

POSTĘPY NAUKI I TECHNOLOGII PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO

t. 77 nr 3-4

Warszawa 2023

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 hab. inż. Marek Roszko, prof. IBPRS-PIB

Z-ca Redaktora Naczelnego – dr hab. inż. Marcin Bryła, prof. IBPRS-PIB

Redaktorzy tematyczni: *dr Beata Bartodziejska, dr inż. Katarzyna Kotarska, dr hab. inż. Dariusz Lisiak, prof. IBPRS-PIB, dr inż. Katarzyna Piasecka-Jóźwiak, 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

Recenzenci

<i>dr hab. Lech Adamczak</i>	<i>dr inż. Anna Okoń</i>
<i>dr hab. Lidia Błaszczuk, prof. IGR PAN</i>	<i>dr inż. Sylwia Onacik-Gür</i>
<i>dr hab. Anna Bzducha-Wróbel, prof. SGGW</i>	<i>dr inż. Agnieszka Stelmazczyk-Kusz</i>
<i>dr hab. Grażyna Cacak-Pietrzak</i>	<i>prof. dr hab. Łukasz Stępień</i>
<i>dr hab. Dorota Cais-Sokolińska, prof. UPP</i>	<i>dr inż. Piotr Szymański</i>
<i>dr hab. Marta Chmiel</i>	<i>prof. dr hab. inż. Bożena Waszkiewicz-Robak</i>
<i>dr hab. Bożena Danyluk, prof. UPP</i>	<i>prof. dr hab. Agnieszka Waśkiewicz</i>
<i>dr hab. Małgorzata Gumienna, prof. UPP</i>	<i>dr hab. Magdalena Wirkowska-Wojdyła, prof. SGGW</i>
<i>dr hab. inż. Marek Kieliszek, prof. SGGW</i>	<i>dr inż. Elżbieta Wojtowicz</i>
<i>dr hab. inż. Monika Modzelewska-Kapituła, prof. UWM</i>	

Sekretarz Redakcji

mgr Lila Nabiałek

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

Kolekcja Mikroorganizmów Przemysłowych – fotobakterie izolowane z żywności

Jaroszewska E., Mikołajczuk-Szczyrba A., Bucka-Kolendo J.,
Sokołowska B.5

Ryzyko występowania grzybów pleśniowych i ich wtórnych metabolitów w suplementach diety na bazie pyłku pszczelego

Altn I., Twarużek M. 18

Wpływ składu mieszaniny gazów w opakowaniu MAP na jakość mięsa wieprzowego

Chmiel M., Adamczak L., Pietrzak D., Florowski T., Cegiełka A. 31

Wpływ wysokich cisnień na wybrane wyróżniki jakości marynowanego mięsa wieprzowego

Pietrzak D., Winiarek A., Chmiel M., Adamczak L., Cegiełka A.,
Florowski T. 44

Świadomość konsumencka wybranej grupy studentów wobec napojów energetyzujących

Król J., Brodziak A., Król K. 59

Informacje dla autorów81

CONTENTS

Collection of Industrial Microorganisms Resources – *Photobacterium* isolated from food

Jaroszewska E., Mikołajczuk-Szczyrba A., Bucka-Kolendo J.,
Sokołowska B.5

Risk of ascending molds and their secondary metabolites in bee pollen-based dietary supplements

Ałtyn I., Twarużek M. 18

The effect of the gas mixture composition in the MAP packaging on the quality of pork meat

Chmiel M., Adamczak L., Pietrzak D., Florowski T., Cegiełka A. 31

Effect of high pressure processing on selected quality characteristics of marinated pork

Pietrzak D., Winiarek A., Chmiel M., Adamczak L., Cegiełka A.,
Florowski T. 44

Consumer awareness of a selected group of students towards energy drinks

Król J., Brodziak A., Król K. 59

COLLECTION OF INDUSTRIAL MICROORGANISMS RESOURCES – *PHOTOBACTERIUM* ISOLATED FROM FOOD

Ewelina Jaroszevska, Anna Mikolajczuk-Szczyrba, Joanna Bucka-Kolendo,

Barbara Sokolowska

Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology

State Research Institute

Department of Microbiology

36 Rakowiecka Str., 02-532 Warsaw, Poland

ewelina.jaroszevska@ibprs.pl

Received: 13 October 2023

Revised: 5 February 2024

Accepted: 7 February 2024

Summary

Photobacterium is a genus of gram-negative bacteria in the family *Vibrionaceae*. These bacteria are associated with the marine ecosystem and have been considered to spoil fish meat and cause food poisoning due to their ability to produce biogenic amines. Some species of this genus are bioluminescent. From 2011, scientific reports on the presence of DNA of *Photobacterium* in beef, pork, ostrich, and raw meat products began to appear, regardless of their packaging and storage method. *Photobacterium* was isolated from pork meat by culture method only in 2016. Research indicates that *Photobacterium* contamination is a common problem in fish processing and the meat industry. In our studies, we managed to isolate from salmon samples bioluminescent strains such as *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium kishitani*, and *Aliivibrio logei*/*Aliivibrio salmonicida*. Four strains of *Photobacterium* isolated from seafood were deposited in the IAFB Collection of Industrial Microorganisms.

Keywords: *Photobacterium*, meat spoilage, psychrophilic spoilers, cold-smoked salmon, bioluminescence

KOLEKCJA MIKROORGANIZMÓW PRZEMYSŁOWYCH – FOTOBAKTERIE IZOLOWANE Z ŻYWNOŚCI

Streszczenie

Photobacterium to rodzaj bakterii Gram-ujemnych z rodziny *Vibrionaceae*. Bakterie te są związane z ekosystemem morskim i uważa się, że psują mięso ryb i powodują zatrucia

pokarmowe ze względu na ich zdolność do wytwarzania amin biogennych. Niektóre gatunki tego rodzaju są bioluminescencyjne. Od 2011 roku zaczęły pojawiać się doniesienia naukowe dotyczące obecności DNA *Photobacterium* w produktach z wołowiny, wieprzowiny, strusia i surowego mięsa, niezależnie od sposobu ich pakowania i przechowywania. *Photobacterium* wyizolowano z mięsa wieprzowego metodą hodowlaną dopiero w 2016 roku. Badania wskazują, że zanieczyszczenie *Photobacterium* jest częstym problemem w przetwórstwie rybnym i przemyśle mięsnym. W naszych badaniach udało nam się wyizolować z próbek łososa bioluminescencyjne szczepy, takie jak *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium kishitanii* i *Aliivibrio logei*/*Aliivibrio salmonicida*. Cztery szczepy z rodzaju *Photobacterium* wyizolowane z ryb zdeponowano w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS-PIB.

Słowa kluczowe: fotobakterie, psucie się mięsa, psychrofilne bakterie psujące, łosoś wędzony na zimno, bioluminescencja

INTRODUCTION

The genus *Photobacterium* is a psychrophilic, halophilic, gram-negative, relatively aerobic, motile bacteria of the *Vibrionaceae* family. These bacteria are associated with the marine ecosystem and are found in coastal waters, open oceans, and deep seas. They occur as free-living organisms, symbiotic, or even pathogenic to marine organisms [Urbańczyk et al., 2011]. The genus *Photobacterium* attracts the attention of researchers due to its ability to bioluminescence and the mechanisms of pathogenesis that some species exhibit.

The genus currently includes 49 species and 6 subspecies, according to www.bacterio.net (accessed on 30.08.2023). Among known species are fish and seafood spoiling strains (*P. phosphoreum* and *P. iliopiscarium*), pathogens (e.g. *P. damsela*), symbionts (e.g. *P. kishitanii*), and free-living bacteria (e.g. *P. angustum*) [Labella et al., 2017; Urbańczyk et al., 2011]. Species such as *P. rosenbergii*, *P. jeanii*, *P. sanctipauli*, and two subspecies of *P. damsela* are reported to be pathogens of corals, sponges, fish, and warm-blooded animals. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (Pdd) is an opportunistic human pathogen that can cause severe wound infections. There are also fatal cases due to sepsis or rapidly progressive necrotizing fasciitis. Human infections by *P. damsela* subsp. *damsela* result from exposure of subcutaneous tissue to the marine environment or wounds inflicted during fish handling. The main virulence factors are cytotoxins with hemolytic activity: damselizine (Dly) and phobalysin P (PhlyP) [Rivas et al., 2013; Rivas et al., 2015; Schröttner et al., 2020; Caddia et

al., 2022].

Some species of the genus *Photobacterium* exhibit the phenomenon of bioluminescence. It is defined as the ability of living organisms to emit visible light using natural chemical reactions. Representatives of luminescent species are, e.g. *P. phosphoreum*, *P. kishitanii*, *P. leiognathi*, *P. mandapamensis*, *P. aquimaris*, *P. angustum* (some strains) and *P. damsela* (some strains) [Musa Moi et al., 2017].

On the molecular level, bioluminescence is enabled by a cascade of chemical reactions catalyzed by enzymes encoded by the *lux* operon with the gene order *luxCDABEG*, whose expression ensures the production of all elements necessary for the emission of visible light without the need to supply substrates from the outside [Brodli, et al. 2018; Pajor, 2017]. The *luxA* and *luxB* genes encode the enzyme luciferase's α - and β - subunits, respectively. *LuxC*, *luxD*, and *luxE* constitute the fatty acid reductase complex, responsible for synthesizing the long-chain aldehyde substrate, and *luxG* encodes a flavin reductase. In bacteria, the heterodimeric luciferase catalyzes the monooxygenation of long-chain aliphatic aldehydes to the corresponding acids utilizing reduced FMN and molecular oxygen. The energy released as a photon results from an excited state flavin-4a-hydroxide, emitting light of length around 490 nm [Brodli et al., 2018; Musa Moi et al., 2017; Pajor et al., 2017] (Diagram 1.).

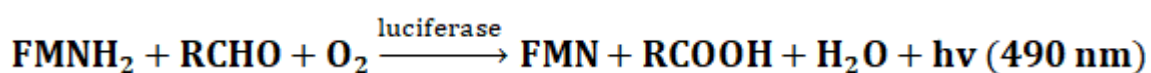


Diagram 1. Bacterial bioluminescence reaction scheme
Schemat reakcji bakteryjnej bioluminescencji

Photobacterium are regarded as microorganisms that spoil the meat of fish [Dalgaard et al., 1997; Ast et al., 2005] and also may cause food poisoning due to their ability to produce biogenic amines, i.e., histamine, putrescine, cadapelin, agmatine, and tyramine [Jørgensen et al., 2000; Lehane and Olley, 2000; Takahashi et al., 2015; Fuertes-Perez et al., 2019]. For example *P. damsela* subsp. *piscicida* (Pdp) is the causative agent of fish photobacteriosis, a bacterial disease affecting economically important marine fish species. But latest research indicates that *Photobacterium* contamination is a common problem not only in fish processing but also in the meat industry.

Implementing molecular biology methods for food research contributes to a better understanding of the diversity of microorganisms in food, including those that cause its spoilage. The results of such research are scientific reports that reveal the presence of

Photobacterium genetic material not only in fish meat [Olofsson et al., 2007; Macé et al., 2012; Chaillou et al., 2015] but also in beef [Pennacchia et al., 2011; Stoops et al., 2015] and pork [Nieminen et al., 2016] regardless of the method of its storage (vacuum packaging, modified atmosphere packaging, tray packaging). In recent years, there have been further reports of the presence of *Photobacterium* genetic material in raw French pork sausages [Bouju-Albert et al., 2018], pork meat [Li et al., 2019], chicken meat [Hilgarth et al., 2018a, Dourou et al., 2021] in Italian sausages dry-fermented with natural extracts [Pini et al., 2020] and vacuum-packed ostrich meat [Juszczuk-Kubiak et al., 2021].

Photobacterium was for the first time isolated by culture method in 2016 from modified atmosphere packaged pork [Nieminen et al., 2016]. These bacteria produce odorous compounds such as acetoin, diacetyl, and 3-methyl-1-butanol, among other substances that cause the unpleasant smell of stale meat [Nieminen et al., 2016].

In 2018, Hilgarth et al. isolated a new species of *Photobacterium carnosum* from rotten poultry meat packaged in a modified atmosphere that had not been isolated from the marine environment. Numerous scientific reports have indicate that *Photobacterium* contamination as prevalent and well-known issue within the seafood industry [Eissa et al., 2018; Labella et al., 2017; Reynisson, et al. 2009]. However, in recent years, *Photobacterium* infection has escalated into a significant concern not only within the realm of fish processing, but also within the meat industry [Fuertes-Perez et al., 2021; Fuertes-Perez et al., 2019; Hilgarth et al., 2018b] regardless of the type of meat and the packaging method. The above studies indicate that *Photobacterium* has yet to be underestimated in its importance in meat spoilage processes. The methodological limitations, along with the challenges associated with isolating new and previously unknown microorganisms, have posed enduring difficulties for technologists and scientists. This lack of awareness regarding the presence of these bacteria in meat persisted for an extended period. Common food quality control and quality methods based on standard media and cultivation at temperatures ranging from 25°C to 37°C made it impossible to isolate psychrophilic *Photobacterium* bacteria [Fuertes-Peres et al., 2019]. The development of modern technologies (molecular biology methods), especially next-generation sequencing (NGS), and their application to food research revealed the presence of *Photobacterium* DNA in pork, beef, poultry meat, and seafood regardless of the packaging and storage methods. Therefore, it seems very important to support classical microbiological methods with novel technologies that can provide new, meaningful information on the presence of undesirable microorganisms and change the approach to their detection in food. Knowledge about the origin and biodiversity of *Photobacterium* found in food products,

especially meat, is very limited (it seems unlikely that these bacteria are autochthonous members of the animal gut microbiome, given the psychrophilic nature of these organisms and their inability to grow at temperatures $>25^{\circ}\text{C}$). The source of the contamination has not yet been identified, but it is believed to be in a common area where meat is slaughtered, processed, or packaged [Fuertes-Peres et al., 2019].

This study aimed to try to isolate *Photobacterium* by culture method from food samples in which the presence of their DNA was previously found using next-generation sequencing (NGS) [Bucka-Kolendo et al., 2022; Bucka-Kolendo et al., 2022a; Bucka-Kolendo et al., 2022b; Jaroszewska et al., 2022, Juszczuk-Kubiak et al., 2021].

MATERIALS AND METHODS

Samples of vacuum-packed ostrich fillets and steaks, as well as raw salmon packed in a modified atmosphere and vacuum-packed smoked salmon, were subjected to examination. Samples of ostrich fillets and steaks in a frozen state were stored at -20°C and analysed in IV quarter of 2019. Samples of raw and smoked salmon were stored under refrigerated conditions at 5°C and analysed in I quarter of 2022.

Classical method for isolation of psychrophilic and halophilic bacteria

Briefly, for the isolation of *Photobacterium*, Marine Agar (Difco) with the addition of meat extract and vancomycin was used [Hilgarth et al., 2018a]. After 5-days incubation at 15°C , colonies were randomly selected, isolated and cultured on Marine Agar for the assessment of bioluminescence and subsequent identification. Identification was carried out using MALDI-TOF MS and 16S rDNA sequencing. Bacteria DNA isolation was performed as described by Juszczuk-Kubiak et al. (2021).

Molecular identification

Bacterial identification was carried out by analyzing the sequence of a fragment of the 16S rDNA gene, including the following steps. DNA isolation from 24 h culture using the DNAeasy® PowerFood® Microbial Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). DNA purity and concentration were checked using UV-Vis NanoDrop 1000 3.8.1 spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). Amplification of a fragment of the 16S rDNA gene using primers 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 16SR (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3'). The reaction mixture contained 20 μl DreamTaq PCR Master Mix (ThermoScientific, Waltham, MA, USA), 1 μl of each primer at a final concentration of 4 μM , 10-20 ng DNA, water to obtain a final volume of 40 μl .

PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 40 denaturation cycles at 94°C for 30 seconds, hybridization at 51°C for 35 seconds, elongation at 72°C for 1 minute and 40 seconds, and final elongation at 72°C for 2 minutes. The amplification process was conducted using the SimpliAmp™ Thermal Cycler camera model A24812 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Electrophoresis was performed in 1.5% agarose gel at 120 V for 45 minutes in 1xTAE buffer (Tris-Acetate-EDTA buffer). The gel was stained with 6 µl SimplySafe (EURx, Gdańsk, Poland) to visualize DNA fragments under the influence of UV radiation. Documentation of the gel was conducted using GeneSnap version 6.08 (SynGene). PCR sequencing was performed using the Genetic Analyzer model 3730 Applied Biosystems™ (Genomed, Warsaw, Poland).

The resulting sequences were assembled using Serial Cloner and compared with the NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) database.

The sequence alignment and phylogenetic tree were performed using the MEGA X program. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method and the Tamura-Nei model.

A 24-hour culture of microorganisms on a solid medium was subjected to identification with MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry). Briefly, samples were analyzed by the Direct Smear plus Formic Acid (On-Target) method, using the α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (α -CHCA) matrix according to the manufacturer's instruction. Mass spectrometry was measured on MALDI-TOF MS (AXIMA iD Plus Confidence, Shimadzu Corporation). *E. coli* DH5 α was used as a standard for mass calibration. The identification was made by comparing the mass spectrum of the sample against SuperSpectrum in the SARAMIS database.

RESULTS AND DISCUSSION

In our previous studies, *Photobacterium* was found using Next Generation Sequencing (NGS) to be the dominant microbiota in samples of ostrich fillets and steaks vacuum-packed and stored for 14 days, and their contribution to the total pool of bacteria present in the product ranged from 47.2% to 91.8%, depending on the production batch [Juszczuk-Kubiak et al., 2021].

In the first step of the analysis, frozen samples of ostrich meat elements were used to isolate *Photobacterium* by culture methods. The abundance of psychrophilic and halophilic bacteria, including presumed *Photobacterium*, obtained after cultures of the tested samples

on Marine Agar was approximately 7 log CFU/g. However, as other authors suggest [Dourou et al., 2021; Dourou et al., 2023], this medium needs to be more selective for *Photobacterium*. In this case (frozen ostrich samples), the detection of *Photobacterium* was impeded. This was confirmed by Fuertes-Perez S. et al. (2019) observations, who stated that the *Photobacterium* does not survive the food-freezing process. Emborg et al. (2002) and Dalgaard et al. (2006) reported that deep-freezing reduces the number of *Photobacterium* below the detection limit for culture methods.



Figure 1. Bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* KKP 3845 on Marine Agar medium
Bioluminescencja Photobacterium phosphoreum KKP 3845 na podłożu Marine Agar

In the second step, NGS studies showed *Photobacterium* DNA in samples of raw salmon fillets packaged in a modified atmosphere, cold-smoked and vacuum-packed salmon. In samples of raw salmon fillets packaged in a modified atmosphere and stored for 6 days, *Photobacterium* accounted for 90.7-95.8% of the total identified bacteria [Bucka-Kolendo et al., 2022, 2022a]. *Photobacterium*'s share of the total bacterial pool identified in cold-smoked and vacuum-packaged salmon ranged from 2.8% to 45.1% after 33 days of storage [Bucka-Kolendo et al., 2022b].

Salmon samples also were used to isolate *Photobacterium* by culture methods. The abundance of psychrophilic and halophilic bacteria, including presumed *Photobacterium*, obtained after cultures of the tested samples on Marine Agar was approximately 7 log CFU/g. Bioluminescent isolates were identified by 16S rDNA sequencing. Based on the 16S rDNA

identification, most sequences have been assigned to *Photobacterium phosphoreum* (Fig. 1.), *Photobacterium kishitanii* and *Aliivibrio logei*/*Aliivibrio salmonicida*. At the same time, MALDI-TOF MS identified isolates not bioluminescent as *Serratia*, *Pseudomonas*, *Brochotrix*, and occasionally *Acinetobacter* [Jaroszevska et al., 2022].

Isolated strains of the *Photobacterium* genus were deposited in the Culture Collection of Industrial Microorganisms - Microbiological Resource Center, Department of Microbiology, Institute of Agricultural and Food Biotechnology - State Research Institute (IAFB) (Tab 1.).

Table 1. Strains of the genus *Photobacterium* from the IAFB
Szczepki z rodzaju *Photobacterium* z IBPRS-PIB

Genus	Collection no.	The source of isolation
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	KKP 3845	Raw salmon fillets
<i>Photobacterium kishitanii</i> / <i>Photobacterium phosphoreum</i>	KKP 3847	Cold smoked salmon
<i>Photobacterium kishitanii</i> / <i>Photobacterium phosphoreum</i>	KKP 3848	Cold smoked salmon
<i>Photobacterium kishitanii</i> / <i>Photobacterium phosphoreum</i>	KKP 3850	Cold smoked salmon

Based on the 16S rDNA sequences, the phylogenetic analysis was performed to investigate the alignment between the studied and other closely related strains (*Vibrio casei* and *Aliivibrio logei*) from the Culture Collection of Industrial Microorganisms - Microbiological Resource Center (KKP) and NCBI (National Center for Biotechnology Information) database.

The initial tree for the heuristic search was obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Tamura-Nei model and then selecting the topology with a superior log likelihood value. This analysis involved 21 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. There were a total of 1680 positions in the final dataset. The tree with the highest log likelihood (-6159.80) is shown (Fig. 2). The results confirmed that the isolated *Photobacterium* belongs to the *Photobacterium phosphoreum* and *Photobacterium kishitanii*, respectively, and represents high homogeneity.

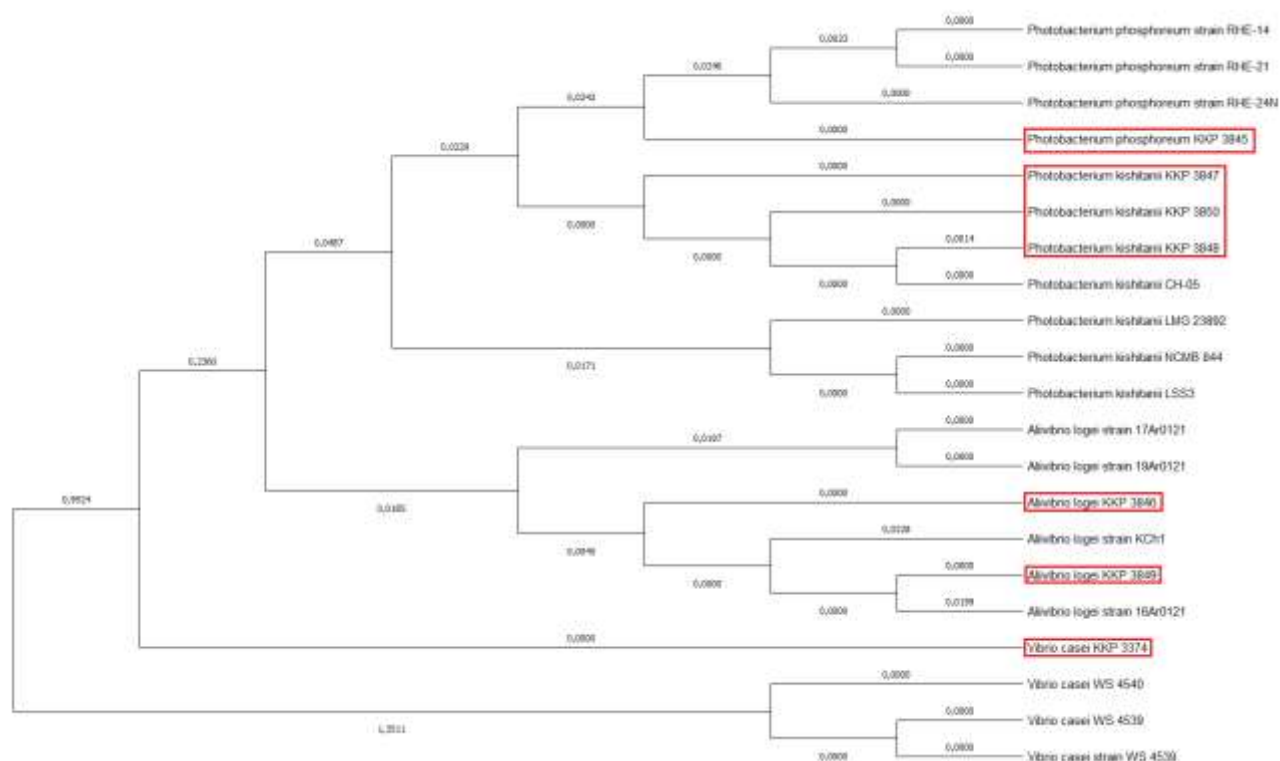


Figure 2. The phylogenetic tree built based on sequence analysis of the 16S rDNA gene, representing the evolutionary relationships of the taxa tested. In red squares, strains belonging to KKP

Drzewo filogenetyczne zbudowane na podstawie analizy sekwencji genu 16S rDNA, obrazujące pokrewieństwa ewolucyjne badanych taksonów. W czerwonych kwadratach szczepy należące do KKP

CONCLUSIONS

This study aimed to try to isolate *Photobacterium* by culture method from food samples in which the presence of their DNA was previously found using next-generation sequencing. In our studies, we managed to isolate from salmon samples bioluminescent strains such as *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium kishitani* and *Aliivibrio logei*/*Aliivibrio salmonicida*. In frozen ostrich samples, the detection of *Photobacterium* was impeded because deep-freezing probably reduces the amount of *Photobacterium* below the detection limit for culture methods. This and our previous studies [Juszczuk-Kubiak et al., 2021, Bucka-Koledo et al., 2022b] demonstrates that the *Photobacterium* spp. in raw and cold-smoked salmon and raw ostrich meat is a widespread issue linked with the seafood but also meat industry.

REFERENCES

1. Ast J.C., Dunlap P.V. (2005). Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the *Photobacterium phosphoreum* species group. *Environmental Microbiology*, 7, 1641-16454
2. Bouju-Albert A., Pilet M.F., Guillou S. (2018). Influence of lactate and acetate removal on the microbiota of french fresh pork sausages. *Food Microbiol.*, 76, 328–336
3. Brodl E., Winkler A., Macheroux P. (2018). Molecular Mechanisms of bacterial bioluminescence. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 16, 551-564
4. Bucka-Kolendo J., Średnicka P., Porębska I., Sokołowska B. (2022). Bacterial communities on raw salmon fillets packed in a modified atmosphere assessed by cultural method and by Next-Generation Sequencing. *FoodMicro 2022*. Ateny, 08.2022 - poster
5. Bucka-Kolendo J., Średnicka P., Porębska I., Sokołowska B. (2022a). Mikrobiota surowych filetów z łososia pakowanych w zmodyfikowanej atmosferze - ocena metodami hodowlanymi i sekwencjonowania nowej generacji. *Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów*. Warszawa 15-17.09.2022 – poster
6. Bucka-Kolendo J., Średnicka P., Porębska I., Sokołowska B. (2022b). Mikrobiota wędzonego na zimno i pakowanego próżniowo łososia przechowywanego w różnych temperaturach - porównanie metod hodowlanych i sekwencjonowania nowej generacji. *Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów*. Warszawa 15-17.09.2022 – research brief
7. Caddia G., Casu M.A., Dettori S., Urru R., Paglietti B. (2022). Wound infection caused by *Photobacterium damsela* in a man in Sardinia (the first case in Italy): a case report and review of literature. *Infect. Dis. Trop. Med.* 8, e796
8. Chaillou S., Chaulot-Talmon A., Caekebeke H., Cardinal M., Christieans S., Denis C., H'el'ene Desmonts, M., Dousset X., Feurer C., Hamon E., Joffraud J.-J., La Carbona S., Leroi F., Leroy S., Lorre S., Mac'e S., Pilet M.-F., Pr'evost H., Rivollier M., Roux D., Talon R., Zagorec M., Champomier-Verg'es M.-C. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *ISME J.* 9, 1105–1118. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.202>
9. Dalgaard P., Mejlholm O., Christiansen T., Huss H.H. (1997). Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere-packed fish products. *Letters in Applied Microbiology* 24, 373-378
10. Dourou D., Spyrelli E.D., Doulgeraki A.I., Argyri A.A., Grounta A., Nychas G.-J.E., Chorianopoulos N.G., Tassou, C.C. (2021). Microbiota of Chicken Breast and Thigh

- Fillets Stored under Different Refrigeration Temperatures Assessed by Next-Generation Sequencing. *Foods*, 10, 765. <https://doi.org/10.3390/foods10040765>
11. Eissa I.A.M., Derwa H.I., Ismail M., El-Lamie M., Dessouki A.A., Elsheshtawy H., Bayoumy E.M. (2018). Molecular and phenotypic characterization of *Photobacterium damsela* among some marine fishes in Lake Tamsah. *Microb. Pathog.*, 114, 315 - 322 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.006>
 12. Fuertes-Perez S., Hauschild P., Hilgarth M., Vogel R.F. (2019). Biodiversity of *Photobacterium* spp. Isolated From Meats. *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2019.02399
 13. Fuertes-Perez S., Vogel R.V., Hilgarth M. (2021). Comparative genomics of *Photobacterium* species from terrestrial and marine habitats. *Curr. Res. Microb. Sci.*, 2, 100087. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100087>
 14. Hilgarth M., Fuertes S., Ehrmann M., Vogel R.F. (2018a). *Photobacterium carnosum* sp. nov., isolated from spoiled modified atmosphere packaged poultry meat. *Systematic and Applied Microbiology* 41, 44-50
 15. Hilgarth M., Fuertes-Pérez S., Ehrmann M., Vogel R.F. (2018). An adapted isolation procedure reveals *Photobacterium* spp. as common spoilers on modified atmosphere packaged meats. *Lett. Appl. Microbiol.*, 66(4), 262-267. DOI: 10.1111/lam.12860
 16. Jaroszewska E., Mikołajczuk-Szczyrba A., Dekowska A., Bucka-Kolendo J., Porębska I., Sokołowska B. (2022). *Photobacterium* - bioluminescencyjne bakterie pochodzenia morskiego - występowanie w żywności. Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Warszawa 15-17.09.2022 – research brief
 17. Jørgensen L.V., Dalgaard P., Huss H.H. (2000). Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2448–2453
 18. Juszczuk-Kubiak E., Dekowska A., Sokołowska B., Połaska M., Lendzion K. (2021). Evaluation of the spoilage-related bacterial profiles of vacuum-packaged chilled ostrich meat by next-generation DNA sequencing approach. *Processes*, 9, 803. <https://doi.org/10.3390/pr9050803>
 19. Labella A.M., Arahal D.R., Castro D., Lemos M.L., and Borrego J.J. (2017). Revisiting the genus *Photobacterium*: taxonomy, ecology and pathogenesis. *Int. Microbiol.*, 20, 1–10. doi: 10.2436/20.1501.01.280
 20. Lehane L., Olley J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiol.*, 58, 1–37

21. Li N., Zhang Y., Wu Q., Gu Q., Chen M., Zhang Y., Sun X., Zhang J. (2019). High-throughput sequencing analysis of bacterial community composition and quality characteristics in refrigerated pork during storage. *Food Microbiol.*, 83, 86–94
22. Macé S., Cornet J., Chevalier F., Cardinal M., Pilet M-F., Dousset, X., Joffraud, J.-J. (2012). Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. *Food Microbiol.*, 30, 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.013>
23. Moi M.I., Roslan N.N., Leow A.T.C., Ali A.S.M., Rahman R.N.Z.R.A., Rahimpour A., Sabri S. (2017). The biology and the importance of *Photobacterium* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101(11), 4371-4385 doi: 10.1007/s00253-017-8300-y
24. Nieminen T.T., Dalgaard P., Björkroth J. (2016). Volatile organic compounds and *Photobacterium phosphoreum* associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged raw pork. *Int. J. Food Microbiol.*, 218, 86–95
25. Olofsson T.C. Ahrné S., Molin G. (2007). The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7°C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 109–119 doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03216.x
26. Pajor K., Sypniewski D., Bednarek I. (2017). Bioluminescencja jako narzędzie w biologii molekularnej. *Post. Hig. Med. Doświad.*, 71, 1033-1049
27. Parte, A.C. (2018). LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 68, 1825–1829. doi: 10.1099/ijsem.0.002786
28. Pennacchia C., Ercolini D., Villani F. (2011). Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiol.*, 28, 84-93
29. Pini F., Aquilani C., Giovannetti L., Viti C., Pugliese C. (2020). Characterization of the microbial community composition in Italian Cinta Senese sausages dry-fermented with natural extracts as alternatives to sodium nitrite. *Food Microbiol.*, 89, 103417
30. Reynisson E., Lauzon H.L., Magnússon H., Jónsdóttir R., Ólafsdóttir G., Marteinsson V., Hreggviðsson G.Ó. (2009). Bacterial composition and succession during storage of North-Atlantic cod (*Gadus morhua*) at superchilled temperatures. *BMC Microbiology*, 9, 250. doi:10.1186/1471-2180-9-250

31. Rivas A.J., Manuel L., Osorio L. and C.R. (2013). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in microbiology*, 4, 283. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00283
32. Rivas A.J., von Hoven G., Neukirch C., Meyenburg M., Qin Q., Füser S., Boller K., Lemos M.L., Osorio C.R., Hausmann M. (2015). Phobalysin, a small β -pore-forming toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infect. Immun.*, 83 (11, 4335-4348. DOI: 10.1128/IAI.00277-15
33. Schröttner P., Tille E., Lück C., Bunk B. (2020). Wound infection caused by *Photobacterium damsela* in a 32-year-old woman: case report and review of the literature. *GMS Infectious Diseases*, 8, ISSN 2195-8831
34. Stoops J., Ruyters S., Busschaert P., Spaepen R., Verreth C., Claes J., Lievens B., Van Campenhout I. (2015). Bacterial community dynamics during cold storage of minced meat packaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives. *Food Microbiol.*, 48, 192-199
35. Takahashi H., Ogai M., Miya S., Kuda T., Kimura, B. (2015). Effects of environmental factors on histamine production in the psychrophilic histamine-producing bacterium *Photobacterium iliopiscarium*. *Food Control*, 52, 39–42
36. Urbańczyk H., Ast J.C., Dunlap P.V. (2011). Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *FEMS Microbiological Reviews*, 35, 324-342

RYZIKO WYSTĘPOWANIA GRZYBÓW PLEŚNIOWYCH I ICH WTÓRNYCH METABOLITÓW W SUPLEMENTACH DIETY NA BAZIE PYŁKU PSZCZELEGO

Iwona Altyn, Magdalena Twarużek

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego
Wydział Nauk Biologicznych
Katedra Fizjologii i Toksykologii
ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz

iwonaalt@ukw.edu.pl

Otrzymano: 31 stycznia 2024

Poprawiono: 25 marca 2024

Zaakceptowano: 26 marca 2024

Streszczenie

W 2022 roku system RASFF opublikował dane, które wskazują, że podobnie jak w latach ubiegłych, mykotoksyny były trzecią najczęściej zgłaszaną kategorią zagrożeń (485 zgłoszeń, co oznacza wzrost o 10,5% w porównaniu do 2021 r.). Właściwości toksyczne tych związków stanowią problem ogólnoswiatowy, który wpływa na agrobiznes w wielu krajach, globalizację handlu żywnością, ograniczenie produkcji zwierzęcej i rolnej, a przede wszystkim na zdrowie ludzi. Pyłek pszczeli jest produktem naturalnym, popularnym ze względu na swoje właściwości odżywcze i lecznicze. Jednak, ze względu na znikome informacje na temat stopnia jego zanieczyszczenia niebezpiecznymi substancjami, jakość tego produktu pszczelarskiego staje pod znakiem zapytania. Szczególnie, obecność mykotoksyn może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów pyłku pszczelego, w którym nie obowiązują żadne ograniczenia prawne. Na potrzeby pracy sformułowano hipotezę badawczą, która brzmi: konsumenci stosujący suplementację diety na bazie pyłku pszczelego są narażeni na toksyczne działanie grzybów pleśniowych i mykotoksyn, obecnych w tych produktach. Materiał badawczy stanowiło 38 próbek, które przebadano pod kątem obecności grzybów pleśniowych i mykotoksyn. Pleśnie i drożdże oznaczono metodą posiewową, natomiast oznaczanie mykotoksyn przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej HPLC-FLD oraz HPLC-MS/MS. Analiza mykologiczna wykazała porażenie grzybami pleśniowymi na poziomie 95%, natomiast 34% przebadanego materiału była zanieczyszczona mykotoksynami. Wyniki potwierdziły obecność pleśni w materiale badawczym, a także ich wtórnych metabolitów. Użycie niskiej jakości surowca może przyczynić się do wzrostu

toksycznych grzybów i wytwarzaniu mykotoksyn podczas procesów technologicznych. Dlatego w oparciu o nasze wyniki zaleca się, aby producenci tych suplementów diety uwzględnili analizę grzybów pleśniowych i mykotoksyn w kontroli jakości produktów.

Słowa kluczowe: zanieczyszczenie, grzyby pleśniowe, mykotoksyny, pyłek pszczele, suplementy diety

RISK OF ASCENDING MOLDS AND THEIR SECONDARY METABOLITES IN BEE POLLEN-BASED DIETARY SUPPLEMENTS

Summary

In 2022, the RASFF system published data showing that, as in previous years, mycotoxins were the third most frequently reported hazard category (485 reports, an increase of 10.5% compared to 2021). The toxic properties of these compounds constitute a global problem that affects agrobusiness in many countries, the globalization of food trade, reduced animal and agricultural production, and, above all, human health. Bee pollen is a natural product, popular for its nutritional and healing properties. However, due to scant information on the degree of its contamination with hazardous substances, the quality of this beekeeping product is questionable. In particular, the presence of mycotoxins may pose a health risk to consumers, and for which there are no legal restrictions in bee pollen. For the purposes of this work, a research hypothesis was formulated: consumers who use dietary supplements based on bee pollen are exposed to the toxic effects of molds and mycotoxins present in these products. The research material consisted of 38 samples, which were examined for the presence of mold fungi and mycotoxins. Molds and yeasts were determined using the seeding method, while mycotoxins were determined using HPLC-FLD and HPLC-MS/MS liquid chromatography methods. Mycological analysis showed a 95% infection with mold, while 34% of the tested material was contaminated with mycotoxins. The results confirmed the presence of molds in the test material, as well as their secondary metabolites. The use of low-quality raw material can contribute to the growth of toxic fungi and the production of mycotoxins during processing. Therefore, based on our results, it is recommended that manufacturers of these dietary supplements include analysis of molds and mycotoxins in product quality control.

Keywords: contamination, molds, mycotoxins, bee pollen, dietary supplements

WSTĘP

Produkty pszczelarskie, takie jak pyłek były stosowane od wieków jako produkty spożywcze, jak i również w medycynie tradycyjnej, ze względu na swoje wartości odżywcze (Kroyer i Hegedus, 2001). Obecnie wykorzystywane są w terapii naturalnej, tj. apiterapii w celach leczniczych oraz prewencyjnych, a także zyskuje na popularności ze względu na swoje potencjalne zastosowanie jako pasza i suplement dla bydła (Carrera i in., 2023). Szereg pierwotnych i wtórnych metabolitów zawartych w pyłku pszczelim wykazuje szerokie spektrum właściwości i bioaktywności, m.in. przeciwutleniających (Aličić i in., 2014; Morais i in., 2011), przeciwzapalnych (Maruyama i in., 2010), przeciwrakotwórczych (Furusawa i in., 1995), przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych (Pascoal i in., 2014), hepatoprotekcyjnych i przeciwmiażdżycowych (Eraslan i in., 2009, Salles i in., 2014). Badania wykazały, że flawonoidy obecne w pyłku pszczelim są zdolne do inaktywacji elektrofilów i usuwania wolnych rodników, co zapobiega mutagenności (Pascoal i in., 2014). Innym mechanizmem działania tego produktu na funkcje komórek, jest zdolność do modyfikowania szlaków sygnałowych komórek, w tym hamowania proliferacji (Richardson i in., 2000). Wykazano także, pozytywny wpływ tego produktu na usunięcie obrzęków pochodzenia sercowo-naczyniowego i nerkowego (Yakusheva, 2010).

Odpowiednia jakość, zarówno surowców jak i produktów końcowych, stanowi podstawę zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów. Ryzyko jakie niosą ze sobą środki spożywcze związane jest z różnego rodzaju zanieczyszczeniami pochodzenia naturalnego, takimi jak grzyby pleśniowe i ich wtórne metabolity - mykotoksyny, których obecność pomimo stosowania zasad GAP i GMP, jest nieunikniona (Végh i in., 2021). Właściwości toksyczne mykotoksyn stanowią problem ogólnoswiatowy, który wpływa na agrobiznes w wielu krajach, globalizację handlu żywnością, ograniczenie produkcji zwierzęcej i rolnej, a przede wszystkim na zdrowie ludzi. Spowodowało to ustanowienie prawnych limitów maksymalnych poziomów mykotoksyn w paszy i żywności, w wielu krajach (FDA, 2023). Niestety, suplementy diety na bazie pyłku pszczelego zostały wyłączone z tego schematu decyzyjnego, ponieważ spożycie tego produktu przez konsumentów jest ogólnie uważane za znikome (KE, 2018). Campos i in. (2008) na podstawie swoich badań, zaproponowali poziomy maksymalne AFB1 (2 µg/kg) i całkowitej liczby aflatoksyn (4 µg/kg) w pyłku pszczelim, jednakże propozycja ta nigdy nie została powszechnie zaakceptowana. Spożywanie produktu zanieczyszczonego mykotoksynami, takimi jak aflatoksyny (AF), ochratoksyna A (OTA), deoksyniwalenol (DON), toksyny T-2 i HT-2, zearalenon (ZEN), może powodować zmiany w układzie immunologicznym, powodować astmę i inne choroby układu

oddechowego, a także uszkodzić nerki i ośrodkowy układ nerwowy oraz niekorzystnie wpływać na gospodarkę hormonalną. W związku z powyższym, mykotoksyny wykazują działanie antagonistyczne wobec właściwości prozdrowotnych pyłku pszczelego. Ich obecność w suplementach diety na bazie tego surowca, może powodować nie tylko spadek wartości odżywczych produktu a przede wszystkim wywołać działanie niepożądane na organizm.

Szybki rozwój wysoko selektywnych metod analitycznych, w tym stosowanie techniki LC-MS/MS, umożliwia wykrywanie mykotoksyn w śladowych ilościach. Oszacowanie stopnia występowania mykotoksyn w suplementach diety, stanowi poważne wyzwanie dla ośrodków naukowych, z powodu braku uregulowań w prawodawstwie UE, dotyczących ich poziomów, braku pełnych informacji o związkach pochodzenia naturalnego czy ich właściwościach fizykochemicznych. W związku z powyższym tematyka pracy związana jest z identyfikacją mykologicznego i mykotoksykologicznego zagrożenia, opartą na wysoko selektywnych technikach analitycznych. Na potrzeby pracy sformułowano hipotezę badawczą, która brzmi: konsumenci stosujący suplementacje diety na bazie pyłku pszczelego są narażeni na toksyczne działanie grzybów pleśniowych i mykotoksyn, obecnych w tych produktach.

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiły suplementy diety na bazie pyłku pszczelego. Na potrzeby badań zostało zakupionych 38 produktów ze sklepów stacjonarnych oraz działających online, na terenie Polski. Suplementy diety występowały w różnych formach przetworzenia - granulki, płyn, kapsułki, tabletki (Rys. 1).



Rysunek 1 Materiał do badań
Study material

Aparatura, odczynniki i wzorce

Aparatura i sprzęt wykorzystywany do badań: homogenizator mikrobiologiczny typu Stomacher (BagMixer 400, Interscience, Francja), inkubator laboratoryjny ILW 240 STD, mikroskop (Leica DM750), pipety automatyczne Transferpette® (10-100, 100-1000, 500-5000 µl) (Brand), płytki Petriego, sterylne woreczki do homogenizowania typu

Stomacher, Thermomix TM31 (Vorwerk), chromatograf cieczowy Shimadzu Nexera z detektorem masowym 5500 QTRAP (Sciex, USA), chromatograf cieczowy Shimadzu Nexera z detektorem masowym API4000 (Sciex, USA), chromatograf cieczowy Merck-Hitachi z detektorem fluorescencyjnym, dejonizator wody Elix 3 (Milipore), filtry strzykawkowe 0,22 µm PTFE (Merck, Niemcy), homogenizatory nożowe z wyposażeniem i zestawem noży (Heidolph, Niemcy), kolumna Bond Elut Mycotoxin (Agilent, USA), kolumna chromatograficzna Gemini-NX-C18 (150x4,6 mm, 3 µm) z przedkolumną (Phenomenex, USA), kolumna immunopowinowactwa Aflatest (Vicam), kolumna immunopowinowactwa Ochraprep (R-Biopharm), kolumna chromatograficzna Lichrospher® 100 RP-18 (250x4 mm, 5 µm) z przedkolumną, kolumna chromatograficzna Synergi Polar C18 (150x2 mm, 4 µm) z przedkolumną (Phenomenex, USA), komora do wykonywania ekstrakcji za pomocą techniki SPE (J.T. Baker), system oczyszczania wody Simplicity 185 (Milipore), waga techniczna Adventurer Pro (Ohaus), wirówka laboratoryjna Multifuge 3 L-R (Heraeus), wytrząsarka Promax 1020 (Heidolph), zestaw do odparowywania próbek w strumieniu azotu Reacti-vaptm (Thermo Scientific).

Odczynniki wykorzystywane w czasie prowadzonych badań: acetonitryl czystość gradientowa do chromatografii cieczowej LiChrosolv® (Merck), acetonitryl do chromatografii cieczowej (LC/MS) LiChrosolv® (Merck), chlorek sodu (Merck), kwas azotowy V (Merck), kwas octowy (Merck), kwas octowy lodowaty, czysty (Merck), metanol czystość gradientowa do chromatografii cieczowej LiChrosolv® (Merck), metanol do chromatografii cieczowej (LC/MS) LiChrosolv® (Merck), sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS, R-Biopharm), woda dejonizowana z urządzenia do produkcji ultraczystej wody Simplicity 185 (Millipore, USA), wodorotlenek sodu, czysty (Merck).

Wzorce firmy Biopure wykorzystywane podczas analiz: aflatoksyna B1 (AF B1), aflatoksyna B2 (AF B2), aflatoksyna G1 (AF G1), aflatoksyna G2 (AF G2), deoksyniwalenol (DON), diacetoksyscirpenol (DAS), monoacetoksyscirpenol (MAS), niwalenol (NIV), ochratoksyna A (OTA), toksyna T-2 i HT-2, zearalenon (ZEN), znakowane izotopowo wzorce wewnętrzne (13C-DON, 13C-HT-2, 13C-T2, 13C-PAT, 13C-ZEN).

Metody badań

Analiza mykologiczna

Materiał do badań został zmielony w warunkach jałowych, w przypadku kapsułek analizie poddano tylko substancję czynną, bez zewnętrznej otoczki. Następnie 20 g próbki

odważono do sterylnych woreczków do homogenizatora typu Stomacher, a następnie dodano 180 ml jałowego płynu fizjologicznego (stosunek 1:10), zgodnie z Polską normą PN-R-87028:1996 (składniki: enzymatyczny hydrolizat kazeiny - 1 g, chlorek sodu - 8,5 g, woda destylowana - 1000 ml, pH $7,0 \pm 0,2$). Przygotowaną zawiesinę homogenizowano przez 90 s w homogenizatorze mikrobiologicznym typu Stomacher. Wykonano serię rozcieńczeń dziesięciokrotnych w jałowym płynie do rozcieńczeń, z których wykonano posiew powierzchniowy wg Kocha (PN-ISO 7954: wrzesień 1999) na podłożu agarowym YGC (ekstrakt drożdżowy, glukoza z dodatkiem 100 ppm chloramfenikolu, pH 6,6) z modyfikacją własną - posiew na płytkę posiewową 1 ml i 0,1 ml materiału badawczego, w trzech powtórzeniach. Płytki poddano inkubacji w $25 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 5-7 dni. Do analizy ilościowej wykorzystano wszystkie płytki z 10-100 koloniami. Grzyby anamorficzne odróżniono od drożdży na podstawie ich mikroskopowej morfologii i rodzaju zarodnikowania. Wyniki wyrażono jako liczbę jednostek tworzących kolonię na 1 g próbki (jtk/g).

Analiza jakościowa obejmowała określenie składu grzybów pleśniowych badanego materiału. Z wyrosłych kolonii wykonano preparaty mikroskopowe w glicerolu i laktofenolu wg Amanna, zgodnie z Polską Normą PN R-64791: 1994 (laktofenol Ammana: krystaliczny fenol - 10 g, kwas mlekowy - 10 g, gliceryna - 20 g, woda destylowana - 10 ml, błękit metylenowy - 0,5 g na 100 ml laktofenolu).

Analiza mykotoksykologiczna

Aflatoksyny

25 g zmielonej próbki umieszczono w 100 ml kolbie stożkowej, dodano 2,5 g soli fizjologicznej NaCl i homogenizowano z 50 ml MeOH:H₂O (8:2 v/v) przez 1 minutę, a następnie przefiltrowano na karbowanej bibule filtracyjnej. 10 ml supernatantu rozcieńczono w 40 ml H₂O destylowanej, a uzyskaną mieszaninę przesączono przy użyciu sączka drobnowłóknistego do cylindra miarowego. 10 ml rozcieńczonego ekstraktu naniesiono na kolumnę powinowactwa immunologicznego AflaTestTM, z szybkością przepływu 1-2 kropli/sekundę. Następnie kolumnę wysuszono powietrzem, przemyto 20 ml H₂O destylowanej i ponownie wysuszono powietrzem. AF eluowano przy użyciu 1 ml MeOH. Eluat zebrano do fiolki o pojemności 5 ml, dodano 1 ml oczyszczonej H₂O i następnie próbkę wytrząsano.

Ochratoksyna A

12,5 g zmielonej próbki umieszczono w 100 ml kolbie stożkowej, homogenizowano z 50 ml ACN:H₂O (6:4 v/v) przez 2 minuty i przefiltrowano na karbowanej bibule filtracyjnej.

5 ml przesączonego supernatantu dodano do 55 ml roztworu PBS i przesączono przy użyciu sączka drobnowłóknistego do cylindra miarowego. 48 ml rozcieńczonego ekstraktu (odpowiadającego 1 g próbki) naniesiono na kolumnę Ochraprep®, z szybkością przepływu 1-2 kropli/sekundę. Następnie kolumnę wysuszone powietrzem, przemyto 20 ml H₂O destylowanej i ponownie wysuszone powietrzem. OTA eluowano przy użyciu 1,5 ml roztworu MeOH:CH₃COOH (98:2). Eluat zebrano do fiolki o pojemności 5 ml, przepuszczono przez kolumnę 1,5 ml oczyszczonej H₂O i próbkę wytrząsano.

Trichoteceny i Zearalenon

12,5 g zmielonej próbki umieszczono w 100 ml kolbie stożkowej, homogenizowano z 50 ml ACN:H₂O (8:2 v/v) przez 3 minuty, a następnie przefiltrowano na karbowanej bibule filtracyjnej. Do fiolki o pojemności 10 ml dodano 4 ml ekstraktu, a następnie 40 µl ¹³C-ZEN (C=1,00 µg/ml), wytrząsano i naniesiono na kolumnę BondElute® Mycotoxin. 2 ml oczyszczonego ekstraktu zmieszano z 50 µl roztworu wzorca wewnętrznego (¹³C-DON c = 2,50 µg/ml, ¹³C-T2 c = 0,25 µg/ml i ¹³C-HT2 c = 0,25 µg/ml) i odparowano do sucha w temperaturze 50°C pod strumieniem azotu. Pozostałość rozpuszczono w 0,495 ml mieszaniny MeOH:H₂O (2:8 v/v) i następnie wytrząsano przez 1 min.

Analiza chromatograficzna

Aflatoksyny

Aflatoksyny oznaczono ilościowo za pomocą detekcji fluorescencji HPLC. Objętość wtrysku wynosiła 50 µl. Izokratyczna faza ruchoma obejmowała ACN (20%), MeOH (20%) i H₂O (60%), 119 mg KBr i 100 µl 65% HNO₃. Stężenie mykotoksyny określono przy szybkości przepływu 1 ml/min. Długości fal wzbudzenia i emisji dla detektora fluorescencji wynosiły odpowiednio 362 nm i 425 nm. Czas retencji dla AF wynosił 3,5 minuty.

Ochratoksyna A

Ochratoksynę A oznaczono ilościowo za pomocą detekcji fluorescencji HPLC. Objętość wtrysku wynosiła 50 µl. Izokratyczna faza ruchoma obejmowała ACN (70%) i 2% CH₃COOH (30%). Stężenie mykotoksyny określono przy szybkości przepływu 1 ml/min, a objętość wstrzyknięcia wynosiła 50 µl. Długość fal wzbudzenia i emisji dla detektora fluorescencji wynosiły odpowiednio 330 nm i 460 nm. Czas retencji dla OTA wynosił 3,5 minuty.

Trichoteceny i Zearalenon

Trichoteceny i Zearalenon oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją tandemowej spektrometrii mas MS/MS. Obie fazy mobilne A – 1%

CH₃COOH w H₂O i B - 1% CH₃COOH w MeOH- zawierały 5 mM CH₃COONH₄. Elucję z 70% fazy ruchomej A utrzymywano przez 0,5 minuty; następnie zastosowano gradient liniowy, osiągając 90% fazy ruchomej B po 5,5 min, prowadzony izokratycznie przez 4 min, a następnie pobrany z powrotem do 70% fazy ruchomej A, która została utrzymana do końca biegu na poziomie 15,0 min. Przepływ szybkości ustawiono na 0,5 ml / min, a objętość wstrzyknięcia wynosiła 7 µl. Wykonano spektrometrię mas przy użyciu API 4000. Interfejs jonizacji przez elektrorozpylanie (ESI) był używany w trybach jonów ujemnych i dodatnich w temperaturze 500°C z następującymi ustawieniami: gaz kurtyny 25 psi, gaz nebulizatora 50 psi, gaz pomocniczy 50 psi, gaz kolizyjny 6, napięcie jonizacji –4000 lub +4500 V.

Parametry walidacyjne dla poszczególnych mikotoksyn zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry walidacyjne dla wybranych mykotoksyn
Validation parameters for selected mycotoxins

Material do badań	Parametry walidacji	DON	NIV	3ADON	MAS	DAS	T2	HT2	ZEN	OTA	AF
Suplementy diety na bazie pyłku pszczelego	LOQ [µg/kg]	3	3	3	1,5	1	0,6	2	0,2	0,4	0,2
	LOD [µg/kg]	1	1	1	0,5	0,3	0,2	0,7	0,07	0,13	0,06
	Odzysk [%]	87	83	92	102	102	92	95	100	110	108

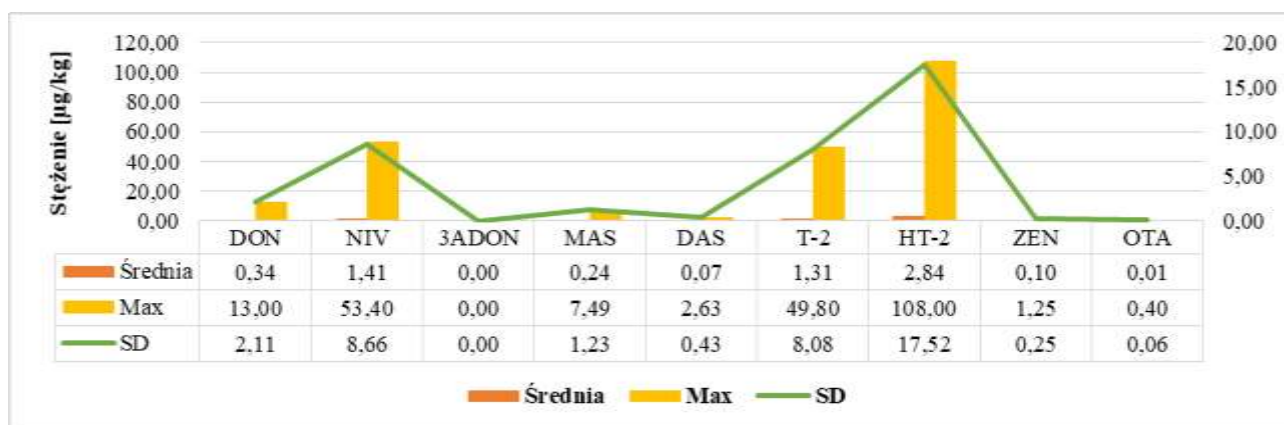
WYNIKI I DYSKUSJA

Analizie zostało poddanych 38 próbek suplementów diety na bazie pyłku pszczelego, z czego 95% zanieczyszczone grzybami pleśniowymi, a 34% wtórnymi metabolitami pleśni. Z badanego materiału najczęstszymi rodzajami jakie zostały zidentyfikowane były *Cladosporium* (43%) i *Alternaria* (27%). *Mucor* spp. i *Penicillium* spp. zanieczyściło, odpowiednio 14% i 10% suplementów diety, podobnie jak w przypadku wyników badań Sinkevičienė i in. (2021). Średnia liczba grzybów w próbkach suplementów diety na bazie pyłku pszczelego wynosiła $2,2 \times 10^4$ jtk/g, natomiast średnia liczba drożdży w próbkach mieściła się w $1,4 \times 10^4$ jtk/g (Tab. 2). Podobne wyniki w swoich badaniach otrzymali Nardoni i in. (2016), którzy analizowali pyłek pszczeli pod kątem obecności grzybów pleśniowych. Wyniki wykazały obecność rodzajów *Cladosporium*, *Alternaria*, *Humicola*, *Acremonium* oraz *Penicillium*. Natomiast, González i in. (2005), w badanym materiale, wyizolowali drożdże i *Penicillium* spp., które były dominującymi grzybami. Kačániová i in. (2011) w swoich badaniach wykazali, że najczęstszymi izolatami grzybów pleśniowych obecnych w próbkach pyłku pszczelego były *Mucor mucedo* (49 izolatów), *Alternaria*

alternata (40 izolatów), *Mucor hiemalis* (40 izolatów), *Aspergillus fumigatus* (33 izolaty) i *Cladosporium cladosporioides* (31 izolatów). W badaniach własnych, w grupie najczęściej występujących mykotoksyn były ZEN (34%) i MAS (5%). Stężenia maksymalne ZEN i MAS wynosiły odpowiednio 1,25 µg/kg i 7,49 µg/kg. 3% badanego materiału było zanieczyszczone DON, NIV, DAS, T-2 i OTA. Analizowany materiał wolny był od AF (Rys. 2).

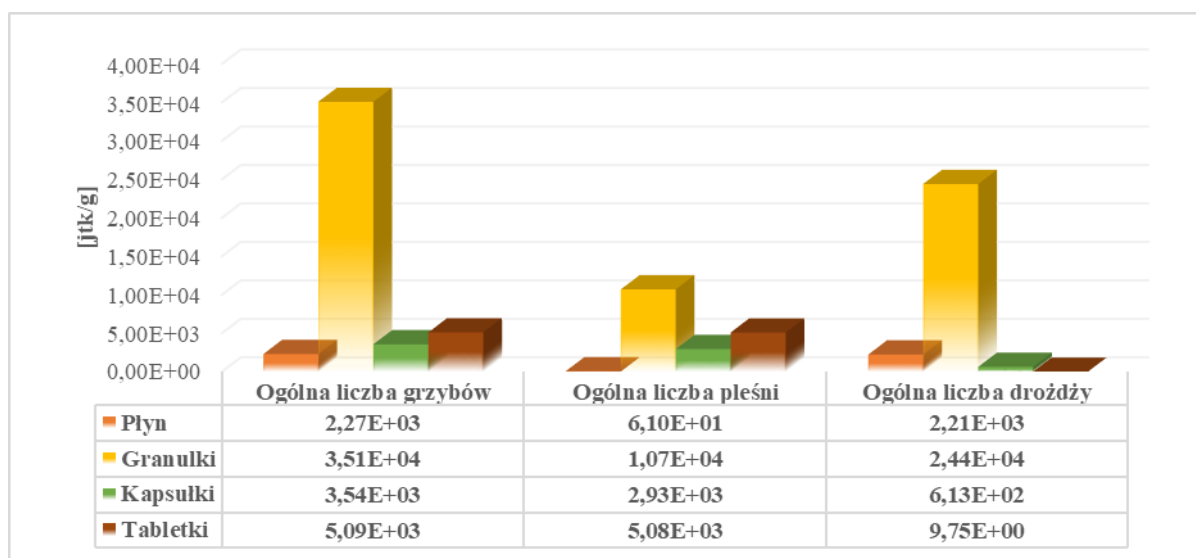
Tabela 2. Ogólna liczba grzybów w badanym materiale
Total number of fungi in the tested material

	Ogólna liczba grzybów [jtk/g]	Ogólna liczba pleśni [jtk/g]	Ogólna liczba drożdży [jtk/g]
Średnia	2,2 x 10 ⁴ (22750,26 K)	7,7 x 10 ³ (7775,55 K)	1,4 x 10 ⁴ (14974,71 K)
Próbki pozytywne	36	36	34
Procent pozytywnych próbek	95	95	89



Rysunek 2. Stężenia mykotoksyn w suplementach diety na bazie pyłku pszczelego
Concentrations of mycotoxins in bee pollen-based dietary supplements

Dodatkowo, zakupiony materiał podzielono pod kątem jego formy przetworzenia, na 4 grupy: granulki (n=23), kapsułki (n=10), tabletki (n= 4), płyn (n=1). Forma kapsułki była wolna od zanieczyszczeń, pozostałe formy suplementów diety były w 100% zanieczyszczone grzybami pleśniowymi (Rys. 3). Natomiast, w przypadku występowania mykotoksyn w badanym materiale, to kapsułki były najbardziej skażone (60%), a płyn był wolny od skażenia tymi związkami (Tab. 3) .



Rysunek 3. Średnie wartości grzybów w próbkach
Average values of fungi in the samples

Tabela 3. Stężenia mykotoksyn w poszczególnych formach suplementów diety na bazie pyłku pszczelego
Concentrations of mycotoxins in different forms of bee pollen-based dietary supplements

Formy	Stężenia	DON	NIV	MAS	DAS	T2	HT2	ZEN	OTA
Granulki (n=23)	Średnia [µg/kg]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Max [µg/kg]	0	0	0	0	0	0	0,2	0
	Próbki pozytywne	0	0	0	0	0	0	5	0
	Procent próbek pozytywnych [%]	0	0	0	0	0	0	22	0
Kapsułki (n=10)	Średnia [µg/kg]	1,30	5,34	0,90	0,26	4,98	10,80	0,29	0,04
	Max [µg/kg]	13	53,4	7,49	2,63	49,8	108	1,25	0,4
	Próbki pozytywne	1	1	2	1	1	1	6	1
	Procent próbek pozytywnych [%]	10	10	20	10	10	10	60	10
Tabletki (n=4)	Średnia [µg/kg]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	Max [µg/kg]	0	0	0	0	0	0	0,2	0
	Próbki pozytywne	0	0	0	0	0	0	2	0
	Procent próbek pozytywnych [%]	0	0	0	0	0	0	50	0

González i in. (2005), badali potencjalną zdolność do wytwarzania OTA i aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂, przez hodowanie izolatów *in vitro*, a następnie analizę tych mykotoksyn w ekstraktach hodowlanych metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną. Stwierdzono, że odpowiednio 100%, 53,3%, 33,3% i 25% izolatów *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *P. verrucosum* i *A. niger* wytwarzało OTA. Ponadto 28,6% izolatów z grupy *A. flavus* plus *A. parasiticus* było zdolnych do wytwarzania aflatoksyny B₁. Aflatoksynę B₂ wykryto tylko w 10% kultur. W badaniach własnych badany materiał był wolny od AF, co zostało również

potwierdzone w pracach innych autorów (Garcia-Villanova i in., 2004; González i in., 2005; Pitta i in., 2010; Valadares i in., 2015). OTA w prowadzonych badaniach była oznaczona na niskim poziomie, bądź też materiał wolny był od tej toksyny, co również potwierdza niską zawartość OTA (7%) w badaniach własnych (Keskin i Eyupoglu, 2023; Xue i in., 2014; Garcia-Villanova i in., 2004). Dodatkowo potwierdzono obecność toksyn DON i T-2 w piętnastu próbkach pyłku z Hiszpanii, ale zawartość tych mykotoksyn była poniżej granicy wykrywalności zastosowanej metody GC/MS (Rodríguez-Carasco i in., 2013). W tym samym badaniu autorzy zbadali obecność kilku innych mykotoksyn, wytwarzanych przez rodzaj *Fusarium*: 3AcDON, DAS, NIV i toksynę HT-2. Stwierdzono, że część próbek była zanieczyszczona NIV, natomiast wszystkie inne badane toksyny były poniżej granicy wykrywalności.

WNIOSKI

Zwiększająca się popularność suplementów diety na bazie roślin skłania producentów do pozyskiwania coraz to nowszych źródeł surowców, które przyciągnęłyby nowych konsumentów. Porażenie zarodnikami grzybów pleśniowych, produktów spożywczych może przyczynić się nie tylko do znacznych strat ekonomicznych, ale przede wszystkim do zagrożenia zdrowia konsumentów. Wysoki procent skażenia suplementów diety grzybami pleśniowymi i ich wtórnymi metabolitami, może świadczyć zarówno o złej jakości surowca, jak i produktu końcowego. Obecnie, kit pszczeli (propolis), pyłek oraz pierzga pszczela, produkty uboczne w przemyśle pszczelarskim, stają się produktami wysoce pożądanymi wśród konsumentów, ze względu na swoje prozdrowotne właściwości. Otrzymane wyniki badań, mykologicznych i mykotoksykologicznych, suplementów diety, uświadamiają konsumentów, że produkt ten nie jest lekiem i może być zanieczyszczony niebezpiecznymi substancjami. Świadomy konsument daje przedsiębiorcom możliwość ciągłego rozwoju rynku przemysłowego, podnoszenia jakości, higieny i bezpieczeństwa żywności, działając zgodnie z maksymą Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności – EFSA.

Dodatkowo, na bazie tych danych przedsiębiorcy mogą opracować zalecenia i wytyczne dobrej praktyki higieny oraz kierunki zmian w zakresie norm handlowych i badawczych stosowanych w odniesieniu do poszczególnych grup suplementów diety.

PIŚMIENNICTWO

1. Aličić D., Šubarić D., Jašić M., Pašalić H., Ačkar D. 2014. Antioxidant properties of pollen. *Hrana u zdravlju i bolesti*, 3(1): 6-12

2. Campos M.G.R., Bogdanov S., Bicudo de Almeida-Muradian L., Szczesna T., Mancebo Y., Frigerio, C., Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47 (2): 154-161
3. Carrera M.A., Miguel E., Fernández-Alba A.R., Hernando M.D. 2023. First survey on the presence of mycotoxins in commercial bee pollen sourced from 28 countries. *Food Control*, 152, 109816
4. Eraslan G., Kanbur M., Silici S. 2009. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: the ameliorative effect of bee pollen. *Food and Chemical Toxicology* 47: 86-91
5. FDA, 2023. FDA Chemical, metals, natural toxins & pesticides guidance documents & regulations, <https://www.fda.gov/food/guidance-documents-regulatory-information-topic-food-and-dietary-supplements/chemical-metals-natural-toxins-pesticides-guidance-documents-regulations>
6. Garcia-Villanova R.J., Cordon C., González Paramás A.M., Aparicio P., & Garcia Rosales M.E. 2004. Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(24): 7235-7239
7. González G., Hinojo M.J., Mateo R., Medina A., Jiménez M. 2005. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology* 105.1: 1-9
8. Kačániová M., Juráček M., Chlebo R., Kňazovická V., Kadasi-Horáková M., Kunová S., Lejková J., Haščík P., Mareček J., Šimko M. 2011. Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(7), 623-629
9. Keskin E., Eyupoglu O.E. 2023. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-MS/MS and health risk assessment of the mycotoxins in bee products of Turkey. *Food Chemistry*, 400, 134086
10. Kroyer G., Hegedus N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(3), 171-174
11. Maruyama H., Sakamoto T., Araki Y., Hara H. 2010. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 10: 30

12. Morais M., Moreira L., Feás X., Estevinho L.M., 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and anti-microbial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49:1096–1101
13. Nardoni S., D’Ascenzi C., Rocchigiani G., Moretti V., Mancianti F. 2016. Occurrence of moulds from bee pollen in Central Italy – A preliminary study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 23 (1): 103–105
14. Pascoal A., Rodrigues S., Teixeira A., Feás X., Estevinho L.M., 2014. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63:233–239
15. Pitta M., Markaki P. 2010. Study of aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus* in bee pollen of Greek origin. *Mycotoxin Research*, 26: 229–234
16. Rodríguez-Carasco Y., Font G., Mañes J., Berrada H. 2013. Determination of mycotoxins in bee pollen by gas chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 1999–2005
17. Salles J., Cardinault N., Patrac V., Berry A., Giraudet C., Collin M.L., Chanet A., Tagliaferri C., Denis P., Pouyet C., Boirie Y., Walrand S. 2014. Bee pollen improves muscle protein and energy metabolism in malnourished old rats through interfering with the Mtor signaling pathway and mitochondrial activity. *Nutrient’s* 6:5500–5516
18. Sinkevičienė J., Burbulis N., Baliukonienė V. 2021. The influence of storage conditions on bee pollen contamination by microscopic fungi and their mycotoxins. *Zemdirbyste-Agriculture*, 108 (2): 159-164
19. Valadares-Deveza M., Keller K.M., Lorenzon A.M.C., Nunes T.L.M., Sales O.E., Barth O.M. 2015. Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46: 1171–1176
20. Végh R., Csóka M., Sörös C., Sipos L. 2021. Food safety hazards of bee pollen – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 114: 490-509
21. Xue X., Selvaraj J.N., Zhao L., Dong H., Liu F., Liu Y., Li Y. 2014. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin a in bee pollen by low-temperature fat precipitation and immunoaffinity column cleanup coupled with LC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 7: 690–696
22. Yakusheva E. 2010. Pollen and bee bread: Physico-chemical properties. Biological and pharmacological effects. Use in medical practice, in *Theoretical and Practical Basics of Apitherapy*, pod red. Rakita D., Krivtsov N., Uzbekova D.G., Ryazan R., Russia, pp. 84-9

WPLYW SKŁADU MIESZANINY GAZÓW W OPAKOWANIU MAP NA JAKOŚĆ MIĘSA WIEPRZOWEGO

Marta Chmiel, Lech Adamczak, Dorota Pietrzak, Tomasz Florowski, Agata Cegielka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Żywności
Katedra Technologii i Oceny Żywności
Zakład Technologii Mięsa
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

marta_chmiel@sggw.edu.pl

Otrzymano: 9 stycznia 2024

Poprawiono: 24 stycznia 2024

Zaakceptowano: 25 stycznia 2024

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu składu mieszaniny gazów w opakowaniu MAP (80% O₂ i 20% CO₂, 70% O₂ i 30% CO₂ oraz 60% O₂ i 40% CO₂ oraz 50% O₂ i 50% CO₂) na jakość mięsa wieprzowego. Ocenę jakości mięsa przeprowadzano co 3 dni, do 12 dnia przechowywania. Wykonano pomiary zawartości O₂ i CO₂ w opakowaniach MAP, oznaczono ilość wycieku do opakowania, dokonano pomiaru pH oraz składowych barwy L*, a* i b*, oznaczono wartość wskaźnika TBA badanego surowca.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono istotny ($p \leq 0,05$) wpływ składu mieszaniny gazów MAP wartości wskaźnika TBA badanego mięsa wieprzowego oraz jasność barwy (składowa barwy L*). W 12 dniu przechowywania mięso pakowane w MAP 80/20 charakteryzowało się istotnie ($p \leq 0,05$) wyższą wartością wskaźnika TBA (0,9 mg MDA/kg produktu) w stosunku do mięsa pakowanego w MAP 50/50 (0,5 mg MDA/kg produktu). Stwierdzono także istotny wpływ czasu przechowywania na ilość wycieku do opakowania, pH, wartości wskaźnika TBA oraz składowe barwy L*, a* i b* mięsa niezależnie od składu mieszaniny gazów w opakowaniu MAP.

Słowa kluczowe: wieprzowina, modyfikowana atmosfera, jakość mięsa

THE EFFECT OF THE GAS MIXTURE COMPOSITION IN THE MAP PACKAGING ON THE QUALITY OF PORK MEAT

Summary

The aim of the study was to determine the effect of the gas mixture composition in the

MAP packages (80% O₂ and 20% CO₂, 70% O₂ and 30% CO₂ and 60% O₂ and 40% CO₂ and 50% O₂ and 50% CO₂) on the quality of pork meat. The quality of meat was evaluated every 3 days, until the 12th day of storage. The O₂ and CO₂ content in MAP packages, drip loss, pH, L*, a* and b* color components, and TBA index value of raw material were determined.

Based on the obtained results, a significant ($p \leq 0.05$) effect of gas mixture composition on the TBA index values and the lightness (L* color component) of pork meat was found. On the 12th day of storage, meat packed in MAP 80/20 was characterized by a significantly ($p \leq 0.05$) higher TBA index value (0.9 mg MDA/kg product) compared to meat packed in MAP 50/50 (0.5 mg MDA/kg of product). A significant effect of storage time on the amount of drip loss, pH, TBA index values and L*, a* and b* color components of meat was also found, regardless of the composition of the gas mixture in the MAP packaging.

Keywords: pork, modified atmosphere, meat quality

WSTĘP

Konsumenci dokonują wyboru mięsa głównie na podstawie takich cech ocenianych wzrokowo jak barwa i marmurkowatość oraz obecność wycieku w opakowaniu [Peng i in. 2019]. Na ich podstawie, a szczególnie barwy mięsa, konsumenci określają świeżość i jakość nabywanego surowca. Jednym z ostatnich etapów produkcji mięsa, na którym w pewien sposób może być jeszcze kształtowana jego jakość jest etap pakowania [McMillin 2017, Lund i in. 2007]. Opakowanie nie tylko powinno odpowiednio ekspozycjonować zapakowany produkt, ale także chronić go przed uszkodzeniami mechanicznymi oraz wydłużać jego termin przydatności do spożycia przy zachowaniu jak najwyższej jakości [Ripoll i in. 2013].

W celu wydłużenia trwałości i zahamowania niekorzystnych zmian zachodzących w mięsie podczas przechowywania producenci stosują różne metody pakowania, a najpopularniejsze z nich to pakowanie w atmosferze modyfikowanej (ang. Modified Atmosphere Packaging – MAP) lub próżniowe (ang. Vacuum Packaging – VP) [Wang i in. 2019, McMillin 2017, McMillin 2008]. W opakowaniach z modyfikowaną atmosferą powietrze zastępowane jest mieszaniną gazów, o odpowiednio dobranym składzie [Bingol, Ergun 2011]. Najczęściej stosuje się tlen, dwutlenek węgla i azot, a każdy z nich pełni określoną funkcję. W zależności od rodzaju pakowanego produktu stosowane są różne mieszaniny gazów, w różnych kombinacjach i proporcjach. W przemyśle mięsnym do pakowania w MAP mięsa czerwonego najczęściej stosowana jest mieszanina gazów składająca się z 80% O₂ i 20% CO₂ [Rossaint i in. 2015, McMillin 2008]. Wysoka zawartość

tlenu w opakowaniu MAP powoduje, że mięso charakteryzuje się atrakcyjną dla konsumenta różowo-czerwoną barwą [Zouaghi, Cantalejo 2016, Lorenzo, Gómez 2012]. Z drugiej strony wysoka zawartość tego gazu w atmosferze otaczającej produkt może powodować utlenianie lipidów, wywołując w ten sposób negatywne zmiany smaku i zapachu, podczas gdy barwa mięsa jest nadal pożądana [Li i in. 2022]. W badaniach podjęto próbę określenia wpływu składu mieszaniny gazów w opakowaniu MAP na jakość mięsa wieprzowego przechowywanego przez 12 dni w warunkach chłodniczych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań i układ doświadczeń

Materiał do badań stanowiło mięso wieprzowe – szynka wieprzowa bez skóry i kości pozyskane w warunkach przemysłowych. Badania wykonano w 3 seriach doświadczalnych na surowcu pozyskanym z 3 różnych partii produkcyjnych. W każdej serii wykorzystano 5 szynek o masie około 2 kg, które pocięto na plastry o masie około 200 g. Losowo wybrane plastry surowca pakowano w modyfikowanej atmosferze (MAP) w czterech różnych mieszaninach gazów (80% O₂ i 20% CO₂ – MAP 80/20, 70% O₂ i 30% CO₂ – MAP 70/30, 60% O₂ i 40% CO₂ – MAP 60/40 oraz 50% O₂ i 50% CO₂ – MAP 50/50). W tym celu plastry mięsa układano na sztywnych tackach (187×137×63 mm) wykonanych z PET (politereftalan etylenu), a na każdej tacce przed ułożeniem mięsa umieszczano celulozowy wkład, którego rolą było pochłonięcie wycieku powstającego z surowca w czasie przechowywania. Opakowania z mięsem wypełniano odpowiednią mieszaniną gazów, przy zastosowaniu maszyny pakującej typu „tray - sealer” Multivac T250 firmy Multivac Sp. z o.o. wyposażonej w mikser gazów MAP Mix 9001 ME - 3/200B firmy Mocon Europe A/S, a następnie zamykano poprzez zgrzanie tacek z folią górną (OPALEN B62). W każdej z 3 serii eksperymentalnych przygotowano po 5 opakowań każdego z wariantów MAP. Łącznie przygotowano po 15 opakowań MAP 80/20, MAP 70/30, MAP 60/40 oraz MAP 50/50. Zapakowany surowiec przechowywano w warunkach chłodniczych (0-4°C), bez dostępu światła przez 12 dni. Ocenę jakości mięsa wieprzowego przeprowadzano bezpośrednio przed pakowaniem (dzień 0) oraz po 3, 6, 9 i 12 dniach przechowywania. W dniu 0, po zapakowaniu surowca oznaczono wyjściową zawartość gazów w opakowaniach MAP wypełnionych poszczególnymi mieszaninami gazów, przy użyciu analizatora gazów CheckMate 3 firmy Mocon Europe A/S. Skład mieszanin gazów oznaczano także w każdym dniu analiz. W poszczególnych dniach analiz losowo wybierano po 1 opakowaniu z mięsem każdego z wariantów MAP. Ocena jakości mięsa obejmowała oznaczenie ilości wycieku do

opakowania, pomiar pH i składowych barwy L^* , a^* i b^* , a po rozdrobnieniu surowca w wilku laboratoryjnym przy użyciu siatki o średnicy oczek 3 mm oznaczenie wartości wskaźnika TBA.

Metody badawcze

Pomiar zawartości gazów w opakowaniach MAP

Pomiar zawartości O_2 i CO_2 w opakowaniach MAP wykonano poprzez wbicie do opakowania igły analizatora gazów CheckMate 3 firmy Mocon Europe A/S. Dokładność analizatora wynosiła 0,01% dla tlenu oraz 0,8% dla dwutlenku węgla.

Oznaczenie ilości wycieku do opakowania

Mięso wieprzowe ważono po pokrojeniu na plastry. Następnie po określonych czasach przechowywania ponownie ważono. Ilość wycieku do opakowania obliczano w stosunku do masy przed pakowaniem i wyrażano w %.

Pomiar pH

Pomiar pH mięsa wykonywano pH-metrem firmy Testo (model testo 206) poprzez wbicie elektrody urządzenia bezpośrednio w badany surowiec. Przed wykonaniem pomiarów pH-metr kalibrowano w buforach o pH 4 i 7. Oznaczenie wykonywano w 2 powtórzeniach na plastrze mięsa, przyjmując średnią za wynik oznaczenia.

Pomiar składowych barwy L^* , a^* i b^*

Pomiaru składowych barwy L^* , a^* i b^* dokonywano metodą odbiciową kolorymetrem Konica Minolta model CR400 (wielkość otworu głowicy pomiarowej 8 mm, iluminant D65, obserwator 10°). Kolorymetr kalibrowano na wzorcu bieli (Y: 95,5; x: 0,3159; y: 0,3326). Pomiary wykonywano w różnych miejscach na powierzchni mięsa w 3 powtórzeniach, przyjmując średnią za wynik oznaczenia.

Oznaczenie wartości wskaźnika TBA

Oznaczenie przeprowadzano zgodnie z metodyką przedstawioną przez Shahidi [1990]. Do pomiaru absorbancji wykorzystywano spektrofotometr CampSpec M501 (CampSpec Ltd., Leeds, Wielka Brytania), przy długości fali 532 nm wobec próby odczynnikowej zawierającej 5 ml TBA (kwasu 2-tiobarbiturowego) i 5 ml 10% TCA (kwasu trichlorooctowego). Otrzymany wynik absorbancji mnożono przez współczynnik przeliczeniowy wynoszący 2,34. Wynik wyrażano w mg MDA/kg produktu. Oznaczenie wykonywano w 2 powtórzeniach, przyjmując średnią za wynik oznaczenia.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano w programie STATISTICA 13PL (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (One - Way ANOVA) oraz test szczegółowy Tukey'a HSD dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$. Określono wpływ składu mieszaniny gazów w opakowaniu MAP oraz wpływ czasu przechowywania na wybrane wyróżniki jakości mięsa wieprzowego.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zmiany w zawartości O_2 i CO_2 w opakowaniach MAP z badanym mięsem wieprzowym zaprezentowano w Tabeli 1. Jak zakładano, zawartość O_2 w opakowaniach MAP 80/20 była istotnie ($p \leq 0,05$) najwyższa, a w opakowaniach MAP 50/50 istotnie najniższa. Z kolei zawartość CO_2 w opakowaniach MAP 80/20 była istotnie ($p \leq 0,05$) najniższa, a w opakowaniach MAP 50/50 istotnie najwyższa. Różnice te utrzymywały się do ostatniego dnia przechowywania surowca.

Istotny ($p \leq 0,05$) wpływ czasu przechowywania na zawartość O_2 w opakowaniach MAP stwierdzono tylko w przypadku wypełnienia ich mieszaniną gazów 80% O_2 i 20% CO_2 (MAP 80/20) oraz 70% O_2 i 30% CO_2 (MAP 70/30). Wraz z wydłużeniem czasu przechowywania badanego mięsa wieprzowego pakowanego w MAP 80/20 lub MAP 70/30 obserwowano systematyczne obniżanie się zawartości O_2 w opakowaniach. Istotne obniżenie zawartości O_2 w opakowaniach MAP 80/20 i MAP 70/30, w porównaniu z dniem 0 stwierdzono już w 3 dniu, natomiast najniższą zawartość tego gazu obserwowano w ostatnim, tj. 12 dniu przechowywania (Tabela 1).

Istotny ($p \leq 0,05$) wpływ czasu przechowywania na zawartość CO_2 stwierdzono w przypadku wszystkich analizowanych składów mieszanin gazów MAP. Początkowo, w dniu 3 obserwowano obniżenie zawartości tego gazu w opakowaniach MAP w porównaniu z dniem 0 (dla opakowań MAP 60/40 i MAP 50/50 było ono istotne), a następnie stopniowy wzrost, do poziomu obserwowanego w dniu pakowania (MAP 60/40 i MAP 50/50) lub istotnie najwyższego (dla opakowań MAP 80/20 i MAP 70/30) w 12 dniu przechowywania (Tabela 1).

Początkowe obniżenie się zawartości CO_2 w opakowaniach MAP mogło być spowodowane rozpuszczeniem się części tego gazu w powierzchniowych warstwach mięsa [Rossaint i in. 2014]. Im wyższe stężenie CO_2 w opakowaniach MAP tym lepszy efekt bakteriostatyczny, jednak rozpuszczanie za dużej ilości gazu w mięsie może powodować zmniejszenie jego ciśnienia w opakowaniu i w efekcie jego zapadnięcie się [Ye i in. 2020].

Wzrost zawartości CO₂ w końcowych okresach przechowywania badanego surowca mógł być z kolei spowodowany rozwojem i metabolizmem drobnoustrojów, które zużywają O₂ i produkują CO₂ [Rossaint i in. 2014, Esmer i in. 2011]. Zbliżone tendencje obserwowali Conte-Junior i in. [2020], którzy stwierdzili istotne obniżenie zawartości tlenu i wzrost zawartości dwutlenku węgla w czasie przechowywania w opakowaniach MAP (80% O₂ i 20% CO₂ oraz 60% O₂ i 40% CO₂) mięsa wołowego oraz Chmiel i in. [2019] dla mięsa drobiowego pakowanego w MAP (75% O₂ i 25% CO₂).

Zmiany w jakości badanego mięsa wieprzowego podczas chłodniczego przechowywania w opakowaniach MAP z różnymi mieszaninami gazów przedstawiono w Tabeli 2. Nie stwierdzono istotnego ($p > 0,05$) wpływu składu mieszaniny gazów MAP na ilość wycieku do opakowania, pH oraz wartości wskaźnika TBA (do 9 dnia przechowywania) badanego mięsa wieprzowego. Zaobserwowano jedynie, w każdym z analizowanych dni przechowywania, nieznacznie wyższy wyciek do opakowania oraz pH mięsa pakowanego w mieszaninach gazowych z wyższą zawartością tlenu (MAP 80/20 i MAP 70/30) w porównaniu do pakowanego w mieszaninach gazowych z niższą zawartością tego gazu, a wyższą CO₂ (MAP 60/40 i MAP 50/50). Jak podają Li i in. [2022] pakowanie mięsa w atmosferze modyfikowanej z wysoką zawartością tlenu może wpływać na utlenienie białek, co powoduje ograniczenie ich zdolności do budowy wiązań chemicznych z cząsteczkami wody, a w konsekwencji może doprowadzić do powstawania większej ilości wycieku. Z kolei nieznacznie niższe pH mięsa pakowanego w MAP 60/40 oraz MAP 50/50 mogło być spowodowane rozpuszczeniem się części CO₂ w badanym surowcu. Tworzy się wtedy słaby kwas węglowy, który obniża pH mięsa [Rossaint i in. 2014].

Mięso pakowane w MAP 80/20 charakteryzowało się w dniach 0-9 nieznacznie wyższymi wartościami wskaźnika TBA w porównaniu z oznaczanymi dla pozostałych MAP. Natomiast w ostatnim, tj. 12 dniu przechowywania mięso pakowane MAP 80/20 charakteryzowało się istotnie ($p \leq 0,05$) najwyższą wartością wskaźnika TBA (Tabela 2). Bao i Ertbjerg [2015] wskazują na istotny wzrost wartości wskaźnika TBA mięsa wieprzowego wraz ze wzrostem zawartości tlenu w opakowaniach MAP podczas 14 dni przechowywania. Podobnie jak w niniejszej pracy, najwyższą zawartością aldehydu dimalonowego charakteryzowało się mięso pakowane w mieszaninie gazów składającej się z 80% O₂ i 20% CO₂. Również Wang i in. [2019] obserwowali istotny wpływ składu mieszaniny gazów MAP na wartości wskaźnika TBA wieprzowiny. Wraz ze wzrostem stężenia tlenu w opakowaniach wartość wskaźnika TBA istotnie wzrastała. Najwyższą wartość wskaźnika TBA autorzy stwierdzili w mięsie zapakowanym w MAP z 80% zawartością O₂.

Czas chłodniczego przechowywania miał istotny ($p \leq 0,05$) wpływ na ilość wycieku do opakowania, pH oraz wartości wskaźnika TBA badanego mięsa wieprzowego. Wraz z upływem czasu przechowywania ilość wycieku do opakowań MAP wzrastała i badane mięso wieprzowe w 12 dniu przechowywania charakteryzowało się najwyższą ilością wycieku (Tabela 2). Według Arvanitoyannis i Stratakos [2012] wydłużenie czasu przechowywania ma negatywny wpływ na jakość mięsa, powodując m.in. zwiększoną ilość wycieku do opakowania. Obecność wycieku w opakowaniu zwłaszcza, gdy przekracza pojemność wkładki pochłaniającej, pogarsza wygląd pakowanego mięsa i przez to wpływa na decyzje konsumentów o zakupie mięsa a także ogranicza jego stabilność mikrobiologiczną.

Mięso przechowywane w MAP 80/20 i MAP 70/30 charakteryzowało się stabilnym pH na poziomie 5,6-5,8 do 9 dnia przechowywania, natomiast mięsa w MAP 60/40 i MAP 50/50 do dnia 6. Po tym czasie obserwowano istotne ($p \geq 0,05$) obniżenie się, w porównaniu z dniem 0, pH mięsa do poziomu 5,5 lub 5,3 (Tabela 2). Podobne tendencje obserwowali Chmiel i in. [2019] w badaniach nad wpływem czasu przechowywania w opakowaniach MAP na jakość mięsa drobiowego.

.

Tabela 1. Zmiany w zawartości gazów w opakowaniach MAP w czasie chłodniczego przechowywania badanego mięsa wieprzowego (średnia±odchylenie standardowe)*Changes in gas content in MAP packages during cooling storage of analyzed pork (mean±standard deviation)*

Wyróżnik	O ₂ [%]				CO ₂ [%]			
	MAP 80/20	MAP 70/30	MAP 60/40	MAP 50/50	MAP 80/20	MAP 70/30	MAP 60/40	MAP 50/50
dzień 0	79,3 ^{Ab} ±0,3	69,3 ^{Bb} ±0,2	60,2 ^{Ca} ±1,1	50,1 ^{Da} ±0,9	20,7 ^{Aa} ±0,2	29,6 ^{Bab} ±0,2	39,4 ^{Cb} ±0,6	48,7 ^{Db} ±0,8
dzień 3	77,1 ^{Aa} ±0,5	67,5 ^{Ba} ±0,8	60,0 ^{Ca} ±0,2	50,6 ^{Da} ±0,7	20,3 ^{Aa} ±0,3	27,9 ^{Ba} ±0,3	36,9 ^{Ca} ±1,0	45,6 ^{Da} ±0,4
dzień 6	76,0 ^{Aa} ±2,1	66,5 ^{Ba} ±1,3	60,1 ^{Ca} ±0,4	50,3 ^{Da} ±1,1	21,2 ^{Aab} ±0,3	28,2 ^{Ba} ±1,2	37,5 ^{Ca} ±0,4	47,3 ^{Db} ±0,4
dzień 9	74,2 ^{Aa} ±2,4	64,5 ^{Ba} ±1,5	60,5 ^{Ca} ±0,5	50,5 ^{Da} ±1,0	22,1 ^{Ab} ±0,5	30,5 ^{Bbc} ±1,0	38,4 ^{Cab} ±0,5	48,4 ^{Db} ±1,1
dzień 12	74,0 ^{Aa} ±2,0	63,0 ^{Ba} ±1,6	59,8 ^{Ca} ±0,7	50,8 ^{Da} ±1,3	23,5 ^{Ac} ±0,3	32,0 ^{Bc} ±0,8	39,8 ^{Cb} ±1,2	49,2 ^{Db} ±2,1

A, B, C, D – wartości średnie w wierszu, dla danego wyróżnika, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$; ^{a, b} - wartości średnie w kolumnie, dla danego wyróżnika, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 2. Zmiany w jakości badanego mięsa wieprzowego przechowywanego w MAP z różnymi mieszaninami gazów (średnia±odchylenie standardowe)*Changes in quality of analyzed pork stored in MAP with different gas mixture composition (mean±standard deviation)*

Wyróżnik	Ilość wycieku do opakowania [%]				pH				TBA [mg MDA/kg produktu]			
	MAP 80/20	MAP 70/30	MAP 60/40	MAP 50/50	MAP 80/20	MAP 70/30	MAP 60/40	MAP 50/50	MAP 80/20	MAP 70/30	MAP 60/40	MAP 50/50
dzień 0	-				5,8 ^b ±0,1				0,2 ^a ±0,1			
dzień 3	4,2 ^{Aa} ±0,4	4,3 ^{Aa} ±0,3	4,0 ^{Aa} ±0,7	3,8 ^{Aa} ±0,4	5,7 ^{Aab} ±0,1	5,7 ^{Aab} ±0,1	5,6 ^{Aab} ±0,1	5,6 ^{Aab} ±0,1	0,3 ^{Aa} ±0,1	0,2 ^{Aa} ±0,2	0,2 ^{Aa} ±0,1	0,2 ^{Aa} ±0,1
dzień 6	5,3 ^{Ab} ±0,5	5,4 ^{Ab} ±0,5	4,9 ^{Aab} ±0,8	4,6 ^{Aab} ±0,3	5,7 ^{Aab} ±0,2	5,7 ^{Aab} ±0,1	5,6 ^{Aab} ±0,1	5,6 ^{Aab} ±0,1	0,4 ^{Aa} ±0,1	0,3 ^{Aa} ±0,1	0,2 ^{Aa} ±0,1	0,2 ^{Aa} ±0,1
dzień 9	5,6 ^{Abc} ±0,9	5,8 ^{Abc} ±0,6	5,4 ^{Ab} ±0,4	5,2 ^{Ab} ±0,4	5,6 ^{Aab} ±0,1	5,6 ^{Aab} ±0,1	5,5 ^{Aa} ±0,1	5,5 ^{Aa} ±0,1	0,7 ^{Aab} ±0,3	0,6 ^{Aab} ±0,2	0,5 ^{Aab} ±0,2	0,4 ^{Aab} ±0,2
dzień 12	6,5 ^{Ac} ±0,5	6,1 ^{Ac} ±1,0	5,9 ^{Ab} ±0,5	5,8 ^{Ab} ±0,3	5,5 ^{Aa} ±0,1	5,5 ^{Aa} ±0,1	5,3 ^{Aa} ±0,1	5,3 ^{Aa} ±0,1	0,9 ^{Bb} ±0,1	0,7 ^{ABb} ±0,2	0,6 ^{ABb} ±0,1	0,5 ^{Ab} ±0,1

A, B, C, D – wartości średnie w wierszu, dla danego wyróżnika, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$; ^{a, b} - wartości średnie w kolumnie, dla danego wyróżnika, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Wraz z wydłużeniem czasu przechowywania wartości wskaźnika TBA badanego mięsa wieprzowego wzrastały. Istotny wzrost w porównaniu z dniem 0 obserwowano w 12 dniu przechowywania, niezależnie od składu mieszaniny gazów w opakowaniach MAP (Tabela 2). Także Rotabakk i in. [2006] w badaniach nad wpływem sposobu pakowania na jakość mięśni piersiowych, wykazali związek między wydłużaniem czasu przechowywania, a zwiększającymi się wartościami wskaźnika TBA.

Zmiany w wartościach składowych barwy L^* , a^* i b^* badanego mięsa wieprzowego podczas przechowywania w opakowaniach MAP zaprezentowano w Tabeli 3. Jasność barwy mięsa pakowanego w MAP z 50, 60 i 70 i 80% zawartością tlenu w początkowych dniach przechowywania była zbliżona. Istotny wpływ składu mieszaniny gazów na wartości składowej barwy L^* stwierdzono dopiero w 9 i 12 dniu przechowywania. Mięso MAP 80/20 charakteryzowało się istotnie wyższą wartością tej składowej barwy, a więc wyższą jasnością w porównaniu do mięsa MAP 60/40 i MAP 50/50. Stwierdzono istotny ($p \leq 0,05$) wpływ czasu chłodniczego przechowywania na wartości składowej barwy L^* badanego mięsa wieprzowego pakowanego w MAP z wyższą zawartością tlenu, tj. MAP 80/20 i MAP 70/30. Istotny wzrost jasności barwy, w porównaniu z dniem 0 obserwowano w dniu 3, w kolejnych dniach przechowywania wartości utrzymywały się na zbliżonym poziomie. W przypadku mięsa pakowanego w MAP z niższą zawartością tlenu (MAP 60/40 i MAP 50/50) obserwowano, w porównaniu z dniem 0 niewielki wzrost jasności barwy w dniu 3, a następnie jej stopniowe obniżenie w kolejnych dniach. Zmiany te nie były natomiast istotne. Według Wang i in. [2019] wartości składowej barwy L^* mięsa wieprzowego pakowanego w MAP z 0, 20, 50, 80% zawartością O_2 były zbliżone. Kameník i in. [2014] podają, że wartości składowej barwy L^* w mięsie wołowym pakowanym w MAP 80% O_2 i 20% CO_2 wzrastały w czasie przechowywania.

Nie stwierdzono istotnego ($p > 0,05$) wpływu składu mieszaniny gazów MAP na wartości składowej barwy a^* (określającej udział barwy czerwonej) i b^* (określającej udział barwy żółtej) badanego mięsa wieprzowego w każdym z analizowanych dni przechowywania. Obserwowano jedynie tendencję do przyjmowania wyższych wartości tych składowych barwy w przypadku mięsa pakowanego w mieszaninach gazowych z wyższą zawartością tlenu, a więc MAP 80/20 i MAP 70/30 (Tabela 3).

Tabela 3. Zmiany w barwie badanego mięsa wieprzowego przechowywanego w MAP z różnymi mieszaninami gazów (średnia±odchylenie standardowe)
Changes in color of analyzed pork stored in MAP with different gas mixture composition (mean±standard deviation)

Wyróżnik	L*				a*				b*			
	MAP 80/20	MAP 70/30	MAP 60/40	MAP 50/50	MAP 80/20	MAP 70/30	MAP 60/40	MAP 50/50	MAP 80/20	MAP 70/30	MAP 60/40	MAP 50/50
dzień 0	46,3 ^a ±1,2				8,2 ^a ±0,4				5,3 ^a ±1,2			
dzień 3	52,3 ^{ba} ±0,6	51,0 ^{ba} ±1,7	50,1 ^{aA} ±3,0	49,1 ^{aA} ±2,8	11,5 ^{ba} ±0,9	11,1 ^{ba} ±1,2	10,3 ^{ba} ±0,4	9,0 ^{aA} ±1,8	10,3 ^{ba} ±0,9	10,2 ^{ba} ±0,7	9,9 ^{ba} ±1,2	10,1 ^{ba} ±1,0
dzień 6	52,9 ^{ba} ±1,9	51,3 ^{ba} ±1,6	49,2 ^{aA} ±1,8	48,4 ^{aA} ±1,7	10,8 ^{ba} ±1,1	9,6 ^{ba} ±0,3	8,2 ^{aA} ±1,0	7,9 ^{aA} ±0,7	9,7 ^{ba} ±0,7	9,0 ^{ba} ±0,3	8,9 ^{ba} ±0,7	9,0 ^{ba} ±0,5
dzień 9	53,0 ^{ba} ±2,2	51,0 ^{ba} ±1,9	48,0 ^{aA} ±1,7	47,3 ^{aA} ±1,4	9,5 ^{aA} ±1,5	8,5 ^{aA} ±0,6	7,1 ^{aA} ±1,6	6,8 ^{aA} ±1,8	9,3 ^{ba} ±1,0	8,4 ^{ba} ±0,2	8,3 ^{ba} ±0,4	8,5 ^{ba} ±0,9
dzień 12	53,2 ^{ba} ±1,9	52,5 ^{ba} ±2,3	46,6 ^{aA} ±1,4	45,4 ^{aA} ±2,4	9,4 ^{aA} ±1,4	7,8 ^{aA} ±1,1	6,9 ^{aA} ±1,2	6,1 ^{aA} ±1,9	9,3 ^{ba} ±0,9	8,6 ^{ba} ±0,7	7,8 ^{ba} ±0,9	8,6 ^{ba} ±0,7

A, B, C, D – wartości średnie w wierszu, dla danego wyróżnika, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$; ^a, ^b - wartości średnie w kolumnie, dla danego wyróżnika, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Wang i in. [2019] podają, że przechowywanie mięsa w atmosferze modyfikowanej istotnie wpływa na wartości składowej barwy b^* . Najwyższymi wartościami tej składowej barwy charakteryzowało się mięso pakowane w MAP z 80% zawartością tlenu. Li i in. [2022] badali wpływ różnej zawartości tlenu w MAP (MAP 80% O_2 i 20% CO_2 , MAP 60% O_2 , 20% CO_2 i 20% N_2 oraz MAP 40% O_2 , 20% CO_2 i 40% N_2) na wartości składowej barwy a^* mięsa wieprzowego. Autorzy nie stwierdzili istotnego wpływu zawartości tlenu w opakowaniach MAP na wartości tej składowej barwy. Ponadto, zasugerowali, że już 40% tlenu w opakowaniach MAP jest wystarczające, aby utrzymać pożądaną barwę wieprzowiny (o typowym udziale barwy czerwonej).

Zaobserwowano istotny ($p \leq 0,05$) wpływ czasu przechowywania na wartości składowych barwy a^* i b^* mięsa wieprzowego pakowanego w MAP. W przypadku składowej barwy a^* istotny wzrost, w porównaniu z dniem 0 obserwowano w 3 i 6 dniu przechowywania w opakowaniach MAP 80/20 i MAP 70/30, a więc z wyższą zawartością tlenu, a także tylko w dniu 3 dla mięsa przechowywanego w MAP 60/40. W kolejnych dniach przechowywania wartości tej składowej barwy obniżały się (Tabela 3). W przypadku mięsa MAP 50/50 obserwowano podobne tendencje, jednak zmiany te nie były istotne.

W 3 dniu przechowywania mięso pakowane w MAP charakteryzowało się istotnie wyższymi wartościami składowej barwy b^* w porównaniu z dniem 0. Nie stwierdzono istotnego ($p > 0,05$) wpływu czasu przechowywania w dniach 3-12 na wartości tej składowej barwy. Obserwowano jedynie tendencję do obniżania wartości tej składowej barwy wraz z upływem czasu przechowywania. Z kolei w badaniach Peng i in. [2019] wartości składowej barwy b^* polędwiczek wieprzowych pakowanych w MAP 80/20 osiągnęły najwyższą wartość w 3 dniu przechowywania, a następnie w miarę upływu czasu przechowywania wartości tej składowej barwy obniżały się.

Początkowy wzrost wartości składowych barwy L^* , a^* i b^* , w porównaniu z dniem 0 (a więc przed pakowaniem) związany był z wpływem tlenu na barwę mięsa. Po zapakowaniu mięsa mioglobina przekształcała się w utlenowaną formę oksymoglobiny, a mięso charakteryzowało się różowo-czerwoną barwą. W czasie dłuższego przechowywania może dochodzić również do utlenienia żelaza wchodzącego w skład cząsteczki mioglobiny, przez co udział formy utlenionej, tj. brązowo-szarej metmioglobiny wzrasta [Alvarenga i in. 2019].

WNIOSKI

Przeprowadzone badania wykazały, że skład mieszaniny gazów w opakowaniach MAP miał istotny wpływ tylko na takie wyróżniki jakości mięsa wieprzowego jak wartość

wskaźnika TBA oraz jasność barwy (składowa barwy L*). Wraz z wydłużeniem czasu przechowywania mięsa wieprzowego ilość wycieku do opakowania oraz wartości wskaźnika TBA wzrastały, natomiast pH mięsa obniżało się, niezależnie od składu zastosowanej mieszaniny gazów MAP. Natomiast zmiany w wartościach składowych barwy były różne w zależności od składu mieszaniny gazów MAP. Uzyskane wyniki wskazują zatem, iż to czas chłodniczego przechowywania, a nie skład mieszaniny gazów w opakowaniach MAP determinuje analizowane wskaźniki jakości mięsa.

PIŚMIENNICTWO

1. Alvarenga T.I., Hopkins D.L., Ramos E.M., Almeida A.K., Geesink G. (2019). Ageing-freezing/thaw process affects blooming time and myoglobin forms of lamb meat during retail display. *Meat Sci.*, 153, 19-25
2. Arvanitooyannis I.S., Stratakis A.Ch. (2012). Application of modified atmosphere packaging and active/smart technologies to red meat and poultry: a review. *Food and Bioproc. Tech.*, 5, 1423-1446
3. Bao Y., Ertbjerg P. (2015). Relationship between oxygen concentration, shear force and protein oxidation in modified atmosphere packaged pork. *Meat Sci.*, 110, 174-179
4. Bingol E.B., Ergun O. (2011). Effects of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat. *Meat Sci.*, 88, 774-785
5. Chmiel M., Roszko M., Adamczak L., Florowski T., Pietrzak D. (2019). Influence of storage and packaging method on chicken breast meat chemical composition and fat oxidation. *Poult. Sci.*, 98, 2679-2690
6. Conte-Junior C.A., Monteiro M.L.G., Patrícia R., Mársico E.T., Lopes M.M., Alvares T.S., Mano S.B. (2020). The effect of different packaging systems on the shelf life of refrigerated ground beef. *Foods*, 9, 495-510
7. Esmer K.O., Irkin R., Degirmencioglu N., Degirmencioglu A. (2011). The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat Sci.*, 88, 221-226
8. Kameník J., Saláková A., Pavlík Z., Bořilová G., Hulanková R., Steinhäuserová I. (2014). Vacuum skin packaging and its effect on selected properties of beef and pork meat. *Eur. Food Res. Technol.*, 239, 395-402
9. Li S., Guo X., Shen Y., Pan J., Dong X. (2022). Effects of oxygen concentrations in modified atmosphere packaging on pork quality and protein oxidation. *Meat Sci.*, 189, 108826

10. Lorenzo J.M., Gómez M. (2012). Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. *Meat Sci.*, 92, 610-618
11. Lund M.N., Lametsch R., Hviid M.S., Jensen O.N., Skibsted L.H. (2007). High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine *longissimus dorsi* during chill storage. *Meat Sci.*, 77, 295-303
12. McMillin K.W. (2008). Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci.*, 80, 43-65
13. McMillin K.W. (2017). Advancements in meat packaging. *Meat Sci.*, 132, 153-162
14. Peng Y., Adhiputra K., Padayachee A., Channon H., Ha M., Warner D.R. (2019). High oxygen modified atmosphere packaging negatively influences consumer acceptability traits of pork. *Foods*, 8, 2-16
15. Ripoll G., Albertí P., Casasús I., Blanco M. (2013). Instrumental meat quality of veal calves reared under three management systems and color evolution of meat stored in three packaging systems. *Meat Sci.*, 93, 336-343
16. Rossaint S., Klausmann S., Herbert U., Kreyenschmidt J. (2014). Effect of package perforation on the spoilage process of poultry stored under different modified atmospheres. *Food Packag. Shelf Life*, 1, 68-76
17. Rossaint S., Klausmann S., Kreyenschmidt J. (2015). Effect of high-oxygen and oxygen-free modified atmosphere packaging on the spoilage process of poultry breast fillets. *Poult. Sci.*, 94, 96-103
18. Rotabakk B.T., Birkeland S., Jeksrud W.K., Sivertsvik M. (2006). Effect of modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization on the shelf life of skinless chicken breast fillets. *J. Food Sci.*, 71, 124-S131
19. Shahidi F. (1990). The 2-tiobarbituric acid (TBA) methodology for the evaluation of warmed over flavor and rancidity in meat products. In: *Proceedings of 36th International Congress of Meat Science and Technology*, Havana, Cuba, 1008-1014
20. Wang C., Wang H., Li X., Zhang C. (2019). Effects of oxygen concentration in modified atmosphere packaging on water holding capacity of pork steaks. *Meat Sci.*, 148, 189-197
21. Ye K., Ding D., Zhu X., Wu Z., Hu Q., Li R. (2020). Modified atmosphere packaging with a small change in gas ratio could maintain pork quality during -3°C storage. *Food Control*, 109, 106943
22. Zouaghi F., Cantalejo M.J. (2016). Study of modified atmosphere packaging on the quality of ozonated freeze-dried chicken meat. *Meat Sci.*, 119, 123-131

WPLYW WYSOKICH CIŚNIEŃ NA WYBRANE WYRÓŻNIKI JAKOŚCI MARYNOWANEGO MIĘSA WIEPRZOWEGO

**Dorota Pietrzak, Agnieszka Winiarek, Marta Chmiel, Lech Adamczak, Aneta Cegielka,
Tomasz Florowski**

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Żywności
Katedra Technologii i Oceny Żywności
Zakład Technologii Mięsa
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

dorota_pietrzak@sggw.edu.pl

Otrzymano: 19 lutego 2024

Poprawiono: 18 marca 2024

Zaakceptowano: 20 marca 2024

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu wysokich ciśnień (HPP; 100, 300 i 500 MPa/5 min/10°C) na wybrane wyróżniki jakości marynowanego mięsa wieprzowego. Badania przeprowadzono po 24 h marynowania mięsa w temperaturze 4-6°C. Obejmowały one oznaczenie absorpcji marynaty, wskaźnika TBARS, ilości wycieku podczas obróbki cieplnej, a także pomiary pH, parametrów barwy i tekstury oraz ocenę sensoryczną. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zastosowanie HPP przyczyniło się do zwiększenia absorpcji marynaty w mięsie wieprzowym (od 25 do 70%). Surowe mięso marynowane, które poddano działaniu ciśnienia 300 i 500 MPa różniło się istotnie ($p \leq 0,05$) pod względem barwy od mięsa kontrolnego oraz mięsa poddanego działaniu ciśnienia 100 MPa ($\Delta E > 20$). Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu HPP na barwę marynowanego mięsa poddanego obróbce cieplnej ($\Delta E < 2$). Wykazano, że w przypadku marynowanego mięsa wieprzowego powinno stosować się ciśnienia niższe niż 500 MPa, ze względu na istotne zwiększenie jego twardości, co było negatywnie postrzegane w ocenie sensorycznej.

Słowa kluczowe: mięso wieprzowe, marynowanie, wysokie ciśnienia, barwa, utlenianie lipidów

EFFECT OF HIGH PRESSURE PROCESSING ON SELECTED QUALITY CHARACTERISTICS OF MARINATED PORK

Summary

The aim of the study was to determine the effect of high pressures (HPP; 100, 300 and 500 MPa/5 min/10°C) on selected quality characteristics of marinated pork. The study was conducted after 24 h of meat marinating at 4-6°C. Marinade absorption, TBARS index, thermal drip were determined, as well as pH, color and texture parameters were measured. Sensory quality was also evaluated. Based on the obtained results, it was found that the use of HPP contributed to an increase in the absorption of marinade in pork (from 25 to 70%). Raw marinated meat pressurized at 300 and 500 MPa differed significantly ($p \leq 0.05$) in color from control meat and meat pressurized at 100 MPa ($\Delta E > 20$). In contrast, there was no significant effect of HPP on the color of heat-treated marinated meat ($\Delta E < 2$). It has been shown that pressures lower than in case of marinated pork 500 MPa should be used, due to the significant increase in hardness, which was negatively perceived in sensory evaluation.

Keywords: pork, marination, high pressures, color, lipid oxidation

WSTĘP

Produkcja żywności wygodnej jest jednym z najbardziej dynamicznie rozwijających się sektorów przemysłu spożywczego. Wynika to z dużego zapotrzebowania na produkty o wysokim stopniu dyspozycyjności, z których można szybko i łatwo przygotować posiłek w warunkach domowych. Do takich produktów zalicza się marynowane wyroby mięsne, które przed spożyciem należy tylko poddać obróbce cieplnej [Pietrzak 2010, Nikmaram i in. 2018, Siroli i in. 2020]. Marynowanie stosuje się w celu poprawy cech sensorycznych mięsa, nadania pożądanej barwy, smaku, zapachu, kruchości i soczystości, ale również, żeby zwiększyć wydajność. Tradycyjny sposób marynowania polega na zanurzeniu mięsa w marynacie, jednak trwa on długo - od kilkudziesięciu minut nawet do kilku dni. W celu przyspieszenia tego procesu coraz częściej wykorzystuje się wieloigłowe nastrzykiwarki oraz mieszkarki łopatkowe lub bębnowe, co dodatkowo umożliwia równomierne rozprowadzanie marynaty w mięsie. Składy marynat oraz metody marynowania są cały czas doskonalone i dostosowywane do potrzeb produkcji oraz przeznaczenia surowca [Alvarado, McKee 2007, Williams 2012, Latoch i in. 2023, Ehsanur Rahman i in. 2023].

Jakość marynowanych wyrobów mięsnych zależy od wielu czynników, m.in.: jakości surowców, zastosowanej metody marynowania, warunków higienicznych podczas produkcji

oraz późniejszego przechowywania. W przypadku tego typu wyrobów poważny problem mogą stanowić wtórne zanieczyszczenia poprodukcyjne [Pietrzak 2010]. Rozwiązaniem mogłoby być użycie nietermicznej metody utrwalania, w której wykorzystuje się ciśnienia rzędu 400-600 MPa (w temperaturze otoczenia lub niższej), określanej w skrócie jako HPP (High Pressure Processing). Dzięki zastosowaniu HPP można zwiększyć bezpieczeństwo i przedłużyć trwałość różnych produktów mięsnych, bez wpływu na ich wartość odżywczą oraz cechy sensoryczne [Nguyen i in. 2010, Kruk i in. 2011, Huang i in. 2017, Bolumar i in. 2021, Rajendran i in. 2022]. Metoda ta jest szczególnie zalecana do zapakowanych próżniowo produktów mięsnych gotowych do spożycia (m.in. wędlin, wyrobów garmazeryjnych), które mogą być wtórnie zanieczyszczone podczas porcjowania lub pakowania [Pietrzak i in. 2010, Wang i in. 2016, Meloni 2019].

HPP ma jednak też pewne wady, które mogą ograniczać jej zastosowanie w przemyśle mięsnym – przede wszystkim, może wpływać na barwę i teksturę produktów mięsnych oraz przyspieszać utlenianie lipidów [Cheftel, Culioli 1997, Bajovic i in. 2012, Ma, Ledward 2013, Bolumar i in. 2021]. Zmiany barwy są szczególnie widoczne w przypadku wyrobów z surowego mięsa, ale mogą być ograniczone jeśli działaniu wysokich ciśnień będzie poddawane mięso marynowane [O'Neill i in. 2019a, O'Neill i in. 2019b, Uyarcan, Kayaardi 2019, Rajendran i in. 2022]. Jednocześnie wiele składników marynat wykazuje silne właściwości przeciwutleniające [Latoch i in. 2023], co mogłoby też w pewien sposób wpłynąć na ograniczenie niekorzystnych zmian oksydacyjnych, które zachodzą w mięsie poddawanych działaniu wysokich ciśnień (> 400 MPa). Zastosowanie HPP mogłoby dodatkowo ułatwić równomierne rozprowadzenie marynaty w mięsie oraz zwiększyć intensywność smaku i wpłynąć w korzystny sposób na teksturę, co jest szczególnie ważne w przypadku wyrobów mięsnych z obniżoną zawartością soli kuchennej, na które w ostatnich latach popyt wyraźnie się zwiększył [Grossi i in. 2012, Rodrigues i in. 2016].

W badaniach podjęto próbę określenia wpływu wysokich ciśnień (100, 300 i 500 MPa) na wybrane wyróżniki jakości marynowanego mięsa wieprzowego.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań i układ doświadczeń

Materiał do badań stanowiło mięso wieprzowe - mięsień najdłuższy grzbietu (*musculus longissimus dorsi*), które pozyskiwano bezpośrednio z zakładów mięsnych. Badania wykonano w 3 seriach doświadczalnych na surowcu pochodzącym z różnych partii

produkcyjnych. Mięso dzielono na plastry o grubości około 2,5 cm, które po zważeniu umieszczano w woreczkach polietylenowych, dodawano marynatę (w/s 4:1 – mięso : marynata) i pakowano próżniowo (200 mBar) przy użyciu pakowarki Multivac C200 firmy Multivac Sp. z o.o. Do marynowania mięsa wykorzystano gotową mieszankę przypraw firmy Prymat „Marynata do mięs PIKANTNA”, o następującym składzie: sól, papryka słodka, czosnek (14%), cebula, gorczyca biała, kolendra, chili (5%), cukier, majeranek, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, owoc jałowca, pieprz czarny (1,4%), rozmaryn. Zgodnie z zaleceniem producenta podanym na opakowaniu, marynatę wcześniej wymieszano z odpowiednią ilością oleju rzepakowego. Zapakowane próbki mięsa z marynatą poddawano działaniu wysokich ciśnień – 100 MPa, 300 MPa i 500 MPa przez 5 min w temperaturze 10°C. Proces ciśnieniowania przeprowadzono przy użyciu urządzenia UNIPRESS PASKALIZATOR U5000/120, o pojemności komory 3000 cm³, w którym czynnikiem roboczym była woda. Podczas ciśnieniowania obserwowano wzrost temperatury w komorze, średnio o 3°C na 100 MPa. Po ciśnieniowaniu próbki marynowanego mięsa pozostawiano na 24 h w chłodni (w temperaturze 4-6°C), bez dostępu światła.

W każdej z 3 serii doświadczalnych przygotowywano po 2 próbki marynowanego mięsa dla każdego z wariantów HPP – 100 MPa (M_100), 300 MPa (M_300) i 500 MPa (M_500) oraz dodatkowo 2 próbki marynowanego mięsa, które nie były ciśnieniowane (KM). Ocenę wybranych wyróżników jakości mięsa przeprowadzano po 24 h marynowania. Po jednej próbce z każdego wariantu po wyjęciu z opakowania umieszczano na stojaku z drutu ze stali nierdzewnej na 5 min (aby umożliwić ociekanie nadmiaru marynaty), a następnie ważono w celu oznaczenia absorpcji marynaty. Z mięsa odkrawano plaster o masie około 40 g, który rozdrabniano i mieszano. Tak przygotowana próbka mięsa posłużyła do oznaczenia wskaźnika TBARS oraz pomiaru pH. Na przekroju mięsa przeprowadzano pomiar parametrów barwy. Pozostałe mięso ważono i poddawano obróbce cieplnej w piecu konwekcyjno-parowym (Rational, Niemcy) w temperaturze 80°C (przy pełnym zaparowaniu) do osiągnięcia w centrum geometrycznym temperatury 72°C. Po wystudzeniu mięso ponownie ważono w celu oznaczenia ilości wycieku podczas obróbki cieplnej, a następnie wykonano pomiary siły cięcia oraz parametrów barwy na przekroju. Druga próbka mięsa posłużyła do przeprowadzenia oceny sensorycznej.

Metody badawcze

Oznaczenie absorpcji marynaty

Mięso dzielono na plastry, które po zważeniu (z dokładnością do 0,01 g) umieszczano w woreczkach polietylenowych, dodawano marynatę, zamykano próżniowo i poddawano HPP. Następnie po 24 h marynowania mięso wyjmowano z opakowania i ponownie ważono, usuwając wcześniej nadmiar marynaty z powierzchni mięsa. Absorpcję marynaty obliczano w stosunku do masy mięsa przed marynowaniem i wyrażano w %.

Pomiar parametrów barwy

Parametry barwy L^* , a^* i b^* mierzono metodą odbiciową przy użyciu kolorymetru Konica Minolta model CR400 (wielkość otworu głowicy pomiarowej 8 mm, iluminant D65, obserwator 10°). Urządzenie przed pomiarem kalibrowano na wzorcu bieli ($Y: 95,5$; $x: 0,3159$; $y: 0,3326$). Pomiary wykonywano na przekroju mięsa w 5 różnych miejscach, przyjmując średnią za wynik oznaczenia. Obliczano także bezwzględne różnice barwy między wyrobem kontrolnym (KM) oraz wyrobami poddanymi HPP według wzoru:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2},$$

gdzie:

ΔE – bezwzględna różnica barwy,

L^* , a^* , b^* – wartości parametrów barwy wyrobu kontrolnego,

L , a , b – wartości parametrów barwy wyrobów poddanych HPP.

Interpretację uzyskanych wyników ΔE przeprowadzono w oparciu o poniższe kryteria [Mokrzycki, Tatol 2011]: jeżeli $0 < \Delta E < 1$ - obserwator nie zauważa różnicy w barwie, $1 < \Delta E < 2$ - tylko doświadczony obserwator może zauważyć różnicę w barwie, $2 < \Delta E < 3,5$ - niedoświadczony obserwator również zauważa różnicę w barwie, $3,5 < \Delta E < 5$ - zauważalna jest wyraźna różnica w barwie, $\Delta E > 5$ - obserwator zauważa dwie różne barwy.

Oznaczenie wskaźnika TBARS

Oznaczenie przeprowadzano według metodyki opisanej przez Shahidi [1990]. Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru CampSpec M501 (Wielka Brytania), przy długości fali 532 nm wobec próby odczynnikowej (5 cm^3 0,02 M roztworu kwasu 2-tiobarbiturowego i 5 cm^3 10% kwasu trichlorooctowego). Otrzymany wynik absorbancji mnożono przez współczynnik przeliczeniowy wynoszący 2,34 i wyrażano w mg MDA/kg produktu. Oznaczenie wykonywano w 2 powtórzeniach, przyjmując średnią za wynik oznaczenia.

Pomiar pH

Do zlewki naważano 10 g rozdrobnionego mięsa, dodawano 30 cm³ destylowanej wody i po wymieszaniu odstawiano na 10 minut. Pomiar pH mięsa wykonywano przy użyciu pH-metru CP-411 firmy Elmetron, wyposażonego w elektrodę szklano-kalomelową. Przed wykonaniem pomiaru pH-metr kalibrowano w buforach o pH 4 i 7. Pomiar wykonywano w 2 powtórzeniach, przyjmując średnią za wynik oznaczenia.

Oznaczenie ilości wycieku podczas obróbki cieplnej

Mięso ważono (z dokładnością do 0,01 g) przed obróbką cieplną, a następnie ponownie po przeprowadzonej obróbce cieplnej i wystudzeniu do 20°C. Ilość wycieku podczas obróbki cieplnej obliczano w stosunku do masy mięsa przed obróbką cieplną i wyrażano w %.

Pomiar siły cięcia

Siłę cięcia mierzono przy użyciu urządzenia ZWICKI typ 1120 (Niemcy), wykorzystując element tnący typu Warnera-Bratzlera. Próbkę do badań przygotowywano poprzez wycięcie z poddanego wcześniej obróbce cieplnej mięsa (wzdłuż włókien) prostopadłościanów o wymiarach 1 x 1 cm i długości około 5 cm. Pomiar wykonywano w 4 powtórzeniach, przyjmując średnią za wynik oznaczenia.

Ocena sensoryczna

Mięso do oceny sensorycznej poddawano obróbce cieplnej w piecu konwekcyjno-parowym (Rational, Niemcy) w temperaturze 180°C do osiągnięcia w centrum geometrycznym temperatury 72°C (około 20 minut). Po wystudzeniu mięso pokrojono na równe plastry o szerokości około 0,3 cm. W ocenie wzięto pod uwagę takie wyróżniki, jak: barwa na przekroju, zapach, smak, twardość oraz ogólna pożądalność. Ocena sensoryczna została przeprowadzona przez zespół składający się z 10 przeszkolonych osób. Wykorzystano niestrukturyzowaną 9 stopniową skalę graficzną z wartościami brzegowymi: dla barwy na przekroju: „zbyt jasna” i „zbyt ciemna”, dla zapachu: „niewyczuwalny” i „zbyt intensywny”, dla smaku: „słabo wyczuwalny, mało wyrazisty” i „zbyt intensywny”, dla twardości: „zbyt miękka” i „zbyt twarda”, dla ogólnej pożądalności: „najmniej pożądana” i „najbardziej pożądana”.

Analiza statystyczna

Do przeprowadzenia analizy statystycznej wykorzystano program STATISTICA 13PL (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji (One-Way ANOVA) oraz test szczegółowy Tukey’a HSD dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$. Określono wpływ wysokości zastosowanego ciśnienia na wybrane wyróżniki jakości marynowanego

mięsa wieprzowego.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zmiany w jakości marynowanego mięsa wieprzowego poddanego HPP przedstawiono w Tabeli 1. Po 24 h marynowania stwierdzono przyrost masy we wszystkich próbkach mięsa. Można jednak zauważyć, że absorpcja marynaty w próbkach mięsa, które poddano HPP (M_100, M_300, M_500) była większa niż w mięsie kontrolnym (KM), odpowiednio o 25, 40 i 70%. Przy zastosowaniu wyższych ciśnień (300 i 500 MPa) były to istotne różnice ($p \leq 0,05$). O'Neill i in. [2019a, 2019b] wykazali, że stosując odpowiednie parametry HPP można przyspieszyć dyfuzję marynaty z powierzchni mięsa do wnętrza w wyniku powstałego gradientu stężenia składników marynaty, co zostało potwierdzone w niniejszych badaniach.

Nie stwierdzono istotnego ($p > 0,05$) wpływu HPP na pH oraz wartości wskaźnika TBARS w marynowanym mięsie wieprzowym (Tabela 1). Można jednak zauważyć tendencję do zwiększania się zarówno pH mięsa, jak i wartości wskaźnika TBARS wraz ze wzrostem stosowanego ciśnienia. Zwiększanie się pH produktów mięsnych, które poddano działaniu HPP w porównaniu z wyrobem kontrolnym obserwowano również w badaniach innych autorów [Wang i in. 2015, O'Neill i in. 2019a, Dong i in. 2020], którzy tłumaczyli to zjawisko zmniejszającą się liczbą dostępnych grup kwasowych w wyniku zmian konformacyjnych, do których dochodzi podczas denaturacji białek.

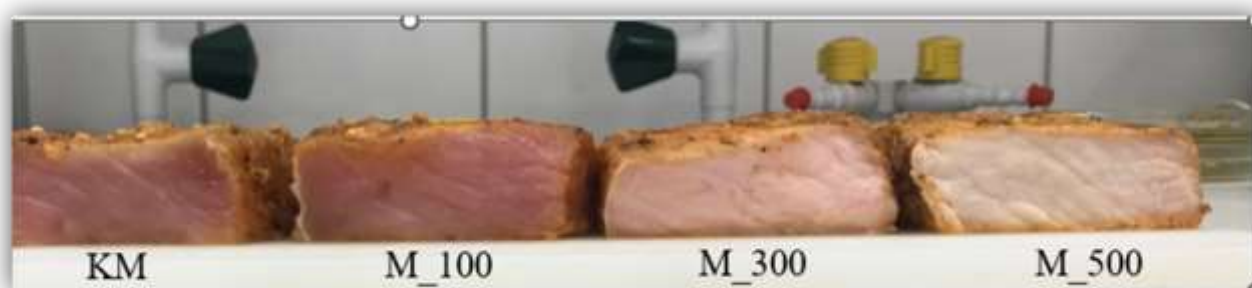
Tabela 1. Wpływ HPP na wybrane wyróżniki jakości marynowanego mięsa wieprzowego (średnia±odchylenie standardowe)
Effect of HPP on selected quality properties of marinated pork (mean±standard deviation)

Wyróżniki	KM	M_100	M_300	M_500
Absorpcja marynaty [%]	1,9a±0,5	2,5ab±0,6	2,8b±0,7	3,4b±1,1
pH	5,2a±0,2	5,2a±0,2	5,3a±0,3	5,5a±0,3
TBARS [mg MDA/kg]	0,3a±0,1	0,4a±0,2	0,4a±0,1	0,5a±0,1
L*	50,0a±5,2	49,6a±4,6	69,9b±3,7	73,2b±3,1
a*	4,0a±0,5	4,7a±0,5	6,9b±1,0	4,1a±0,3
b*	4,7a±1,7	4,4a±0,7	10,1b±0,8	11,7b±2,8
ΔE		0,9	21,9	23,8

a, b - wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Według wielu autorów [Kruk i in. 2011, He i in. 2012, Ma, Ledward 2013, Kantono i in. 2020], zastosowanie wysokich ciśnień (> 300 MPa) przyspiesza utlenianie lipidów w produktach mięsnych. Przyczyną może być denaturacja białek hemowych wywołana ciśnieniem, która prowadzi do uwalniania jonów Fe(II) lub Cu(II) katalizujących proces utleniania lipidów [Cheftel, Culioli 1997, Medina-Meza i in. 2014]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki są zbieżne z wynikami badań O'Neill i in. [2019a], którzy również wykazali, że w marynowanym mięsie wieprzowym poddanym HPP (300-500 MPa) proces utleniania lipidów zachodził szybciej niż w wyrobie kontrolnym, a wzrost wartości wskaźnika TBARS był wprost proporcjonalny do wysokości zastosowanego ciśnienia. Można jednak zauważyć, że w wartości wskaźnika TBARS oznaczone w mięsie poddanym HPP nie przekraczały 0,5 mg MDA/kg, a dopiero powyżej tego poziomu występuje zjełczały smak, który może być wyczuwany przez konsumentów [Wood i in. 2008].

Jasność barwy marynowanego mięsa wieprzowego poddanego działaniu ciśnienia 100 MPa była zbliżona do barwy mięsa kontrolnego. Natomiast zastosowanie wyższych ciśnień przyczyniło się do istotnego ($p \leq 0,05$) zwiększenia wartości parametru barwy L^* mięsa. Wartości parametru barwy a^* (określającego udział barwy czerwonej) mięsa poddanego działaniu ciśnienia 300 MPa były istotnie ($p \leq 0,05$) wyższe niż w pozostałych wariantach mięsa. Natomiast w przypadku parametru barwy b^* (określającego udział barwy żółtej) obserwowano podobną tendencję, jak przy jasności - istotnie ($p \leq 0,05$) wyższe wartości tego parametru barwy charakteryzowały mięso poddane działaniu ciśnienia 300 i 500 MPa. Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że zastosowanie ciśnienia ≥ 300 MPa przyczyniło się do istotnego rozjaśnienia barwy na przekroju marynowanego mięsa, a obliczone ΔE wskazują, że różnice były na tyle duże (Fot. 1), że przeciętny obserwator mógł je zauważyć [Mokrzycki, Tatol 2011].



Fotografia 1. Wpływ HPP na barwę marynowanego mięsa wieprzowego
Effect of HPP on the color of marinated pork

Wysokie ciśnienia (> 150 MPa) mogą powodować niekorzystne zmiany barwy produktów mięsnych, szczególnie tych, które nie były poddawane obróbce cieplnej. Przyczyną może być denaturacja globiny bądź przemieszczanie się lub uwalnianie hemu z cząsteczki mioglobiny, a przy wyższych ciśnieniach (> 400 MPa) również utlenianie mioglobiny do metmioglobiny, ale nie można wykluczyć też częściowej denaturacji barwników mięśniowych [Marcos i in. 2010, Sazonova i in. 2017]. Rozjaśnienie barwy wyrobów marynowanych poddanych działaniu HPP obserwowali również inni autorzy, dotyczyło to zarówno mięsa wieprzowego [O'Neill i in. 2019a], wołowego [Uyarcan, Kayaardi 2019], jak i drobiowego [Dong i in. 2020]. Podobnie jak w niniejszych badaniach zmiany barwy mięsa były tym bardziej widoczne, im wyższe ciśnienie zastosowano. Wang i in. [2015] nie stwierdzili natomiast istotnego wpływu HPP (350-600 MPa) na parametry barwy mierzone na powierzchni marynowanego mięsa wieprzowego. Według tych autorów, zastosowanie miodowo-czosnkowej marynaty przyczyniło się do zamaskowania potencjalnych przebarwień mięsa spowodowanych działaniem wysokich ciśnień. Jednocześnie wykazano, że w marynowanym mięsie poddanym działaniu ciśnienia > 450 MPa udało się wydłużyć okres przydatności do spożycia z 10 do 31 dni.

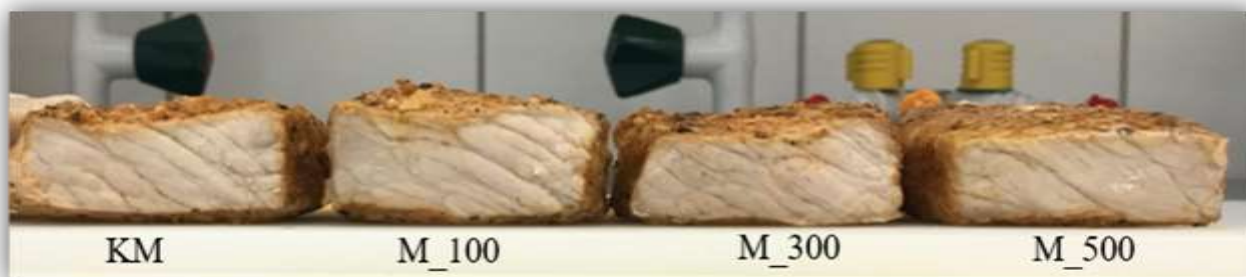
W tabeli 2 przedstawiono wpływ HPP na zmiany wybranych wyróżników jakości marynowanego mięsa wieprzowego poddanego obróbce cieplnej. Nie wykazano istotnych różnic w ilości wycieku podczas obróbki cieplnej badanego mięsa. Można jednak zauważyć, że wraz ze wzrostem zastosowanego ciśnienia, ubytki masy podczas obróbki cieplnej mięsa były coraz większe. Brak istotnego wpływu HPP na ilość wycieku podczas obróbki cieplnej stwierdzono także w przypadku marynowanych kotletów wieprzowych [O'Neill i in. 2019a] oraz mięsa wołowego [Rodrigues i in. 2016].

Tabela 2. Wpływ HPP na wybrane wyróżniki jakości marynowanego mięsa wieprzowego poddanego obróbce cieplnej (średnia±odchylenie standardowe)
Effect of HPP on selected quality properties of heat-treated marinated pork (mean±standard deviation)

Wyróżniki	KM	M_100	M_300	M_500
Ilość wycieku podczas obróbki cieplnej [%]	16,5a±3,2	16,9a±4,9	19,5a±3,3	21,5a±2,9
L*	71,3a±0,9	69,9a±3,9	68,4a±5,1	72,3a±4,5
a*	3,5a±0,8	3,7a±0,4	4,6a±1,1	2,8a±0,2
b*	11,3a±1,8	12,2a±1,4	13,1a±3,6	12,0a±1,3
ΔE		1,7	1,9	1,4
Siła cięcia [N]	51,2a±4,4	57,6ab±9,7	59,3ab±23,1	70,5b±11,3

a, b - wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Zastosowanie HPP nie miało także istotnego wpływu na barwę marynowanego mięsa wieprzowego poddanego obróbce cieplnej. Wartości parametrów barwy (L^* , a^* , b^*) mięsa ciśnieniowanego kształtowały się na zbliżonym poziomie jak w mięsie kontrolnym (Tabela 2). Na podstawie obliczeń ΔE można stwierdzić, że w przypadku mięsa poddanego obróbce cieplnej, różnice w barwie wywołane działaniem wysokich ciśnień mogą być widoczne tylko dla osób mających doświadczenie w ocenie barwy (Fot. 2).



Fotografia 2. Wpływ HPP na barwę marynowanego mięsa wieprzowego poddanego obróbce cieplnej
Effect of HPP on the color of marinated heat-treated pork

Wcześniejsze badania wykazały, że parametry barwy (L^* , a^* , b^*) gotowanego mięsa wieprzowego poddanego przed obróbką cieplną działaniu ciśnienia 300 i 600 MPa nie różniły się istotnie w porównaniu z próbką kontrolną mięsa. Na podstawie wizualnej oceny stwierdzono, że mięso poddane HPP - po przeprowadzeniu obróbki cieplnej charakteryzowało się barwą typową dla mięsa gotowanego. Uznano więc, że zmiany barwy mięsa w wyniku działania wysokich ciśnień nie mają znaczenia w przypadku dalszego jego przetwarzania [Sazonova i in. 2018]. Natomiast O'Neill i in. [2019a] wykazali, że marynowane kotlety wieprzowe poddane HPP cechowały się po obróbce cieplnej istotnie wyższymi wartościami parametru barwy L^* w porównaniu z próbką kontrolną mięsa. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w przypadku parametrów barwy a^* i b^* badanych wyrobów mięsnych, co mogło wynikać z obecności na ich powierzchni marynaty o specyficznym, ciemnym zabarwieniu.

Marynowane mięso wieprzowe poddane HPP charakteryzowała wyższa siła cięcia niż mięso kontrolne, ale istotne ($p \leq 0,05$) różnice stwierdzono tylko w przypadku zastosowania ciśnienia 500 MPa (Tabela 2).

HPP może wywoływać zmiany konformacji białek w mięsie i powodować ich denaturację, żelowanie lub agregację, co z kolei ma wpływ na teksturę mięsa. Zmiany te zależą od układu białek w mięsie oraz warunków prowadzenia procesu – czasu, ciśnienia

i temperatury [Sun, Holley 2010]. Badania innych autorów, wykazały, że istotny wzrost twardości marynowanego mięsa wołowego [Rodrigues i in. 2016] oraz kotletów wieprzowych [O'Neill i in. 2019a] następował jeśli zastosowano ciśnienie ≥ 500 MPa, co potwierdzają wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Natomiast Wang i in. [2015] nie zaobserwowali istotnego wpływu HPP (350-600 MPa) na wartości siły cięcia marynowanego mięsa wieprzowego.

W Tabeli 3 przedstawiono wpływ HPP na wyniki oceny sensorycznej marynowanego mięsa wieprzowego poddanego obróbce cieplnej.

Nie wykazano istotnych różnic pod względem barwy na przekroju, zapachu i smaku mięsa. Stwierdzono natomiast, że mięso poddane działaniu ciśnienia 500 MPa oceniono istotnie ($p \leq 0,05$) niżej za ogólną pożądalność, co może być związane z jego teksturą. Według oceniających, mięso to było istotnie ($p \leq 0,05$) twardsze w porównaniu z pozostałymi wariantami mięsa, co potwierdzają również wyniki instrumentalnych pomiarów tekstury (Tabela 2).

Tabela 3. Wpływ HPP na wyniki oceny sensorycznej marynowanego mięsa wieprzowego poddanego obróbce cieplnej (średnia $\pm$ odchylenie standardowe)
Effect of HPP on the results of sensory evaluation of heat-treated marinated pork (mean $\pm$ standard deviation)

Wyróżniki	KM	M_100	M_300	M_500
Barwa na przekroju	6,3a $\pm$ 1,1	6,5a $\pm$ 1,0	6,3a $\pm$ 1,0	6,1a $\pm$ 1,1
Zapach	6,9a $\pm$ 0,7	6,5a $\pm$ 1,0	6,6a $\pm$ 0,7	6,6a $\pm$ 1,4
Smak	6,6a $\pm$ 1,0	6,0a $\pm$ 1,6	6,3a $\pm$ 1,4	5,6a $\pm$ 2,1
Twardość	6,9a $\pm$ 1,1	6,8a $\pm$ 1,3	7,4a $\pm$ 1,0	8,6b $\pm$ 0,9
Ogólna pożądalność	7,6b $\pm$ 0,9	7,1b $\pm$ 0,8	7,4b $\pm$ 0,8	4,8a $\pm$ 0,6

a, b - wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki są zbieżne z wynikami badań Sazonovej i in. [2018], którzy poddawali działaniu wysokich ciśnień (300 i 600 MPa) surowe mięso wieprzowe. Wykazali oni również, że przy wyższych ciśnieniach następuje zwiększenie twardości mięsa, co przekłada się na mniejszą jego akceptację przez oceniających. W przypadku marynowanego mięsa wieprzowego, które poddano działaniu wysokich ciśnień (300, 400 i 500 MPa) nie stwierdzono istotnych różnic w ogólnej pożądalności w porównaniu z wyrobem kontrolnym, ale było ono również niżej oceniane za teksturę [O'Neill i in. 2019a].

WNIOSKI

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie wysokich ciśnień przyczyniło się do zwiększenia absorpcji marynaty w mięsie wieprzowym. Barwa marynowanego mięsa wieprzowego, które poddano HPP różniła się istotnie od barwy mięsa kontrolnego, a różnice były tym bardziej widoczne, im wyższe ciśnienie zostało użyte. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu zastosowania wysokich ciśnień na barwę mięsa poddanego obróbce cieplnej, co wskazuje na możliwość wykorzystania tej metody w produkcji marynowanych wyrobów mięsnych, które przed spożyciem powinny być poddane obróbce cieplnej. Stosowane ciśnienie powinno być jednak niższe niż 500 MPa, ze względu na istotne pogorszenie tekstury mięsa, które było negatywnie postrzegane w ocenie sensorycznej.

Badania do niniejszej publikacji zostały wykonane przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu „Centrum żywności i żywienia - modernizacja kampusu SGGW w celu stworzenia Centrum Badawczo-Rozwojowego Żywności i Żywienia (CŻiŻ)” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Mazowieckiego na lata 2014-2020 (nr projektu RPMA.01.01.00-14-8276/17).

PIŚMIENNICTWO

1. Alvarado C., McKee S. (2007). Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. *J. App. Poult. Res.*, 16, 113-120
2. Bajovic B., Bolumar T., Heinz V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Sci.*, 92, 280-289
3. Bolumar T., Orlie V., Sikes A., Aganovic K., Bak K.H., Guyon C., Stübler A.S., de Lamballerie M., Hertel C.A., Brüggemann D.A. (2021). High-pressure processing of meat: Molecular impacts and industrial applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 20, 332-368
4. Cheftel J.C., Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Sci.*, 46, 211-236
5. Dong. K., Luo. X., Liu L., An F., Tang D., Fu L., Teng H., Huang Q. (2020). Effect of high-pressure treatment on the quality of prepared chicken breast. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 56, 1597-1607

6. Ehsanur Rahman S.M., Islam S., Pan J., Kong D., Xi Q., Du Q., Yang Y., Wang J., Oh D.H., Han R. (2023). Marination ingredients on meat quality and safety - A review. *Food Qual. Saf.*, 7, fyad027
7. Grossi A., Søltoft-Jensen J., Knudsen J.C., Christensen M., Orlén V. (2012). Reduction of salt in pork sausages by the addition of carrot fibre or potato starch and high pressure treatment. *Meat Sci.*, 92, 481-489
8. He Z., Huang Y., Li H., Qin G., Wang T., Yang J. (2012). Effect of high-pressure treatment on the fatty acid composition of intramuscular lipid in pork. *Meat Sci.*, 90, 170-175
9. Huang H.W., Wu S.J., Lu J.K., Shyu Y.T., Wang C.Y. (2017). Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, 72, 1-8
10. Kantono K., Hamid N., Oey I., Wu Y.C., Ma Q., Farouk M., Chadha D. (2020). Effect of high hydrostatic pressure processing on the chemical characteristics of different lamb cuts. *Foods*, 9, 1444
11. Kruk Z.A., Yun H., Rutley D.L., Lee E.J., Kim Y.J., Jo C. (2011). The effect of high pressure on microbial population, meat quality and sensory characteristics of chicken breast fillet. *Food Control*, 22, 6-12
12. Latoch A., Czarniecka-Skubina E., Moczowska-Wyrwisz M. (2023). Marinades based on natural ingredients as a way to improve the quality and shelf life of meat: A review. *Foods*, 12, 3638
13. Ma H.J., Ledward D.A. (2013). High pressure processing of fresh meat – Is it worth it? *Meat Sci.*, 95, 897-903
14. Marcos B., Kerry J.P., Mullen A.M. (2010). High pressure induced changes on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. *Meat Sci.*, 85, 115-120
15. Medina-Meza I.G., Barnaba C., Barbosa-Cánovas G.V. (2014). Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 22, 1-10
16. Meloni D. (2019). High-hydrostatic-pressure (HHP) processing technology as a novel control method for *Listeria monocytogenes* occurrence in Mediterranean-style dry-fermented sausages. *Foods*, 8, 672
17. Mokrzycki W.S., Tatol M. (2011). Colour difference ΔE – a survey. *Mach. Graph. Vis.*, 20, 383-411
18. Nguyen L.T., Tay A., Balasubramaniam V.M., Legan J.D., Turek E.J., Gupta R. (2010). Evaluating the impact of thermal and pressure treatment in preserving textural quality of selected foods. *LWT-Food Sci. Technol.*, 43, 525-534

19. Nikmaram N., Budaraju S., Barba F.J., Lorenzo J.M., Cox R.B., Mallikarjunan K., Roohinejad S. (2018). Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Sci.* 145, 245-255
20. O'Neill C.M., Cruz-Romero M.C., Duffy G., Kerry J.P. (2019a). Improving marinade absorption and shelf life of vacuum packed marinated pork chops through the application of high pressure processing as a hurdle. *Food Packag. Shelf Life*, 21, 100350
21. O'Neill C.M., Cruz-Romero M.C., Duffy G., Kerry J.P. (2019b). Comparative effect of different cooking methods on the physicochemical and sensory characteristics of high pressure processed marinated pork chops. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 54, 19-27
22. Pietrzak D. (2010). Perspektywy stosowania wysokich ciśnień w produkcji żywności wygodnej z mięsa drobiowego. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 2(69), 16-28
23. Rajendran S., Mallikarjunan P.K., O'Neill E. (2022). High pressure processing for raw meat in combination with other treatments: A review. *J. Food Process. Preserv.*, 46, e16049
24. Rodrigues I., Trindade M.A., Caramit F.R., Candoğan K., Pokhrel P.R., Barbosa-Cánovas G.V. (2016). Effect of high pressure processing on physicochemical and microbiological properties of marinated beef with reduced sodium content. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 38, 328-333
25. Sazonova S., Galoburda R., Gramatina I. (2017). Effect of high pressure processing on raw pork colour and water holding capacity. In: *Proceedings of 63rd International Congress of Meat Science and Technology*, Cork, Ireland, 610-611
26. Sazonova S., Galoburda R., Gramatina I., Straumite E. (2018). High pressure effect on the sensory and physical attributes of pork. *Research for Rural Development*, 1, 227-232
27. Shahidi F. (1990). The 2-tiobarbituric acid (TBA) methodology for the evaluation of warmed over flavor and rancidity in meat products. In: *Proceedings of 36th International Congress of Meat Science and Technology*, Havana, Cuba, 1008-1014
28. Siroli L., Baldi G., Soglia F., Bukvicki D., Patrignani F., Petracci M., Lanciotti, R. (2020). Use of essential oils to increase the safety and the quality of marinated pork loin. *Foods*, 9, 987
29. Sun X.D., Holley R.A. 2010: High pressure effects on the texture of meat and meat products. *J. Food Sci.*, 75, 17-23
30. Uyarcan M., Kayaardi S. (2019). Effects of high pressure and marination treatment on texture, myofibrillar protein structure, color and sensory properties of beef loin steaks. *Ital. J. Food Sci.*, 31, 573-592

31. Wang C.Y., Huang H.W., Hsu C.P., Yang B.B. (2016). Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 56, 527-540
32. Wang H., Yao J., Gänzle M. (2015). Effect of pressure on quality, protein functionality, and microbiological properties of honey garlic pork chops. In: *Proceedings of 61st International Congress of Meat Science and Technology*, Clermont-Ferrand, France
33. Williams B.J. (2012). Marination: Processing Technology. In: *Handbook of meat and meat processing* (ed. by Y.H. Hui), CRC Press, New York, 495-503
34. Wood J.D., Enser M., Fisher A.V., Nute G.R., Sheard P.R., Richardson R.I., Hughes S.I., Whittington F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.*, 78, 343–358

ŚWIADOMOŚĆ KONSUMENCKA WYBRANEJ GRUPY STUDENTÓW WOBEĆ NAPOJÓW ENERGETYZUJĄCYCH

Jolanta Król, Aneta Brodziak, Kamil Król

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Katedra Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

jolanta.krol@up.lublin.pl

Otrzymano: 5 stycznia 2024

Poprawiono: 19 stycznia 2024

Zaakceptowano: 23 stycznia 2024

Streszczenie

Rynek napojów energetyzujących jest dynamicznie rozwijającą się branżą o wciąż dużym potencjale wzrostu. Na polskim rynku dostępnych jest wiele różnorodnych marek napojów energetyzujących, poczynając od znanych światowych marek takich, jak Red Bull, a kończąc na markach własnych sieci handlowych i stacji benzynowych. Głównymi konsumentami napojów energetyzujących w Polsce, jak również w innych krajach, są osoby młode, w tym studenci. Celem badań była ocena świadomości konsumenckiej studentów na temat napojów energetyzujących z uwzględnieniem preferencji, przyczyn i częstotliwości ich spożywania. Badania przeprowadzono w 2021 roku, przy wykorzystaniu autorskiej ankiety, którą skierowano do 110 studentów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Stwierdzono, że w grupie ankietowanych napoje energetyzujące spożywało przynajmniej raz w życiu ponad 94% studentów. Ankietowani sięgali po napoje energetyzujące przede wszystkim w celu zmniejszenia uczucia senności (75,3%) oraz dostarczenia organizmowi energii (48,2%). Przy wyborze napojów energetyzujących najczęściej zwracali uwagę na smak (70%), cenę (62,4%) oraz markę (42,8%). Ponad 82% respondentów była świadoma, że napoje energetyzujące mają szkodliwy wpływ na zdrowie, jak również, że można się od nich uzależnić. Co ważne, u ponad 34% ankietowanych, którzy kiedykolwiek spożywali takie napoje, wystąpiły niekorzystne objawy, które mogą świadczyć o negatywnym ich wpływie na zdrowie.

Słowa kluczowe: napoje energetyzujące, prawo, skład, kofeina, tauryna, wpływ na zdrowie

CONSUMER AWARENESS OF A SELECTED GROUP OF STUDENTS TOWARDS ENERGY DRINKS

Summary

The market of energy drinks is a dynamically developing industry with still high growth potential. There are many different brands of energy drinks available on the Polish market, ranging from world-famous brands such as Red Bull to own brands of retail chains and gas stations. The main consumers of energy drinks in Poland, as well as in other countries, are young people, including students. The aim of research was to assess the consumer awareness of students about energy drinks, taking into account the preferences, reasons and frequency of their consumption. The research was conducted in 2021, using an original survey addressed to 110 students of the University of Life Sciences in Lublin. It was found that over 94% of the respondents consumed energy drinks at least once in their lives. Respondents most often drank energy drinks to reduce the feeling of drowsiness (75.3%) and provide the body with energy (48.2%). When choosing energy drinks, they predominately paid attention to the taste (70%), price (62.4%) and brand (42.8%). Over 82% respondents were aware that energy drinks have a harmful effect on health and that they can become addicted to them. Importantly, over 34% of respondents who had ever consumed such drinks experienced unfavourable symptoms that may indicate their negative impact on health.

Keywords: energy drinks, law, composition, caffeine, taurine, impact on health

WPROWADZENIE

Definicja i podstawy prawne

Termin napoje energetyzujące, określane również jako napoje energetyczne, był przez lata różnie definiowany. Początkowo określano je jako środki specjalnego przeznaczenia żywieniowego, których zadaniem jest pobudzenie psychofizyczne organizmu oraz zwiększenie jego efektywności w warunkach długotrwałego wysiłku fizycznego i psychicznego [Hoffmann i Świdorski 2008]. Definiowano je jako bezalkoholowe napoje funkcjonalne, które posiadają w swoim składzie szereg aktywnych biologicznie substancji działających pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy, zwalczając objawy zmęczenia oraz poprawiając koncentrację [Wybieralska 2014].

Napoje energetyzujące to bezalkoholowe napoje należące do żywności funkcjonalnej (o ukierunkowanym działaniu na organizm człowieka) ze względu na zawartość aktywnych składników takich, jak kofeina, tauryna, witaminy z grupy B, L-karnityna, glukonolakton czy

kombinacje składników, przykładowo: guarany, korzenia żeń-szenia, inozytolu czy innych [Czernecki i Sosnowska 2015]. Nazwa „napoje energetyzujące” jest jednak tylko terminem handlowym, niezakwalifikowanym prawnie przez UE i odnosi się do różnego rodzaju gazowanych i pobudzających napojów bezalkoholowych. Dotychczas brak odpowiedniej regulacji był powodem zróżnicowanej klasyfikacji w obrębie państw Unii. Przykładowo Belgia, Francja, Niemcy, a także Polska zaliczały je do segmentu napojów orzeźwiających. Kilka krajów wprowadziło środki regulujące etykietowanie, dystrybucję i sprzedaż napojów energetycznych zawierających znaczne ilości kofeiny. Przepisy europejskie [Rozporządzenie 1169/2011] wymuszają dodatkowe oznakowanie kofeiny w przypadku napojów energetyzujących zawierających co najmniej 150 mg/l kofeiny. W załączniku III ww. rozporządzenia, w odniesieniu do napojów, które zawierają kofeinę w proporcji przewyższającej 150 mg/l należy w oznakowaniu umieścić ostrzeżenie: *„Wysoka zawartość kofeiny; nie zaleca się stosowania u dzieci, kobiet w ciąży i kobiet karmiących piersią”*.

Napoje energetyzujące można obecnie sprzedawać we wszystkich państwach członkowskich UE, chociaż niektórzy prawodawcy krajowi zdecydowali się przyjąć bardziej szczegółowe podejście regulacyjne, w tym poprzez określenie zasad sprzedaży nieletnim. Na przykład w Szwecji, Norwegii, Danii i Islandii, z uwagi na wysoką zawartość kofeiny i tauryny, można je dostać tylko i wyłącznie w aptekach. We Włoszech i Francji wprowadzenie na rynek energy drinków wymaga zezwolenia Ministra Zdrowia [Garus-Pakowska i in. 2015]. Z kolei, na Węgrzech w 2012 r. przyjęto „podatek na zdrowie publiczne”, który ma zastosowanie do napojów energetyzujących zawierających kofeinę, a także szeregu innych produktów i składników odżywczych. Z uwagi na wysoką zawartość kofeiny i tauryny, Polska również na wzór innych krajów europejskich, wprowadziła obostrzenia przy wprowadzaniu na rynek napojów z dodatkiem kofeiny lub tauryny [Ustawa z dnia 17 sierpnia 2023 r. o zmianie ustawy o zdrowiu publicznym oraz niektórych innych ustaw]. Od 1 stycznia 2024 r. zgodnie z ustawą będzie obowiązywał zakaz sprzedaży napojów z dodatkiem kofeiny lub tauryny osobom poniżej 18. roku życia; na terenie jednostek systemu oświaty oraz w automatach. Według ustawy, za napój z dodatkiem kofeiny lub tauryny uważa się wyrób w postaci napoju będący środkiem spożywczym, ujęty w Polskiej Klasyfikacji Wyrobów i Usług w klasie 10.89 oraz w dziale 11, w którego składzie znajduje się kofeina w proporcji przewyższającej 150 mg/l lub tauryna, z wyłączeniem substancji występujących w nim naturalnie. W myśl cytowanej ustawy, producent lub importer napoju z dodatkiem kofeiny lub tauryny jest obowiązany do oznaczenia opakowania jednostkowego wyrobu

widoczną, czytelną oraz umieszczoną w sposób nieusuwalny i trwały informacją o treści „*Napój energetyzujący*” lub „*Napój energetyczny*”.

Rynek i spożycie napojów energetyzujących w Polsce

W Polsce napoje energetyzujące stały się popularne w latach dziewięćdziesiątych XX wieku, co zapoczątkowane było pojawieniem się na rynku europejskim w 1987 roku napoju o nazwie Red Bull. Od tego momentu, rynek produkujący napoje energetyzujące rozrastał się w bardzo szybkim tempie [Hoffmann i Świdorski 2008, Paździor i Szymańska 2016]. Obecnie istnieje około 500 firm zajmujących się produkcją i dystrybucją tej grupy napojów, które są sprzedawane w ponad 100 krajach na całym świecie. W Polsce rynek napojów bezalkoholowych (w tym energetyzujących) jest dość rozbudowany. Na rynku dostępnych jest wiele różnorodnych marek, począwszy od znanych światowych marek takich, jak Red Bull, a skończywszy na markach własnych sieci handlowych (Kong Strong, BePower, Rapid) i stacji benzynowych (Lotos Dynamic, Verva). Z raportu Euromonitora dla „Rzeczypospolitej” wynika, że w 2021 r. wartość polskiego rynku napojów energetyzujących wynosiła 2,22 mld zł, natomiast w 2023 r. wzrosła o ponad 40% (3,26 mld zł). Napoje z tej kategorii zanotowały w 2022 roku wzrost wartości o 21% w całym panelu detalicznym w porównaniu do roku poprzedniego. W okresie tym ilość sprzedanych napojów wzrosła o jedną trzecią, osiągając 283 mln litrów. Szacunki Nielsen [2018] wskazują natomiast, że rynek napojów energetyzujących i izotonicznych w Polsce łącznie ma wartość 3,8 mld zł. Przeciętna osoba w Polsce wypija rocznie ponad 3 litry energetyków. Według raportu Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Instytutu Badawczego [Stoś i in. 2021], już dzieci w wieku 3-9 lat sięgają po napoje energetyzujące (2,1%), a częstość spożycia tych produktów rośnie wraz z wiekiem. W grupie nastolatków (10-17 lat) wynosi od 27,4% wśród dziewcząt do 35,7% wśród chłopców.

Skład napojów energetyzujących

Głównymi składnikami napojów energetyzujących są najczęściej: woda, cukry (sacharoza, glukoza, syrop glukozowo-fruktozowy, fruktoza, maltodekstryny), substancje biologicznie aktywne, a także substancje dodatkowe – regulatory kwasowości (np. kwas cytrynowy, cytrynian sodu), aromaty, barwniki (np. błękit brylantowy, antocyjany), substancje konserwujące (sorbinian potasu, benzoosan sodu), przeciwutleniacze (kwas askorbinowy) i dwutlenek węgla. Napoje typu light zawierają natomiast substytuty cukru (acesulfam K, aspartam) [badania własne] – Tabela 1.

Za pożądaną efekt pobudzenia po spożyciu napojów energetyzujących odpowiadają dodane substancje aktywne. Do najczęściej stosowanych należą: kofeina, tauryna, inozytol, L-karnityna, glukuronolakton, ale również guarana, gorzka pomarańcza (*Citrus aurantium*), żeń-szeń (*Panax ginseng*), ekstrakty z miłorzębu japońskiego (*Ginko biloba*), Yerba mate z liści ostrokrzewu paragwajskiego (*Ilex paraguariensi*) i hibiskusa (*Hibiscus*) lub liście koki (*Erythroxylon coca*) [badania własne].

Tabela 1. Skład wybranych napojów energetyzujących dostępnych na rynku
Composition of selected energy drinks available on the market

Nazwa	Producent/ dystrybutor	Zawartość kofeiny (mg/100 ml)	Wartość odżywcza (kcal/100 ml)	Inne składniki czynne
Adrenaline Adrenaline Rush	PepsiCo	80	38 133	ekstrakt z żeń-szenia
BE! Power (Biedronka)	Jeronimo Martins Polska S.A.	32	46	-
Black	Food Care	32	46	tauryna
Blow	Premium Beverages	32	47	-
Burn	Coca-Cola	37	47	-
Energia Lecha	Marcelin Management	32	46	witamina: B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , niacyna, kwas pantotenowy, tauryna
N-GINE	Food Care	32	46	ekstrakt z żeń-szenia
Olimp Dominator	Olimp Labs	33	49,5	tauryna, L-karnityna, tiamina, witamina B ₆ i B ₁₂ , folacyna, kwas pantotenowy, niacyna, biotyna, witamina C
Ozone	Eko-Vit	32	47	tauryna (400 mg), niacyna, witamina: B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , kwas pantotenowy
Red Bull Red Bull Energy Shot	Red Bull GMBH	32 133	45	tauryna, glukuronolakton, witamina z grupy B, inozytol
Tiger	Maspex	32	46	tauryna (0,4%), inozytol (0,02%), ryboflawina, niacyna, kwas pantotenowy, witamina B ₆ i B ₁₂
Green Up Green Up Power Plus	Herbapol	32 48	35 50	wyciąg z guarany

Źródło: Badania własne
Source: Own study

Podstawowymi składnikami bioaktywnymi są jednak kofeina (pochodząca z kawy i guarany), wykazująca działanie pobudzające (zazwyczaj 0,03% składników napoju) i tauryna (endogenny aminokwas niebiałkowy syntetyzowany w organizmie człowieka), wpływająca na koncentrację, czas reakcji i samopoczucie (zazwyczaj 0,4% składników).

Maksymalna ilość kofeiny w zalecanej dziennej porcji w suplementach diety, określona w Uchwale nr 16/2019 Zespołu ds. Suplementów Diety z dnia 25 października 2019 r. [Uchwała 2019], wynosi do 400 mg na dobę, w porcjach podzielonych, pod warunkiem, iż produkt nie zawiera innych składników o synergistycznym działaniu, a porcja kofeiny spożywana jednorazowo nie może przekraczać 200 mg. Natomiast u dzieci spożycie kofeiny nie może być wyższe niż 2,5 mg/kg masy ciała w ciągu doby [Wierzejska 2012]. Puszka napoju energetyzującego (250 ml) zawiera 80-120 mg tego związku. Kofeina wchłania się bardzo szybko z przewodu pokarmowego, a jej maksymalne stężenie we krwi jest osiągane już po ok. 45 min. Spożywana w małych dawkach – 12,5-100 mg/dobę (1-3 mg/kg masy ciała) znosi zmęczenie, poprawia nastrój, zmniejsza senność, poprawia reakcje wzrokowe i słuchowe oraz zwiększa pewność siebie, wydajność, wytrzymałość, kreatywność, zdolność koncentracji i zapamiętywania [Czernecki i Sosnowska 2015]. Jednak nawet w dawce uznanej za bezpieczną (250-300 mg/dobę) może przyczynić się do bezsenności, nerwowości, niepokoju, przyspieszenia oddechu, podrażnienia śluzówki żołądka, wystąpienia nudności, wymiotów, drżenia, hiperglikemii i tachykardii [Bojarowicz i Przygoda 2012, Czernecki i Sosnowska 2015, Rodak i in. 2021]. Spożywanie dużych ilości kofeiny (stymulant), również w połączeniu z dużymi ilościami etanolu (depresant), przyczynia się do wzrostu incydentów sercowych [Said i in. 2020, Zheng i in. 2022]. Według EFSA [2015], spożycie kofeiny w ilości 3 mg/kg masy ciała/dobę może służyć jako podstawa do określenia pojedynczych jej dawek i bezpiecznego dziennego spożycia. Kofeina znalazła również zastosowanie w medycynie, m.in. do leczenia migren czy też chorób o podłożu neurologicznym, ale także ma potencjał we wspomaganiu oddychania u noworodków [Czernecki i Sosnowska 2015, Miziak i in. 2023, Rodak i in. 2021].

Tauryna, pomimo naturalnego występowania w organizmie, musi być dostarczana wraz z pożywieniem. Najlepszym źródłem tego aminokwasu są produkty pochodzenia zwierzęcego, np. ostrygi lub mięso indycze. Dawki terapeutyczne mogą wynosić 3 g/dobę, ponieważ aminokwas ten wolno wchłania się z przewodu pokarmowego [Della 2002]. W napojach energetyzujących ilość tauryny wynosi najczęściej 400 mg/100 ml. Warto jednak podkreślić, że najwyższa dawka bezpieczna została ustalona na poziomie 1000 mg/kg masy ciała/dobę. Tauryna posiada właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne

i immunomodulujące [Surai i in. 2021]. U zdrowych osób odgrywa kluczową rolę w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów, homeostazy ciśnienia krwi i otyłości, głównie ze względu na jej działanie cytoprotekcyjne, przeciwutleniające i przeciwzapalne [Guan i Miao 2020]. Może zatem chronić przed dyslipidemią, otyłością, nadciśnieniem i cukrzycą [Bae i in. 2022]. Jest neuroprzekaznikiem, który stymuluje komórki nerwowe do wzmożonej pracy. Zmniejsza również stratę serotoniny, odpowiedzialnej za poczucie uspokojenia i relaksu, podczas wzmożonej aktywności fizycznej, dlatego też często stanowi składnik napojów dedykowanych sportowcom [Sikora 2008]. Podczas wysiłku fizycznego zmniejsza stężenie mleczanów i wolnych kwasów tłuszczowych, zwiększając tym samym wydolność fizyczną [Czernecki i Sosnowska 2015].

Guarana stanowi ekstrakt z rośliny *Paulinia guarana*, która występuje w Brazylii oraz Wenezueli. W jej nasionach znajduje się kofeina, której przypisuje się działanie pobudzające. W guaranie jest kilkakrotnie razy więcej kofeiny niż w ziarnach kakaowca. Na etykietach napojów energetyzujących, których składnikiem jest guarana, nie podaje się informacji na temat ilości kofeiny znajdującej się w guaranie. W związku z tym pełna zawartość kofeiny w napoju będzie wyższa niż ta, podana na opakowaniu. Dodatek 1 g guarany może zwiększyć zawartość kofeiny o około 40 mg [Cichocki 2012].

Ważnym składnikiem bioaktywnym napojów energetyzujących jest inozytol, określany jako witamina B₈. Występuje naturalnie w surowcach i produktach pochodzenia zwierzęcego i roślinnego. W puszcze napoju energetyzującego (250 ml) jest ok. 50 mg inozytolu, natomiast dzienne zapotrzebowanie wynosi zazwyczaj 1000 mg (500-2000 mg). Uczestniczy w prawidłowym przewodzeniu impulsów nerwowych oraz metabolizmie lipidów, w tym cholesterolu. Wskazuje się również na działanie uspokajające, przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe, przeciwutleniające i przeciwzapalne [Chatree i in. 2020, Liu i in. 2020]. Może powodować podwyższenie ilości fosforu, dlatego też osoby, które spożywają produkty bogate w inozytol, powinny pamiętać o suplementacji wapnia w celu zachowania równowagi fosforanowo-wapniowej [Hoffman i Świderski 2008]. Niedobory inozytolu w organizmie mogą przyczynić się do wystąpienia bezsenności, nerwowości, nadmiernej pobudliwości, wypadania włosów czy bezpłodności [Czernecki i Sosnowska 2015].

Glukuronolakton to składnik również często dodawany do napojów energetyzujących. Występuje naturalnie w niektórych produktach spożywczych, np. w czerwonym winie. Uczestniczy w wydalaniu toksyn z organizmu, obniża senność oraz poprawia koncentrację i samopoczucie [Godala i in. 2013]. Może również ograniczać możliwość pojawienia się kamieni w woreczku żółciowym [Cichocki 2012]. W badaniach na zwierzętach wskazano

jednak na potencjalne działanie szkodliwe w nerkach (zapalenie brodawek nerkowych u szczurów) [Rubio i in. 2022].

L-karnityna jest substancją organiczną, która powstaje w wątrobie, nerkach oraz mózgu. Dzielne zapotrzebowanie organizmu na L-karnitynę wynosi ok. 15 mg. Jej główną funkcją jest metabolizm lipidów, dlatego może powodować zmniejszenie zawartości tkanki tłuszczowej, hamować rozwój otyłości i występowanie miażdżycy. Wykazuje również działanie detoksykujące i antyoksydacyjne [Alhasaniah 2023, Czernecki i Sosnowska 2015].

Popularnym składnikiem są również witaminy z grupy B, tj. witamina B₃ (PP, niacyna) – składnik koenzymów NAD oraz NADP, witamina B₅ (kwas pantotenowy) – składnik koenzymu A, witamina B₆ (pirydoksyna) – prekursor licznych enzymów, niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego i witamina B₁₂ – niezbędna do produkcji erytrocytów, leukocytów i płytek krwi. Ogólnie witaminy z grupy B uczestniczą w metabolizmie węglowodanów, tłuszczów i białek, wspomagają pracę układu nerwowego, działają pobudzająco i likwidują uczucie zmęczenia [Munteanu i Schwartz 2024, Paździor i Szymańska 2016].

Coraz bardziej popularnym dodatkiem są również wyciągi z roślin, np. żeń-szenia (wpływa na poprawę kondycji i wytrzymałość organizmu, pobudza zdolności intelektualne mózgu i opóźnia wystąpienie objawów zmęczenia psychicznego), miłorzębu japońskiego (stymuluje krążenie krwi, wzmacnia i uszczelnia naczynia krwionośne, zwiększa zdolność zapamiętywania) czy zielonej herbaty, zawierającej teinę i teaninę (działanie przeciwnowotworowe i przeciwutleniające, działa pobudzająco, wpływa na poprawę koncentracji). Stanowią one zdrowszą alternatywę w składzie napojów energetyzujących, zwłaszcza dla osób spożywających duże ilości tych napojów.

Wpływ napojów energetyzujących na zdrowie człowieka

Napoje energetyzujące stosowane zgodnie z przeznaczeniem przynoszą wiele korzyści: pobudzają układ nerwowy, skracają czas reakcji, poprawiają funkcje poznawcze oraz mobilizują organizm do dłuższego wysiłku psychicznego i fizycznego [Hoffmann i Świdorski 2008]. Niestety nadmiernie ich spożywanie może prowadzić do niebezpiecznych konsekwencji dla organizmu. Niekorzystny wpływ napojów energetyzujących związany jest przede wszystkim z nadużywaniem znajdującej się w nich kofeiny. Udowodniono, że napoje tego typu mogą powodować odwodnienie, arytmie serca oraz zwiększać ciśnienie tętnicze. Ponadto, prawdopodobnie wywołują bezsenność, bóle głowy, zaburzenia neurologiczne, insulinooporność czy nasilają działanie innych używek, np. alkoholu [Mehwish i in. 2018,

Tarragon i in. 2021]. Badania Wierzbickiej i in. [2013], przeprowadzone na grupie młodzieży szkolnej, wskazały na zaburzenia snu, niepokój i lęk u większości respondentów często sięgających po energetyki. Z powodu dużej zawartości cukru, napoje tego typu mogą także przyczyniać się do rozwoju nadwagi i otyłości [Bleich i Vercammen 2018] oraz nadciśnienia, obniżenia poziomu cholesterolu HDL, a także zwiększenia prawdopodobieństwa wystąpienia choroby niedokrwiennej serca czy próchnicy [Kłosiewicz-Latoszek i Cybulska 2011]. Wskazano także na negatywny wpływ długotrwałego i nadmiernego spożycia napojów energetyzujących na stan morfofunkcjonalny wątroby [Kutia i in. 2020], opisując prawdopodobne mechanizmy działania ich podstawowych składników (cukrów, kofeiny, tauryny, D-glukuronolaktonu, witaminy B₃) na morfologię i funkcjonowanie wątroby oraz łączenie stosowania napojów z alkoholem. Rubio i in. [2022] rozważali również ekspozycję i ryzyko nie tylko ze strony kofeiny, ale także innych skalników (D-glukuronolaktonu i tauryny), wskazując na potrzebę wprowadzenia obowiązkowego podawania ich zawartości.

Należy podkreślić, iż napoje energetyzujące nie mają na celu nawodnienia organizmu, lecz wywołać określony efekt biologiczny – głównie pobudzenie, dodanie energii, zniesienie senności i poprawę koncentracji. Zalecane są do spożycia dla osób będących w okresie wzmożonego wysiłku fizycznego lub intelektualnego, zwłaszcza dla sportowców, menedżerów, kierowców czy studentów podczas sesji.

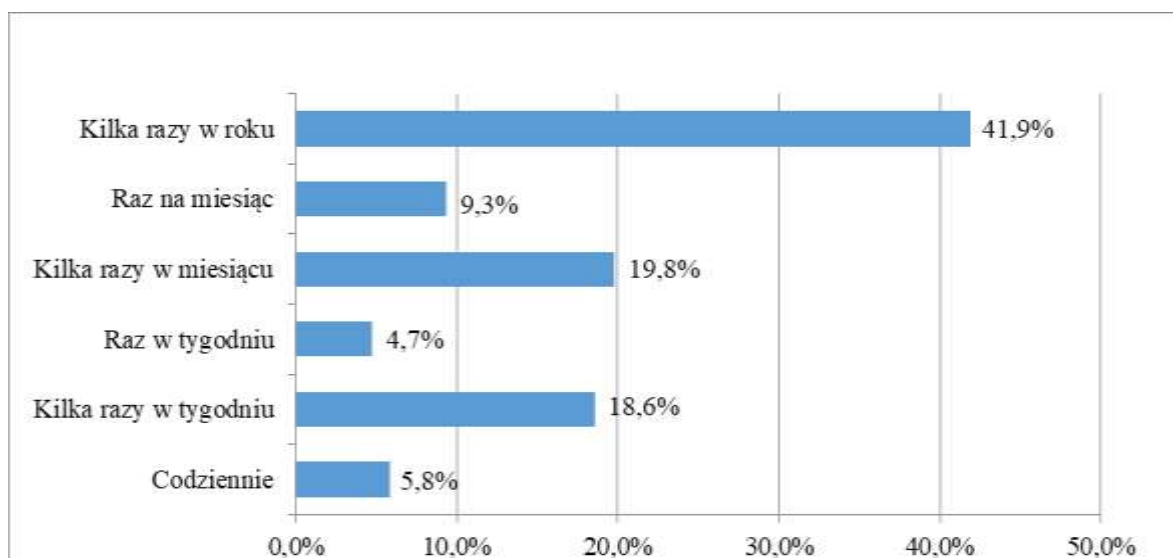
W związku z tym celem badań była ocena świadomości konsumenckiej studentów na temat napojów energetyzujących z uwzględnieniem preferencji, przyczyn i częstotliwości ich spożywania.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono w 2021 roku, z wykorzystaniem autorskiej ankiety, weryfikującej znajomość składu, preferencji i determinantów spożywania napojów energetyzujących oraz częstotliwości spożycia. Kwestionariusz umieszczony został na popularnym portalu społecznościowym, który zrzesza szerokie grono młodych ludzi. Ankieta składała się z 15 pytań. Miały one charakter zamknięty, jednokrotnego, bądź wielokrotnego wyboru. Ankietę skierowano do studentów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Próbie badaną stanowiło 110 osób, z czego 71,8% stanowiły kobiety, a 28,2% mężczyźni.

WYNIKI I DYSKUSJA

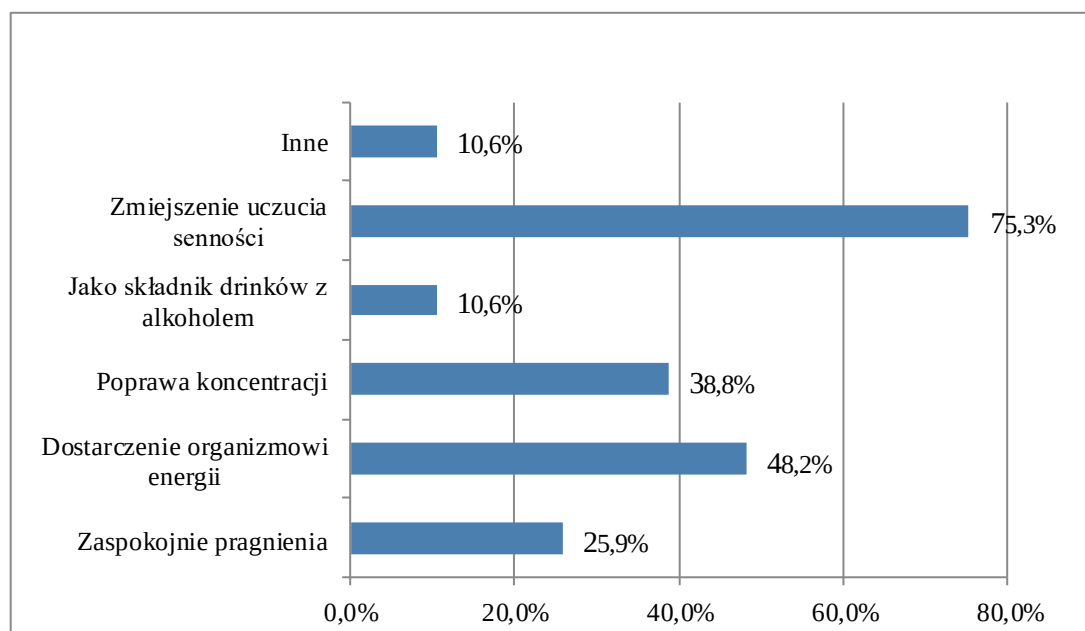
Uzyskane wyniki wskazują, że ponad 94% ankietowanych przynajmniej raz w życiu spożywało napój energetyzujący. Spośród nich najwięcej osób (41,9% ankietowanych) odpowiedziało, że pije napoje energetyzujące kilka razy w roku, 19,8% kilka razy w miesiącu oraz 18,6% kilka razy w tygodniu. Codziennie spożywało je 5,8% badanych (rysunek 1). W badaniu Suwały [2011], na grupie studentów Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie, żadna z osób nie wskazała codziennego spożycia napojów energetyzujących. Co więcej, 17% badanych odpowiedziało, że nigdy nie spożywało tego typu napojów. Spośród osób deklarujących spożywanie napojów energetyzujących, najczęściej (37%) wskazywano na konsumpcję kilka razy w roku. Spożywanie napojów energetyzujących kilka razy w miesiącu zadeklarowało 21% studentów. Należy jednak zaznaczyć, że okres między badaniami Suwały i własnymi wynosił 10 lat. Na podstawie tych badań można więc zauważyć zmiany w preferencjach i zachowaniu współczesnych studentów na rynku. W innym badaniu preferencji konsumenckich - prowadzonym przez Paździor i Szymańską [2016] wzięło udział 106 uczestników, spośród których najwięcej, bo 57% ankietowanych, deklarowało spożywanie napojów energetyzujących rzadziej niż raz w miesiącu, a 32% - raz lub kilka razy w miesiącu. Jedynie 1% respondentów wskazał codzienne spożycie tych napojów. W badaniach Garus-Pakowskiej i in. [2015] do konsumpcji napojów energetyzujących przyznało się 75% ankietowanych, którymi byli studenci dwóch uczelni medycznych. Zdecydowana większość respondentów sięgała po napoje energetyzujące okazjonalnie (rzadziej niż raz w miesiącu) - 42%, a przynajmniej raz w tygodniu - 14% ogółu ankietowanych. Spożywanie napojów energetyzujących prawie codziennie zadeklarowało 2% studentów. Taki sam odsetek wskazał, że sięga po nie nawet kilka razy dziennie. Również studenci z innych krajów [Mintel Market Report 2022, Pavlovic i in. 2023, Protano i in. 2023] deklarowali częste spożywanie napojów energetyzujących. Wśród studentów medycyny i stomatologii w Nigerii aż 80% ankietowanych potwierdziło spożywanie tych napojów. Jednak odnotowuje się zdecydowanie większe zainteresowanie napojami energetyzującymi wśród konsumentów w USA, bowiem aż 52% z nich spożywa je kilka razy w tygodniu lub częściej [Mintel Market Report 2022].



Rysunek 1. Częstotliwość spożycia napojów energetyzujących w badanej grupie studentów
Frequency of consumption of energy drinks in the study group of students

Większość ankietowanych twierdziła, że sięga po napoje energetyzujące w celu zmniejszenia uczucia senności (75,3%), a 48,2% z powodu dostarczenia organizmowi energii. Około 39% respondentów odpowiedziało, że spożywa je, aby poprawić koncentrację, a 25,9% chciało w ten sposób zaspokoić pragnienie. Pozostali studenci zaznaczyli, że kierują się innymi powodami, m.in. namową znajomych lub chęcią zwiększenia wydolności fizycznej przed treningiem (rysunek 2). Jako główny powód stosowania napojów energetyzujących również młodzi ludzie z Małopolski i Podkarpacia wskazali zmniejszenie senności (44,20%), w dalszej kolejności gaszenie pragnienia (26,70%) i poprawę wydolności fizycznej (13,75%) [Błaszczyk-Bębenek i in. 2018]. Z kolei, studenci uczelni medycznych [Garus-Pakowska i in. 2015] wskazali, iż najczęściej spożywali napoje w sytuacjach odczuwania zmęczenia (35%) lub przy wzmożonym wysiłku intelektualnym (32%). Ponad 35% badanej grupy zadeklarowało zwiększenie ilości spożywanych napojów energetyzujących podczas sesji egzaminacyjnej. Również studenci uczelni wyższych w Lublinie [Zagroda i in. 2011] wskazali, iż napoje energetyzujące w głównej mierze stosują w czasie sesji egzaminacyjnej (34%) i kolokwium (26% badanych). Według Zucconi i in. [2013], konsumpcja napojów energetyzujących jest związana ze sportem, gdyż około 52% dorosłych i 41% nastolatków potwierdziła spożywanie napojów podczas uprawiania sportu. Podobne wyniki uzyskano wśród studentów Akademii Wychowania Fizycznego [Joachim i Szoltysek 2013]. Zaledwie 3% deklaroowało, że nie próbowało „energy drinków”. Mając do wyboru napoje energetyzujące i izotoniczne po intensywnym wysiłku fizycznym, 73% respondentów wskazało, że sięgają częściej po napoje energetyzujące dające krótkotrwały przypływ energii, a nie po napoje izotoniczne, które uzupełniają niedobory elektrolitów po treningu.

Zdecydowana większość badanych spożywała napoje w trakcie lub tuż po zakończeniu wysiłku fizycznego (65%). Badania chorwackie [Pavlovic i in. 2023] również wskazują, że studenci uprawiający sport znacznie częściej spożywali napoje energetyzujące.

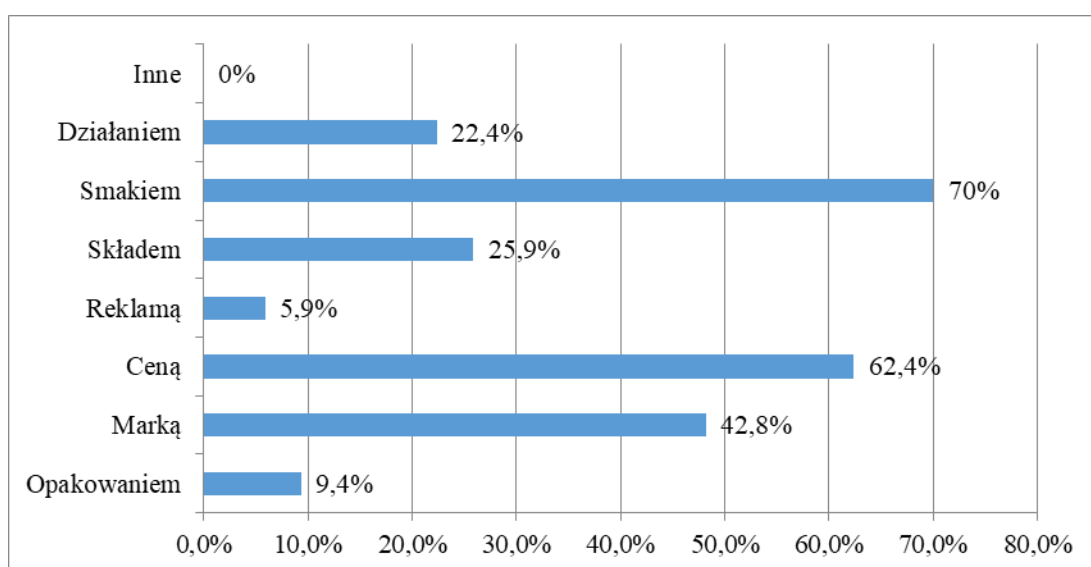


Rysunek 2. Powody spożywania napojów energetyzujących
Reasons for consumption of energy drinks

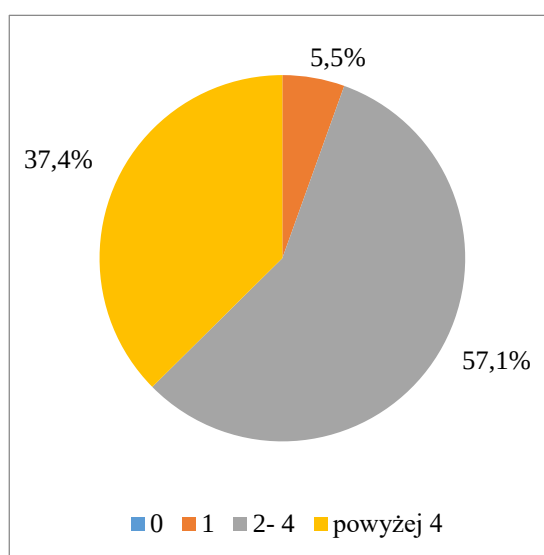
Dla większości ankietowanych w badaniach własnych (70%) kluczowym czynnikiem przy wyborze napojów energetyzujących był smak – rysunek 3. Kierowanie się ceną zaznaczyło 62,4% respondentów. Z kolei, dla 42,8% badanych studentów ważna była marka. Najmniej ankietowanych przy zakupie napojów energetyzujących zwracało uwagę na opakowanie, bądź reklamę. W badaniach Suwały [2011] najważniejszym czynnikiem dla studentów również okazały się walory smakowe i cena. W dalszej kolejności ankietowani wybierali: pojemność opakowania, dostępność produktu na rynku, rodzaj opakowania, opinię znajomych oraz promocje. Najmniej istotnym czynnikiem okazała się reklama. Podobnie Paździor i Szymańska [2016] wskazali, iż kluczową rolę w konsumpcji danego napoju energetyzującego odgrywa smak i cena. Parametry takie, jak zawartość kofeiny, zapach, kaloryczność oraz markę oceniono jako ważne. W badaniach Zucconi i in. [2013] wśród czynników decydujących o zakupie energetyka najczęściej pojawiał się smak napoju (40%). Z kolei, z raportu Mintel Market Report [2022] wynika, że Amerykanie przy zakupie napojów energetyzujących w 2022 roku kierowali się głównie smakiem (40%), ceną (30%) i zawartością kofeiny (28%). Tradycyjny napój energetyczny (np. Monster, Red Bull) w ciągu ostatnich trzech miesięcy spożywało 25% konsumentów.

Walory smakowe oraz cena były głównymi determinantami wyboru w badaniach Garus-

Pakowskiej i in. [2015]. Jednocześnie, posiadanie ulubionej marki napoju energetyzującego zadeklarowało 43% ankietowanych. Wśród marek wymienianych przez respondentów znalazły się: Green up, Red bull, Tiger, Mona vie, Black, Burn, Level up, Blow, Be Power, Bullit i Adrenaline. W badaniach własnych każdy z ankietowanych był w stanie wymienić choćby jedną markę napoju energetyzującego. Największą grupę stanowili respondenci znający od 2 do 4 marek omawianych napojów (57,1%) (rysunek 4). W badaniach innych autorów [Błaszczuk i in. 2013, Semeniuk 2011] ankietowana młodzież również rozpoznawała kilka marek napojów energetyzujących, przy czym dla większości z nich ulubioną marką był Tiger oraz Red bull. Należy podkreślić, że przy zakupie napojów energetyzujących kierowali się głównie ceną, smakiem oraz opinią o producencie/produkcji.

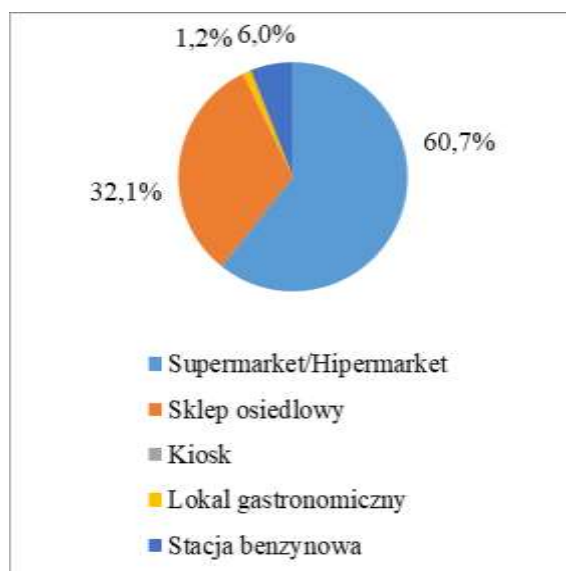


Rysunek 3. Kryteria wyboru napojów energetyzujących
Criteria for selecting of energy drinks



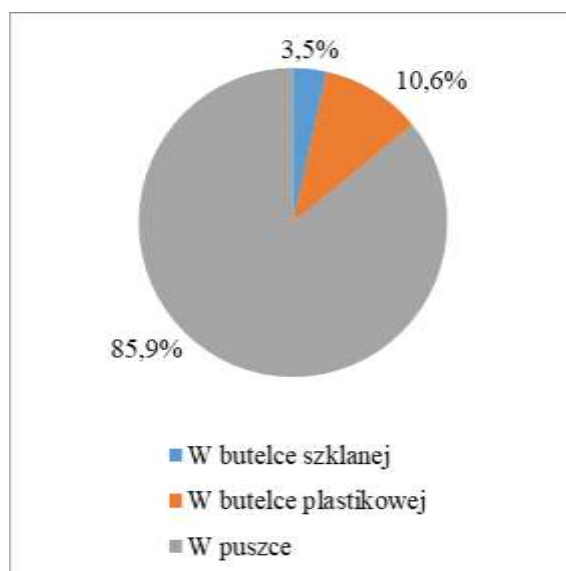
Rysunek 4. Znajomość marek napojów energetyzujących
Knowledge of brands of energy drinks

Miejscami, w których studenci najczęściej dokonują zakupu napojów energetyzujących były supermarkety lub hipermarkety (60,7%) oraz sklepy osiedlowe (32,1%). Rzadziej ankietowani wskazywali na stacje benzynowe (6%) i lokale gastronomiczne (1,2%) – rysunek 5. W badaniach Wielgus i Nowickiej-Pajor [2020] zdecydowana większość respondentów (ok. 82%) jako miejsce zakupów napojów bezalkoholowych preferowała tzw. nowoczesny handel (hiper- i supermarkety). Tylko 4% ankietowanych tego rodzaju zakupów dokonywała w restauracji/barze. Według raportu KPMG [2016], do najpopularniejszych kanałów dystrybucji napojów energetyzujących należą hiper- i supermarkety, dyskonty, sklepy spożywcze oraz stacje benzynowe. Mniejsze znaczenie mają sklepy monopolowe, sklepy internetowe, hotele, restauracje czy bary. Dodatkowo, coraz większą rolę odgrywają maszyny i automaty vendingowe.



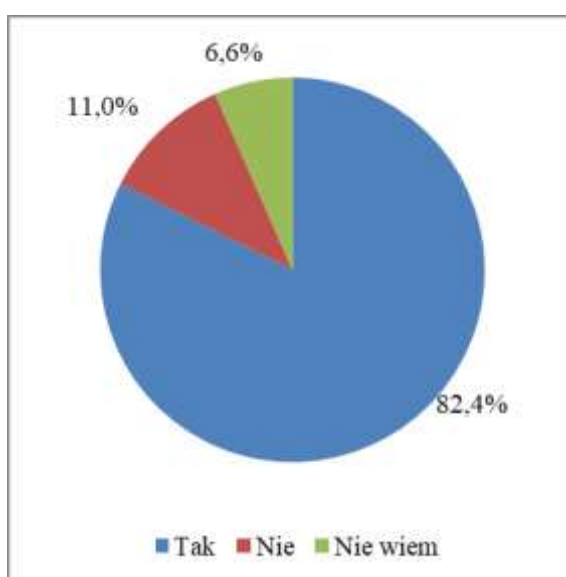
Rysunek 5. Najczęściej wybierane miejsca zakupu napojów energetyzujących
Most frequently chosen places to purchase of energy drinks

Zdecydowana większość respondentów (85,9%) najchętniej wybierała napoje energetyzujące w puszcze, natomiast 10,6% w butelce plastikowej, a zaledwie 3,5% w szklanej (rysunek 6). Również w innych badaniach [Suwała 2011] ponad 50% respondentów wybrało puszkę jako preferowany rodzaj opakowania. Szata graficzna i design opakowania nie były czynnikami decydującymi, ale też nie były całkowicie nieistotne.



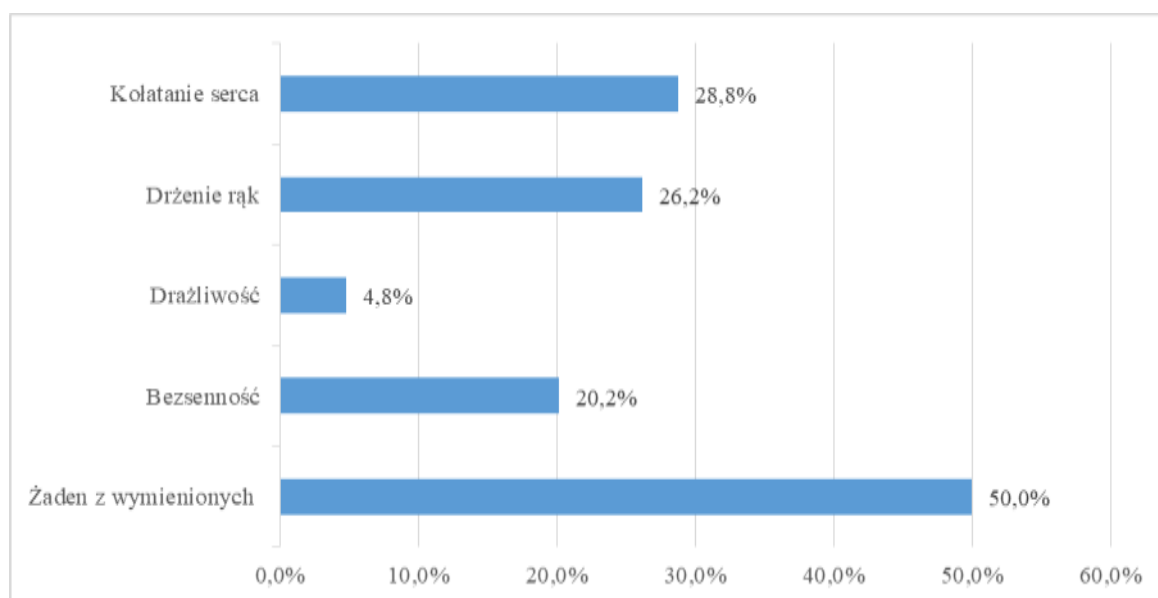
Rysunek 6. *Preferencje studentów dotyczące opakowania napojów energetyzujących*
Preferences of students regarding the packaging of energy drinks

Na pytanie odnośnie zwracania uwagi na skład napoju energetyzującego, jedynie 21% ankietowanych odpowiedziało twierdząco. W badaniu Kopacz i in. [2012] na skład napoju energetyzującego zawsze zwracało uwagę 30,6%, a czasami – 43,6% studentów. Ankietowani najprawdopodobniej byli świadomi zagrożeń wynikających z konsumpcji napojów energetyzujących, ponieważ większość (77,8%) uważała, iż są one niebezpieczne dla zdrowia. W badaniach własnych zdecydowana większość ankietowanych (82,4%) odpowiedziała, że spożywanie napojów energetyzujących jest szkodliwe dla zdrowia. Na brak niekorzystnego ich wpływu na organizm wskazało 11%, a pozostałe osoby (6,6%) nie miały na ten temat zdania (rysunek 7).



Rysunek 7. *Opinia ankietowanych na temat szkodliwości napojów energetyzujących*
Opinion of respondents on the harmfulness of energy drinks

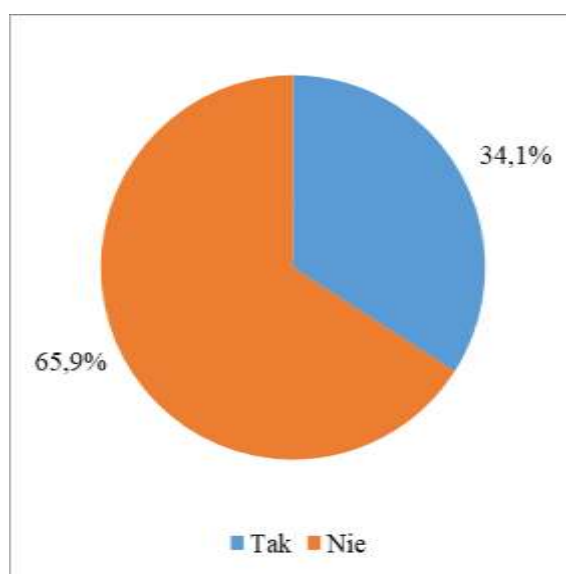
W odpowiedzi na pytanie o występowanie objawów niepożądanych po spożyciu napojów energetyzujących 50% ankietowanych stwierdziło, że nigdy nie wystąpiły u nich niepożądane objawy. Pozostali odczuwali różne negatywne następstwa konsumpcji napojów energetyzujących, tj. kołatanie serca (28,6% respondentów), drżenie rąk (26,2%) oraz bezsenność (20,2%) – rysunek 8. W badaniach Kopacz i in. [2012] najczęstszymi objawami po wypiciu napoju energetyzującego były: pobudzenie (72,9%), kołatanie serca (32,2%) oraz bezsenność (25,8%). Pobudzenie organizmu (54,6%) i bezsenność (23,6%) odczuwała najczęściej młodzież z terenu Bieszczadów [Błaszczuk i in. 2013]. W wielu badaniach [Pavlovic i in. 2023, Protano i in. 2023, Semeniuk 2011] najczęściej zgłaszanymi działaniami niepożądanymi po spożyciu napojów energetyzujących przez ankietowanych były: przyspieszenie akcji serca, pobudzenie, nerwowość, zaburzenia snu, zawroty głowy, trudności w skupieniu uwagi, zaburzenia żołądkowo-jelitowe oraz bezsenność. Studenci uczelni medycznych [Garus-Pakowska i in. 2015] zanotowali także negatywne następstwa konsumpcji napojów energetyzujących. Najczęściej było to kołatanie serca (26%) oraz drżenie rąk (16%). Na wzrost ciśnienia krwi wskazało 5% studentów, a 3% na zawroty głowy. Amerykańskie Centra Kontroli Zatruc oraz Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (USFDA) powiązały spożywanie napojów energetyzujących nawet z możliwymi skutkami śmiertelnymi [Gummin i in. 2020].



Rysunek 8. *Występowanie objawów niepożądanych po spożyciu napojów energetyzujących*
Occurrence of adverse symptoms after consumption of energy drinks

Coraz bardziej popularne w ostatnich latach stały się drinki, które stanowią połączenie napoju energetycznego i alkoholu. Zjawisko to występuje zwłaszcza wśród ludzi młodych

[Motyka i Marcinkowki 2015, Protano i in. 2023]. Napój energetyczny przyspiesza czas wchłaniania alkoholu oraz blokuje jego działanie uspokajające, co sprzyja agresywnym zachowaniom. Może stać się również powodem odwodnienia organizmu, co skutkuje między innymi bólem głowy, biegunką, zmęczeniem i skurczami mięśni [Pennay i in. 2011]. W badaniach własnych 34,1% ankietowanych przyznało, że zdarzało im się łączyć napoje energetyzujące z alkoholem, a 65,9% zaprzeczyło (rysunek 9). W innych badaniach przeprowadzonych wśród studentów [Garus-Pakowska i in. 2015, Pawlas i in. 2017] prawie połowa ankietowanych spożywających napoje energetyzujące zadeklarowała, iż zdarzało im się łączyć taki napój z alkoholem, pomimo znajomości niekorzystnych skutków. Zucconi i in. [2013] wskazali już 10 lat temu, że jednoczesne spożycie napojów energetyzujących wraz z alkoholem jest bardzo wysokie, wynosząc 56% u dorosłych i 53% u nastolatków. W USA w badaniach przeprowadzonych na 606 przypadkowo wybranych studentach wykazano, że ponad 70% ankietowanych spożywało takie drinki. Udowodniono, że wśród tej grupy pojawiały się niebezpieczne zachowania, a były to m.in. prowadzenie pojazdu w stanie nietrzeźwym, wypadki powodujące wszelkiego rodzaju urazy, a nawet większa skłonność do nieostrożnych praktyk seksualnych [Berger i in. 2013].



Rysunek 9. Spożywanie napojów energetyzujących w połączeniu z alkoholem
Consumption of energy drinks in combination with alcohol

Na pytanie dotyczące możliwości uzależnienia się od napojów energetyzujących najwięcej respondentów (79,1%) odpowiedziało twierdząco, 11% nie wiedziało, a 9,9% zaprzeczyło możliwości uzależnienia się od tych napojów. Należy podkreślić, iż w ostatnich latach wzrasta liczba doniesień o problemach związanych z uzależnieniem od kofeiny i jej odstawieniem [Subaiea i in. 2019].

WNIOSKI

1. Wśród badanej grupy studentów niemal każdy (94%) przynajmniej raz w życiu spożywał napój energetyzujący, a najczęstszym powodem spożywania była chęć zmniejszenia uczucia senności oraz dostarczenie organizmowi energii.
2. Kluczowymi czynnikami przy wyborze napojów energetyzujących dla ankietowanych były: smak, cena oraz marka.
3. Ponad 82% respondentów było świadomych, że napoje energetyzujące mają szkodliwy wpływ na zdrowie, jak również, że można się od nich uzależnić.
4. U ponad 34% respondentów, którzy kiedykolwiek spożywali takie napoje, wystąpiły niekorzystne objawy konsumpcji, świadczące o negatywnym ich wpływie na zdrowie.
5. Z uwagi na rosnące zjawisko spożywania i nadużywania napojów energetyzujących przez studentów, istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań z udziałem większej ich grupy. Istotne jest zatem zaangażowanie środowiska akademickiego w realizację badań i upowszechnianie wiedzy w tym zakresie.

PIŚMIENNICTWO

1. Alhasaniah A.H. (2023). L-carnitine: Nutrition, pathology, and health benefits. *Saudi J. Biol. Sci.* 30, 2, 103555
2. Bae M., Ahmed K., Yim J.E. (2022). Beneficial effects of taurine on metabolic parameters in animals and humans. *J. Obes. Metab. Syndr.* 31, 2, 134
3. Berger L., Fendrich M., Fuhrmann D. (2013). Alcohol mixed with energy drinks: Are there associated negative consequences beyond hazardous drinking in college students? *Addict. Behav.* 38, 9, 2428-2432
4. Błaszczuk E., Piórecka B., Jagielski P., Schlegel-Zawadzka M. (2013). Konsumpcja napojów energetyzujących i zachowania z nią związane wśród młodzieży wiejskiej. *Probl. Hig. Epidemiol.* 94, 4, 815-819
5. Błaszczuk-Bębenek E., Jagielski P., Schlegel-Zawadzka M. (2018) Characteristics of energy drink consumption among adolescents from southern Poland. *J. Hyg. Engine. Design* 23, 91-98
6. Bleich S.N., Vercammen K.A. (2018). The negative impact of sugar-sweetened beverages on children's health: an update of the literature. *BMC Obesity* 5, 1, 1-27
7. Bojarowicz H., Przygoda M. (2012). Kofeina. Cz. I. Powszechność stosowania kofeiny oraz jej działanie na organizm. *Probl. Hig. Epidemiol.* 93, 1, 8-13

8. Chatree S., Thongmaen N., Tantivejkul K., Sitticharoon C., Vucenik I. (2020). Role of inositols and inositol phosphates in energy metabolism. *Molecules* 25, 21, 5079
9. Cichocki M. (2012). Napoje energetyzujące - współczesne zagrożenie zdrowotne dzieci i młodzieży. *Przegl. Lek.* 69, 10, 854-860
10. Czernecki T., Sosnowska B. (2015). Napoje energetyzujące a bezpieczeństwo zdrowotne. *Przem. Spoż.* 69, 12, 24-27
11. Della C.L., Crichton R.R., Duburs G., Nolan K., Tipton K.F., Tirzitis G., Ward R.J. (2002). The use of taurine analogues to investigate taurine functions and their potential therapeutic applications. *Amino Acids* 23, 367-379
12. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2015). Scientific Opinion on the safety of caffeine. European Food Safety Authority, Parma, Italy
13. Garus-Pakowska A., Jakubowska A., Gaszyńska E., Szatko F. (2015). Charakterystyka spożycia napojów energetyzujących wśród studentów wybranych uczelni medycznych. *Probl. Hig. Epidemiol.* 96, 4, 776-781
14. Godała M., Szymańska A., Materek-Kuśmierkiewicz I., Szatko F. (2013). Spożycie napojów energetyzujących przez sportowców. Cz. II. Znajomość składu napojów energetyzujących. *Probl. Hig. Epidemiol.* 94, 2, 272-279
15. Guan L., Miao P. (2020). The effects of taurine supplementation on obesity, blood pressure and lipid profile: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Pharmacol.* 885, 173533
16. Gummin D.D., Mowry J.B., Beuhler M.C., Spyker D.A., Brooks D.E., Dibert K.W., Rivers L.J., Pham N.P.T., Ryan M.L. (2020). Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS), 37th Annual Report. *Clin. Toxicol.* 58, 1360-1541
17. Hoffmann M., Świdorski F. (2008). Napoje energetyzujące i ich składniki funkcjonalne. *Przem. Spoż.* 9, 8-13
18. Joachimiak I., Szołtysek K. (2013). Świadomość, stan wiedzy oraz częstotliwość spożycia napojów energetyzujących i izotonicznych przez osoby młode, czynnie uprawiające sport. *Nauki Inż. Technol.* 1, 8, 26-38
19. Kłosiewicz-Latoszek L., Cybulska B. (2011). Cukier a ryzyko otyłości, cukrzycy i chorób sercowo-naczyniowych. *Probl. Hig. Epidemiol.* 92, 2, 181-186
20. Kopacz A., Wawrzyniak A., Hamułka J., Górnickai M. (2012). Badania uwarunkowań spożywania napojów energetyzujących przez studentów. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 63, 4, 491-497

21. Kutia S., Kriventsov M., Moroz G., Gafarova E., Trofimov N. (2020). Implications of energy drink consumption for hepatic structural and functional changes: a review. *Nutr. Food Sci.* 50, 5, 937-953
22. Liu X., Liu C., Chen C., Sun W., Ci Y., Li Q., Song Y. (2020). Combination of inositol hexaphosphate and inositol inhibits liver metastasis of colorectal cancer in mice through the Wnt/ β -catenin pathway. *OncoTargets and Therapy* 3223-3235
23. Mehwish A., Rafia H., Aaveza N., Zunair A., Wasim A. Khan K, Khayyam A., Muneer M. (2018). 4th year MBBS Students: Knowledge and practice for energy drinks consumption and their side effects. *J. Med. Health Sci.* 12, 1405-1409
24. Mintel Market Report (2022). US Energy Drinks. <https://store.mintel.com/report/us-energy-drinks-market-report-2022>
25. Miziak B., Błaszczyk B., Chrościńska-Krawczyk M., Czuczwar S.J. (2023). Caffeine and its interactions with antiseizure medications – Is there a correlation between preclinical and clinical data? *Int. J. Mol. Sci.* 24, 24, 17569
26. Motyka M., Marcinkowki J.T. (2015). Nowe metody odurzania się. Cz. VIII. Napoje energetyzujące łączone z alkoholem. *Probl. Hig. Epidemiol.* 96, 4, 830-838
27. Munteanu C., Schwartz B. (2024). B Vitamins, glucoronolactone and the immune system: Bioavailability, doses and efficiency. *Nutrients* 16, 1, 24
28. NIELSEN (2018). Rynek napojów bezalkoholowych w Polsce
29. Pawlas K., Hołojda P., Brust K. (2017). Ocena spożycia napojów energetycznych oraz ich wpływu na zdrowie człowieka na podstawie badania wśród studentów wrocławskich uczelni. *Med. Środ. – Env. Med.* 20, 39-45
30. Pavlovic N., Miskulin I., Jokic S., Kovacevic J., Miskulin M. (2023). Consumption of energy drinks among university students in Eastern Croatia. *Appl. Sci.* 13, 1124
31. Paździor P., Szymańska I. (2016). Wyróżniki jakości napojów energetycznych w opinii konsumentów. W: *Food Quality Evaluation*, red. Żuchowski J., Zieliński R., Radom, 39-50
32. Pennay A., Lubman D., Miller P. (2011). Combining energy drinks and alcohol – a recipe for trouble? *Aust. Fam. Physician.* 40, 3, 104-107
33. Protano C., Valeriani F., De Giorgi A., Marotta D., Ubaldi F., Napoli Ch., Liguori G., Spica V.R., Vitali M., Gallè F. (2023). Consumption patterns of energy drinks in university students: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* 107, 111904
34. Rodak K., Kokot I., Kratz E.M. (2021). Caffeine as a factor influencing the functioning of the human body – Friend or foe? *Nutrients* 13, 9, 3088

35. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności, zmiany rozporządzeń Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1924/2006 i (WE) nr 1925/2006 oraz uchylenia dyrektywy Komisji 87/250/EWG, dyrektywy Rady 90/496/EWG, dyrektywy Komisji 1999/10/WE, dyrektywy 2000/13/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, dyrektyw Komisji 2002/67/WE i 2008/5/WE oraz rozporządzenia Komisji (WE) nr 608/2004
36. Rubio C., Cámara M., Giner R.M., González-Muñoz M.J., López-García E., Morales F.J., Moreno-Arribas M.V., Portillo M.P., Bethencourt E. (2022). Caffeine, D-glucuronolactone and taurine content in energy drinks: exposure and risk assessment. *Nutrients* 14, 23, 5103
37. Rynek napojów bezalkoholowych w Polsce (2016). Raport-KPMG-wrzesień 2016
38. Said M.A., van de Vegte Y.J., Verweij N., van der Harst P. (2020). Associations of observational and genetically determined caffeine intake with coronary artery disease and diabetes mellitus. *J. Am. Heart Assoc.* 9, 24, e016808
39. Semeniuk W. (2011). Spożywanie napojów energetyzujących wśród studentów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. *Probl. Hig. Epidemiol.* 92, 4, 965-968
40. Sikora E. (2008). Napoje energetyzujące – korzyści i zagrożenia. *Przem. Ferment. Owoc.-Warz.* 3, 7-8
41. Stoś K., Rychlik E., Woźniak A., Ołtarzewski M., Wojda B., Przygoda B., Matczuk E., Pietraś E., Kłys W. (2021). Krajowe badanie sposobu żywienia i stanu odżywienia populacji polskiej. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa
42. Subaiea G.M., Altebainawi A.F., Alshammar T.M. (2019). Energy drinks and population health: consumption pattern and adverse effects among Saudi population. *BMC Public Health* 9, 1539
43. Surai P.F., Earle-Payne K., Kidd M.T. (2021). Taurine as a natural antioxidant: From direct antioxidant effects to protective action in various toxicological models. *Antioxidants* 10, 12, 1876
44. Suwała G. (2011). Analiza konsumenckich kryteriów wyboru napojów energetyzujących na przykładzie kryteriów przyjmowanych przez studentów towaroznawstwa Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie. *Zesz. Nauk. UE w Krakowie* 851, 75-88

45. Tarragon E., Calleja-Conde J., Giné E., Segovia-Rodríguez L., Durán-González P., Echeverry-Alzate V. (2021). Alcohol mixed with energy drinks: what about taurine? *Psychopharmacology* 238, 1-8
46. Uchwała nr 16/2019 Zespołu do spraw Suplementów Diety z dnia 25 października 2019 r. w sprawie wyrażenia opinii dotyczącej maksymalnej ilości kofeiny w zalecanej dziennej porcji
47. Ustawa z dnia 17 sierpnia 2023 r. o zmianie ustawy o zdrowiu publicznym oraz niektórych innych ustaw. *Dz.U.* 2023 poz. 1718
48. Wielgus A., Nowicka-Pajor J. (2020). Strategie wartości dla klientów na rynku napojów bezalkoholowych. Praca licencjacka, Wyższa Szkoła Biznesu – National Louis University, Nowy Sącz
49. Wierzbicka E., Brzozowska A., Dróżdż K. (2013). Ocena ryzyka nadmiernego pobrania kofeiny z dietą w wybranej grupie młodzieży szkolnej. *Probl. Hig. Epidemiol.* 94, 4, 820-824
50. Wierzejska R. (2012). Kofeina powszechny składnik diety i jej wpływ na zdrowie. *Rocz. Państw. Zakładu Hig.* 63, 2, 141-147
51. Wybieralska K. (2014). Determinanty stosowania witaminowo-mineralnych suplementów diety oraz napojów funkcjonalnych przez wybrane grupy konsumentów. *Probl. Hig. Epidemiol.* 95, 1, 70-74
52. Zagroda M., Skibińska A., Polnik P., Prystupa A., Mosiewicz J. (2001). Rozpowszechnienie spożycia napojów energetyzujących wśród studentów uczelni wyższych w Lublinie – badanie ankietowe. *Fam. Med. Primary Care Rev.* 13, 2, 269-272
53. Zheng H., Lin F., Xin N., Yang L., Zhu P. (2022). Association of coffee, tea, and caffeine consumption with all-cause risk and specific mortality for cardiovascular disease patients. *Front. Nutr.* 9, 842856
54. Zucconi S., Volpato C., Adinolfi F., Gandini E., Gentile E., Loi A., Fioriti L. (2013). Gathering consumption data on specific consumer groups of energy drinks. *EFSA Supporting Publications* 10, 3, 394E

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 (**Keywords**)

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