

DEKONTAMINACJA PRZYPRAW Z WYKORZYSTANIEM DITLENKU WĘGLA W STANIE NADKRYTYCZNYM

Ewa Waldon-Wiewióra¹, Sylwia Skapska¹, Barbara Sokołowska^{1,2}, Izabela Porębska¹

¹ Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

² Instytut Wysokich Ciśnień PAN, Laboratorium Biomateriałów
ul. Sokołowska 29/37, 01-142 Warszawa
sylwia.skapska@ibprs.pl

Streszczenie

Przyprawy to najczęściej różne części roślin: nasiona, kwiaty, a nawet korzenie o bardzo delikatnych i nietrwałych związkach zapachowych oraz substancjach barwnych wrażliwych na temperaturę. Należą one do surowców mocno zanieczyszczonych mikrobiologicznie.

W celu uniknięcia strat substancji termolabilnych coraz częściej szuka się nowych nietermicznych metod ich wyjaławiania. Jedną z tych metod może okazać się zastosowanie ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym (SCCD).

W pracy zbadano poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego trzech rodzajów przypraw: suszonych liści tymianku i pietruszki oraz owoców kolendry, przed działaniem i po działaniu SCCD. Określono także wpływ wilgotności badanych przypraw na skuteczność procesu dekontaminacji. Największą redukcję liczby mikroorganizmów podczas 30-minutowego działania SCCD pod ciśnieniem 60 MPa, w temperaturze 35°C uzyskano przy 30% wilgotności próbek.

Słowa kluczowe: ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym, tymianek, nać pietruszki, owoc kolendry, zanieczyszczenie mikrobiologiczne

DECONTAMINATION OF SPICES USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE

Summary

Spices are usually different parts of plants (seeds, flower or even roots) containing very delicate and labile flavour compounds and thermosensitive pigments. However, they belong to the heavily microbiologically contaminated raw materials.

In order to avoid losses of these thermolabile substances more and more research is conducted to develop new nonthermal methods of their decontamination. One of such methods is using supercritical carbon dioxide (SCCD).

The level of microbiological contamination of three kind of spices: dried thyme and parsley leaves and coriander fruits, before and after SCCD treatment was examined. The influence of humidity of the spices on the effectiveness of decontamination process was also investigated. The highest reduction of the number of microorganisms was achieved after 30 min of SCCD treatment at the pressure of 60 MPa and temperature 35°C, when the humidity of samples was 30%.

Key words: supercritical carbon dioxide, thyme, parsley leaves, coriander fruit, microbiological contamination

WSTĘP

Przyprawy to najczęściej różne części roślin: nasiona, kwiaty, a nawet korzenie. Jako przyprawy wykorzystuje się te fragmenty roślin, w których magazynowane są substancje smakowe, zapachowe i barwiące [Makała 2010]. Należą one do surowców mocno zanieczyszczonych mikrobiologicznie ($10^2 \div 10^9$ jtk/g przyprawy). Najczęściej izolowane z przypraw drobnoustroje to: bakterie przetrwalnikujące z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium*, pałeczki z grupy coli, enterokoki, paciorkowce kałowe oraz pleśnie z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, niekiedy *Fusarium*, *Alternaria* i *Cladosporium*. W sporadycznych przypadkach izolowano również bakterie chorobotwórcze, takie jak *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* [McKee 1995; Kostrzewa, Owczarczyk 1997; Wieczorkiewicz-Górnik, Piątkiewicz, 2008; Garbowska i in. 2015].

Według wytycznych opracowanych przez Międzynarodową Komisję Specyfikacji Mikrobiologicznych dla Żywności [International Commission on Microbiological Specifications for Foods 2005] całkowita liczba bakterii w przyprawach poniżej 10^4 jtk/g wskazuje na ich dobrą jakość, 10^4 - 10^6 jtk/g jest liczbą dopuszczalną, natomiast powyżej 10^6 jtk/g jest niedopuszczalną liczbą bakterii w przyprawach.

Przyprawy, ze względu na obecność lotnych i termolabilnych substancji smakowo-zapachowych, a także czasami nietrwałą barwę, są bardzo trudnym produktem do sterylizacji. Z tego powodu poszukuje się nowych, nietermicznych metod ich wyjaławiania. Stosowane jest m.in. ozonowanie [Wysok i in. 2006; Vali Asill i in. 2013], fumigacja tlenkiem etylenu bądź bromkiem etylenu [Vajdi, Pereira 1973] i napromienianie promieniami jonizującymi [Juri i in. 1986; Chmielewski, Migdał 2005]. Metody te wykorzystują jednak substancje i techniki postrzegane jako nieprzyjemne dla środowiska i stanowiące potencjalne zagrożenie

dla zdrowia. Z kolei zastosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych nie umożliwiło uzyskania wystarczającego stopnia redukcji mikroflory [Skąpska i in. 2003; Windyga i in. 2008]. Jedną z innowacyjnych, nietermicznych technik, które potencjalnie mogłyby być zastosowane do dekontaminacji przypraw, może być użycie ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym [De Luna i in. 2008; Nakamura i in. 1994; Enomoto i in. 1997; Dillow i in. 1999; Zhang i in. 2006]. Jest on stosowany ze względu na swoje, odpowiednie do tego procesu, właściwości. Jako najważniejsze wymienia się małą lepkość i wysoką dyfuzyjność umożliwiającą odpowiednią penetrację w głąb sterylizowanego surowca. Ponadto CO₂ posiada stosunkowo niskie parametry krytyczne (31,1°C, 7,38 MPa), co jest korzystne ze względu na koszty niezbędnej aparatury ciśnieniowej i umożliwia prowadzenie „sterylizacji na zimno” [Zhang i in. 2006]. Ditlenek węgla nie przyczynia się do powstawania korozji na urządzeniach, nie jest toksyczny i palny. Gaz ten jest składnikiem powietrza, dlatego jest względnie niedrogi, można go również pozyskiwać z nadwyżek produkcyjnych pochodzących z innych rodzajów przemysłów [Dillow i in. 1999].

Metoda wyjaławiania z użyciem SCCD polega na wprowadzeniu do surowca CO₂ w stanie nadkrytycznym, przetrzymaniu go przez określony czas, a następnie usunięciu go z produktu [Ferrentino, Balaban 2011]. Podczas tego procesu następuje przekształcenie ditlenku węgla pod wpływem zewnętrznej fazy wodnej produktu do kwasu węglowego, który powoduje zmiany w błonie komórkowej drobnoustrojów. Kwas ten i ditlenek węgla przenikają przez błony komórkowe, powodując obniżenie się pH w cytoplazmie, a co za tym idzie – inaktywację enzymów kluczowych dla metabolizmu komórki. Następuje zachwianie równowagi elektrolitowej i usuwanie ważnych składników z wnętrza komórki, dochodzi do pęknięcia komórki, przez co drobnoustrój obumiera [Garcia-Gonzalez i in. 2007]. Proces SCCD jeszcze nie jest używany na skalę przemysłową do dekontaminacji przypraw, ale wyniki niektórych doświadczeń wskazują, że dla tego typu produktów może to być skuteczna metoda [De Luna i in. 2008].

Celem pracy była ocena przydatności procesu dekontaminacji z użyciem SCCD do wyjaławiania trzech przypraw ziołowych: suszonych liści tymianku i pietruszki i owoców kolendry.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiły trzy próbki suszonych przypraw ziołowych: owoce kolendry (*Coriandrum sativum* L.), tymianek (*Thymus vulgaris* L.) i liście pietruszki (*Petroselinum crispum* Mill.). Przyprawy w ilości ok. 10 g wprowadzano do gilzy ze stali nierdzewnej, umieszczano w komorze aparatu Applied Separations Spe-ed SFE i poddawano

działaniu nadkrytycznego ditlenku węgla w różnych parametrach procesu i przy różnych stopniach nawilżenia.

Wilgotność przypraw oznaczono, stosując wago-suszkę METLER TOLEDO HR83. Liczbę mezofilnych drobnoustrojów tlenowych, przed działaniem i po działaniu SCCD, oznaczano metodą płytkową wg PN-EN ISO 4833-1:2013-12.

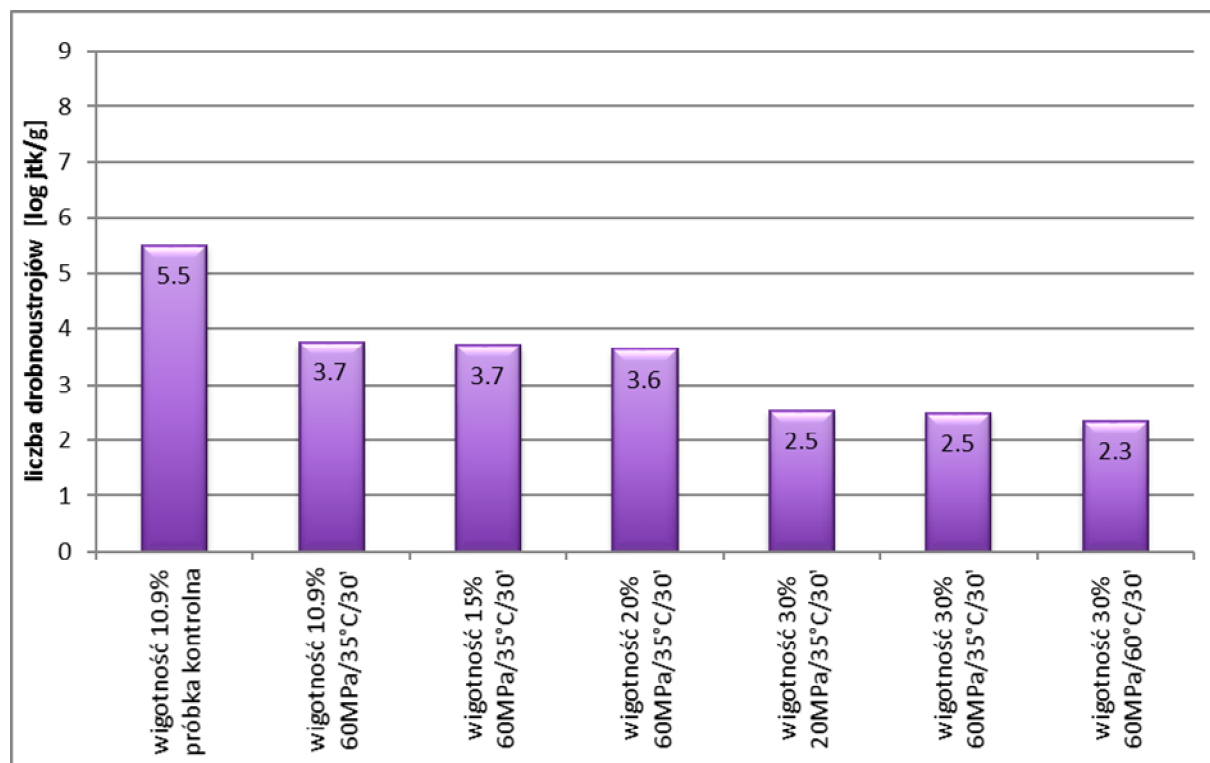
Próbki owoców kolendry i tymianku nawilżano do końcowej wilgotności 15%, 20% lub 30% poprzez wprowadzenie odpowiedniej ilości jałowej wody i godzinne mieszanie. W przypadku suszonej pietruszki zastosowano dodatek wody do 30% i 50% wilgotności.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki uzyskane w doświadczeniu zostały przedstawione na wykresach 1–3. Początkowe zanieczyszczenie próbek przypraw mezofilnymi drobnoustrojami tlenowymi wynosiło od 5,5 do 7,9 log jtk/g, w zależności od przyprawy. Pierwsze próby dekontaminacji z wykorzystaniem ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym przeprowadzono dla przypraw o wyjściowej wilgotności (owoce kolendry – 10,9%; tymianek – 12,0%; nać pietruszki – 4,3%). Parametry tego procesu to ciśnienie rzędu 60 MPa utrzymane przez 30 minut. Temperatura procesu dla próbek kolendry i pietruszki wynosiła 35°C, zaś dla tymianku 60°C. Po procesie dekontaminacji osiągnięto 1,8 log redukcji drobnoustrojów w próbce owoców kolendry (rysunek 1). Dla naci pietruszki zredukowano zanieczyszczenie o 1,6 log (rysunek 3), zaś w przypadku tymianku w trakcie procesu dekontaminacji osiągnięto redukcję o 2,5 log (rysunek 2). Podejmowane wcześniej [Skąpska i in. 2003] próby sterylizacji mielonego pieprzu metodą wysokich ciśnień hydrostatycznych (HHP) przy ciśnieniu 1000 MPa w atmosferze argonu dały zadowalające rezultaty w stosunku do tlenowych bakterii mezofilnych (redukcja o ponad 3 logarytmy) dopiero przy zastosowaniu temperatury 140°C; w temperaturach 60–100°C zmniejszenie liczebności tej grupy drobnoustrojów nie przekraczało 2 logarytmów. Nieco lepszy efekt działania wysokich ciśnień uzyskano, stosując hel, jednak znaczącą, powyżej 2 log, redukcję mezofilnych bakterii tlenowych w ziarnach kolendry i nasionach kminku osiągnęto dopiero w temperaturach powyżej 80°C [Windyga i in, 2008].

Wyniki uzyskane po procesie dekontaminacji przy wyjściowej wilgotności próbek nie były satysfakcjonujące, dlatego podjęto próbę sterylizacji przy zwiększonej wilgotności. Dla kolendry i tymianku wilgotność zwiększono do 15%, 20% i 30%, zaś dla pietruszki do 30% i 50%. Po nawilżeniu przypraw do 30% wilgotności osiągnięto najlepsze efekty procesu dekontaminacji. Dla tymianku osiągnięto redukcję liczby drobnoustrojów o 3,9 log

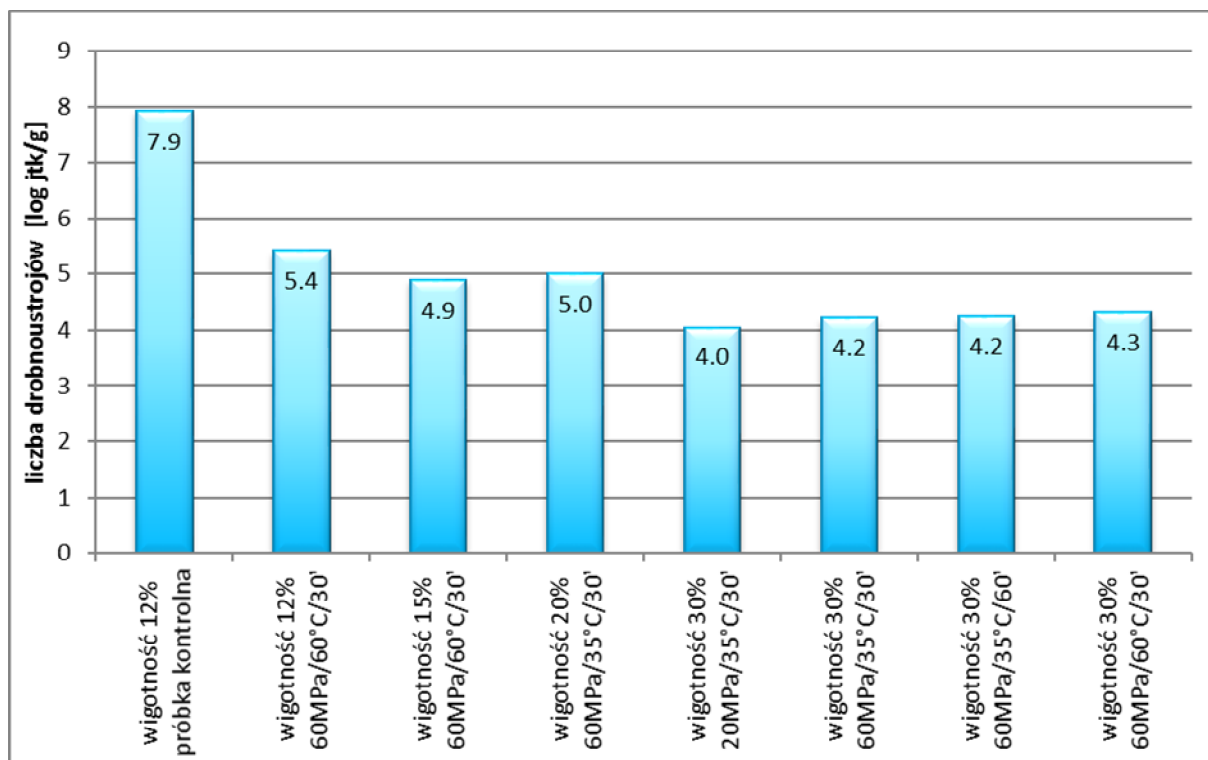
(rysunek 2), dla kolendry 3,2 log (rysunek 1), zaś dla pietruszki około 2,0 log (rysunek 3). W przypadku pietruszki zwiększenie wilgotności nawet do 50% nie spowodowało lepszego efektu dekontaminacji.



Rysunek 1. Zmiana zanieczyszczenia mezofilnymi drobnoustrojami tlenowymi owoców kolendry po procesie dekontaminacji SCCD
Changes in the total count of microorganisms in coriander fruits due to SCCD decontamination process

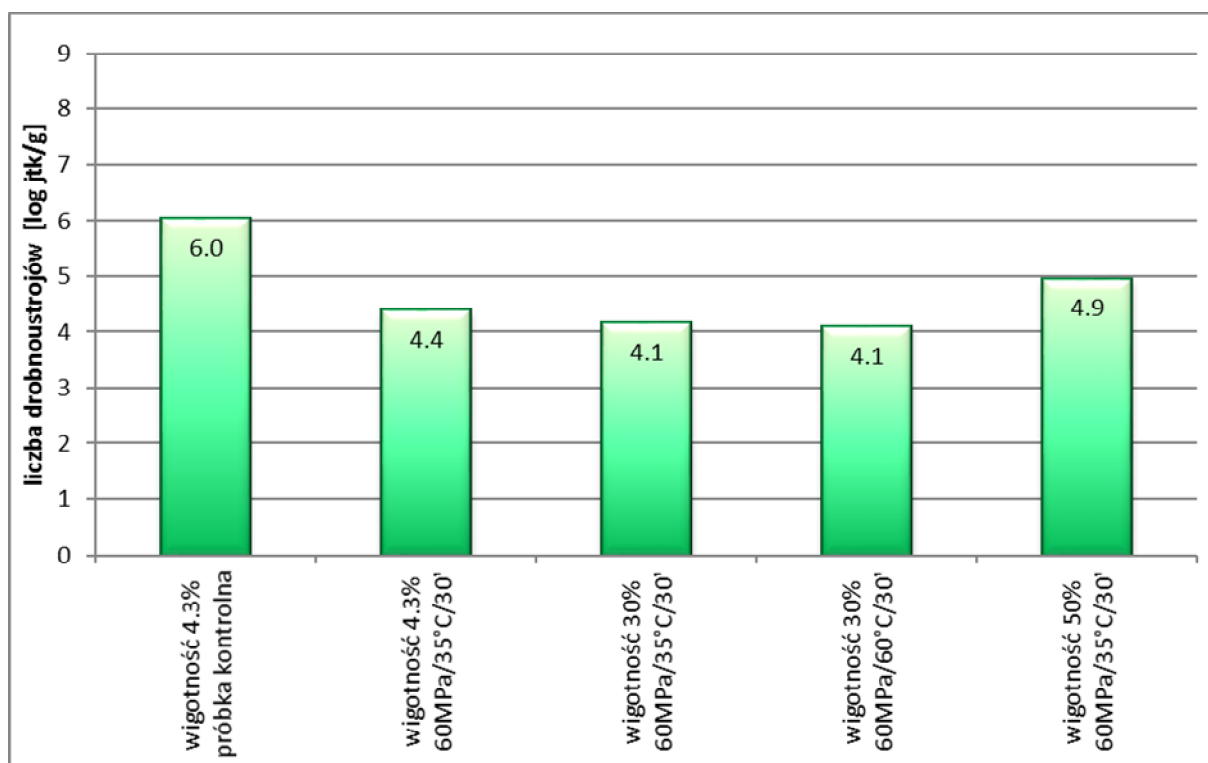
Wpływ wilgotności produktów poddawanych działaniu SCCD okazał się bardzo istotny – dzięki nawilżaniu osiągnięto większą redukcję liczebności mikroorganizmów. Pozytywny efekt zwiększania wilgotności w procesie dekontaminacji z użyciem SCCD znajduje potwierdzenie w literaturze. Kamihira i in. [1987] podają, że wysuszone komórki drożdży, pleśni i bakterii o niewielkiej zawartości wody od 2% do 10%, nie zostały eliminowane przez SCCD, podczas gdy komórki o wilgotności 70–90% ulegały znacznej inaktywacji. De Luna i in. [2008] wykazali, że największą redukcję bakterii tlenowych w przypadku papryki w proszku uzyskano po zwiększeniu wilgotności co najmniej do 20%. Dekontaminacja proszku osocza przy wilgotności 6,8% z wykorzystaniem SCCD (35°C, 200 atm) była niemożliwa, dopiero zwiększenie zawartości wody do 30,7% spowodowało inaktywację drobnoustrojów o ok. 3 log [Taniguchi i in. 1987]. Próby dekontaminacji mąki z zastosowaniem SCCD dały zadowalający efekt dopiero po nawilżeniu jej do 28%

wilgotności [Haas i in. 1989]. Stosując inną metodę utrwalania – HHP, również stwierdzono, że zwiększenie zawartości wody w nośniku, którym była krzemionka, istotnie wpłynęło na efektywność inaktywacji *Lactobacillus rhamnosus*. Przy zawartości wody 1% proces prowadzony w ciśnieniu 500 MPa był nieskuteczny, natomiast przy wilgotności 20% stwierdzono całkowitą inaktywację bakterii już w 10°C po 15 minutach [Windyga i in. 2008].



Rysunek 2. Zmiana zanieczyszczenia mezofilnymi drobnoustrojami tlenowymi tymianku po procesie dekontaminacji SCCD
Changes in the total count of microorganisms in thyme due to SCCD decontamination process

Najlepsze wyniki dekontaminacji wszystkich przypraw osiągnięto, gdy temperatura procesu wynosiła 35°C. Przy wzroście temperatury do 60°C nie zaobserwowano zauważalnych zmian w redukcji mikroflory. Podwyższenie temperatury procesu SCCD daje zazwyczaj korzystny wpływ na skuteczność sterylizacji, ponieważ wyższe temperatury ułatwiają dyfuzję CO₂ przez błony komórkowe. Efekt ten w przypadku sproszkowanej papryki obserwowano po podniesieniu temperatury do stosunkowo wysokiego poziomu, powyżej 60°C [De Luna i in. 2008]. Proces prowadzony w tak wysokiej temperaturze nie może być jednak uważany za technikę nietermiczną i może mieć negatywny wpływ na jakość przypraw, szczególnie na związki termolabilne, w tym bardzo delikatne olejki zapachowe i nietrwałe barwniki.



Rysunek 3. Zmiana zanieczyszczenia mezofilnymi drobnoustrojami tlenowymi naci pietruszki suszonej po procesie dekontaminacji SCCD
Changes in the total count of microorganisms in dried parsley leaves due to SCCD decontamination process

W przypadku tymianku proces dekontaminacji prowadzony przy niższym ciśnieniu, czyli 20 MPa (rysunek 2), dał nieznacznie lepsze wyniki niż przy ciśnieniu 60 MPa. Podobne rezultaty, czyli brak pozytywnego efektu sterylizacji proszku paprykowego pod wpływem zwiększania ciśnienia od 60 do 300 barów, zaobserwowano w badaniach De Luna i in. [2008]. Autorzy wyjaśnili to zjawisko tym, że wartość ciśnienia w próbkach stałych nie ma znaczącego wpływu na efekt inaktywacji drobnoustrojów. W produktach ciekłych ciśnienie odgrywa znaczącą rolę, ponieważ wpływa na ilość CO₂ rozpuszczonego w próbce, a co za tym idzie – ułatwia jego penetrację do mikroorganizmów znajdujących się w cieczy. W produktach stałych ditlenek węgla ma wpływ tylko na komórki znajdujące się na powierzchni cząstek, dlatego ważniejsze jest zapewnienie dobrego kontaktu CO₂ z powierzchnią drobnoustrojów niż podwyższanie ciśnienia.

WNIOSKI

1. Redukcja zanieczyszczenia mikrobiologicznego za pomocą ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym, przy zastosowanych w pracy parametrach procesu, w nienawilżonych

przyprawach (owoce kolendry – 10,9%; tymianek – 12,0%; nać pietruszki – 4,3%) była znikoma.

2. Wilgotność przypraw miała duży wpływ na skuteczność procesu dekontaminacji. Na efektywność tego procesu miał również wpływ rodzaj przyprawy. Tymianek okazał się przyprawą najbardziej podatną na sterylizację, zaś dla liści pietruszki osiągnięto najmniejszą redukcję zanieczyszczeń mikrobiologicznych, co mogło być spowodowane nierównomiernym stopniem nawilżenia wszystkich listków pietruszki.
3. Próbkę przypraw o podwyższonej wilgotności mogą nie nadawać się do dłuższego przechowywania i niezbędne może być ich dosuszanie po procesie dekontaminacji SCCD. Konieczne są dalsze badania wpływu etapu dekontaminacji SCCD i etapu dosuszania przypraw na ich cechy sensoryczne.

PIŚMIENNICTWO

1. Chmielewski A. G., Migdał W. (2005). Radiation decontamination of herbs and species. *Nukleonika*, 50 (4), 179-184
2. De Luna R., Cabrero M.T., Calvo L. (2008). Sterilization of paprika powder using high pressure CO₂
http://www.isasf.net/fileadmin/files/Docs/Barcelona/ISASF%202008/PDF/Oral%20communications/OC_NP_10.pdf
3. Dillow A. K., Dehghani F., Hrkach J. S., Foster N. R., Langer R. (1999). Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10344-10348
4. Enomoto A., Nakamura K., Hakoda M., Amaya N. (1997). Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 305–307
5. Ferrentino G., Balaban M. O. (2011). Chapter 10 – Dense-phase carbon dioxide processing of fluid foods W: Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods. *Food Sci. Technol. Internat. Series. Academic Press*, 263–303
6. Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Różańska L. (2015). Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.*, 49, 1-5
7. Garcia-Gonzalez L., Geeraerd A. H., Spilimbergo S., Elst K., Van Ginneken L., Debevere J., Van Impe J. F., Devlieghere F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *Intern. J. Food Microbiol.*, 117, 1-28

8. Haas G. J., Prescott H. E., Dudley E., Dik R., Hintlian C., Keane L. (1989). Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *J. Food Safety*, 9 (4), 253-265
9. International Commission on Microbiological Specifications for Foods ICMSF (2005). Spices, herbs, and vegetable seasonings. *Microorganisms in Foods, Microbial Ecology of Food Commodities*. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 360-372
10. Juri M. L., Ito H., Watanabe H., Tamura N. (1986). Distribution of Microorganisms in Spices and Their Decontamination by Gamma-irradiation. *Agric. Bioi. Chem.*, 50 (2), 347-355
11. Kamihira M., Taniguchi M., Kobayashi T. (1987). Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide. *Agricult. Biol. Chem.*, 51 (2), 407-412
12. Kostrzewa E., Owczarczyk B. (1997). Zanieczyszczenia mikrobiologiczne przypraw ziołowych i metody ich wyjaławiania. *Wiad. Zielar.*, (4), 19-21
13. Makąła H. (2010). Przyprawy do żywności charakterystyka i właściwości. *Przem. Spoż.*, 64 (11), 32-35
14. McKee L. H. (1995). Microbial contamination of spices and herbs. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28 (1), 1-11
15. Nakamura K., Enomoto A., Fukushima H., Nagai K., Hakoda M. (1994). Disruption of microbial cells by the flash discharge of high-pressure carbon dioxide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1297-1301
16. PN-EN ISO 4833-1:2013-12 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów – Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30 stopni C
17. Skąpska S., Windyga B., Kostrzewa E., Jendrzejczak Z., Karłowski K., Fonberg-Broczek M., Ścieżyńska H., Grochowska A., Górecka K., Porowski S., Morawski A., Arabas J., Szczepek S. (2003). Effect of ultra high pressure under argone and temperature on the volatiles and piperine content and microbiological quality of black pepper (*Piper Nigrum* L.). W: *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Springer, 431-436
18. Taniguchi M., Suzuki H., Sato M., Kobayashi T. (1987). Sterilization of plasma powder by treatment with supercritical carbon dioxide. *Agricult. Biolog. Chem.*, 51 (12), 3425-3426
19. Wieczorkiewicz-Górnik M., Piątkiewicz A. (2008). Mikrobiologiczne zanieczyszczenie przypraw ziołowych. *Gosp. Mięś.*, 46 (8), 48-50

20. Windyga B., Fonberg-Broczek M., Śnieżyńska H., Skąpska S., Górecka K., Grochowska A., Morawski A., Szczepek J., Karłowski K., Porowski S. (2008). Zastosowanie wysokiego ciśnienia w atmosferze helu do obniżenia zanieczyszczenia mikrobiologicznego przypraw ziółowych. *Roczn. PZH*, 59 (4), 437-443
21. Vali Asill R., Azizi M., Bahreini M., Arouiee H. (2013). The investigation of decontamination effects of ozone gas on microbial load and essential oil of several medicinal plants. *Not. Sci. Biol.*, 5 (1), 34-38
22. Wysok B., Uradziński J., Gomółka-Pawlicka M. (2006). Ozone as an alternative disinfectant – A review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 15/56, 3-8
23. Vajdi M., Pereira R. R. (1973) Comparative effects of ethylene oxide, gamma irradiation and microwave treatments on selected spices. *Food Sci.*, 38, 893-895
24. Zhang J., Dalal N., Gleason C., Matthews M. A., Waller L. N., Fox K. F., Fox A., Drews M. J., LaBerge M., An Y. H. (2006). On the mechanisms of deactivation of *Bacillus atrophaeus* spores using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, 38, 268-273