

POSTĘPY NAUKI I TECHNOLOGII PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO

t. 76 nr 2

Warszawa 2022

Rada Programowa

prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski
dr hab. inż. Piotr Kielczyński, prof. IPPT PAN
prof. dr hab. Agnieszka Kita
prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska
dr hab. inż. Iwona Konopka, prof. UWM
prof. dr hab. Józef Korczak
prof. dr hab. Grażyna Podolska
prof. dr hab. Zdzisław Targoński

Kolegium Redakcyjne

Redaktor Naczelny – dr Piotr Janiszewski, piotr.janiszewski@ibprs.pl

Redaktorzy tematyczni:

dr Beata Bartodziejska
dr inż. Katarzyna Kotarska
dr hab. inż. Dariusz Lisiak, prof. IBPRS-PIB
dr inż. Katarzyna Piasecka-Jóźwiak
dr inż. Elżbieta Polak
dr hab. inż. Stanisław Ptasznik, prof. IBPRS-PIB
dr inż. Sylwia Skąpska
dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS-PIB
dr inż. Anna Szafrńska
dr inż. Elżbieta Wojtowicz

Native speaker: Christopher Whyatt, Senior Lecturer (TEFL), at the Adam Mickiewicz University, Poznań

Sekretarz Redakcji

mgr Lila Nabialek

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego –
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa
tel. 22 606 36 99, lila.nabialek@ibprs.pl

Czasopismo wydawane jest w wersji pierwotnej drukowanej
Czasopismo recenzowane
Wydawnictwo Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowego Instytutu Badawczego

ISSN 2083-5809
Projekt graficzny okładki – INNOVA
nakład 80 egz.

SPIS TREŚCI

Ołów, kadm i rtęć w produktach zbożowych dla niemowląt i małych dzieci – ocena narażenia Jędrzejczak R., Ręczajska W.	5
Specjacja ołowiu w środowisku, organizmie człowieka i rośliny oraz sposoby przenikania, metabolizm i oddziaływanie poszczególnych form specjacyjnych na organizmy żywe Rybarska K.	18
Świadomość konsumencka w zakresie tłuszczów jadalnych, w zależności od aktywności fizycznej i częstotliwości badań okresowych respondentów – badania wstępne Żbikowska K., Religa A., Żbikowska A., Marciniak-Łukasiak K.	34
Zasoby kolekcji kultur drobnoustrojów przemysłowych – charakterystyka nowych izolatów bakterii octowych z rodzaju <i>ASAIA</i> Sokołowska B., Bucka-Kolendo J., Dekowska A., Mikołajczuk-Szczyrba A., Nasiłowska J.	48
Wpływ konsumpcji mięsa na ryzyko powstania chorób nowotworowych i sercowo-naczyniowych Borzuta K., Janiszewski P., Lisiak D., Grześkowiak E.	62
Informacje dla autorów	83

CONTENTS

Lead, cadmium and mercury in cereal products for infants and toddlers – exposure assessment Jędrzejczak R., Ręczajska W.	5
Specification of lead in the environment, human and plant organism and permeability, metabolism and the influence of particular specialization forms on living organisms Rybarska K.	18
Consumer awareness on edible fat depending on physical activity and the frequency of periodic examinations of respondents - preliminary research Żbikowska K., Religa A., Żbikowska A., Marciniak-Łukasiak K.	34
Collection of industrial microorganisms resources - acetic acid bacteria from genus <i>ASAIA</i> Sokołowska B., Bucka-Kolendo J., Dekowska A., Mikołajczuk-Szczyrba A., Nasiłowska J.	48
The influence of meat consumption on the risk of cancer and cardiovascular diseases Borzuta K., Janiszewski P., Lisiak D., Grześkowiak E.	62

OLÓW, KADM I RTĘĆ W PRODUKTACH ZBOŻOWYCH DLA NIEMOWLĄT I MAŁYCH DZIECI – OCENA NARAŻENIA

Renata Jędrzejczak, Wiesława Ręczajska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

renata.jedrzejczak@ibprs.pl

Streszczenie

Krajowe produkty na bazie różnych zbóż przeznaczone dla niemowląt i małych dzieci zbadano na zawartość metali toksycznych, takich jak ołów, kadm i rtęć. Do oznaczania zawartości ołowiu i kadmu wykorzystano technikę absorpcyjnej spektrometrii atomowej z atomizacją elektrotermiczną (ETAAS), zaś rtęci – absorpcyjną spektrometrię atomową z techniką amalgamacji (AAS-Amalg.). Łącznie analizie poddano 66 próbek produktów dla niemowląt i małych dzieci na bazie pszenicy, kukurydzy, owsa i wielu różnych zbóż.

W badanych produktach zawartości ołowiu i kadmu były zróżnicowane: <0,001-0,047 mg/kg Pb i <0,001-0,058 mg/kg Cd. Nie stwierdzono obecności rtęci powyżej LOQ, tj. 0,001 mg/kg. W nielicznych produktach, głównie wyprodukowanych na bazie pszenicy, stwierdzono przekroczenia dopuszczalnych zawartości ołowiu i kadmu. Oszacowane pobranie ołowiu i kadmu przez niemowlęta i małe dzieci wraz z jednorazową porcją badanych produktów na bazie zbóż, nie miało znaczącego wpływu na dopuszczalny poziom ich dziennego spożycia. Tym samym, nie zaobserwowano zagrożeń dla zdrowia niemowląt i małych dzieci w wyniku spożywania dostępnych na rynku krajowym produktów na bazie zbóż.

Słowa kluczowe: metale toksyczne, kaszki zbożowe, dopuszczalny poziom spożycia

LEAD, CADMIUM AND MERCURY IN CEREAL PRODUCTS FOR INFANTS AND TODDLERS – EXPOSURE ASSESSMENT

Summary

The content of toxic metals such as lead, cadmium and mercury in cereal-based products for infants and toddlers available on the Polish market was tested. A total of 66 samples of products for infants and toddlers based on wheat, maize, oats and multi grains were analyzed. For determination of lead and cadmium the electrothermal atomic absorption spectrometry

technique (ETAAS) was used, and for mercury amalgamation technique with atomic absorption spectrometry (AAS-Amalg.).

The contents of lead and cadmium in the tested samples were varied from $<0,001$ to $0,047$ mg/kg and from $<0,001$ to $0,058$ mg/kg, respectively. No mercury was found in the tested product samples above the LOQ, i.e. $0,001$ mg/kg. In a few products, mainly those made of wheat, the permissible lead and cadmium contents were exceeded. Estimated intake of lead and cadmium by infants and toddlers, along with a single portion of the examined cereal-based products, did not have any important impact on the acceptable level of their daily consumption. Thus, no threats to health of infants and toddlers due to consumption of cereal-based products available on the domestic market, were observed.

Keywords: toxic metals, permissible level of intake, cereal-based products for infants and toddlers

WSTĘP

Metale toksyczne, takie jak ołów, kadm i rtęć, wchodzą w skład skorupy ziemskiej i są naturalnym składnikiem środowiska przyrodniczego. W wyniku naturalnych procesów, jak np. wybuchy wulkanów oraz czynników antropogenicznych związanych z działalnością człowieka (przemysł, rolnictwo, motoryzacja, urbanizacja) wprowadzane są do środowiska w nadmiernych ilościach, co powoduje zanieczyszczenie powietrza, wód, gleb i roślin.

Ołów, kadm i rtęć uznawane są za bezwzględnie szkodliwe dla zdrowia i narażenie na nie, zwłaszcza niemowląt i małych dzieci, może prowadzić do wielu szkodliwych skutków zdrowotnych. Większe ich narażenie na metale toksyczne niż dorosłych wynika m.in. z nie w pełni rozwiniętego systemu immunologicznego, szybszego wchłaniania z przewodu pokarmowego, a także szybciej zachodzących procesów metabolicznych. Wspólną cechą tych metali jest zdolność do kumulacji w organizmie człowieka, długi okres biologicznego półtrwania i związana z tym chroniczna toksyczność [EFSA 2012a, EFSA 2012b, EFSA 2012c].

Ołów, kadm i rtęć wchłaniane są przez niemowlęta i małe dzieci głównie przez układ pokarmowy, wraz z pożywieniem, oraz oddechowy z powietrzem i mogą wywoływać szereg negatywnych skutków zdrowotnych. Mogą być przyczyną anemii, zaburzeń neurologicznych, rozwojowych, obniżenia zdolności intelektualnych (IQ), a także powodować uszkodzenie nerek, wątroby, nadciśnienie. Wykazują także działanie mutagenne, teratogenne, kancerogenne. Ostatnie badania wykazały również związek pomiędzy narażeniem na ołów,

kadm i rtęć a symptomami ADHD u dzieci, których nawet niskie poziomy zwiększają ryzyko wystąpienia zaburzeń [Lee M-J. i in. 2018, Donzelli i in. 2019].

W wyniku prowadzonych badań toksykologicznych tolerowane pobranie (TWI/TDI) dla kadmu i rtęci, BMDL₀₁ i BMDL₁₀ dla ołowiu oraz BMDL₁₀ dla rtęci zostały określone przez EFSA [EFSA 2012a, 2012b, 2012c] (Tabela 1).

Tabela 1. Tolerowane pobranie Pb, Cd i Hg z żywnością
Tolerated intakes of Pb, Cd and Hg with food

Metal	Parametr	Wartości
Pb	BMDL ₀₁	1,5 µg/kg m.c./dzień
	BMDL ₁₀	0,63 µg/kg m.c./dzień
Cd	TWI	2,5 µg/kg m.c./tydzień
	TDI	0,36 µg/kg m.c./dzień
Hg	TWI	4,0 µg/kg m.c.
	BMDL ₁₀	0,06 mg/kg m.c./dzień

BMDL₀₁ - poziom dawki odniesienia dla efektu sercowo-naczyniowego; BMDL₁₀ – poziom dawki odniesienia dla efektu nefrotoksycznego; TWI – tolerowane tygodniowe pobranie; TDI – tolerowane dzienne pobranie; m.c. - masa ciała

Zboża stanowią jedną z najważniejszych upraw na świecie, a produkty zbożowe mają duże znaczenie w żywieniu człowieka, szczególnie niemowląt i małych dzieci. Po karmieniu mlekiem, kaszki zbożowe są w pierwszej kolejności wprowadzane do diety niemowląt. Zawierają szereg substancji korzystnych dla rozwoju młodego organizmu, takich jak węglowodany (w tym błonnik pokarmowy), białko roślinne, lipidy, substancje mineralne (Fe, Cu, Mg, Zn, K, P), witaminy z grupy B i enzymy [Zin 2009]. Poza tymi korzystnymi składnikami mogą zawierać również zanieczyszczenia, w tym metale toksyczne, takie jak ołów i kadm. Ich dopuszczalne zawartości w produktach zbożowych dla niemowląt i małych dzieci zostały określone odpowiednimi rozporządzeniami Unii Europejskiej [UE 2021/1317, UE 2021/1323]. Dopuszczalna zawartość rtęci w produktach zbożowych dla niemowląt i małych dzieci nie została określona (Tabela 2).

Tabela 2. Najwyższe dopuszczalne zawartości metali toksycznych w produktach na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci
Maximum contents for toxic metals in cereal-based foods for infants and toddlers

Metal	Rodzaj produktów	NDZ, mg/kg
Ołów		0,020
Kadm	Produkty na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci	0,040
Rtęć		-

Eksperti w USA uważają jednak, że dopuszczalna zawartość ołowiu w żywności dla niemowląt i małych dzieci nie powinna przekraczać 0,001 mg/kg [AAP 2016], czy nawet niemierzalnego poziomu tego pierwiastka [HBBF 2019]. Uznają oni metal ten za niezwykle szkodliwy dla niemowląt i małych dzieci, zagrażający ich prawidłowemu rozwojowi, będącym głównie odpowiedzialnym za obniżenie IQ.

Ze względu na wagę problemu obecność metali toksycznych w żywności dla niemowląt i małych dzieci powinna być starannie kontrolowana i utrzymywana na minimalnym poziomie. Celem badań była ocena poziomu zanieczyszczenia ołowiem, kadmem i rtęcią dostępnej na rynku krajowym żywności dla niemowląt i małych dzieci produkowanej na bazie zbóż oraz ocena zagrożenia dla zdrowia wynikającego ze spożywania badanych produktów.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Material do badań

66 próbek produktów mleczno-zbożowych i zbożowych dla niemowląt i małych dzieci dostępnych na rynku krajowym, w tym 28 próbek na bazie pszenicy, 12 próbek na bazie kukurydzy, 9 próbek na bazie owsa i 17 próbek na bazie wielu zbóż

Odczynniki i roztwory

Kwas azotowy(V) 69%, modyfikator palladowy ($10 \pm 0,02$ g/l w 5% HNO_3), roztwory wzorcowe Pb, Cd i Hg o stężeniu 1000 mg/l, argon 99,999%, tlen 99,9%, stosowano wyłącznie odczynniki o stopniu czystości do analizy, wodę dwukrotnie destylowaną w szkle

Aparatura

Spektrometr absorpcji atomowej Solaar M6 (Thermo) do oznaczenia zawartości Cd i Pb, analizator rtęci AMA-245 (Altec) – do oznaczenia zawartości rtęci, piec mikrofalowy MARS 5 (CEM Corp.) wyposażony w komplet naczyń teflonowych, waga analityczna, destylarka (Aquatron A4D), urządzenia pomocnicze do rozdrabniania próbek

Oznaczanie zawartości Pb, Cd i Hg

Zawartość Pb i Cd oznaczono wg PN-EN 14084:2004 po mineralizacji mikrofalowej metodą elektrotermicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej z korekcją tła Zeemana (ETAAS). Około 0,3 g jednorodnej próbki, odważono z dokładnością do 0,001 g do naczynia teflonowego, dodano 4 ml HNO_3 i pozostawiono do następnego dnia. Mineralizację prowadzono w piecu mikrofalowym przez 50 min z maksymalną mocą 1200W do uzyskania

bezbarnego lub jasnożółtego roztworu. Po ochłodzeniu próbkę przenoszono wodą do kolby pomiarowej o poj. 25 ml i oznaczano techniką ETAAS.

Zawartość Hg oznaczono wg procedury badawczej własnej [PB-ZA 04, 2016]. Około 0,1 g jednorodnej próbki odważono z dokładnością do 0,001 g do łódeczki niklowej i poddano analizie metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z techniką amalgamacji.

Weryfikacja i walidacja metod oraz potwierdzenie ważności wyników badań

Stosowane metody zostały zweryfikowane i zwalidowane z wykorzystaniem odpowiednich CRM, a szczegółowe dane przedstawiono we wcześniejszej pracy [Jędrzejczak, Ręczajska 2022].

W ramach potwierdzenia ważności wyników, w każdej serii pomiarowej analizowano próbkę badaną w 2-3 powtórzeniach oraz ślepą i odpowiedni CRM. Regularnie uczestniczono w badaniach biegłości (FAPAS) uzyskując wyniki zadowalające ($|z| < 2$).

Ocena narażenia na Pb, Cd i Hg

Do określenia poziomu narażenia niemowląt i małych dzieci na Pb, Cd i Hg w wyniku spożywania produktów mleczno-zbożowych i zbożowych, wykorzystano wielkość jednorazowej porcji produktu: 20 g (dla niemowląt w wieku 6-8 miesięcy) i 30 g (dla małych dzieci w wieku 1-3 lat).

Analiza statystyczna Analizę statystyczną i obliczenia przeprowadzono z wykorzystaniem programu Excel (Microsoft Office Standard 2013), TIBCO Software Inc. (2017) i Statistica, wersja 13. Obliczono wartości średnie i odchylenia standardowe, medianę dla badanych produktów. Dla wartości poniżej granicy oznaczalności danego pierwiastka przyjęto do obliczeń wartość połowy LOQ, tj. 0,0005 mg/kg. Ocenę zawartości ołowiu i kadmu w badanych produktach przeprowadzono poprzez nieparametryczną analizę wariancji Kruskala-Wallisa. Przyjęto poziom istotności $\alpha=0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zawartość ołowiu, kadmu i rtęci w produktach na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci

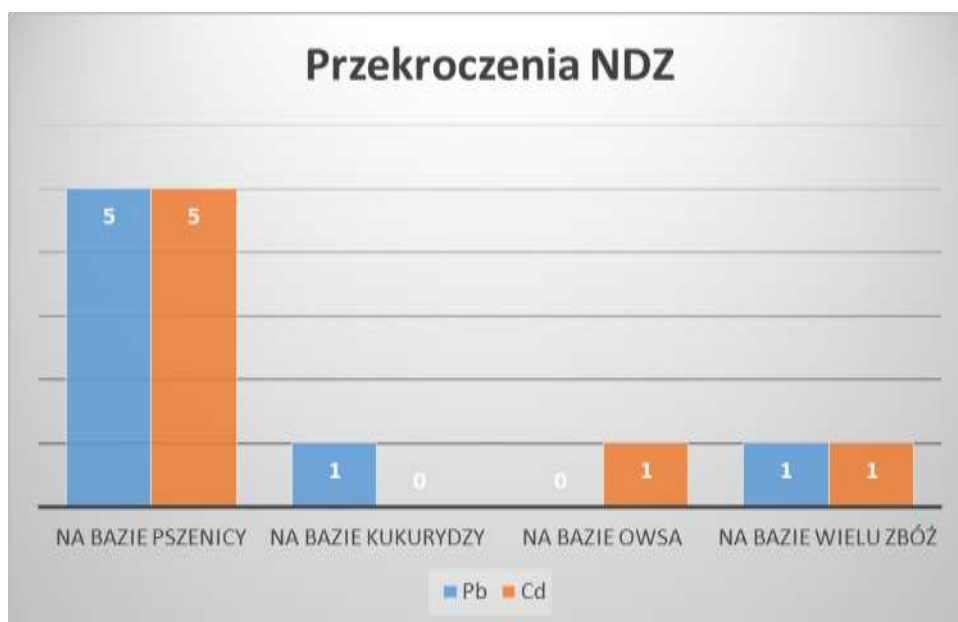
W tabeli 3 przedstawiono wyniki badań 66 próbek produktów na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci. Zawartości ołowiu i kadmu wahały się w nich znacznie z RSD 100% i 88%, odpowiednio. Poniżej granicy oznaczalności Pb było 21% próbek produktów na bazie zbóż, a w przypadku Cd tylko 3% próbek. Jednocześnie, średnie zawartości Pb i Cd

były bardzo małe, około 2-krotnie niższe od wartości dopuszczalnych. Nie stwierdzono obecności rtęci powyżej 0,001 mg/kg w badanych produktach.

Tabela 3. Zawartość Pb, Cd i Hg w produktach na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci
Pb, Cd and Hg content in cereal-based food for infants and toddlers

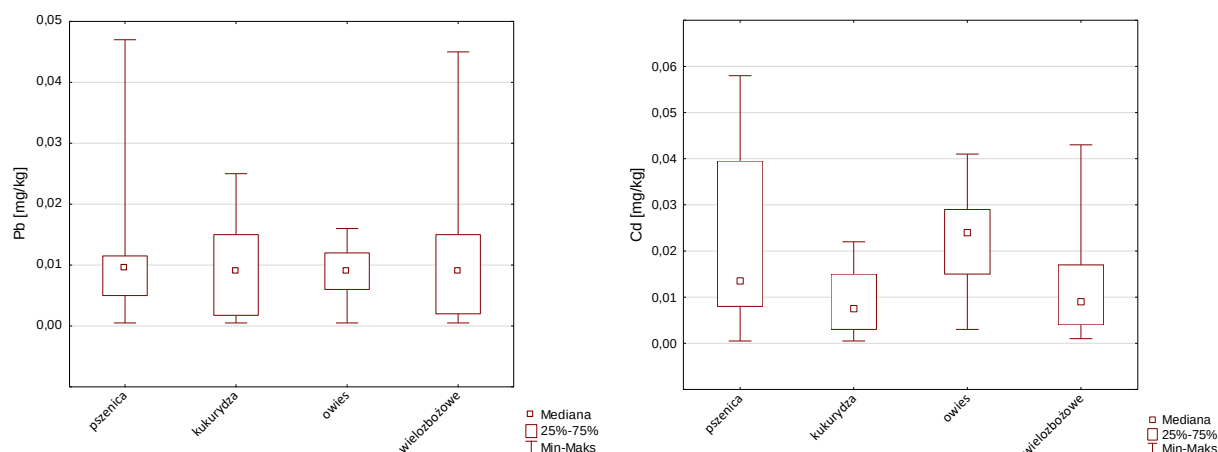
Rodzaj produktu	n	Pb, mg/kg		Cd, mg/kg		Hg, mg/kg
		zakres	średnia	zakres	średnia	
Na bazie pszenicy	28	<0,001-0,047	0,013±0,013	<0,001-0,058	0,021±0,018	<0,001
Kaszka mleczna manna	7	<0,001-0,010	0,006±0,003	0,002-0,020	0,010±0,005	<0,001
Kaszka mleczno-pszenna z owocami	9	<0,001-0,011	0,009±0,003	<0,001-0,014	0,006±0,004	<0,001
Kaszka manna	12	<0,001-0,047	0,018±0,017	0,013-0,058	0,039±0,014	<0,001
Na bazie kukurydzy	12	<0,001-0,025	0,009±0,008	<0,001-0,022	0,009±0,007	<0,001
Kaszka ryżowo-kukurydziana	5	<0,001-0,019	0,010±0,006	<0,001-0,017	0,013±0,006	<0,001
Kaszka ryżowo-kukurydziana z owocami	4	<0,001-0,025	0,014±0,009	0,001-0,014	0,009±0,007	<0,001
Kleik kukurydziany	3	<0,001-0,004	0,003±0,002	<0,001-0,005	0,003±0,002	<0,001
Na bazie owsa	9	<0,001-0,016	0,008±0,005	0,003-0,041	0,022±0,012	<0,001
Kaszka mleczno-owsiana	6	<0,001-0,016	0,009±0,005	0,015-0,041	0,025±0,009	<0,001
Kaszka mleczno-owsiana z owocami	3	<0,001-0,012	0,007±0,005	0,003-0,035	0,015±0,014	<0,001
Na bazie wielu zbóż	17	<0,001-0,045	0,010±0,011	0,001-0,043	0,012±0,010	<0,001
Kaszka mleczno-wielozbożowa z owocami	4	<0,001-0,016	0,008±0,007	0,003-0,018	0,010±0,005	<0,001
Kaszka wielozbożowa z owocami	4	<0,001-0,015	0,007±0,005	0,001-0,012	0,006±0,004	<0,001
Kaszka wielozbożowa	9	0,001-0,045	0,013±0,013	0,001-0,043	0,015±0,012	<0,001
Razem	66	<0,001-0,047	0,011±0,011	<0,001-0,058	0,017±0,015	<0,001

Przekroczenia dopuszczalnych zawartości ołowiu i kadmu stwierdzono w 7 próbkach badanych produktów, co stanowi 11% wszystkich zbadanych produktów (Rys. 1). Najwięcej przekroczeń dopuszczalnych zawartości Pb stwierdzono w 5 próbkach kaszki manny oraz w 1 próbce kaszki ryżowo-kukurydzianej z owocami i 1 próbce kaszki wielozbożowej. Najwięcej przekroczeń dopuszczalnej zawartości Cd stwierdzono również w 5 próbkach kaszki pszennej, ale tylko w 1 tej samej, w której przekroczona była wartość NDZ dla ołowiu oraz w 1 próbce kaszki mleczno-owsianej i 1 próbce kaszki wielozbożowej.



Rysunek 1 Przekroczenia dopuszczalnych zawartości Pb i Cd w poszczególnych grupach produktów na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci
Exceedances of the permissible Pb and Cd content in individual groups of cereal-based products for infants and toddlers

Analiza statystyczna, nie wykazała istotnych różnic ($p > 0,05$) pomiędzy zawartością ołowiu w produktach na bazie różnych zbóż. W odróżnieniu do kadmu, którego zawartość istotnie zależała ($p < 0,05$) od rodzaju zboża, na bazie którego produkty zostały wyprodukowane. Zawartości kadmu w badanych produktach układały się w kolejności: na bazie owsa > na bazie pszenicy > wielozbożowe > na bazie kukurydzy (Rys. 2). Największy rozrzut wyników zawartości ołowiu i kadmu obserwowany był zwłaszcza w produktach na bazie pszenicy.



Rysunek 2. Średnie zawartości Pb i Cd w produktach na bazie różnych zbóż dla niemowląt i małych dzieci
Mean Pb and Cd content in cereal-based products for infants and toddlers

We wcześniejszych badaniach w Polsce [Wojciechowska-Mazurek i in. 2008] średnie zawartości Pb i Hg w produktach dla niemowląt i małych dzieci na bazie zbóż były na podobnym poziomie jak w niniejszych badaniach, tj. (0,013-0,017) mg/kg i 0,002 mg/kg, odpowiednio, natomiast w przypadku Cd były niższe (0,003-0,007) mg/kg. W Raportach EFSA [2012a, 2012b, 2012c] średnie zawartości Pb, Cd i Hg w żywności dla niemowląt i małych dzieci z udziałem produktów zbożowych były również małe i wahały się w zakresie (0,007-0,013) mg/kg, 0,012 mg/kg i 0,0013 mg/kg, odpowiednio.

W Hiszpanii, w produktach na bazie zbóż zawartości Pb były niekiedy wysokie (0,036 mg/kg-0,598 mg/kg), natomiast Cd były na podobnym poziomie (0,007-0,036) mg/kg [Roca de Togores i in. 1999]. Późniejsze badania wykazały jeszcze wyższe maksymalne zawartości Pb w tego rodzaju produktach (<0,002-1,027) mg/kg, natomiast zawartości Cd były analogiczne (0,003-0,040) mg/kg [Hernandez-Martinez, Navaro-Blasco 2012]. Kolejne badania przeprowadzone w Hiszpanii dotyczące występowania Hg w produktach zbożowych dla niemowląt, wykazały obecność tego metalu na poziomie <0,0003-0,0140 mg/kg [Hernandez-Martinez, Navaro-Blasco 2013]. Podobnie małe zawartości Hg w tego typu produktach stwierdzono w Portugalii (0,0002-0,0030 mg/kg) [Martins i in. 2013] i Francji (0,0003-0,0010 mg/kg) [Guerin i in. 2018]. W Słowenii zawartości Pb i Cd wykryto na poziomach 0,001-0,059 mg/kg i 0,023-0,024 mg/kg, odpowiednio [Kirincic i in. 2019]. EFSA w zebranych danych od państw wspólnotowych oceniła średni poziom występowania poszczególnych metali w produktach na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci następująco: Pb - (0,007-0,013) mg/kg, Cd - 0,012 mg/kg i Hg 0,0013 mg/kg [EFSA 2012a, EFSA 2012b, EFSA 2012c]. Przeprowadzona przez Khaneghanh i in. [2020] analiza światowych danych publikowanych w latach 2013-2019 wykazała zawartości ołowiu i kadmu w produktach na bazie zbóż dla niemowląt, odpowiednio: $0,040 \pm 0,016$ mg/kg i $0,012 \pm 0,290$ mg/kg.

W Pakistanie zawartości Pb i Cd w produktach dla niemowląt i małych dzieci wynosiły 0,053-0,095 mg/kg i 0,026-0,088 mg/kg, odpowiednio [Kazi i in. 2010]; w Chinach 0,005-0,086 mg/kg i 0,000-0,0013 mg/kg, odpowiednio [Liu i in. 2010]; w Australii w śniadaniowych produktach zbożowych dla dzieci wahały się w zakresie <0,01-0,246 mg/kg i <0,01-0,107 mg/kg, odpowiednio [Tinggi i Schoendorfer 2018], z najwyższymi zawartościami znacznie przekraczającymi aktualne zalecenia. Również wysokie zawartości Pb i Cd odnotowano w produktach na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci w Maroko – (0,16-1,057) mg/kg i 0,011-0,123) mg/kg, odpowiednio [Sifou i in. 2021] i Nigerii – 0,29-2,34 mg/kg i 0,001-0,46 mg/kg, odpowiednio [Igweze i in. 2020].

Ocena narażenia

Instytut Matki i Dziecka [IMiD, 2014], a także producenci w ramach całodzienniej racji pokarmowej (CRP) zalecają jednorazową dawkę produktów dla niemowląt i małych dzieci na bazie zbóż wynoszącą 20 g do 1 roku życia i 30 g w wieku 1-3 lat. Uwzględniając średnią zawartość Pb i Cd w zbadanych produktach do organizmu niemowlęcia do 1 roku życia wprowadzane jest 0,22 µg Pb i 0,34 µg Cd, natomiast dla dzieci w wieku 1-3 lat – 0,33 µg Pb i 0,51 µg Cd. Wielkość pobrania ołowiu i kadmu wraz z jednorazową dawką produktu w µg/kg masy ciała w odniesieniu do średniej masy ciała niemowląt w wieku od 6 miesięcy do 3 lat kształtuje się następująco (Tabela 4):

Tabela 4. Poziom pobrania Pb i Cd z jednorazową dawką produktu na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci
Pb and Cd uptake level with a single dose of a cereal-based product for infants and toddlers

Wiek, miesiące	6	8	12	24	36
Waga, kg (50c) ¹	7,7	8,25	9,35	11,35	14,2
Pb, µg/kg m.c.	0,029	0,027	0,035	0,029	0,023
BMDL ₀₁	1,9%	1,8%	2,4%	1,9%	1,5%
BMDL ₁₀	4,5%	4,2%	5,6%	4,6%	3,7%
Cd, µg/kg m.c.	0,044	0,041	0,055	0,045	0,036
TDI	12%	11%	15%	12%	10%

¹ 50 centyl

Z oszacowanego poziomu pobrania Pb i Cd z jednorazową dawką produktu na bazie zbóż przez niemowlęta i małe dzieci wynika, że jest on znacznie poniżej określonych dopuszczalnych wartości. Pojedyncza porcja produktu na bazie zbóż może stanowić (1,5-2,4)% BMDL₀₁ i (3,7-5,6)% BMDL₁₀, ustalonych dla ołowiu. W przypadku kadmu, udział jednorazowej dawki w całodziennym pobraniu jest znacznie wyższy i wynosi (10-15)%. Można więc stwierdzić, że na podstawie obecnie obowiązujących zaleceń jednorazowa dawka produktu na bazie zbóż w CRP nie stanowi istotnego zagrożenia dla zdrowia niemowląt i małych dzieci. Obawy mogą jedynie budzić przypadki najwyższych zawartości Pb, dla których BMDL₀₁ waha się w granicach 7-10%, a BMDL₁₀ – 16-24%. W przypadku stwierdzonych najwyższych zawartości Cd – stanowi to już 34-52% TDI dla 1 posiłku w całodzienniej racji pokarmowej. Dla Hg nie obliczono wartości pobrania wraz

z produktami dla niemowląt i małych dzieci na bazie zbóż ze względu na brak jego stwierdzonej obecności w badanych produktach powyżej wartości LOQ.

Większość literaturowych danych dotyczących wielkości spożycia metali toksycznych przez niemowlęta i małe dzieci odnosi się do całodziennych racji pokarmowych bez wyróżnienia konkretnych grup produktów. Stąd też przywołano tu nieliczne dostępne. Np. w Hiszpanii stwierdzono wyższe poziomy spożycia Pb, Cd i Hg wraz z produktami na bazie zbóż dla niemowląt, ale nie przekraczających na ogół dopuszczalnych poziomów spożycia [Hernandez-Martinez, Blasco 2012, 2013] oraz w Słowenii [Kirincic i in. 2019] i Korei [Kim i in. 2014]. W Korei [Kim i in. 2014] oszacowano również udział produktów zbożowych w całkowitym pobraniu z diety Pb, Cd i Hg przez dzieci w wieku 0-6 lat, wynoszący odpowiednio 11,1%, 37,9% i 25,4%. Bardzo wysoki poziom spożycia Pb i Cd wraz z produktami zbożowymi dla niemowląt do 1 roku życia, przekraczający nawet kilkaset % dopuszczalnych wartości spożycia, odnotowano w Nigerii [Igweze i in. 2020]. Podsumowaniem mogą być natomiast opinie przedstawione przez EFSA na podstawie danych europejskich wskazujące, że niemowlęta i małe dzieci są najbardziej narażone na toksyczne działanie Pb, Cd i Hg [EFSA 2012a, EFSA 2012b, EFSA 2012c]. W odniesieniu do ołowiu najwyższe średnie pobranie stwierdzono u małych dzieci w porównaniu do pozostałych grup wiekowych, wynoszące 1,32 µg/kg m.c., przekraczające BMDL₁₀ i znajdujące się w górnej granicy BMDL₀₁. Wielkość pobrania Pb przez niemowlęta oszacowano na poziomie 0,91 µg/kg m.c., które również przekracza BMDL₁₀. Stwierdzono, że największy udział w wielkości pobrania Pb mają cztery grupy produktów, tj. woda, mleko i produkty mleczne, produkty dla niemowląt i małych dzieci oraz produkty na bazie zbóż [EFSA 2012a]. Podobnie duże pobranie odnotowano w przypadku kadmu przekraczające wyznaczoną wartość TWI wynoszące 2,68 µg/kg m.c. dla niemowląt i 4,85 µg/kg m.c. dla małych dzieci, w których udział zbóż i produktów zbożowych oszacowano na poziomie 21,7% (niemowlęta) i 27,1% (małe dzieci) [EFSA 2012b]. W odniesieniu do rtęci nieorganicznej stwierdzono pobranie na bardzo niskim poziomie, poniżej wyznaczonych wartości TWI tj. 0,77 µg/kg m.c. (niemowlęta) i 1,13 µg/kg m.c. (małe dzieci) [EFSA 2012c].

PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań zawartości ołowiu, kadmu i rtęci w produktach na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci dostępnych na rynku krajowym wskazują, że nie stanowią one zagrożenia dla zdrowia niemowląt i małych dzieci. Średnie zawartości poszczególnych

metali w produktach na bazie różnych zbóż w większości zbadanych produktów były poniżej dopuszczalnych zawartości określonych w rozporządzeniach KE [EU 2021/1317, EU 2021/1323]. Ponadto, oszacowany poziom narażenia na Pb i Cd w wyniku spożycia jednorazowej dawki produktu przez niemowlęta i małe dzieci nie wpływa znacząco na ogólny poziom spożycia, który jest znacznie poniżej określonego dopuszczalnego poziomu spożycia. Pozytywnie należy również ocenić brak stwierdzonej obecności rtęci w zbadanych produktach powyżej 0,001 mg/kg (LOQ). Niepokój jedynie mogą budzić produkty, w których dopuszczalne zawartości ołowiu i kadmu zostały przekroczone, i były to w większości produkty na bazie pszenicy. Tym niemniej, na tle danych z innych krajów, w których przekroczenia dopuszczalnych zawartości, zwłaszcza ołowiu i kadmu są niekiedy wielokrotne, produkty dla niemowląt i małych dzieci dostępne na rynku krajowym nie powinny budzić obaw odnośnie do ich możliwych negatywnych skutków zdrowotnych.

PIŚMIENNICTWO

1. AAP (American Academy of Pediatrics). (2016). Prevention of childhood lead toxicity <https://pediatrics.aappublictions.org/content/pediatrics/early/2016/06/16/peds.2016-1493.full.pdf> (online)
2. Donzelli G., Carducci A., Llopis-Gonzales A., Verani M., Llopis-Morales A., Cioni L., Morales-Suares-Varela M. (2019). The association between lead and attention-deficit/hyperactivity disorder: A systematic review. *Int. J. Environ. Re. Public Health* 16, 382; doi:10.3390/ijerph16030382
3. EFSA, European Food Safety Authority (2012a). Scientific Report of EFSA. Lead dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, 10(7), 2831, 1-59
4. EFSA, European Food Safety Authority, (2012b) Scientific Report of EFSA. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, 10(1): 2551, 1-37
5. EFSA, European Food Safety Authority (2012c). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal*, 10 (12):2985, 1-241
6. Guerin T., Chekri R., Chafey C., Testu Ch., Hulin M., Noel L. (2018) Mercury in foods from the first French total diet study on infants and toddlers. *Food Chem.* 239, 920-925
7. HBBF (Healthy Babies Bright Future). (2019). What's in my baby's food. www.healthybabyfood.org/sites/healthybabyfood.org/files/2019-10/BabyFoodReport_FULLREPORT_ENGLISH_R5b.pdf
8. Hernandez-Martinez R., Navaro-Blasco I. (2012). Estimation of dietary intake and content of lead and cadmium in infant cereals marketed in Spain. *Food Control* 26, 6-14
9. Hernandez-Martinez R., Navaro-Blasco I. (2013). Survey of total mercury and arsenic content in infant cereals marketed in Spain and estimated dietary intake. *Food Control* 30, 423-432

10. Igweze Z.N., Ekhaton O.C., Orisakwe O.E. (2020). Lead and cadmium in infant milk and cereal based formulae marketed in Nigeria: A probabilistic non-carcinogenic human health risk assessment. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 71(3), 303-311
11. IMiD. (2014). *Żywnienie niemowląt i małych dzieci*. Pod red. H. Weker i M. Barańskiej. Warszawa Instytut Matki i Dziecka
12. Kazi T.G., Jalbani N., Baig J.A., Arain M.B., Afridi H.I., Jamali M.K., Shah A.Q., Nemon A.N. (2010). Evaluation of toxic elements in baby foods commercially available in Pakistan. *Food Chem.*, 119, 13-13-1317
13. Kim D.W., Woo H.D., Joo J., Park K.S., Hong Y.S., Sohn S.J., Yoon H.J., Hwang M.S., Kim J. (2014). Estimated long-term dietary exposure to lead, cadmium, and mercury in young Korean children
14. Khaneghah A.M., Fakhri Y., Nematollahi A., Pirhadi M. (2020). Potentially toxic elements (PTEs) in cereal based foods: A systematic review and meta-analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, 96, 30-44
15. Kirincic S., Joksić A.S., Zupan M., Ivanos J., Rep P., Rotter E., Ivartnik M., Grčman H. (2019). Lead and cadmium in foods/drinking water from Slovenian market/taps: Estimation of overall chronic dietary exposure and health risks. *Food Addit. Contam.* 36(100), 1522-1537
16. Lee M-J., Chou M-Ch., Cou W-J., Huang Ch-W., Kuo Ho-Ch., Lee S-Y., Wang L-J. (2018). Heavy metals' effect on susceptibility to attention-deficit/hyperactivity disorder: Implication of lead, cadmium and antimony. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 1221; doi:10.3390/ijerph15061221
17. Liu P., Wang C-N., Song X-Y., Wu Y-N. (2010). Dietary intake of lead and cadmium by children and adults – Result calculated from dietary recall and available lead/cadmium level in food in comparison to result from food duplicate diet method. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 450-457
18. Martins C., Vasco E., Paixao E., Alvito P. (2013). Total mercury in infant food, occurrence and exposure assessment in Portugal. *Food Addit. Contamin: Part B* 6(3), 151-157
19. PB-ZA 04 wyd. 5 z dn. 15.03.2016 Produkty spożywcze. Oznaczanie zawartości rtęci metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z techniką amalgamacji
20. PN-EN 14084:2004 Artykuły żywnościowe. Oznaczanie pierwiastków śladowych. Oznaczanie zawartości ołowiu, kadmu, cynku, miedzi i żelaza metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) po mineralizacji mikrofalowej
21. Roca de Togores M., Farre R., Frigola A.M. (1999). Cadmium and lead in infants cereals – electrothermal-atomic absorption spectroscopic determination. *Sci. Total Environ.*, 234, 197-201
22. WE 1881/2006. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych Dz.U. UE L364/5
23. Rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1317 z dnia 9 sierpnia 2021 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów ołowiu w niektórych środkach spożywczych Dz.Urz. UE L 286/1

24. Rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1323 z dnia 10 sierpnia 2021 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów kadmu w niektórych środkach spożywczych Dz.Urz. UE L 288/13
25. Sifou A., Benabbou A., Aakame R. B., Mahnine N., Antonopoulos A., Halim M., Zinedine A. (2021). Trace elements in breakfast cereals and exposure assessment in Moroccan population: Case of lead and cadmium. *Biol. Trace Elem. Res.*, 199, 1268-1275
26. Tinggi U., Schoendorfer N. (2018). Analysis of lead and cadmium in cereal products and duplicate diets of a small group of selected Brisbane children for estimation of daily metal exposure. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 50, 671-675
27. UE 2021/1317. Rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1317 z dnia 9 sierpnia 2021 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów ołowiu w niektórych środkach spożywczych
28. UE 2021/1323. Rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1323 z dnia 10 sierpnia 2021 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów kadmu w niektórych środkach spożywczych
29. Wojciechowska-Mazurek M., i in. (2008). Monitoring zanieczyszczenia żywności pierwiastkami szkodliwymi dla zdrowia. Cz. I. Produkty zbożowe pszenne, warzywne, cukiernicze oraz produkty dla niemowląt i dzieci. *Roczn. PZH*, 59(3), 251-266
30. Zin M. (2009). Ocena żywności i żywienia. Zboża i produkty zbożowe. Wyd. Uniwersytetu Rzeszowskiego

**SPECJACJA OŁOWIU W ŚRODOWISKU, ORGANIZMIE
CZŁOWIEKA I ROŚLINY ORAZ SPOSOBY PRZENIKANIA,
METABOLIZM I ODDZIAŁYWANIE POSZCZEGÓLNYCH FORM
SPECJACYJNYCH NA ORGANIZMY ŻYWE**

Karolina Rybarska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych
ul. Starołęcka 40, 61-361 Poznań

karolina.paszynska@ibprs.pl

Streszczenie

Ołów należy do jednych z najbardziej toksycznych metali. Jego liczne związki są rozpowszechnione w środowisku i stanowią zagrożenie dla zdrowia. Stopień ryzyka zależy od formy specjacyjnej, w jakiej ten pierwiastek występuje. W poniższej pracy omówione zostały najczęściej spotykane formy specjacyjne ołowiu w środowisku, w organizmie człowieka i w roślinach. Poruszono kwestie migracji związków w ekosystemie, ich transportu i metabolizmu oraz szkodliwego działania na organizmy żywe. Przedstawiono również metody analizy specjacyjnej ołowiu z przykładami oznaczeń, z uwzględnieniem badań żywności.

Słowa kluczowe: ołów, toksyczność, formy specjacyjne, analiza specjacyjna

**SPECIFICATION OF LEAD IN THE ENVIRONMENT, HUMAN AND PLANT
ORGANISM AND PERMEABILITY, METABOLISM AND THE INFLUENCE OF
PARTICULAR SPECIALIZATION FORMS ON LIVING ORGANISMS**

Summary

Lead is one of the most toxic metals. Its numerous compounds are widespread in the environment and pose a health hazard. The degree of risk depends on the speciation form in which this element occurs. The following work discusses the most common speciation forms of lead in the environment, in the human body and in plants. The issues of migration of compounds in the ecosystem, their transport and metabolism as well as harmful effects on living organisms were discussed. The methods of lead speciation analysis are also presented

with examples of determinations, including food studies.

Keywords: lead, toxicity, speciation forms, speciation analysis

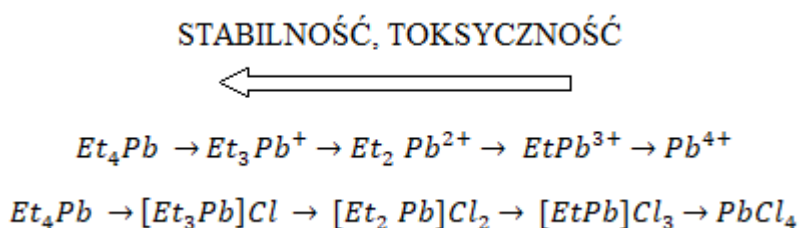
WSTĘP

Ołów był wykorzystywany przez człowieka już tysiące lat p.n.e. Na skutek intensywnego rozwoju przemysłu od XVIII do XX wieku oraz coraz szerszego poznawania właściwości i zastosowań tego metalu, rosło zanieczyszczenie środowiska związkami ołowiu. Są one obecne w środowisku z powodu dawniejszego stosowania ich jako środka przeciwstukowego, do produkcji rur czy farb oraz aktualnego wykorzystania w bateriach i akumulatorach kwasowo-ołowiowych [Ebdon i in. 1998, Mester i in. 2000]. Najwyższe dopuszczalne poziomy zawartości ołowiu w produktach spożywczych reguluje rozporządzenie Komisji Europejskiej 2021/1317 z dnia 9 sierpnia 2021 r. Wynika z niego, że największe ilości ołowiu w przeliczeniu na mg/kg świeżej masy spotykane są w suplementach diety (3,0 mg/kg), niektórych solach nierafinowanych (2,0 mg/kg) czy przyprawach (1,5 mg/kg) oraz maźkach (1,5 mg/kg). Dla właściwej oceny zagrożenia konieczne jest poznanie poszczególnych form specjacyjnych metalu. Wszystko to wymusza wzrost zainteresowania jego migracją i oddziaływaniem, zarówno na biosferę, jak i na człowieka oraz technikami analizy specjacyjnej.

FORMY SPECJACYJNE OŁOWIU W ŚRODOWISKU

Ołów w przyrodzie występuje na stopniach utlenienia od $-IV$ do $+IV$, jednak najczęściej jest to $Pb(II)$ i $Pb(IV)$. Związki Pb^{2+} spotykane są naturalnie w postaci minerałów, np. galeny lub anglezytu, jak również jako zanieczyszczenie powstałe w wyniku działalności człowieka. Po przedostaniu się do środowiska glebowego, z racji małej ruchliwości, gromadzi się głównie w warstwie powierzchniowej, zwykle do głębokości 20 cm [Staniak 2014]. Z gleby ołów nieorganiczny pomimo, że w większości jest silnie związany przez materię organiczną, może migrować do tkanek roślinnych, a następnie zostać wchłoniętym przez zwierzęta i ludzi. Związane jest to ze zdolnością metali ciężkich do akumulacji, powodującą wzrost stężenia ołowiu w tkankach kolejnych ogniw łańcucha pokarmowego [Lorenc 2020, Winiarska-Mieczana i in. 2011]. Związki Pb^{4+} są znacznie słabiej rozpowszechnione niż związki Pb^{2+} . W przyrodzie praktycznie nie występują, ponieważ poza tym, że są nietrwałe, do ich powstania wymagane jest silnie utleniające środowisko [Abadin i in. 2020].

Odrotna sytuacja spotykana jest dla organicznych połączeń ołowiu, gdzie najczęściej spotykany jest +IV stopień utlenienia [Abadin i in. 2020]. Zanieczyszczenie środowiska związkami ołowioorganicznymi, wynikające głównie ze stosowania ich jako środków przeciwstukowych w paliwach, stopniowo maleje. Jednak organiczne formy ołowiu są znacznie bardziej toksyczne niż nieorganiczne. Ich toksyczność jest wyższa dla ligandów alkilowych niż arylowych, a dla form kationowych wzrasta wraz ze wzrostem liczby grup organicznych, np. etylowych. W środowisku wodnym związki alkilołowiuowe są niestabilne i zwykle rozpadają się na jony, uwalniając kolejne grupy alkilowe. Ich trwałość maleje wraz ze spadkiem ilości ligandów. Tetraalkilopochodne w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła są dość stabilne, jednak rozpadają się pod wpływem działania światła UV [Lorenc 2020, Mester i in. 2000, Ebdon i in. 1998]. Toksyczność i stabilność alkilopochodnych na przykładzie przedstawiono na rysunku 1. Związki organiczne ołowiu, szczególnie tetraalkilopochodne oraz produkty ich rozkładu, stanowią jedno z głównych zanieczyszczeń żywności tym pierwiastkiem (Xia i in. 2017).



Rysunek 1. Schemat rozkładu związków tetraalkilołowiu
Scheme of decomposition of tetraalkyllead compounds

FORMY SPECJACYJNE OŁOWIU W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

Gdy jony Pb^{2+} dostaną się do organizmu, ołów krąży w organizmie właśnie w tej postaci. Wraz z krwią może dotrzeć do wszystkich tkanek organizmu, w tym przenikać przez barierę krew-mózg i przez łożysko. Większość ołowiu jest wydalana z organizmu, jednak pierwiastek ten ma zdolność akumulacji. Gromadzi się głównie w kościach. U dorosłego człowieka trafia tam nawet 94% ołowiu, który nie został usunięty, u dzieci jest to maksymalnie 73%. Dzięki powolnemu uwalnianiu, stężenie ołowiu we krwi może przez długi czas pozostawać na stałym poziomie. Z krwi przedostaje się do narządów wewnętrznych, szczególnie do nerek i wątroby, odpowiedzialnych za detoksykację i wydalanie [Giel-Pietraszuk i in. 2012].

Tabela 1. Zawartość ołowiu w poszczególnych frakcjach krwi [Giel-Pietraszuk i in. 2012]
Lead content in individual blood fractions [Giel-Pietraszuk et al. 2012]

Krew	Zawartość [%]
erytrocyty	99
białka osocza	0,4 – 0,75
niskocząsteczkowe ligandy w osoczu	0,25 – 0,6
ołów w stanie wolnym	0,0001
Pozostałe narządy	Zawartość [µg/g]
wątroba	1
nerki (kora-rdzeń)	0,8-0,5
jajniki i trzustka	0,4
śledziona	0,3
prostata i nadnercza	0,2
mózg i tkanka tłuszczowa	0,1
jądra	0,08
serce	0,07
mięśnie szkieletowe	0,05

Jony Pb^{2+} wiążą się z białkami, szczególnie z grupami karboksylowymi reszt kwasów glutaminowego i asparaginowego oraz tiolowymi cysteiny. W krwinkach czerwonych, które zawierają 99% ołowiu obecnego we krwi, pierwiastek występuje związany z błoną komórkową, jednak większość jest połączona z białkami, w szczególności z dehydratazą kwasu δ -lewulinowego. Pozostały 1% jest związany z białkami osocza (przede wszystkim z albuminą oraz z γ -globulinami i metaloproteinami) oraz z niskocząsteczkowymi związkami (cysteiną, kwasami karboksylowymi) [Mohhamed i in. 2021, Giel-Pietraszuk i in. 2012].

Dehydrataza kwasu δ -aminolewulinowego

Ołów jest inhibitorem enzymów katalizujących biosyntezę hemu: dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego (ALAD), ferrochelatazy i koproporowej oksydazy pirynogenowej. Największy wpływ wykazuje w stosunku do ALAD, enzymu katalizującego dimeryzację kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) do monopirołu porfobilinogenu (PBG). W jego miejscu aktywnym znajduje się cynk, który w przypadku zatrucia ołowiem jest wypierany, czego następstwem jest dezaktywacja enzymu. Zahamowanie przemiany ALA powoduje jego

akumulację, co w konsekwencji, prawdopodobnie przez antagonistyczne działanie w stosunku do receptora kwasu γ -aminomasłowego (GABA), wywołuje patologiczne zmiany w tkance nerwowej [Scinicariello i in. 2007].

Albumina

Albuminy surowicy stanowią główny składnik rozpuszczalnej białkowej frakcji osocza krwi. Służą przede wszystkim do transportu kwasów tłuszczowych oraz innych związków organicznych i nieorganicznych, w tym jonów metali. Albumina surowicy ludzkiej (HSA) wiąże toksyczne metabolity, magazynuje tlenek azotu oraz pomaga utrzymać prawidłowe ciśnienie osmotyczne krwi. To białko globularne zbudowane z 585 aminokwasów, z czego 35% stanowi cysteina. Składa się z trzech domen, każdej zbudowanej z dwóch subdomen i stabilizowanej 17 mostkami disiarczkowymi między resztami cysteiny. Jony Pb^{2+} są wiązane dzięki oddziaływaniom hydrofilowym przez atomy tlenu i azotu. Przyłączenie ołowiu destabilizuje białko, przez zmniejszenie udziału α -helisy w jego drugorzędowej strukturze z 57% do 48% [Belatik i in. 2012, Engelking 2020, Lambrinidis i in. 2015].

Metalotioneiny

Metalotioneiny (MT) to grupa białek o niskiej masie cząsteczkowej, zawierających w cząsteczce 20 grup cysteinowych, tworzących miejsca koordynacyjne dla wiązania jonów metali. Spotykane są u organizmów należących do królestw roślin, zwierząt, grzybów i sinic. [Suhy i in. 1999]. Metalotioneiny są zbudowane z pojedynczego łańcucha, na który składa się od 61 do 68 aminokwasów (brak aminokwasów aromatycznych), zlokalizowanych w dwóch domenach α i β . Reszty cysteiny znajdują się w sekwencjach Cys-Cys, Cys-x-Cys, Cys-x-y-Cys (gdzie x i y to aminokwasy niebędące cysteiną) oraz Cys-Pro-Cys-Pro, charakterystycznej dla MT-3. Gdy białko nie jest związane z żadnym metalem, nazywane jest apo-metalotioneiną lub tioneiną. Wiązanie metalu odbywa się przez siarkę grup tiolowych. Możliwe jest przyłączenie 7 jonów dwuwartościowych (cynku, kadmu, ołowiu, rtęci) lub 12 jonów jednowartościowych (miedzi, srebra). Pociąga to za sobą wzrost stabilności i odporności białka na proteolizę, powodując akumulację metali. MT-2A składa się z 61 aminokwasów. Domena α znajduje się w C-końcowej części, liczy aminokwasy od 31 do 61 i zawiera 11 reszt cysteiny, które wiążą cztery jony dwuwartościowe. Domena β znajdująca się w N-końcowej części białka, liczy aminokwasy od 1 do 30, w tym 9 reszt cysteiny, wiążących trzy jony dwuwartościowe. MT-1, MT-3 i MT-4 mają analogiczną budowę. [Prasad, Bao 2020, Forma, Bryś 2012].

Metalotioneiny odpowiadają za detoksykację organizmu z metali ciężkich,

w szczególności z Cd i Hg, utrzymanie homeostazy jonów cynku i miedzi, ochronę przed stresem oksydacyjnym i apoptozą. Powinowactwo metali do reszt cysteiny jest identyczne jak do grup tiolowych: $\text{Zn(II)} < \text{Pb(II)} < \text{Cd (II)} < \text{Cu(I)} < \text{Ag(I)} < \text{Hg(II)}$. MT-1 i MT-2 są najpowszechniejsze. Ich biosynteza przebiega we wszystkich tkankach, przede wszystkim w wątrobie, ale też w dużym stopniu w nerkach, trzustce i jelitach. Zwiększa się w obecności metali ciężkich, ale również leków, cytokin, hormonów (szczególnie glukokortykoidów), czy w wyniku działania promieniowania i stresu oksydacyjnego [Forma, Bryś 2012, Suhy i in. 1999, Wong i in. 2017]. MT-1 i MT-2 zwykle związane są z cynkiem, w obecności ołowiu jest on jednak wypierany. Na przykładzie MT-2 można zauważyć różnice w wiązaniu kationów Pb^{2+} i innych jonów dwuwartościowych. MT-2 zwykle koordynuje metale dwuwartościowe (np. Zn czy Cd) tetraedrycznie, jednak dla ołowiu widać tendencję do wiązania jonu przez trzy atomy siarki, wynikającą z obecności wolnej pary elektronowej na orbitalu 6s ołowiu, zajmującej jedno miejsce koordynacyjne. Sposób koordynacji jest również zależny od pH, czego nie wykazują kompleksy MT-2 z cynkiem czy kadmem. W środowisku obojętnym spotykany jest tylko jeden sposób wiązania, każdy z siedmiu jonów Pb^{2+} jest koordynowany przez trzy reszty cysteinowe w kształt piramidy trygonalnej. W środowisku kwaśnym ($\text{pH}=4,5$), poza formą piramidy trygonalnej występują również, w domenie α : zniekształcona piramida trygonalna oraz w domenie β : zniekształcona piramida tetragonalna [Vašák i Meloni, 2017].

Oddziaływanie

Wszystkie formy ołowiu wykazują działanie głównie neuro- i nefrotoksyczne. Jego okres półtrwania to około 4 lata, co razem ze zdolnością do kumulowania się w organizmie może prowadzić do chorób przewlekłych [Winiarska-Mieczana i in. 2011].

Ołów nieorganiczny w największym stopniu wchłaniany jest przez układ oddechowy. Gdy cząstki mają średnice do 1 μm , pobierane są w ok. 95%, natomiast większe trafiają do układu pokarmowego i dopiero tam są wchłaniane. Toksyczność kationów ołowiu wynika z ich podobieństwa do innych jonów, głównie Zn^{2+} i Ca^{2+} , przez co może je zastępować w metaloproteinach, powodując ich dezaktywację. Cynk jest naturalnie związany z wieloma białkami. Najważniejsze z nich to białka wiążące DNA, w których cynk występuje w palcach cynkowych. Białka związane z wapniem biorą udział w procesach fizjologicznych, skurczach mięśni, odpowiedzi immunologicznej, wzroście organizmu czy tworzeniu i niszczeniu komórek oraz przesyłaniu sygnałów między nimi. Zastąpienie ich ołowiem zaburza procesy komórkowe. Jony ołowiu oddziałują również na DNA i RNA, przez wiązanie z grupami

fosforowymi czy nawet zasadami azotowymi. Utworzenie kompleksu z DNA może powodować zmiany w strukturze helisy, a przy wyższych stężeniach ołowiu wytrącenie kompleksu. Połączenie z RNA wywołuje jego hydrolizę [Giel-Pietraszuk i in. 2012]. Kationy Pb^{2+} oddziałują również z innymi białkami, z racji wysokiego powinowactwa do grup tiolowych cysteiny i reszt kwasów asparaginowego lub glutaminowego, zaburzając ich strukturę, a tym samym funkcjonowanie [Mohhamed i in. 2021].

Związki tetraalkiloołowiowe wchłaniane są przez człowieka wieloma drogami. Wdychane z powietrzem absorbują się w ilości 30-40%. W kontakcie ze skórą również dostają się do organizmu, z racji ich zdolności do rozpuszczania w tłuszczach, przy czym tetrametylołów wchłania się w mniejszym stopniu niż jego analogi z grupami etylowymi. Po spożyciu mogą natomiast zostać rozłożone w żołądku przez kwas solny, do odpowiednich tripochodnych [Rivas-Urraca 1996]. W pracy Cremer i Callaway z 1961 porównano toksyczność związków tetra- i trialkiloołowiu. Wykazano, że w przeciwieństwie do tetraetylołowiu, tetrametylołów i tetrapropylołów były znacznie mniej toksyczne niż odpowiadające im trialkilopochodne. Potwierdzono również stosunkowo wolny rozkład tetrametylołowiu i tetrapropylołowiu do tripochodnych. Na podstawie wyników sformułowano hipotezę, że to właśnie niskie tempo konwersji odpowiada za niewielką toksyczność tych związków. Dla tetraetylołowiu natomiast, który sam w sobie może być nieszkodliwy, szybkość przemiany jest wysoka, więc jego toksyczność jest porównywalna z formą trialkilową. Podejrzewa się, że to właśnie wysoce toksyczne tripochodne, powstałe podczas rozkładu związków tetraalkilowych w wątrobie, odpowiedzialne są za ich szkodliwość. Alkilowe pochodne ołowiu wykazują działanie toksyczne głównie na układ nerwowy. Tetraetylołów, dzięki lipofilowemu charakterowi, może łatwo przechodzić przez barierę krew-mózg i odkładać się w organie, a dokładnie w korze przedczołowej, hipokampie i limbicznym przodomózgowiu [Cadet i Bolla 2007]. Jak wcześniej wspomniano, łatwo rozkłada się do trialkiloołowiu, który poza możliwością akumulacji w nerkach i wątrobie, zaburza procesy energetyczne w mózgu. Hamuje on reakcję utleniania glukozy, w której wytwarzane jest ATP oraz zmienia rozkład jonów Cl^- w błonach neuronów, zwiększając ich pobudliwość, tym samym powodując wzrost zapotrzebowania na glukozę [Rivas-Urraca 1996].

FORMY SPECJACYJNE OŁOWIU W ROŚLINACH

Przyswajalność metali ciężkich przez rośliny zależna jest od wielu czynników. Są to właściwości gleby, np. pH i wielkość cząstek, indywidualne cechy gatunkowe rośliny, jej stan

fizjologiczny czy powierzchnia korzenia oraz forma specyficjna pierwiastka. Części nadziemne absorbują małe ilości metali, ponieważ ich powierzchnia chroniona jest warstwą wosków i kutykuli. Ołów może dostać się tą drogą do komórek rośliny przez uszkodzenia kutykuli lub przez szparki. Główną częścią rośliny pobierającą metale jest korzeń, przez który dostaje się nawet ponad 90% ich całkowitej ilości. Tam też jest w większości zatrzymywany przez pasma kaspariańskie, przez pektyny w ścianach komórkowych, w błonach komórkowych, przez wytrącanie soli ołowiu w przestrzeniach międzykomórkowych, tworzenie się kompleksów w wakuolach komórek ryzodermi i kory czy przez wiązanie z ligandami organicznymi [Staniak 2014, Kumar i in. 2017]. Jony ołowiu pobrane przez korzenie mogą zostać przetransportowane do innych części rośliny przez ksylem, co regulowane jest przez różne chelatory. Transport i akumulacja metalu są możliwe po związaniu jonów przez wspomniane wcześniej ligandy, którymi mogą być fitochelatyny, metalotioneiny oraz różnego rodzaju aminokwasy i białka, np. glutation, histydynę czy nikotianaminę [Amari i in. 2017].

Glutation

W odpowiedzi na pojawienie się metali ciężkich, rośliny wytwarzają cząsteczki o niskiej masie, zawierające grupy tiolowe. Najpowszechniejszym tego rodzaju związkiem, spotykanym u eukariontów posiadających mitochondria, czyli również u roślin, jest glutation, tripeptyd o wzorze γ -Glu-Cys-Gly. Występuje on w formie zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG) właściwie we wszystkich organellach komórkowych. Wysoka reaktywność grupy tiolowej, jej nukleofilowy charakter, stabilność oraz rozpuszczalność kompleksów GSH odpowiadają za jego właściwości. Glutation stanowi barierę ochronną roślin przed działaniem metali ciężkich, ksenobiotyków i stresem oksydacyjnym. Tripeptyd wiąże jony ołowiu, czy inne szkodliwe związki, w wyniku działania S-transferazy glutationu, a wytworzone kompleksy izolowane są w wakuolach. Z glutationu syntetyzowana jest również inna grupa związków odpowiedzialnych za detoksykację roślin – fitochelatyny [Yadav 2010].

Fitochelaty

Fitochelaty (PC) to grupa peptydów zawierających grupy tiolowe wiążące metale. Występują u roślin, grzybów i glonów. Syntetyzowane są z glutationu lub jego homologów pod wpływem działania syntetazy fitochelatin, aktywowanej w wyniku obecności metali ciężkich. Enzym jest pobudzany przez wiele metali, jednak najsilniej przez jony kadmu. Zbudowany jest z powtarzających się 2 do 11 razy fragmentów γ -Glu-Cys, połączonych z pojedynczym aminokwasem, którym może być glicyna, alanina czy glutamina. Ogólny

wzór można przedstawić następująco: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-X}$, gdzie n to liczba połączeń $\gamma\text{-Glu-Cys}$, a X oznacza resztę trzeciego aminokwasu. Detoksykacja, podobnie jak w przypadku glutationu, odbywa się przez związanie metalu, zmniejszające ilość wolnych jonów w komórce i przeniesienie utworzonego niskocząsteczkowego kompleksu do wakuoli. Na miejscu jony są wiązane, np. z długołańcuchowymi PC, kwasami organicznymi czy jonem siarczkowym w trwałe kompleksy [Barańkiewicz i in. 2009, Scarano i Morelli 2002].

Sposób kompleksowania przez fitochelatyny zależy od metalu. W badaniu autorstwa Scarano i Morelli z 2002 roku porównywano go dla ołowiu i kadmu. Wykazano, że w kontakcie komórki z jonami ołowiu, PC o wartości n równej 3-6, występują jedynie w formie kompleksów, a PC₂ tylko w postaci wolnej oraz, że jony metalu są wiązane przez pojedyncze cząsteczki peptydu. Na podstawie stosunku metal/PC, wynoszących dla Pb-PC₃ i Pb-PC₄ odpowiednio $1,0 \pm 0,2$ i $1,6 \pm 0,1$ i badań spektroskopowych wynioskowano, że jedna cząsteczka PC₃ wiąże jeden jon ołowiu, dla PC₄ jest to jeden lub dwa. Stwierdzono też, że jedynie 40% całkowitej ilości ołowiu zostało związane z fitochelatynami. Podobna część występowała w połączeniu z nierozpoznanymi związkami niskocząsteczkowymi, a reszta ze związkami o dużych masach cząsteczkowych.

Oddziaływanie

Ołów przedostaje się do rośliny głównie systemem korzeniowym, jednak pobieranie go z gleby jest niewielkie. W większości jest tam również zatrzymywany [Ociepa-Kubicka i Ociepa 2012]. Mimo tego, z racji swojej wysokiej toksyczności, wykazuje szereg szkodliwych działań na funkcjonowanie roślin. Ołów zmniejsza ilość dostępnych dla komórki białek, wiążąc się z nimi [Amari i in. 2017]. Wpływa na wzrost roślin, zmienia przepuszczalność błon komórkowych, narusza równowagę wodną i odżywianie mineralne. Powoduje powstawanie reaktywnych form tlenu, wywołując stres oksydacyjny, tym samym uszkadzając komórki. Reaguje z grupami tiolowymi enzymów, hamując ich aktywność [Yadav 2010]. Zaburza proces fotosyntezy, przez hamowanie aktywności ALAD, enzymu katalizującego jedną z reakcji prowadzących do utworzenia układu porfiryнового chlorofilu. Obniża wydajność fosforylacji oksydacyjnej, zmniejszając ilość grzebieni mitochondrialnych oraz wpływając na enzym katalizujący utlenianie bursztynianu do fumaranu. Wpływa na metabolizm azotu, a dokładnie na nitrogenezę, hamując redukcję azotu do amoniaku przez bakterie symbiotyzujące z rośliną. Powoduje zrywanie wiązań wodorowych i fosfodiesterowych, a tym samym destabilizację czy nawet zniszczenie struktury kwasów nukleinowych [Gruca-Królikowska i Waclawek 2006].

ANALIZA SPECJACYJNA

Pierwiastki występują w odmiennych formach i połączeniach z różnymi ligandami, różniących się biodostępnością i toksycznością. Dla poznania rzeczywistego zagrożenia wynikającego z ich obecności w próbce, konieczne jest oznaczenie nie całkowitej zawartości pierwiastka, a poszczególnych form specjacyjnych. Ze względu na specyfikę analizy specjacyjnej, stosowana technika analityczna powinna spełniać następujące kryteria:

- rozdzielać od siebie, jak również od matrycy próbki, poszczególne formy specjacyjne,
- umożliwiać identyfikację każdej z form specjacyjnych pierwiastka,
- zapewniać wysoką czułość, pozwalając na oznaczenie analitów na bardzo niskich poziomach stężeń, ponieważ już ogólne zawartości pierwiastków to często śladowe ilości.

Biorąc pod uwagę powyższe wymagania, najlepiej sprawdzają się techniki sprzężone. Do rozdzielania analitów najczęściej wykorzystywana jest chromatografia gazowa, ze względu na możliwość osiągnięcia bardzo niskich wartości granic wykrywalności oraz jej wysoką sprawność. W przypadku form nietlotnych korzysta się z technik rozdzielania w fazie ciekłej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej czy elektroforezy kapilarnej, z uwagi na różnorodność mechanizmów rozdzielania i faz ruchomych oraz łatwość łączenia w układzie on-line [Bouyssiere i in. 2003]. Początkowo do detekcji stosowano techniki spektrometrii atomowej (AAS, AES i AFS), które jednak nie pozwalały na jednoczesne oznaczenie wielu pierwiastków. Analiza wielopierwiastkowa możliwa jest przy użyciu detektora emisji atomowej z plazmą indukowaną mikrofalowo (MIP-AED). Obecnie najpowszechniej korzysta się ze spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie. Pomimo wielu zalet tej techniki, ICP powoduje rozkład substancji, dlatego gdy nie jest znana struktura analizowanego związku, w celu jego identyfikacji konieczne jest zastosowanie innej metody jonizacji, np. elektrorozpylania (ESI) [Bajger i in. 2011]. Dobór techniki zależy od rodzaju i właściwości oznaczanych analitów.

Chromatografia gazowa stosowana jest do oznaczania jedynie niepolarnych, lotnych i trwałych termicznie form specjacyjnych ołowiu, dlatego tylko formy tetraalkilowe można analizować bezpośrednio. Pozostałe wymagają przeprowadzania ich w lotne formy niepolarne, bez naruszenia ich struktury. Derywatyzacja może odbyć się przez generowanie wodorków, co sprawdza się dla jonów ołowiu lub trialkiloołowiu, jednak powstające związki są niestabilne. Innym sposobem jest wykorzystanie odczynnika Grignarda, np. chlorków czy bromków metylu, etylu, propylu, butylu i innych, co jest odpowiednie dla wielu związków

organicznych ołowiu. Niemniej jednak przygotowanie próbki do analizy jest długie i pracochłonne. Składa się z wielu etapów: ekstrakcji rozpuszczalnikiem niepolarnym (często poprzedzonej jeszcze kompleksowaniem, w celu ułatwienia przejścia form metaloorganicznych), derywatyzacji, usunięcia interferentów, w tym nadmiaru odczynnika Grignarda, zateżenia i osuszenia [Bajger i in. 2011]. Do derywatyzacji można również zastosować odczynniki tetraalkiloborane, np. tetrapropyloboran czy tetraetyloboran (użyteczny tylko do pochodnych metylowych) [Pereiro i Diaz 2002].

Przykładem analizy specjacyjnej ołowiu metodą chromatografii gazowej może być praca Bergmanna i Neidharta z 1996 roku. Oznaczali oni związki ołowioorganiczne w próbkach wody. Procedura wyglądała następująco: doprowadzenie próbki buforem cytrynianowym do pH=5, dodanie EDTA w celu zahamowania alkalizacji ołowiu nieorganicznego oraz odczynnika butylującego $[\text{Bu}_4\text{N}][\text{BBu}_4]$ w mieszaninie acetonu i pentanu, zawierającej Me_3PbPb jako wzorzec wewnętrzny, następnie ekstrakcja fazy wodnej pentanem, osuszenie ekstraktu na kolumnie z siarczanem sodu, dodanie heksanu i odparowanie oraz analiza GC-AAS. Jednoczesne oznaczenie tetraalkiloołowiu nie było możliwe, ze względu na zbyt dużą lotność w porównaniu ze związkami butylowanymi. Jako fazę stacjonarną wykorzystano polidimetylodisiloksan, eluentem był hel, a sygnał zbierano przy długości fali równej 217 nm. W pracy Pereiro i Diaz z 2002 roku porównano technikę MIP-AED z innymi metodami oznaczania form specjacyjnych ołowiu w połączeniu z chromatografią gazową. Wykazano, że system GC-MIP-AED ma zbliżone do GC-ICP-MS wartości granicy wykrywalności oraz 2-3-krotnie wyższe wartości niż GC-MS lub GC-AAS. Przedstawiono również optymalne parametry pracy układu, pozwalające na oznaczenie form alkiloołowiu, wyrażonych jako Pb, na poziomie 0,1-100 pg. Były to: długość fali emisji=405,783 nm i przepływ uzupełniający helu 300-330 mL/min, zapewniające najwyższą czułość, ciśnienie tlenu, zapobiegającego osadzaniu się węgla, do maksymalnie 138 kPa oraz ciśnienie wodoru, poprawiającego czułość, od 550 do 650 kPa.

Porównując HPLC do chromatografii gazowej można zauważyć jedną istotną zaletę. Technika nie wymaga derywatyzacji analitów w celu wytworzenia lotnych związków, co bardzo upraszcza proces przygotowania próbki. Może również służyć do oznaczania związków termicznie nietrwałych. Wykorzystuje się w niej wiele mechanizmów separacji, jak również szeroki zakres faz stacjonarnych i ruchomych. Metoda umożliwia także znaczne manipulacje warunkami rozdzielania. To wszystko pozwala na jednoczesną analizę szeregu analitów o odmiennych właściwościach [Bajger i in. 2011].

Chromatografię wykluczania (SEC), bazującą na różnicach w masach cząsteczkowych

analitów, często stosuje się do rozdzielania białek i innych biocząsteczek o masach od 10 do 1000 kDa [Bajger i in. 2011]. Technikę wykorzystali Szpunar i in. w pracy z 1998 r., do specjacji ołowiu w winie. Wykazali oni, że SEC-ICP-MS umożliwia oznaczenie głównej formy specjacyjnej ołowiu obecnej w winie, czyli kompleksu z dimerem ramnogalakuronianu II (dRG-II), przy minimalnym przygotowaniu próbki. Do rozdzielania związków wykorzystano kolumnę ze złożem polimerowym oraz mrówczan amonu o pH=5,2 i szybkości przepływu równej 0,6 mL/min, jako eluent. Pozostałe formy specjacyjne nie zostały rozpoznane. Wspomniany kompleks wykrywany był przy użyciu techniki SEC-ICP-MS również w innych produktach pochodzenia roślinnego oraz w owocach czy warzywach (Khouzam i in. 2012). Chromatografia jonowymienna (IEC) opiera się na reakcji wymiany jonowej między fazą stacjonarną a badanym roztworem. Zatrzymane jony są następnie wymywane w kolejności związanej z siłą oddziaływania ze złożem. Wymieniacz jonowy jest odpowiednio dobierany w zależności od tego, czy analizowane są kationy czy aniony. Dla poprawy rozdzielania stosuje się środki kompleksujące [Bajger i in. 2011]. Chromatografia w odwróconym układzie faz (RP) opiera się na różnicach w polarności i hydrofobowości badanych substancji. Rozszerzeniem tej techniki jest chromatografia par jonów (IP), gdzie do fazy ruchomej dodawany jest specjalny odczynnik, co umożliwia analizę jonów. Odczynnikami takimi dla kationów, w tym alkiloołowiowych, są np. tetrametylenoditiokarbaminian amonu lub pentanosulfonian amonu lub sodu [Ebdon i in. 1998]. W pracy z 1991 roku autorstwa Al-Rashdana i in. porównano mechanizmy rozdzielania oraz sposoby detekcji stosowane w HPLC dla form trialkiloołowiowych oraz ołowiu nieorganicznego. W technice IEC-HPLC zastosowano kolumnę z wypełnieniem krzemionkowym z wprowadzonymi grupami sulfonowymi oraz 70% roztwór metanolu z buforem octowym o pH=7, jako fazę ruchomą. Właściwe rozdzielanie związków nie było jednak możliwe. Użycie IP-HPLC z kolumną C₁₈, pentanosulfonianem sodu oraz 70% roztworem metanolu o pH=3, jako eluentem, pozwoliło na rozdzielanie badanych związków. Gdy do detekcji stosowano ICP-MS, widoczne było zanieczyszczenie ołowiem nieorganicznym, czego nie dało się zauważyć na chromatografie z detekcją ICP-AES. Wskazano na co najmniej trzy rzędy wielkości niższe wartości granicy wykrywalności systemu ICP-MS, w porównaniu z ICP-AES. Jeszcze lepsze wyniki uzyskano przy użyciu RP-HPLC. W połączeniu z detekcją ICP-AES najbardziej optymalna okazała się elucja gradientowa z wykorzystaniem 10% roztworu metanolu w buforze octowym o pH=4,6 przez 6 min, a następnie podnoszeniem stężenia metanolu do 70% przez 20 min. Gradientu nie można było jednak zastosować dla ICP-MS. Z tego względu skorzystano z elucji

izokratycznej 30% roztworem metanolu w tym samym buforze. Ostatni z badanych trybów oznaczania ołowiu okazał się najlepszy. RP-HPLC-ICP-MS wykorzystano również do analizy specjacyjnej ołowiu w próbkach ryżu w pracy z 2017 r. autorstwa Xia i in. Zastosowano ekstrakcję 1% roztworem EDTA w 2% metanolu wspomaganą ultradźwiękami, a do rozdzielania form ołowiu kolumnę C_{18} i elucję gradientową metanolem i buforem octowym o $pH=4,7$ (przez 7 min w stosunku odpowiednio 55:45, następnie zwiększanie ilości metanolu przez 3 min do stosunku 90:10, utrzymanie go przez 13 min, na koniec obniżenie ilości metanolu do pierwotnej zawartości). Pozwoliło to na jednoczesne oznaczenie jonów Pb^{2+} , trimetylołowiu, trietylołowiu i tetraetylołowiu.

Elektroforeza kapilarna w porównaniu z technikami chromatograficznymi wykazuje kilka zalet, m. in. zużywa minimalne ilości próbki i odczynników oraz odznacza się wyższą wydajnością rozdzielczą, zarówno form jonowych jak i obojętnych [Chen i in. 2014]. Chen i in. w pracy z 2014 roku, wykorzystali ją w połączeniu z detekcją ICP-MS do oznaczenia ołowiu w próbkach zwierząt morskich. Zastosowali bufor boranowy z dodatkiem 2% metanolu, CTAB w ilości 0,4 mmol/L, który umożliwił oznaczenie trimetylo- i trietylołowiu, przez zmianę ładunków powierzchniowych kapilary i odwrócenie przepływu elektroosmotycznego oraz EDTA, w celu skompleksowania jonów Pb^{2+} , co pozwoliło na ich oznaczenie w zastosowanym EOF. Analizę prowadzono przy napięciu -12,5 kV w trybie ciągłego wprowadzania próbki.

PODSUMOWANIE

Dokładne poznanie form specjacyjnych toksycznych metali, sposobów migracji, dróg wchłaniania oraz oddziaływania na organizmy żywe pozwala na ocenę zagrożenia wynikającego z ich obecności w środowisku czy pożywieniu. Pomimo, że wiedza na temat form specjacyjnych ołowiu oraz ich toksycznego działania jest obszerna i stale poszerzana, istnieje uzasadniona potrzeba zgłębiania tego tematu.

Analiza specjacyjna jest dziedziną stale rozwijającą się. Konieczne jest poszukiwanie nowych form specjacyjnych pierwiastków i metod ich oznaczania oraz sposobów ulepszenia już istniejących technik, chociażby w celu obniżenia granic wykrywalności. W ten sposób zbliżalibyśmy się do poznania rzeczywistego składu badanych próbek i ich realnego wpływu na organizmy.

PIŚMIENNICTWO

1. Abadin H., Klotzbach J.M., Taylor J., Diamond G.L., Buser M., Citra M., Scinicariello F., Chappell L.L., Przybyla J., McIlroy L.A. (2020). Physical and chemical properties. W: Toxicological Profile for Lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry
2. Al-Rashdan A., Heitkemper D., Caruso J.A. (1991). Lead Speciation by HPLC-ICP-AES and HPLC-ICP-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 29(3), 98–102
3. Amari T., Ghnaya T., Abdelly T. (2017). Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. *South African Journal of Botany*, 111, 99-110
4. Bajger G., Konieczka P., Namieśnik J. (2011). Speciation of trace element compounds in samples of biota from marine ecosystems. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 23(3), 125-142
5. Barańkiewicz D., Kózka M., Piechalak A., Tomaszewska B., Sobczak P. (2009). Determination of cadmium and lead species and phytochelatins in pea (*Pisum sativum*) by HPLC–ICP-MS and HPLC–ESI-MS. *Talanta*, 79, 493–498
6. Belatik A., Hotchandani S., Carpentier R., Tajmir-Riahi H. (2012). Locating the Binding Sites of Pb(II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins. *PLoS ONE*, 7(5), e3672
7. Bergmann K., Neidhart B. (1996). Speciation of organolead compounds in water samples by GC-AAS after in situ butylation with tetrabutylammonium tetrabutylborate. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 356(1), 57-61
8. Bouyssiere B., Łobiński R., Szpunar J. (2003). Techniki łączone w środowiskowej analizie specjacyjnej. W: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. Gdańsk: CEEAM
9. Cadet J.L., Bolla K.I. (2007). Environmental toxins and disorders of the nervous system. W: Neurology and Clinical Neuroscience. Philadelphia : Mosby Elsevier
10. Chen Y., Huang L., Wu W., Ruan Y., Wu Z., Xue Z., Fu F. (2014). Speciation analysis of lead in marine animals by using capillary electrophoresis couple online with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Electrophoresis*, 35(9), 1346–1352
11. Cremer J.E., Callaway S. (1961). Further studies on the toxicity of some tetra and trialkyl lead compounds. *British Journal of Industrial Medicine*, 18(4), 277-282

12. Ebdon L., J. Hill S.J., Rivas C. (1998). Lead speciation in rainwater by isotope dilution-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 53, 289-297
13. Engelking K. (2020). ALBUMINA – budowa, rola w organizmie oraz wykorzystanie roztworów albuminy ludzkiej w leczeniu. Uniwersytet Jagielloński. Praca specjalizacyjna
14. Forma E., Bryś M. (2012). Rola metalotionein i kadmu w rozwoju raka piersi. *Folia Medica Lodziensia*, 39(2), 207-244
15. Giel-Pietraszuk M., Hybza K., Chełchowska M., Barciszewski J. (2012). Mechanizmy toksyczności ołowiu. *Postępy biologii komórki*, 39(2), 217-248
16. Gruca-Królikowska S., Waclawek W. (2006). Metale w środowisku Cz. II. Wpływ metali ciężkich na rośliny. *Chemia, Dydaktyka, Ekologia, Metrologia*, 11(1-2), 41-54
17. Khouzam R.B., Szpunar J., Holeman M., Lobinski R. (2012). Trace element speciation in food: State of the art of analytical techniques and methods. *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 169–179
18. Kumar B., Smita K., Flores L.C. (2017). Plant mediated detoxification of mercury and lead. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2335-S2342
19. Lambrinidis G., Vallianatou T., Tsantili-Kakoulidou A. (2015). In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 86, 27-45
20. Lorenc W. (2020). Badanie specjacji pierwiastków toksycznych w próbkach żywności ciekłej i stałej technikami sprzężonymi LC/ICP-DRC-MS i ESI-MS/MS. Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca doktorska
21. Mester Z., Lord H., Pawliszyn J. (2000). Speciation of trimethyllead and triethyllead by in-tube solid phase microextraction high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15, 595-600
22. Mohammed T.A., Meier Ch.M., Kalvoda T., Kalt M., Rulíšek L., Shoshan M.S. (2021). Potent Cyclic Tetrapeptide for Lead Detoxification. *Angewandte Chemie International Edition*, 60, 12381 – 12385
23. Ociepa-Kubicka A., Ociepa E. (2012). Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 15(2), 169-180
24. Pereiro I.R., Díaz A.C. (2002). Speciation of mercury, tin, and lead compounds by gas chromatography with microwave-induced plasma and atomic-emission detection (GC–MIP–AED). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(1), 74–90

25. Prasad A.S., Bao B. (2020). Zinc, oxidative stress in the elderly, and implication for inflammation. W: *Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*, Second Edition. Oxford: Academic Press Elsevier
26. Rivas-Urraca C. (1996). Environmental speciation of tin and lead by HPLC-ICP-MS. University of Plymouth. Praca doktorska
27. Scarano G., Morelli E. (2002). Characterization of cadmium- and lead- phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *BioMetals*, 15, 145-151
28. Scinicariello F., Murray H.E., Moffett D.B., Abadin H.G., Sexton M.J., Fowler B.A. (2007). Lead and δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphism: Where Does It Lead? A Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 35-41
29. Staniak S. (2014). Źródła i poziom zawartości ołowiu w żywności. *Polish Journal of Agronomy*, 19, 36–45
30. Suhy D.A., D. Simon K.D., Linzer D.I.H., O'Halloran T.V. (1999). Metallothionein Is Part of a Zinc-scavenging Mechanism for Cell Survival under Conditions of Extreme Zinc Deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9183–9192
31. Szpunar J., Pellerin P., Makarov A., Doco T., Williams P., Medina B., Łobiński R. (1998). Speciation analysis for biomolecular complexes of lead in wine by size-exclusion high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13(8), 749–754
32. Vašák M., Meloni G. (2017). Mammalian Metallothionein-3: New Functional and Structural Insights. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1117
33. Winiarska-Mieczana A., Kwiecień M., Kwiatkowska K. (2011). Zawartość kadmu i ołowiu w herbatach zielonych. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 92(3), 667-670
34. Wong D.L, Merrifield-MacRae M.E., Stillman M.J. (2017). Lead(II) Binding in Metallothioneins. W: *Lead: Its Effects on Environment and Health*. Berlin: De Gruyter
35. Xia J., Fang Y., Chen Y., Pan Y., Li P., Xue M., Hu Q. (2017). Lead speciation analysis in rice by reversed phase chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 74-80.
36. Yadav S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179

ŚWIADOMOŚĆ KONSUMENCKA W ZAKRESIE TŁUSZCZÓW JADALNYCH, W ZALEŻNOŚCI OD AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ I CZĘSTOTLIWOŚCI BADAŃ OKRESOWYCH RESPONDENTÓW - BADANIA WSTĘPNE

**Katarzyna Żbikowska¹, Aleksandra Religa¹, Anna Żbikowska²,
Katarzyna Marciniak-Lukasiak²**

¹Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski
ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa
kasiazbikus@wp.pl; olareliga4@gmail.com

²Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Żywności, Katedra Technologii i Oceny Żywności
ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

anna_zbikowska@sggw.edu.pl; katarzyna_marciniak_lukasiak@sggw.edu.pl

Streszczenie

Tłuszcz jest jednym z ważniejszych składników żywności i niezbędnym składnikiem diety. Ze względów zdrowotnych ważna jest nie tylko jego ilość, ale także jakość. Nadmierna konsumpcja tłuszczu, bogatego w nasycone kwasy tłuszczowe (SFA) lub izomery trans kwasów tłuszczowych może prowadzić do wielu chorób cywilizacyjnych i ich spożycie powinno być ograniczane. Celem pracy była analiza poziomu wiedzy respondentów, na temat związku pomiędzy rodzajem tłuszczu w żywności a zdrowiem, ze szczególnym uwzględnieniem niepożądanych żywieniowo kwasów tłuszczowych.

Przeprowadzono badania ankietowe na grupie 114 respondentów, zróżnicowanych pod względem aktywności fizycznej i częstotliwości wykonywania badań okresowych.

Najczęściej poprawnych odpowiedzi, dotyczących kwasów tłuszczowych, zwłaszcza SFA, udzielali respondenci z grupy uprawiającej sport powyżej 5 godzin tyg. oraz badających się częściej. Najmniejszą wiedzę na temat wpływu niepożądanych żywieniowo kwasów tłuszczowych miały osoby najmniej aktywne fizycznie i wykonujące badania okresowe raz w roku lub rzadziej. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę prowadzenia tego typu badań na większej populacji oraz podejmowania działań zmierzających do podniesienia poziomu wiedzy całego społeczeństwa, na temat związku pomiędzy żywnością, żywieniem a zdrowiem.

Słowa kluczowe: tłuszcze spożywcze, dieta, poziom wiedzy, nasycone kwasy tłuszczowe

CONSUMER AWARENESS ON EDIBLE FAT DEPENDING ON PHYSICAL ACTIVITY AND THE FREQUENCY OF PERIODIC EXAMINATIONS OF RESPONDENTS - PRELIMINARY RESEARCH

Summary

Fat is one of the most important food ingredients and an essential component of the diet. For health reasons, not only quantity is important, but also quality. Excessive fat consumption rich in saturated fatty acids or with trans fat can lead to many civilization diseases, so fat consumption should be limited. The aim of our work was to analyse the level of consumer knowledge about connection between type of fat in food and health, particular in view of nutritionally undesirable fatty acids.

The survey was carried out on a group of 114 respondents, diversified in terms of physical activity and the frequency of periodic examinations. Most often correct answers, about fatty acids, especially SFA, were given by the respondents from the group practising sports for more than 5 hours a week and those who do periodic examinations more often. People who were the least physically active and who undergo periodic tests once a year or less frequently had the least knowledge about the effects of nutritionally undesirable fatty acids. The obtained results indicate the need for this type of research on a larger population and the need for taking actions to improve the level of knowledge of the entire society on the relationship between food, nutrition and health.

Keywords: food fats, diet, level of knowledge, saturated fatty acids

WSTĘP

Odpowiednia dieta i aktywny tryb życia ma związek z profilaktyką chorób cywilizacyjnych [Plewa, Markiewicz 2006]. Tłuszcze są bardzo ważnym składnikiem diety człowieka, stanowią podstawowe źródło energii, zapewniają prawidłowe funkcjonowanie oraz rozwój organizmu [Visioli 2020; Praca zbiorowa 2022]. Jednak nadmierne ich spożywanie niesie za sobą wiele niekorzystnych dla zdrowia skutków, należą do nich liczne choroby cywilizacyjne jak: nadwaga, otyłość, choroby układu krążenia czy nowotwory. Na wartość żywieniową i zdrowotną tłuszczu wpływa również obróbka termiczna np. smażenie (dochodzić może do utlenienia, hydrolizy i innych niepożądanych przemian w tłuszczach, np. powstania izomerów trans kwasów tłuszczowych - TFA, zagrażających zdrowiu konsumenta) [Achremowicz, Szary-Sworst 2005].

W wielu produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego, takich jak: masło, ser

oraz smalec występują znaczne ilości nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA). Ich źródłem są także produkty z tłuszczem pochodzenia roślinnego, np. olejem palmowym czy kokosowym [Mińkowski i in. 2011]. Zaleca się, ze względów zdrowotnych, aby SFA nie dostarczały więcej niż 10% energii z diety [EFSA 2010]. Ma to związek z niekorzystnym wpływem SFA na funkcjonowanie organizmu człowieka, w tym na skład tłuszczów we krwi i działanie membran komórkowych [Rudzińska, Przybylski 2019]. Nadmierne spożycie produktów z wysoką zawartością SFA przyczynia się do wzrostu stężenia cholesterolu LDL we krwi [Zagrodzki, Starek 2012] i zwiększa ryzyko zachorowania na miażdżycę [Mińkowski i in. 2011]. W tłuszczach występują również TFA. Naturalnie występują w tłuszczu mleka i mięsie zwierząt przeżuujących, oraz w tłuszczach przemysłowo modyfikowanych przez częściowe uwodornienie [Achremowicz, Korus 2007]. Mają one niekorzystny wpływ na zdrowie np. przyczyniają się do chorób układu krążenia i otyłości [EFSA 2004]. Ponadto ich nadmiar w diecie może przyczynić się do wystąpienia cukrzycy typu 2 oraz zachorowania na raka piersi czy prostaty [Dybkowska 2015].

Dla zdrowia człowieka istotne są nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-9, posiadające właściwości przeciwalergiczne [Zielińska, Nowak 2014], n-3 i n-6 odpowiedzialne za prawidłowy rozwój i funkcjonowanie organizmu [Bojarowicz, Woźniak 2008]. Ponadto zbyt mała ilość tłuszczu w diecie, może prowadzić do niedoboru witamin A,D,E,K. Niedostateczna podaż kwasów n-6 może doprowadzić również do: spowolnienia wzrostu u dzieci, stanów zapalnych skóry, wzrostu podatności na infekcje [Włodarek i in. 2014]. Natomiast monoenowe kwasy tłuszczowe obniżają stężenie cholesterolu we krwi [Mińkowski i in. 2011]. Szczególnie istotne w diecie są kwasy n-3, które działają prewencyjnie w kierunku ograniczenia powstawania miażdżycy, pomocne są również w syntezie hormonów i budowie błon komórkowych oraz tkanki mózgu [Bartkowski 2013].

Tłuszcz, w zależności od zastosowania, powinien posiadać odpowiednie właściwości technologiczne [Żbikowska, Rutkowska 2008]. Ważnym aspektem jest jego odporność na obróbkę termiczną [Gawęcki 1997], ponieważ w czasie ogrzewania zachodzi rozpad tłuszczu, co prowadzi do zmian w jego składzie [Flis, Konaszewska 2007]. Tłuszcze poddawane obróbce termicznej nie powinny zawierać znacznych ilości PUFA, ponieważ wpływają one niekorzystnie na jego stabilność oksydacyjną [Hajkiewicz 2018]. W produkcji żywności często zalecane jest stosowanie tłuszczów stałych (np. w produkcji wyrobów ciastkarskich, cukierniczych). Odznaczają się one odpowiednią plastycznością i są odporne na utlenianie. Tłuszcze o dużej zawartości SFA, wykazują wysoką stabilność oksydacyjną i wysoką temperaturę topnienia [Żbikowska i in. 2012; Żbikowska, Rutkowska 2008]. SFA są stabilne

termicznie i korzystnie wpływają na strukturę produktu [Białek i in. 2015; Żbikowska i in. 2012].

Konsumenci coraz częściej zwracają uwagę na żywność, którą spożywają. Notuje się spadek konsumpcji tłuszczów pochodzenia zwierzęcego na rzecz tłuszczów roślinnych [Pawłowska i in. 2018].

W związku z rosnącą świadomością konsumentów, w zakresie żywności i żywienia, oraz skłonnością do podążania za zmieniającymi się trendami w stylu życia celem pracy była ocena wiedzy konsumenckiej, grupy respondentów, na temat tłuszczów spożywczych, ze szczególnym uwzględnieniem SFA. Ankietowani byli zróżnicowani pod względem aktywności fizycznej i częstotliwości wykonywania badań okresowych.

MATERIAŁ I METODYKA PRACY

W celu oceny poziomu wiedzy konsumentów na temat tłuszczów przeprowadzono badanie ankietowe. W autorskim kwestionariuszu, dane socjodemograficzne, znalazły się pytania zasadnicze, zarówno jednokrotnego, jak i wielokrotnego wyboru. Badania przeprowadzono w sposób pośredni jak i bezpośredni, w sierpniu 2022 roku.

W badaniu udział wzięło 114 respondentów, w tym 66,1% stanowiły kobiety. Najwięcej osób biorących udział w badaniu było w wieku 18-25 lat (39,3%) i mieszkali oni głównie w miastach powyżej 100 tys. mieszkańców (54,5%). Respondenci biorący udział w badaniu najczęściej deklarowali wykształcenie wyższe (72,3%). Najwięcej z nich poświęcało na aktywność fizyczną mniej niż 30 min (24,1%) lub 1-2 godz. tygodniowo (24,1%). Połowa respondentów zadeklarowała wykonywanie badań okresowych rzadziej niż raz w roku. Około połowa ankietowanych potwierdziła występowanie w rodzinie chorób (50,9%), których występowanie ma związek w dużym stopniu ze stylem życia i profilaktyką. Ponad połowa respondentów określiła swój poziom wiedzy na temat tłuszczów jako średni – 57,1% (Tab.1).

Tabela 1. Charakterystyka respondentów
Respondents' characteristics

Płeć	Kobieta	66,1%	Wiek (lata)	< 18 lat	0,9%
				18-25 lat	39,3%
	Mężczyzna	33,9%		26-39 lat	28,6%
				>40 lat	31,3%
Wykształcenie	Podstawowe	0,9%	Miejsce zamieszkania	Miasto (liczba mieszkańców)	
	Gimnazjalne	0%		<20 tys.	8%
	Średnie	23,2%		20 - 100 tys.	26,8%
	Zawodowe	3,6%		> 100 tys.	54,5%
	Wyższe	72,3%		Wieś	10,7%
Rodzaj najczęściej wybieranej aktywności fizycznej	Siłowni	26,8%	Czas poświęcany tygodniowo na aktywność fizyczną	Mniej niż 30 min	24,1%
	Fitness	20,5%		30 min -1 godzina	17,9%
	Sporty zespołowe	11,6%		1-2 godziny	24,1%
	Rower	40,2%		3-4 godziny	19,6%
	Nie uprawiam sportu	22,3%		Powyżej 5 godzin	14,3%
Częstotliwość wykonywania badań okresowych	Raz na pół roku	17%	Wywiad rodzinny (udar, zawał, miażdżyca)	Tak	50,9%
	Częściej niż raz na pół roku	5,4%		Nie	39,3%
	Raz w roku	27,7%		Nie wiem	9,8%
	Rzadziej	50%			
Własna ocena poziomu wiedzy na temat tłuszczów		Niski		21,4%	
		Średni		57,1%	
		Wysoki		14,3%	
		Bardzo wysoki		7,1%	

WYNIKI I DYSKUSJA

Tłuszcze są ważnym składnikiem żywności i diety każdego człowieka. Ich wartość technologiczna i żywieniowa zależy od składu kwasów tłuszczowych. Są źródłem kwasów tłuszczowych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania ponadto zbyt niska podaż tłuszczów w diecie, może prowadzić do niedoboru witamin A, D, E, K [Visioli 2020; Włodarek i in. 2014].

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że o konieczności występowania tłuszczu w diecie przekonanych było 91% ankietowanych, 3% uważało że można go wyeliminować z diety, natomiast pozostali nie mieli zdania na ten temat. Tłuszcze zwierzęce mogą być źródłem cholesterolu i SFA. Zaleca się ograniczać ich ilość w diecie [EFSA 2010]. Pomimo to znaczna część ankietowanych najczęściej używała tłuszczów zwierzęcych

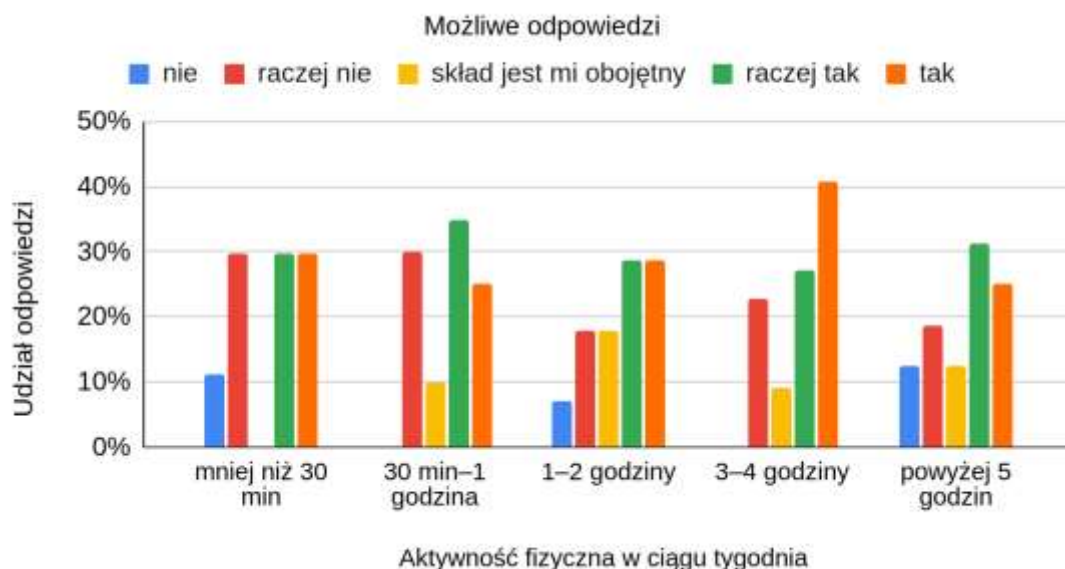
(34,8%). Pozostali deklarowali, że najczęściej stosują tłuszcze pochodzenia roślinnego (oliwę z oliwek -36,5%, inne oleje -26,1%, margarynę -2,6%) -Tabela 2.

Respondenci, niezależnie od aktywności fizycznej i częstotliwości badań, w większości deklarowali, że zwracają uwagę na skład/wartość odżywczą tłuszczów (60,8%), a wybierając tłuszcze najczęściej kierują się ich składem/wartością odżywczą (53%) oraz smakiem (50,4%). Tylko dla nielicznych znaczenie miała reklama i opinie znajomych (po 4,3%). Pomimo, że dla ponad połowy ważny był skład lub wartość odżywcza, to jedynie dla 21,7% znaczenie miały informacje na etykiecie (Tabela 2).

Tabela 2. Struktura odpowiedzi respondentów na wybrane pytania
Structure of respondents' answers on selected questions

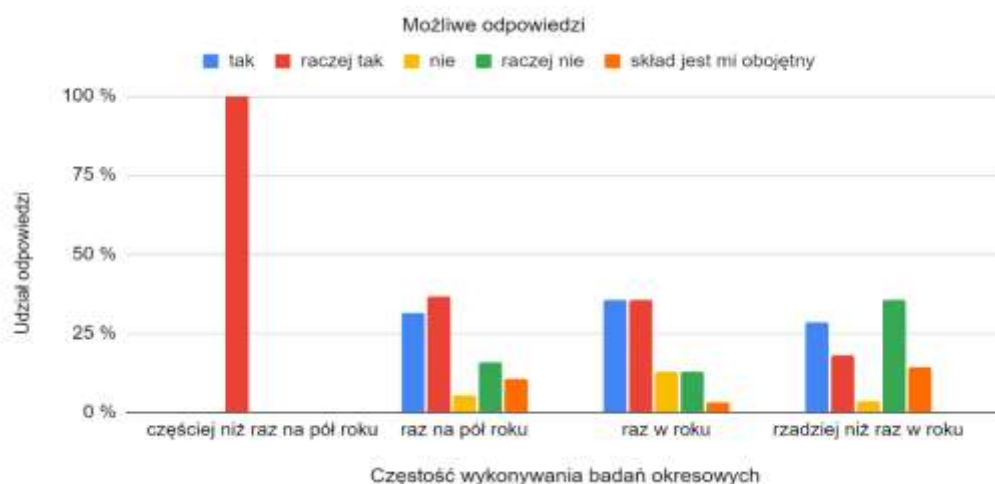
Pytanie	Udział odpowiedzi (%)				
Czy Pani/Pana zdaniem należy wyeliminować wszystkie tłuszcze z diety?	Tak	Nie		Nie wiem	
	3	91		6	
Jakie tłuszcze najczęściej Pani/Pan stosuje?	Tłuszcze zwierzęce (masło, smalec)	Różne oleje	Margaryny		Oliwa z oliwek
	34,8	26,1	2,6	36,5	
Czy zwraca Pani/Pan uwagę na wartość odżywczą tłuszczów?	Tak	Nie			
	60,8	39,2			
Czym się Pani/Pan kieruje wybierając tłuszcze? (można wskazać kilka odpowiedzi)	Skład/wartość odżywcza	Smak	Informacje na etykiecie	Reklama	Opinia znajomych
	53,0	50,4	21,7	4,3	4,3

Na skład/wartość odżywczą tłuszczów, najwięcej osób zwracało uwagę w grupie osób uprawiających sport 3-4 godziny tygodniowo – ok. 48% (Rys.1). Z kolei najmniejszą uwagę do tych informacji przywiązywały osoby z grupy aktywnej fizycznie powyżej 5 godz. (ok. 43%) oraz 1-2 godz. tygodniowo.



Rysunek 1. Struktura odpowiedzi (w zależności od poziomu aktywności fizycznej) na pytanie: czy zwraca Pani/Pan uwagę na skład/wartość odżywczą tłuszczów?
Structure of answers (depending on the level of physical activity) to the question: Do you pay attention to the composition / nutritional value of fats?

Osoby wykonujące badania okresowe rzadziej niż raz w roku wykazywały najmniejsze zainteresowanie składem/wartością odżywczą tłuszczów. Nie stwierdzono znaczących różnic w odpowiedziach osób, badających się raz w roku i raz na pół roku. Natomiast wszystkie osoby badające się częściej niż raz w roku deklarowały, że zwracają uwagę na takie informacje (Rys. 2.)

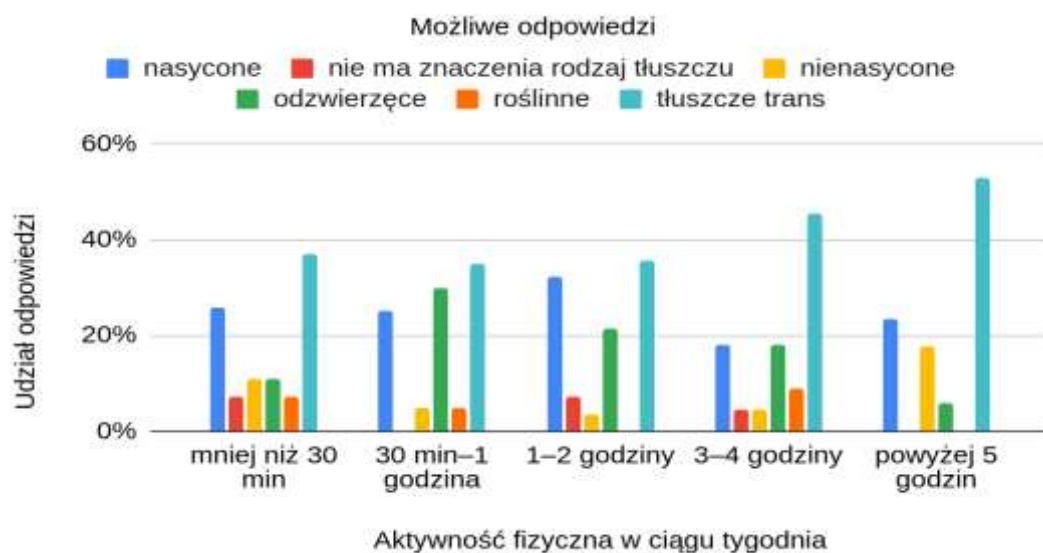


Rysunek 2. Struktura odpowiedzi (w zależności od częstotliwości wykonywania badań okresowych) na pytanie: czy zwraca Pani/Pan uwagę na skład/wartość odżywczą tłuszczów?
Structure of answers (depending on the frequency of periodic examinations) to the question: Do you pay attention to the composition / nutritional value of fats?

Mniej niż połowa wszystkich osób biorących udział w badaniu (43%) prawidłowo wskazało definicję kwasów tłuszczowych nasyconych, podobnie ok. 45% respondentów zaznaczyło właściwe przykłady SFA. Jednocześnie 62,6% respondentów wiedziało, że ta grupa kwasów negatywnie wpływa na zdrowie, z kolei nieprawidłowej odpowiedzi w tym zakresie, udzieliło aż 34,8%.

Większość ankietowanych, jako źródło występowania SFA, wskazała smalec (80%) i masło (58,3%) a jedynie 21,7% spośród nich tłuszcz kakaowy. Z kolei nieprawidłowej odpowiedzi, dotyczącej występowania SFA, udzieliło 37,4%, zaliczając margaryny do smarowania i 19,1% oliwę z oliwek do źródeł tych kwasów.

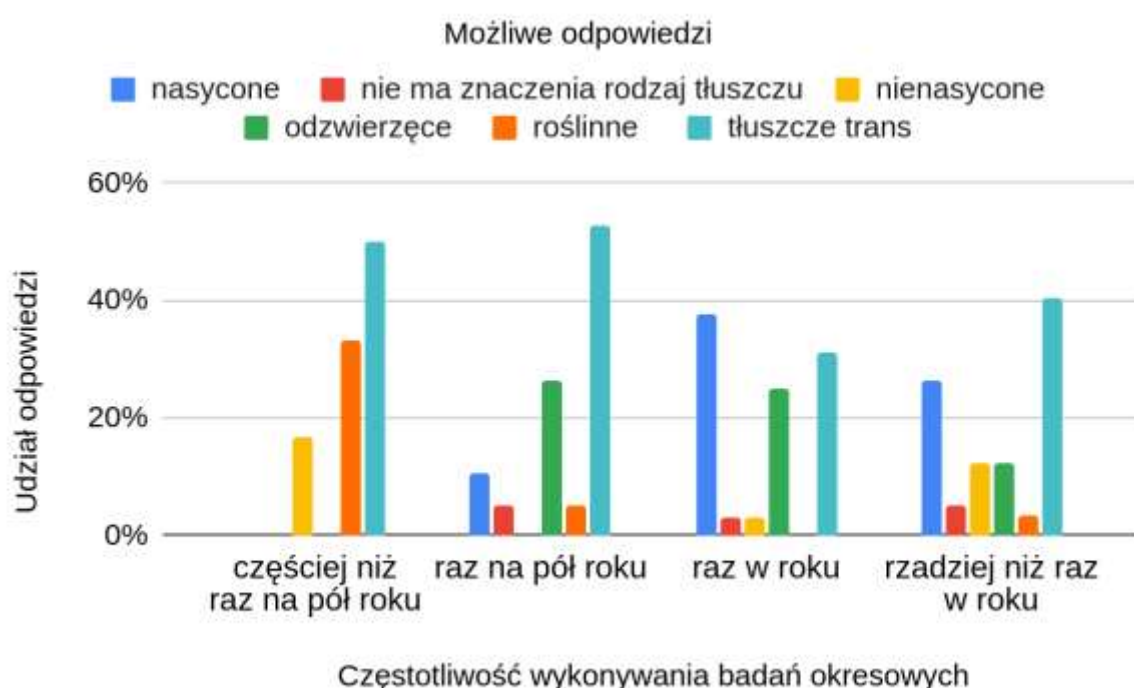
TFA i SFA to grupy kwasów tłuszczowych, które ze względu na ich niekorzystny wpływ na zdrowie należy eliminować z diety [Di Daniele et al 2021; EFSA 2010; EFSA 2004]. Ze względu na związek pomiędzy spożywaniem TFA a chorobami układu krążenia wprowadzono regulacje dotyczące limitów ich zawartości w tłuszczu spożywczym [EU REGULATION 2019]. TFA, podobnie jak SFA, podnoszą stężenie LDL we krwi, zwiększając prawdopodobieństwo chorób niedokrwiennych serca [EFSA 2010] i jednocześnie obniżają stężenie HDL [EFSA 2004]. Działają więc podwójnie źle na układ krążenia, są więc bardziej szkodliwe od SFA.



Rysunek 3. Struktura odpowiedzi (w zależności od poziomu aktywności fizycznej) na pytanie: Które tłuszcze są najbardziej szkodliwe dla zdrowia?
Structure of answers (depending on the level of physical activity) to the question: Which fats are the most harmful to health?

Najczęściej poprawnych odpowiedzi, że najbardziej szkodliwymi dla zdrowia tłuszczami są „tłuszcze trans” udzielali ankietowani z grupy uprawiających sport powyżej 5

godz./tydzień (ok. 53%), a najrzadziej osoby uprawiające sport do 2 godz. w tygodniu. Najczęściej wskazywaną niewłaściwą odpowiedzią, bez względu na aktywność fizyczną respondentów, było stwierdzenie, iż to SFA są najbardziej szkodliwe dla zdrowia (25,2%). Najczęściej wskazywali ją respondenci z grupy uprawiającej sport 1-2 godz./tydz. (32,1%) - Rys.3. Tłuszcze roślinne są źródłem nienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym NNKT, które są niezbędne w diecie dla prawidłowego rozwoju i zachowania dobrej kondycji [Bartkowski 2013]. Co ciekawe, najwięcej nieprawidłowych odpowiedzi, że nienasycone kwasy tłuszczowe są najbardziej szkodliwe, wystąpiło w grupie osób najardziej aktywnych fizycznie (około 18%).

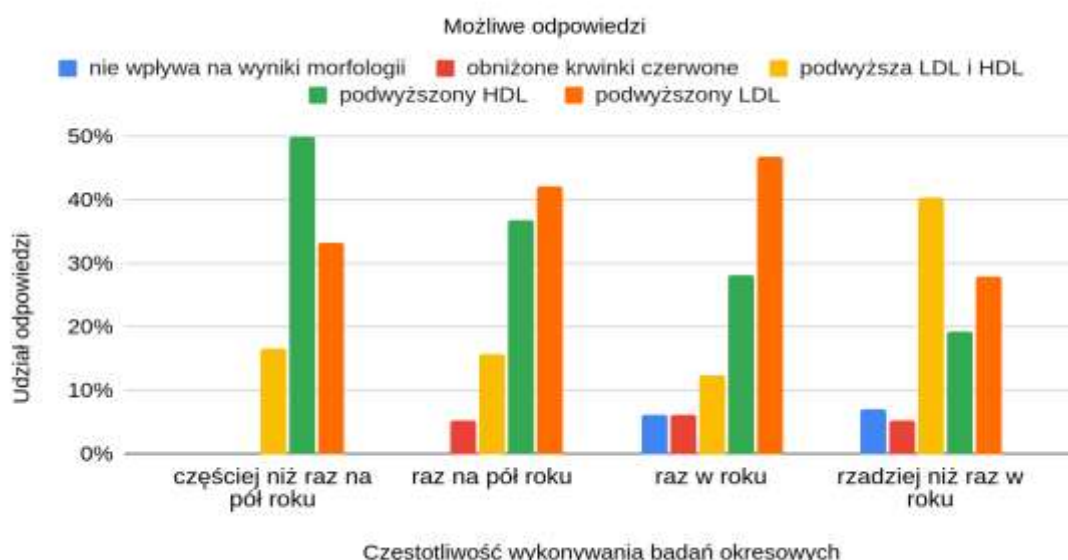


Rysunek 4. Struktura odpowiedzi (w zależności od częstotliwości wykonywania badań okresowych) na pytanie: Które tłuszcze są najbardziej szkodliwe dla zdrowia?
The structure of the answer (depending on the frequency of periodic examinations) to the question: Which fats are the most harmful to health?

Osoby wykonujące badania okresowe raz na pół roku lub częściej udzieliły najwięcej poprawnych odpowiedzi, wskazując TFA jako najbardziej szkodliwe „tłuszcze”. Najmniejszą wiedzę w tym zakresie, wykazali respondenci z grupy wykonywującej badania okresowe raz w roku (Rys. 4).

Wysokie stężenie LDL w surowicy krwi jest jednym z głównych czynników chorób sercowo-naczyniowych (CVD, dławica piersiowa, zawał mięśnia sercowego, udar, przemijający atak niedokrwienny-TIA, choroby tętnic obwodowych) [Elmore i in. 2010]. SFA podwyższając stężenie LDL, sprzyjają powstawaniu zespołu metabolicznego, któremu

towarzyszy otyłość, oporność na insulinę oraz cukrzyca typu 2. Stężenie LDL podnoszą spożywane w nadmiarze SFA i TFA [Briggs i in 2017; Cichosz, Czeczot 2012]. Jedynie 36,5% spośród wszystkich ankietowanych (niezależnie od aktywności fizycznej i częstotliwości wykonywania badań okresowych) wiedziało, że nadmiar „tłuszczów nasyconych” w diecie może mieć związek z podwyższonym stężeniem LDL. Pozostali respondenci udzielili błędnych odpowiedzi, wskazując na związek pomiędzy spożywaniem SFA, a podwyższonym stężeniem HDL (26,5%), podwyższonym stężeniem LDL i HDL (27%), obniżoną liczbą erytrocytów 5,2%. Natomiast 5,2% twierdziło, że „tłuszcze nasycone” nie wpływają na wyniki morfologii krwi. Analizując poziom wiedzy ankietowanych w tym zakresie, w zależności od ich aktywności fizycznej stwierdzono, że najwięcej poprawnych odpowiedzi udzielili respondenci z grupy osób poświęcających najwięcej czasu na aktywność fizyczną (41,18%). Osoby trenujące 1-2 godziny tygodniowo najczęściej zaznaczali niepoprawne odpowiedzi, najczęściej uważali, że nadmiar SFA wpływa na podwyższenie zarówno HDL jak i LDL w wynikach morfologii krwi (około 36%) - Rys.5. Podsumowując można stwierdzić, że poziom aktywności fizycznej nie wpływał znacząco na stan wiedzy respondentów na temat związku pomiędzy SFA a częstotliwością wykonywania badań krwi.

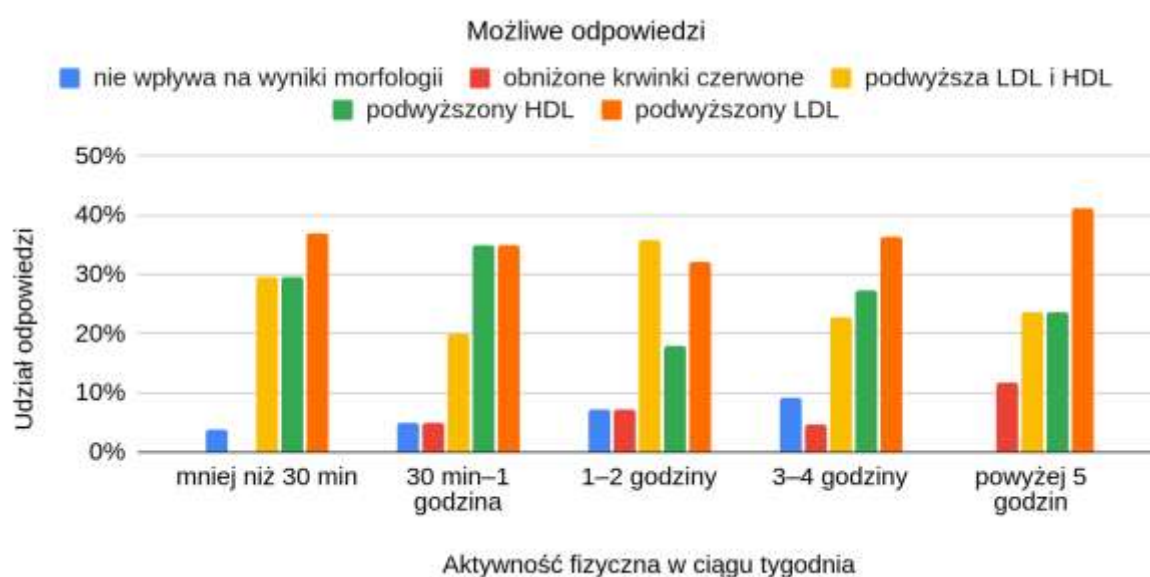


Rysunek 5. Struktura odpowiedzi (w zależności od poziomu aktywności fizycznej) na pytanie: Czy wie Pan/Pani na które wyniki w morfologii krwi wpływa nadmiar tłuszczów nasyconych w diecie?

Structure of answers (depending on the level of physical activity) to the question: Do you know which blood count results are affected by excess saturated fat in the diet?

Najwięcej poprawnych odpowiedzi: nadmiar „tłuszczów nasyconych” w diecie powoduje wzrost frakcji cholesterolu LDL, co jest widoczne w wynikach morfologii krwi,

wskazali ankietowani z grupy osób wykonywujących badania okresowe raz na pół roku (42,11%) oraz raz w roku (46,88%). Najczęstszą nieprawidłową odpowiedzią, udzielaną przez respondentów, było stwierdzenie, że SFA podwyższają HDL we krwi (ok. 37% wskazań w grupie badającej się raz na pół roku i częściej - 50%). Z kolei w grupie respondentów wykonujących badania okresowe rzadziej niż raz w roku, najczęściej zaznaczano odpowiedź, że SFA podwyższa stężenie LDL i HDL w wynikach morfologii krwi (Rys.6). Podsumowując można stwierdzić, że najmniejszą wiedzę w tym zakresie miały osoby wykonujące badania okresowe najrzadziej.



Rysunek 6. Struktura odpowiedzi (w zależności od od częstotliwości wykonywania badań okresowych) na pytanie: Czy wie Pan/Pani na które wyniki w morfologii krwi wpływa nadmiar tłuszczów nasyconych w diecie?
Structure of answers (depending on the frequency of periodic examinations) to the question: Do you know which blood count results are affected by excess saturated fat in the diet?

PODSUMOWANIE

Osoby, które badania profilaktyczne wykonywały najrzadziej, wykazywały najmniejsze zainteresowanie składem produktów i ich wartością odżywczą. Pomimo, że dla ponad połowy wszystkich ankietowanych skład produktów i ich wartość odżywcza były ważne, to jedynie dla ok 20% znaczenie miały informacje zamieszczane na etykiecie produktów. Świadczy to o braku świadomości konsumentów o ważnej roli informacyjnej opakowań. Ponadto stwierdzono zróżnicowanie w poziomie wiedzy respondentów w zakresie tłuszczów i wpływu SFA oraz TFA na zdrowie w poszczególnych grupach. Najmniejszą wiedzę na ten temat miały

osoby z grupy wykonującej badania okresowe rzadziej niż raz w roku.

W związku z zaobserwowanymi brakami w edukacji części respondentów, istnieje konieczność poszerzania wiedzy społeczeństwa na temat związku pomiędzy żywnością, żywieniem a zdrowiem oraz prowadzenia dalszych badań ankietowych na większej populacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Achremowicz B., Korus J. (2007). Potrzeba regulacji zawartości izomerów trans kwasów tłuszczowych w żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3 (52), 5-14
2. Achremowicz K., Szary-Sworst K. (2005). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe czynnikiem poprawy stanu zdrowia człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3 (44), 23-35
3. Bartkowski L. (2013). Nasiona lnu - naturalne źródło zdrowia i urody. *Chemicz. Przem.*, 67 (3), 186-191
4. Białek M., Rutkowska J., Wieczorek P., Białek A. (2015). Ocena jakości żywieniowej frakcji tłuszczowej wyrobów cukierniczych typu baton przeznaczonych dla dzieci. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 96 (2), 467-474
5. Bojanowicz H., Woźniak B. (2008). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz ich wpływ na skórę. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 89 (4), 471-475
6. Briggs M.A., Petersen K.S., Kris-Etherton P.M. (2017). Saturated fatty acids and cardiovascular disease: replacements for saturated fat to reduce cardiovascular risk. *Healthcare*. 5, 29. doi:10.3390/healthcare5020029
7. Cichosz G., Czeczot H. (2012). Kwasy tłuszczowe izomerii trans w diecie człowieka. *Bromat. Chem. Toksykol.* XLV, 2, 181–190
8. Di Daniele N., Marrone G., Di Lauro M., Di Daniele F., Palazzetti D., Guerriero C., Noce A. (2021). Effects of caloric restriction diet on arterial hypertension and endothelial dysfunction. *Nutrients*. 13, 274. doi.org/10.3390/nu13010274
9. Dybkowska E. (2015). Rola kwasów tłuszczowych w żywieniu i zdrowiu człowieka. *Znaczenie racjonalnego żywienia w edukacji zdrowotnej*, Warszawa: WSiLiZ
10. EFSA (2004). Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to the presence of trans fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2004.81>

11. EFSA (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1461>
12. Elmore RG, Li A.J. (2010). Statyny a nowotwory: co wiemy, a czego nie wiemy, *Ginekologia po dyplomie*, 3, 21-24
13. EU REGULATION (2019). Commission Regulation (EU) 2019/649 of 24 April 2019 Amending Annex III to Regulation (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council as Regards Trans Fat, Other than Trans Fat Naturally Occurring in Fat of Animal. Available online:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32019R0649>
14. Flis K., Konaszewska W. (2007). *Podstawy żywienia człowieka*. Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne WSiP, Warszawa
15. Gawęcki J. (1997). *Prawda o tłuszczach*. Wydawnictwo Instytut Danone - Fundacja Promocji Zdrowego Żywienia, Warszawa
16. Hajkiewicz M. (2018). Na czym smażyć? Ranking 8 najpopularniejszych tłuszczów do smażenia cz.2. <https://wiem-co-jem.pl/oliwa-do-smazenia/>
17. Mińkowski K., Grześkiewicz S., Jerzewska M. (2011). Ocena wartości odżywczej olejów roślinnych o dużej zawartości kwasów linolenowych na podstawie składu kwasów tłuszczowych, tokoferoli i steroli. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 75 (2), 124-135
18. Pawłowska A., Kocur A., Siudem P., Paradowska., Kocur A. (2018). Badanie stabilności oleju lnianego i oleju z czarnuszki. *Postępy Fitoterapii*, 19 (3), 157-163
19. Plewa M., Markiewicz A. (2006). Aktywność fizyczna w profilaktyce i leczeniu otyłości. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii*, 2 (1), 30-37
20. Praca zbiorowa (2022). *Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie* (red. M. Jarosz, E. Rychlik, K. Stoś, J. Charzewskiej) https://www.pzh.gov.pl/wp-content/uploads/2020/12/Normy_zywienia_2020web-1.pdf
21. Rudzińska M., Przybylski R. (2019). Rola tłuszczu w żywieniu człowieka. *Medycyna Rodzinna*, 22 (4), 182-188
22. Visioli F., Poli A (2020). Fatty acids and cardiovascular risk. Evidence, lack of evidence, and diligence. *Nutrients*, 12, 3782
23. Włodarek D., Lange E., Kozłowska L. Głąbska D., (2014). *Dietoterapia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa

24. Zagrodzki P., Starek A. (2012). Dietetyczne znaczenie olejów roślinnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 45 (4), 1175-1182
25. Zielińska A., Nowak I. (2014). Kwasy tłuszczowe w olejach roślinnych i ich znaczenie w kosmetyce. *Chemik*, 68 (2), 103-110
26. Żbikowska A., Kowalska M., Rutkowska J. (2012). Zawartość fazy stałej a jakość i przydatność technologiczna szorteningów do produkcji ciast kruchych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2 (81), 173-185
27. Żbikowska A., Rutkowska J. (2008). Skład kwasów tłuszczowych a jakość i przydatność technologiczna tłuszczów do pieczenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (59), 90-95

ZASOBY KOLEKCJI KULTUR DROBNOUSTROJÓW PRZEMYSŁOWYCH – CHARAKTERYSTYKA NOWYCH IZOLATÓW BAKTERII OCTOWYCH Z RODZAJU *ASAIA*

Barbara Sokołowska, Joanna Bucka-Kolendo, Agnieszka Dekowska, Anna Mikołajczuk-
Szczyrba, Justyna Nasilowska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Mikrobiologii
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

barbara.sokolowska@ibprs.pl

Streszczenie

Naturalnym środowiskiem bakterii z rodzaju *Asaia* są tropikalne kwiaty, owoce i owady południowo-wschodniej Azji. Pojawiają się jednak doniesienia o ich występowaniu w Europie w napojach z dodatkiem naturalnych soków i aromatów. Celem pracy była identyfikacja i charakterystyka gram-ujemnych pałeczek wyizolowanych z napoju izotonicznego dla sportowców wykazującego objawy zepsucia w postaci widocznych kłaczków oraz z wody butelkowanej i napoju truskawkowego nie wykazujących objawów zepsucia. Na podstawie sekwencjonowania fragmentu genu 16S rDNA stwierdzono, że wyizolowane bakterie należały do gatunków *Asaia lannensis*, *Asaia bogorensis* i *Asaia* sp. Jest to drugi opisany przypadek izolacji tych bakterii w Polsce. Analiza filogenetyczna oparta na sekwencji genu 16S rDNA wykazała, że badane izolaty stworzyły niezależny odrębny klaster, przypisując szczepy *Asaia lannensis* do jednej, a *Asaia* sp. i *Asaia bogorensis* do drugiej grupy. Jednocześnie wykazano dystans badanych szczepów do sekwencji pobranych z bazy danych. Szczepy zostały zdeponowane w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych IBPRS – PIB.

Słowa kluczowe: *Asaia*, bakterie octowe, zepsucie napojów

COLLECTION OF INDUSTRIAL MICROORGANISMS RESOURCES - ACETIC ACID BACTERIA FROM GENUS *ASAIA*

Summary

The natural environment for acetic bacteria of the genus *Asaia* is tropical fruits, flowers, and insects of south-east Asia. However, there are reports of their occurrence in Europe in beverages with the addition of natural juices and flavors. The aim of this study was the

identification and characteristics of gram-negative rods isolated from a sports drink with flocks as a visual defect, bottled water, and a strawberry drink. Molecular identification through PCR amplification of a partial region of the 16S rRNA gene allowed the classification of these bacteria as *Asaia lannensis*, *Asaia bogorensis*, and *Asaia* sp. This is the second described case of isolation of these bacteria in Poland. Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA gene sequence showed that the tested isolates formed an independent distinct cluster, assigning *Asaia lannensis* to one group and *Asaia* sp. and *Asaia bogorensis* to the other group. At the same time, showing the distance of the tested strains to the sequences taken from the database. The strains were deposited in the IAFB Collection of Industrial Microorganisms.

Keywords: *Asaia*, acetic acid bacteria, beverages' spoilage

WSTĘP

Rodzaj *Asaia* ustanowiono w 2000 roku jako piąty rodzaj bakterii octowych z rodziny *Acetobacteraceae*. Nazwa tego rodzaju pochodzi od nazwiska japońskiego bakteriologa Toshinobu Asai zajmującego się systematyką bakterii octowych. Ich naturalne środowisko stanowią tropikalne kwiaty, owoce i owady południowo-wschodniej Azji. Bakterie z rodzaju *Asaia* po raz pierwszy wyizolowano z kwiatów drzewa storczykowatego (*Bauhinia purpurea*) i kwiatów ołownika (*Plumbago auriculata*), rosnących w tropikalnym klimacie Indonezji [Yamada i in. 2000]. Aktualnie znanych jest osiem gatunków bakterii z rodzaju *Asaia* izolowanych głównie z egzotycznych kwiatów rosnących w Indonezji, Tajlandii i Japonii; są to: *A. bogorensis*, *A. siamensis*, *A. krungthepensis*, *A. lannensis*, *A. spathodeae*, *A. astilbe*, *A. platycodi*, *A. prunellae* [Yamada i in. 2000, Katsura i in. 2001, Yukphan i in. 2004, Malimas i in. 2008, Kommanee i in. 2010, Suzuki i in. 2010].

Od pozostałych rodzajów bakterii octowych wyróżnia je nie tylko budowa genetyczna, ale również właściwości biochemiczne. Większość gatunków z rodzaju *Asaia*, w przeciwieństwie do innych bakterii octowych z rodzajów *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconoacetobacter* i *Kozakia*, nie tworzy kwasu z etanolu, a ich wzrost w obecności 0,35% (v/v) kwasu octowego zostaje zahamowany lub jest słaby. Bakterie *Asaia* spp. są gram ujemnymi, tlenowymi pałeczkami. W hodowlach płytkowych tworzą zwykle małe, jasnoróżowe, łososiowe lub pomarańczowe, gładkie i lśniące kolonie o średnicy od 1 do 3 mm. Optymalne pH dla ich wzrostu wynosi 4-5 a optymalna temperatura wzrostu to 25-30°C. Szczepy izolowane w krajach tropikalnych rosną w temperaturach do 40°C. Kolonie

bakterii z rodzaju *Asaia* swoją barwę zawdzięczają syntetyzowanym przez nie barwnikom karotenoidowym [Antolak i in. 2017].

Bakterie *Asaia* spp. stanowią grupę mikroorganizmów saprofitycznych, niewywołujących chorób u ludzi. Jednak mogą wywoływać oportunistyczne infekcje, gdy przedostaną się do krwioobiegu człowieka z obniżoną odpornością. Udokumentowano kilka przypadków bakteriemii wywołanej przez *A. bogorensis* i *A. lannensis* u osób dorosłych, przewlekle chorych, poddawanych okresowo dializom lub narkomanom oraz u dzieci chorych na kardiomiopatię lub choroby nowotworowe [Snyder i in. 2004, Tuuminen i in. 2006, Abdel-Haq i in. 2009, Jurtschenko i in. 2010]. Nie odnotowano do tej pory przypadków infekcji człowieka drogą pokarmową.

Aktualnie zainteresowanie naukowców skupia się na możliwości zastosowania bakterii z rodzaju *Asaia*, jako narzędzia w walce z malarią, jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych na świecie [Capelli in 2019, Chen i in. 2021, Grogan i in. 2021, Grogan i in. 2022]. Choroba ta przenoszona jest przez samice komarów z rodzaju *Anopheles*. Za rozwój choroby w organizmie gospodarza odpowiedzialne są jednokomórkowe pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*, przenoszone przez ten gatunek komarów. Dotychczasowe badania nad bakteryjnymi symbiontami komarów przenoszących malarię pokazują, że w składzie mikroflory izolowanej z komarów dominują bakterie należące do rodzaju *Asaia*. Wykazano, że gatunek *Asaia bogorensis* hamuje rozwój oocyst pierwotniaków *Plasmodium* sp. [Boissière i in., 2012, Capone i in., 2013, Dong i in., 2009].

Bakterie *Asaia* spp. są także izolowane z wód aromatyzowanych wykazujących objawy zepsucia w postaci zmętnienia, kłaczków i osadów, zmiany zapachu, a za ich źródło uznaje się naturalne soki i aromaty owocowe [Moor i in. 2002, Horsakova i in. 2009, Kręgiel i in. 2012]. Niskie pH napojów oraz obecność konserwantów nie hamują rozwoju tych bakterii. Z próbek napoju izotonicznego dla sportowców wykazującego objawy zepsucia w postaci widocznych kłaczków oraz z próbek wody butelkowanej i napoju truskawkowego bez objawów zepsucia wyizolowano gram-ujemne pałeczki, prawdopodobnie należące do bakterii octowych z rodzaju *Asaia*. Celem pracy była ich identyfikacja i charakterystyka.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Material badawczy

Przypadek 1

Przedmiotem badań były próbki napoju izotonicznego dla sportowców pochodzące z dwóch partii produkcyjnych (po 2 opakowania handlowe z każdej partii) z Zakładu

Produkcyjnego nr 1. Próbkę z pierwszej partii wykazywały oznaki zepsucia w postaci widocznych kłaczek. W obrazie mikroskopowym badanych próbek stwierdzono obecność krótkich pałeczek. Zakład produkcyjny zlecił identyfikację drobnoustrojów będących przyczyną zepsucia. Próbkę z drugiej partii produkcyjnej nie wykazywały żadnych objawów zepsucia.

Przypadek 2

Z Zakładu produkcyjnego nr 2 przesłano po trzy próbki wody butelkowanej i napoju truskawkowego w celu wykonania rutynowych badań kontroli jakości: oznaczenia liczby bakterii wg PN-85/A-79033 p. 3.22, liczby drożdży i pleśni oraz obecności bakterii *Escherichia coli* i grupy *coli*. Próbkę nie wykazywały oznak zepsucia. Przesłano także płytkę z wyizolowanymi w Zakładzie bakteriami, tworzącymi różowe kolonie, celem ich identyfikacji.

Pożywki i metody hodowlane

Do oznaczenia liczby drobnoustrojów oraz charakterystyki wyizolowanych bakterii użyto pożywek stosowanych w rutynowych badaniach napojów, zgodnie z krajowymi i międzynarodowymi metodami badawczymi:

- OSA (Orange Serum Agar, Merck), inkubacja 72 h w temperaturze $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ [14].
- DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar Merck), inkubacja 7 dni w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ [30].
- Pożywka agarowa z sacharozą inkubacja 72 h w temperaturze $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ [26].
- Pożywka PCA (Plate Count Agar, Merck), inkubacja 72 h w temperaturze $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ [29] lub w temperaturze $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ [25].
- Pożywka Rapid'E coli 2 (Bio-Rad) wg PB-ZM/PBJM 15, wyd. 1 z 03.01.2018r. Oznaczanie liczby bakterii z grupy *coli* i *E. coli* metodą filtracji membranowej.
- Pożywka GC wg Yukphan i in., 2004, o składzie: 2% glukozy, 0,3% peptonu, 0,3% ekstraktu drożdżowego i 0,7% CaCO_3 .

Laboratorium mikrobiologiczne IBPRS-PIB pracuje zgodnie z wymaganiami PN-EN ISO/IEC 17025:2017 (zakres akredytacji Polskiego Centrum Akredytacji Nr AB 452). Pożywki i testy są sprawdzane zgodnie z normą PN-EN ISO 11133:2014-07 [27], z wykorzystaniem odpowiednich szczepów odniesienia.

Charakterystyka biochemiczna

W kolejnych etapach identyfikacji wykonano:

- Test na wytwarzanie oksydazy - Bactident Oxidase, Merck.

- Test na wytwarzanie katalazy - Bactident Catalase, Merck.
- Barwienie metodą Grama.
- Ocena profilu biochemicznego za pomocą testów API 50 CH (bioMerieux).

Identyfikacja molekularna

Identyfikację bakterii przeprowadzono na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu *16S rDNA*, obejmującej następujące etapy:

- Izolację DNA z 24 h hodowli stosując zestaw DNAeasy® PowerFood® Microbial Kit zgodnie z instrukcją producenta (Qiagen).

Czystość i stężenie DNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru UV-Vis NanoDrop 1000 3.8.1 (ThermoScientific, Waltham, MA, USA).

- Amplifikację fragmentu genu *16S rDNA* przy użyciu starterów 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i 16SR (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3'). Mieszanina reakcyjna zawierała: 20µl DreamTaq PCR Master Mix (ThermoScientific, Waltham, MA, USA), 1µl każdego startera w stężeniu końcowym 4µM, 10-20 ng DNA, wodę aby otrzymać objętość końcową 40µl. Reakcję PCR przeprowadzono w następujących warunkach: początkowa denaturacja w 94°C przez 2 minuty, następnie 40 cykli denaturacji w 94°C przez 30 sekund, hybrydyzacja w 51°C przez 35 sekund, elongacja w 72°C przez 1 minutę i 40 sekund, a końcowe wydłużenie w 72°C przez 2 minuty. Do przebiegu amplifikacji wykorzystano aparat SimpliAmp™ Thermal Cycler model A24812 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).
- Elektroforezę przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym przy napięciu 120 V przez 45 minut w buforze 1xTAE (bufor Tris-Octan-EDTA). Żel zabarwiono 6µl SimplySafe (EURx, Gdańsk, Polska) w celu wizualizacji fragmentów DNA pod wpływem promieniowania UV. Dokumentację żelu przeprowadzono za pomocą GeneSnap wersja 6.08 (SynGene).
- Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR przeprowadzono z wykorzystaniem Genetic Analyzer model 3730 Applied Biosystems™ (Genomed, Warszawa, Polska).

Otrzymane sekwencje zostały złożone przy użyciu Serial Cloner i porównane z bazą danych programu NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Uzyskane podczas tego badania sekwencje DNA zostały zdeponowane w GenBank.

Analiza genetyczna

Pokrewieństwo filogenetyczne badanych szczepów *Asaia* wyznaczono w oparciu

o analizę sekwencji nukleotydowych 16S rDNA i zobrazowano dendrogramami przedstawiającymi dystans genetyczny pomiędzy izolatami, oraz wybranymi z bazy NCBI sekwencjami 16S rDNA bakterii octowych z rodzaju *Asaia*, *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Analizę przeprowadzono w oparciu o metodę największej wiarygodności (ang. Maximum Likelihood) i modelu Tamura-Nei [Tamura i Nei 1993]. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.]. Uzyskano drzewo, z wyrównaniem sekwencji przy zastosowaniu CLUSTALW i programu MEGA X [Kumar i in. 2018].

Przeanalizowano łącznie 22 sekwencje 16S rDNA należące do: *Asaia lannensis* (N=8), *Asaia bogorensis* (N=5), *Asaia* sp. (N=3), *Acetobacter aceti* (N=3), *Gluconobacter oxydans* (N=3).

WYNIKI I DYSKUSJA

Pierwszy przypadek izolacji bakterii z rodzaju *Asaia*

Z posiewów próbek napoju izotonicznego dla sportowców (Zakład produkcyjny nr 1) uzyskano charakterystyczne jasno różowe kolonie na pożywce Orange Serum Agar (Fot. 1) i na pożywce PCA, po 72 h inkubacji w temperaturze 30°C. Na pożywce agarowej z sacharozą, w tych samych warunkach inkubacji, stwierdzono wytwarzanie śluzowatych substancji zewnątrzkomórkowych (Fot. 2). Wyizolowane bakterie były gram-ujemne, katalazo-dodatnie i oksydazo-ujemne. Nie uzyskano wzrostu drożdży i pleśni – drobnoustrojów będących również częstą przyczyną zepsucia napojów. Uzyskane wyniki wskazywały, że wyizolowane bakterie to prawdopodobnie bakterie octowe z rodzaju *Asaia*. Z próbek bez oznak zepsucia nie wyizolowano żadnych drobnoustrojów. Uzyskanie charakterystycznych różowych kolonii ze strefą przejaśnienia (CaCO₃ rozpuszczony pod wpływem wytwarzanego przez bakterie kwasu) na pożywce GC wg Yukphan i in., 2004, potwierdziło podejrzenia, że wyizolowany drobnoustrój należy do gatunku *Asaia*. Łącznie wyizolowano 4 szczepy.

W literaturze przedmiotu najczęściej opisuje się bakterie z rodzaju *Asaia* jako niezdolne do tworzenia śluzowych substancji pozakomórkowych [Cleenverck i de Vos 2008, De Vero i Giudei 2008, Sengun i Karabiyikli 2011]. Jednak szczepy wyizolowane przez Kato i in. 2007, produkowały rozpuszczalny w wodzie egzopolisacharyd. Metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) stwierdzono, że był to β-(2,6)-fruktan tworzony przez *Asaia* sp. tylko w obecności sacharozy jako źródła węgla. Tworzenie śluzowych

substancji pozakomórkowych przez szczepy z rodzaju *Asaia* zostało potwierdzone także w badaniach Horsakovej i in. 2009 oraz Kręgiel i in. 2016. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszych badaniach.



Fot. 1 Wzrost bakterii *Asaia* sp. KKP 3878 na pożywce OSA
Growth of Asaia sp. KKP 3878 bacteria on OSA medium



Fot. 2 Wytwarzanie substancji egzopolisacharydowych przez bakterie *Asaia* sp. KKP 3878 na pożywce z sacharozą wg PN-90/A-75052/09
Production of extracellular polymeric substances by bacteria Asaia sp. KKP 3878 on a nutrient medium with sucrose according to PN-90 / A-75052/09

Drugi przypadek izolacji bakterii z rodzaju *Asaia*

W próbkach wody butelkowanej i napoju truskawkowego (Zakład produkcyjny nr 2) nie stwierdzono obecności drożdży i pleśni w 1 ml oraz bakterii grupy *coli* i *Escherichia coli*

w 10 ml. Natomiast w trzech próbkach wody butelkowanej, po inkubacji na pożywce PCA przez 5 dni w temperaturze $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, stwierdzono wzrost charakterystycznych różowych kolonii bakterii w liczebności $2,7 \times 10^4$ jtk/ml – $5,5 \times 10^5$ jtk/ml. Obecność różowych kolonii bakterii stwierdzono także po inkubacji jednej z trzech badanych próbek napoju truskawkowego. Ich liczebność po 5 dniowej inkubacji na pożywce PCA w temperaturze $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ wynosiła $9,5 \times 10^4$ jtk/ml.

Wyzolowane bakterie były gram-ujemne, katalazo-dodatnie i oksydazo-ujemne. Podobnie jak w pierwszym opisywanym przypadku uzyskanie charakterystycznych różowych kolonii ze strefą przejaśnienia (CaCO_3 rozpuszczony pod wpływem wytwarzanego przez bakterie kwasu) na pożywce GC wg Yukphan i in., 2004, potwierdziło podejrzenia, że wyizolowany drobnoustrój należy do gatunku *Asaia*. Łącznie z wody butelkowanej i napoju truskawkowego wyizolowano 3 szczepy oraz jeden szczep z płytki przesłanej z Zakładu.

Identyfikacja i charakterystyka

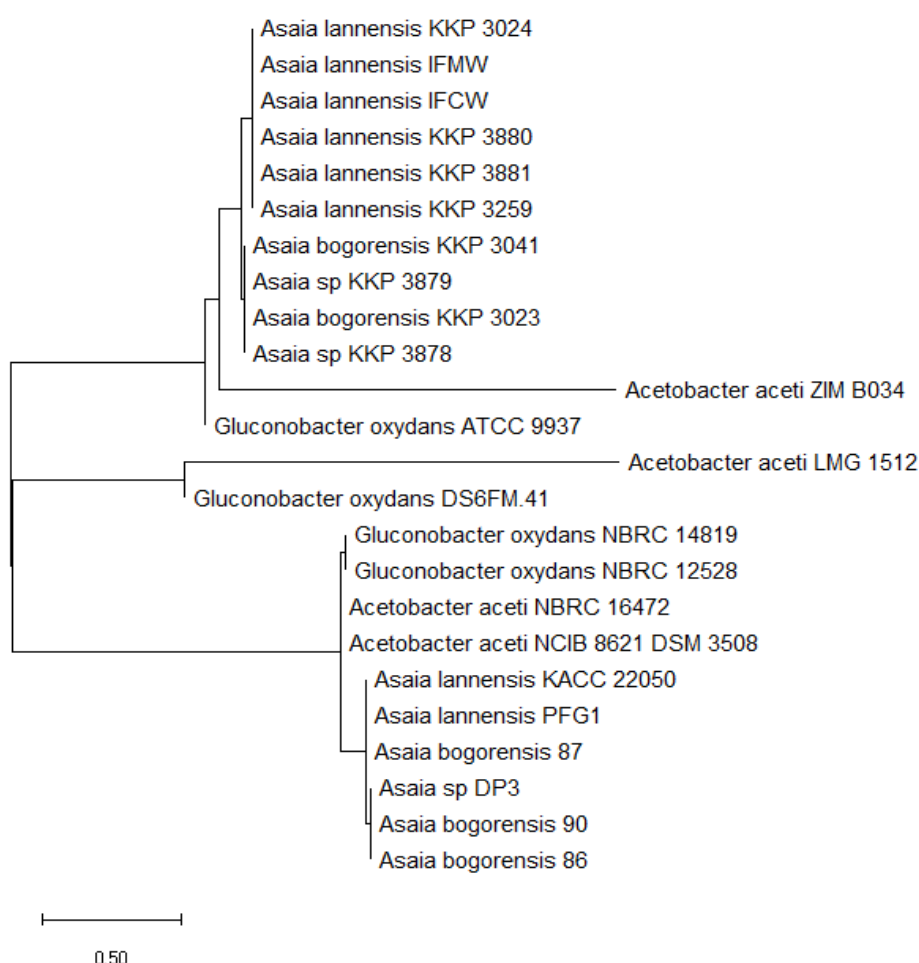
Do charakterystyki biochemicznej gatunków *Asaia* wykorzystywane są, między innymi, ich zdolności do wytwarzania kwasów z różnych cukrów [Yamada i in. 2000, Katsura i in. 2001, Malimas i in. 2008, Suzuki i in. 2010]. Wspólną cechą wszystkich gatunków *Asaia* jest brak zdolności do wytwarzania kwasu z laktozy. Natomiast do różnicowania gatunków *Asaia* wykorzystywana jest ich zdolność do wytwarzania kwasu z dulcytolu. Szczepy gatunków *Asaia bogorensis*, *A. krungthepensis* i *Asaia lannensis* (z opóźnieniem) mają zdolność do wytwarzania kwasu z dulcytolu w przeciwieństwie do *Asaia siamensis* które nie są do tego zdolne [Katsura i in. 2001, Malimas i in. 2008]. Uzyskane przez nas wyniki są zgodne z obserwacjami innych zespołów badawczych. Wszystkie wyizolowane szczepy nie wytwarzały kwasu z laktozy natomiast wytwarzały kwas z dulcytolu.

Na podstawie sekwencji 16S rDNA badanych szczepów, potwierdzono przynależność wszystkich ośmiu szczepów do rodzaju *Asaia*. Dodatkowo, pięć z nich przypisano odpowiednio do gatunku, w tym do *Asaia bogorensis* (dwa szczepy) i *Asaia lannensis* (cztery szczepy) (Tabela 1). Uzyskane sekwencje zostały zdeponowane w GenBank.

Uzyskane sekwencje zostały porównane z sekwencjami 16S rDNA pozyskanymi z bazy NCBI (ang. The National Center for Biotechnology Information). W oparciu o topologię uzyskanego drzewa filogenetycznego (Rys. 1) wszystkie badane szczepy *Asaia* wykazały niewielki dystans genetyczny. Szczepy *Asaia lannensis* (KKP 3024, KKP 3881, KKP 3880, KKP 3259) stworzyły homogeniczny kład razem z sekwencjami szczepów *Asaia lannensis* IFMW i IFCW. Drugi kład stanowiły izolaty *Asaia bogorensis* KKP 3041 i KKP 3023 i *Asaia* sp. KKP 3878 i KKP 3879, gdzie wspólne umiejscowienie na drzewie może sugerować, że

szczepy KKP 3878 i KKP 3879, zidentyfikowane tylko do rodzaju, również należą do gatunku *Asaia bogorensis*.

Pozostałe sekwencje szczepów pozyskanych z bazy danych NCBI zostały przypisane do oddzielnych kładów. Oba utworzone kłady wykazały bliskie pokrewieństwo ze szczepami *Acetobacter aceti* ZIM B034 i z referencyjnym *Gluconobacter oxydans* ATCC 9937. Jednocześnie przeprowadzona analiza filogenetyczna potwierdziła doniesienia innych autorów [Kręgiel i in. 2012; Katsura i in. 2001; Yamada i in. 2000], że bakterie z rodzaju *Asaia* są blisko spokrewnione z innymi bakteriami octowymi należącymi do rodzaju *Acetobacter* czy *Gluconobacter*.



Rysunek 1. Drzewo filogenetyczne pokazuje przynależność gatunków bakterii z rodzaju *Asaia*. Drzewa filogenetyczne skonstruowane przy użyciu metody największej wiarygodności (ang. Maximum Likelihood) i modelu Tamura-Nei. Sekwencje *Acetobacter aceti* i *Gluconobacter oxydans* użyto jako grupy zewnętrzne.
The phylogenetic tree shows the affiliation of bacterial species of the *Asaia* genus. Phylogenetic trees were constructed using the Maximum Likelihood method and the Tamura-Nei model. *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter oxydans* sequences were used as outgroups.

Izolacja przez nasz zespół unikalnych bakterii z rodzaju *Asaia*, z napoju izotonicznego dla sportowców, wody butelkowanej i napoju truskawkowego jest kolejnym opisanym przypadkiem w Polsce. Pierwszy w Polsce przypadek izolacji bakterii *Asaia lannensis* z wody mineralnej o smaku truskawkowym miał miejsce w roku 2010 w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej [Kręgiel i in. 2012].

Wyzolowane szczepy bakterii z rodzaju *Asaia* zostały zdeponowane w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych (Tab. 1). Łącznie Kolekcja posiada 8 szczepów bakterii octowych z rodzaju *Asaia*. Zasoby największej europejskiej Kolekcji DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH stanowią cztery szczepy: *Asaia siamensis* DSM 15972 (pochodzący z Tajlandii), oraz szczepy wyizolowane w Japonii - *Asaia prunellae* DSM 23028, *Asaia platycodi* DSM 23029 i *Asaia astilbis* DSM 23030. Amerykańska Kolekcja ATTC posiada dwa szczepy *Asaia bogorensis* pochodzące z Indonezji.

Zgodnie z danymi World Data Centre for Microorganisms (www. wdcn.org) przedstawionymi w Global Catalogue of Microorganisms w Kolekcjach na świecie zdeponowanych jest 200 szczepów *Asaia bogorensis*, 42 szczepy *Asaia krungthepensis*, 41 szczepów *Asaia siamensis*, 21 szczepów *Asaia* sp., 13 szczepów *Asaia spathodeae*, 12 szczepów *Asaia astilbis*, 11 szczepów *Asaia lannensis*, 8 szczepów *Asaia prunellae* i 7 szczepów *Asaia platycodi*.

Tabela 1. Szczepy z rodzaju *Asaia* znajdujące się w zasobach Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS-PIB
Strains of the genus Asaia from the IAFB Collection of Industrial Microorganisms resources

Nazwa	Nr w Kolekcji	Nr dostępu GenBank	Źródło izolacji
<i>Asaia bogorensis</i>	KKP 3023	OP649587	Woda butelkowana
<i>Asaia lannensis</i>	KKP 3024	OP649588	Woda butelkowana
<i>Asaia bogorensis</i>	KKP 3041	OP650028	Izolat pochodzący z zakładu produkującego soki i napoje
<i>Asaia lannensis</i>	KKP 3259	OP650047	Napój truskawkowy niegazowany
<i>Asaia</i> sp.	KKP 3878	<u>OP623519</u>	Napój izotoniczny dla sportowców
<i>Asaia</i> sp.	KKP 3879	<u>OP623520</u>	Napój izotoniczny dla sportowców
<i>Asaia lannensis</i>	KKP 3880	<u>OP623521</u>	Napój izotoniczny dla sportowców
<i>Asaia lannensis</i>	KKP 3881	<u>OP623522</u>	Napój izotoniczny dla sportowców

WNIOSKI

Z próbek napoju izotonicznego dla sportowców wykazującego objawy zepsucia w postaci widocznych kłaczków oraz z próbek wody butelkowanej i napoju truskawkowego bez objawów zepsucia wyizolowano siedem szczepów gram-ujemnych pałeczek, które zidentyfikowano jako bakterie octowe z rodzaju *Asaia*. Cztery z nich przypisano do gatunku *Asaia lannensis* i jeden do *Asaia bogorensis*, zaś przynależność gatunkową potwierdzono filogenetycznie.

PIŚMIENNICTWO

1. Abdel-Haq N., Savaşan S., Davis M., Asmar B.J., Painter T., Saliminia H. (2009). *Asaia lannaensis* blood-stream infection in a child with cancer and bone marrow transplantation. J. Med. Microbiol., 7(58), 974-976
2. Antolak H., Czyżowska A., Kręgiel D. (2016). Antibacterial and antiadhesive activities of extracts from edible plants against soft drink spoilage by *Asaia* spp. J. Food Protect., 80, 25-34
3. Antolak H., Kręgiel D. (2016). Bakterie kwasu octowego *Asaia* sp. i ich unikalne zdolności adaptacyjne. Postępy Mikrobiologii, 4, 392-397
4. Antolak H., Oracz J., Otlewska A., Żyżelewicz D., Kręgiel D. (2017). Identification of carotenoids and isoprenoid quinonens from *Asaia lannensis* and *Asaia bogorensis*. Molecules, 22, 1608
5. Boissière A., Tchioffo M.T., Bachar D., Abate L., Marie A., Nsango S.E., Shahbazkia H.R., Awono-Ambene P.H., Levashina E.A., Christen R., Morlais I. (2012) Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. PLoS Pathog 8(5): e1002742
doi:10.1371/journal.ppat.1002742
6. Cappelli A, Damiani C, Mancini M.V., Valzano M, Rossi P., Serrao A., Ricci I., Favia G. (2019). *Asaia* Activates Immune Genes in Mosquito Eliciting an Anti-Plasmodium Response: Implications in Malaria Control. Front. Genet. 10:836
doi: 10.3389/fgene.2019.00836
7. Capone A., Ricci I., Damiani C., Mosca M., Rossi P., Scuppa P., Crotti E., Epis S., Angeletti M., Valzano M., Sacchi L., Bandi C., Daffonchio D., Mandroli M., Favia G. (2013). Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. Parasit. Vectors, DOI:10.1186/1756-3305-6-182

8. Chen, S.; Yu, T.; Terrapon, N.; Henrissat, B.; Walker, E.D. Genome Features of *Asaia* sp. W12 Isolated from the Mosquito *Anopheles stephensi* Reveal Symbiotic Traits. *Genes* 2021, 12, 752. <https://doi.org/10.3390/genes12050752>
9. Cleenwerck I., de Vos P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, 2-14
10. Dong Y., Manfredini F., Dimopoulos G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5(5): e1000423. DOI:10.1371/journal.ppat.1000423
11. Grogan C., Bennett M., Lampe D.J. (2022). An evaluation of fusion partner proteins for paratransgenesis in *Asaia bogorensis*. *PLoS ONE* 17(9): e0273568 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273568>
12. Grogan C., Bennett M., Moore Sand Lampe D. (2021). Novel *Asaiabogorensis* Signal Sequences for *Plasmodium* Inhibition in *Anopheles stephensi*. *Front. Microbiol.* 12:633667. doi: 10.3389/fmicb.2021.633667
13. Horsakova I., Voldrich M., Cerovsky M., Dedlackova P., Sicnerova P., Ulbrich P. (2009). *Asaia* sp. as a bacterium decaying the packaged still fruit beverages. *Czech. J. Food Sci.*, 27, S 362-365
14. IFU No. 2, April 1996 Total Count of Potential Spoiling Microorganisms of Fruits and Related Products
15. Jurtschenko S., Beavers-May T.K., Stovall S.H. (2010). Nosocomial infection with *Asaia lannaensis* in two pediatric patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Med. Microbiol.*, 59, 848-852
16. Kato N., Mizuno M., Nakai Y., Nozaki K., Suga H., Kanda T. (2007). Structural analysis of the water-soluble carbohydrate from *Asaia bogorensis* by NMR spektroskopy. *J. Appl. Glycosci.*, 54, 231-233
17. Katsura K., Kawasaki H., Potacharoen W., Saono S., Seki T., Yamada Y., Uchimura T., Komagata K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α *Proteobacteria*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 50, 823-829
18. Kommanee J., Tanasupawat S., Yukphan P., Malimas T., Muramatsu Y., Nakagawa Y., Yamada Y. (2010). *Asaia spathodeae* sp., nov., an acetic acid bacterium in the α *Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 56, 81-87
19. Kręgiel D. (2013). Attachment of *Asaia lannensis* to materials commonly used in beverage industry. *Food Control*, 32(2), 537-542

20. Kręgiel D., Rygała A., Libudzisz Z. (2011). Bakterie z rodzaju *Asaia* – nowe zanieczyszczenie smakowych wód mineralnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 2(75), 5-16
21. Kręgiel D., Rygała A., Libudzisz Z., Walczak P., Ołtuszek-Walczak E. (2012). *Asaia lannensis*- the spoilage acetic acid bacteria isolated from strawberry-flavored bottled water in Poland. *Food Control*, 26, 147-150
22. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
23. Malimas T., Yukphan P., Takahashi M., Keneyasu M., Potacharoen W., Tanasupawat S., Nakagawa Y., Tanticharoen M., Yamada Y. (2008). *Asaia lannaensis* sp., nov., a new acetic acid bacterium in the *Alpha-Proteobacteria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 666-671
24. Moore J.E., McCalmont M., Xu J., Millar B. Ch., Heaney N. (2002). *Asaia* sp. an unusual spoilage organism of fruit-flavored bottled water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4130-4131
25. PN-85/A-79033 p. 3.22 Napoje bezalkoholowe. Pobieranie próbek i metody badań. Oznaczanie liczby bakterii w temp. 20-22°C
26. PN-90/A-75052/09 Przetwory owocowe, warzywne i warzywno-mięsne. Metody badań mikrobiologicznych. Oznaczanie obecności i liczby bakterii rodzaju *Leuconostoc*
27. PN-EN ISO 11133:2014-07 Mikrobiologia żywności, pasz i wody. Przygotowanie, produkcja, przechowywanie i przeprowadzanie badań pożywek
28. PN-EN ISO/IEC 17025:2017 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących
29. PN-EN ISO 4833-1:2013-12 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu wgłębnego w temperaturze 30 stopni C
30. PN-ISO 21527-1:2009 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część 1: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody wyższej niż 0,95
31. Sengun I.Y., Karabiyikli S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22, 647-656

32. Snyder R.W., Ruhe J., Kobrin M.S., Wasserstein A., Doline C., Nachamkin I., Lipschutz J.H. (2004). *Asaia bogorensis* peritonitis identified by 16S ribosomal RNA sequence analysis in a patient receiving peritoneal dialysis. American Journal of Kidney Diseases, 44(2), e15-e17
33. Suzuki R., Zhang Y., Iino T., Kosako Y., Komagata K., Uchimura T. (2010). *Asaia astilbe* sp. nov., *Asaia platycodi* sp. nov., and *Asaia prunellae* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from flowers in Japan. J. Gen Appl. Microbiol., 56, 339-346
34. Tamura K., Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10:512-526
35. Tuuminen T., Heinasmaki T., Kerttula T. (2006). First report of bacteriemia by *Asaia bogorensis*, in a patient with a history of intravenous-drug abuse. J. Clin. Microiol., 44, 3048-3050
36. De Vero L., Giudei P. (2008). Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. Int.J. Food Microbiol., 125, 96-101
37. Yamada Y., Katsura K., Kawasaki H., Widyastuti Y., Saono S., Seki T., Uchimura T., Komagata K. (2000). *Asaia bogorensis* gen nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α Proteobacteria. Int. J. Sys. Evol. Microbiol., 50, 823-829
38. Yukphan P., Potacharoen W., Tanasupawat S., Tanticharoen M., Yamada Y. (2004). *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α Proteobacteria. Int. J. Sys. Evol. Microbiol., 54, 313-316

WPLYW KONSUMPCJI MIĘSA NA RYZYKO POWSTANIA CHOROÓB NOWOTWOROWYCH I SERCOWO-NACZYNIOWYCH

Karol Borzuta, Piotr Janiszewski, Dariusz Lisiak, Eugenia Grześkowiak

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy
Pracownia Badania Surowców i Produkcji Rzeźnianej
ul. Głogowska 239, 60-111 Poznań

karol.borzuta@ibprs.pl

Streszczenie

Mięso jest źródłem tłuszczu, wody i białka, zawierającego wszystkie niezbędne egzogenne aminokwasy. Jego skład stanowią również witaminy i mikroelementy. Według danych statystycznych to czynniki żywieniowe (35%) oraz palenie tytoniu (30%) stwarzają główne ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe. Stąd tak ważna jest ocena wpływu pokarmu na zdrowie człowieka. Celem tego przeglądu jest analiza doniesień literaturowych na temat związku pomiędzy spożyciem mięsa świeżego lub przetworzonego a występowaniem chorób u ludzi. Stwierdzono, że zbyt wysokie spożycie mięsa czerwonego i przetworzonego (np. powyżej 500 g tygodniowo) a szczególnie takiego o dużej zawartości tłuszczu ma związek z ryzykiem chorób sercowo naczyniowych i nowotworów u ludzi. Wśród mięsa czerwonego ograniczony wpływ na wystąpienie nowotworów złośliwych ma spożycie mięsa wieprzowego, które obecnie cechuje się niską zawartością tłuszczu. W Polsce jego spożycie jest dominujące i wyniosło w 2021 ok. 43 kg/osobę. Mięso przetworzone ma dużo większy wpływ na ryzyko występowania nowotworów w porównaniu z mięsem świeżym. Procesami technologicznymi stymulującymi powstawanie kancerogennych związków chemicznych w wyrobach mięsnych są: peklowanie, wędzenie, pieczenie i grillowanie. Ograniczenie wpływu tych procesów można osiągnąć przez zastosowanie technologii wędzenia preparatem dymu wędzarniczego oraz optymalnej metody grillowania. Ważnym sposobem na redukcję wpływu zbyt dużego spożycia mięsa na ryzyko powstawania nowotworów jest jego ograniczona konsumpcja w codziennej diecie oraz spożywanie razem z mięsem warzyw i owoców, zawierających duże ilości witamin C i E.

Słowa kluczowe: spożycie mięsa, choroby nowotworowe, choroby sercowo-naczyniowe

THE INFLUENCE OF MEAT CONSUMPTION ON THE RISK OF CANCER AND CARDIOVASCULAR DISEASES

Summary

Meat is the basic source of fat, water and protein, containing all essential exogenous amino acids, and is also a source of a large number of various micronutrients. However, according to statistical data, the share of dietary factors (35%) and smoking (30%) poses the main risk of developing cancer. The aim of this review is to analyze literature reports on the relationship between meat consumption and the occurrence of diseases in humans, with particular emphasis on the risks and benefits of red meat and processed meat consumption. Too much consumption of red and processed foods (eg. over 500 g per week), especially fatty meat, is associated with the risk of cardiovascular disease and cancer in humans. Among red meat, the lowest impact on the occurrence of malignant tumors has the consumption of pork, which is currently characterized by a low fat content. In Poland, its consumption is dominant (43 kg/person). Processed meat has a much greater impact on cancer risk than fresh meat. Technological processes stimulating the formation of carcinogenic chemical compounds in meat products are: curing, smoking, baking and grilling. Reducing the impact of these processes can be achieved by the technology of smoking with a smoke preparation and the optimal method of grilling. An important way to reduce the impact of too much meat consumption on the risk of cancer is to eat vegetables and fruits together with meat.

Key words: meat consumption, cancer, cardiovascular disease

1. Wstęp

Mięso jest źródłem podstawowych, niezbędnych w żywieniu człowieka składników odżywczych, takich jak: woda, tłuszcz i białko zawierające wszystkie niezbędne aminokwasy tj. lizynę, treoninę, metioninę, fenyloalaninę, tryptofan, izoleucynę i walinę. Wśród tłuszczów uwagę zwraca występowanie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [Ferguson 2010]. Zawiera również liczne mikroskładniki, jest źródłem łatwo przyswajalnego żelaza, cynku i seleniu oraz posiada wysoki poziom witamin B6, B12 i D. Uwagę epidemiologów zwróciła nadal aktualna problematyka poziomu spożycia mięsa powiązana z rozwojem niektórych chorób. Szczególną uwagę skierowano na związek pomiędzy rozwojem dwóch głównych jednostek chorobowych w krajach zachodnich, tj. chorób układu sercowo-naczyniowego [CSN] i raka jelita grubego [RJ], związanych z konsumpcją mięsa czerwonego i mięsa przetworzonego [McAfee i in. 2010].

Zwyczajowo mięsem czerwonym określa się mięso zwierząt gospodarskich, tj. wołowe, wieprzowe, jagnięce oraz kozie. Wyróżniamy mięso świeże, które jest w jak najmniejszym stopniu przetworzone (np. gotowane, duszone lub pieczone w folii, [Sajór, <https://www.zywnosc.com.pl/spozycie-miesa-a-ryzyko-nowotworow/>]) oraz mięso przetworzone, które obejmuje mięso czerwone konserwowane metodą wędzenia, peklowania lub solenia, a także surowiec mięsny z dodatkiem konserwantów chemicznych [World Cancer Res. Fund. 2007]. Ta definicja nie obejmuje wszystkich źródeł mięsa, których spożycie jest jednak marginalne, np. mięsa dziczyzny, mięsa końskiego. Do mięsa białego zalicza się mięso drobiowe. Wieprzowina jest także często kojarzona z mięsem białym i rzeczywiście taka jest ale tylko w odniesieniu do zwierząt młodych. Problem stanowi jednak, jakie zwierzęta zaliczać do młodych, gdzie jest granica wieku [Lippi i in. 2016]. Innym ważnym aspektem metodycznym badań epidemiologicznych jest jednolitość sformułowania definicji mięsa przetworzonego. Często do tej grupy zalicza się też mięso drobiowe, które powinno być z tej grupy usunięte [Micha i in. 2010].

Alarm związany z ryzykiem wystąpienia chorób nowotworowych u ludzi spożywających mięso czerwone i mięso przetworzone wzbudził raport World Cancer Research Foundation [2007], w którym zawarty jest wniosek, że dowody naukowe wskazują na przekonujący związek wystąpienia raka jelita grubego ze spożyciem mięsa czerwonego oraz mięsa przetworzonego. W streszczeniu tego opracowania podkreślono, że ludzie powinni spożywać tygodniowo nie więcej niż 500 g mięsa czerwonego, unikając spożywania mięsa przetworzonego.

W raporcie z 2015 r. International Agency for Research on Cancer (IARC) opublikował podsumowanie badań nad związkiem raka z konsumpcją mięsa czerwonego i przetworzonego, stwierdzając, że jest mocny dowód na ten związek w przypadku raka jelita grubego [Kruger & Zhan 2018].

Jednak wnioski z obu tych raportów są kontrowersyjne, np. Boyle i in. [2018] kwestionuje powiązanie konsumpcji mięsa z rakiem jelita grubego i twierdzi, że duże znaczenie ma tu specyfika diety, jako dodatkowego czynnika utrudniającego jednoznaczne wnioskowanie. Choć istnieje wiele badań nad związkiem pomiędzy spożyciem mięsa a ryzykiem wystąpienia wielu chorób u ludzi, w tym nowotworów, to wyniki nie są zawsze zgodne, ponieważ dużą rolę odgrywają tu kwestie metodyczne, oparte głównie na badaniach epidemiologicznych, tj. analizie częstości chorób oraz przyczyn śmiertelności w określonych grupach konsumentów.

Celem tego przeglądu jest analiza doniesień literaturowych na temat związku pomiędzy

spożyciem mięsa a występowaniem chorób u ludzi ze szczególnym uwzględnieniem ryzyka i korzyści, jakie niesie ze sobą konsumpcja mięsa czerwonego i mięsa przetworzonego. W pracy uwzględniono doniesienia z badań autorskich oraz pięciu opublikowanych prac przeglądowych [McAfee i in. 2010; Ferguson 2010; Lippi i in. 2016; Huang 2021; Lescinsky i in. 2022].

2. Spożycie mięsa

Mięso jest ważną grupą żywności, szczególnie w diecie konsumentów krajów rozwiniętych. Na ilość spożycia mięsa wpływa bardzo wiele czynników, takich jak: wielkość produkcji żywca, status socjoekonomiczny, płeć, wiek, religia, masa ciała, ogólne spożycie energii itp. [Linseisen i in. 2002]. W tab.1 przedstawiono ogólne spożycie mięsa czerwonego i przetworzonego przez mężczyzn i kobiety niektórych krajów europejskich [Linseisen i in. 2002].

Tabela 1. Średnie dzienne spożycie mięsa ogółem, mięsa czerwonego i mięsa przetworzonego przez mężczyzn i kobiety w wybranych krajach europejskich [Linseisen i in. 2002]

Mean daily consumption of total meat, red meat and processed meat by men and women in selected European countries [Linseisen et al. 2002].

Kraj	Mięso ogółem, g		Mięso czerwone, g		Mięso przetworzone, g	
	Mężczyźni	Kobiety	Mężczyźni	Kobiety	Mężczyźni	Kobiety
Wielka Brytania	108,1	72,3	40	24,6	38,4	22,3
Grecja	78,8	47,1	45,3	25,5	10	5,8
Hiszpania	170,4	99,2	74	37,8	52,8	29,6
Niemcy	154,6	84,3	52,5	28,6	83,2	40,9
Włochy	140,1	86,1	57,8	40,8	33,5	19,6

Z danych zawartych w tabeli 1 wynika, że mniejsze dzienne spożycie mięsa ogółem występuje w Grecji i Wielkiej Brytanii, natomiast największe w Hiszpanii. Dość znamienne jest również to, że we wszystkich wymienionych krajach mężczyźni spożywają o prawie 40% więcej mięsa dziennie niż kobiety. W badaniach nad występowaniem nowotworów u ludzi związanych ze spożyciem mięsa zakłada się jako spożycie wysokie powyżej 160 g/dziennie mięsa czerwonego i przetworzonego oraz jako spożycie niskie poniżej 60 g/d [Lynette & Ferguson 2010].

3. Ryzyko zdrowotne

3.1. Choroby sercowo-naczyniowe

Dieta jest jednym z ważniejszych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, w tym choroby wieńcowej, zawału mięśnia sercowego i udaru mózgu [Willam-Son i in. 2005]. Wiele badań potwierdza większe ryzyko chorób sercowo-naczyniowych związane ze wzrostem spożycia mięsa czerwonego. Już badania Frasera [1999] wykazały związek pomiędzy konsumpcją wołowiny z częstotliwością trzy razy w tygodniu a ryzykiem śmiertelności na wieńcową chorobę serca u mężczyzn. Potwierdziły to także wyniki badań Kelemena i in. [2005], którzy łącznie z mięsem czerwonym podawali konsumentom mięso przetworzone. Wzrost ryzyka ostrego syndromu wieńcowego stwierdzili Kontoglenni i in. [2008] u konsumentów spożywających więcej niż osiem porcji mięsa czerwonego na miesiąc w porównaniu ze spożywaniem tylko czterech porcji tego mięsa, przy założeniu, że standardowa porcja wynosiła 60 g. Inne badania potwierdziły redukcję śmiertelności spowodowaną chorobami sercowo-naczyniowymi u wegetarian, którzy ten styl konsumpcji uprawiali dłużej niż 5 lat, nie notowano natomiast obniżenia śmiertelności u wegetarian o krótszej praktyce tego nawyku żywieniowego [Key i in. 1998].

Dominujące znaczenie w badaniach mają spostrzeżenia, że tłuszcz i profil kwasów tłuszczowych mięsa czerwonego są odpowiedzialne za powikłania chorób sercowo-naczyniowych. Główne zalecenia żywieniowe odnośnie redukcji tych chorób dotyczą obniżenia spożycia energii zawartej w tłuszczu, obniżenia spożycia nasyconych kwasów tłuszczowych oraz kwasów tłuszczowych trans w związku z ich wpływem na poziom cholesterolu [Gidding i in. 2005]. Konsumenci spożywający dużo mięsa (np. 280g/d) mają większy poziom cholesterolu całkowitego i frakcji LDL oraz trójglicerydów w płazmie krwi niż wegetarianie, weganie a także jedzący średnie i małe ilości mięsa [Li i in. 1999]. Natomiast przy mniejszym spożyciu mięsa czerwonego niskotłuszczowego, tj. do 180 g/d, nie stwierdzono negatywnego wpływu na zawartość cholesterolu całkowitego i frakcji LDL w płazmie krwi, a więc działania hipercholesteroloamicznego [Beauchesne-Rondeau i in., 2003; Wagemakers i in. 2009]. Mięso czerwone obecnie produkowane, a szczególnie mięso wieprzowe, charakteryzuje się dużo mniejszym przetłuszczeniem niż np. 20 lat temu, co istotnie zmniejsza ryzyko chorób sercowo-naczyniowych. W Polsce zawartość mięsa w półtuszy wynosiła w latach osiemdziesiątych XX wieku ok. 45% a w roku 2022 już ok. 59% [Biuletyn MRiGŻ, 2022], co oznacza, że zawartość tłuszczu zmniejszyła się o ok. 14 punktów procentowych. Obecnie mięso czerwone, a szczególnie mięso wieprzowe, ocenia się

jako niskotłuszczowe i o niskiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych [Williams 2007].

Nienasycone kwasy tłuszczowe trans decydują o koncentracji cholesterolu we krwi. Istnieją zalecenia częściowego lub całkowitego usunięcia tych kwasów w procesie produkcyjnym olejów roślinnych w drodze ich hydrogenezy [USFDA 2003]. W przeciwieństwie do tego Chardigny i in. [2008] wykazali, że inny kwas tłuszczowy trans (wakcenowy, C18:1, trans 11) jest głównym kwasem trans obecnym w mięsie czerwonym i nie ma on wpływu ani na poziom cholesterolu całkowitego ani frakcji LDL. Kwas ten jest pośrednikiem w produkcji izomerów CLA cis-9, trans -11, które mają potencjalnie korzystny wpływ na zdrowie. W konkluzji część badaczy stawia hipotezę, że zawartość tłuszczu w mięsie czerwonym może stanowić ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, inni z kolei twierdzą, że konsumpcja mięsa czerwonego, wytrybowanego z nadmiaru tłuszczu nie stanowi takiego ryzyka.

3.2. Nowotwory

Wykonano liczne badania nad wpływem spożycia mięsa czerwonego i przetworzonego na ryzyko choroby nowotworowej. Badano różne rodzaje nowotworów, takie jak rak: jelita grubego, piersi, prostaty, płuc, przełyku, żołądka, trzustki, nerek, pęcherza, jajnika, tarczycy oraz jamy ustnej. Poniżej scharakteryzowano wnioski z wyników badań różnych autorów, zajmujących się poszczególnymi rodzajami nowotworów.

Lippi i in. [2016] wykonali przegląd prac opublikowanych w latach 2005 do 2015, w których badano związek pomiędzy spożyciem mięsa a ryzykiem chorób nowotworowych u ludzi. Przeanalizowano w sumie 42 prace tematyczne, w tym 12 prac dotyczących raka jelita grubego, 6 raka przełyku, 4 raka żołądka, po 3 raka piersi i nerek, po 2 raka płuc, pęcherza i jajnika oraz po jednej pracy na temat raka tarczycy, prostaty, trzonu macicy, chłoniaka nieziarniczego, jamy ustnej i raka wątroby. W 6 na 12 badanych prac stwierdzono, że większe ogólne spożycie mięsa wiązało się z ryzykiem raka jelita grubego. Ryzyko to zwiększyło się u konsumentów spożywających więcej niż 500 g tygodniowo ogólnej ilości mięsa czerwonego. W tym przypadku na 8 prac wszystkie wykazały związek z rakiem jelita grubego, podobnie jak z rakiem płuc (2 prace), przełyku (5 prac) i żołądka (3 prace) oraz jednej pracy z rakiem trzonu macicy. Nie wykryto natomiast związku spożycia mięsa czerwonego z rakiem trzustki, jajników, prostaty i chłoniakiem nieziarniczym. Ryzyko powstawania nowotworów było największe przy spożyciu większej ilości mięsa czerwonego

razem z mięsem przetworzonym, co miało miejsce w przypadku raka jelita grubego (w 7 na 8 prac), żołądka (w 3 na 3 prace) oraz pęcherza (w 2 na 2 prace).

Interesujące dane dotyczą wpływu spożycia większej ilości mięsa zróżnicowanego gatunkowo na ryzyko powstania nowotworów. Analiza obserwacji naukowych zebranych przez Lippi i in. [2016] wykazała, że największe ryzyko wiązało się ze spożyciem mięsa wołowego (potwierdzenie w 3 na 4 prace), niższe ze spożyciem mięsa jagnięcego (1 na 2 prace) i najniższe ze spożyciem mięsa wieprzowego (brak związku w 4 cytowanych pracach). Należy podkreślić, że na 10 wykonanych badań w jednych stwierdzono związek powstania raka nerek nawet przy spożywaniu dużej ilości mięsa białego z drobiu [Faramawi i in. 2007].

Na podstawie informacji zawartych w wyżej cytowanych pracach można zatem przyjąć hipotezę, że konsumpcja mięsa świeżego jest związana z mniejszym ryzykiem nowotworów niż konsumpcja mięsa przetworzonego. Powyższe potwierdzają także dane na temat przyczyn śmiertelności [Lars and Orsini 2014]. Grupa Robocza International Agency for Research on Cancer [2015] po przeanalizowaniu ponad 800 różnych badań nad rakiem u ludzi stwierdziła, że mięso przetworzone powinno być klasyfikowane jako kancerogenne, szczególnie w przypadku raka jelita grubego. Podkreślono przy tym, że każde spożycie 50 g dziennie mięsa przetworzonego powoduje 18% wzrost ryzyka raka jelita grubego a każde spożycie 100 g mięsa czerwonego wzrost 17%.

Natomiast nowe doniesienia naukowe z Nowej Zelandii dowodzą, że nie ma ryzyka wzrostu występowania raka jelita grubego u ludzi konsumujących mięso przetworzone ale regularnie preferujących żywność niskotłuszczową. A zatem preferencja dla diety niskotłuszczowej może zmniejszyć ryzyko wystąpienia raka jelita grubego u ludzi spożywających mięso przetworzone [Sneyd & Cox 2020]. Podkreśla się przy tym korzystne oddziaływanie konsumpcji produktów mlecznych.

3.2.1. Mechanizm tworzenia raka i czynniki kancerogenne

Tradycyjna nazwa nowotworu jest używana zarówno jako określenie nowotworów łagodnych, jak i złośliwych (raki, mięsaki). Cechą wspólną tych dwóch typów chorób jest tworzenie guza. Nowotwór złośliwy jest to stan, w którym dochodzi do niekontrolowanego rozwoju zmienionych morfologicznie i czynnościowo komórek, początkowo w miejscu pierwotnej zmiany, potem do otaczających tkanek i wreszcie do wędrowania i namnażania się zmienionych komórek w miejscach odległych, określonych jako przerzuty [Encyklopedia zdrowia, 2000]. Są dwie teorie tłumaczące mechanizm powstawania nowotworów –

genetyczny i epigenetyczny. Pierwszy z nich zakłada, że zapoczątkowana zmiana o charakterze mutacji powstaje w materiale genetycznym komórki (w DNA). Zmieniony jakościowo lub ilościowo genom moduluje następnie zmianę morfologiczną. Mechanizm epigenetyczny zakłada natomiast że pierwotny defekt w aparacie pozagenetycznym indukuje zmianę w DNA. Utrwalony, zmieniony genotyp przekazuje nową cechę potomnym komórkom nowotworowym. W miarę rozwoju wiedzy, zwłaszcza badań nad mechanizmami chemicznego i fizycznego, a potem wirusowego nowotworzenia (tzw. karcinogenezy), przewagę uzyskiwać zaczęły teorie genetyczne.

Istnieją również liczne interpretacje mechanizmów tworzenia raka związane z konsumpcją mięsa [Ferguson i in. 2010]. Należą do nich: działanie kancerogenne spowodowane wysokim spożyciem tłuszczów, tworzenie kancerogennych amin heterocyklicznych i/lub wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych podczas ogrzewania, tworzenie składników kancerogennych typu N-nitrozo lub kancerogeneza żelaza hemowego, jako wynik promujących ją procesów endogennych.

Funkcjonuje hipoteza, że nie samo spożywanie mięsa jest kancerogenne lecz dieta wysokotłuszczowa. Niebezpieczny dla zdrowia stopień skażenia wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) produktów grillowanych występuje w przypadku zwiększonej zawartości tłuszczu w mięsie, ponieważ związki z grupy WWA mają charakter lipofilny, a tłuszcz jest równocześnie prekursorem powstawania WWA [Wajdzik 2022]. Tworzenie się związków z grupy WWA (np. benzo(a)piren) jest silnie uzależnione od metody grillowania oraz rodzaju stosowanego źródła energii. Ściekający na rozżarzony węgiel lub drewno w czasie grillowania tłuszcz ulega przemianom, prowadzącym do powstania związków z grupy WWA. Dlatego spływający tłuszcz powinien trafiać poza bezpośrednią strefę żarzenia. Większą podatność na tworzenie związków WWA mają wyroby grillowane nad otwartym ogniem i zawierające większą ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych [Wajdzik 2022]. Ponadto zwiększoną obecność związków WWA stwierdzono w wyrobach grillowanych z wykorzystaniem węgla drzewnego niż samego drewna. Znaczne zmniejszenie ilości węglowodorów z grupy WWA powoduje przygotowanie kwaśnych marynat do produktów grillowanych.

Na zwiększone ryzyko raka piersi u kobiet wynikające z większego spożycia tłuszczów wskazują także badania Schulza i in. [2008]. W badaniach nowozelandzkich [Sneyd & Cox 2020] nad rakiem jelita grubego stwierdzono, że preferencja diety niskotłuszczowej może obniżyć ryzyko jego powstawania. Natomiast Crowe i in. [2008] nie znaleźli związku pomiędzy ryzykiem raka prostaty a dietą tłuszczową.

Podczas dłuższego ogrzewania mięsa w wysokich temperaturach (grillowanie, smażenie, pieczenie na rożnie) tworzą się także kancerogenne heterocykliczne aminy aromatyczne (HAA). Sprzyja temu obecność heksoz, wolnych aminokwasów (szczególnie kreatyny) oraz zasad purynowych, pirymidynowych i nukleozydów [Wajdzik 2022]. Ilość związków z grupy HAA rośnie m.in. wraz z temperaturą ogrzewania oraz stopniem dojrzewania mięsa a maleje w przypadku użycia przypraw zawierających antyoksydanty (np. związki fenolowe). W celu ograniczenia ryzyka tworzenia się związków z grupy HAA proces ogrzewania mięsa należy prowadzić w temperaturze nie przekraczającej 180°C. Po przekroczeniu temperatury grillowania 170°C mogą w produktach tworzyć się N-nitrozoaminy. Ich ilość jest ściśle skorelowana z obecnością drugo i trzeciorzędowych amin pochodzących z rozkładu białek oraz z obecnością wolnych azotynów. Z tego powodu nie powinno się grillować mięsa peklowanego oraz w końcowym okresie jego dojrzewania. Zagrożeniem powstawania N-nitrozoamin jest również grillowanie połączone z procesem wędzenia.

Nitrozoaminy tworzą się przez reakcję azotynu i tlenku azotu z drugorzędowymi aminami i N-alkyl amidami a katalizuje ten proces żelazo hemowe, którego czerwone mięso jest bogatym źródłem. Dlatego badania Huanga [2003] donoszą o silnym związku pomiędzy nadmiarem żelaza w diecie a ryzykiem raka u ludzi. Dokładny mechanizm kancerogennego wpływu mięsa czerwonego i przetworzonego na organizm człowieka nadal nie jest wyjaśniony. Obecnie uważa się, że są za to odpowiedzialne substancje powstające w wyniku przemian żelaza hemowego, występującego w dużej ilości w mięsie czerwonym, ponieważ dochodzi do uszkodzenia DNA komórek organizmu człowieka [Sajór, www.zywnosc.com.pl]. Dodatkowo obróbka termiczna mięsa w wysokiej temperaturze powoduje powstawanie węglowodorów aromatycznych i heterocyklicznych amin aromatycznych. W przypadku wędlin ich wpływ na powstawanie nowotworów związany jest z dodatkiem azotanów i azotynów w procesie peklowania, które mogą reagować ze składnikami mięsa, tworząc rakotwórcze nitrozoaminy.

3.2.2. Możliwości redukcji ryzyka raka spowodowanego spożyciem mięsa czerwonego i przetworzonego

Poznanie mechanizmu powstawania nowotworów zbliża nas do redukcji ryzyka występowania tej groźnej choroby. Dotychczasowe liczne, cytowane poniżej, badania w tej dziedzinie pozwoliły na wskazanie wielu sposobów ograniczających to ryzyko.

3.2.2.1. Obniżenie ilości i modyfikacja składu spożywanego tłuszczu

W produkcji świń wysokomięsnych o obniżonej zawartości tłuszczu w tuszy w ostatnim trzydziestoleciu w Polsce poczyniono znaczny postęp dzięki m.in. wprowadzeniu rozliczenia za żywca według systemu klasyfikacji SEUROP, promującemu surowiec o najwyższej zawartości chudego mięsa w tuszy i najniższej zawartości tłuszczu. Zawartość mięsa (mięśność) w tuszach wieprzowych wzrosła w latach 1991–2022 z ok. 43% do ok. 59% a tłuszczu obniżyła się z ok. 33% do ok. 14% [Borzuta 1998; Biuletyn MRiGŻ, 2022; Borzuta i Lisiak 2016]. W krajach zachodnioeuropejskich, takich jak: Dania, Francja, Holandia, Niemcy mięśność tuczników osiągnęła jeszcze wyższy poziom, przekraczający 60%. Dzięki selekcji, pracom genetycznym i odpowiedniemu żywieniu uzyskano chudą wieprzowinę, zmniejszając tym samym ryzyko powstania raka u konsumentów mięsa. Tam, gdzie nie uzyskano takiego postępu hodowlanego można obniżyć spożycie tłuszczu przez wykrawanie tego składnika z wyrębów kulinarnych. Innym sposobem zwiększającym prozdrowotność w spożyciu tłuszczu jest sterowanie jego jakością przez odpowiednie żywienie zwierząt, obniżające zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych i zwiększające zawartość niezbędnych, nienasyconych kwasów tłuszczowych, a szczególnie kwasu linolenowego z rodziny n-3 [Lisiak i in. 2013], który uważany jest za czynnik zapobiegający rakowi [Russell i in. 1999]. Jak wynika ze szczegółowych badań krajowych [Praca zbiorowa 2015] wieprzowina w porównaniu z mięsem wołowym, jako typowym mięsem czerwonym, charakteryzuje się korzystnym profilem kwasów tłuszczowych, tj. niższą zawartością kwasów nasyconych (tzw. „złego” tłuszczu) i znacznie wyższą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (tzw. „dobrego” tłuszczu). W porównaniu z mięsem drobiowym mięso to, pomimo niższej całkowitej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, charakteryzuje się znacznie korzystniejszą proporcją kwasów omega-6 do omega-3, która wynosi w wyrębach wieprzowych poniżej 10:1 a w mięsie drobiowym 20:1. Natomiast mięso przeżuwaczy ma z kolei wyższy poziom skoniugowanego kwasu linolowego (CLA), uważanego za czynnik przeciwrakowy, niż mięso innych gatunków zwierząt.

3.2.2.2. Redukcja formowania amin heterocyklicznych (HCA) i wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych (WWA)

Aminy heterocykliczne są składnikiem alkalicznym i mogą wywoływać mutacje DNA, w następstwie aktywacji różnych enzymów metabolicznych [Feldon 2007]. Dowiedziono, że dieta z wysokim poziomem błonnika, jak np. śruty jęczmiennej może redukować potencjalny

wpływ kancerogenezy amin heterocyklicznych przez modyfikację ich absorpcji i ekskrecji [Kestell i in. 1999]. Carter i in. [2007] wykazali, że biała i zielona herbata oraz kofeina spożywane przez ludzi są inhibitorami HCA wywołującymi zmiany patologiczne, które mogą powodować raka.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) to grupa ponad 100 związków zbudowanych z kilku skondensowanych pierścieni aromatycznych, które powstają głównie w procesie wędzenia i grillowania mięsa i wyrobów. Ich głównym przedstawicielem jest benzo(a)piren (BaP), związek powszechnie występujący w środowisku, którego maksymalna zawartość jest normowana przepisami UE [Rozp. Komisji [UE] nr 815/2011] i wynosi 2 mikrogramy na kilogram mięsa i wyrobów mięsnych nie grillowanych. Dla mięsa i produktów mięsnych grillowanych limit wynosi 5 mikrogramów na kg produktu. Należy dodać, że benzo(a)piren nigdy nie występuje sam, a w towarzystwie innych węglowodórów, które różnią się istotnie pod względem toksyczności [Obiedziński 2014]. Węglowodór ten znajduje się na liście Międzynarodowej Organizacji Zapobiegania Rakowi, jako związek chemiczny powodujący największe zagrożenie pod względem kancerogenności spośród innych związków WWA, powstający m.in. podczas procesów ogrzewania, suszenia, grillowania i wędzenia, kiedy produkty spalania wchodzą w kontakt z żywnością. Dlatego od lat doskonalono technologię wędzenia, której wynikiem jest preparat dymu wędzarniczego, pozwalający na eliminację tradycyjnego wędzenia, podczas którego powstaje znacznie więcej WWA [Obiedziński 2014]. Preparat ten zawiera tylko ok. 2 ppm benzo(a)piranu w 1 kg, stąd jego ogólna zawartość w wędzonym produkcie jest nieporównywalnie mniejsza niż podczas wędzenia tradycyjnego a szczególnie tzw. wędzenia na ciepło. Według badań Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego zawartość benzo(a)pirenu w wybranych produktach spożywczych wynosiła w ppm/kg: kiełbasa zwyczajna 1,4; kiełbasa krakowska sucha 1,3; boczek wędzony 1,8; szprot wędzony 7,6; wieprzowina grillowania 7,9; stek wołowy grillowany 4,4; kurczak grillowany 3,7; chleb żytni 1,1-1,6; olej rzepakowy 2,6; herbata 3,9-21,3; kawa słodowa silnie palona 16,0; jabłka 0,1-0,5 [Konspekty tematów szkoleniowych, 1997]. Podobną zawartość benzo(a)pirenu stwierdzono w badaniach produktów mięsnych w woj. podkarpackim, która wynosiła średnio: boczek wędzony 3,80 µg/kg; szynka wędzona 2,72 µg/kg, polędwica wędzona 1,78 µg/kg; smalec 1,03 µg/kg; kiełbasa 1,31 µg/kg; wędzonka drobiowa 0,92 µg/kg [Znamirowska i in. 2011]. Z kolei Ciecierska i Obiedziński [2007] wykazali zawartość benzo(a)pirenu w granicach od 0,28 do 0,89 µg/kg zależnie od grupy wyrobów mięsnych, metody wędzenia i miejsca pobrania próby. WWA trafiają do organizmu przez układ pokarmowy z czego 7-10% pochodzi z produktów

wędzonych i grillowanych [Obiedziński 2014]. Głównym źródłem WWA są produkty zbożowe, które choć mają ich niski poziom w swoim składzie, to ilościowo spożywamy ich najwięcej w codziennej diecie. Związki WWA nie kumulują się w organizmie ludzi i zwierząt, co stanowi czynnik ochronny przed ryzykiem nowotworów.

3.2.2.3. Modyfikacja tworzenia N-nitrozoamin

Większość N–nitrozoamin tworzy się endogennie, a na proces ich tworzenia mogą wpływać inne składniki diety np. witaminy C i E, które go blokują. W doświadczeniu na zwierzętach Mirvish [1986] wykazał, że obie te witaminy powodują zahamowanie kancerogenności o 30 do 60%. Doszedł do wniosku, że u ludzi dieta bogata w witaminę C negatywnie koreluje z ryzykiem raka żołądka, przełyku, krtani, ust i szyi. Potwierdziły to również badania Bartscha i in. [1988].

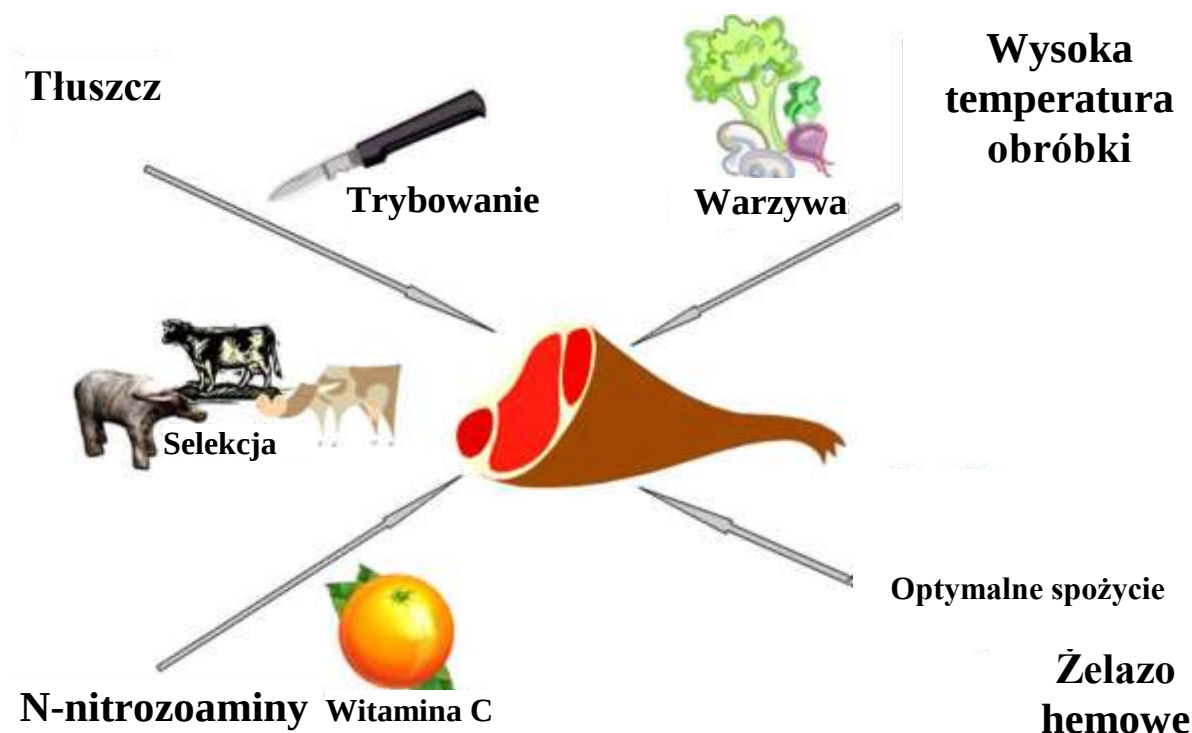
Ilość powstałych nitrozoamin podczas grillowania jest m.in. powiązana z obecnością w produkcie wolnych azotynów i azotanów. Dlatego nie powinno się grillować produktów peklowanych. Zawartość azotanów w surowym, niepeklowanym mięsie nie jest duża i wynosi w wieprzowinie 12,8 ppm NaNO_3/kg oraz w wołowinie 3,40 ppm NaNO_3/kg [Konspekty tematów szkoleniowych, 1997]. Dla porównania w serze białym wynosi ona 20,70 ppm; marchwi 8,47-119,6 ppm; kapuście 43,60-162,4 ppm; cebuli 11,20-25,5 ppm; szpinaku 7,60-142,1 ppm/kg produktu. Duże różnice zawartości azotanów w warzywach spowodowane są przede wszystkim intensywnością nawożenia azotowego.

Proces tworzenia nitrozoamin katalizuje żelazo hemowe. Badania Hanga [2003] donoszą o istotnym związku pomiędzy nadmiarem żelaza w żywności a ryzykiem raka u ludzi. Najwięcej żelaza występuje w mięsie wołowym (2,1mg/100g) a następnie w owczym (1,6mg/100g), cielęcym (1,2mg/100g), najmniej w mięsie wieprzowym (0,9 mg/kg) [Praca zbiorowa, 2011]. Żelazo w mięsie występuje głównie w postaci hemu, który jest dobrze wchłaniany, co pozwala na zwiększenie jego absorpcji w organizmie człowieka. Spożycie 100g wołowiny lub jagnięciny zapewnia co najmniej jedną czwartą dziennego zapotrzebowania na żelazo dorosłego człowieka [Kończak, 2008].

Na rysunku 2 schematycznie przedstawiono działania, które mogą przyczynić się do zapobiegania występowania u ludzi nowotworów, związanych ze spożywaniem mięsa [Ferguson, 2010]. Należą do nich:

- a) zmniejszenie spożycia tłuszczu przez selekcję zwierząt i wykrawanie tkanki tłuszczowej z wyrębów

- b) redukcja nitrozoamin przez spożycie witaminy C lub E
- c) obniżenie mutagenności związków związanych z obróbką termiczną w wysokich temperaturach przez spożycie owoców, warzyw i produktów zbożowych
- d) spożywanie optymalnego poziomu żelaza hemowego w diecie



Rys. 2. Postępowanie w celu ograniczenia ryzyka raka spowodowanego spożyciem mięsa wg Fergusona [2010]
Proceedings to reduce the risk of cancer caused by meat consumption according to Ferguson [2010]

4. Korzyści z konsumpcji mięsa

Jak już wspomniano, mięso jest podstawowym źródłem tłuszczu, wody i białka, zawierającego wszystkie niezbędne egzogenne aminokwasy a także jest źródłem dużej liczby różnych mikrośladników. Frakcja tłuszczowa zawiera polienowe kwasy tłuszczowe (PUFA): kwas alfa-linolenowy (C18:3, n-3), kwas linolowy (C18:2, n-3), kwas eikozapentaenowy (EPA), dekozapentaenowy (DPA) i kwas dekozaheksainowy (DHA). Kwasy te mają wpływ na zapobieganie chorobom sercowo-naczyniowym [Sidoliqui i in. 2008], korzystnie oddziałują na centralny układ nerwowy i funkcję siatkówki oka [Mann i in. 2006; Ruxton i in. 2004] a dodatkowo skoniugowany kwas linolowy (CLA) ma działania antykancerogenne

[Hargrave-Bernes i in. 2008]. Głównym źródłem tego kwasu jest mięso przeżuwaczy i mleko, a konsumenci tych produktów mają większą zawartość tego związku we krwi niż wegetarianie [Mann i in. 2006].

Niedobór żelaza jest natomiast głównym czynnikiem żywieniowym związanym z anemią, szczególnie u dzieci i młodych kobiet. Żelazo jest składnikiem niezbędnym dla wielu procesów biochemicznych zachodzących w organizmie, a jako komponent hemoglobiny jest przeznaczony do transportu tlenu we krwi. Dlatego nawet łagodny poziom niedoboru tego pierwiastka może wywoływać negatywne skutki dla zdrowia [Gibson & Aschwell, 2002]. Żelazo hemowe w mięsie jest bardziej biodostępne niż żelazo zawarte w roślinach i dlatego jego konsumenci mają korzystniejszy jego poziom niż wegetarianie i weganie. Spożycie 90 g/dobę mięsa czerwonego jest wystarczające dla utrzymania korzystnego statusu żelaza u ludzi, natomiast ograniczenie spożycia do 71 g/dobę może wiązać się z ryzykiem wystąpienia anemii [Gibson & Aschwell 2002].

Czerwone mięso jest głównym źródłem witaminy B12, zabezpieczającym jej zapotrzebowanie dzienne u ludzi [Cosgrove i in. 2005]. Ponieważ witamina ta jest odpowiedzialna za aktywność enzymów niskie jej spożycie wiąże się z podwyższeniem zawartości homocysteiny, która jest czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i udarów. Potwierdzono, że konsumenci o dużym spożyciu ogólnym mięsa mieli niższy poziom homocysteiny niż wegetarianie. Średnia ilość spożywanego czerwonego mięsa np. do 72 g/dobę jest wystarczająca dla pokrycia zapotrzebowania na witaminę B12.

Wołowina i jagnięcina są także bogatym źródłem cynku. Nawet niskie spożycie mięsa czerwonego (np. 41 g/dobę) zabezpiecza optymalne zapotrzebowanie na ten pierwiastek dla zdrowia człowieka [Cosgrave i in. 2005].

5. Ocena ryzyka i korzyści konsumpcji mięsa dla zdrowia człowieka

Według danych encyklopedycznych [Encyklopedia Zdrowa, 2000] udział czynników żywieniowych (35%) oraz palenie tytoniu (30%) stwarzają główne ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe. W 2008 r. w Polsce na nowotwory złośliwe zmarły 244 osoby na 100 tys. ludności, natomiast dla porównania na choroby układu krążenia 453 osoby, na choroby układu oddechowego 50 osób a na cukrzycę 17 osób [Rocznik Statystyczny 2010]. Przyjmując ilość zgonów na 100 tys. ludności ogółem jako 100% udział zgonów spowodowanych czynnikami żywieniowymi wynosił zatem ok. 24% a chorobami układu krążenia 45%. Dane te świadczą o wielkiej roli żywienia w występowaniu przyczyn

śmiertelności ludności w XXI wieku.

Badania dowodzą również, że tłuszcz i profil kwasów tłuszczowych mięsa czerwonego spożywanego przez ludzi są odpowiedzialne za powikłania chorób sercowo-naczyniowych. W związku z tym, zalecenia żywieniowe obejmują redukcję tych chorób przez obniżenie spożycia energii zawartej w tłuszczu, zmniejszenie spożycia nasyconych kwasów tłuszczowych oraz kwasów tłuszczowych w konfiguracji trans w związku z ich wpływem na poziom cholesterolu frakcji LDL w płazmie krwi konsumentów.

Liczne badania wskazują na związek pomiędzy większym spożyciem mięsa czerwonego i przetworzonego a ryzykiem wystąpienia nowotworów, a szczególnie raka jelita grubego, raka płuc, przełyku, żołądka oraz trzonu macicy. W związku z tym Światowa Fundacja Badań nad Rakiem (World Cancer Research Foundation) zaleciła ograniczenie konsumpcji mięsa czerwonego do 500 g tygodniowo, minimalizując spożycie mięsa przetworzonego.

Badania wskazują także na mniejsze ryzyko nowotworów przy spożywaniu mięsa wieprzowego niż mięsa przeżuwaczy. Jest to ważne stwierdzenie dla konsumentów polskich, gdyż statystyki wyraźnie wskazują na dominację tego gatunku w jadłospisie przeciętnego Polaka, spożywającego średnio dziennie 116 g wieprzowiny i tylko ok. 10 g wołowiny. Dodatkowym atutem obecnie produkowanego mięsa wieprzowego jest jego małe otłuszczenie, spowodowane postępowaniem hodowlanym [Kołodziej-Skalska i in. 2016], co ma duże znaczenie dla ograniczenia chorób układu krążenia. Natomiast problemem jest duże spożycie mięsa przetworzonego (średnio 77 g/d/osobę w Polsce, podobnie jak w Niemczech i Holandii), przekraczające zalecane przez Światową Fundację Badań nad Rakiem normy (do 50 g/d/osobę). Dlatego należy preferować produkty mięsne przetworzone, nie poddane procesom peklowania, wędzenia i pieczenia, np. kielbasę białą, parówki itp., w których potencjalnie zawartość benzo(a)pirenu jest znacznie mniejsza niż w kielbasach trwałych, wędzonych.

Korzyści ze spożywania mięsa przedstawione w rozdziale 4 nie mogą być pominięte przy analizie zagrożeń występowania nowotworów. Ważny jest kompromis zmierzający do minimalizowania ryzyka zachorowania na nowotwory, które można osiągnąć przez umiar w spożyciu mięsa czerwonego i przetworzonego a także przez dobór gatunkowy mięsa w diecie oraz jednocześnie spożywanie mięsa z warzywami i owocami, bogatymi w witaminy C i E.

Najnowsze opublikowane w renomowanym periodyku *Nature Medicine* badania autorów amerykańskich i kanadyjskich, oparte także na metaanalizie dostępnych opracowań, zdają się jednak przeczyć ścisłemu związkowi spożywania a ryzykiem zdrowotnym [Lescinsky i in.

2022]. Autorzy podkreślają słaby dowód powiązania pomiędzy konsumpcją nieprzetworzonego mięsa czerwonego w ilości do 200 g dziennie a rakiem jelita grubego, rakiem piersi, dusznicą bolesną i cukrzycą typu 2. Co więcej, nie znaleziono związku pomiędzy spożyciem tego mięsa a udarem niedokrwiennym lub krwotokiem śródmózgowym. Ze względu na słaby badany związek z ryzykiem chorób i zgonów spowodowanych spożyciem świeżego mięsa czerwonego formułowanie nowych wniosków w sprawie zaleceń wielkości spożycia jest problematyczne i wymaga dalszych badań.

6. Wnioski

1. Zbyt wysokie spożycie czerwonego i przetworzonego (np. powyżej 500 g tygodniowo) a szczególnie mięsa otluszczonego ma związek z ryzykiem chorób sercowo naczyniowych i nowotworów u ludzi. Najczęściej występujące choroby nowotworowe związane z wysokim spożyciem mięsa dotyczą raka jelita grubego, żołądka, przełyku i raka płuc.
2. Wśród mięsa czerwonego najmniejszy wpływ na wystąpienie nowotworów złośliwych ma spożycie mięsa wieprzowego, które obecnie cechuje się niską zawartością tłuszczu.
3. Mięso przetworzone ma dużo większy wpływ na ryzyko nowotworów niż mięso świeże. Procesami technologicznymi stymulującymi powstawanie kancerogennych związków chemicznych w wyrobach mięsnych są: peklowanie, wędzenie, pieczenie i grillowanie. Ograniczenie wpływu tych procesów można osiągnąć przez technologię wędzenia preparatem dymu wędzarniczego oraz optymalną metodę grillowania (temperatura grillowania nie wyższa niż 170°C, unikanie grillowania mięsa peklowanego oraz w końcowym okresie jego dojrzewania i grillowania połączonego z procesem wędzenia).
4. Polska należy do krajów o dużym spożyciu mięsa czerwonego ale największy w nim udział, sięgający ok. 90% ma chude mięso wieprzowe, co ogranicza ryzyko nowotworów.
5. W Polsce należy stworzyć mechanizmy, ograniczające spożycie mięsa przetworzonego, które jest zbyt duże, przekraczające zalecenia Światowej Fundacji Badań nad Rakiem.
6. Ważnym sposobem na ograniczenie wpływu zbyt dużego spożycia mięsa na ryzyko nowotworów jest konsumpcja razem z mięsem warzyw i owoców

PIŚMIENNICTWO

1. Bartsch H., Ohshima H., Pignatelli B. (1988). Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutation Research*, 202 (2), 307-324
2. Biuletyn Zintegrowanego Systemu Rolniczej Informacji Rynkowej. MRiRW: Rynek mięsa wieprzowego. Nr 42 (2022) z dn. 27.10.2022 r.
3. Borzuta K., Lisiak D. (2016). Ewolucja wartości rzeźnej trzody chlewnej w Polsce w ostatnim sześćdziesięcioleciu. *Przegl. Hodowl.* 4, 1-6
4. Borzuta K.: Badania nad przydatnością różnych metod szacowania mięsności do Klasyfikacji tusz wieprzowych w systemie EUROP. Rozprawa habilitacyjna, *Roczn. Inst. Przem. Mięs. i Tł.*, XXXV/2, s. 84
5. Boyle P., Boffeta P. (2008). Diet, nutrition and cancer: Public, media and scientific confusion. *Actuals of Oncology*, 19, 10, 1665-1667
6. Carter O., Dashwood R.H., Wang R., Dashwood W.M., Orner G.A., Fisher K.A. (2007). Comparison of white tea, green tea, epigallocatechin-3-gallate and caffeine as inhibitors of Pulp – induced colonic aberrant crypts. *Nutrition and Cancer*, 58 (1), 60-65
7. Chardigny J.M., Destailats F., Malpnech-Brugere C., Moulin J., Bauman D. E., Lock A.L. et al. (2008). Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effects on cardiovascular risk factors in healthy subjects? Results of the trans fatty acids Chemical Nutrition, 87(3), 558-566
8. Ciecierska M., Obiedziński M. (2007). Influence of smoking process on polycyclic aromatic hydrocarbons content in meat products. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 6 (4), 17-28
9. Cosgrove M., Flynn A., Kiely M. (2005). Consumption of red meat, white meat and processed meat in Irish adults in relation to dietary quality. *Brit. J. of Nutr.* 93, 933-942
10. Crove F.L., Key., Appleby P.M., Travis R.C., Overvad K., Jakobsen M.K. et al. (2008). Dietary fat intake and risk of prostate cancer and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(s), 1405-1413
11. Faramawi M.F., Johnson F., Fry M.W., Sall M., Zhan J. (2007). Consumption of different types of meat and the risk renal cancer.: meta-analyses of case control studies. *Cancer causes Control*, 18, 125-133
12. Felton J.S., Knize M.G. (2006). A meat and potato war : Implications for cancer etiology. *Carcinogenesis*, 27(12), 2367-2370

13. Ferguson L. R. (2010). Meat and cancer. Review. Meat Science, 84, 308-313
14. Ferguson L.R. (2006). Nutrigenomics: Integrative genomic approaches into nutrition research. Molecular Diagnosis and Therapy. 10 (2), 101-108.
15. Fraser G. (1999). Associations between diet and cancer, ischemic heart disease and all-cause mortality in non Hispanic white California Seventh-Day Adventists. American Journal of Clinical Nutrition, 70, 532S-538S
16. Gibson S., Aschwell M. (2002). The association between red and processed meat consumption and iron intakes and status among British adults. Public Health Nutrition, 6(4), 341-350
17. Gidding S.S., Dennison B.A., Birch L.L., Daniels S.R., Gillman M.W., Lichtenstein A.H. et al. (2005). Dietary recommendations for children and adolescents: A guide for practitioners: Consensus statement from the American Heart Association. Circulation, 112 (13), 2061-2075
18. Hargrave-Barnes K.M., Azain M.J., Milner J.J. (2008). Conjugated linoleic acid induced fat loss dependence on delta 6 desaturase or cyclooxygenase. Obesity. 16 (10), 2245-2252
19. Huang X. (2003). Iron overload and its association with cancer risk in humans. Mutation Research, 533(1-2), 153-171
20. Hung Y., Cao D., Chen Z., Chen B., Li J., Guo J., Deng Q., Lin L., Wei Q. (2021). Red and processed meat consumption and cancer outcomes: Umbrella review. Food Chemistry 256, 129697, 1-11
21. Intern. Agency for Res. on Cancer. Volume 114. Consumption of red meat and processed meat. IARC Working Group. Lyon: 6-13 September, 2015. IARC Monogr. Eval Carcinog Risks Hum.
22. IARC, 2015. IARC monographs evaluate consumption of red meat and processed meat.
23. Kelemen L.E., Kushi L.A., Jacobs D.R., Cerhan J.R. (2005). Associations of dietary protein with disease and mortality in a prospective study of postmenopausal women. American Journal of Epidemiology, 161, 239-249
24. Kestell P., Zhao L., Zhu S., Harris P.J., Ferguson L.R. (1999). Studies on the mechanism and excretion of the food carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (1Q). Carcinogenesis, 20 (12), 2253-2260

25. Key T.J., Fraser G.E., Thorogood M., Appleby P.N., Beral V., Reeves G. et al. (1998). Mortality in vegetarians and non-vegetarians: A collaborative analysis of 8300 deaths among 7600 men and women in five prospective studies. *Public Health Nutrition*, 1, 33-41
26. Kołczak T. (2008). Jakość wołowiny. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 1(56), 5-22
27. Kołodziej-Skalska A., Matysiak B., Grudziński M. (2016). Mięso wieprzowe a zdrowie człowieka. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych. Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika*, 65(4), 535-542
28. Kontogianni M.D., Panagiotakas D.B., Pitsavos C., Chryschoon C., Stefanadis C. (2008). Relationship between meat intake and the development of acute coronary syndroms: The CARDIO 200 case-control study. *European Journal of Clinical Nutrition*., 62, 171-177
29. Kruger C., Zhan Y. (2018). Review. Red meat and colon cancer: A review of mechanistic evidence for heme in the context of risk assessment methodology. *Food and Chemical Toxicology* 118, 131-153
30. Larsson S.C., Orsini N. (2014). Red meat and processed meat consumption and all-cause mortality: a meta-analysis. *An. J. Epidemiol.*, 179, 282-289
31. Lescinsky H., Afshin A., Ashbaugh C., Bisignano C., Brauer M. et al. (2022). Health effects associated with consumption of unprocessed red meat. *Nature Medicine*, 28, 2075-2082
32. Li D., Sinclair A.J., Mann N., Turner A., Ball, Kelly F. et al. (1999). The association of diet and thrombotic risk factors in healthy male vegetarians and meat-eaters. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53, 612-619
33. Linseisen J., Kesse E., Shimani N., Bueno-do Mesquito, Ocke H.B., Skeie M.C (2002). Meat consumption in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts: Results from 24-hour dietary recalls. *Public Health Nutrition*, 5 (6 B), 1243-1258
34. Lippi G., Mattiuzzi C., Carvelli G. (2016). Meat consumption and cancer risk: a critical review of published meta-analyses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 97, 1-14
35. Lisiak D., Grześkowiak E., Borzuta K., Raj S., Janiszewski P., Skiba G. (2013). Effects of supplementary vegetable and animal fat on the slaughter values of fatteners, meat quality and fatty acid profile in pig. *Czech. J. Anim Sci.*, 58(11), 497-511
36. Mann N., Pirota J., O'Connell S.K.D., Kelly F., Sinclair A. (2006). Fatty acid composition of habitual omnivore and vegetarian diets. *Lipids* 41 (7), 637

37. Mc Afee A.J., Mc Sorley E.M., Cuskelly G. J., Moss B.W., Wallace J.M.W., Bonham M.P., Fearon A.M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risk and benefits. *Reviev. Meat Science*, 84, 1-13
38. Micka R., Wallace S.M., Mozaffarin D. (2010). Red and processed meat, consumption and diabetes mellitus, a systematic review and meta-analysis. *Circulation*, 121
39. Mirvish S.S. (1986). Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis and cancer. *Cancer*, 58 (Suppl. 8), 1842-1850
40. Obiedziński M. (2014). Ale dym z tym wędzeniem. *Polityka* 6 (2944), z dn. 04.02.2014, Nauka, s. 68
41. Praca zbiorowa pod red. Pisuli A. i Pospiecha E. (2011). *Mięso – podstawy nauki i technologii*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2011
42. Praca zbiorowa: Konspekty tematów szkoleniowych (1997). Wybrane zagadnienia produkcji kielbas surowo-wędzonych. Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego, Warszawa 9-10 styczeń 1997
43. Riboli E., Hunt K.J., Slimeni N., Ferrari P., Norat T., Fahey M. et al. (2002). European prospective investigation into cancer and nutrition. *Public Health Nutrition*, 5 (6B), 1113-1124
44. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 835/2011 z dnia 19 sierpnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 odnośnie do najwyższych dopuszczalnych poziomów WWA w środkach spożywczych, *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*, L 215/4
45. Russel D., Parnell W., Wilson N. (1999). NZ food: NZ people. Key results of the 1997. National Nutrition Survey. M.O Health
46. Ruxton C.H.S., Reed S.C., Simpson M.J.A., Millington K.J. (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *J. of Hum. Nutr. And Diab.*, 17, 449-459
47. Sajós J. Spożycie mięsa ryzyko nowotworów. www.zywnosc.com.pl/spozycie-miеса-a-ryzyko-nowotworów/źródło: Instytut Żywności i Żywienia
48. Schulz M., Hoffman K., Weikert C., Nothlings U., Schulze M.B., Boeing H. (2008). Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer. The European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Potsdam study (see comment). *British Journal of Nutrition*, 100(5), 942-946

49. Siddiqui R.A., Harvey K.A., Zaloga G.P. (2008). Modulation of enzymatic activities by n-3 polyunsaturated fatty acids to support cardiovascular health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(7), 417-437
50. Sneyol M.J., Cox B. (2020). Do low-fat foods alter risk of colorectal cancer from processed meat. *Public Health*, 183, 138-145
51. Statistical yearbook of the Republic of Poland. Warsaw 2010
52. US Food and Drug Administration, 2003. Evidenace for industry: Food labeling: Trans fatty acids in nutrition labelling, nutrient content claims and health claims
53. Wagemakers J.J., Prynne C., Stephen A.M., Wadsworth M.E.J. (2009). Consumption red or processed meat does not predict risk factors for coronary heart disease: results from a cohort of British adults in 1989 and 1999. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63 (3), 303-311
54. Wajdzik J. (2022). Produkty grillowane w diecie. *Ogólnopolski Informator Masarski*, 8, 324, 26-44
55. Williams P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition and Dietetics*, 64(4), 5113-5119
56. Williamson C.S., Foster R.K., Stenner S.A., Buttriss J.L. (2005). Red meat in the diet. British Nutrition Foundation, *Nutrition Bulletin*, 30, 323-355
57. World Cancer Research Fund. 2007. American Institute for Cancer Research: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer. A global perspective. The Institute. Washington, DC, USA, ISBN: 978-0-9722522-2-5
58. Znamiorska A., Zachora A., Jarzyna M., Rudy M., Duma P. (2011). Benzo(a)piren w wędzonych produktach mięsnych i smalcu. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 66, 1, 137-143

Informacje dla autorów

„Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego” są wydawnictwem ciągłym (kwartalnikiem) publikowanym przez Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy (IBPRS - PIB).

Prace kwalifikowane są do druku na podstawie recenzji. Artykuły powinny być napisane w sposób zwięzły i rzeczowy oraz zgodnie z zasadami pisowni polskiej.

Objętość prac nie powinna przekraczać 15 stron maszynopisu formatu A4. Tekst należy napisać czcionką Times New Roman 12 pkt (tytuł pracy – 14 pkt) z zachowaniem odstępu pomiędzy wierszami 1,5, marginesy 2,5 cm i wcięcia akapitów 0,75 cm i zapisać w formacie Word for Windows 97-2003. Tekst powinien być wyjustowany z numeracją na dole strony. Tabele, rysunki i wykresy należy umieścić w tekście. Tytuły tabel należy umieszczać nad tabelami, a rysunków pod rysunkami. Numeracja powinna odpowiadać chronologii ich pojawiania się w tekście (np. tabela 1, rysunek 1). Skróty jednostek miar i wyniki oznaczeń powinny być zgodne z Międzynarodowym Układem Jednostek SI. Tytuły tabel (nagłówki) i rysunków należy podać w języku polskimi i angielskim (*kursywą*). Kursywą należy wyróżnić: symbole i wielkości fizyczne, jedno- i wieloliterowe skróty wyrazów w indeksach oraz nazwy łacińskie.

W treści cytowane powinny być tylko dokumenty publikowane np.

- [Kowalski 2002]
- [Kowalski, Szewczyk 2003]
- [Kowalski 2002; Szewczyk 2000; Słowik 1999]
- [Kowalski i in. 2004] – jeżeli jest więcej niż dwóch autorów

Nie powinno się jednorazowo cytować więcej niż pięć pozycji literatury.

Układ pracy (wszystkie tytuły wypośrodkowane i wytłuszczone)

TYTUŁ PRACY (14 pkt)

Autorzy (**Imię i Nazwisko**) 12 pkt

Miejsce pracy (nazwa instytucji, adres, e-mail pierwszego autora)

Streszczenie (do 20 wierszy)

Słowa kluczowe (do 6 słów)

TYTUŁ PRACY W J. ANGIELSKIM 12 pkt

Streszczenie w j. angielskim (**Summary**)

Słowa kluczowe w j. angielskim (**Key words**)

WPROWADZENIE lub **WSTĘP**

Tekst uwzględniający podział na ułatwiające lekturę rozdziały i podrozdziały oraz ilustracje graficzne i tabelaryczne.

PIŚMIENNICTWO (spis ułożony alfabetycznie, numerowany) tylko dokumenty publikowane

W przypadku prac doświadczalnych układ powinien zawierać dodatkowo:

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

WYNIKI I DYSKUSJA (wyniki z badań w syntetycznym zestawieniu)

WNIOSKI

Przykłady:

- artykuł z czasopisma
Funk P. (2004). Soki owocowe. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 48, 8-9
- wydawnictwa zwarte
Ball S. (2001). *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*. Warszawa: Medyk Sp. z o.o.
Żywność wygodna i żywność funkcjonalna. (1999). Pr. zbior. pod red. F. Świderskiego. Warszawa: WNT
- rozdział w książce
Brusiło J. (2008). Żywność modyfikowana genetycznie – Ocena etyczna globalnego eksperymentu. W: *Zrównoważone rolnictwo a bezpieczna żywność*. Kraków: PTTŻ
- czasopismo elektroniczne
Komorowska A., Sieliwanowicz B., Mrówka E., Stecka K., Hałasińska A. (2003). Studies on yeast extracts enriched in 5'nucleotides flavour enhancers obtained from spent brewery yeast. *Electr. J. Pol. Agricult. Univ., Biotechnol.*, 6, 1. <http://www.ejpan.media.pl/series/volume6/issue1/biotechnology/index.html>
- materiały z konferencji
Górniak W. (2003). Grupy jakościowe ziarna pszenicy a kierunki jego wykorzystania. W: *Ogólnopolska Konferencja Naukowa – Jakość a wykorzystanie ziarna zbóż*. 15–16 października 2003. Puławy: JUNG [CD-ROM]

Redakcja zastrzega sobie prawo do dokonywania w tekście poprawek redakcyjnych niewpływających na treść merytoryczną artykułu bez porozumienia z Autorami.

Artykuł należy przesłać e-mailem na adres Sekretarza Redakcji.

Redakcja

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława
Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy

ul. Rakowiecka 36,

02-532 Warszawa

Sekretarz – Lila Nabiałek, tel. 22 606 36 99, e-mail: lila.nabialek@ibprs.pl