pożywki, umożliwiającej kulturę „*in vitro*” różnych organów, tkanek i komórek roślinnych [19]. Pozwoliło to na masowe otrzymywanie roślin tymi sposobami w laboratorium;
- opisanie struktury kwasów nukleinowych przez Watsona i Cricka w 1953 roku oraz rozszyfrowanie kodu genetycznego, który jest odpowiedzialny za zróżnicowanie fenotypowe organizmów;
- wykrycie enzymów restrykcyjnych u bakterii oraz opisanie ich działania - zdolności do przecinania kwasów nukleinowych w specyficznych miejscach;
- opracowanie metod klonowania i systemów przenoszenia oraz wprowadzania genów do zwierząt i roślin – uzyskanie w pierwszych

organizmów transgenicznych, a także opisanie nowoczesnych metod ich identyfikacji.

Powyższe osiągnięcia przyczyniły się do szybkiego rozwoju biotechnologii i uzyskiwania na szeroką skalę zmodyfikowanych genetycznie organizmów (roślin, zwierząt i mikroorganizmów), jak również wszechstronnego ich wykorzystania w wielu gałęziach gospodarki: rolnictwie, medycynie, farmakologii i ochrony środowiska. Wielu badaczy [1, 14, 21] uważa, że produkty uzyskane z organizmów genetycznie modyfikowanych są nieszkodliwe, ponieważ człowiek od zawsze żywił się roślinami i zwierzętami, które w swoich komórkach zawierają geny. Ponadto, pojawienie się nowych produktów nie oznacza wycofania artykułów produkowanych tradycyjnymi metodami, czy konieczności ich zakupu, gdyż każdy ma prawo wyboru. Te dwa kierunki produkcji żywności rozwijają się równolegle i niezależnie od siebie. Mimo tego, wiele osób zadaje sobie pytanie, czy nie stwarzają one zagrożenia dla ludzkości?

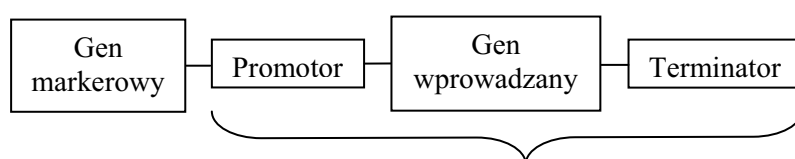
Organizmy transgeniczne

Organizmy genetycznie zmodyfikowane to organizmy, w których materiał genetyczny został zmieniony w sposób niezachodzący w warunkach naturalnych wskutek krzyżowania, czy selekcji, lecz przy zastosowaniu technik inżynierii genetycznej - wprowadzono gen (fragment DNA) pochodzący z innego lub tego samego gatunku.

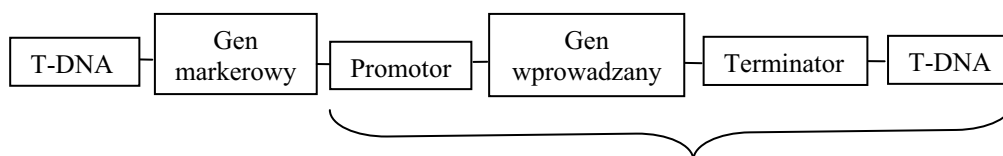
Proces ten nazywamy transformacją genetyczną. Wprowadzony gen odpowiedzialny jest za produkcję odpowiedniego białka, co ujawnia się w postaci nowej cechy, która jest dziedziczna, tzn. przekazywana na potomstwo.

Do przenoszenia genu używa się specjalnych konstrukcji genowych (zwanymi transgenami), które integrują się z genomem biorcy zmieniając jego właściwość. Stąd nazwa organizmy transgeniczne. Transgen składa się z promotora (stymuluje ekspresję obcego genu), sekwencji kodującej dany gen oraz terminatora. Ekspresja wprowadzonego genu do komórki danego organizmu, wystąpi wówczas, gdy transgen zostanie na stałe włączony do jego genomu.

W konstrukcie genowym oprócz transgeny znajdują się geny markerowe - selekcyjne (Rys. 1 i 2), np. geny odporności na antybiotyki (neomycyna, kanamycyna), dzięki czemu na pożywkach zawierających te antybiotyki rosną jedynie komórki ze zintegrowanym obcym DNA. Czynniki selekcyjnymi, często stosowanymi, obok antybiotyków, mogą być herbicydy. Do wykrywania komórek stransformowanych używa się np. genów kodujących wytwarzanie β -glukuronidazy, luceferazy itp.



Rys. 1. Transgen – wprowadzany do komórki roślinnej – metodą bezwektorową



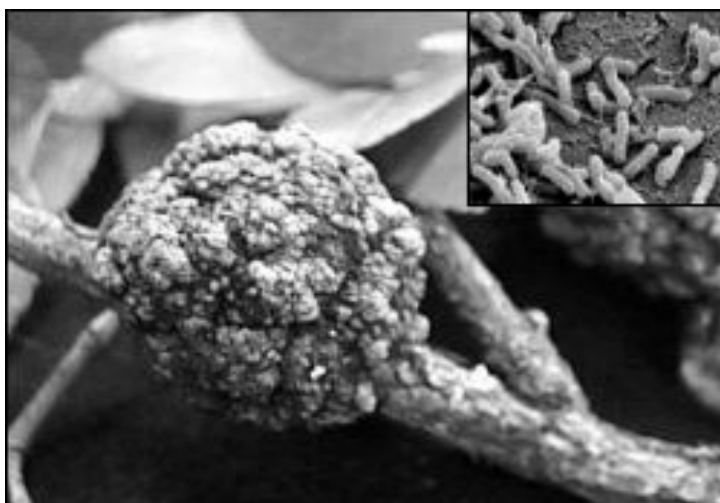
Rys. 2. Transgen - wprowadzany do komórki roślinnej - metodą wektorową

Rośliny transgeniczne uzyskuje się przez przeniesienie obcych fragmentów DNA (genów) do genomu biorcy i stabilną ich integrację z tym genomem. Wprowadzone fragmenty DNA ulegają ekspresji w genomie gospodarza, dzięki czemu możemy otrzymać rośliny o nowych lub ulepszonych cechach. Nowoczesne techniki pozwalają przenosić geny zarówno z organizmów spokrewnionych z biorcą, jak również z oddalonych jednostek systematycznych np. przenoszenie genów roślinnych do genomu zwierzęcego. W 1983 roku przeprowadzono pierwszą udaną transformację u tytoniu [9]. Dotychczas opisano wiele metod wprowadzania genów do komórek roślinnych, a wśród nich najczęściej stosowane są:

a. Metoda wektorowa

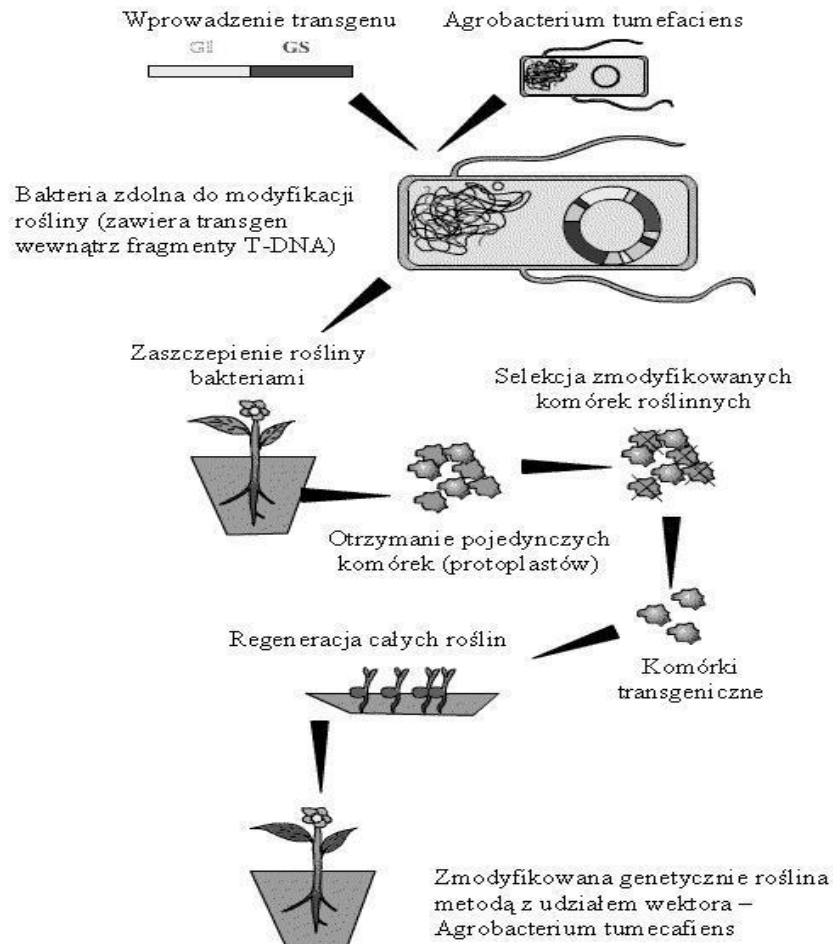
W przypadku tej metody wykorzystuje się naturalną zdolność bakterii glebowych: *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*, do

infekowania roślin w miejscu zranień i przekazywania fragmentu własnego plazmidu, który integruje się z genomem komórki roślinnej. W miejscu infekcji plazmidów z: *A. tumefaciens* - tworzą się tumorowate narośla (Fot. 1), natomiast *A. rhizogenes* – powstaje duża liczba włośników.



Fot. 1. Narośl na roślinie w miejscu infekcji przez bakterię *A. tumefaciens*

Jedną z najważniejszych metod przenoszenia genów jest transformacja z wykorzystaniem wektorów, którymi są plazmidy występujące u *Agrobacterium tumefaciens*. Ze względu na powinowactwo do gospodarza, bakterie te mogły być początkowo wykorzystywane głównie do transformowania roślin dwuliściennych [8] (Rys. 3). Chociaż w określonych warunkach okazało się możliwe transformowanie przy pomocy *A. tumefaciens* także ryżu [4].



Rys. 3. Transformacja tytoniu przy użyciu wektora plazmidowego

b. Metody bezwektorowe

Są to metody polegające na bezpośrednim wprowadzeniu DNA do komórek roślinnych lub zwierzęcych. Pozwalają one na transformowanie dowolnych organizmów, a zaliczamy do nich:

1. *Mikrowstrzeliwanie* polega na wprowadzaniu DNA w postaci kulek opłaszczonych złotem lub wolframem o średnicy 0,5 – 5 μm za pomocą

aparatu, tzn. strzelby genetycznej (wstrzeliwanie DNA) do komórek i tkanek roślinnych. Pierwszą rośliną otrzymaną przy użyciu tej metody był tytoń [11], jednak w większości przypadków stosowana jest ona do transformacji roślin jednoliściennych [24].

2. *Fragmenty DNA (geny) wprowadzane są bezpośrednio do protoplastów* stosując:

- elektroporację – DNA wprowadza się do protoplastów (komórki roślinne pozbawione ściany komórkowej) przy pomocy krótkotrwałych wysokonapięciowych impulsów elektrycznych wykorzystując generatory mikroimpulsów. Impulsy elektryczne wytwarzają w błonie komórkowej protoplastu pory przez które wnika DNA,
- glikol polietylenowy (PEG) - inkubacja protoplastów roślin z plazmidowym i nośnikowym DNA odbywa się w obecności PEG-u, który obniża napięcie powierzchniowe błony komórkowej protoplastu, dzięki czemu DNA przenika do wnętrza protoplastów. Efektywność tej metody wzrasta w obecności jonów magnezu.

3. *Makroiniekcja* – polega na wstrzykiwaniu wodnego roztworu zawierającego plazmid (z genem np. odporności na kanamycynę) w rozwijający się kwiatostan. Nasiona wytworzone przez traktowane rośliny są oceniane na podstawie odporności na ten antybiotyk. Metoda ta została zastosowana przez De la Pena i Schell'a [7].

4. *Mikroiniekcja* – polega na wprowadzeniu DNA bezpośrednio do jąder komórkowych. Zastosowana do transformowania protoplastów tytoniu i lucerny przez Reich i wsp. [17] dała ok. 15-25% transformantów. Rzadziej stosowana u roślin, częściej u zwierząt.

Dotychczas zmodyfikowano większość gatunków roślin użytkowych, dla których opracowano sposób regeneracji.

Cele i główne kierunki modyfikacji roślin

Modyfikacjom genetycznym poddawane są nie tylko gatunki roślin, które mają największe znaczenie gospodarcze, ale również rośliny wykorzystywane

w badaniach naukowych, które używano jako modelowe (rzodkiewnik, tytoń czy petunia) do poznania ekspresji genów przeniesionych z innych gatunków (np. od zwierząt).

Odporność na herbicydy

Jest to jedna z najbardziej rozpowszechnionych modyfikacji. Polega na wprowadzeniu do rośliny odporności na działanie totalnego herbicydu (np. Roundup), co umożliwia łatwą kontrolę zachwaszczenia pól uprawnych. Zmodyfikowane rośliny (soja, kukurydza, rzepak) posiadają geny: odpowiedzialne za produkcję enzymów rozkładających związek czynny - glifosatu danego herbicydu (np. gen GOX – kodujący enzym oksydoreduktazę glifosatu, który rozkłada ten związek lub gen EPSPS warunkujący odporność na ten herbicyd).

Odporność na szkodniki

Występująca w glebie bakteria *Bacillus thuringiensis* jest naturalnym biopestycydem, stosowanym do ochrony roślin w gospodarstwach ekologicznych. Zawiera ona bowiem, geny kodujące syntezę białek (Cry), toksycznych dla określonych owadów. Dzięki zastosowaniu inżynierii genetycznej możliwe było przeniesienie tych genów do roślin, co spowodowało, że stały się one odporne na szkodniki, przez co ograniczono konieczność chemicznej ochrony. Odporność typu Bt wprowadzono do wielu gatunków roślin uprawnych, np. ziemniak (odporny na stonkę ziemniaczaną), kukurydza (odporna na omacnicę prosowiankę), czy bawełna (odporna na kwieciana bawełnianego i słonecznicę amerykańską).

Odporność na choroby

Choroby roślin są spowodowane przez grzyby, bakterie i wirusy i stanowią one zagrożenie nie tylko obniżenia plonów, ale także dla zdrowia ludzi i zwierząt. Przykładem są grzyby z rodzaju *Fusarium* wytwarzające toksyczne mykotoksyny, które powodują zmiany w metabolizmie RNA. Genetycznie

zmodyfikowane rośliny odporne na choroby bakteryjne i grzybowe otrzymano po wprowadzeniu genów kodujących enzymy aktywne przy infekcji (rozkładające ścianę komórkową) np. glukanazy, chitynazy. Natomiast odporność na choroby wirusowe uzyskano po wprowadzaniu do roślin genów płaszcza wirusa. Genetycznie zmodyfikowane rośliny odporne na wirusy to: papaja, dynia, kawon, ziemniak i inne.

Odporność na niekorzystne warunki środowiska

Rośliny narażone są na negatywne działanie stresów abiotycznych: zasolenia, metali ciężkich, wysokich i niskich temperatur, suszę, które ograniczają możliwości uprawy roślin na terenach zdegradowanych. Ze względu na złożone mechanizmy odporności na stresy, otrzymano zmodyfikowane rośliny poprzez zwiększenie syntezy w roślinach proliny, mannitolu, glicerolu, betainy czy innych substancji o właściwościach osmoregulacyjnych, produkowanych w odpowiedzi na różne stresy. Otrzymano rośliny tytoniu, pomidora i ziemniaka o zwiększonej tolerancji na stres solny i mróz oraz ryż i tytoń odporny na suszę.

Poprawa lub nadanie nowych cech jakościowych

Genetyczne modyfikacje pozwalają na zmianę składu kwasów tłuszczowych w soi, rzepaku, poprzez zwiększenie zawartości kwasów nienasyconych. Wzbogacono również skład aminokwasowy białek u kukurydzy, podwyższając zawartość lizyny. Innym przykładem jest wytworzenie odmiany ryżu Golden Rice o zwiększonej dwudziestokrotnie zawartości prowitaminy A [19]. Odmianę tę otrzymano przez wprowadzenie dwóch genów: kodującego syntazę fitoenu (psy) i desaturazę karotenu (crtl). Inżynierię genetyczną wykorzystano także do obniżenia zawartości alkaloidów: kofeiny w kawie, czy nikotyny w tytoniu, jak również do zmiany barwy kwiatów i przedłużenia ich kwitnienia u roślin ozdobnych np. u goździka.

Pierwszą rośliną transgeniczną był pomidor odmiany Flavr Savr o opóźnionym dojrzewaniu, na skutek zablokowania ekspresji genu

odpowiedzialnego za aktywność poligalakturonazy. Odmiana ta została wprowadzona na rynek USA w 1994 roku.

Produkcja substancji wykorzystywanych w medycynie

Dzięki modyfikacjom genetycznym powiększa się spektrum produktów uzyskiwanych z roślin. Rośliny transgeniczne mogą wytwarzać szczepionki, przeciwciała chroniące przed różnymi chorobami, a także związki wykorzystywane w przemyśle. Rośliny mogą służyć do produkcji monoklonalnych przeciwciał, hormonów, witamin, które obecnie są wytwarzane przy użyciu komórek zwierzęcych. Dzięki temu ryzyko przeniesienia patogenów zostanie wyeliminowana, ponieważ nie istnieją choroby przenoszone z roślin na ludzi [20]. Ponadto, produkcja leków w roślinach na dużą skalę może być tańsza i łatwiejsza, np. produkcja ludzkiej insuliny przez bakterię *Echerichia coli* czy szczepionki przeciwko wirusowi HBV w sałacie.

Uprawa roślin transgenicznych na świecie

W roku 1996 rośliny transgeniczne uprawiane były na powierzchni 1,7 mln ha. W ciągu 10 lat areał uprawy wzrósł ponad 10-krotnie (102 mln ha). Wśród gatunków największą powierzchnię zajmuje soja (58,6 mln ha), następnie kukurydza (25,2 mln ha), bawełna (13,4 mln ha), rzepak (4,8 mln ha) i pozostałe gatunki < 0,1 mln ha (Tab. 1) [6].

Rośliny transgeniczne uprawiane są w większości na terenie Stanów Zjednoczonych (54,6 mln ha), w dalszej kolejności w Ameryce Południowej (31,5 mln ha), Kanadzie (6,11 mln ha), Indiach (3,8 mln ha) i Chinach (3,5 mln) i w pozostałych krajach (2,49 mln ha) (Tab. 2) [6].

Największy obszar wśród upraw roślin genetycznie zmodyfikowanych zajmują rośliny z wprowadzoną cechą tolerancji na herbicydy (68%). Znacznie mniej uprawia się roślin z wprowadzoną odpornością na owady (19%) oraz roślin, które posiadają obydwie te cechy – 13%.

Tab. 1. Powierzchnia upraw genetycznie zmodyfikowanych roślin na świecie 1996-2006 w [mln ha]

Rok	Soja	Kukurydza	Bawełna	Rzepak	Inne (pomidor, dynia, papaja)	Razem
1996	0,5	0,3	0,8	0,1	<0,1	1,7
1998	14,5	8,3	2,5	2,4	<0,1	27,8
2000	25,8	10,3	5,3	2,8	<0,1	44,2
2002	36,5	12,4	6,8	3	<0,1	58,7
2004	48,4	19,3	9	4,3	0,1	81
2006	58,6	25,2	13,4	4,8	-	102

Tab. 2. Powierzchnia uprawy roślin transgenicznych w wybranych krajach w 2006 roku w [mln ha]

Kraj	Areał uprawy	Genetycznie zmodyfikowane uprawy
USA	54,6	soja, kukurydza, bawełna, rzepak, dynia, papaja, lucerna
Argentyna	18,0	soja, kukurydza
Brazylia	11,5	soja, kukurydza
Kanada	6,11	rzepak, kukurydza, soja
Indie	3,8	bawełna
Chiny	3,5	bawełna
Paragwaj	2,0	soja
RPA	1,4	kukurydza, soja, bawełna
Inne kraje (Urugwaj, Filipiny, Australia, Rumunia, Meksyk, Hiszpania, Kolumbia, Francja, Iran, Honduras, Czechy, Portugalia, Niemcy, Słowacja)	1,09	soja, kukurydza, bawełna, ryż

Genetycznie modyfikowane zwierzęta i metody ich otrzymywania

Transgeniczne zwierzęta to takie, u których w wyniku zastosowania technik inżynierii genetycznej na trwałe, w sposób świadomy, zmieniono genotyp przez wprowadzenie nowego genu (genów), pochodzących od innego organizmu. Najczęściej stosowane są następujące metody uzyskiwania takich organizmów:

1. *Mikroiniekcja obcego DNA do jednego z przedjądrzy* zapłodnionej komórki jajowej (zygoty) lub jąder komórkowych zarodka dwublastomerowego. Następnie zarodek zostaje umieszczony w jajowodzie matki zastępczej. Jeżeli wprowadzony gen zostanie włączony do genomu przed rozpoczęciem podziałów zygoty, to we wszystkich komórkach zarodka obcy gen wykazuje ekspresję (znajduje się w tej samej pozycji genomu i w tej samej liczbie kopii).
2. *Zakażanie wczesnych zarodków* zrekombinowanym wirusowym wektorem jest szczególnie przydatne w odniesieniu do niższych kręgowców, zwłaszcza ryb.
3. *Mikroiniekcja obcego DNA do pierwotnych komórek zarodkowych ES* (ang. *embryo stem*), a następnie przeniesienie tej komórki do zarodka w stadium blastocysty. Powstałe z takich blastocyst dorosłe osobniki zawierają zarówno komórki oryginalnego zarodka jak i komórki ES z transgenem i mogą produkować komórki rozrodcze obu typów. Pierwszym zwierzęciem transgenicznym była mysz (z wprowadzonym genem wzrostu szczura), otrzymana przez Palmitera w 1980 roku [3].

Cele modyfikacji zwierząt

Prace nad transgenicznymi zwierzętami prowadzi się w celach naukowych i praktycznych. Zadania poznawcze dotyczą genetycznej kontroli systemów fizjologicznych u zwierząt i człowieka oraz opracowania podłoża genetycznych chorób. Natomiast cele praktyczne obejmują poprawę cech związanych z produktywnością zwierząt oraz możliwości wykorzystania produktów wytwarzanych przez zwierzęta w medycynie. Główne cele wytwarzania zwierząt transgenicznych to:

1. Szybszy przyrost masy ciała - uzyskuje się poprzez wprowadzenie genu odpowiedzialnego za produkcję hormonu wzrostu, np. do ryb (karp, łosoś) i zwierząt gospodarskich (świnie, króliki) oraz poprawa wydajności mlecznej krów, nieśności kur czy przyrostu wełny u owiec.
2. Zmiany jakościowe produktów zwierzęcych i polepszenie: jakości mięsa (włączenie genu ze szpinaku do zapłodnionej *in vitro* komórki jajowej świni, spowodowało zwiększenie zawartości kwasu oleinowego o 20% w mięsie wieprzowym); jakości mleka – obniżenie zawartości tłuszczu i podwyższenie białka, zmiana składu białek mleka umożliwiających szybsze uzyskanie serów (wprowadzenie genów kodujących białka: beta- i kappa- kazeinę); obniżenie zawartości cholesterolu w jajkach czy poprawa jakości wełny u owiec [18].
3. Poprawa odporności zwierząt na choroby i pasożyty (kury odporne na wirusa ptasiej grypy, krowy odporne na priony - wywołujące chorobę szalonych krów – BSE i inne).
4. Polepszenie trawienia i metabolizmu (lepsze wykorzystanie paszy).
5. Wykorzystanie zwierząt do celów biomedycznych to [10]:
 - uzyskiwanie białek w mleku zwierząt o znaczeniu farmaceutycznym - albumin, antytrombin, przeciwciał, hormonu wzrostu, interferonu, kolagenu, fibrynogenu itp.,
 - zastosowanie ksenogenicznych komórek i tkanek,
 - ksenotransplantacja organów.

Genetycznie modyfikowane mikroorganizmy

Mikroorganizmy zwane drobnoustrojami obejmują zwykle jednokomórkowe organizmy widoczne pod mikroskopem. Zaliczamy do nich: bakterie, pierwotniaki, glony i niektóre grzyby, a także organizmy, które nie są zdolne do samodzielnych procesów życiowych (przemiany materii), wskutek tego mogą się rozmnażać tylko wykorzystując metabolizm innych organizmów, a są to riketsje i wirusy.

Zgodnie z Dyrektywą 90/219/WE mikroorganizm oznacza każdą jednostkę komórkową lub niekomórkową zdolną do replikacji lub przenoszenia materiału genetycznego, łącznie z wirusami, wiroidami, komórkami zwierzęcymi i roślinnymi w kulturach. Termin genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy (GMM) oznacza mikroorganizmy, w których materiał genetyczny został zmieniony w sposób niezachodzący w naturze, przy użyciu inżynierii genetycznej. W przypadku mikroorganizmów stosowane są następujące techniki:

- wprowadzanie genów przy użyciu wektorów np. plazmidów bakteryjnych (lub innych nośników) i włączanie ich do komórki gospodarza,
- bezpośrednie wprowadzanie do mikroorganizmów materiału genetycznego, przy zastosowaniu mikroiniekcji, makroiniekcji lub mikrokapsułkowania,
- łączenie komórek lub hybrydyzacja, czyli tworzenie nowych komórek.

Wykorzystanie zmodyfikowanych mikroorganizmów

Różnorodność wśród mikroorganizmów stwarza ogromne możliwości wykorzystania ich w przemyśle biotechnologicznym do [2, 5]:

- wytwarzania białek człowieka przez bakterie zmodyfikowane genetycznie. Do produkcji ludzkiej insuliny zastosowano zmodyfikowane szczepy bakterii *E. coli*. Podobnie bakteria ta jest wykorzystywana do wytwarzania innych białek (np. hormonu wzrostu),
- produkcji antybiotyków, aminokwasów i witamin przez bakterie i grzyby, które poddane są odpowiednim modyfikacjom genetycznym, a następnie wykorzystywane do wytwarzania leków, pozyskiwanych łatwymi metodami, gdyż ich inkubacja odbywa się w warunkach zamkniętych,
- wytwarzania nowych szczepionek przez zmodyfikowane organizmy staje się coraz powszechniejsze. Podobnie jak białka człowieka, również białka wirusów mogą być produkowane przez bakterie zmodyfikowane,
- zastosowania mikroorganizmów do opracowywania nowych metod w terapii genowej,

- produkcji nowych detergentów - niektóre mikroorganizmy genetycznie zmodyfikowane mają zdolność do syntezy enzymów (proteaz, lipaz), przydatnych do produkcji lepszych, biodegradowalnych detergentów,
- wytwarzania elektrod przez genetycznie zmodyfikowane wirusy,
- wykorzystania bakterii do uzyskiwania roślin odpornych na szkodniki.

Rośliny odporne na szkodniki zawierają białko owadobójcze Cry pochodzące z bakterii *Bacillus thuringiensis*. Do przeniesienia sklonowanego genu Bt wykorzystano m.in. plazmid Ti z innej bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Obecnie na szeroką skalę tworzone są rośliny transgeniczne należące do różnych gatunków, zawierające odporność na szkodniki.

Mikroorganizmy znajdują szerokie zastosowanie w badaniach teoretycznych do opracowywania wielu procesów metabolicznych. Enzymy izolowane z bakterii umożliwiają cięcie i łączenie DNA w probówce, jak również do namnażania wybranych genów w dowolnych ilościach [16].

Metody identyfikacji GMO

Identyfikacja organizmów genetycznie zmodyfikowanych polega na wykryciu genów, bądź ich fragmentów. Identyfikację GMO można również przeprowadzić poprzez wykrywanie produktów ekspresji tych genów, np. białek specyficznych czy zwiększonego stężenia białek.

Składowymi konstruktów genowych, którym najpierw transformowana jest komórka *Agrobacterium*, a następnie komórki roślinne, są 25-nukleotydowe sekwencje obu końców T-DNA i zawarty między nimi transgen oraz roślinny marker selekcyjny. Na zewnątrz sekwencji T-DNA znajdują się także bakteryjny gen replikacji *ori* i bakteryjny marker selekcyjny.

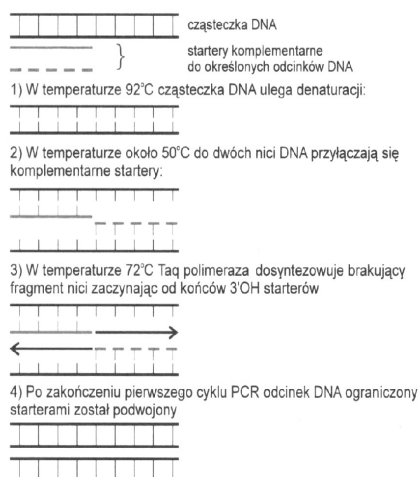
Do genomu roślinnego zostaje wbudowana tylko część konstruktów, czyli transgen oraz marker selekcyjny. Transgen przy wektorowej i bezwektorowej transformacji, składa się z: promotora, sekwencji kodującej oraz terminatora. Najczęściej u roślin promotorem jest wirus mozaiki kalafiora CaMV 35S, zaś u zwierząt wirus wakuolizujący małp SV40. Znając elementy transgenów oraz gen markerowy możemy zidentyfikować organizmy transgeniczne.

Metody identyfikacji GMO dzieli się na:

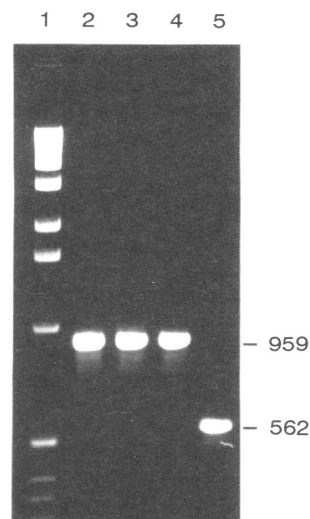
a. METODY OPARTE NA ANALIZIE DNA

- jakościowa analiza DNA – wskazująca na obecność/nieobecność poszukiwanej sekwencji w próbce oraz analiza ilościowa DNA określająca jego ilość w danej próbce.

Najczęściej w praktyce stosowane są metody oparte na Łańcuchowej Reakcji Polimerazy (PCR), polegające na powieleniu (amplifikacji) wybranych odcinków DNA *in vitro*, przyłączaniu starterów (primerów) i syntezie nowych nici DNA przez polimerazę termostabilną. Starterami są oligonukleotydy, składające się z ok. 20 par zasad, które wiążą się specyficznie z określonym miejscem na jednoniciowej matrycy. Replikacja rozpoczyna się od starterów na każdej nici i zachodzi w przeciwnych kierunkach. Cykl ten powtarza się wielokrotnie, w celu powielenia specyficznych fragmentów DNA, występujących w produkcie pochodzącym z organizmu genetycznie zmodyfikowanego (np. promotor CaMV 35S) i wykrycie poszukiwanej sekwencji w ilości umożliwiającej zidentyfikowanie produktu podczas reakcji elektroforezy na żelu agarozowym w postaci prążka o określonej masie cząsteczkowej [15] (Rys.4 i 5).



Rys. 4. Schemat reakcji PCR [13]



Rys. 5. Analiza PCR [22]

Po stwierdzeniu obecności jednej lub kilku modyfikacji genetycznych, kolejnym etapem badania jest określenie ich ilościowej zawartości w próbce. W tym celu wykorzystuje się dwie zmodyfikowane techniki PCR: kompetytywne PCR i PCR w czasie rzeczywistym. Metody te pozwalają na określenie zależności pomiędzy stężeniem matrycowego DNA, a ilością produktów PCR powstałych podczas amplifikacji. Zasada kompetytywnego PCR polega na jednoczesnym powielaniu znanej ilości standardu DNA, tzn. kompetytora i badanego DNA (matrycowego) - oba DNA posiadają takie same miejsca wiązania startera. Zakładając, że wydajność amplifikacji jest taka sama, to stosunek ilości produktów PCR odpowiada stosunkowi matrycowego DNA i standardu DNA w próbce przed reakcją.

Dokładniejszą techniką częściej stosowaną jest PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR), w której analizowany jest przyrost produktu w czasie rzeczywistym (ilość kopii badanej cząsteczki kwasu nukleinowego jest monitorowana w każdym cyklu reakcji amplifikacji i jest związana z emisją sygnału fluorescencyjnego proporcjonalnego do ilości produktu generowanego w każdym cyklu reakcji). Do analizy przyrostu ilości produktu w reakcji PCR używa się wyznakowanych fluorescencyjnie starterów (sond). Ilość GMO w próbce, przy zastosowaniu PCR w czasie rzeczywistym, jest określona, jako stosunek ilości sekwencji charakterystycznych dla GMO do ilości sekwencji referencyjnych w badanym materiale. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym obejmuje: dwa systemy do detekcji sekwencji; charakterystycznych dla GMO i referencyjnych; krzywe standardowe dla obu sekwencji i odpowiednie kontrole reakcji (np. pozytywna kontrola DNA, negatywna kontrola DNA, kontrola inhibicji PCR) [23].

Inną metodą, którą można zastosować do identyfikacji GMO jest hybrydyzacja kwasów nukleinowych metodą Southern. Technika ta polega na związaniu wyznakowanej radioaktywnie lub chemicznie (przyłączenie digoksygeniny lub biotyny) cząsteczki DNA (sondy) do komplementarnej cząsteczki w analizowanej próbce. Wstępny etap to rozdział danej mieszaniny fragmentów DNA w żelu agarozowym. Następnie przeniesienie fragmentów z żelu na filtr nylonowy (czasem nitrocelulozowy), umożliwiającą hybrydyzację

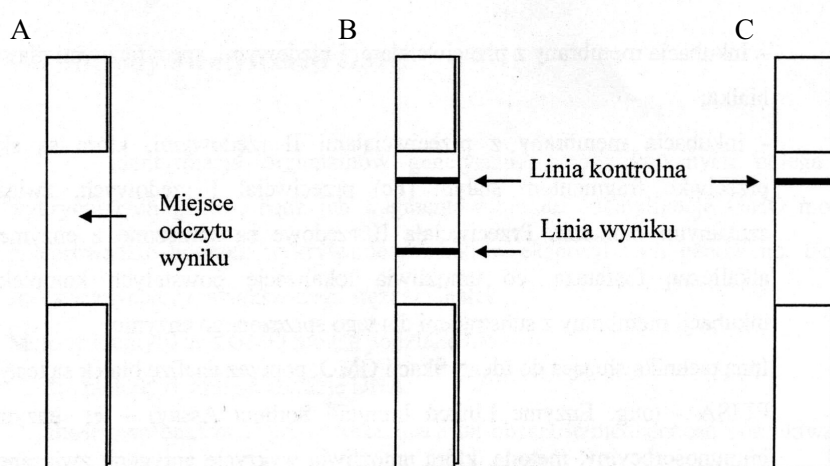
z sondą na zasadzie komplementarności i detekcja sondy związanej z komplementarną cząsteczką DNA. Jeżeli sonda była znakowana radioaktywnie, to należy przeprowadzić autoradiografię, a jeżeli barwiona chemicznie to przeprowadza się reakcję wykrywania digoksygeniny lub biotyny.

b. METODY OPARTE NA ANALIZIE BIAŁEK

- jakościowa analiza białek (immunodetekcja) – wskazująca na obecność/nieobecność specyficznego białka i ilościowa – umożliwiająca ustalić ilość białka produkowanego przez wprowadzony gen. Wśród metod wykrywania GMO wykorzystujących analizę białek można wyróżnić technikę Western Blot, w której wykorzystuje się przeciwciała do analizy białek rozdzielonych wcześniej w żelu poliakrylamidowym. Metoda ta polega na: przeniesieniu (transferze) rozdzielonych wcześniej białek z żelu na specjalną membranę, zablokowaniu pozostałych jeszcze na membranie miejsc wiązania białek, inkubację membrany z przeciwciałami I rzędowymi, specyficznymi dla szukanego białka i inkubację membrany z przeciwciałami II rzędowymi, które są skierowane przeciwko fragmentom stałym (Fc) przeciwciał I rzędowych, związanych z szukanymi białkami. Przeciwciała II rzędowe są sprzężone z enzymem np. z alkaliczną fosfatazą, co umożliwia lokalizację powstałych kompleksów, po inkubacji membrany z substratami dla sprzężonego enzymu.

Inną techniką służącą do identyfikacji GMO za pomocą analizy białek są testy ELISA, które umożliwiają wykrycie antygeny związanej przez specyficzne przeciwciała, dzięki reakcji barwnej katalizowanej przez enzym - metoda detekcji i w niektórych testach zmierzenie zawartości „nowego” białka produkowanego przez GMO - ocena ilościowa produktu. Testy paskowe oparte na białkach są praktyczne, szybkie w przeprowadzeniu, łatwe w odczycie oraz dostępne na rynku w postaci zestawów do wykrywania konkretnych modyfikacji (kukurydza, soja, rzepak, bawełna, burak cukrowy). Interpretacja wyniku jest łatwa, gdy na pasku pojawia się jeden prążek tzw. prążek kontrolny oznacza to, że wynik analizy jest negatywny. Gdy na pasku pojawiają się dwa prążki, wynik testu jest pozytywny [12] (Rys. 6).

Wynik pozytywny reakcji wskazuje na obecność GMO w ilości np. > 0,9% w zależności od czułości testu. Zestawy do detekcji zostały zaprojektowane w ten sposób by wykryć specyficzne białko charakterystyczne dla danej modyfikacji. Przykładowo testy ELISA stosowane są do wykrywania modyfikacji genetycznej w produktach rolniczych pochodzenia roślinnego, takich jak: soja, rzepak, kukurydza, są to testy diagnostyczne typu Trait™.



Rys. 6. Test ELISA: A-pasek, B - wynik pozytywny, C –wynik negatywny

Obecnie wykorzystywane są następujące rodzaje testów:

- dla wszystkich typów modyfikacji typu Bt (np. YieldGard^R, NatureGard^R, Maximizer^R i typu Star LinkTM) – dla kukurydzy,
- typu LibertyLinkTM – dla rzepaku,
- typu Roundup ReadyTM – dla soi.

Zastosowanie tych metod zależy od tego, jaki materiał jest analizowany. Świeży materiał lub częściowo przetworzony może być testowany za pomocą każdej z opisanych metod. Test ELISA charakteryzuje się mniejszą czułością w porównaniu do technik PCR, które umożliwią wykrycie niewielkiej zawartości obcego DNA, zwłaszcza przy identyfikacji transgeniczności w produktach

żywnościowych, poddanych obróbce technologicznej. W tym przypadku powinno się jednak zastosować obie techniki – analizę kwasów i białek, wówczas otrzymany wynik będzie bardziej wiarygodny.

Podsumowanie

W pracy przedstawiono metody stosowane przy tworzeniu organizmów genetycznie modyfikowanych (roślin, zwierząt i mikroorganizmów), cele modyfikacji u tych organizmów oraz ich znaczenie teoretyczne i praktyczne. Przeanalizowano również części składowe transgeny, w zależności od zastosowanej metody wprowadzania genów do komórek oraz wykorzystania go do identyfikacji organizmów genetycznie modyfikowanych. Następnie opisano techniki oparte na analizie kwasów nukleinowych i immunodetekcji białek, służące do wykrywania transgeniczności w produktach żywnościowych.

Wszystkie zaprezentowane metody umożliwiają wykrycie tylko znanych, określonych modyfikacji lub konkretnego elementu (promotora, terminatora, genu), jeśli ten sam znajduje się w różnych modyfikowanych produktach. Natomiast żadna z tych technik nie pozwoli określić, czy dany produkt jest wolny od GMO, jeśli wprowadzone modyfikacje są nieznane.

W przypadku produktów poddanych obróbce technologicznej, wiele metod bardzo czułych zawodzi, ponieważ badane kwasy nukleinowe czy białka mogą być zdegradowane.

Literatura

1. Bednarski W., Rejs A.: *Biotechnologia żywności*. WNT, 2003, Warszawa.
2. Bednarski W., Fiedurek J.: *Podstawy biotechnologii przemysłowej*. WNT, 2007, Warszawa.
3. Bishop J.: *Ssaki transgeniczne*. PWN, 2001, Warszawa.
4. Chan M.T., Chang H.H. Ho S.L., Tong W.F., Yu S.M.: *Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene*. *Plant Mol. Biol.*, 1993, 22, 491-506.

5. Chmiel A., Grudziński S.: *Biotechnologia i chemia antybiotyków*. PWN, 1998, Warszawa.
6. Clive J.: *Global status of commercialised transgenic crops: ISAAA Briefs*, 32, 2006, Ithaca, NY, USA.
7. De la Pena A.L.H., Schell J.: Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature*, 1987, 325, 274-276.
8. Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A.: *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 1992, 19 15-38.
9. Horsch R.B.: Transgenic crops. Induced mutations and molecular techniques for crop improvement. *Proceeding of Symposium Vienna*, 19-23 June 1995, 357-369.
10. Houdebine L.M.: Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol. Biol.*, 2006, 360, 163-202.
11. Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Samford J.C.: High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 1987, 327, 70-73.
12. Kłyszewko-Stefanowicz L.: *Ćwiczenia z biochemii*. PWN, Warszawa: 2003, 306 – 331.
13. Kofta W.: *Podstawy inżynierii genetycznej*. Wyd. Pruszyński i Sp., 1997, Warszawa.
14. Malepszy S.: *Biotechnologia roślin*. PWN, 2001, Warszawa.
15. McHughen A.: *Żywność jakość technologia*. WNT, 2004, Warszawa.
16. Platt J.L.: New risks, new gains. *Nature*, 2000, 407, 27-30.
17. Reich T.J., Iyer V.N., Miki B.L.: Efficient transformation of alfa protoplast by intranuclear of Ti plasmids. *Bio/Technol.* 1986, 4, 1001-1004.
18. Rosochacki S.: Problemy bezpieczeństwa związane z transgenezą zwierząt. w: *Biotechnologia zwierząt*. (red. Zwierzchowski L., Jaszczaka K, Modliński J.A.), PWN, 1997, Warszawa.
19. Szopa J., Kostyń K.: Kultury komórkowe i rośliny transgeniczne w biotechnologii. *Biotechnologia*, 2006, 4(75), 7-17.

20. Szpitter A., Królicka A.: Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia*, 2005, 4(71), 82-108.
21. Twardowski T., Zimny J., Twardowska A.: *Biobezpieczeństwo biotechnologii*. Wyd. Edytor, 2003, Poznań.
22. Słomski R., Kwiatkowska J., Chlebowska H.: *Diagnostyka molekularna. w: Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*. Wyd. Sorus, 1996, Poznań.
23. Weighardt F.: *Badanie próbek żywności na obecność GMO. Wykrywanie GMO metodą ilościowego PCR. Materiały informacyjne na warsztaty dla pracowników laboratoriów kontroli GMO organizowany w ramach realizacji projektu UNEP/GEF nr GFL/2716-02-4531 „Wsparcie krajowych norm bezpieczeństwa biologicznego w Polsce”*. 2005.
24. Zimny J.: *Systemy transformacyjne w kulturach *in vitro*, a transformacje u roślin zbożowych*. Monografia IHAR: 1997, 1-8.

6. Wykorzystanie kompletnej chromatografii gazowej (GCxGC) do analizy lotnych produktów utleniania lipidów

HENRYK JELEŃ

Wstęp

Chromatografia gazowa jest podstawowym narzędziem do badania związków zapachowych żywności. Związki te, to najczęściej substancje lotne o ciężarze cząsteczkowym do 300 Da, w dużej części hydrofobowe, tak więc chromatografia gazowa jest metodą separacji predestynowaną do tego typu analiz. Sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas, jako metodą identyfikacji związków zapachowych żywności stało się podstawowym narzędziem do ich badania.

Jednowymiarowa chromatografia gazowa, której początki datuje się na lata 40-te, pomimo niezaprzeczalnych zalet, w przypadku rozdziałów bardzo złożonych mieszanin wykazuje ograniczenia związane głównie z pojemnością pików układu chromatograficznego, czego konsekwencją jest koelucja składników. Technika, która pozwala na zwiększenie pojemności układu jest chromatografia dwuwymiarowa.

Terminem dwuwymiarowej chromatografii gazowej określa się często zarówno technikę opartą na przenoszeniu selektywnym określonej frakcji z jednej kolumny na drugą (2D-GC), jak i chromatografię kompletną, gdzie wszystkie związki przenoszone są z jednej kolumny na drugą, o innym mechanizmie rozdziału (GCxGC).

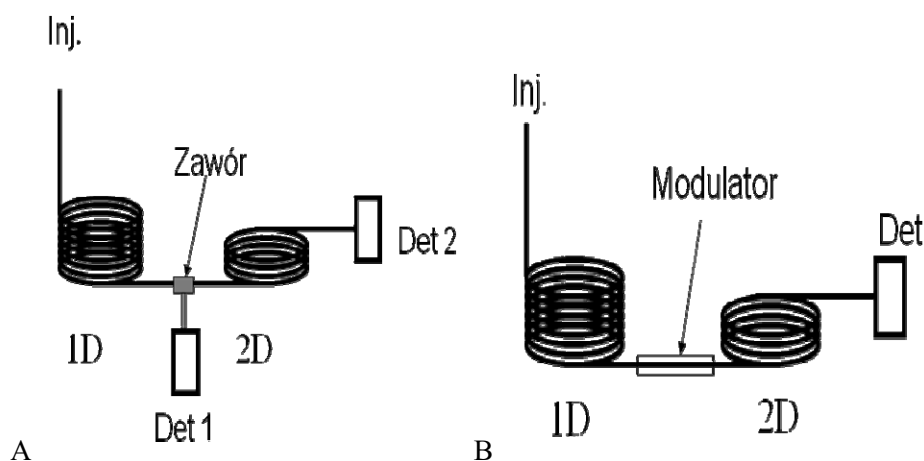
2D-GC a GCxGC

Pierwsze doniesienia literaturowe na temat chromatografii gazowej dwuwymiarowej (2D-GC) pojawiły się w końcu lat 50-tych [1]. Zasada tej techniki opiera się na „wycinaniu” określonych, wybranych frakcji związków rozdzielonych na pierwszej kolumnie za pomocą zaworu i przeniesienie jej na drugą kolumnę o odmiennym mechanizmie retencji (*ang. heart cutting*). Zarówno pierwsza jak i druga kolumna w chromatografii 2D-GC to kolumny o zbliżonej średnicy i długości, lecz o odmiennym mechanizmie retencji. Wykorzystywane są dwa detektory, często o odmiennym mechanizmie detekcji monitorowania eluatu przenoszonego z kolumny na kolumnę (Rys. 1A). Bardzo częstą kombinacją w analizie związków zapachowych żywności jest zestaw kolumn niepolarna-polarna, lub – szczególnie w analizie aromatów i olejków eterycznych, kombinacja kolumny niepolarniej lub polarnej z kolumną chiralną. Początkowo chromatografia 2D-GC zazwyczaj realizowana była w układach dwupieczowych, obecnie za sprawą zaworów typu Deans Switch jest powszechnie stosowana z użyciem jednego pieca. Ogranicza to możliwości separacyjne (jedna temperatura dla obydwu kolumn), jest jednak rozwiązaniem o wiele tańszym i mniej skomplikowanym od systemów dwupieczowych. Aplikacje 2D-GC w analizie związków zapachowych żywności obejmują analizę kluczowych związków zapachowych dla tworzenia aromatów lub obcych zapachów produktów, a także w ocenie autentyczności aromatów/olejków eterycznych badanych poprzez analizę enancjoselektywną ich składników [2].

W chromatografii dwuwymiarowej 2D-GC na wyjściu z pierwszej kolumny instalowany jest zawór do przekierowywania eluatu na drugą kolumnę, oraz detektor monitorujący elucję na pierwszej kolumnie. Drugi detektor umieszczony jest na drugim końcu kolumny. Możliwe jest więc także zwiększenie selektywności analizy poprzez wybór detektora selektywnego typu ECD lub NPD na drugiej kolumnie.

Kompletna, dwuwymiarowa chromatografia gazowa (GCxGC) opiera się na transferze wszystkich związków, a nie tylko wybranych frakcji, eluujących z pierwszej kolumny na drugą, o odmiennym mechanizmie retencji [3]. Aby umożliwić całkowity transfer związków z pierwszej kolumny na drugą, bez

pogorszenia efektów separacji osiągniętych na pierwszej kolumnie, pomiędzy kolumnami niezbędne jest zastosowanie modulatora, a nie zaworu (Rys.1B).



Rys. 1. Schemat konfiguracji zestawu do analizy techniką: A - dwuwymiarowej chromatografii gazowej (2D-GC), B - kompletnej, dwuwymiarowej chromatografii gazowej (GCxGC)

Aby nie doszło do koelucji analitów na drugiej kolumnie czas przeznaczony na analizę w drugim wymiarze musi być krótki, co za tym idzie druga kolumna jest kolumną o długości zazwyczaj 1-3 metrów i zazwyczaj średnicy 100 μm . Warunkiem koniecznym prowadzenia rozdzielów za pomocą GCxGC jest ortogonalność – zróżnicowanie mechanizmów retencji. Pomiedzy kolumnami znajduje się modulator pozwalający na zbieranie frakcji z kolumny I oraz ich okresowe dozowanie na kolumnę II, z częstotliwością taką, by pasma nie łączyły się ponownie w modulatorze. Modulator w równych interwałach zbiera materiał eluujący z kolumny I, a następnie kieruje na drugą kolumnę. Proces ten odbywa się przez cały czas analizy. Właśnie rozwój modulatorów był kluczowym dla rozwoju tej techniki [4]. Uważa się rok 1991 za początek kompletnej dwuwymiarowej chromatografii gazowej. Piki eluujące z drugiej kolumny mają małą szerokość, rzędu kilkudziesięciu do kilkuset milisekund. W praktyce, w wyniku działania modulatora, związek opuszczający kolumnę I zostaje „pocięty” na kilka pasm, dających na kolumnie II bardzo wąskie piki. Przy

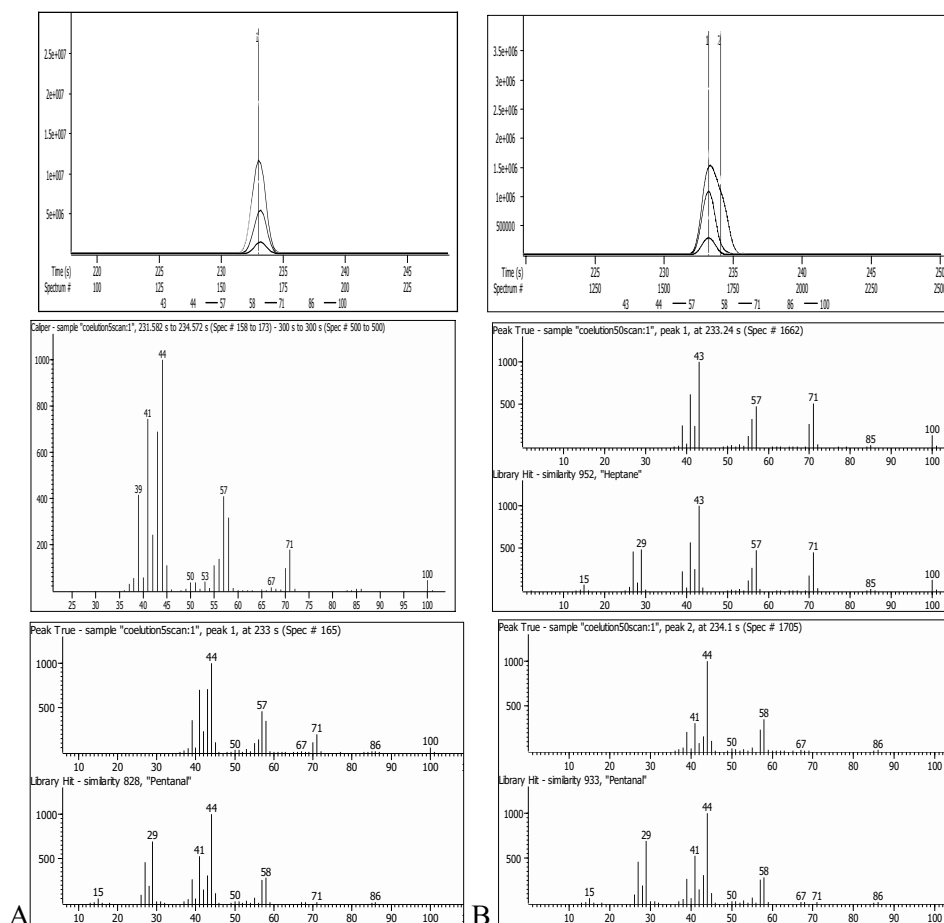
koeluujących w pierwszym wymiarze (kolumnie I) związkach, z kolumny II eluują naprzemiennie piki tych związków, gdzie każdy zazwyczaj podzielony jest na kilka modulacji (pasm). Rekonstruowane chromatogramy pików po elucji z układu GCxGC przypominają chromatograf płytki TLC rozwijanej w dwóch kierunkach. Podstawową zaletą kompletnej dwuwymiarowej chromatografii gazowej jest zwiększona pojemność pików układu, co znacznie poprawia rozdzielczość, zmniejszając ryzyko koelucji związków. Kompresja pasm chromatograficznych, związana z modulacją pików powoduje znaczny wzrost sygnału do szumu eluujących związków. Pojemność pików układu GCxGC może wynosić nawet 9.000 w porównaniu do około 300 w jednowymiarowej chromatografii gazowej, lub 800 w technice *heart-cutting* (2D-GC) przy 3 transferach. Stwarza to znacznie lepsze perspektywy w analizie złożonych mieszanin związków lotnych, zarówno w oznaczaniu składu paliw, na potrzeby analizy, których powstały pierwsze aplikacje GCxGC, jak i w analizie składników żywności, w szczególności związków zapachowych.

Detekcja w GCxGC

Generowanie wąskich pików, eluujących z drugiej kolumny, stwarza wysokie wymagania dla detektora, który musi zapewnić odpowiednią szybkość próbkowania, by każdy z pików był opisany dostatecznie dużą liczbą punktów. W praktyce, w układach GCxGC wykorzystuje się detektory płomieniowo – jonizacyjne (FID) lub wychwyty elektronów (ECD), które zazwyczaj mogą pracować z częstotliwością do 200Hz. Znacznie trudniejszym detektorem do zastosowania w układzie GCxGC jest spektrometr masowy. Najbardziej rozpowszechnione spektrometry mas – z analizatorem kwadrupolowym, są aparatami skanującymi, gdzie szybkość przemiatania widma (scan) zależy od zakresu mas. W praktyce przy zakresie mas rzędu 400 Da szybkość skanowania wynosi kilku skanów na sekundę. W standardowym połączeniu chromatografii gazowej ze spektrometrią mas, gdzie piki mają szerokość rzędu kilku sekund daje to kilkanaście lub więcej skanów na pik, co w zupełności wystarczy zarówno do identyfikacji związku, jak i analizy ilościowej. Dla pików eluujących z drugiej kolumny w GCxGC, których szerokość wynosi zazwyczaj

około 100 ms, szybkość zbierania danych powinna być rzędu co najmniej 50 skanów na sekundę. Ponieważ instrumenty kwadrupolowe w dużym zakresie mas z reguły nie generują widm tak szybko, praktycznie jedynym spektrometrem mas nadającym się do tego celu jest spektrometr czasu przelotu (ToF), gwarantujący szybkość zbierania danych rzędu 100 a nawet 500 widm na sekundę. Ponieważ spektrometr czasu przelotu (ToF) nie jest aparatem skanującym, to szybkość generowania widm jest prawie niezależna od zakresu mas. Szybkie generowanie widm w spektrometrze mas używanym jako detektor w GCxGC spełnia dwa główne zadania – oprócz wymienionego powyżej szybkiego próbkowania pików opuszczających drugą kolumnę powoduje, że duża liczba widm w obrębie pików umożliwia dokładną dekonwolucję widm koeluuujących związków. Dekonwolucja widm masowych jest procesem „rozplątywania” złożonych widm powstających w wyniku detekcji w spektrometrze mas jonów z koeluuujących pików. W programach do dekonwolucji odbywa się to w dużym uproszczeniu poprzez porównanie czasów, w których eluują wierzchołki poszczególnych jonów składających się na widmo masowe. W praktyce wykorzystuje się nie czas, a numer skanu, który potem jest transformowany na czas retencji. Oprócz czasu retencji danego jonu brany jest pod uwagę kształt poszczególnych jonów (pików wyekstrahowanych jonów). Jony eluujące dokładnie w tym samym czasie i mające ten sam kształt zostają na siebie nałożone tworząc widmo związku. Niepasujące do tego widma jony, stanowią kolejny pik koeluuującej substancji lub zanieczyszczenia. Spośród programów do dekonwolucji widm najbardziej znanym jest Amdis wchodzący w skład biblioteki widm masowych NIST (National Institute of Standards and Technology). Proces dekonwolucji jest niezbędnym narzędziem do identyfikacji koeluuujących pików, co ma fundamentalne znaczenie w jednowymiarowej chromatografii gazowej, istotne jest także w chromatografii dwuwymiarowej, zwiększając możliwość poprawnej identyfikacji i rekonstrukcji pików eluujących z drugiej kolumny. Dla poprawnej dekonwolucji pików najistotniejszym jest duża szybkość skanowania umożliwiająca uzyskanie odpowiedniej liczby widm w obrębie pików. Uważa się, że szybkość generowania widm od około 50 widm/sek wystarcza do dekonwolucji widm uzyskanych w spektrometrach typu ToF. Może to w decydujący sposób wpływać na poprawną identyfikację

związków. Zjawisko to ilustruje przykład zamieszczony na rysunku 2, gdzie pokazano wpływ szybkości skanowania na jakość widm.



Rys. 2. Chromatogramy koeluujących pików heptanu i pentanal przy szybkości akwizycji widm: A - 5 widm/sek, B - 50 widm/sek.

Na rysunku 2, chromatogram A przedstawia koelujące piki heptanu i pentanal (kolumna DB-5MS). Widmo uzyskano przy szybkości akwizycji widm 5 widm/sek. Algorytm dekonwolucji zidentyfikował jeden związek, którego

widmo przedstawiono poniżej i po porównaniu z biblioteką, związek ten został zidentyfikowany jako pentanal (podobieństwo z widmem biblioteki NIST = 828). Chromatogram B (Rys. 2) przedstawia tą samą mieszaninę analizowaną z szybkością 50 widm/sek. Algorytm dekonwolucji zidentyfikował prawidłowo dwa związki: heptan i pentanal (podobieństwo z biblioteką NIST odpowiednio 952 i 933). Spektrometr mas Pegasus 4D (LECO), oprogramowanie do dekonwolucji Chromatof 3.21.

W wypadku spektrometrów z analizatorem czasu przelotu fundamentalne znaczenie dla dekonwolucji ma fakt, że widma są jednorodne (mają taką samą intensywność poszczególnych jonów) w obrębie całego piku. Niejednorodność widm w obrębie piku generowana w spektrometrach kwadrupolowych nosi nazwę „spectra tilting” i musi być w procesie dekonwolucji korygowana.

Wykorzystanie kompletnej dwuwymiarowej chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GCxGC-ToF-MS) do charakterystyki lotnych produktów utleniania kwasów tłuszczowych w makaronach „instant”.

Uznaje się, że analiza związków lotnych powstających w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych jest dobrą i obiektywną metodą oceny jakości tłuszczów i stabilności oksydacyjnej produktów [5]. Lotne produkty utleniania lipidów, w szczególności kwasów tłuszczowych, to duża grupa związków o zróżnicowanym charakterze, wśród których dominują alkanale i alkadienale oraz ketony. Powstają one z rozpadu wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych generowanych zarówno w procesie utleniania wolnorodnikowego, jak i fotosensybilizowanego [6]. W zależności od profilu kwasów tłuszczowych produktu, profil związków zapachowych będący wynikiem oksydacji kwasów tłuszczowych może być różny. Wśród lotnych produktów utleniania kwasów tłuszczowych bardzo często, jako markera tych procesów używa się heksanal, będącego produktem utleniania kwasu linolowego. W większości produktów spożywczych ulegających oksydacji heksanal obecny jest w największej ilości spośród lotnych związków, będących produktami utleniania kwasów tłuszczowych. Z uwagi na zróżnicowane progi wyczuwalności sensorycznej lotnych produktów utleniania lipidów zasadne jest monitorowanie jak

największej ich liczby. Wiele ze związków lotnych powstających w procesie oksydacji kwasów tłuszczowych nie ma znaczenia sensorycznego z uwagi na wysokie progi wyczuwalności sensorycznej. Przykładem mogą być węglowodory alifatyczne, których progi wyczuwalności sensorycznej zamykają się w granicach 90-2150 ppm. Alkeny charakteryzują się progami rzędu 0.02-9 ppm, natomiast aldehydy cechują się znacznie niższymi progami wyczuwalności sensorycznej. Progi wyczuwalności sensorycznej (OT) dla alkanali wynoszą 0.04 – 1 ppm, alkadienale w zależności od położenia i konfiguracji podwójnych wiązań charakteryzują OT rzędu 0.3 – 0.002 ppm – najniższe dla trans, cis-2,4-alkadienali [7]. Poznanie pełnego profilu lotnych produktów utlenienia kwasów tłuszczowych jest istotne dla charakterystyki kluczowych związków odpowiedzialnych za aromat produktu.

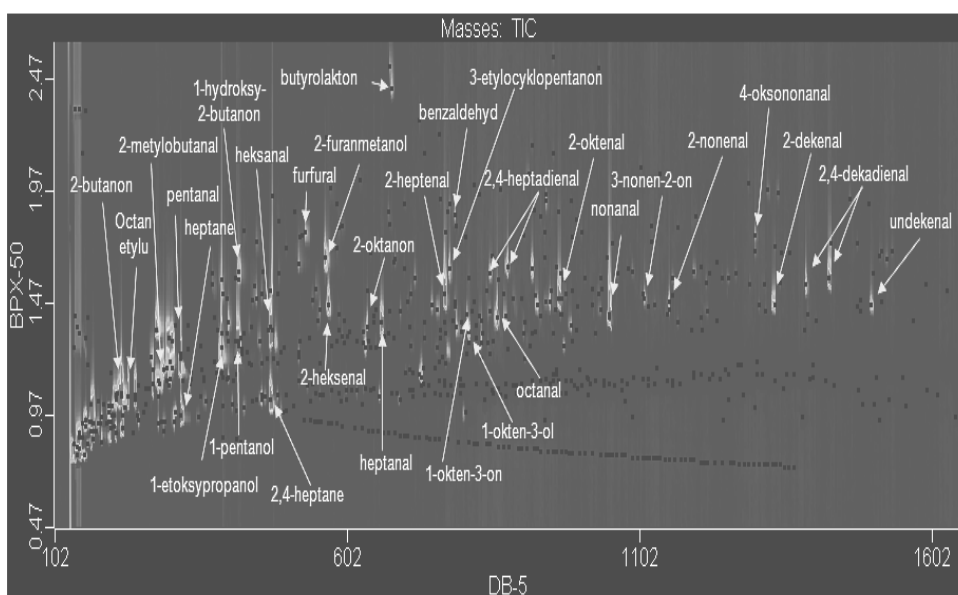
GCxGC w profilowaniu związków lotnych generowanych w czasie procesu technologicznego

Kompletna chromatografia gazowa jest narzędziem umożliwiającym porównywanie profilu analizowanych związków poprzez odejmowanie jednego chromatogramu od drugiego. Rysunek 3 przedstawia chromatogram będący efektem odjęcia chromatogramu reprezentującego próbkę ciasta po parowaniu przed smażeniem od chromatogramu próbki po smażeniu. Zaznaczono dominujące związki lotne, będące wynikiem procesu smażenia. Dobór kolumny DB-5 i BPX-50 umożliwił rozdział związków według temperatury wrzenia (DB-5) i polarności (BPX-50). Ponadto związki będące produktami utleniania lipidów – w większości polarne, zostały efektywnie rozdzielone od węglowodorów alifatycznych oraz upływu fazy z kolumny (przedstawionych na chromatogramie jako ciągi pików w postaci czarnych punktów, niżej – siloksany pochodzące z fazy, powyżej nich węglowodory).

Separacja pików w oparciu o różnice w polarności umożliwiła rozdzielenie np. pentanal od heptanu (obydwa związki na kolumnie DB-5 koeluują - mają indeksy retencji wynoszące odpowiednio 701 i 700). Chromatografia jednowymiarowa lotnych produktów utleniania kwasów tłuszczowych pozwala na oznaczenie zazwyczaj około 60-80 związków. Analiza tych samych

związków techniką GCxGC-ToF MS z dekonwolucją eluujących pików daje od 800-1800 pików.

Część z nich to ciągi pików pochodzących z upływu fazy w kolumnie (*ang. column bleed*), możliwe jest także generowanie kilku pików dla jednego związku powstających w wyniku nakładania pasm. Większość pików to efekt dekonwolucji. Dekonwolucja pików powoduje dużą ilość danych generowanych w czasie przebiegu chromatograficznego, utrudniającą czasami interpretację chromatogramów.

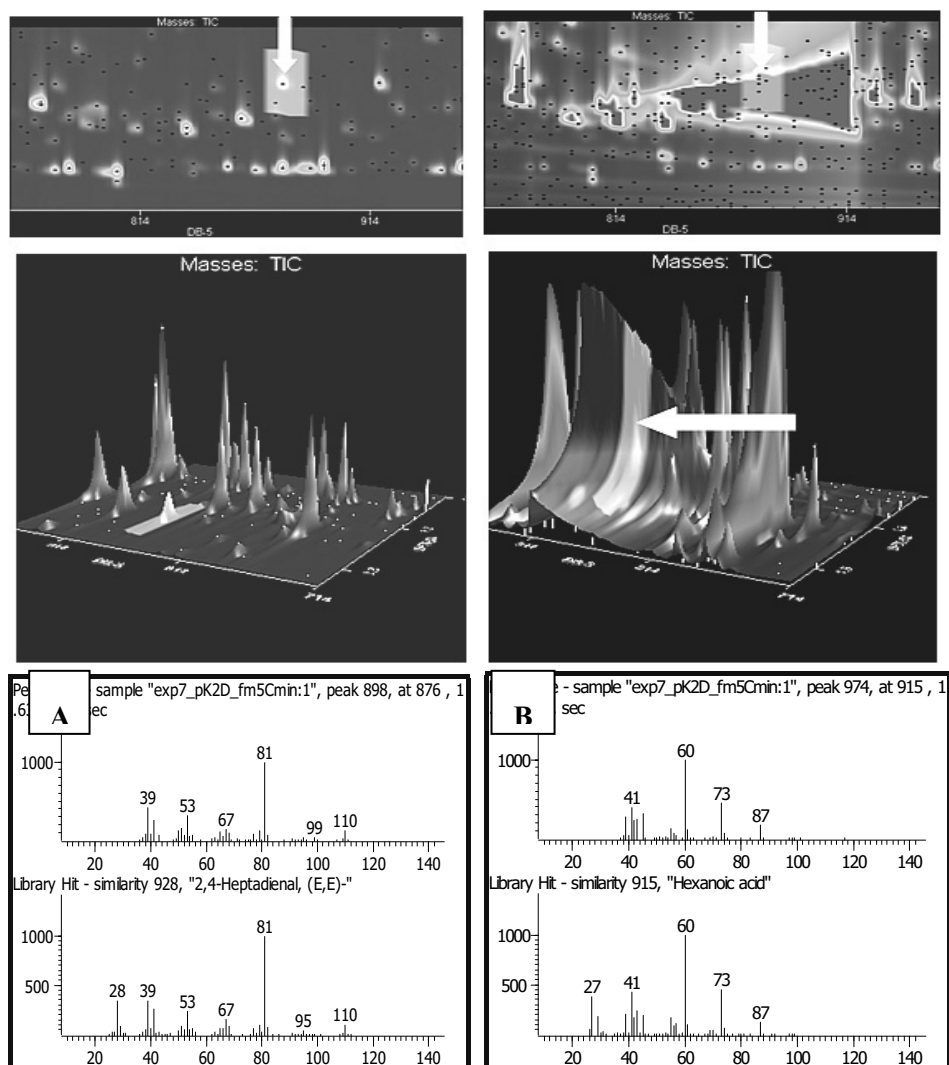


Rys. 3. Chromatogram związków lotnych powstających w procesie smażenia makaronu instant uzyskany techniką GCxGC z wykorzystaniem układu kolumn DB-5 x BPX-50. Na chromatogramie GCxGC kropkami zaznaczono zidentyfikowane piki. Związki lotne rozdzielane są na kolumnie DB-5 według temperatur wrzenia, na kolumnie BPX-50 – wg polarności.

Możliwości dekonwolucji układu GCxGC-ToF-MS ilustruje rysunek 4. Przedstawiono na niej fragment chromatogramów lotnych produktów utleniania kwasów tłuszczowych, otrzymany w pierwszym dniu testu przyspieszonego starzenia, bezpośrednio po usmażeniu makaronu, oraz po okresie 61-dniowego przechowywania w temperaturze 50°C, w celu indukcji zmian oksydacyjnych.

Z uwagi na dużą stabilność oksydacyjną makaronów instant konieczne było zastosowanie długiego czasu i relatywnie wysokiej temperatury do wytworzenia zmian oksydacyjnych w tłuszczu użytym do smażenia. Na rysunku 4A przedstawiono pik 2,4-heptadienu (zaznaczony strzałką) bezpośrednio po smażeniu dobrze oddzielony od innych związków lotnych. Po okresie przechowywania w próbce zaobserwowano znaczne ilości wolnych kwasów karboksylowych, których duże piki koeluowały z oznaczanymi innymi związkami lotnymi. Rysunek 4B przedstawia pik 2,4-heptadienu koeluujący z pikiem kwasu heksanowego. Pomimo prawie całkowitej koelucji aldehydu, trudnej do rozdzielania za pomocą GCxGC, z uwagi na znaczne dysproporcje w powierzchniach pików i specyfikę kwasów karboksylowych eluujących na kolumnie typu DB-5, dekonwolucja widm umożliwiła jednoznaczną identyfikację 2,4-heptadienu i rozdzielanie analizowanych związków (Rys. 4B).

Kompletna dwuwymiarowa chromatografia gazowa, zwłaszcza w połączeniu z detekcją analizowanych związków za pomocą spektrometru czasu przelotu i wykorzystaniem dekonwolucji pików daje niespotykaną dotąd w chromatografii gazowej ilość informacji. Jest to wciąż technika relatywnie nowa, gdzie liczba prac publikowanych rocznie niedawno jeszcze sięgała kilkunastu, a obecnie kilkudziesięciu. Potencjał chromatografii GCxGC w pełni uwidacznia się przy analizie bardzo złożonych mieszanin, gdzie możliwa jest identyfikacja składników koeluujących w chromatografii jednowymiarowej [8]. Szczególnie istotne zdaje się być wykorzystanie tej techniki w procesie identyfikacji związków kluczowych dla tworzenia aromatu, jako uzupełnienie chromatografii i olfaktometrii (GC-O) [9].



Rys. 4. Fragment chromatogramów lotnych produktów utlenienia kwasów tłuszczowych makaronu instant: A - bezpośrednio po wyprodukowaniu, a przed testem przyspieszonego starzenia, B - po 61 dniach przechowywania w temperaturze 50°C (B). Strzałką zaznaczono pik 2,4-heptadienu. Dominujący pik na chromatogramie (B) to kwas heksanowy.

Zastosowania GCxGC w analizie żywności obejmują głównie analizę olejków eterycznych, technika ta zaczyna być także wykorzystywana w analizie lipidów, zarówno do analizy składu kwasów tłuszczowych w złożonych układach jakimi są tłuszcze ryb morskich, jak i steroli [10, 11]. Praca [12] dobrze charakteryzuje potencjał techniki GCxGC-ToF-MS. Autorzy wykorzystali ją do identyfikacji związków siarkowych, wpływających na aromat pieczonego mięsa wołowego. Spośród zidentyfikowanych wstępnie 4700 związków (15000 pików na chromatogramie) wyselekcjonowali około 70 związków potwierdzając tożsamość ponad 50 z nich. Podsumowując, kompletna, dwuwymiarowa chromatografia gazowa (GCxGC-ToF-MS) jest w chwili obecnej techniką chromatografii gazowej dającą największą ilość informacji analitycznych, gdzie trudności analityczne wiążą się raczej nie z separacją składników złożonych mieszanin, a interpretacją często bardzo dużej ilości danych, zwłaszcza w profilowaniu związków, a nie analizie wybranych.

Literatura

1. Simmons M.C., Snyder L.R.: Two stage gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1958, 45, 32-38.
2. Schurig V.: Chiral separations using gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21, 647-661.
3. Adahchour M., Beens J., Vreuls R.J.J. Brinkman U.A.Th.: Recent developments in comprehensive two dimensional gas chromatography (GCxGC). I. Introduction and instrumental setup. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25, 5, 438-454.
4. Adahchour M., Beens J., Vreuls R.J.J. Brinkman U.A.Th.: Recent developments in comprehensive two dimensional gas chromatography (GCxGC). II. Modulation and detection. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25, 540-553.
5. Frankel E.N.: In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science and Technology*, 1993, 4, 220-224.

6. Wąsowicz E., Gramza A., Hęś M., Jeleń H.H., Korczak J., Małecka M., Mildner-Szkudlarz S., Rudzińska M., Samotyja U., Zawirska-Wojtasiak R.: Oxidation of lipids in food. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2004, 13/54, SI 1, 87-100.
7. Belitz H.-D., Grosh W., Schieberle P.: *Food Chemistry*. Springer, 2004, Berlin.
8. Adahchour M., Stee L.L.P. van, Beens J., Vreuls R.J.J.: Comprehensive two-dimensional chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the trace analysis of flavor compounds in food. *Journal of Chromatography*, 2003, A 1019, 157-172.
9. Eyres G., Marriott P. J., Dufour J.-P.: The combination of gas chromatography – olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterization of essential oils. *Journal of Chromatography*, 2007, A 1150, 70-77.
10. Geus J.-J. de, Aidos I., Boer J. de, Luten J.B., Brinkman U.A.Th.: Characterisation of fatty acids in biological oil samples using comprehensive multidimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 2001, A. 910, 95-103.
11. Tranchida P.Q., Donato P., Dugo P., Digo G., Mondello L.: Comprehensive chromatographic methods for the analysis of lipids. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26, 3, 191-205.
12. Rochat S., Saint Laumer J.-Y. de, Chaintreau A.: analysis of sulfur compounds from the in-oven roast beef aroma by comprehensive two dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 2007, A.1147, 85-94.

7. Występowanie i metody analizy biotoksyn w owocach morza

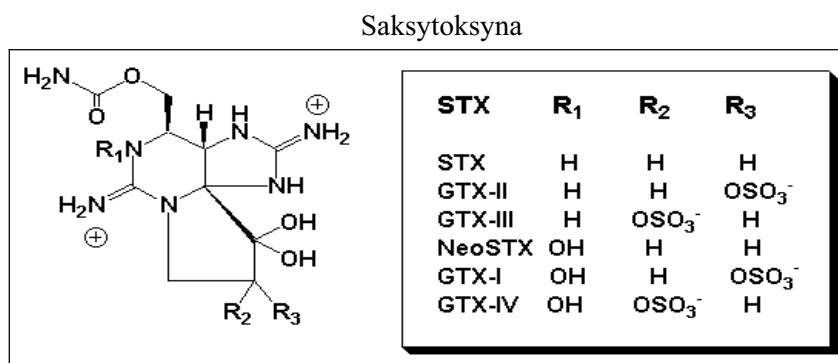
MIROŚLAW M. MICHALSKI

Plankton jest w oceanach podstawowym źródłem pożywienia dla mięczaków, takich jak ostrygi, małże, przegrzebki czy też omułki oraz dla larw skorupiaków. Substancje toksyczne przedostają się do organizmu mięczaków poprzez plankton jako ich pożywienie i kumulowane są w mięśniach i wątrobotrzustce.

Główne biotoksyny spotykane u mięczaków (*shellfish marine biotoxins*) to toksyny: PSP – paraliżujące, NSP – neurotoksyny, ASP – anamnestyczne, DSP – wywołująca biegunki oraz AZA (kwas azaspirowy) wywołujący biegunki i zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego [6].

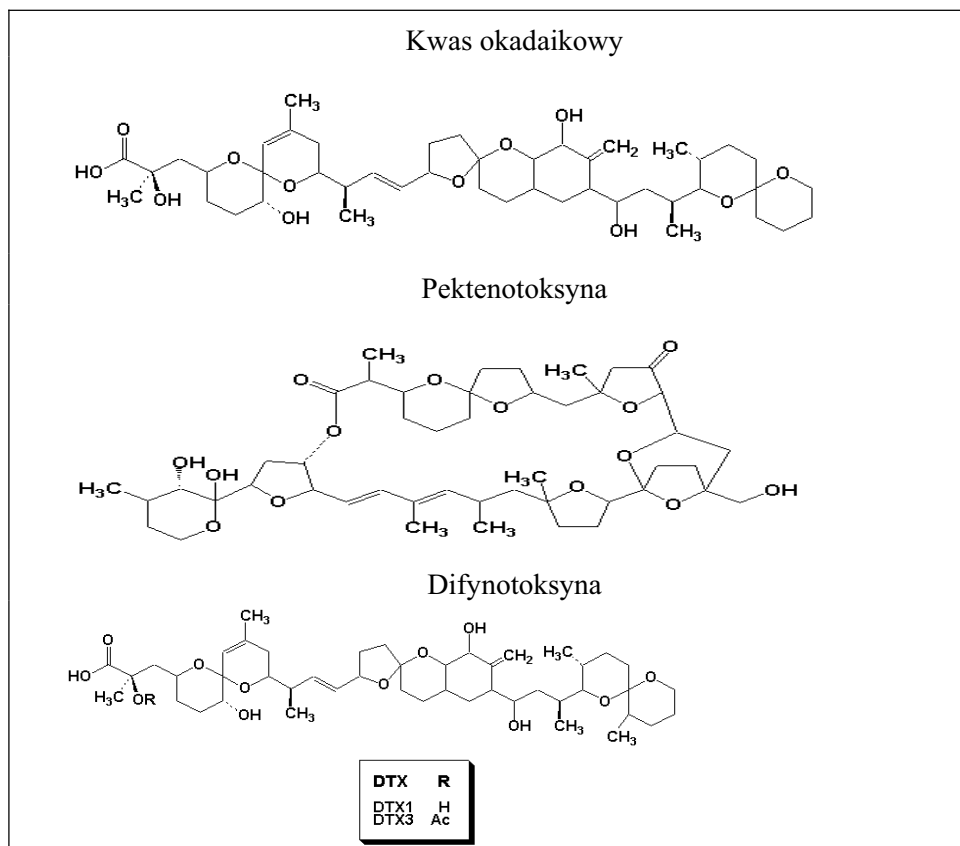
Toksyny paraliżujące są najbardziej niebezpieczne dla człowieka i stanowią duży problem w krajach, gdzie spożywanie małż jest powszechne. Aktywną toksyną jest saksytoksyna (STX) oraz jej 21 izomerów (pochodne tetrahydropuryn, SXT's) (Rys.1). Minimalna dawka saksytoksyny powodująca zatrucia to 20 µg/kg masy ciała. Dopuszczalna zawartość PSP wynosi 80 µg/100g mięsa mięczaków. Pierwsze udokumentowane zatrucie wystąpiło w 1948 roku w Japonii, a w USA w połowie lat 60. W Europie notowane są zatrucia od wczesnych lat osiemdziesiątych. Pod koniec 1987 roku w Wielkiej Brytanii dziesiątki osób było zatrutych PSP a 3 osoby zmarły. Pierwotnym źródłem SXT's są glony z rodzaju *Alexandrium*, a więc np. *A. catenella*, *A. tamarensis*, *A. minutum*, *A. fundyense* i *A. cohorticula*. [6, 7]. Objawy zatrucia saksytoksyną to drętwienie języka, brak czucia, porażenie mięśni oddechowych i układu motorycznego, porażenie układu sercowo-naczyniowego, drżenie rąk i palców u nóg, bełkotliwa mowa, ślinienie się i kłopoty z oddychaniem. Śmiertelność wynosi około 10%. Metody wykrywania to test na myszkach MBA

(metoda referencyjna) lub na szczurach RBA i metody alternatywne, tj. Elisa (*immunoassay*), HPLC, LC-MS, LC, chromatografia jonowymienna, elektroforeza, określenie stopnia blokowania kanałów sodowych (*mouse in vitro*) czy też techniki elektroforetyczne. Test MBA wykonuje się na 3 myszkach. Wstrzykuje się dootrzewnowo wodny (pH 2,5-3) ekstrakt z mięsa małży. Jest to test oficjalny wg Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1990. Method 959.08: Paralytic Shellfish Poison. 15th Ed., pp.881-882, Volume II. AOAC, Arlington, VA, U.S.A. Wśród metod immunologicznych stosuje się test Elisa.



Rys. 1. Toksyny PSP (źródło: internet)

Toksyny wywołujące biegunkę (DSP) są toksynami lipofilnymi, gromadzącymi się w tkance tłuszczowej mięczaków. Toksyny są termostabilne. Objawy zatrucia to uporczywe biegunki, wymioty, nudności i skurcze żołądka. Objawy są już widoczne nawet po 30 minutach od spożycia. Z reguły objawy zanikają po 3-4 dniach. Przy chronicznych zatruciach jest możliwa indukcja raka żołądka czy też przewodu pokarmowego [3]. Do tej grupy toksyn zalicza się kwas okadaikowy (OA) i jego pochodne - dinofysiskotoksyny (DTX1, DTX2, DTX3), pektenotoksyny (PTX1, PTX2) oraz yessotoksyny (YTX's) (Rys. 2). Dinofysiskotoksyny uszkadzają również wątrobę.

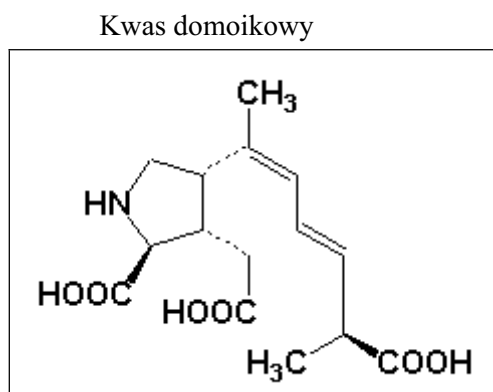


Rys. 2. Toksyny DSP (źródło: internet)

Źródłem toksyn DSP są glony *Dinophysis spp.* oraz *Prorocentrum*. Metody wykrywania toksyn to MBA [8], HPLC (*fluorometric detector*), TLC, LC, LC-MS, LC-ion-spray MS, testy fosfatazowe (np. PP2A, Biosense), Elisa czy też testy cytotoksyczne. Badania międzylaboratoryjne LC-MS wskazują na tę metodę jako referencyjną dla toksyn ASP i DSP [5, 6]. Co do toksyn amnestycznych to związkiem toksycznym jest kwas domoikowy i jego izomery (Rys. 3).

Po raz pierwszy zdiagnozowano zatrucie kwasem domoikowym w Kanadzie w 1987 roku w wyniku spożycia omułek (*blue mussels*). Okrzemek *Pseudo-*

nitzschia jest głównym jednokomórkowcem, wytwarzającym kwas domoikowy (DA) [1, 4, 6]. Objawy zatrucia występują po 24 godzinach od spożycia. Następuje krótkotrwała utrata pamięci (*short term memory*). Przy zatruciu „lekkim” i u ludzi nie mających problemów z nerkami następuje całkowite wyzdrowienie już po kilku dniach. Przy zatruciu „poważnym”, gdy organizm nie jest w stanie szybko usunąć toksyny (DA), może wystąpić dodatkowo poważne, trwałe uszkodzenie mózgu. Metody wykrywania ASP to HPLC (metoda referencyjna), MBA, Elisa, TLC, GC-MS, LC-MS czy też elektroforeza kapilarna. Test na myszkach jest metodą AOAC (1990).

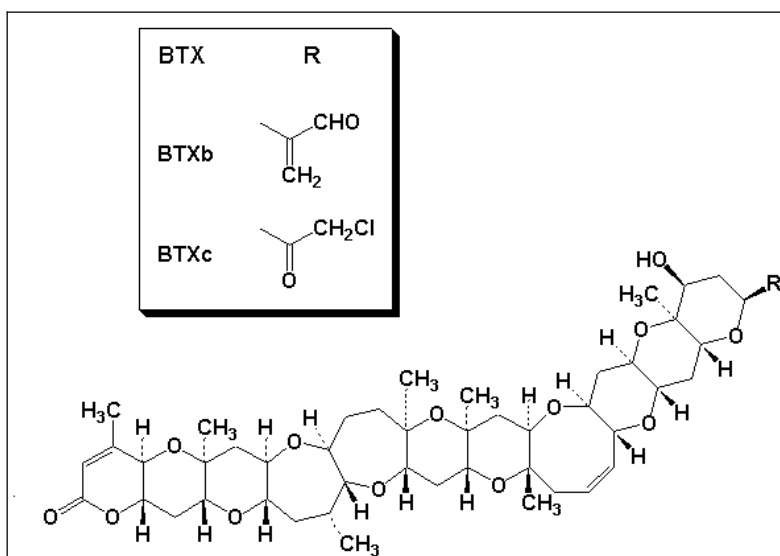


Rys. 3. Toksyna ASP (źródło: internet).

Neurotoksyną jest brewetoksyna i jej izomery (Rys.4). Objawy zatrucia to podwójne widzenie, trudności w przełykaniu, dreszcze, mdłości, biegunka, odrętwienie, suchość w ustach czy też uporeczywy kaszel przy wdychaniu mgiełki morskiej zawierającej brewetoksynę (objawy astmopodobne). Zatrucia neurotoksyną po spożyciu mięczaków najczęściej występują w zatoce Meksykańskiej, Nowej Zelandii i na wschodnim wybrzeżu Florydy. W Europie nie stwierdzono zatruć po spożyciu małż skażonych brewetoksyną. Wykryto jedynie w Niemczech, Francji, Grecji, Holandii, Portugalii czy też Hiszpani obecność planktonu wytwarzającego tę toksynę. Za obecność NSP odpowiadają

brudnice (*dinoflagellate*), a szczególnie glon *Gymnodinium breve* (*Karenia brevis*) [4, 6]. Brewetoksyna jest toksyczna również dla ryb. Jest to toksyna bezsmakowa, bezzapachowa, ciepłooporna, kwasooporna oraz rozpuszczalna w tłuszczach (lipofilna) [2]. Brewetoksynę wykrywa się testem MBA, testami biologicznymi na rybach *Gambusia affinis* (FBA), Elisa, TLC, LC-MS czy też metodami radioimmunologicznymi.

Brewetoksyna



Rys. 4. Toksyne NSP (źródło: internet).

Zasady wprowadzania do handlu małż są ściśle określone prawodawstwem unijnym. Akty stanowiące to: Decyzja Komisji z dnia 15 marca 2002 r. (2002/225) ustanawiająca szczegółowe zasady wykonania dyrektywy Rady 91/492/EWG w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu zawartości i metod analizy niektórych morskich biotoksyn w małżach, szkarłupniach, osłonnicach i ślimakach morskich; sekcja VII w Rozporządzeniu (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności

pochodzenia zwierzęcego; Decyzja Komisji z 14 listopada 2003 roku w sprawie warunków zdrowotnych i wymagań certyfikacyjnych przy imporcie małż, ich jaj, gamet przeznaczonych do rozmnażania, hodowli, tuczenia z przeznaczeniem do spożycia przez ludzi (2003/804/EC); Decyzja Komisji z dnia 15 marca 2002 r. (2002/226) ustanawiająca specjalne kontrole zdrowotne w odniesieniu do zbierania i przetwarzania określonych małży dwuskorupowych o poziomie toksyny ASP (*Amnesic Shellfish Poison*) przekraczającym limity określone w dyrektywie Rady 91/492/EWG (*notyfikowana jako dokument nr C(2002) 1009*); Decyzja Komisji nr z dnia 18 stycznia 1996 r. (96/77/EC) ustanawiająca warunki dla zbioru i przetwórstwa pewnych małży dwuskorupowych pochodzących z obszarów gdzie poziom PSP przekracza dopuszczalne limity określone dyrektywą 91/492 czy też Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 15 lipca 2005 roku w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych dla umieszczania na rynku zwierząt i produktów akwakultury (DzU nr 138 poz. 1158) [6].

Literatura

1. Bates S.S., Bird C.J., de Freitas A.S.W., Foxall, R., Gilgan M.W., Hanic L.A., Johnson G.E., McCulloch A.W., Odense P., Pocklington R.G., Quilliam M.A., Sim P.G., Smith J.C., Subba Rao D.V., Todd E.C.D., Walter J.A. & Wright J.L.C.: Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1989, 46, 1203-1215.
2. Benson J.M., Tischler D.L., Baden D.G.: Uptake, distribution, and excretion of brevetoxin 3 administered to rats by intratracheal instillation. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, 1999, 56, 345-355.
3. Draisci R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria P., Poletti R.: First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon.*, 1996, 34(8), 923-935.
4. Hallegraeff G.M.: 1. Harmful algal blooms: a global overview. In Hallegraeff G.M. (eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*), 1995, 1-22. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.

5. Holland P., McNabb P.: Inter-laboratory Study of an LC-MS Method for ASP & DSP Toxins in Shellfish. Cawthron Report No.790, 2003, Nelson, New Zealand, Cawthron Institute.
6. Michalski M.: Biotoksyny morskie – występowanie i metody analizy. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 2006, 3 (48), 16-22.
7. Mons M.N., Van Egmond H.P., Speijers G.J.A.: Paralytic shellfish poisoning: A Review RIVM Report No. 388802 005, June 1998.
8. Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K., Clardy J.: Diarrhetic shellfish poisoning. ACS Symposium Series No. 262. In Ragelis E.P. ed. *Seafood Toxins.* 1984, 207-214.

CZEŚĆ II

INSTRUMENTALNE METODY BADANIA TEKSTURY SUROWCÓW I PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH

8. Nowoczesne metody badania mikrostruktury i mechaniki surowców roślinnych

KRYSTYNA KONSTANKIEWICZ

Wstęp

Tak się złożyło, że zaproponowany przez organizatorów konferencji „Nowoczesne metody analityczne w zapewnieniu jakości i bezpieczeństwa żywności” wykład nt. najnowszych metod badania mikrostruktury i mechaniki surowców roślinnych jest zbieżny z tematyką badawczą Zakładu Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów Instytutu Agrofizyki PAN.

Realizowana przez interdyscyplinarny zespół tematyka należy do priorytetowych kierunków badawczych w zakresie jakości i bezpieczeństwa żywności oraz poznania i kontroli właściwości materiału – także tkanek roślinnych – podczas całego procesu produkcyjnego. Przy zwiększającym się zapotrzebowaniu na produkt dobrej jakości rośnie też potrzeba poznania coraz szerszego zakresu jego właściwości i ciągłego monitorowania ich zmian [1, 7, 15, 21, 25, 31, 33, 45, 49, 60, 67].

Prowadzimy badania mikrostruktury i właściwości mechanicznych tkanek roślinnych w celu określenia cech jakościowych surowców rolniczych – owoców i warzyw - przeznaczonych do bezpośredniej konsumpcji jak i przetwórstwa przemysłowego. Głównym celem naszych badań jest poznanie, opisanie i modelowanie związków pomiędzy budową szkieletu mechanicznego – strukturą komórkową - i właściwościami mechanicznymi – wytrzymałością, procesami pęknięcia - tkanki roślinnej, a także opracowanie instrumentalnych metod monitorowania właściwości materiału i analizy tekstury owoców i warzyw [13, 39, 44, 64, 68].

Badania są trudne ze względu na dużą biologiczną różnorodność materiału, a także na konieczność jednoczesnego uwzględniania wpływu dużej liczby czynników wynikających ze złożonych warunków uprawy i przechowywania, a także coraz bardziej wymagających procesów technologicznych [2, 4, 5, 18, 29, 36, 37, 44, 47, 48, 57, 59].

Tkanka roślinna należy do skomplikowanych materiałów, do badania, których niezbędne są oryginalne metody pomiarowe poprzedzone pracami podstawowymi. W większości przypadków nie jest możliwa adaptacja systemów pomiarowych powszechnie stosowanych w badaniach innych materiałów. Opracowane nowe metody badawcze wymagają ciągłego doskonalenia zarówno ze względu na szybki rozwój technik pomiarowych, jak i zmieniające się wymagania odmianowe związane z przeznaczeniem surowców i produktów rolniczych, a także zwiększające się oczekiwania konsumentów [10, 15, 16, 22, 24, 30, 45, 46, 63, 64].

Najnowsze trendy w badaniach naukowych dotyczą poznania i opisanie podstawowych cech materiału - w skali mikro, a następnie szukanie ich zależności z właściwościami całych obiektów, także jakościowymi. Jedną z podstawowych cech fizycznych charakteryzujących materiał badawczy jest struktura, która wpływa w decydujący sposób na pozostałe jego właściwości, np.: fizyczne, chemiczne, biologiczne. Badania materiałowe mają długą tradycję popartą praktycznym doświadczeniem produkcji wielu materiałów. Na podstawie ilościowego opisu struktury badanego materiału można prowadzić porównania między obiektami lub rejestrować zmiany w obrębie jednego obiektu, wywołane np. procesem technologicznym, przechowywaniem lub wynikających z niejednorodności materiału. Natomiast wiedzę o wpływie struktury na właściwości materiału można wykorzystać do sterowania procesami technologicznymi, w celu otrzymania materiału o oczekiwanych właściwościach a także do projektowania zupełnie nowych materiałów [19, 27, 33, 44, 51, 53, 61, 70].

Podstawowym elementem strukturalnym tkanki roślinnej jest komórka i to właśnie z wielkością komórki poszukuje się zależności z innymi właściwościami badanego materiału. Z wieloletnich własnych badań w tym zakresie wynika, że

struktura komórkowa jest cechą charakterystyczną tkanek roślinnych a każde wnioskowanie może być oparte tylko o aktualne wyniki ilościowej analizy parametrów struktury, szczególnie związanych z wielkością komórek [27, 31, 40, 41, 42, 53].

Od paru lat prowadzimy oryginalne prace nad rozwijaniem zaawansowanych technik uzyskiwania mikroskopowych obrazów struktury komórkowej - tworzącej wspomniany szkielet mechaniczny - tkanki roślinnej umożliwiających przeprowadzenie ich ilościowej analizy. W tym celu, między innymi została opracowana automatyczna procedura analizy obrazu umożliwiająca, uzyskanie wymiarów geometrycznych komórek na przekroju przy użyciu konfokalnego mikroskopu laserowego. Opracowano też metodykę preparatyki obiektów, w zależności od rodzaju tkanki i interesujących elementów strukturalnych, do obserwacji przy wykorzystaniu różnych technik mikroskopowych [28, 38, 41, 42, 65, 72].

Do aktualnych badań należą także opracowywane innowacyjne metody opisu procesów zachodzących w tkankach podczas ich deformacji. Zastosowaliśmy po raz pierwszy kontaktową metodę emisji akustycznej, która umożliwia śledzenie procesów pękania ścian komórkowych, inicjujących niszczenie tkanki a także istotnych dla konsumenta świeżych warzyw i owoców ze względów na odczucie kruchości, soczystości [43, 49, 66, 67, 69, 70, 71].

Zainicjowaliśmy także oryginalne i przyszłościowe badania nad właściwościami ścian komórkowych. To właśnie ściany komórkowe odgrywają szczególną rolę w procesach wytrzymałościowych całej struktury – wyznaczają kształt i wielkość komórek, stanowią sztywną konstrukcję całego obiektu a jednocześnie są pierwszym elementem struktury, który pękając inicjuje proces niszczenia całej tkanki. Zbadanie mechanicznych właściwości ścian komórkowych tkanek naturalnych jest zadaniem niezmiernie trudnym, głównie ze względu na ich niewielkie wymiary. Alternatywą może być prowadzenie badań dla modelowych materiałów imitujących naturalne ściany. Dotychczas uzyskane rezultaty pokazują możliwości wytwarzania takich modelowych ścian, o właściwościach chemicznych i strukturalnych zbliżonych do naturalnych oraz

odpowiednich wymiarach do przeprowadzenia testów mechanicznych [6, 8, 9, 12, 19, 32, 39, 46, 50, 55, 60].

Ciągły rozwój nowych metod pomiarowych poszerza możliwości oceny jakości surowców roślinnych w szybki i co najważniejsze nieniszczący sposób. Do najnowszych osiągnięć naszego Zakładu należy rozpoczęcie prac nad wykorzystaniem metody, czasowo-przestrzennej korelacji plamkowej – *biospeckle*, do oceny stanu świeżości owoców i warzyw. Jest to nieinwazyjna i niedestrukcyjna metoda oparta o interpretację zjawiska optycznego występującego podczas oświetlenia powierzchni owocu koherentnym światłem wiązki laserowej. W wyniku odbicia światła od powierzchni badanego obiektu uzyskujemy stabilny obraz w przypadku metalu – *speckle*, natomiast z powierzchni świeżego obiektu biologicznego, np. jabłka, obraz wykazuje cechy fluktuacji – *biospeckle*. Taki zmieniający się obraz niesie informację o zmianach fizycznych i biologicznych obserwowanego obiektu. Obserwowany efekt powstaje w wyniku nałożenia dwóch obrazów – stabilnego po odbiciu światła od skórki owocu i zmieniającego się pochodzącego z głębszej warstwy pod skórka. Zmienne w czasie i w przestrzeni wzory *biospeckli* mogą być rejestrowane jako serie obrazów a następnie analizowane przez specjalistyczny program i wyznaczone przy pomocy funkcji korelacji. Współczynnik korelacji wzoru *biospeckli* zmienia się z różną prędkością w zależności od świeżości owoców – wilgotności, zastosowanych środków ochronnych, itp. Aktualne badania pokazują, że współczynnik korelacji szybko maleje z czasem dla świeżych jabłek, co może być związane z większą ruchliwością cząstek stałych wewnątrz komórek w przypowierzchniowej warstwie przy większej wilgotności obiektu [3, 34, 54, 56, 58, 63, 68].

Metoda wymaga jeszcze prac podstawowych, szczególnie w zakresie interpretacji obserwowanego zjawiska, ale ze względu na szybkość analizy i niedestrukcyjny charakter, może być dobrym przyszłościowym rozwiązaniem do monitoringu zmian jakości surowców roślinnych w czasie przechowywania.

Obserwacje mikroskopowe roślinnych struktur komórkowych

Źródłem informacji o strukturze komórkowej są obserwacje mikroskopowe. Powszechnie dostępne coraz doskonalsze mikroskopowe metody pozwalają na obserwacje struktury w różnych powiększeniach, a cyfrowe techniki zapisu otrzymanego obrazu na analizę zawartych w nich informacji. Bogata oferta różnego typu mikroskopów – np. optyczne, konfokalne, elektronowe, akustyczne, rentgenowskie – z szerokim dodatkowym wyposażeniem i oprogramowaniem, rutynowo pracujących z bardzo dobrymi efektami z wieloma materiałami daje duże możliwości badawcze, także tkanki roślinnej. Dobór właściwego sprzętu nie jest łatwy, natomiast często decyduje o sukcesie rozwiązania postawionego problemu, zaoszczędza czas i koszty. Decydujące znaczenie ma cel prowadzonych badań, a więc skoncentrowanie uwagi na istotnych elementach struktury, natomiast pominięcie zbędnych szczegółów, a także zapewnienie metodologicznej poprawności. Istotne znaczenie ma miejsce pobrania próbki oraz wybór płaszczyzny obserwacji. Natomiast stosowanie wstępnej preparacji próbek, od zwykłego cięcia do utrwalania struktury, może wносить zaburzenia obserwowanej tkanki, które powinny być uwzględniane w dalszych badaniach i wnioskowaniu [14, 17, 18, 25, 35, 40, 45, 53].

W badaniach fizycznych właściwości tkanki roślinnej poszukuje się metod otrzymania takiego obrazu jej struktury, na którym wyraźnie są widoczne ściany komórkowe, które wyznaczają wymiary całej komórki. Układ komórek na obserwowanej powierzchni daje informację o przestrzennej organizacji elementów struktury a także o ewentualnych zmianach struktury w wyniku badanych procesów. Badania, a także obserwacje porównawcze mikrostruktury tkanki roślinnej wymagają wielu pomiarów, dlatego chętnie wykorzystuje się w tym celu metody komputerowe. Dla obrazów o dobrej jakości można przeprowadzać analizy w sposób automatyczny posługując się profesjonalnymi programami [28, 45, 72].

Obraz struktury nadający się do komputerowej analizy powinien być wysokiej jakości, a więc przede wszystkim o bardzo dobrym kontraście. Interesujące nas elementy struktury powinny być jednoznacznie rozróżnialne, możliwe do policzenia i zmierzenia. Zadanie to jest trudne w przypadku tkanek

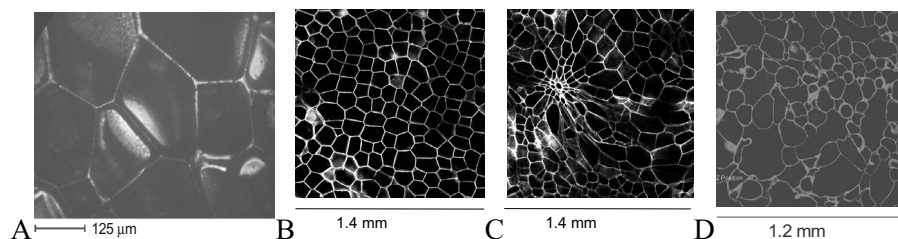
roślinnych, które są mało kolorowe, czasami wręcz przezroczyste, a dodatkowo z powodu dużej zawartości wody szybko ulegają wysychaniu i deformują się podczas obserwacji.

Ilościowy opis struktury komórkowej wymaga opracowania odpowiedniej metodyki badawczej dla danego obiektu. Nawet przy dobrze opracowanych zasadach postępowania niezastąpione jest doświadczenie i wiedza obserwatora w celu właściwej interpretacji zawartej na obrazie informacji [28, 72].

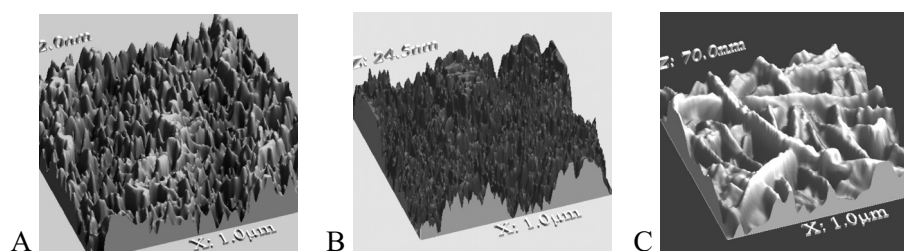
W naszym Zakładzie do badań struktury komórkowej tkanek roślinnych wykorzystujemy mikroskopy konfokalne: optyczny i laserowy. Pierwsze wyniki uzyskaliśmy przy wykorzystaniu optycznego mikroskopu konfokalnego „Confocal 2002”, TSRLM – *Tandem Scanning Reflected Light Microscope* - źródłem światła jest lampa rtęciowa, rozdzielczość 752 x 582 pikseli. Mikroskop opracowany przez Petrana i Hadravskiego na Uniwersytecie w Yale w 1971 roku, później udoskonalony poprzez kolejne patenty, spełnił nasze pierwsze oczekiwania w badaniach tkanki roślinnej w stanie naturalnym – bez wstępnej preparacji. Pozwolił na uzyskanie obrazów dobrej jakości – o dużym kontraście z głębokości ograniczonej tylko przezroczystością próbki (Rys. 1) [28, 45, 52].

Aktualnie dalsze zaawansowane prace prowadzimy przy wykorzystaniu Skanującego Laserowego Mikroskopu Konfokalnego, CSLM – *Confocal Scanning Laser Microscope*. Początkowo badania były prowadzone na Uniwersytecie w Kyoto, w Japonii, a obecnie kontynuujemy prace na własnym sprzęcie. Od 2007 roku dysponujemy mikroskopem Olympus Fluoview FV300 – jest on w pełni zautomatyzowany, przeznaczony do badań we fluorescencji i w świetle przechodzącym, próbka wymaga barwienia, rozdzielczość 512 x 512 pikseli, oś Z o rozdzielczości 10 nm (Rys. 1) [45, 72].

Korzystając ze współpracy z Laboratorium Analitycznym Wydziału Chemii UMCS mogliśmy przeprowadzić badania, w dużych powiększeniach, struktury ściany komórkowej z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych – *Atomic Force Microscope*, *AFM Digital Instruments NanScope III* – minimalna preparacja próbek, kontrastowe, trójwymiarowe obrazy z możliwością ich analizy (Rys.2) [11].



Rys. 1. Obrazy struktury komórkowej tkanek parenchymy: A - ziemniaka, Optyczny Mikroskop Konfokalny „Confocal 2002”, TSRLM, B, C i D - Skanujący Laserowy Mikroskop Konfokalny, CSLM, odpowiednio dla ziemniaka, marchwi i jabłka [45, 72]

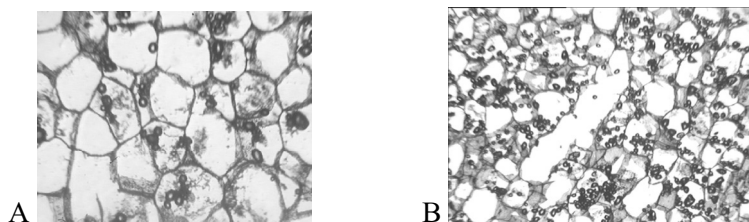


Rys. 2. Profile powierzchni materiałów ściany komórkowej, Mikroskop Sił Atomowych, AFM: A - materiał ściany komórkowej wyizolowany z tkanki jabłka, B – materiał ściany komórkowej utrwalonej tkanki jabłka, C – materiał modelowej ściany komórkowej [11]

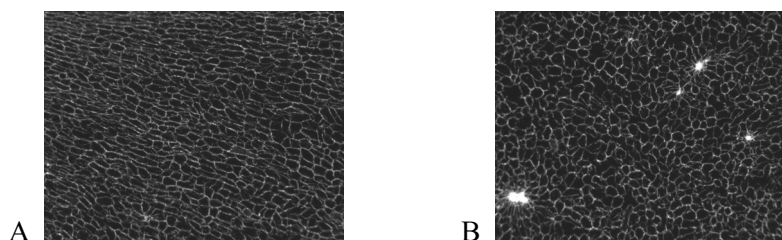
Do obserwacji cienkich przekrojów utrwalonej struktury tkanek roślinnych, także po odkształceniu, wykorzystujemy mikroskop optyczny N800-M wyposażony w aparat fotograficzny i komputer z oprogramowaniem do analizy obrazu (Rys.3) [13, 38, 45].

W ramach współpracy z National Institute of Agronomic Research (INRA) rozpoczęliśmy także prace z wykorzystaniem *makroskopu*, który pozwala na oglądanie dużych powierzchni badanych obiektów – wymiar próbki: ~1 cm x 1 cm, obraz: 5,8 mm x 4,7 mm, 1 piksel 3,6 μm, źródło światła poza polem

widzenia kamery – ściany komórkowe jasne. Obrazy są dobrej jakości i dzięki temu także możliwa jest ich analiza (Rys. 4) [20].



Rys. 3. Obrazy struktury komórkowej tkanki parenchymy ziemniaka, mikroskop optyczny, A – próbki z utrwaloną strukturą, B – widoczne ziarna skrobi i pęknięcie struktury [38, 45]



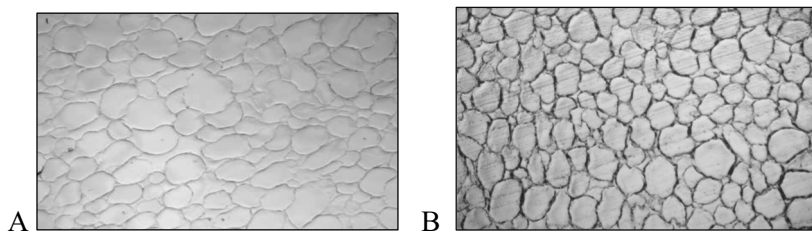
Rys. 4. Obraz struktury tkanki parenchymy jabłka, makroskop: A, B obserwacje w dwóch wzajemnie prostopadłych płaszczyznach, obraz: 5,8 mm x 4,7 mm, 1 piksel 3,6 μ m

Materiał badawczy i preparatyka próbek

Morfologia struktury tkanek roślinnych jest pochodną wielu czynników, m.in.: odmiany, wymiaru i kształtu obiektu, rodzaju tkanki, sposobu uprawy, warunków klimatycznych, terminu zbioru, procesu przetwórczego, warunków przechowywania. Tego typu materiały są szczególnie podatne na różnego rodzaju oddziaływania, np. mechaniczne, termiczne, w których łatwo dochodzi do zmian struktury, co następnie może wywoływać cały szereg procesów

obniżających jakość produktu. Spośród roślinnych materiałów rolniczych miękkie tkanki są szczególnie podatne na zmiany struktury i różnego rodzaju uszkodzenia. Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym powstawaniu zmian struktury jest w wielu przypadkach duże uwilgotnienie ośrodka. Ze względu na „delikatność” struktury badanych obiektów już samo przygotowanie próbek do obserwacji i analizy jest dużym problemem. Szczególnie w sytuacji, kiedy nie tylko stan wejściowy struktury podlega badaniom, ale także jego zmiany w efekcie różnych oddziaływań.

Miękkie tkanki roślinne wymagają usztywnienia struktury a cała procedura poprzez utwalenie, odwodnienie, przesylenie parafiną (żywicą) pozwala na precyzyjne cięcie na cienkie skrawki. Opracowano metodykę preparatyki nieodkształconych i odkształconych tkanek roślinnych, do obserwacji w świetle przechodzącym, przy pomocy mikroskopu optycznego. Procedura uwzględnia utwalenie w mieszaninie aldehydu glutarowego, formaliny i kwasu octowego, a następnie zatapianie w żywicy metakrylowej wysokiej twardości, która równomierne i dokładnie wypełnia całą strukturę komórkową. Ściany komórkowe zostają utwalone w stanie wysokiego turgoru, a zastosowana mieszanina substancji chemicznych nie powoduje jego spadku. Opracowana metodyka pozwala na utwalenie tkanek jabłka i marchwi bez zmian stanu ścian komórkowych. Otrzymane obrazy mikroskopowe nadają się do analizy ilościowej, zarówno w przypadku tkanek nieodkształconych, jak i poddanych deformacji (Rys. 5) [38, 45].



Rys. 5. Obrazy utwalonej struktury tkanki jabłka, mikroskop optyczny, powiększenie 4x: A – nieodkształconej, B – po odkształceniu, 20% [13]

Tak przygotowane obiekty umożliwiają obserwacje, w świetle przechodzącym, stosunkowo dużych powierzchni cienkich preparatów – o grubości od kilku do kilkudziesięciu mikrometrów. Do precyzyjnego cięcia powszechnie wykorzystuje się różnego typu mikrotomy. Należy mieć jednak na uwadze, że optymalna preparatyka utrwalania struktury powinna być dobrana eksperymentalnie dla każdego rodzaju badanych obiektów, a także powinna uwzględniać wymagania używanego mikroskopu.

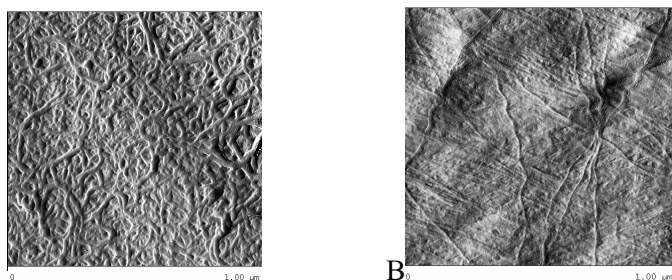
W dotychczasowych pracach jako materiał badawczy wybraliśmy tkanki miękkie – parenchymy, jabłka (*Malus domestica* L.), ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.), marchwi (*Daucus carota* L.). Natomiast opracowane metody badawcze mogą być rozszerzone na inne materiały roślinne.

Przykładowo, obserwacje tkanki roślinnej w stanie naturalnym, prowadzone w optycznym mikroskopie konfokalnym TSRLM, nie wymagają specjalnej preparatyki, oprócz cięcia na bloczki lub plastry – w przypadku ziemniaka usunięcie skrobi z przepołowionych komórek. Jakość obrazu jest dobra, natomiast obserwacje powinny być prowadzone w krótkim czasie, ze względu na szybkie wysychanie próbki [28, 45].

Obserwacje struktury komórkowej w laserowym mikroskopie konfokalnym wymagają barwienia interesujących nas elementów struktury przy pomocy odpowiednio dobranych barwników – Coryphosphyne O, CSLM Fluoview. Otrzymane obrazy są bardzo dobrej jakości, umożliwiły opracowanie metody automatycznej analizy geometrycznych parametrów płaskich przekrojów komórek. Metoda ta pozwala także na oszacowanie frakcji ścian komórkowych w badanym przekroju tkanki. Automatyczna analiza jest szczególnie cenna w przypadku bardzo dużej liczby komórek na jednym przekroju, a w przypadku analizy rozwoju szczeliny powstałej w wyniku pęknięcia struktury umożliwia uwzględnienie całego zestawu sąsiadujących ze sobą przekrojów, czasami na dużych głębokościach [45, 70, 71, 72].

Czasami badania struktury wymagają obserwacji w bardzo dużych powiększeniach. Tak jest w przypadku struktury ściany komórkowej – konieczność obserwacji i analizy takich elementów jak mikrofibryle celulozy, ich ułożenia w matrycy pektynowej i wymiarów geometrycznych. Do tego

zadania wykorzystaliśmy z powodzeniem mikroskop sił atomowych NanoScope III, Digital Instruments. Badania wymagały oryginalnego opracowania sposobu przygotowania próbek do obserwacji. Tkankę jabłka utrwalano w mieszaninie aldehydu glutarowego, formaliny i kwasu octowego a następnie odwadniano w serii stężeń alkoholu etylowego oraz acetonu i poddawano suszeniu w punkcie krytycznym. Wysuszone próbki po naklejeniu na odpowiednią taśmę były analizowane pod mikroskopem, w celu obserwacji struktury ścian komórkowych. Opracowana preparatyka pozwoliła na utrwalenie elementów ścian komórkowych takich jak włókna celulozy. Uzyskano, przy różnych powiększeniach, obrazy struktury bardzo dobrej jakości z wyraźnie widocznymi elementami struktury – włókna celulozowe, które nadają się do analizy ilościowej (Rys. 6) [11, 12].



Rys. 6. Obrazy struktury ścian komórkowych - 1μm x 1μm, Mikroskop Sił Atomowych, AFM: A - utrwalonej tkanki jabłka, B – materiału modelowego (kompozyt celuloza bakteryjna / pektyny / xyloglucan) [11, 12]

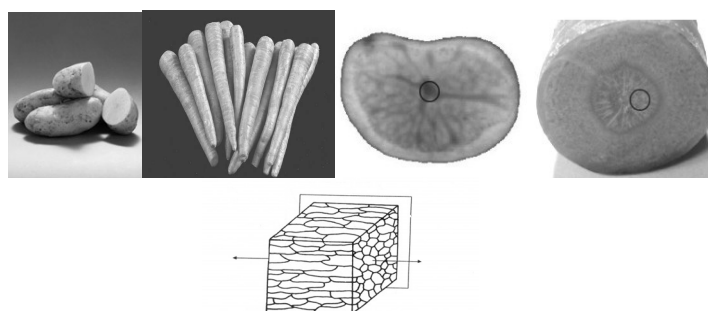
Ilościowa analiza struktury

Praktyczne wykorzystanie badań strukturalnych jest możliwe tylko wtedy, gdy ich wyniki potrafimy opisać przy pomocy liczb. Opis typu lepszy-gorszy jest zbyt subiektywny, by można było go wykorzystać na masową skalę, np. do oceny jakości produktu.

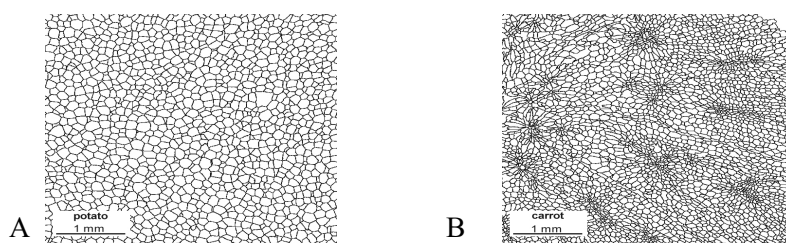
W celu ilościowego opisanie struktury wykorzystuje się metody stereologiczne i analizę obrazu. Rozwój metod ilościowych opisu struktury wiąże się z coraz doskonalszymi metodami mikroskopowych obserwacji, a także coraz precyzyjniejszych opracowań sposobów próbkowania. To właśnie sposób wyboru obiektów do badań decyduje w dużym stopniu o błędzie systematycznym pomiaru [45, 62].

Tkanki roślinne mają niejednorodną i niestabilną strukturę komórkową z często występującymi nieciągłościami dużych rozmiarów. Na podstawie obrazów mikroskopowych można stwierdzić występowanie niejednorodności położenia w obiekcie, a także zorientowanie elementów struktury – niejednorodność anizotropowa. Te cechy decydują o sposobie pobierania prób do analiz oraz o ich liczebności (Rys. 7, 8). Każdy badany obiekt powinien przejść taką wstępną charakterystykę, aby wynik końcowy analizy struktury był reprezentatywny dla interesującego nas obszaru. Istotne znaczenie ma też to, czy wyniki mają opisywać określony fragment badanego obiektu czy też obiekt jako całość.

Coraz doskonalsze cyfrowe techniki zapisu obrazu oglądanej struktury pozwalają na analizę zawartej w nich informacji. Analiza ilościowa może być przeprowadzona na obrazach o bardzo dobrym kontraście, z wyraźnie rozróżnialnymi obiektami – możliwymi do policzenia i zmierzenia. Przede wszystkim z wyraźnie zaznaczonymi ścianami komórkowymi.

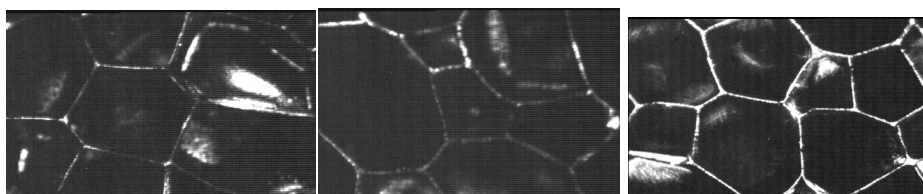


Rys. 7. Przykłady niejednorodności struktury tkanki ziemniaka i marchwi

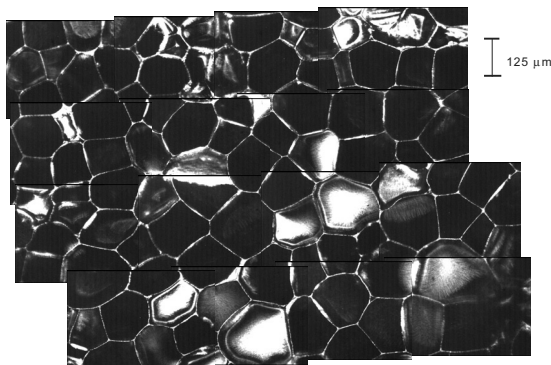


Rys. 8. Obrazy struktury tkanki parenchymy, Konfokalny Mikroskop Laserowy, CSLM: A –ziemniaka, B – marchwi, z wyraźnie widocznymi obszarami niejednorodności struktury [72]

Jednym z problemów, ze względu na duży zakres zmienności wielkości komórek, może być zbyt mała liczba obiektów/komórek widocznych w całości na jednym obrazie. Problem ten można rozwiązać poprzez precyzyjne składanie sąsiadujących ze sobą obrazów, w taki sposób, aby bok obrazu złożonego był przynajmniej 10-krotnie większy. Należy uwzględnić czas trwania takiej operacji, w celu zabezpieczenia próbki przed wyschnięciem – jeśli próbki są w stanie naturalnym (Rys. 9, 10) [25, 28, 40, 45].



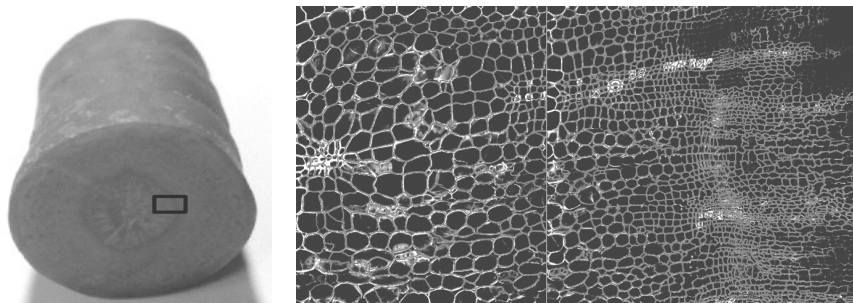
Rys. 9. Przykładowe obrazy struktury komórkowej tkanki parenchymy ziemniaka, Optyczny Mikroskop Konfokalny, TSRLM – wyraźnie widoczne ściany komórkowe natomiast zbyt mało komórek widocznych w całości na jednym obrazie, [26]



Rys. 10. Obraz struktury komórkowej tkanki parenchymy ziemniaka, Optyczny Mikroskop Konfokalny, TSRLM – powstały ze złożenia 16 pojedynczych, sąsiadujących ze sobą obrazów, wystarczających rozmiarów do ilościowej analizy [26]

Badania struktury tkanki roślinnej wymagają wielu pomiarów, wielu obiektów, dlatego chętnie wykorzystuje się metody komputerowe, szczególnie automatyczne. Rozwiązanie takie w praktycznym zastosowaniu, nawet dla bardzo dobrej jakości obrazów, wymaga ciągłej kontroli obserwatora, w celu uniknięcia dużych błędów przypadkowych. Niewielkie przerwy w ścianach komórkowych wynikające z właściwości mikroskopu lub błędów w cięciu próbki, a także widoczne przypadkowe inne obiekty nie będące przedmiotem analizy, powinny być ręcznie skorygowane, a dalsza analiza wykonana komputerowo (Rys.11) [45, 72].

Zaawansowane programy do analizy obrazu, na podstawie dużych zbiorów obrazów i elementów struktury, umożliwiają wyznaczenie średnich wielkości parametrów struktury, a także ich rozkłady, po uprzednim wyznaczeniu minimalnej liczby komórek reprezentatywnych dla całej populacji. Na płaskim obrazie (2D) wielkość komórki określają parametry jej przekroju: powierzchnia, obwód, średnice, natomiast przestrzennie (3D) odpowiednio: objętość i powierzchnia boczna bryły [45, 72].

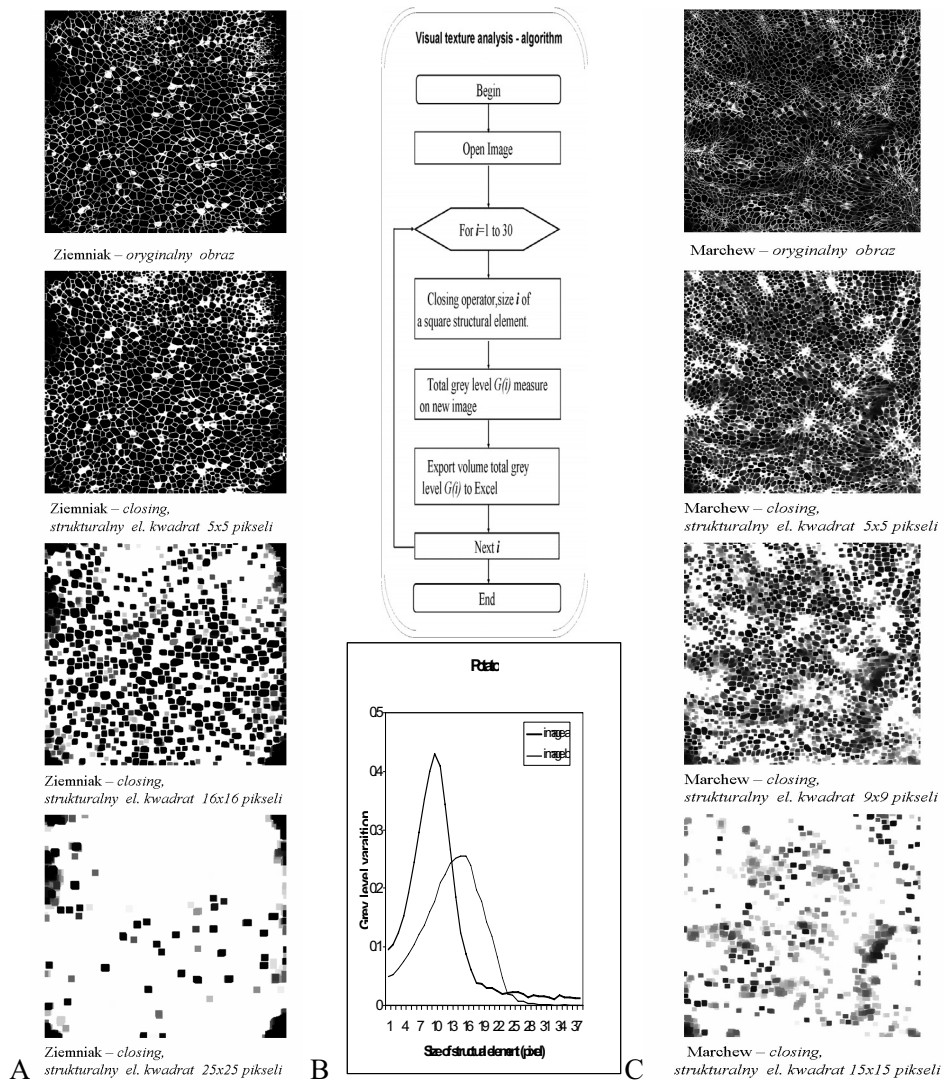


Rys. 11. Przykładowy obraz struktury tkanki parenchymy marchwi, z pogranicza dwóch sąsiednich rodzajów tkanki o zróżnicowanej strukturze, Skanujący Konfokalny Mikroskop Laserowy, CSLM [72]

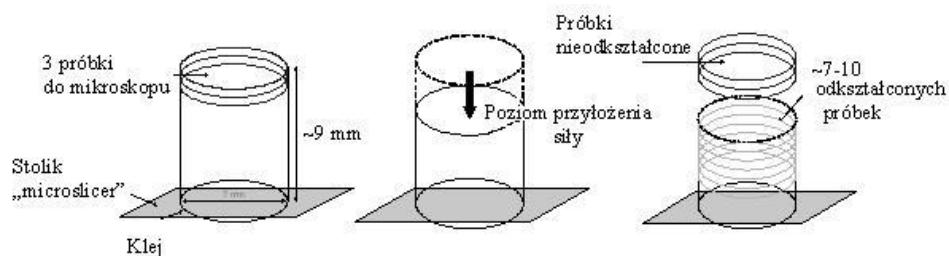
Do najnowszych metod analizy wielkości komórek na obrazie zawierającym dużą ich liczbę, na przykład otrzymanym z mikroskopu konfokalnego lub makroskopu, należy metoda Wizualnej Analizy Tekstury – *Visual Texture Analysis* [20, 65]. Metoda opiera się na wyznaczeniu wariancji poziomu szarości, dla zarejestrowanego obrazu, dla danego typu elementu strukturalnego – kwadrat dla ośrodków izotropowych i odpowiednio element liniowy dla struktur np. o wydłużonych komórkach. Po zastosowaniu kolejnych kroków analizy – zastosowanie operatora zamknięcia, wyznaczenie całkowitego poziomu szarości, ponownie wyznaczenie operatora zamknięcia dla kolejnego rozmiaru elementu strukturalnego i zmierzenie całkowitego poziomu szarości – i wyznaczeniu wariancji poziomu szarości mogą być analizowane rozkłady wielkości komórek na danym obrazie lub wykonywane porównania pod względem wielkości komórek kolejnych obrazów. Główną zaletą metody jest szybkość wykonywanej analizy i możliwość stosowania w przypadku porównywania struktur na złożonych obrazach uzyskanych z różnych mikroskopów (Rys.12).

Oczywiście bardziej złożone analizy należy wykonać dla próbek tkanki, które uległy zniszczeniu podczas deformacji, a ich struktura zawiera pęknięcia w złożonej formie, ze względu na bifurkacje powstałej szczeliny (Rys. 13, 14). W takim przypadku otrzymujemy całe serie obrazów, które oprócz analizy

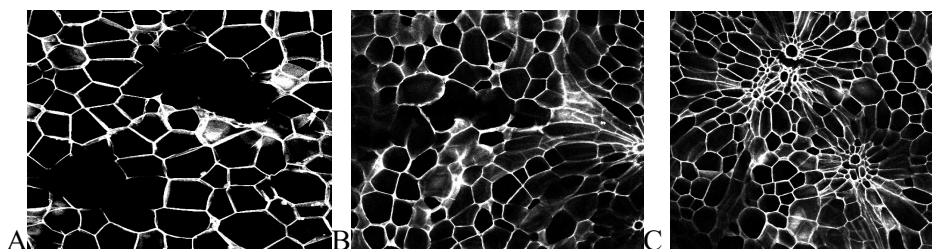
płaskiego obrazu, wymagają złożonych procedur, w celu otrzymania przestrzennych zmian struktury w całej objętości tkanki [70, 71].



Rys. 12. Schemat Wizualnej Analizy Tekstury, VTA: A, C - procesy zmiany obrazów odpowiednio dla tkanki ziemniaka i marchwi, B - algorytm Wizualnej Analizy Tekstury, poniżej przykład zmiany wariancji poziomu szarości od wielkości elementu strukturalnego [65]



Rys. 13. Schemat testu osiowego ściskania próbki tkanki roślinnej z zaznaczonymi przekrojami pobranymi z bezpośredniego sąsiedztwa do analizy struktury początkowej (3 próbki) i po odkształceniu (7-10 próbek) [70, 71]



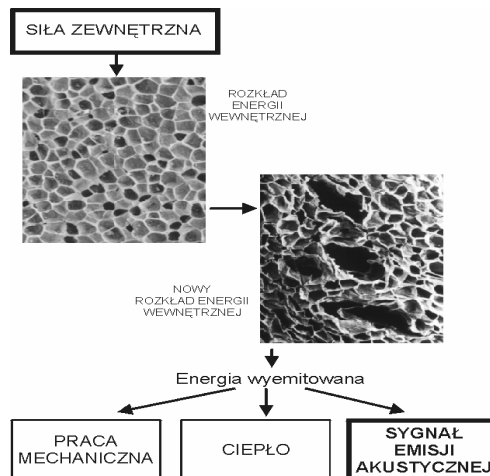
Rys. 14. Uszkodzenia struktury tkanek parenchymy: A – ziemniak, poprzez pęknięcie ścian komórkowych, B, C marchwi – pęknięcia ścian komórkowych, a także mikropęknięcia pomiędzy wiązkami przewodzącymi – rejestrowane zmiany nawet przy bardzo niewielkich odkształceniach [70, 71]

Pęknięcia struktury – metoda emisji akustycznej

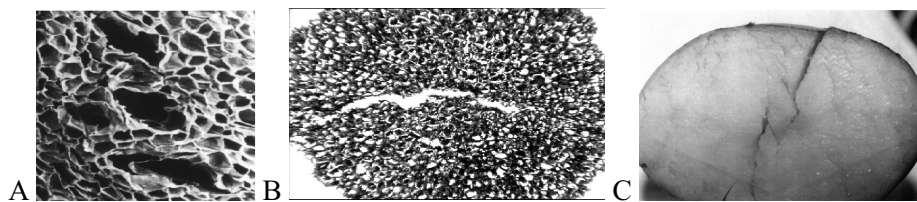
Podstawowym uszkodzeniem struktury komórkowej są pęknięcia ścian komórkowych. Dochodzi do tego pod wpływem działania sił zewnętrznych podczas różnych procesów związanych z uprawą, zbiorem, przechowywaniem i obróbką surowców roślinnych. Do śledzenia procesów pęknięcia ścian

komórkowych, świeżych owoców i warzyw, zainicjowaliśmy badania z wykorzystaniem metody emisji akustycznej (EA)[43, 66, 67, 69].

Uszkodzenia mechaniczne tkanki roślinnej, wywołane np. w różnych testach wytrzymałościowych, powodują pęknięcia struktury komórkowej. Pęknięcia są inicjowane na poziomie pojedynczej komórki i rozwijają się w formie szczeliny poprzez pęknięcie kolejnych komórek. Propagacja pęknięcia może przebiegać poprzez kolejne ściany komórkowe lub pomiędzy komórkami (Rys.15, 16).



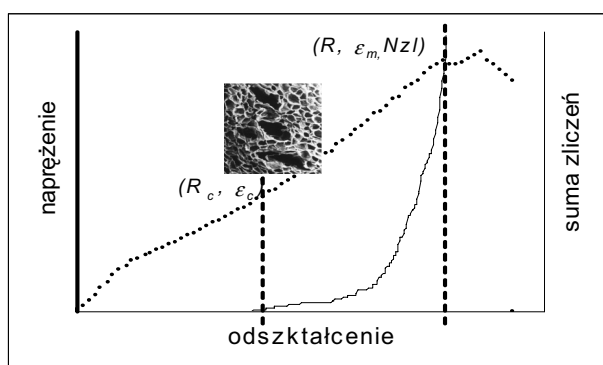
Rys. 15. Schemat powstania sygnału emisji akustycznej w tkance roślinnej [66]



Rys. 16. Rozwój pęknięcia w tkance parenchymy ziemniaka: A – na poziomie komórki, B – na przekroju próbki, C – na przekroju całej bulwy

Zmiany w strukturze komórkowej wywołane pęknięciami generują sygnał emisji akustycznej, który może być rejestrowany i analizowany. Analizy sygnału EA dokonuje się na podstawie wyodrębnienia pewnych charakterystycznych parametrów, tzw. deskryptorów (zliczenia, zdarzenia), a następnie badania ich zmian w czasie oraz w funkcji innych czynników zewnętrznych. Zarejestrowanie sygnału akustycznego w trakcie testu wytrzymałościowego pozwala na wyznaczenie wczesnych stanów pęknięcia struktury, zanim próbka zostanie zniszczona – osiągnie stan wytrzymałości np. w teście ściskania (Rys. 17).

Z zaawansowanych badań w tym zakresie prowadzonych w Zakładzie wynika, że struktura – wielkość komórek, ma wpływ na wytrzymałość tkanki i na parametry sygnału akustycznego.



Rys. 17. Zależność naprężenie-odkształcenie oraz suma zliczeń EA w procesie ściskania tkanki parenchymy ziemniaka, gdzie: (R_c, ε_c) - stan krytyczny (wczesne wykrycie pęknięcia) R_c – naprężenie krytyczne, ε_c - odkształcenie krytyczne, (R, ε_m) granica wytrzymałości, R – naprężenie, ε_m – odkształcenie w granicy wytrzymałości [66]

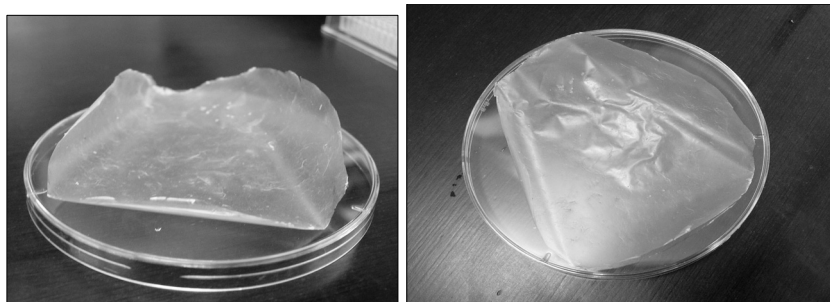
Modelowa ściana komórkowa

Uszkodzenia mechaniczne powodują pęknięcia struktury komórkowej, są inicjowane na poziomie pojedynczej komórki. Szczególną rolę w tym procesie

odgrywają ściany komórkowe. Z jednej strony utrzymują kształt i określają wymiar komórki, zapobiegają uszkodzeniom błony komórkowej, a jednocześnie to ich właściwości decydują o zainicjowaniu procesu pęknięcia całej tkanki [12, 20, 39, 60, 70, 71].

Pierwotne ściany komórkowe są niewielkich rozmiarów i głównie z tego powodu poznanie ich właściwości mechanicznych jest utrudnione. Alternatywą są badania na modelowych materiałach, których właściwości są podobne do naturalnych ścian komórkowych.

Do najnowszych badań Zakładu należą zaawansowane prace nad modelowymi ścianami komórkowymi o właściwościach fizycznych, chemicznych i strukturalnych zbliżonych do rzeczywistych ścian, a jednocześnie o wystarczająco dużych rozmiarach w celu wykonania testów mechanicznych (Rys. 18) [12, 39].



Rys. 18. Modelowy materiał imitujący ścianę komórkową, płytka o wymiarze ~ 8 cm [12]

Uzyskano błonę zbliżoną do rzeczywistej ściany komórkowej jabłka. Poddano ją testom mechanicznym, które wykazały, że ten sztuczny materiał umożliwi w przyszłości symulowanie wpływu różnych czynników na właściwości mechaniczne rzeczywistych ścian komórkowych. Prace zostały zainicjowane we współpracy z Katolickim Uniwersytetem w Leuven i są

kontynuowane we własnych laboratoriach, a także w National Institute of Agronomic Research (INRA) – Nantes.

Wytworzone materiały modelowe poddano także obserwacjom ich struktury pod mikroskopem sił atomowych – AFM. Otrzymano zdjęcia dobrej jakości, z wyraźnie widocznymi mikrofibrilami celulozy. Zdjęcia poddano analizie ilościowej pod kątem charakterystyki elementów strukturalnych – włókien celulozowych. Przeprowadzona ilościowa analiza struktury - chropowatość powierzchni materiałów, średnia długość i grubość mikrofibryli, średnia i maksymalna wysokość profilu - materiałów modelowych oraz dla naturalnej tkanki jabłka pokazała, że wykonane materiały modelowe dobrze odwzorowują strukturę naturalnej tkanki jabłka [12].

Dalszy rozwój metod badawczych

Przedstawione powyżej oryginalne metody badawcze należą do najnowszych w zakresie oceny struktury i właściwości mechanicznych surowców roślinnych. Związane są one z ciągle postępującym rozwojem technik pomiarowych i analitycznych, a także coraz większymi wymaganiami nowoczesnych technologii produkcji na bazie surowców roślinnych. Zależność mikrostruktury i właściwości mechanicznych, szczególnie podatność tkanki roślinnej na uszkodzenia, może być wykorzystana do ciągłej rejestracji jakości, w cyklu produkcyjnym płodów rolnych, kontroli i optymalizacji cech odmianowych, uwzględnienia wpływu wielu czynników na badane cechy, a także ograniczenia strat w całym procesie produkcyjnym.

Dotychczasowe wyniki i ich weryfikacja z klasycznymi metodami oceny jakości są pozytywne. Wykazano możliwość stosowania opracowanych metod do szerokiej klasy materiałów, nie tylko roślinnych, jak owoce, warzywa, nasiona, ziarna, ale również produkty spożywcze, tkanki medyczne, materiały chirurgiczne i stomatologiczne.

Planujemy dalszy rozwój prac prowadzonych przez Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów, przede wszystkim poszerzenie zakresu badanych materiałów i rodzajów tkanek, analizy mikro- i makrostruktury - także analizy 3D, powiązanie mikrostruktury z właściwościami całego obiektu – ocena

jakości, tekstury, modelowych badań nad właściwościami ścian komórkowych, a także wielo-skalowego modelowania właściwości tkanki roślinnej. Kontynuowane będą również prace nad nową, innowacyjną i niedestrukcyjną metodą oceny tych materiałów, opartą na przestrzenno-czasowej korelacji plamkowej.

Dotychczasowe wyniki eksperymentów umożliwiły rozpoczęcie prac nad opracowaniem innowacyjnego urządzenia do określania kruchości i chrupkości oraz innych cech tekstury owoców i warzyw na podstawie metody emisji akustycznej.

Wszystkie metody badania struktury i mechaniki surowców roślinnych mają cechy rozwojowe, i to ze względu na oryginalność rozwiązań metodycznych, jak i bardzo duży potencjał przyszłościowych zastosowań praktycznych.

Literatura

1. Abbott J.A.: Quality measurements of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 1999, 15, 201-225.
2. Alvarez M. D., Canet W. Lopez M.E.: Influence of deformation rate and degree of compression on textural parameters of potato and apple tissues in texture profile analysis. *European Food Research and Technology*, 2002, 215, 13-20.
3. Asacura T., Takai N.: Dynamic laser speckles and their application to velocity measurements of the diffuse object. *Appl. Optics*, 1981, 25(3), 179-194.
4. Baranowski P., Lipecki J., Mazurek W., Walczak R.T.: Detekcja uszkodzeń mechanicznych jabłek z wykorzystaniem termografii. *Acta Agrophysica*, 2005, 125, 6(1), 19-29.
5. Bourne M.C.: *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Academic Press, 2002, London.
6. Brett C., Waldron K.: *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Unwin Hyman, 1990, London.

7. Butz P., Hofmann C., Tauscher B.: Recent developments in noninvasive techniques for fresh fruit and vegetable internal quality analysis. *J. Food Sci.*, 2005, 70(9), 131-141.
8. Chanliaud E., Burrows K.M., Jeronimidis G., Gidley M.J.: Mechanical properties of primary cell wall analogues. *Planta*, 2002, 215:989-996
9. Cybulska J.: Ściany komórkowe a jakość żywności. „Człowiek a środowisko”. Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Kuratorium Oświaty w Lublinie, 2006, Lublin, 119-123.
10. Cybulska J.: Metody badania właściwości teksturalnych owoców i warzyw. „Agrofizyczne metody badawcze”, Prace doktorantów w ramach projektu: „Stypendia dla młodych naukowców szansą agrorozwoju Lubelszczyzny”, EFS ZPORR, IA PAN, 2007, Lublin, 17-23.
11. Cybulska J., Konstankiewicz K.: Cell walls structure investigations by atomic force microscope. *Recent Advances in Agriculture, Food Processing and Waste Policy*, Slovak University of Agriculture in Nitra, 25-26.04.2007.
12. Cybulska J., Konstankiewicz K., Vanstreels E., Nicolaï B.: Selected physical properties of model cell wall materials. *Book of Abstracts, 6-th International Workshop for Young Scientists BioPhys Spring 2007*, Book of abstracts, Lublin, Poland 17-19 May 2007, 19-20.
13. Cybulska J., Zdunek A., Kongsy R., Konstankiewicz K.: Image analysis of apple tissue cells after mechanical deformation. *Acta Agrophysica*, 2008, 11(1), 57-69.
14. Davies L.M., Harris P.J.: Atomic force microscopy of microfibrils in primary cell walls. *Planta*, 2003, 217: 283–289.
15. De Belie N., De Smedt V., De Baerdemaeker J.: Principal component analysis of chewing sounds to detect differences in apple crispness. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 18(2), 109–119.
16. De Belie N., Tu K., Jancsó P., De Baerdemaeker J.: Preliminary study on the influence of turgor pressure on body reflectance of red laser light as a ripeness indicator for apples. *Postharvest Biology and Technology*, 1999, 16, 279–284.

17. De Smedt V., Pauwels E., De Baerdemaeker J., Nicolai B. M.: Microscopic observation of mealiness in apples: a quantitative approach. *Postharvest Biology and Technology*, 1998, 14, 151-158.
18. Delgado A.E., Rubiolo A.C.: Microstructural changes in strawberry after freezing and thawing processes. *Lebensmittel - Wissenschaft und – Technology*, 2005, 38, 135–142.
19. Devaux M-F., Barakat A., Robert P., Bouchet B., Guillon F., Navez B., Lahaye M.: Mechanical breakdown and cell wall structure of mealy tomato pericarp tissue. *Postharvest Biology and Technology*, 2005, 37(3), 209-221.
20. Devaux M.F., Bouchet B., Legland D., Guillon F., Lahaye M.: Macrovision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. *Postharvest Biology and Technology*, doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.06.017.
21. Dobrzański jr.B., Rybczyński R., Gołacki K.: Quality parameter of storage apple as a firmnes. *Int. Agrophysics*, 2000, 14, 149-157.
22. Duizer L.: A review of acoustic research for studying the sensory perception of crisp, crunchy and crackly textures. *Food Science and Technology*, 2001, 12, 17-24.
23. Fornal J., Jeliński T., Sadowska J., Quattrucci E.: Comparison of endosperm microstructure of wheat and durum wheat using digital image analysis. *Int. Agrophysics*, 1999, 13, 215-220.
24. Fornal J., Sadowska J., Ornowski A., Jeliński T., Velikanov L.: Damage resistance and microstructure of barley kernels. *Int. Agrophysics*, 2000, 14, 159-166.
25. Gancarz M., Konstankiewicz K.: Changes of cellular structure of potato tuber parenchyma tissues during storage. *Research in Agricultural Engineering*, 2007, 53(2), 75–78.
26. Gancarz, K. Konstankiewicz, Król A., Pawlak K.: Method for the microscopic image compilation of the potato tuber's cellular structure, *Scientia Agriculturae BOHEMICA*, 2003, 3, 34, 81-85.

27. Gancarz M., Konstankiewicz K., Pawlak K.: Zmienność parametrów struktury komórkowej w bulwie ziemniaka. *Acta Agrophysica*, 2005, 127, 6(3), 625-638.
28. Gancarz M., Konstankiewicz K., Pawlak K., Zdunek A.: Analysis of plant tissue images obtained by confocal tandem scanning reflected light microscope. *Int. Agrophysics*, 2007, 21(1), 49-53.
29. Gondek W., Lewicki P.P., Ranachowski Z.: Influence of water activity on the acoustic properties of breakfast cereals. *Journal of Texture Studies*, 2006, 37, 497-515.
30. Gross K.C., Wang C.Y., Saltveit M.: The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks. *Agricultural Handbook*, 2002, No 66, doi: <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/>.
31. Haman J., Konstankiewicz K.: Destruction processes in the cellular medium of a plant – theoretical approach. *International Agrophysics*, 2000, 14, 37-42.
32. Hepworth D.G., Bruce D.M.: Relationships between primary plant cell wall architecture and mechanical properties for onion bulb scale epidermal cells, *Journal of Texture Studies*, 2004, 586–602.
33. Jackman R.L., D.W. Stanley D.W.: Perspectives in the textural evaluation of plant foods, *Trends in Food Science & Technology*, 1995, 7, Vol. 6, 187-194
34. Junior R., Silva B., Rabelo G., Costa R., Enes A., Cap N., Rabal H.: Reliability of biospeckle image analysis. *Opt. Eng.*, 2006, 45, 390-395.
35. Kalab M., Allan-Wojtas P., Miller S. S.: Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Sci. Technol.*, 1995, 6, 177-186.
36. Konopacka D., Płocharski W.J.: Effect of picking maturity, storage technology and shelf-life on changes of apple firmness of ‘Elstar’, ‘Jonagold’ and ‘Gloster’ cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 2002, 10, 15-26.
37. Konopacka D., Płocharski W.J.: Effect of storage conditions on the relationship between apple firmness and texture acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 32, 205-211.

38. Konstankiewicz K., Cybulska J.: Metodyka preparacji próbek w celu utrwalenia struktury nieodkształconej i odkształconej tkanki roślinnej. Materiały Konferencji „Problemy agrofizyczne kształtowania środowiska rolniczego i jakości surowców żywnościowych”, Fundacja Rozwoju Nauk Agrofizycznych w Lublinie, Lublin, 15-16.05.2007, 130-132.
39. Konstankiewicz K., Cybulska J.: Właściwości mechaniczne modelowych roślinnych ścian komórkowych. Materiały Konferencji „Jakość środowiska, surowców i żywności”, Lublin, 30.03.2007, 41-44.
40. Konstankiewicz K., Czachor H., Gancarz M., Król A., Pawlak K., Zdunek A.: Cell structural parameters of potato tuber tissue. *Int. Agrophysics*. 2002, 16(2), 119-127.
41. Konstankiewicz K., Guc A., and Stoczowska B.: Determination of the structure parameters of potato tuber tissue using specialistic image analysis program. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1998, 7/48, 3, 59-64.
42. Konstankiewicz K., Pawlak K., and Zdunek A.: Quantitative method for determining cell structural parameters of plant tissues. *Int. Agrophysics*, 2001, 15, 161-164.
43. Konstankiewicz K., Zdunek A.: Method of acoustic emission in the studies of cracking processes in plant tissues. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2000, 3(2), doi: www.ejpau.media.pl.
44. Konstankiewicz K., Zdunek A.: Influence of turgor and cell size on the cracking of potato tissue. *International Agrophysics*, 2001, 15(1), 27-30.
45. Konstankiewicz K., Zdunek A.: Micro-structure analysis of plant tissues. Centre of Excellence for Applied Physics in Sustainable Agriculture „Agrophysics”, Lublin 2005, 166.
46. Kunzek H., Kabbert R., Gloyna D.: Aspects of material science in food processing: changes in plant cell walls of fruits and vegetables. *Z Lebensm Unders Forsch*, 1999, A 208:233-50.
47. Lewicki P.P.: Water as the determinant of food engineering properties. A review, *Journal of Food Engineering*, (2004), 61, 483–495.

48. Lewicki P.P., Gondek E., Ranachowski Z.: Influence of water activity on acoustic emission of breakfast cereals. AMAS Workshop on Nondestructive Testing of Materials NTM'03, 2003, 93-109.
49. Marzec A., Lewicki P.P., Ranachowski Z., Dębowski T.: Cereal food texture evaluation with application of mechanical and acoustical methods. AMAS Workshop on Nondestructive Testing of Materials NTM'03, 2003, 111-131.
50. McCann M. C., Bush M., Milioni D., Sado P., Stacey N. J., Catchpole G., Defernez M., Carpita N. C., Hofte H., Ulvskov P., Wilson R. H., Roberts K.: Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall, *Phytochemistry*, 2001, 57 811–821.
51. Niklas K.J.: Plant biomechanics, an engineering approach to plant form and function. The University Chicago Press, 1992.
52. Petran M., Hadrawsky M., and Boyde A.: The tandem scanning reflected light microscope. *Int. Agrophysics*, 1995, 9, 275-286.
53. Pierzynowska-Korniak G., Zadernowski R., Fornal J., Nesterowicz J.: The microstructure of selected apple varieties. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2002, 5(2), doi: www.ejpau.media.pl.
54. Rabal H.J., Arizaga R. A., Cap N.L., Trivi M., Romero G., Alanís E.: Transient phenomena analysis using dynamic speckle patterns. *Opt. Eng.*, 1996, 35(1), 57-62.
55. Renard, C.M.G.C.: Variability in cell wall preparations: quantification and comparison of common methods. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 60, 515–522.
56. Tu K., Chen Y.Y., Ren K., Shao X. F., Dong Q.L., Pan L.Q.: Modelling apple quality changes based on laser scattering image analysis under simulated shelf life conditions. *Acta Hort. (Ishs)*, 2006, 712:371-380, doi: www.actahort.org/books/712/712_42.htm.
57. Tu K. Nicolai B., De Baerdemaeker J.: Effects of relative humidity on apple quality under simulated shelf temperature storage. *Scientia Horticulturae*, 2000, 85, 217-229.

58. Ul'yanov S.S.: Dynamics of statistically-inhomogeneous speckles: a new type of manifestation of Doppler effect. *Optics Letters*, 1995, 20, 1313-1315.
59. Van Zeebroeck M., Van Linden V., Ramon H., De Baerdemaeker J., Nicolai B. M., Tijskens E.: Impact damage of apples during transport and handling. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 45, 157-167.
60. Waldron K.W., Parker M.L., Smith A.C. (2003): Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2003, 2(4), 101-119
61. Wilkinson C., Dijksterhuis G.B., and Minekus M.: From food structure to texture. *Trends in Food Sci. Technol.*, 2000, 11, 442-450.
62. Wojnar L., Kurzydłowski K. J., Szala J. (2002): *Praktyka analizy obrazu*. Polskie Towarzystwo Stereologiczne, Kraków, 2002, 454.
63. Xu Z., Joenathan C., Khorana B.M.: Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens. *Opt. Eng.*, 1995, 34(5), 1487-1502.
64. Zdunek A., Frankevych L., Konstankiewicz K., Ranachowski Z.: Comparison of puncture test, acoustic emission and spatial-temporal speckle correlation technique as methods for apple quality evaluation. *Int. Agrophysics*, 2008, 11(1), 303-315.
65. Zdunek A., Konsky R., Cybulska J., Konstankiewicz K., Umeda M.: Visual texture analysis for cell size measurements from confocal images. *Acta Agrophysica*, 2007, 21(4), 409-415.
66. Zdunek A., Konstankiewicz K.: Emisja akustyczna w badaniu procesów pęknięcia tkanek roślinnych. *Acta Agrophysica*, 2001, 55.
67. Zdunek A., Konstankiewicz K.: Acoustic emission in investigation of plant tissue microcracking. *Transactions of ASAE*. 2004, 47(4), 1171-1177.
68. Zdunek A., Muravsky L.I., Frankevych L., Konstankiewicz K.: New nondestructive method based on spatial-temporal speckle correlation technique for evaluation of apples quality during shelf-life. *Int. Agrophysics*, 2007, 21(3), 305-310.

69. Zdunek A., Ranachowski Z.: Acoustic emission in puncture test of apples during shelf-life. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Agricultural Engineering*, 2006, 9(4),. doi: <http://www.ejpau.media.pl>.
70. Zdunek A., Umeda M.: Influence of cell size and cell wall volume friction on failure properties of potato and carrot tissue. *J. Texture Stud.*, 2005, 36, 25-43.
71. Zdunek A., Umeda M.: Extension and fracture of cell walls after parenchyma tissue deformation. *Biosystems Eng.*, 2006, 93, 3, 269-278.
72. Zdunek A., Umeda M., Konstankiewicz K.: Method of parenchyma cells parametrisation using fluorescence images obtained by confocal scanning laser microscope. *Electronic J. Polish Agricultural Universities, Agric.Eng.*, 2004, 7(1). doi: <http://www.ejpau.media.pl>.

9. Emisja akustyczna w badaniach żywności

ZBIGNIEW RANACHOWSKI

Wstęp

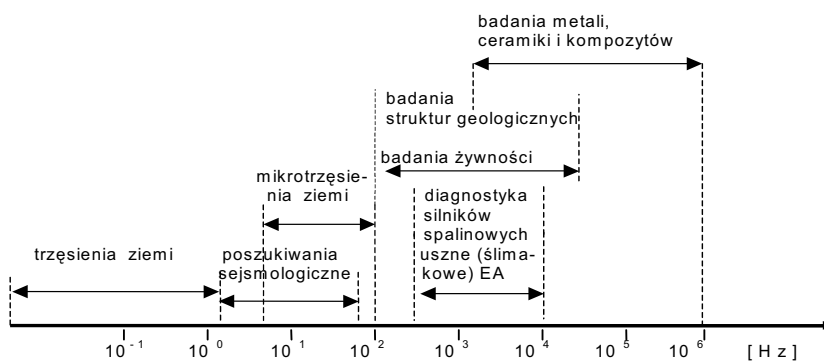
Przedmiotem niniejszego opracowania jest omówienie zastosowania metody pomiaru emisji akustycznej w badaniach żywności, ze szczególnym uwzględnieniem badań krajowych. Terminem emisja akustyczna (EA) określa się zjawisko generacji i propagacji fal sprężystych w różnych ośrodkach stałych i cieczech. Źródłem tych fal są zarówno procesy rozwoju mikropęknięć, generacja i anihilacja dyslokacji lub wzajemne przemieszczanie się fragmentów badanego ośrodka połączone z tarcieniem. Metoda EA jest obecnie szeroko stosowana przy badaniu właściwości mechanicznych oraz przemian fazowych różnych obiektów w wielu dziedzinach nauki i techniki. Zalety wyróżniające omawianą metodę na tle innych metod służących wyznaczaniu własności fizykochemicznych ciał stałych i cieczy, wynikają z podstawowej zasady pomiaru emisji akustycznej. Źródłem rejestrowanego sygnału jest w tym przypadku energia generowana przez niejednorodności badanego ośrodka, w wyniku wywołanej z zewnątrz stymulacji albo normalnej eksploatacji obiektu. Ideę pomiaru sygnału EA przedstawiono na rysunku 1.

Różnicą pomiędzy klasycznymi sygnałami akustycznymi (np. mowy) a emisją akustyczną jest znacznie szersze pasmo częstotliwości tej ostatniej - od pojedynczych herców do megaherców. W pomiarach emisji akustycznej sygnał docierający do sensora pokazanego na rysunku 1 pozwala na wnioskowanie o naturze jego źródła pokazanego po lewej stronie rysunku. Zakres częstotliwości sygnału EA, rejestrowanego w różnych obiektach, przedstawiono na rysunku 2. Rejestracja i analiza sygnałów z tak szerokiego przedziału

częstotliwości narzuca specyficzne wymagania stosowanej aparaturze i metodom obróbki zarejestrowanych danych eksperymentalnych.



Rys. 1. Schemat blokowy systemu do pomiaru emisji akustycznej



Rys. 2. Zakres częstotliwości sygnału EA rejestrowanego w różnych obiektach

Analityczny opis propagacji fal sprężystych w pobliżu źródła EA jest złożony [11], natomiast jeżeli przyjmiemy model źródła punktowego i punkt obserwacji znacznie od niego oddalony, to możemy rozważyć następujący układ równań w ośrodku [14], który charakteryzuje się objętościowym modułem sprężystości:

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} = \nabla p \quad (1)$$

$$\rho \frac{\partial p}{\partial t} = K \nabla v \quad (2)$$

$$\frac{\omega^2}{K} p + \frac{1}{\rho} \nabla \nabla p = 0 \quad (3)$$

W powyższych równaniach przyjęto: ρ - gęstość materiału, $v(x,y,z,t)$ – prędkość fali sprężystej w materiale, $p(x,y,z,t)$ – wartość ciśnienia w kierunkach x,y,z , ∇ - operator gradientu. Ponadto założono harmoniczną postać funkcji ciśnienia i prędkości od czasu t , co w omawianym modelu implikuje zależność:

$$\frac{\partial^2 p(x, y, z, t)}{\partial t^2} = -\omega^2 p(x, y, z, t)$$

Równania 1, 2, 3 pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- w ośrodku o własnościach sprężystych, który został pobudzony do drgań przez źródło EA generują się fale sprężyste o *częstotliwościach* ω [rad/s];
- generowana częstotliwość jest wyższa w materiałach o wyższym module sprężystości K , zależy ona również od postaci funkcji ciśnienia $p(x,y,z,t)$ w obszarze źródła EA wywołujących proces generacji sygnału EA;
- parametry sygnału EA zależą zarówno od stałych materiałowych ośrodka, jak i od charakteru pobudzenia do drgań - możliwe jest po analizie zarejestrowanego sygnału EA uzyskiwanie informacji o stałych materiałowych badanego ośrodka, a także o charakterze jego pobudzenia.

Pół wieku badań żywności metodami akustycznymi

Poniżej zostaną omówione jedynie wybrane doniesienia literaturowe z zakresu badań żywności w wybranych ośrodkach, natomiast następne rozdziały będą poświęcone pracom prowadzonym we współpracy z Katedrą Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji SGGW w Warszawie i precyzyjnemu opisowi obecnie stosowanej metodyki pomiaru. W literaturze omawiającej powyższą tematykę jako prekursorów badań żywności metodami akustycznymi wymienia

się prace: Drake [2], Vickers i Bourne [17], Roudaut i wsp. [13] oraz Tesch i wsp. [16]. Dźwięki emitowane przez produkty spożywcze były początkowo rejestrowane za pomocą mikrofonów pracujących w paśmie 16 – 16000 Hz. Po wymaganym wzmocnieniu sygnału materiał badawczy rejestrowany był na magnetofonie, a począwszy od lat osiemdziesiątych przy zastosowaniu komputera z układem wejścia i wyjścia sygnału akustycznego (karty dźwiękowej). Ważnym zagadnieniem związanym z procesem rejestracji sygnału akustycznego była zastosowana procedura obciążania mechanicznego produktów. Wymienione wyżej zespoły badawcze prowadziły eksperymenty stosując następujące metody:

- żucia w jamie ustnej,
- ręcznego kruszenia za pomocą szczypiec,
- od początku lat siedemdziesiątych stopniowo przechodzą na bardziej powtarzalną i obiektywną metodę, to jest stosując specjalnie zaprojektowane maszyny, w których narzędzie robocze penetrowało, ścisnęło lub zginało próbkę, przesuując się z jednostajną prędkością i umożliwiając rejestrację siły obciążającej próbkę. Maszyny do obciążania mechanicznego próbek żywności określano nazwą teksturometrów.

Badania Drake [2] wykazały, że dźwięki wytwarzane podczas kruszenia produktów różnią się między sobą pod względem amplitudy, częstotliwości dominujących w charakterystyce widmowej tych dźwięków, a także pod względem przebiegu zmian natężenia mierzonego sygnału. Wykazano, że produkty chrupkie generują w trakcie gryzienia dźwięki o swoistej, impulsowo-szumowej charakterystyce widmowej [17]. Analiza częstotliwości generowanych przez te produkty wykazała, że sygnał zawiera składowe z przedziału 0 – 10 kHz. Wymienieni badacze wysunęli hipotezę, że odczuwany stopień chrupkości produktu jest skorelowany z amplitudą mierzonego sygnału. Vickers i Bourne [17] prowadzili badania, czy dźwięk kruszonych produktów spożywczych zawiera informację charakterystyczną dla struktury badanego produktu. W tym celu wyznaczono prawdopodobieństwa poprawnej identyfikacji produktu poprzez odsłuch nagranych wcześniej zapisu sygnału z populacji 18 produktów. Odsetek prawidłowych rezultatów tylko dla dwóch

produktów przekroczył 50%, a dla pozostałych zawierał się w przedziale od 0 do 44 %.

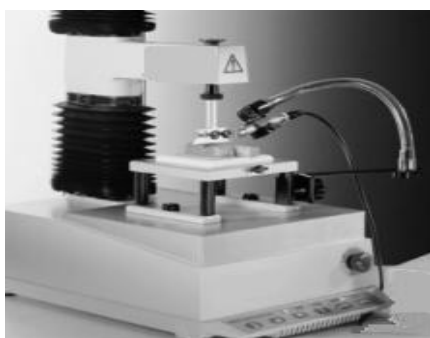
Efekty akustyczne związane z zawartością wody i jej transportem w badanych produktach spożywczych - mierzone aktywnością wody były opisywane w wielu pracach. Interesujące wyniki eksperymentalne uzyskali Tesch i wsp. [16], którzy poddali badaniom dwa produkty (chrupki serowe i kostki grzankowe), sezonowane w eksykatorach w celu uzyskania równowagowego poziomu wilgotności strukturalnej w gradacji ośmiopoziomowej. W wyniku sezonowania uzyskano w produkcie poziomy aktywności wody (a_w) 0,11; 0,23; 0,33; 0,43; 0,52; 0,57; 0,65 i 0,75. Na każdym z tych poziomów mierzono cechy charakterystyczne widma akustycznego próbek produktów – dynamikę gęstości widmowej, dewiację standardową zbioru próbek sygnału, amplitudę maksymalną oraz wartość średnią zbioru próbek sygnału. W ten sposób wyznaczono precyzyjne ilościowe deskryptory (czyli parametry) badanego sygnału, który charakteryzował się złożoną postacią. Uzyskane rezultaty pozwoliły jednoznacznie i precyzyjnie ustalić, że wszystkie wyżej wymienione deskryptory sygnału wskazywały na istnienie maksimum chrupkości dla aktywności wody na poziomie 0,23 oraz na uplastycznienie produktu i monotoniczny spadek chrupkości dla poziomów aktywności wody wyższych w zakresie 0,23 – 1,0. Charakterystyczny dla technologów żywności parametr badanych produktów chrupkość, był równolegle oceniany metodą sensoryczną.

Późniejsze badania Marzec [4], wykonywane przy zastosowaniu mechanicznych teksturometrów do kruszenia uprzednio sezonowanych próbek produktów, potwierdzają zasadniczo wyniki uzyskane przez Tescha i wsp. [16]. W niektórych produktach brak wyraźnego maksimum deskryptora, odwzorowującego intensywność mierzonego sygnału akustycznego, natomiast we wszystkich produktach absorbujących wodę w przedziale aktywności wody 0,4 – 0,6 jest rejestrowana wyraźna zmiana właściwości akustycznych produktu. Powyższa konkluzja pozwala na postawienie tezy, że badanie sygnału akustycznego generowanego w produktach żywnościowych, w których objętościowo lub lokalnie dochodzi do zmiany aktywności wody umożliwia,

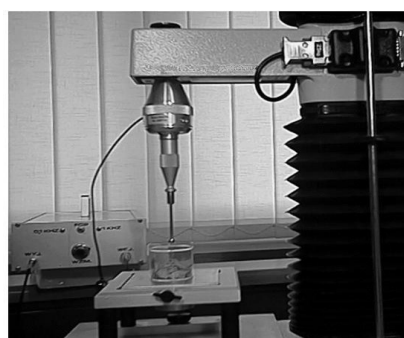
dogodne i szybkie pomiary zmian teksturalnych tych produktów. Jest również możliwe, że prezentowane dalej metody analizy sygnału akustycznego pozwolą na śledzenie wpływu zmian ilościowych innych składników produktów żywnościowych (tłuszcze, sole mineralne) na teksturę badanych produktów.

Sposób prowadzenia kontaktowych pomiarów sygnału akustycznego

Obecnie w wielu laboratoriach technologii żywności prowadzone są pomiary sygnału akustycznego generowanego w procesie kruszenia produktów żywnościowych. Badania te są wykonywane przy użyciu tekstuometrów wyposażonych w mikrofon i wzmacniacz sygnałów akustycznych. Na fotografii 1 pokazano sposób umieszczenia mikrofonu w pobliżu trawersy tekstuometru.



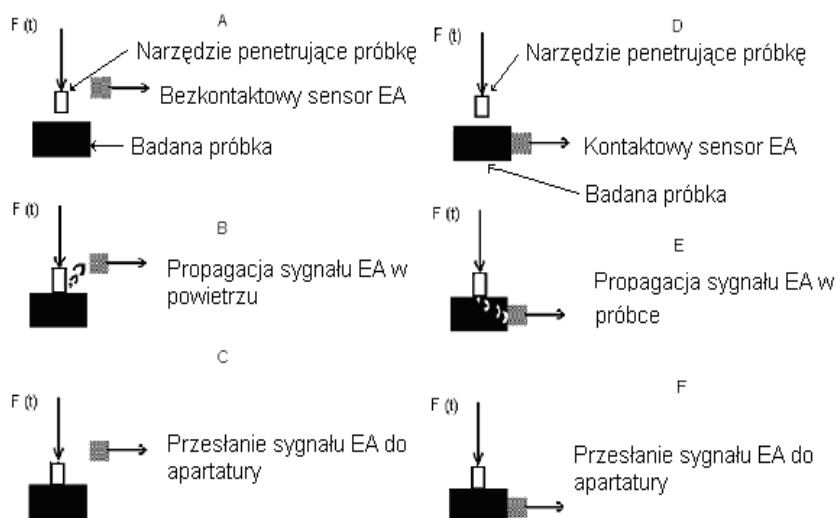
Fot. 1. Widok trawersy tekstuometru wraz z mikrofonem do rejestracji dźwięków generowanych w trakcie kruszenia próbki żywności



Fot. 2. Tekstuometr wyposażony w kontaktowy adapter do rejestracji EA, będący w eksploatacji SGGW w Warszawie, w Katedrze Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji

Rejestracja dźwięków generowanych w trakcie kruszenia produktów spożywczych jest złożonym problemem, ponieważ dźwięki te mają niską energię, w porównaniu do energii tła akustycznego w sposób nieunikniony

rejestrowanego przez mikrofon. Dlatego zaprojektowano kontaktową metodę zapisu rozważanego sygnału dźwiękowego (Fot. 2) [8]. Różnicę pomiędzy urządzeniami stosującymi bezkontaktową i kontaktową metodę rejestracji sygnału akustycznego przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 4. Różnica pomiędzy urządzeniami stosującymi bezkontaktową (A, B, C) i kontaktową (D, E, F) metodę rejestracji sygnału akustycznego

W metodzie kontaktowej pomiędzy ruchomym trzpieniem trawersy maszyny wytrzymałościowej a końcówką obciążającą mechanicznie próbkę (np. narzędzie testu przebicia) umieszczono specjalnie zaprojektowany adapter drgań. Wewnątrz adaptera znajduje się kontaktowy sensor drgań o czułości wystarczającej do badań procesów kruszenia produktów spożywczych, tj. 8 mV/ms^{-2} (przy pojemności własnej 1 nF) oraz o odpowiednim częstotliwościowym paśmie przenoszenia od 1 do 15000 Hz. Grubościenna obudowa adaptera drgań jest przystosowana do przenoszenia wymaganych obciążeń mechanicznych, a ponadto tłumi dźwięki generowane w otoczeniu aparatury. Fale sprężyste o częstotliwościach akustycznych, powstające w trakcie

kruszenia produktów spożywczych, są transmitowane od powierzchni tego produktu do kontaktowego sensora drgań (akcelerometru) poprzez narzędzie robocze. Badania prowadzone przy zastosowaniu opisanego wyżej adaptera oraz precyzyjnej maszyny wytrzymałościowej o niskim poziomie wibracji generowanych w trakcie kruszenia produktów zbożowych wykazały, że zastosowany układ pomiarowy posiada wymaganą czułość przy rejestracji sygnałów dźwiękowych pochodzących z badanej próbki i jednocześnie nie rejestruje tła akustycznego z otoczenia. Podobne układy pomiarowe były stosowane w pomiarach procesów zużycia łożysk tocznych oraz w badaniach własności mechanicznych próbek drewna i kompozytów szkło-epoksydy [15].

Mierzone sygnały emisji akustycznej są, podobnie jak te opisane w pracy Tescha i wsp. [16], wzmacniane w liniowym wzmacniaczu niskoszumnym, a następnie zapisywane w pamięci komputera PC przy zastosowaniu dźwiękowej karty przetwarzania analogowo – cyfrowego z częstotliwością próbkowania 44.1 kHz. Zapis sygnału w formacie standardowego pliku dźwiękowego umożliwia dalszą obróbkę wyników przy zastosowaniu wielu istniejących na rynku edytorów dźwięku. Autor niniejszej pracy zastosował specjalistyczną kartę przetwarzania analogowo – cyfrowego firmy Adlink Technology Inc. typu 9112, umożliwiającą zapis siły obciążającej badaną próbkę łącznie z zapisem emisji akustycznej, a także zmianę częstotliwości próbkowania.

Charakterystyki amplitudowo – czasowe zarejestrowanych sygnałów EA

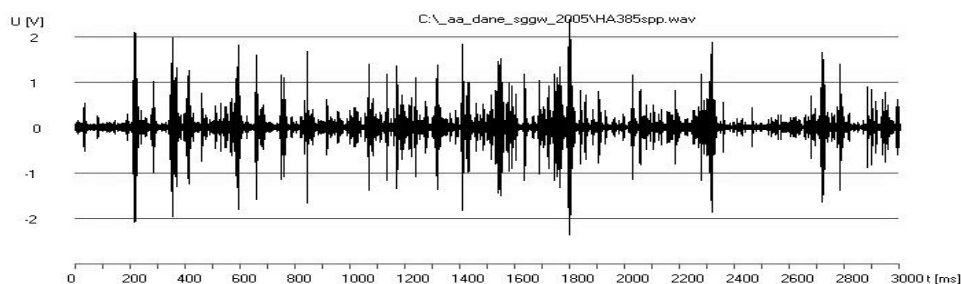
Charakterystyka amplitudowo – czasowa sygnału kruchego produktu zbożowego (Rys. 5) zostanie niżej przedstawiona na przykładzie badania wykonanego przez Marzec [4]. Kromki chrupkiego pieczywa pszennego, poddano zginaniu trójpunktowemu w maszynie wytrzymałościowej Zwick 1445.

Dla uzyskania wysokiej rozdzielczości czasowej (jeden pixel na rysunku = 5 ms) pokazano pierwsze trzy sekundy zapisów. Zależność, zarejestrowanego w trakcie badania próbki natężenia sygnału emisji akustycznej od czasu, jest faktycznie rejestrowana, jako wartość skuteczna (RMS) sygnału i oznaczona jako $v(t)$ [jednostka - Wolty]. W pamięci komputera jest reprezentowana jako ciąg cyfrowych próbek (ang. digital samples) sygnału zmierzonych w chwilach

czasu oddalonych od siebie o T_1 w omawianym przypadku wynoszący $22,7 \mu\text{s}$. Zarejestrowany ciąg próbek sygnału, który poddawany zostanie dalszej obróbce, przedstawić można symbolicznie jako: $v(mT_1)$, gdzie m równe $0, 1, 2, \dots$ jest kolejnym numerem próbki sygnału. Najprostszym deskrytorem (parametrem) dla zbioru próbek sygnału emisji akustycznej z pomiaru pojedynczego produktu jest suma wartości skutecznego sygnału zmierzona w czasie np. 10 sekund pomiaru. Deskryptor ten potocznie bywa nazywany „energią zarejestrowanego sygnału E ” i można go zapisać za pomocą następującego wzoru:

$$E = \sum_{m=1}^N v(mT_1) \quad (4)$$

W omawianym badaniu czas pomiaru sygnału EA wynosił 10 sekund, a parametr N we wzorze (4) był równy 441000. Bliższa analiza zależności amplitudowo – czasowych pokazanych na rysunku 5 pozwala sądzić, że proces generacji sygnału EA ma postać serii krótkich impulsów o zmieniającym się natężeniu. Procedury umożliwiające zliczanie tych impulsów i wyznaczające parametry tych impulsów w celu ich klasyfikacji zostaną przedstawione w następnym rozdziale.



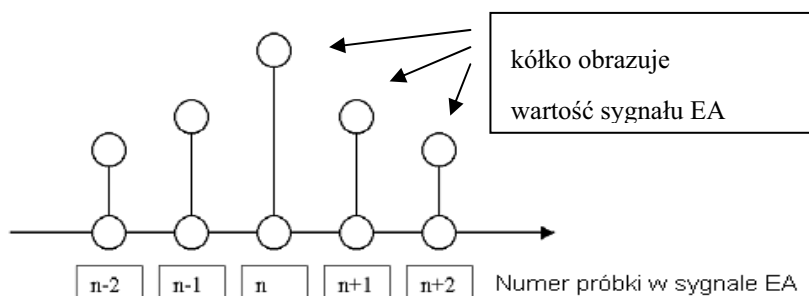
Rys. 5. Wykres amplitudowo-czasowy wzmacnionych sygnałów emisji akustycznej generowanych podczas trójpunktowego zginania próbek [4]

Analiza parametrów amplitudowo – czasowych dla pojedynczych zdarzeń emisji akustycznej

Na podstawie wykresu amplitudowo – czasowego, można wyznaczyć impulsy EA, które są przez badaczy emisji akustycznej nazywane zdarzeniami emisji akustycznej (ang. acoustic emission events). Przy zastosowaniu odpowiedniego powiększenia fragmentów sygnału okazuje się, że w zapisach można wyróżnić dominujące pod względem ilościowym krótkie impulsy o czasie trwania około 100 mikrosekund i zbliżonej amplitudzie, które następując szybko po sobie formują charakterystyczny „chrupki” dźwięk. Bardziej szczegółowa analiza zapisu zdarzeń EA pozwala na określenie liczby zdarzeń w obrębie każdego zapisu oraz rozkład maksymalnych energii sygnału w obrębie tych zdarzeń. Aby dokonać takiej analizy autor niniejszej pracy zaprojektował oprogramowanie, którego celem była automatyczna detekcja zdarzeń EA. Zadaniem tego oprogramowania było wykrycie początku impulsu, przyjmując za kryterium zadaną wielkość chwilowej energii sygnału, opisanej wzorem (2), a następnie wykryć jego koniec, po którym jest rejestrowany pewien stały poziom tła. Jako umowny koniec impulsu przyjęto chwilę, kiedy chwilowa wartość energii sygnału zmaleje o połowę, w porównaniu do przyjętego wcześniej progu detekcji jego początku. Po wykryciu impulsu poszukiwanie następnego zdarzenia emisji akustycznej następuje po pominięciu dwóch kolejnych próbek sygnału, aby utrudnić ponowne wykrycie „końcówki” tego samego zdarzenia. Schemat przeszukiwania zarejestrowanego zbioru próbek sygnału został pokazany na rysunku 6. Zbiór przeszukiwany jest z przesunięciem, co jedną próbkę sygnału. W każdym kroku porównywana jest z zadanym przez eksperymentatora progiem detekcji energia sumy wartości sygnału dla n-tej próbki, jej dwóch poprzedników i dwóch próbek następnych.

Oprogramowanie przygotowane do analizy parametrów amplitudowo – czasowych pojedynczych zdarzeń EA analizowało zbiór wyników zapisu wartości skutecznej zarejestrowanego sygnału EA (próbek sygnału), zapisywanych co 22,7 μ s. W celu odróżnienia zjawiska wystąpienia zdarzenia EA od zarejestrowanego tła akustycznego, przyjęto kryterium wykorzystujące parametry zdarzeń EA o maksymalnej zmierzonej energii. Suma wartości

skutecznych sygnału w trakcie trwania tych zdarzeń wynosiła około 20 000 mV. Przyjęto dwie wartości progowe: 10% oraz 5% maksymalnej sumy odczytów.



Rys. 6. Schemat przeszukiwania zarejestrowanego zbioru próbek sygnału emisji akustycznej generowanego w procesie kruszenia próbki produktu spożywczego w celu detekcji zdarzeń (krótkich impulsów) emisji akustycznej. Pokazane próbki sygnału różnią się między sobą wartością skuteczną. Indeks n oznacza numer kolejnej próbki sygnału

Wyniki wyznaczenia parametrów amplitudowo – czasowych dla badanych próbek pieczywa chrupkiego o różnej aktywności wody zamieszczono w tabeli 1. Analiza przedstawionych danych pozwala na stwierdzenie następujących prawidłowości:

- liczba zdarzeń EA rejestrowanych na wyższym i niższym poziomie progowym maleje wraz ze wzrostem wilgotności strukturalnej próbek;
- maksymalna wartość napięcia skutecznego zarejestrowanych zdarzeń zmienia się nieznacznie;
- ponieważ ze wzrostem poziomu wilgotności strukturalnej próbek maleje całkowita liczba rejestrowanych zdarzeń EA, zatem można przyjąć: ze wzrostem poziomu wilgotności strukturalnej maleje energia sygnału mierzona w obrębie zdarzeń EA w trakcie ściskania próbek.

Tab. 1. Parametry zdarzeń emisji akustycznej wyodrębnionych w sygnale zarejestrowanym w trakcie zginania trójpunktowego próbek pieczywa pszennego, w nawiasie podano wartość odchylenia standardowego [9]

Aktywność wody pieczywa chrupkiego	Liczba zdarzeń EA (niższy poziom detekcji)	Liczba zdarzeń EA, (wyższy poziom detekcji)	Maksymalna wartość skuteczna sygnału zarejestrowana w obrębie zdarzenia EA, [mV]
0,037	9691 (2435)	217 (65)	124,5 (1)
0,330	8515 (719)	290 (157)	123,2 (2)
0,408	8664 (856)	170 (33)	120,1 (2)
0,530	5866 (1442)	114 (34)	124,5 (2)
0,750	1091 (312)	26 (9)	112,1 (2)

Charakterystyka widmowa mierzonego sygnału emisji akustycznej

W celu wyjaśnienia metody konstruowania charakterystyki widmowej sygnału, która odzwierciedla jej zmiany, poniżej zostanie podany wzór na wyznaczenie funkcji gęstości widmowej (ang. *power spectrum function*) sygnału EA. Rozważając ciągły sygnał emisji akustycznej $v(t)$ w wybranym przedziale czasu, możemy go przedstawić w formie sumy jego składników częstotliwościowych. Zależność ta jest przedstawiana jako $A(\omega)$, gdzie ω (pulsacja) jest analogiem częstotliwości f , określonym jako $\omega = 2\pi f$. Przy założeniu bezwzględnej całkowalności funkcji $v(t)$, może zostać ona liniowo przekształcona na funkcję gęstości widmowej $A(\omega)$ według poniższego wzoru (przekształcenie Fouriera):

$$v(t) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} A(\omega) \sin[\omega t + (\varphi)] d\omega \quad (5)$$

gdzie: φ jest parametrem reprezentującym fazę przekształcanego sygnału.

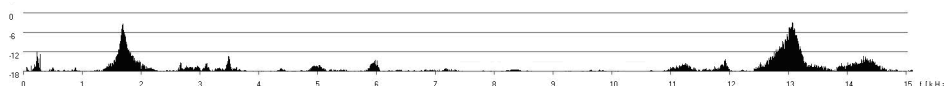
Opracowano komputerową procedurę wyznaczania funkcji gęstości widmowej $A(\omega)$, umożliwiającą porównywanie natężenia zmierzonego sygnału

w wybranych przedziałach częstotliwościowych [11]. Zarejestrowany sygnał jest dzielony na sekcje o długości $\frac{1}{4}$ sekundy. Potem następuje sprawdzenie czy w sekcji jest zawarte zdarzenie emisji akustycznej w sposób analogiczny do opisanego w poprzednim rozdziale. Następnie wyznaczana jest cyfrowa postać funkcji gęstości widmowej przy wykorzystaniu 4000 próbek sygnału sąsiadujących z centralną próbką wykrytego zdarzenia emisji akustycznej. W wyniku zastosowania procedury opisanej powyżej uzyskuje się eliminację zakłóceń pochodzących od napędu maszyny wytrzymałościowej, a ponadto jest wykonywane przekształcenie fragmentów sygnału z zachowaniem tej samej fazy φ , co minimalizuje zniekształcenia wyznaczonej charakterystyki widmowej. Charakterystyki widmowe wszystkich wykrytych zdarzeń emisji akustycznej są rejestrowane w pamięci komputera, a w fazie końcowej wyznaczana jest uśredniona charakterystyka widmowa z całego przebiegu badania próbki żywności. Wynikiem działania programu jest zbiór 1360 współczynników odwzorowujących charakterystykę widmową procesu. Odtwarzany jest zakres częstotliwości od 11 Hz do 15000 Hz, przy czym kolejne współczynniki odwzorowują wartość funkcji gęstości widmowej w kolejnych przedziałach: 11 – 22 Hz, 22 – 33 Hz itd. Algorytm przekształcający zbiór próbek sygnału na zbiór współczynników gęstości widmowej $c_n v(mT_1) \Rightarrow c_n(\omega)$ jest realizowany według poniższego wzoru przybliżonego [10]:

$$C_n = \frac{1}{N} \sum_{m=0}^{N-1} v(mT_1) \text{mod}(e^{jn2\pi m/N}) \quad (6)$$

gdzie: j oznacza $\sqrt{-1}$, a mod - moduł wyrażenia zespolonego.

Charakterystyka widmowa posiada układ charakterystycznych maksimów na osi częstotliwości. Dla pieczywa można wyróżnić dwa charakterystyczne maksima: w przedziale częstotliwości 1-3 kHz oraz 12 do 15 kHz (Rys. 7).



Rys. 7. Charakterystyka widmowa sygnału emisji akustycznej generowanego w trakcie zginania trójpunktowego próbek pieczywa pszennego [4, 9]

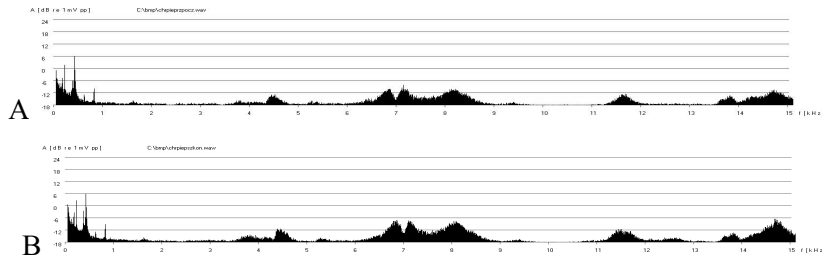
Charakter propagacji fal sprężystych w paśmie 1 kHz i powyżej 10 kHz jest odmienny, ponieważ długość propagowanych fal różni się o rząd wielkości. Efekt ten sprawia, że tłumienie fal o różnej długości jest również odmienne. W próbkach suchych lepiej propagują się fale o niższej częstotliwości, natomiast w próbkach uplastycznionych, o dużym poziomie wilgotności strukturalnej – fale o wyższych częstotliwościach. W związku z tym, możliwe jest skonstruowanie bezwymiarowego współczynnika, zwanego współczynnikiem nachylenia charakterystyki widmowej β , który jest ilorazem energii sygnału emisji akustycznej w paśmie wysokich częstotliwości oraz energii sygnału w paśmie niskich częstotliwości. Optymalne warunki pomiaru tego współczynnika są podczas próby ściskania produktu, ponieważ fale sprężyste propagują się od kruszonych części objętości próbki do płaskiej płyty ściskającej badaną próbkę poprzez większą objętość próbki niż w przypadku przełamania tej próbki. Korzystając z wzoru (6) można określić współczynnik nachylenia charakterystyki widmowej β_p , dla pieczywa chrupkiego ekstrudowanego [4, 5, 9]:

$$P_{12-15} = \sum_{n=12kHz}^{n=15kHz} c_n, \quad P_{1-2} = \sum_{n=1kHz}^{n=3kHz} c_n, \quad \beta_p = P_{12-15} / P_{1-2} \quad (7)$$

Odmienne typy charakterystyki widmowej zaobserwować można w twardszych produktach – na przykład w badanych w masie płatkach kukurydzianych [12]. W produktach tych można wyróżnić charakterystyczne maksima aktywności akustycznej w przedziałach częstotliwości 2-7, 7-9 oraz 14-15 kHz.

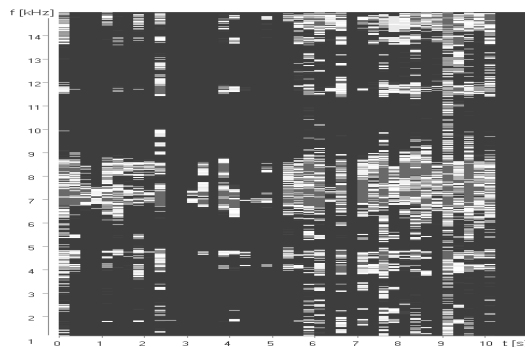
Akustogramy złożonych procesów obciążania mechanicznego

Zdaniem autora niniejszej pracy nie jest właściwym wyznaczanie deskryptorów akustycznych, takich jak liczba zdarzeń emisji akustycznej lub współczynnik nachylenia charakterystyki widmowej dla produktów o złożonej budowie, np. biszkoptów z polewą czekoladową. Lepszym rozwiązaniem jest określenie właściwości osobno dla różniących się właściwościami mechanicznymi składników produktu. Możliwe jest badanie obszaru styku tych produktów, chociażby w celu wykrycia pustek powietrznych. Badanie ewoluującego w czasie sygnału akustycznego obiektu niejednorodnego prowadzi się przy zastosowaniu tzw. akustogramów [5]. Są to wykresy w układzie trzech zmiennych. Na osi poziomej są odwzorowane krótkie przedziały czasu, w obrębie których sygnał akustyczny podlega dekompozycji na składniki częstotliwościowe, na osi pionowej pokazane są częstotliwości składowe sygnału (wyznaczone np. wg wzoru 6), natomiast kolor segmentu w układzie czas – częstotliwość odpowiada chwilowej wartości funkcji gęstości widmowej. Możliwy jest również odczyt wartości liczbowej funkcji gęstości widmowej w wybranym przedziale czasu. Wyniki otrzymane przy zastosowaniu omawianej metody zostaną przedstawione na przykładzie sygnału akustycznego zarejestrowanego w trakcie ściskania chrupek ziemniaczanych z dodatkiem przyprawy smakowej pikantnej charakteryzujących się aktywnością wody 0,14. Chrupki były ściskane w cylindrze o średnicy 30 mm i wysokości 60 mm przez okres 25 sekund. W trakcie procesu ściskania za pomocą metalowego tłoka produkt ulegał stopniowemu utwardzeniu. Dlatego współczynnik nachylenia charakterystyki widmowej β_k zmierzony dla początkowych 10 sekund wynosił 0,58, a dla końcowych 10 sekund wzrósł do 0,60. Charakterystykę widmową omawianego produktu wyznaczono dla pierwszych 10 (Rys. 8A) i ostatnich 10 sekund eksperymentu (Rys. 8B). W wyniku wzrostu upakowania chrupek w trakcie badania teksturometrycznego w końcowych 10 s eksperymentu wzrosło uśrednione natężenie rejestrowanego sygnału dla częstotliwości powyżej 3 kHz. Prawdopodobnie omawiany efekt został spowodowany zmniejszeniem się współczynnika tłumienia fal sprężystych produktu o wyższej gęstości pozornej.



Rys. 8. Charakterystyka widmowa wyznaczona w trakcie ściskania chipsów ziemniaczanych o $a_w = 0,14$, dla: A - pierwszych 10 s; B - ostatnich 10 s eksperymentu trwającego 20 s

To samo zjawisko można zaobserwować na akustogramie środkowych 10 s zapisu uzyskanego w trakcie tego samego badania (Rys. 9). Na przedstawionym akustogramie wyraźnie widoczny jest stopniowy wzrost gęstości widmowej sygnału w pasmach częstotliwości 2 – 8 oraz 14 – 15 kHz.



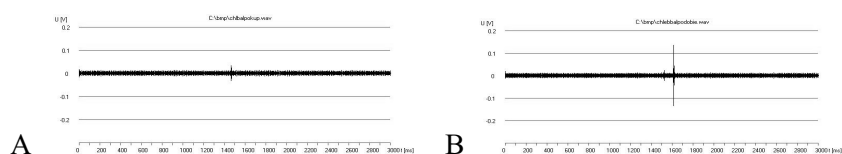
Rys. 9. Akustogram środkowych 10 s badania produktu pokazanego na rys. 8

Zobrazowanie i badanie charakterystyki widmowej procesów z generacją niskich poziomów energii

Istnieje możliwość pomiarów emisji akustycznej w produktach silnie uplastycznionych, gdzie energia generowanego sygnału jest o więcej niż rząd

wielkości niższa niż w przypadku próbek pieczywa chrupkiego lub płatków śniadaniowych badanych w masie. Przykładem takich badań może być monitorowanie zmian tekstury chleba w trakcie jego czerstwienia [6]. Badania takie przeprowadzono z wykorzystaniem maszyny wytrzymałościowej Zwick 1445 z końcówką w postaci pręta o średnicy 1/8 cala zakończonego sferą o średnicy 1/4 cala [5, 6].

Analiza uzyskanych wyników pozwala stwierdzić, że możliwa jest rejestracja i ocena energii sygnału emisji akustycznej generowanej w procesie przebijania skórki pieczywa (Rys. 10). Ze względu na niską energię sygnału generowanego w procesie przebijania skórki pieczywa, zastosowano 10 – krotne wzmocnienie sygnału emisji akustycznej w stosunku do prezentowanego na rysunku 6.



Rys. 10. Wykres amplitudowo – czasowy sygnału generowanego w procesie testu przebicia, zarejestrowanego: A - w pieczywie mieszanym świeżym; B - po 24 godzinach przechowywania w temperaturze 25°C i wilgotności względnej powietrza 30%

W przypadku badania sygnałów emisji akustycznej o niskiej energii i krótkim czasie trwania (poniżej 1000 próbek sygnału), nie jest możliwe efektywne zbadanie ich charakterystyki widmowej przy zastosowaniu dyskretnego przekształcenie Fouriera (wzór 5), ponieważ w celu zapewnienia wymaganej dokładności należy przeprowadzić procedurę sumowania po dostatecznej liczbie niezerowych próbek sygnału. Oprogramowanie zaprojektowane przez autora niniejszej pracy dokonywało efektywnej analizy widmowej sygnału generowanego przez produkt charakteryzujący się

aktywnością akustyczną trwającą, co najmniej 100 milisekund. Do badania efektów niskoenergetycznych została zastosowana metoda falkowej analizy sygnału emisji akustycznej. Przy zastosowaniu tej metody analizy krótkich impulsów sygnału przyjmuje się założenie, że wynikowa charakterystyka częstotliwościowo – czasowa badanego sygnału zostanie określona z mniejszą dokładnością (przedziałowo), niż to byłoby możliwe, gdyby określano oddzielnie metodami przedstawionymi wcześniej, osobno charakterystykę amplitudowo – czasową albo charakterystykę widmową liczniejszego zbioru próbek analizowanego sygnału.

Jeśli rozważamy ciąg $v(mT_1)$, omawiany we wzorze 6 oraz wyznaczony w wyniku podanego przekształcenia ciąg c_n współczynników charakterystyki widmowej, przy czym każdy ze współczynników c_n opisuje fragment charakterystyki widmowej oznaczonej jako $\Delta\omega$ to w dokładności jednoczesnego określenia położenia na osi czasu i częstotliwości podlegamy ograniczeniu zwanemu *zasadą nieoznaczoności Heisenberga* [14]:

$$\Delta t \Delta \omega \geq 1/4\pi$$

Oznacza to, że jeśli w oknie obserwacji chcemy uzyskać dużo wyrazów, to musimy do przekształcenia Fouriera wprowadzić dwa razy tyle próbek sygnału $m = 2n$, co powiększa czas trwania obserwacji sygnału. Jeśli zmniejszamy m , to w otrzymanym zbiorze wynikowym współczynników c_n coraz silniej widoczny jest wpływ próbek sygnału z okolicy początku i końca okna czasowego. Jest to tak zwany efekt okna prostokątnego skutkujący pojawieniem się dodatkowych zniekształceń - wyrazów c_n o amplitudzie $\sim 1/n$

Stosując metodę dekompozycji falkowej analizujemy sygnał z gorszą rozdzielczością w dziedzinie częstotliwości, w porównaniu do przekształcenia Fouriera, natomiast otrzymujemy informację, jak zmieniała się charakterystyka widmowa sygnału w kolejnych (względnie krótkich) przedziałach czasu. Używając tej metody możemy dokonać wizualizacji krótkich impulsów, co jest ważne przy analizowaniu typowych zapisów sygnału emisji akustycznej.

W wyniku procesu dekompozycji falkowej ciąg próbek sygnału $f(mT_1)$ jest przekształcany w dwuwymiarowy zbiór we współrzędnych czas – częstotliwość, w wyniku zastosowania względnie prostego algorytmu. Polega on na

wyznaczaniu iloczynów skalarnych segmentów ciągu próbek ze zbiorem wektorów zwanych rodziną falek. Falki powstają poprzez modyfikację pewnej formy podstawowej:

$$\Psi_{mn}(t) = a_0^{m/2} \psi(a_0^m t n b_0) \quad (8)$$

gdzie: przy założeniu ciągłej funkcji czasu t dla uproszczenia rozważań: $\Psi(t)$ - funkcja *falki* podstawowej, $\Psi_{mn}(t)$ - rodzina *falek* wygenerowana poprzez m -krotne wydłużenie bazy i n -krotne przesunięcie na osi czasu, a_0 - współczynnik skali, b_0 - współczynnik przesunięcia na osi czasu, m, n - indeksy całkowite.

W opracowanym oprogramowaniu rodzina falek została wygenerowana w oparciu o układ dwóch podzbiorów falek podstawowych będących ośmioelementowymi zbiorami dyskretnej funkcji sinus. Dwa podzbiory są przesunięte względem siebie o $\frac{1}{4}$ okresu, natomiast kolejne wydłużenie bazy przebiegało o jedną jednostkę, co odpowiadało czasowi $T/1$ [1].

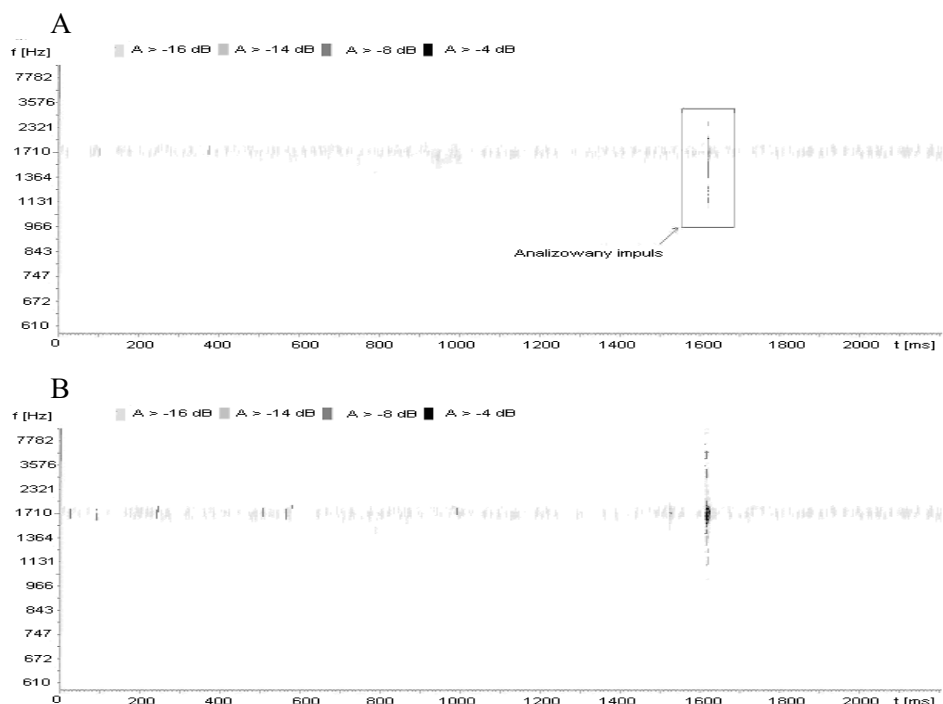
W wyniku działania oprogramowania otrzymano dwuwymiarową tablicę (w układzie czas - częstotliwość), opisującą chwilowe wartości skuteczne sygnału. Na osi pionowej uzyskiwanego w ten sposób zobrazowania usytuowane są indeksy kolejnych wierszy tablicy dekompozycji, odpowiadające wyznaczonym częstotliwościom wyróżnionym w sygnale (można rozpatrywać działanie falek jako zbioru filtrów środkowoprzepustowych). Wyróżnione częstotliwości są na skali usytuowane według układu hiperbolicznego:

$$F_m = (\text{częstotliwość próbkowania} * 3 / (8 + m - 1)) \text{ [Hz]} \quad (9)$$

gdzie: m - rząd falki wg wzoru na $\Psi_{mn}(t)$ podanego wyżej, *częstotliwość próbkowania* wynosi 44,100 Hz.

W rozwiązaniu praktycznym, które zostanie niżej przybliżone na przykładzie, uzyskano rozdzielczość w dziedzinie czasu 2,5 ms przy jednoczesnym określeniu 200 współczynników opisujących charakterystykę widmową badanego impulsu. Poniżej na rysunku 11 pokazano projekcję

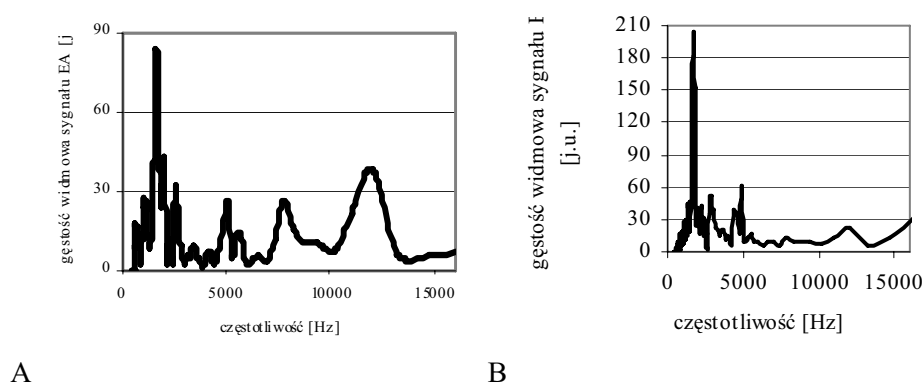
sygnałów z rysunku 10 (test penetracyjny chleba), tym razem w projekcji uzyskanej w wyniku dekompozycji falkowej.



Rys. 11. Projekcja sygnałów EA o niskiej energii zarejestrowanych w trakcie testu penetracyjnego chleba: A – świeżego; B - po 24 godzinach przechowywania. Projekcja w układzie czas – częstotliwość

Na rysunku 11A przedstawiono słaby pojedynczy impuls emisji akustycznej generowany w trakcie przebijania świeżej skórki o aktywności wody 0,81. Na rysunku 11B przedstawiono kilkakrotnie mocniejszy impuls emisji akustycznej generowany w trakcie przebijania skórki pieczywa, które było czerstwe (po 24 godz. przechowywania w temperaturze 25⁰C i wilgotności względnej powietrza 30%). W skórce tego pieczywa aktywność wody wynosiła 0,79.

Na rysunku 12 przedstawiono charakterystykę widmową dwóch impulsów sygnału, analizowanych wcześniej i przedstawionych na rysunku 11. Porównanie rysunku 12A i 12B pozwala stwierdzić, że również przy badaniu słabych impulsów emisji akustycznej można zaobserwować analogiczną zależność stosunku energii sygnału emisji akustycznej pasma 12 – 15 kHz do energii akustycznej pasma 1 – 2 kHz.



Rys. 12. Charakterystyka widmowa dwóch impulsów sygnału, przedstawionych na rys. 11; A - chleb świeży, B - chleb po 24h przechowywania [6].

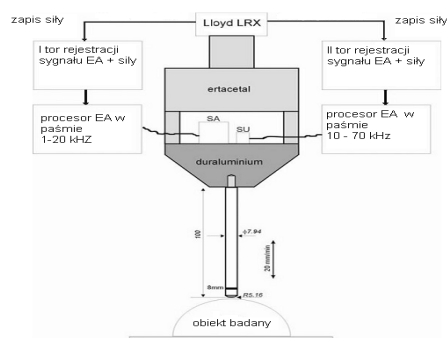
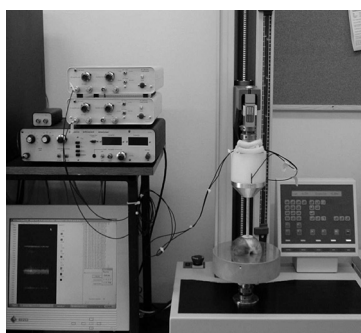
Badanie jakości owoców i warzyw

Procesy chemiczne zachodzące w ścianach komórkowych warzyw i owoców podczas ich dojrzewania, przechowywania i gotowania, zmieniające wytrzymałość mechaniczną ścian komórkowych mają zasadniczy wpływ na zmiany tekstury tych produktów. Badania jakości owoców i warzyw, z wykorzystaniem metody EA są prowadzone w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie. Konstankiewicz i Zdunek [16] jako pierwsi autorzy opublikowali wyniki pomiarów EA generowanej w procesie niszczenia tkanki bulwy ziemniaka pod wpływem sił zewnętrznych w teście jednoosiowego ściskania cylindrycznej próbki. Badania prowadzone przez cytowanych autorów dla różnych tkanek roślinnych wykazały, że w tych materiałach źródłami sygnału EA są:

- pękanie ścian komórkowych,
- pękanie międzykomórkowych połączeń pektynowych oraz
- tarcie narzędzia obciążającego mechanicznie próbkę o fragmenty tkanki.

Sygnał EA pojawia się przed osiągnięciem granicy płynności i wytrzymałości biologicznej, a początek jego rejestracji przypisuje się warunkom rozpoczęcia pęknięcia struktury komórkowej.

W ostatnich latach ukazały się prace Zdunka i Konstankiewicz [17] oraz Zdunka i Ranachowskiego [18] dotyczące badania procesów degradacji tkanek owoców w zależności od czasu ich przechowywania. Eksperymenty prowadzone są na autorskim stanowisku badawczym zaprojektowanym w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie, z zastosowaniem oprogramowania wykonanego przez autora niniejszej pracy. Widok stanowiska i jego schemat funkcjonalny jest pokazany na fotografii 3. Obiekt badany jest, podczas testu przebicia, za pomocą końcówki roboczej umieszczonej w dolnej części adaptera sygnału EA. Górna część adaptera wykonana jest z tworzywa ertacetal, tłumiącego tło akustyczne, natomiast dolna część adaptera jest wykonana z duralu. Wewnątrz adaptera wbudowano dwa sensory EA: pracujący w niższym paśmie częstotliwości (1 – 16 kHz) i oznaczony symbolem SA oraz pracujący w wyższym paśmie częstotliwości (10 – 70 kHz) i oznaczony symbolem SU. Sygnały EA oraz pochodzące z maszyny wytrzymałościowej Lloyd LRX napięcie proporcjonalne do przyłożonej siły są rejestrowane w dwóch komputerach PC przy użyciu kart przetworników analogowo/cyfrowych [20].



Fot. 3. Widok i zasada działania stanowiska do badania jakości owoców i warzyw [18]

Użytecznym w celach poznawczych przykładem zastosowania sygnału EA do badań wpływu procesu przechowywania produktu na jego parametry teksturalne będzie przytoczenie wyników opisanych przez Zdunka i Ranachowskiego [18]. Badania przeprowadzono na 3 odmianach jabłek: Champion, Idared i Jonagold. Owoce były przechowywane w symulowanych warunkach obrotu handlowego (w temperaturze pokojowej i wilgotności 30 – 60%) przez 10 dni. Po 1, 3, 6, 8 i 10 dniu serie po 5 sztuk były poddane testowi penetracyjnemu na stanowisku pokazanym na fotografii 3 [18]. W ramach badań mierzono:

- utratę wagi W [%],
- osmotyczność (koncentrację substancji osmotycznie czynnych) O [osmol/kg],
- jędrność F , określaną jako maksymalna siłę zmierzoną podczas testu przebiccia [N],
- pracę w teście przebiccia T [J],
- sumę zdarzeń EA w paśmie niższym NL [-],
- energię zdarzeń EA w paśmie niższym EL [μ J],
- sumę zdarzeń EA w paśmie wyższym NH [-],
- energię zdarzeń EA w paśmie niższym EH [μ J].

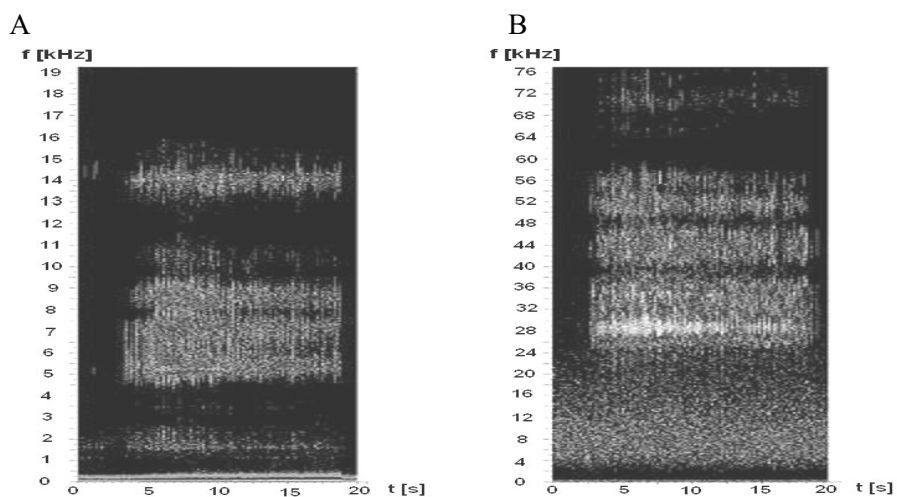
W tabeli 1 przedstawiono przykładowe wyniki obliczeń korelacji wzajemnej pomiędzy ośmioma zmierzonymi parametrami teksturalnymi i akustycznymi. W trakcie testu przebiccia otrzymano akustogramy sygnału EA w niższym i wyższym paśmie (Rys.13).

Zaprezentowane wyżej wyniki badań testów penetracyjnych owoców pozwalają stwierdzić, że w przypadku badania owoców w trakcie ich przechowywania, kiedy zachodzi znaczący ubytek wagi, proces ten skorelowany jest ze spadkiem ich jędrności i pracy w teście przebiccia. Również obserwuje się znaczącą korelację wszystkich zmierzonych parametrów EA ze zmianami parametrów strukturalnych, przy czym nieco wyższą od innych zgodność wykazuje pomiar liczby zliczeń w niższym paśmie akustycznym (1–16 kHz) [18].

Tab. 1. Tablica korelacji wzajemnych wyznaczona dla odmiany Idared [18]

	Dni	W	O	F	T	NL	EL	NH	EH
Dni	1	0,99**	0,34*	0,02	-0,01	0,39**	0,36**	0,16	0,31*
W		0,35*	0,03	0,02	0,39**	0,36**	0,15	0,30*	W
O			1	0,27	0,26	0,02	-0,01	-0,09	O
F				1	0,97**	0,47**	0,50**	0,57**	F
T					1	0,49**	0,52**	0,60**	T
NL						1	0,99**	0,83**	NL
EL							1	0,88**	EL
NH								1	0,95**

* współczynnik istotności $P < 0,05$; ** współczynnik istotności $P < 0,01$



Rys. 13. Typowe akustogramy sygnału EA otrzymane w trakcie testu przebicia jabłka: A- w niższym; B – w wyższym paśmie częstotliwości

Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiono metodę pomiaru sygnału emisji akustycznej w badaniach parametrów teksturalnych wybranych produktów spożywczych. Wykazano, że wiele produktów emituje sygnał EA w trakcie indywidualnie dla każdego z nich opracowanych testów. Istnieje możliwość określania parametrów strukturalnych przy pomocy analizy parametrów sygnału EA, z których omówiono: detekcję i sumowanie zdarzeń EA, energię sygnału EA oraz własności charakterystyki widmowej tego sygnału. Liczne prace, które zostały opublikowane w ostatnim pięćdziesięcioleciu z tej dziedziny, potwierdzają przydatność metody EA w badaniach żywności.

Literatura

1. Białasiewicz J.T.: Falki i aproksymacje. WNT, 2000, Warszawa.
2. Drake B.K.: Food crunching sounds. An introductory study. *J. Food Sci.*, 1963, 28, 233 – 241.
3. Guzik J., Wojtyniak M., Olszowski S., Marczak M., Ranachowski Z.: Investigation of Acoustic Emission Signal Generated in the Friction Pair Lubricated with Oils Containing Various Lubricity Additives. *Engineering Trans.*, 2006, 54, 2, 159 – 166.
4. Marzec A.: Wpływ aktywności wody na właściwości mechaniczne i akustyczne pieczywa chrupkiego. Praca doktorska, SGGW, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, 2002, Warszawa.
5. Marzec A., Lewicki P., Ranachowski Z.: Właściwości mechaniczne i akustyczne suchych produktów zbożowych. *Inżynieria Rolnicza*, 2005, 69(9), 207 – 214.
6. Marzec A., Lewicki P.P., Ranachowski Z., Dębowski T.: Cereal food texture evaluation with application of mechanical and acoustical method. *Nondestructive Testing of Materials and Structures*, Wyd. IPPT PAN, 2003, 111 – 131.
7. Marzec A., Lewicki P., Ranachowski Z.: Investigation of staling of bread using mechanical and acoustic methods. *Materiały z LI Otwartego*

- Seminarium z Akustyki, Gdańsk - Sobieszewo, 2004, 429 – 432.
8. Paupolis A: *Circuits and Systems. A Modern Approach*. Wyd. Holt, Rinehart and Winston, 1980, New York.
 9. Ranachowski Z.: *Metody pomiaru i analiza sygnału emisji akustycznej*. Prace IPPT PAN, 7, 1997, Warszawa.
 10. Ranachowski Z., Gondek E., Lewicki P.P., Marzec A.: *Investigation of acoustic properties of compressed wheat bran flakes*. *Archives of Acoustics*, 2005, 30(2), 255-266.
 11. Roudaut G., Dacremont C., Le Meste M.: *Influence of water on the crispness of cereal – based foods: acoustic, mechanical, and sensory studies*. *Journal of Texture Studies*, 1998, 29, 199 – 213.
 12. Sanchez-Morcillo V., Perez-Arjona I.: *Subdiffractive propagation in a bidimensional sonic crystal*. *Hydroacoustics*, 10, ed. Polish Acoustical Soc. Gdańsk, 2007, 85 – 92.
 13. Stephens R.W.B., Pollock A.A.: *Waveforms and Frequency Spectra of Acoustic Emission*. *Journal of the Acoustic Society of America*, 1971, 50, 3, 904 – 910.
 14. Tesch R., Normand M., Peleg M.: *Comparison of the acoustic and mechanical signatures of two cellular crunchy cereal foods at various water activity levels*. *Journal of Food and Agricultural Sciences*, 1996, 70, 347 – 354.
 15. Vickers Z. M., Bourne M.C. (1976): *A psychoacoustical theory of crispness*. *J. Food Sci.*, 1976, 41, 1158-1164.
 16. Zdunek A., Konstankiewicz K.: *Acoustic emission as a method for the detection of fractures in the plant tissue caused by the external forces*. *Int. Agrophysics*, 1997, 11, 223 – 227.
 17. Zdunek A., Konstankiewicz K.: *Emisja akustyczna w badaniu procesów pęknięcia tkanek roślinnych*. *Acta Agrophysica*, 2001, 55.
 18. Zdunek A., Ranachowski Z.: *Acoustic Emission in Puncture Test of Apples during Shelf –Life*. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2006, 9, 4, www.ejpau.media.pl

CZĘŚĆ III

WYBRANE ASPEKTY ZAPEWNIENIA JAKOŚCI I BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOŚCI

10. Komunikacja z klientem elementem budowy zaufania do marki

ANDRZEJ CZUBAŁA

Wstęp

Oczywistym i typowym działaniem producentów jest dążenie do wyprodukowania i wypromowania artykułów rolno-spożywczych o charakterystycznych cechach jakościowych, zarówno tych sensorycznych, jak i związanych ze sposobem opakowania, oznakowania czy prezentacji. Takie działania wychodzą naprzeciw oczekiwaniom klientów, którzy systematycznie podnoszą swoje wymagania dotyczące cech sensorycznych i ich powtarzalności, sposobu i zakresu informacji zamieszczanych na produkcie czy też sposobu prezentacji. Wszystkie te cechy wchodzą w skład pojęcia **jakości handlowej**, która definiowana jest jako: „*cechy artykułu rolno-spożywczego, dotyczące jego właściwości organoleptycznych, fizykochemicznych i mikrobiologicznych w zakresie technologii produkcji, wielkości lub masy oraz wymagania wynikające ze sposobu produkcji, opakowania, prezentacji i oznakowania, nieobjęte wymaganiami sanitarnymi, weterynaryjnymi lub fitosanitarnymi*”. Pojęcie jakości handlowej, wchodzi w szeroki zakres prawa żywnościowego, którego ogólne zasady zostały zawarte w Rozporządzeniu (WE) nr 17 8/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r., ustanawiającym ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołującym Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiającym procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. **Prawo żywnościowe**, zdefiniowane w art.3, „*oznacza przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne regulujące sprawy żywności w ogólności, a ich bezpieczeństwo w szczególności, zarówno na poziomie Wspólnoty, jak i na poziomie krajowym; definicja ta obejmuje wszystkie etapy produkcji, przetwarzania i dystrybucji żywności oraz paszy produkowanej dla*

zwierząt hodowlanych lub używanej do żywienia zwierząt hodowlanych”. Prawo żywnościowe ma na celu ochronę interesów konsumentów i powinno stanowić podstawę dokonywania przez konsumentów **świadomego wyboru**, związanego ze spożywaną przez nich żywnością .

Prawo to ma na celu zapobieganie:

- oszukańczym lub podstępny praktykom;
- fałszowaniu żywności;
- wszelkim innym praktykom, mogącym wprowadzić konsumenta w błąd.

Jednocześnie podkreśla się, iż w przypadku etykietowania, reklamy i prezentacji żywności lub pasz, z uwzględnieniem ich kształtu, wyglądu lub opakowania, używanych opakowań, sposobu ułożenia i miejsca wystawienia oraz informacji udostępnianych na ich temat w jakikolwiek sposób, **nie może wprowadzać konsumenta w błąd**.

Prawo żywnościowe określa również odpowiedzialność:

o **podmiotów** działających na rynku spożywczym i pasz za zapewnienie na wszystkich etapach produkcji, przetwarzania i dystrybucji w przedsiębiorstwach będących pod ich kontrolą, zgodności produkowanej żywności lub pasz z wymaganiami prawa żywnościowego właściwymi dla ich działalności i kontrolowanie tych wymogów;

o **Państw Członkowskich** za wprowadzenie w życie prawa żywnościowego oraz monitorowanie i kontrolowanie przestrzegania przez podmioty działające na rynku spożywczym odpowiednich wymogów prawa żywnościowego na wszystkich etapach produkcji, przetwarzania i dystrybucji.

W Polsce urzędową kontrolę żywności prowadzi kilka urzędów, a w zakresie jakości handlowej Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych oraz Inspekcja Handlowa. Bazując na informacjach publikowanych przez te urzędy, przedstawiam sytuację panującą w wybranych branżach.

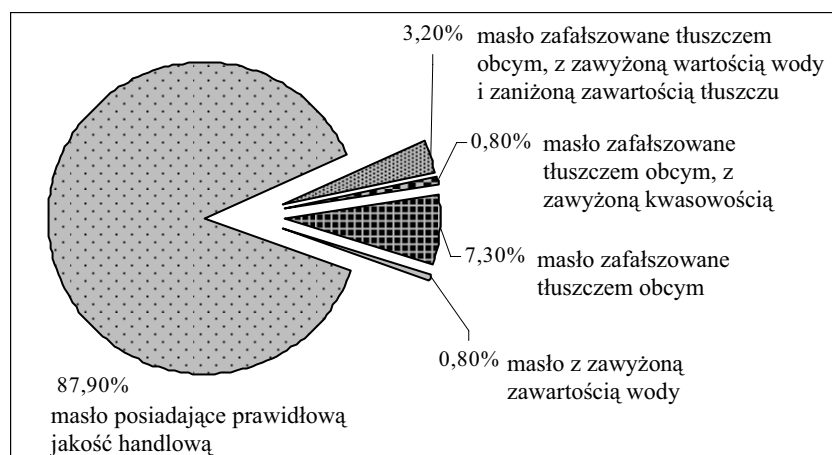
Kontrola jakości masła

W latach 2005 – 2006 wyżej wspomniane inspekcje przeprowadziły na rynku masła szereg kontroli jakości handlowej. Działania te potwierdziły opinię, iż na rynku pojawiło się masło zafałszowane dodatkiem tłuszczów roślinnych. Oprócz zmian cech fizykochemicznych stwierdzono również liczne nieprawidłowości w sposobie znakowania produktów oraz ich prezentacji.

Tab.1. Skala i efekty urzędowych działań kontrolnych

MASŁO	Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych I kwartał 2006	Inspekcja Handlowa IV kwartał 2005	Inspekcja Handlowa I kwartał 2006
Liczba województw na terenie, których przeprowadzono kontrolę	8	8	16
Liczba skontrolowanych partii masła pod kątem zafałszowań	124	81	43
Liczba zafałszowanych partii masła	14	37	21

Inspekcje dokonując w sposób skoordynowany, w różnych obszarach (IH-handel detaliczny; IJHARS – producenci) kontroli 248 partii masła stwierdziły zafałszowanie w przypadku 72 partii, tj. 29,03% (Tab. 1). W przypadku działań IH stwierdzono 58 zafałszowanych partii masła, co stanowi 46,77% ogółu kontrolowanych partii przez tę inspekcję. Działania IJHARS objęły 124 partie masła i stwierdził zafałszowania w przypadku 14 partii, tj. 11,3% ogółu kontrolowanych partii przez tę inspekcję.



Rys.1. Rodzaje stwierdzonych zafałszowań

W przypadku 3,2% kwestionowanych partii, masło zafałszowano tłuszczem obcym oraz stwierdzono zawyżoną zawartość wody, 0,8% stanowiły partie zafałszowane tłuszczem obcym, a dodatkowo posiadały zawyżoną kwasowość; 7,3% to partie zafałszowane tłuszczem obcym, a w przypadku 0,8% partii zawyżono zawartość wody (Rys. 1). Rodzaj stwierdzonych nieprawidłowości potwierdza świadomą działalność producenta na szkodę konsumenta, a tym samym poważnie podważa jego zaufanie, nie tylko do poszczególnych producentów, ale również do całej branży.

Wielkim problemem, dotyczącym ogółu artykułów rolno-spożywczych, jest prawidłowość znakowania. Podkreślenia wymaga fakt, iż nie poruszam tematu nieprawidłowości wynikających z braku znajomości przepisów, a celowego działania mającego wprowadzić klienta w błąd. W przypadku 34% partii kontrolowanego masła, oznakowanie sugerowało inny skład czy pochodzenie produktu niż było to w rzeczywistości. Często są przypadki, w których na opakowaniach produktów wytworzonych z dodatkiem tłuszczów roślinnych lub wręcz w oparciu o nie, zamieszcza się informacje sugerujące, iż produkt ten jest masłem lub posiada te same właściwości jak masło. Mix tłuszczowy nazwany: „osełka śmietanowa”, „wiosenne extra maślane”, „krówka maślowka” - to tylko

nieliczne przykłady działania producenta na szkodę konsumenta. Podobną sytuację możemy zaobserwować w przypadku serów, gdzie bardzo duże podobieństwo opakowań i nazw wyrobów seropodobnych do serów dojrzewających, może stać się przyczyną wprowadzenia konsumenta w błąd. Powagę sytuacji zwiększa dodatkowo fakt prezentacji tych artykułów w sklepach. Układanie mieszanek tłuszczowych obok masła czy wyrobów seropodobnych obok serów, czy czasami wręcz ich przemieszanie, jest również powodem rozlicznych pomyłek znacznej części klientów, którzy dokonują zakupu niezgodnego z wcześniejszymi zamiarami.

Kontrola jakości handlowej soków i nektarów

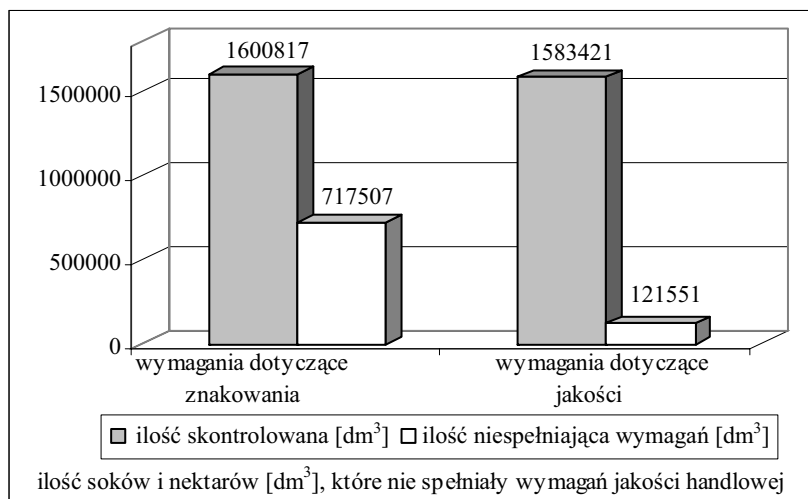
Na podstawie kontroli przeprowadzonych przez IJHARS w latach 2004-2006 można stwierdzić iż zafałszowania soków i nektarów polegały głównie na:

- rozcieńczaniu,
- dokwaszaniu,
- dodatku syntetycznego kwasu jabłkowego,
- dodawaniu innych, tańszych surowców,
- dosładzaniu i jednoczesnym dokwaszaniu soków,
- dodawaniu aromatów identycznych z naturalnymi.

W przypadku wymagań dotyczących parametrów fizyko-chemicznych to naruszenie ich stwierdzono w przypadku 7,6% całości kontrolowanego asortymentu. Gorzej przedstawia się sytuacja w przypadku przestrzegania wymagań odnośnie znakowania, tu naruszenia przepisów stwierdzono w 44,8% ogółu kontrolowanych produktów (Rys. 2).

Podkreślenia wymaga jednak fakt dążenia producentów soków i napojów do polepszenia sytuacji na rynku. Utworzyli oni Krajową Unię Producentów Soków, w ramach której powstał Dobrowolny System Kontroli. Działanie tego systemu oparte jest na Kodeksie Praktyki AIJN, co umożliwiło przyjęcie przez członków KPUS jednolitych wymagań jakościowych wobec poszczególnych grup asortymentowych. Wprowadzenie samokontroli w branży spowodowało znaczne polepszenie jakości oferowanych klientom soków i napojów. Jest to

dobry przykład dążeń producentów do zbudowania dobrych relacji z klientem i pozyskania jego zaufania.



Rys. 2. Wyniki kontroli soków i napojów (IJHARS)

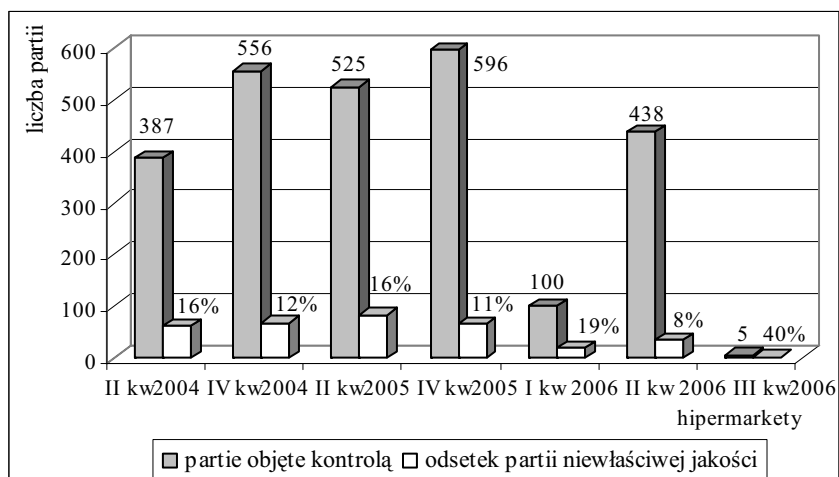
Kontrola jakości handlowej przetworów z mięsa czerwonego i drobiowego

Na podstawie kontroli przeprowadzonych przez IJHARS w latach 2004-2006 można stwierdzić, iż zafałszowania przetworów z mięsa czerwonego polegały głównie na:

- zawyżaniu zawartości wody,
- zawyżaniu zawartości tłuszczu,
- zaniżaniu zawartości białka.

Ilość partii przetworów mięsa czerwonego, w przypadku których stwierdzono wady jakościowe wahała się w przedziale od 8 do 19 % (Rys. 3). Jakość wyrobów wyprodukowanych przez hipermarkety (kiełbasa biała) znacznie odbiegała od średniej. Podkreślenia wymaga jednak fakt, iż w przypadku hipermarketów kontrola została przeprowadzona na symbolicznej wręcz partii, co uniemożliwia uznanie jej wyników za reprezentatywne dla tej

grupy producentów. Jednak powinno stanowić podstawę do przeprowadzenia kontroli zakrojonych na znacznie szerszą skalę.



Rys. 3. Liczba partii przetworów mięsnych objętych kontrolą parametrów fizyko-chemicznych oraz ilość niezgodności

IJHARS przeprowadził również kontrole w zakresie prawidłowości znakowania przetworów mięsnych. Liczba nieprawidłowo oznakowanych partii wynosiła od 26 do 41% wszystkich badanych produktów.

Nieprawidłowości polegały głównie na zamieszczaniu nieprawdziwych informacji, odnośnie składu artykułu czy też zamieszczaniu informacji graficznych wprowadzających klienta w błąd – np. na etykiecie salcesonu zamieszczono zdjęcie plastrów szynki.

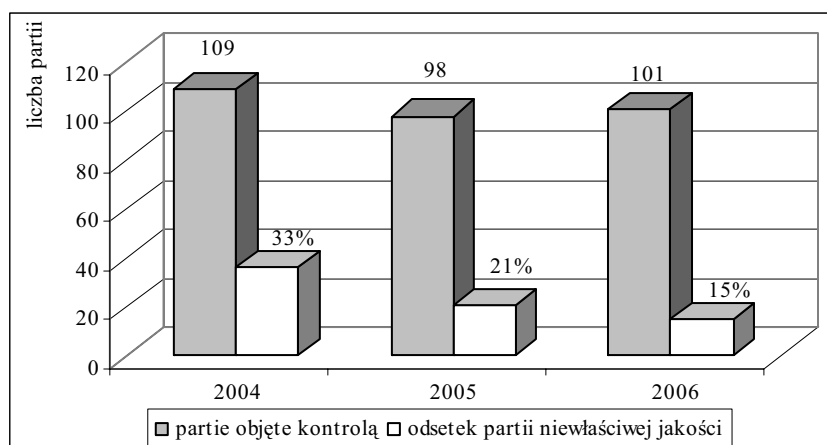
Kontrola jakości handlowej wina i wyrobów winiarskich

Na podstawie kontroli przeprowadzonych przez IJHARS w latach 2004-2006 można stwierdzić, iż zafałszowania wyrobów winiarskich polegały głównie na:

- zawyżonej zawartości cukrów,

- zaniżonej kwasowości ogólnej,
- zawyżonej zawartości alkoholu etylowego,
- zaniżonej zawartości alkoholu etylowego,
- zawyżonej kwasowości lotnej,
- dodawania do win alkoholu etylowego wyprodukowanego z innych roślin (analiza przy udziale spektrometrii masowej izotopów).

Analizując wyniki kontroli, można stwierdzić, że od rozpoczęcia systematycznej weryfikacji jakości wprowadzanych do obrotu wyrobów winiarskich i win, ich jakość znacznie się poprawiła. Udało się doprowadzić do sytuacji, że w przeciągu trzech lat liczba produktów o złej jakości spadła z 33 do 15% (Rys. 4). Jednak zastanawiać musi fakt, iż stało się tak nie w wyniku określonej na spełnienie wymagań jakościowych konsumenta polityki jakościowej firm, lecz działań urzędowej kontroli żywności. Również sposób znakowania wyrobów winiarskich obarczony był wieloma mankamentami, nagminnie na etykietach win owocowych zamieszczano obraz kiści winogron, co może sugerować, iż produkt ten został wyprodukowany z winogron.

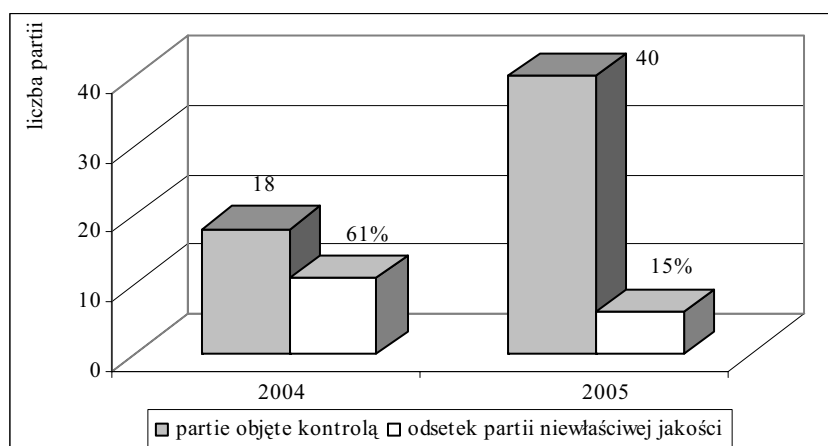


Rys. 4. Jakość handlowa wyrobów winiarskich skontrolowana przez IJHARS w latach 2004-2006

Kontrola jakości octu

Reagując na liczne skargi konsumentów i producentów, IJHARS przeprowadziła w latach 2004-2005 kontrolę jakości handlowej octu (Rys. 5). Kontrolę przeprowadzono wykorzystując metodę oznaczania aktywności węgla C-14. Stwierdzono zafałszowania polegające na:

- dodawaniu do octu esencji octowej,
- wprowadzanie do obrotu esencji octowej jako octu.



Rys. 5. Zafałszowania octu esencją octową wykryte przez IJHARS w latach 2004-2005

Produkty ekologiczne

W ostatnich latach obserwujemy wzrost liczby gospodarstw rolnych i zakładów przetwórczych produkujących żywność w oparciu o metody ekologiczne. Zainteresowanie taką produkcją wiąże się ze stopniowym wzrostem popytu na tego typu produkty. Jednocześnie ich cena jest wyższa niż podobnych, wytworzonych metodami konwencjonalnymi. Taka sytuacja powoduje podejmowanie przez nieuczciwych producentów prób wprowadzania do obrotu

produktów konwencjonalnych oznakowanych jako produkty wytworzone metodami ekologicznymi. Zgodnie z Rozporządzeniem Rady nr 2092/91/EWG z dnia 24 czerwca 1991 roku w sprawie produkcji ekologicznej produktów rolnych oraz znakowania produktów rolnych i środków spożywczych, produkt uważa się za oznakowany jako pochodzący z gospodarstw prowadzących produkcję ekologiczną wówczas, gdy na etykiecie, materiałach reklamowych lub dokumentach handlowych taki produkt lub jego składniki opisane są przez oznaczenie sugerujące nabywcy, że produkt został uzyskany zgodnie z zasadami produkcji metodami ekologicznymi.

W szczególności określenia, ich zwyczajowe pochodne, takie jak BIO, EKO itd. lub zdrobnienia stosowane samodzielnie, jak i w połączeniu, są uznawane za określenia stosujące się do metody produkcji ekologicznej w całej Wspólnocie, w każdym języku wspólnotowym.

Podkreślenia wymaga fakt, iż etykietowanie lub reklama produktu może nawiązywać do ekologicznych metod produkcji tylko wówczas, gdy:

- 1) informacje takie jednoznacznie wskazują, że odnoszą się do metody produkcji rolnej,
- 2) produkt został wyprodukowany zgodnie z zasadami określonymi dla rolnictwa ekologicznego lub został sprowadzony z krajów trzecich,
- 3) produkt został wyprodukowany lub sprowadzony przez podmiot gospodarczy, który podlega stosownej kontroli,
- 4) etykieta zawiera nazwę i/lub kod jednostki lub organu kontrolnego, któremu podmiot gospodarczy podlega,
- 5) działanie niezgodne z powyższymi zasadami jest uznawane za fałszowanie żywności.

Podsumowanie

Przedstawiając przykłady relacji producent-konsument na wybranych rynkach rolno-spożywczych, pragnę zwrócić uwagę na dynamiczny wzrost znaczenia analiz laboratoryjnych w weryfikacji prawdziwości informacji przekazywanych klientowi, który znalazł się w centrum uwagi producentów.

Powszechnym staje się stosowanie chromatografów, spektrometrów, czy innych urządzeń jeszcze nie tak dawno będących obiektem marzeń wielu laboratoriów. Sięgnięto już po metodyki oparte na badaniu izotopów, co pozwoliło na wykrycie wielu zafałszowań żywności. Inspekcje zajmujące się kontrolą żywności, dysponujące silnym zapleczem laboratoryjnym, coraz częściej współpracujące z przedstawicielami nauki, a przede wszystkim współpracujące ze sobą – stały się ważnym strażnikiem poprawności relacji pomiędzy producentem a klientem. Przekonany jednak jestem, iż równie ważnym w kształtowaniu rynku jest wzrost świadomości producentów, którzy coraz częściej walczą jakością o trwałe pozyskanie klienta. Ciekawym rozwiązaniem, sięgającym do jeszcze przedwojennych tradycji (*Polski Związek Bekonowy*), jest zrzeszanie się producentów w grupy, które przyjmują określone przez siebie, wyższe od powszechnie stosowanych, wymogi jakościowe.

Zastanawiający jest jednak, znaczny odsetek artykułów spożywczych oznakowanych w niewłaściwy sposób. Trudno rozgraniczyć przypadki nieprawidłowości, wynikające z błędnej interpretacji przepisów, od tych będących działaniem z premedytacją, obliczonych na wprowadzenie klienta w błąd. Wielu klientów przyjmuje z pełnym zaufaniem informacje zamieszczone na opakowaniach, opierając się bardzo często na pobieżnym przejrzeniu zapisów czy też obrazów zamieszczonych na opakowaniach. Zgodnie z informacjami przekazywanymi przez inspekcje, właśnie ten obszar jest obiektem najczęstszych nadużyć. Konieczne staje się więc doprowadzenie do sytuacji, gdzie w ślad za znaczną poprawą parametrów fizyko-chemicznych artykułów spożywczych, nastąpi poprawa w sposobie znakowania produktów oferowanych ostatecznemu konsumentowi.

11. Weryfikacja systemów jakości na przykładzie przedsiębiorstwa branży cukierniczej

JOLANTA KOWALSKA, KATARZYNA GÓJSKA

Wstęp

Produkcja środków spożywczych jest ściśle związana z ponoszeniem przez producenta odpowiedzialności za wyrób [8]. Oznacza to, że producent zobowiązany jest dostarczyć klientowi artykuły spożywcze bezpieczne dla jego zdrowia.

W procesach produkcyjnych wprowadzane są określone techniki, procedury i metody postępowania, mające na celu zapewnienie właściwego stopnia bezpieczeństwa zdrowotnego produkowanej bądź przetwarzanej żywności [7].

W celu całkowitego zabezpieczenia człowieka przed ciągle wzrastającym, szkodliwym działaniem czynników biologicznych, chemicznych i fizycznych, konieczne jest m.in. wdrożenie w całym łańcuchu żywnościowym (Rys. 1) zasad Dobrej Praktyki Produkcyjnej, Dobrej Praktyki Higienicznej oraz systemu HACCP [6].

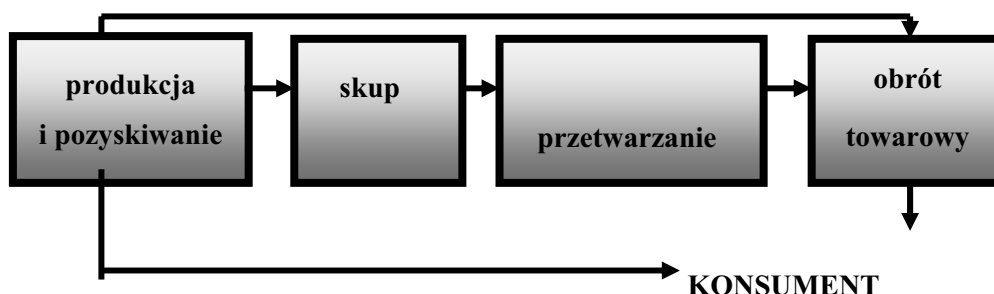
Dobra Praktyka Produkcyjna kieruje się zasadą:

„Zrób dobrze za pierwszym razem – każdym razem.”

Spełnienie tej zasady jest możliwe dzięki odpowiednio przygotowanemu i przeszkolonemu personelowi w zakresie systemów zarządzania jakością, a jednostka pracuje zgodnie z opracowanymi na jej potrzeby procedurami, dostosowanymi do branży i specyfiki danego zakładu [4].

System HACCP, oparty na naukowych i systematycznych podstawach identyfikuje specyficzne zagrożenia i środki służące ich nadzorowaniu, w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Jest również narzędziem pozwalającym ocenić zagrożenia i opracować systemy nadzoru ukierunkowane bardziej na

zapobieganie im niż na badanie produktu końcowego. System HACCP jest w stanie dostosować się do zachodzących zmian, takich jak postęp w projektowaniu wyposażenia, zmiany procedur produkcyjnych czy rozwój technologiczny [3]. Wdrożenie zasad metody HACCP, wprowadzenie systemu monitorowania oraz współpraca z odpowiedzialnymi dostawcami pozwalają na sprawowanie nadzoru nad procesem produkcyjnym, a w konsekwencji wytworzeniem wyrobu bezpiecznego dla konsumenta [9].



Rys. 1. Główne elementy łańcucha żywnościowego [2]

Zagrożenia zdrowotne, jakie mogą wystąpić podczas produkcji żywności, dzielę się na trzy zasadnicze kategorie: fizyczne, chemiczne i biologiczne, w tym mikrobiologiczne. Spośród wszystkich kategorii zagrożeń, mikrobiologiczne czynniki ryzyka są najpoważniejsze [5].

Wpływ okresowych przeglądów na skuteczność funkcjonowania systemów i bezpieczeństwo wyrobu gotowego

Jednym z najistotniejszych elementów systemów jakości jest ich weryfikacja. Na przykładzie zakładu cukierniczego podjęto próbę określenia wpływu okresowych przeglądów na skuteczność funkcjonowania systemów i bezpieczeństwo wyrobu gotowego.

Prezentowana firma to zakład produkujący wyroby cukiernicze, firma z tradycjami, która od początku swego istnienia zwracała szczególną uwagę na jakość oferowanych produktów. Właściciele zakładu dbali o intensywny rozwój

firmy, wprowadzali nowe produkty, gwarantowali bezpieczeństwo oraz powtarzalną jakość. Oczekiwania zagranicznych klientów skłoniły firmę do podjęcia decyzji o dostosowaniu zakładu do wymagań międzynarodowych standardów. Wszystkie wyroby produkowane są według wewnętrznych receptur, uwzględniających obowiązujące wymagania krajowe i międzynarodowe. W omawianym zakładzie wdrożono wytyczne norm A i B, ISO 9001: 2000, systemu HACCP standardowy, (*check list*) IFS (International Food Standard) i BRC (British Retail Consortium), a przede wszystkim zalecenia kodeksu Dobrej Praktyki Produkcyjnej i Higienicznej.

Obecność tak wielu zintegrowanych i funkcjonujących systemów umożliwia lepszą kontrolę nad wyznaczonymi w ramach HACCP punktami krytycznymi CCP, a jednocześnie daje gwarancję produkcji bezpiecznej żywności.

Wdrażanie systemów jakości rozpoczęto od spełnienia wymagań zawartych w Kodeksach Dobrej Praktyki Produkcyjnej i Higienicznej. Największą uwagę skupiono na stanie sanitarnym otoczenia zakładu, pomieszczeń produkcyjnych i pozaprodukcyjnych, stanowisk pracy, aparatury, urządzeń i sprzętu, zabezpieczenia zakładu przed gryzoniami i owadami, utrzymaniu odpowiednich warunków temperatury i wilgotności, skuteczności mycia i dezynfekcji, magazynowaniu żywności oraz na postępowaniu z wyrobem gotowym. Personel zakładowy został przeszkolony w zakresie przestrzegania wysokiego standardu higieny osobistej oraz zapisów w instrukcjach mycia i dezynfekcji oraz dokumentach stanowiskowych. Skuteczność mycia i dezynfekcji jest sprawdzana przez pracownika laboratorium mikrobiologicznego za pomocą testów ATP. Rezultaty mycia i sanitacji są regularnie monitorowane. Częstotliwość i sposób monitorowania zależy od produktu, warunków procesu i występującego ryzyka. System monitorowania jest regularnie przeglądany i modyfikowany zgodnie ze zmieniającymi się okolicznościami.

Zakład korzysta z usług firmy specjalizującej się w walce ze szkodnikami, która ma za zadanie sprawdzenie poprawności działania zamontowanych urządzeń do identyfikacji występowania insektów i gryzoni oraz podjęcia odpowiednich kroków w przypadku stwierdzenia ich obecności.

Podczas dostosowania zakładu do zaleceń Kodeksów GMP i GHP ustalano priorytety wdrażania wymagań w poszczególnych działach. Opracowano harmonogramy prac i wskazano osoby odpowiedzialne za wykonanie poszczególnych zadań. Efektem końcowym było powstanie dokumentu, Księgi Higieny, zawierającej wszystkie procedury i instrukcje oraz wzory formularzy niezbędnych do prowadzenia zapisów roboczych.

Dostosowanie do wymagań GMP i GHP ułatwiło wprowadzanie zaleceń pozostałych norm i standardów.

Na podstawie zarządzenia najwyższego kierownictwa, w połowie lat dziewięćdziesiątych został powołany zespół HACCP, który miał za zadanie opracowanie zaleceń przystosowujących do wymagań zawartych w Codex Alimentarius [1], a następnie przeprowadzenie analizy zagrożeń, ustalenie krytycznych punktów kontrolnych CCP oraz metod ich monitorowania i weryfikacji. Metodę HACCP wdrażano według 12 kroków. W tym zakresie zostały opracowane opisy produktów, schematy technologiczne (zweryfikowane na linii produkcyjnej), przeprowadzono analizę zagrożeń każdego surowca i etapu procesu produkcyjnego, określono środki prewencyjne zapobiegające wystąpieniu tych zagrożeń i ustalono ich priorytety.

Po przeprowadzonej analizie i określeniu środków prewencyjnych wyznaczono CCP w najważniejszych miejscach, w których można wyeliminować, zapobiec lub ograniczyć zagrożenia. Prace nad wyznaczeniem CCP w znacznym stopniu ułatwiło stosowanie „drzew decyzyjnych”, ale najistotniejsza okazała się wiedza i doświadczenie pracowników produkcyjnych. Dla wyznaczonych krytycznych punktów kontrolnych ustalono limity krytyczne i metody ich monitorowania. Na etapie opracowywania i wdrażania systemu ważne było przewidzenie wszystkich możliwych odchyleń parametrów w CCP. Było to konieczne i niezbędne do ustalenia planu działań korygujących.

Na podstawie opracowanych harmonogramów systemy funkcjonujące w omawianym zakładzie były okresowo weryfikowane. Dzięki takim przeglądom zespół HACCP mógł sprawdzić, czy założenia systemu były właściwe i czy system działa prawidłowo.

Opracowanie dokumentacji systemowej miało na celu usystematyzowanie i zapisanie czynności, które były już wcześniej wykonywane w ramach wewnętrznych systemów jakości. Dokumenty opracowano przy pomocy pracowników poszczególnych działów, korzystając przy tym z ich wieloletniego doświadczenia i wiedzy. Najtrudniejszym elementem w systemie było przyzwyczajenie pracowników do prowadzenia systematycznych zapisów. Dlatego organizowano szkolenia, które miały na celu zmianę mentalności i przekonanie załogi do skuteczności wprowadzanych systemów. Wieloletni proces przyniósł bardzo korzystne rezultaty, widoczne w raportach poauditowych.

Podczas początkowej fazy wprowadzania systemu HACCP do zakładu, zespół HACCP ustalił ponad 140 CCP na wszystkich liniach produkcyjnych. Każdy CCP wymagał ciągłego nadzoru i monitoringu. Szczególną uwagę zwrócono na zagrożenia, jakie mogą zostać wprowadzone przez surowce. Również istotne znaczenie odgrywało ich magazynowanie oraz parametry przechowywania półproduktów otrzymywanych w procesie technologicznym. Jednak kilkuletnie egzekwowanie od dostawców spełniania zapisów zawartych w specyfikacjach i wzajemne, pozytywne relacje wpłynęły na wypracowanie zaufania, czego efektem było zmniejszenie liczby CCP dla surowców.

Po pięciu latach od ustalenia pierwszych CCP, zespół HACCP podjął decyzję w sprawie przejścia z CCP na CP. Na decyzję tę składało się szereg bardzo istotnych elementów.

Obowiązkowo raz w roku w zakładzie sprawdzany był i weryfikowany cały system HACCP. Zgodnie z wcześniejszymi ustaleniami, odbywały się audyty wewnętrzne, przeprowadzane przez pracowników zakładu z wielu działów i zewnętrzne, prowadzone przez audytorów krajowych oraz zagranicznych. Przygotowywane raporty z poszczególnych auditów, jak również wskazówki udzielane przez audytorów, stanowiły podstawę do zmniejszenia liczby punktów krytycznych. Kolejnym czynnikiem decydującym o przejściu z CCP na CP, a następnie z ich rezygnacji, była bardzo rygorystyczna selekcja dostawców i przeprowadzanie auditów drugiej strony.

Na podstawie kilkuletniej weryfikacji, modernizacji i szkoleń personelu, pod stałym nadzorem pozostawiono elementy najbardziej zagrażające bezpieczeństwu wyrobu gotowego.

Za newraliczny punkt uznano magazynowanie surowców, a w szczególności mleka w proszku, które może stanowić źródło zagrożeń patogenami, wynikające ze źle przeprowadzonego procesu technologicznego lub w wyniku niewłaściwych parametrów magazynowania wyrobu gotowego.

Na podstawie kilkuletniej weryfikacji zapisów, punkty krytyczne opracowane dla miazgi kakaowej (magazynowanie, uszlachetnianie) zostały uznane za punkty kontrolne, monitorowane zgodnie z zakładowym harmonogramem. Możliwe to było dzięki zakupowi debakteryzatora, który eliminuje zagrożenia ze strony drobnoustrojów patogennych. Ze względu na bezpieczeństwo wyrobów, debakteryzator stanowi krytyczny punkt kontrolny i jest pod ścisłą kontrolą pracowników.

Dzięki stałej kontroli linii produkcyjnej, zespół HACCP zauważył, że umieszczenie wykrywacza metalu na samym końcu linii produkcyjnej, tuż przed pakowaniem do kartonów, pozwala na wycofanie kilku krytycznych punktów kontrolnych, m.in. magazynowanie mas w zbiornikach. Podobnie jak debakteryzator, wykrywacz metalu stanowi krytyczny punkt kontrolny.

Dzięki kilkuletnim przeglądom, zarówno poszczególnych elementów systemów jakości, w tym dokumentacji, zapisów i szkoleniom pracowników, jak i weryfikacji w formie auditów wewnętrznych i zewnętrznych, możliwe było zmniejszenie punktów krytycznych i udoskonalenie nadzoru nad bezpieczeństwem i jakością wytwarzanych wyrobów.

Podsumowanie

Wzrost świadomości i wymagań klienta oraz rosnąca konkurencja spowodowały, że polskie przedsiębiorstwa przemysłu spożywczego coraz większą wagę przykładają do powtarzalnej, wysokiej jakości oferowanych wyrobów i usług. Jedną z metod zagwarantowania bezpieczeństwa produkcji jest wdrożenie i monitorowanie systemów zarządzania jakością. Oprócz

obowiązkowych systemów GMP, GHP i HACCP, wielu producentów podejmuje się dostosowania do wymagań norm ISO, m. in. serii 9000, 140000, 18000 oraz 22000, jak również *check list*, określanych potocznie międzynarodowymi standardami żywnościowymi BRC i IFS. Dla przedsiębiorstw przemysłu spożywczego systemy te należy uznać jako komplementarne, gdyż nie tylko się nie wykluczają, lecz wzajemnie uzupełniają i wspomagają. Dobra Praktyka Przemysłowa wykorzystuje zdobyte doświadczenia w zakresie produkcji żywności, jej spożywania, przechowywania i obróbki.

Rosnące wymagania odbiorców powodują, że nie wystarczy już końcowa kontrola poziomu jakości wyrobu. Obecnie od wytwórcy wymaga się, aby we wszystkich swoich działaniach podejmował wysiłki dla spełnienia oczekiwań konsumentów i potrafił je potwierdzić w postaci skutecznie działającego systemu zapewnienia jakości. Szczególnie sektor rolno – spożywczy, po trudnym dla siebie okresie transformacji, wykazuje duże zainteresowanie i aktywność w dostosowywaniu się do nowych wymagań.

Literatura

1. Codex Alimentarius: Kodeks Żywnościowy FAO/WHO. Seria przekładów Instytutu Żywności i Żywienia, 1995.
2. Dzwolak W., Ziajka S.: Dokumentowanie systemu HACCP w przemyśle spożywczym. Studio 108. 2000, Olsztyn.
3. Kołożyn – Krajewska D.: Wdrażać HACCP czy nie? Bezpieczeństwo i higiena żywności, 1, 2002.
4. Kowalska J., Majewska E., Obiedziński M., Zadernowski M.: Nowe Prawo Żywnościowe Unii Europejskiej. Wydawnictwo ODDK, 2006.
5. Obiedziński M.: Zarządzanie ryzykiem przez HACCP. Bezpieczeństwo i Higiena Żywności. 4, 2003.
6. Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 roku w sprawie higieny środków spożywczych.
7. Turlejska H.: Poradnik dla przedsiębiorców: system HACCP. Urząd Komitetu Integracji Europejskiej, 2004.

Weryfikacja systemów jakości.....

8. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r.o bezpieczeństwie żywności i żywienia.
9. Zadernowski M. R.: Od jakości nie ma odwrotu. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo – Warzywny, 2005, 11(3).

12. Jakość i bezpieczeństwo jako atrybuty żywności

**JOLANTA KOWALSKA,
KATARZYNA SZUSTKIEWICZ**

Wstęp

Bezpieczeństwo żywności oraz jej jakość coraz częściej są tematem dyskusji społecznej, przedmiotem zainteresowania organizacji pozarządowych, a przede wszystkim przedsiębiorstw branży spożywczej. Wraz ze wzrostem liczby produktów na półkach sklepowych oraz stopniem ich przetworzenia wzrasta także znaczenie jakości żywności oraz jej bezpieczeństwa. Fakt przystąpienia do Unii Europejskiej zobowiązuje Polskę do stosowania standardów, systemów oraz metod obowiązujących w krajach członkowskich. Duża konkurencyjność na rodzimym rynku związana z rozszerzeniem go na kraje Europy Zachodniej zmusiła przedsiębiorców do szukania nowych metod przyciągania nabywców. Wysoka jakość oraz bezpieczeństwo stały się nieodłącznym atrybutem żywności. Jakość produktów oraz klient i jego potrzeby stały się priorytetem dla przedsiębiorców branży spożywczej. Produkty przez nich oferowane muszą sprostać oczekiwaniom konsumentów, zarówno pod względem wyglądu, walorów smakowych, zapachowych, odżywczych, stopnia przetworzenia, wygody w przygotowaniu, konkurencyjnej ceny, jak i pod względem bezpieczeństwa dla zdrowia.

Istotną rolę w dostarczaniu konsumentowi produktów bezpiecznych o gwarantowanej jakości odgrywają producenci, którzy odpowiadają za jakość oferowanych produktów [16]. Decydują oni również o sposobach jej zapewniania i utrzymywania na stałym poziomie. Obecnie za najskuteczniejszy sposób zapewniania bezpieczeństwa i jakości produktów spożywczych uważa się wprowadzanie w zakładach produkcyjnych rozwiązań systemowych,

poprawiających komunikację, organizację oraz integrację podejmowanych działań.

Jakość i bezpieczeństwo żywności

Znaczenie jakości w codziennym życiu konsumenta odgrywa coraz większą rolę. Problemy napotymane w trakcie produkcji, przetwarzania, transportu czy magazynowania często są przyczyną pogorszenia jakości, a nawet mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka. Świadomość tych zagrożeń, chęć prowadzenia zdrowego trybu życia oraz czynniki estetyczne i smakowe to główne przyczyny popytu na produkty „wysokiej jakości” [1]. W związku z rosnącą konkurencją na rynku, producenci żywności muszą dokładać wszelkich starań, aby produkty przez nich oferowane spełniały wymogi bezpieczeństwa oraz zaspakajały coraz wyższe oczekiwania klientów [10].

Pojęcie jakości nie jest jednoznaczne i może być interpretowane w różny sposób. Jako pierwszy pojęcia „jakość” użył Platon, określając je jako „ *pewien stopień doskonałości*”. Wielki nauczyciel jakości, William E. Deming, nazwał jakość „*stopniem jednorodności i niezawodności wyrobu przy możliwie niskich kosztach i maksymalnym dopasowaniu do wymagań rynku*” [20]. Inny wybitny myśliciel, Joseph Juran, zaproponował określenie jakości poprzez: „*stopień, w jakim określony wyrób zaspakaja potrzeby określonego nabywcy*”. Można też znaleźć określenia bardziej ogólne takie, jak „*wszystko, co można poprawić*” [20], czy po prostu „*zgodność z wymaganiami*” [2]. Autor ostatniej definicji kojarzony jest także z ciekawym podejściem do jakości. Crossby [2] używa określenia „zero defektów”, które jest integralną częścią „czterech pewników jakości”. Uważa, iż jakość powinna być postrzegana jako zgodność z ustalonymi oczekiwaniami klienta, a nie jako doskonałość wykonania. Jego zdaniem koniecznością jest eliminowanie przyczyn powstawania błędów, a nie kontrolowanie i usuwanie jego skutków. Uważa także, iż nie może istnieć dopuszczalny poziom niezgodności. Produkt dobrej jakości musi charakteryzować się jedynym akceptowalnym poziomem, który ma „zero defektów” [20].

Norma ISO 9000:2000 [12] traktuje **jakość** jako:

„stopień, w jakim zestaw *inherentnych* właściwości spełnia wymagania”, przy czym właściwości rozumiane są tu jako cechy różnicujące produkty.

Jakość jest pojęciem bardzo szerokim i dotyczy zarówno sfery usług, jak i przedmiotów materialnych, osobno definiuje się także, jakość produktów spożywczych.

Szczególłą uwagę należy poświęcić **jakości zdrowotnej** żywności, gdyż wymaga ona definiowania nie budzącego żadnych wątpliwości, ze względu na mogące nastąpić zagrożenia. W ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia [19] podano następującą definicję:

„jakość zdrowotna żywności jest to zbiór cech i kryteriów, za pomocą których charakteryzuje się żywność pod względem wartości odżywczej, jakości organoleptycznej oraz bezpieczeństwa dla zdrowia konsumenta”. W tej samej ustawie pojawia się również definicja sensorycznej jakości żywności, która traktuje jakość jako cechy: smak, zapach, wygląd, barwa i konsystencja, które człowiek może wyodrębnić i ocenić za pomocą zmysłów [18].

Jakość żywności jest obecnie wartością priorytetową dla każdego przedsiębiorcy. Warto zauważyć, że zarówno w ustawodawstwie polskim, jak i unijnym, jakość dotyczy wyłącznie obszaru bezpieczeństwa zdrowotnego produktów spożywczych. Przedsiębiorca ma zatem obowiązek wyprodukować żywność nie zagrażającą zdrowiu konsumenta. Nie ma tu mowy o jakości w szeroko pojętym rozumieniu konsumenckim, tj. spełniającym oczekiwania nabywcy pod względem wyglądu, smaku, zgodności z tendencjami mody czy wygody użycia. W związku z ogromną różnorodnością oferowanych produktów oraz wzrastającymi wymaganiami konsumentów, producenci są zmuszeni do ciągłego udoskonalania swoich wyrobów. Mimo braku obowiązku zapewniania wysokiej jakości, jest to czynnik coraz bardziej istotny w zdobywaniu rynku zbytu. Można więc powiedzieć, że dobra jakość to ta, która spełni wymagania klienta [10].

Kolejnym, nierozzerwalnie związanym z żywnością elementem jest jej bezpieczeństwo, które stanowi zagadnienie priorytetowe, zarówno dla branży spożywczej, jak i dla konsumentów nabywających oraz konsumujących żywność [18].

Bezpieczeństwo jest ogólnie określane jako:

„taki stan, w którym ryzyko niekorzystnego wpływu na zdrowie jest wyeliminowane lub ograniczone do akceptowalnego poziomu” [6].

W przypadku bezpieczeństwa żywności ryzyko będzie dotyczyło występowania zagrożeń biologicznych, chemicznych, fizycznych, bezpośrednich oraz chronicznych, występujących w całym łańcuchu żywnościowym, które mogą wpłynąć niekorzystnie na zdrowie konsumentów. Żywność jest uważana za niebezpieczną, jeżeli udowodniona jest jej szkodliwość dla zdrowia lub nie nadaje się do spożycia przez ludzi. Należy podkreślić, że szkodliwość nie dotyczy jedynie prawdopodobnego natychmiastowego czy długofalowego skutku [6].

W ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia [19], bezpieczeństwo żywności definiowane jest jako *„ogół warunków, które muszą być spełniane, dotyczących w szczególności:*

- a) stosowanych substancji dodatkowych i aromatów,*
- b) poziomów substancji zanieczyszczających,*
- c) pozostałości pestycydów,*
- d) warunków napromieniania żywności,*
- e) cech organoleptycznych,*

i działań, które muszą być podejmowane na wszystkich etapach produkcji lub obrotu żywnością, w celu zapewnienia zdrowia i życia człowieka”.

Można więc powiedzieć, że *„żywność bezpieczna to taka, która nie szkodzi ani zdrowiu ani życiu konsumenta”.* Żywność taka nie zawiera zanieczyszczeń (substancji przedostających się do żywności w następstwie procesu produkcyjnego, wskutek nieprawidłowości w obrocie żywnością, bądź występujących w następstwie zanieczyszczenia środowiska naturalnego, które mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka lub powodować nieprzydatność do spożycia), powyżej ściśle określonego poziomu tolerancji, który stanowi granicę bezpieczeństwa zdrowotnego dla konsumentów [5].

Zgodnie z nową strategią ustawodawstwa Unii Europejskiej bezpieczeństwo żywności nie dotyczy wyłącznie *„dbałości o zapobieganie zagrożeniom zdrowia*

i życia konsumenta”, ale obejmuje również „troskę o dobrostan i zdrowie roślin oraz zwierząt, dbałość o środowisko człowieka, o otoczenie produkcji rolnej oraz przetwórstwa, a także troskę o ekonomiczne bezpieczeństwo konsumenta”[9].

Bezpieczeństwo żywności w nowej międzynarodowej normie ISO 22000 [13] jest definiowane jako *„założenie, że żywność nie spowoduje szkody konsumentowi w fazie przygotowania i/lub spożywania (zgodnie z przeznaczeniem)”*.

Bezpieczeństwa produktu jest związane z jego identyfikowalnością, a więc możliwością odtworzenia jego historii od surowca do wyrobu finalnego. W przypadku problemów związanych z bezpieczeństwem żywności władze państwowe we współpracy z producentem żywności mają obowiązek szybko zareagować, oszacować wpływ potencjalnego zagrożenia na zdrowie konsumentów oraz wycofać produkt niezgodny z rynku [4].

Aspekty bezpieczeństwa żywności skupiają się w sposób szczególny na ochronie konsumentów, dlatego istotnym przedmiotem regulacji prawnych w produkcji i obrocie żywnością jest określenie warunków, jakie muszą być spełnione, aby żywność nie stanowiła zagrożenia. W Rozporządzeniu 178 [15], które jest podstawą nowej strategii bezpieczeństwa żywności nie pojawia się jednak definicja „bezpieczeństwa żywności”. Natomiast zwrócono szczególną uwagę na wyjaśnienie pojęć:

- ryzyko definiowane jako *„niebezpieczeństwo zaistnienia negatywnych skutków dla zdrowia oraz dotkliwości takich skutków w następstwie zagrożenia”*,
- zagrożenie definiowane jako *„czynnik biologiczny, chemiczny lub fizyczny w żywności lub paszy, bądź stan żywności lub paszy, mogący powodować negatywne skutki dla zdrowia”*.

Należy podkreślić bliskość tych zagadnień (tj. bezpieczeństwo, ryzyko, zagrożenie), które sprowadzają się do negatywnych skutków, związanych ze spożyciem żywności [11].

Pojęcia „jakość żywności i bezpieczeństwo żywności”, używane są często zamiennie. Jest to bezpośrednio związane z oczekiwaniami konsumenta, który

nabywając produkt zakłada, że posiada on obydwie te cechy. Bezpieczeństwo żywności stało się niezbędną częścią składową jakości. Władze państwowe popchnęły żywność i przemysł żywnościowy w kierunku wszechstronnego rozwoju systemów zarządzania jakością, aby poprawić bezpieczeństwo żywności, restrukturyzować system kontroli żywności i odbudować w ten sposób zaufanie konsumenta do żywności. Problem bezpieczeństwa żywności został częściowo rozwiązany przez konkurencyjność na rynku. Tylko produkty gwarantowanej jakości, w tym również bezpieczne mają szansę na ekspansję rynkową [14].

Pojęcia „jakość” i „bezpieczeństwo” należy rozróżnić, bowiem *„Jakość jest elementem realizacji umowy pomiędzy klientem i dostawcą. Konsument płaci za jakość, natomiast bezpieczeństwo musi być zagwarantowane prawnie”*[11].

Wymagania prawne

Podstawowym celem regulacji prawnych ustawodawstwa żywnościowego jest zapewnianie bezpieczeństwa i ochrona zdrowia konsumenta. W związku z pojawiającymi się coraz częściej chorobami zwierząt oraz zanieczyszczeniem żywności, stanowiącymi zagrożenie dla zdrowia konsumenta, w ostatnich latach powstało wiele uregulowań prawnych, których zapisy mają na celu usprawnienie nadzoru nad produkcją i obrotem żywności oraz ujednoczenie przepisów, stanowiących wymagania dla organizacji przemysłu spożywczego.

Elementarną księgą, propagującą na całym świecie jednolite zasady bezpieczeństwa żywności, jest Codex Alimentarius – Kodeks Żywnościowy FAO/WHO [18]. W kodeksie zostały opisane zasady systemu HACCP oraz etapy jego wdrażania. System ten stanowi podstawę w zapewnianiu bezpieczeństwa żywności. Kodeks Żywnościowy nie jest prawem ustanowionym, jednak każdy kraj może z niego skorzystać przy tworzeniu prawa wewnętrznego.

Wymogi prawa żywnościowego przez wiele lat sprawiały trudności w interpretacji, co z kolei prowadziło do nieporozumień pomiędzy krajami członkowskimi. Brak jednolitych przepisów na rynku żywności oraz ogromne zmiany w metodach produkcji i przetwórstwa żywności doprowadziły do

powstania nowej strategii w zakresie bezpieczeństwa zdrowotnego krajów Unii Europejskiej [9]. Strategia ta, opisana w "Białej Księdze Bezpieczeństwa Żywności", odnosi się do metod produkcji oraz wskazuje na konieczność systemowego podejścia do zapewniania zgodności ze standardami bezpieczeństwa. W treści Białej Księgi stwierdzono, że: „*Priorytetem polityki komisji jest zapewnienie najwyższych standardów bezpieczeństwa żywności w Unii Europejskiej*” [18].

Niewątpliwie najważniejszym dokumentem prawnym, regulującym wytyczne dotyczące bezpieczeństwa żywności, jest Rozporządzenie WE 178/2002 z dnia 28.01.2002, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności, ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego oraz procedury dotyczące bezpieczeństwa żywności [7].

Rozporządzenie 178/2002/WE tworzy trzy filary bezpieczeństwa żywności w UE. Pierwszy z nich to prawo żywnościowe regulujące zagadnienia bezpieczeństwa żywności w całej Unii Europejskiej. Drugi filar stanowi powołany na mocy Rozporządzenia Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności - EFSA. Trzeci filar to instytucje wspólnoty i krajów członkowskich, odpowiedzialne za urzędową kontrolę żywności.

Rozporządzenie 178/2002/WE tworzy ramowe zasady dla pobierania prób, analizy, zarządzania kryzysowego, kontroli importu żywności i pasz oraz rejestracji przedsiębiorstw żywnościowych i paszowych, dzięki którym system kontroli może objąć cały łańcuch żywnościowy [9].

Kolejnymi dokumentami, które uściślają obowiązki stawiane producentom w zakresie produkcji, składowania i obrotu żywnością, a także podkreślają wymagania higieniczne, są Rozporządzenie WE nr 852/2004 z 29.04.2004 w sprawie higieny środków spożywczych oraz Rozporządzenie WE nr 853/2004 z 29.04.2004, ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Dokumenty te wskazują na odpowiedzialność przedsiębiorstw za bezpieczeństwo żywności, omawiają ogólne i szczegółowe zasady higieny żywności, nakładają obowiązek weryfikacji oparty na zasadach systemu HACCP oraz wskazują na korzystanie z wytycznych Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GMP). Rozporządzenia nakładają również

obowiązek rejestracji i zatwierdzania przedsiębiorstw oraz utrzymanie łańcucha chłodniczego dla żywności tego wymagającej. 25 sierpnia 2006 roku uchwalono Ustawę o bezpieczeństwie żywności i żywienia, która została w całości dostosowana do prawa żywnościowego UE i jest obecnie podstawowym aktem prawnym, który reguluje zasady zapewniania bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i żywienia w Polsce. Ustawa opisuje wymagania dotyczące jakości zdrowotnej żywności, przestrzegania zasad higieny oraz bezpieczeństwa zdrowotnego, zasady produkcji żywności oraz jej obrotu. Ponadto reguluje wymagania dotyczące urządzeń, aparatury, opakowań i innych materiałów mających kontakt z żywnością. Wyznacza także zasady przeprowadzania urzędowej kontroli żywności. Według zapisów Ustawy za zagwarantowanie bezpieczeństwa zdrowotnego żywności odpowiada przedsiębiorca sektora spożywczego. Ustawa podkreśla konieczność identyfikowania produktów w całym łańcuchu żywnościowym, zaczynając od gospodarstwa rolnego, a kończąc na konsumencie [19].

Dostosowywanie prawa krajowego do ustawodawstwa unijnego w zakresie bezpieczeństwa żywności nie jest procesem łatwym i pozbawionym kontrowersji. Wśród twórców aktów prawnych panuje przekonanie, iż tylko spójne, precyzyjne i jasne przepisy pozwolą osiągnąć wysoki poziom bezpieczeństwa żywności we wszystkich gałęziach łańcucha żywnościowego. Wzrost bezpieczeństwa żywności jest, bowiem jedynym warunkiem, dzięki któremu może wzrosnąć zaufanie konsumentów do produktów spożywczych. Wraz z realizacją zrozumiałego, jednolitego i praktycznego prawa żywnościowego zostanie spełniony podstawowy cel, jakim jest ochrona zdrowia i życia człowieka [8].

Systemy a jakość i bezpieczeństwo

Konsument nie posiada bezpośrednich narzędzi do oceny i weryfikacji swoich oczekiwań, musi zatem polegać na deklaracjach producentów oraz twórcach prawa żywnościowego. Należy podkreślić, że konsument jest nie tylko ostatecznym odbiorcą żywności, ale jednocześnie ponosi całe ryzyko związane z jej spożyciem i ewentualnymi konsekwencjami zdrowotnymi. Coraz wyższe

wymagania konsumentów, dotyczące stopnia przetworzenia, wygody spożycia i przygotowania oraz różnorodności smaków i wyglądu artykułów spożywczych, sprzyjają występowaniu wielu zagrożeń. Istotne są również globalizacja handlu, swobodny przepływ towarów, zanieczyszczenie środowiska naturalnego, a także niewystarczający nadzór nad jakością i bezpieczeństwem żywności ze strony urzędowej kontroli. Nadal dużym problemem są nieuczciwi producenci, którzy chcąc obniżyć koszty nie przestrzegają procedur lub fałszują żywność, stwarzając poważne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Zatem pojęciu żywności powinno stale towarzyszyć pojęcie zaufania, natomiast produkcji - odpowiedzialność i etyka.

Konsument chce wierzyć, że jakość oferowanych produktów jest stale i rzetelnie nadzorowana przez producentów i właściwe urzędy, a podstawą tego zaufania jest stabilne prawo żywnościowe. Zapewnianie jakości i bezpieczeństwa polega przede wszystkim na stawianiu wysokich wymagań producentom żywności oraz sprawnym nadzorze nad wszystkimi ogniwami łańcucha żywnościowego.

Jednym z elementów nadzoru nad żywnością jest obowiązek wdrażania zasad dobrych praktyk GHP/GMP oraz HACCP, stojących na straży bezpieczeństwa żywności. Systemy te są skutecznym sposobem eliminacji zagrożeń oraz zapobiegania ich powstawaniu. Coraz częściej, oprócz systemu HACCP przedsiębiorstwa decydują się również na wdrażanie nieobligatoryjnych systemów zapewniania jakości. Wysokie wymagania ze strony rynku zmuszają producentów do usprawniania swojej działalności poprzez systemowe zarządzanie całą organizacją.

Z tego też względu coraz większą popularnością cieszą się systemy zarządzania jakością (ISO 9001), środowiskiem (ISO 14001) oraz bezpieczeństwem i higieną pracy (ISO 18001). Wdrożenie tych norm nie tylko poprawia funkcjonowanie firmy, ale w dużej mierze zwiększa konkurencyjność na rynku. Posiadanie certyfikowanych systemów jakości stanowi również kartę przetargową w działaniach marketingowych. Wielkie nadzieje budzi nowa międzynarodowa norma ISO 22000, skierowana szczególnie do przedsiębiorców branży spożywczej. Łączy ona elementy zarządzania jakością z wymaganiami

HACCP oraz dobrymi praktykami. Norma ta stanowi perspektywę dla przedsiębiorców, zapewniając jednocześnie bezpieczeństwo i wysoką jakość produktów spożywczych.

Pojawienie się produktów pod marką handlową stworzyło konieczność zapewnienia wyrównanego oraz akceptowalnego przez konsumentów poziomu jakości wszystkim wyrobom sprzedawanym pod jedną marką. Należy pamiętać, że konsument niezadowolony z jednego produktu, oceni całą markę handlową. Zadowolenie bądź niechęć konsumenta automatycznie rozciąga się na wszystkie towary tej marki. W związku z powyższymi dylematami oraz potrzebą zapewnienia wyrównanej i pewnej jakości produktów żywnościowych sprzedawanych w sieciach supermarketów, rozpoczęła się dyskusja, której efektem było powstanie standardów dla dystrybutorów sieci handlowych - BRC (British Retail Consortium) oraz IFS (International Food Standard) [3]. Certyfikacja zgodności z wymaganiami zawartymi w tych standardach otwiera drogę w nawiązaniu współpracy z sieciami hipermarketów.

Podsumowanie

Jakość i bezpieczeństwo to niewątpliwie najważniejsze atrybuty żywności. Problem jakości żywności oraz jej wpływu na zdrowie od dawna jest tematem wielu dyskusji i rozważań. Żywność przestała pełnić funkcję jedynie energetyczną i odżywczą, a stała się elementem kulturowym i obyczajowym. Współczesny konsument oczekuje od żywności nie tylko źródła energii oraz niezbędnych składników odżywczych, ale także atrakcyjności wizualnej, sensorycznej, zadowolenia, przyjemności i pewności. Konsumentowi nie wystarcza już jakość akceptowalna. Szuka produktów, które spełnią jego wysokie oczekiwania. Wygrywają produkty, które oprócz atrakcyjnej ceny charakteryzują się wysoką jakością.

Przed producentami stoi zatem poważne zadanie – wdrażanie systemów zarządzania jakością i bezpieczeństwem żywności, służące spełnieniu oczekiwań klientów oraz utrzymaniu wysokiej pozycji na rynku.

Literatura

1. Beulens A. M., Broens D., Folstar P., Hofstede G. J.: Foods afty and transparently. In food chains and networks. Relationships and challenges. Food Control, 2005, 16, 481-486.
2. Crosby Ph.: Running Things: the Art. Of Making Things Happen. Mc Grow – Hill, 1986, New York, 99.
3. Drosik I.: Standard BRC szansą na zapewnienie jakości produktów spożywczych znakowanych marką handlową. Przemysł Spożywczy, 2001, 24.
4. Gorris L. G. M.: Food safety objective: An integral part of food chain management. Food Control, 2005, 16, 801-809.
5. Kijowski J.: Integracja systemów zarządzania jakością i bezpieczeństwem zdrowotnym żywności w normach międzynarodowych. Metody zapewniania jakości i bezpieczeństwa w przetwórstwie żywności. Wyd. SGGW, 2004, Warszawa, 12-13.
6. Małecka M.: Żywność bezpieczna dla konsumenta. Zeszyt Naukowy 73, Wyd. Akademii Ekonomicznej, 2006, Poznań, 8-13.
7. Mokrosińska K., (2006): Nowe kierunki w ustanawianiu prawa żywnościowego w UE i w Polsce. Chłodnictwo, tom XLI (3), 33-36.
8. Mucha M.: Uwarunkowania prawne bezpieczeństwa żywności na podstawie nowego prawa żywnościowego Unii Europejskiej oraz polskich aktów prawnych. Jakość i bezpieczeństwa żywności: uwarunkowania surowcowe, technologiczne-produkcyjne i prawne. Wyd. SGGW, 2006, Warszawa, 159-164.
9. Obiedziński M. W.: Postępy w realizacji strategii bezpieczeństwa żywności – „Biała Księga” w Unii Europejskiej. Metody zapewniania jakości i bezpieczeństwa w przetwórstwie żywności. Wyd. SGGW, 2004, Warszawa, 28-38.
10. Olszewski A.: Geneza jakości oraz metody i techniki zapewniania jakości. Gospodarka Mięsna, 2006, 10, 18-24.

11. Ozimek I.: Bezpieczeństwo żywności w aspekcie ochrony konsumenta w Polsce. Wyd. SGGW, 2006, Warszawa, 27-34, 62.
12. Polska Norma PN-EN ISO 9001:2000: System zarządzania jakością. Wymagania.
13. Polska Norma PN-ISO 22000:2006: System zarządzania bezpieczeństwem żywności - Wymagania dla każdej organizacji należącej do łańcucha żywnościowego.
14. Röhr A., Lüddecke K., Drusch S., Müller M. J., Alvensleben R. V.: Food quality and safety – consumer perception and public health concern. Food Control, 2005, 16, 649-655.
15. Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 roku ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego.
16. Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 roku w sprawie higieny środków spożywczych.
17. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 roku w sprawie higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego.
18. Sikora T.: Bezpieczeństwo żywności, komunikowanie ryzyka konsumpcji a zaufanie konsumenta. Metody zapewniania jakości i bezpieczeństwa w przetwórstwie żywności, Wyd. SGGW, 2004, Warszawa, 39-45.
19. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia.
20. Urbaniak M.: Zarządzanie jakością – teoria i praktyka. Centrum Doradztwa i Informacji Difin sp. z o.o., 2004, 13-15.