

## Élelmiszerek oxidációs és mikrobiológiai változásainak követése műszeres gyorsmódszerekkel az eltarthatósági idő és a mikrobiológiai biztonság előrejelzése megalapozásához

### Zárójelentés

Az OTKA szerződésünk munkatervének megfelelően vizsgálatokat bogyósgyümölcsök püréivel, tojással és létojás-komponensekkel, valamint egy új doktoranduszunknak a kutatásba bekapcsolódása után a munkaterven túlmenően szeletelt sertéshússal is végeztünk. A zárójelentést e három élelmiszer-típus szerinti csoportosításban közöljük.

#### *1. Bogyósgyümölcs pürék minőségjellemzőinek változásai nagy hidrosztatikus nyomás és tárolás hatására*

A bogyósgyümölcsök különösen értékes növényi nyersanyagaink a nagy érzékszervi/élvezeti értékük és a bennük lévő antioxidáns hatású vegyületek következtében. Célunk az volt, hogy málnából, fekete ribizskéből és szamócából készült püréknek egy új, nem-termikus tartósító kezelés, nagy hidrosztatikus nyomással végzett pasztörözés során, majd 4-5, 10, ill. 20 °C hőmérsékleten végzett tárolás közben bekövetkező változásait kövessük nyomon különféle műszeres módszerekkel, összehasonlítva őket ekvivalens mikrobiológiai hatású hőkezeléses tartósítás és a pasztörözést követő tárolás során észlelhető minőség-változásokkal. Azt kívántuk megállapítani, hogy az új technológia nyújt-e, s mennyiben jobb minőség-megőrzési lehetőséget. Az összehasonlítás alapjául a különböző kísérleteinkben 300 és 600 MPa közötti 5 perces hidrosztatikus nyomáskezeléssel, ill. 80 ill. 90 °C-on 5 vagy 15 perces hőkezeléssel pasztörözött minták szolgáltak.

A mikrobiológiai hatást élőcsíraszám-meghatározással, ill a tárolás folyamán automatikus impedimetriás módszerrel (Malthus Microbiological Analyzer) ellenőriztük. A polifenol-tartalom meghatározása Folin reagenssel, spektrofotometriásan történt. Az érzékszervi minősítést 10 tagú bíráló bizottság végezte, a minták tárolás közbeni viszkozitás-változásának a mérésére HAAKE Roto-Visco készüléket használtunk. A minták színét tristimulusos színméréssel jellemeztük. Az antioxidáns kapacitás mérése hidrogén-peroxiddal indukált luminol-oxidáció gátlásának luminometriás mérésével folyt. Az antocianinok, fenolok és szerves savak elemzésére és az aszkorbinsav-tartalom vizsgálatára HPLC-

technikákat alkalmaztunk. A komplex illó anyag összetétel változásának követésére egy kémiai szenzor-sort, ún. elektronikus orrot (NST 3320. típus, Applied Sensor AG, Linköping, Svédország) alkalmaztunk. A mintákban oldott állapotban lévő összetevők jellemzésére egy másik szenzor-sort, ún. elektronikus nyelvet ( $\alpha$ -ASTREE készülék) is kipróbáltunk. Megkíséreltük közeli infravörös reflexiós spektrumaik segítségével is jellemezni a kísérleti mintákat és változásaikat. A minták vizsgálati eredményeinek a kezelések szerinti elkülönülésének statisztikai értékelésére egyes műszeres jellemzők adatainak kemometriás analízisét is végrehajtottuk. Eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

- 1) A kétféle pasztöröző kezelés egyaránt inaktíválta a gyorsfagyasztott málna és fekete ribiszke nyersanyagból készített püré-mintákban viszonylag kis számban jelenlévő, romlást okozó mikroorganizmusokat. A pasztöröző kezeléseket csupán a termékek igen kis pH-ján szaporodni nem is képes baktériumspórák élték túl.
- 2) A minták aszkorbinsav-tartalmát a 80 °C-on 5 perces hőkezelés átlagosan mintegy 23 %-kal, a 600 MPa-os nyomás-kezelés átlagosan kb. 13 %-kal csökkentette.
- 3) A hőkezelt és a nyomás-kezelt minták tristimulusos színjellemzői közül a sárga ( $b^*$ ) színjellemzőben mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség a hőkezelt minták és a kezeletlenek között. A hőkezelés után mért, nagyobb  $b^*$  értékek barnulási folyamatokra utalhatnak. Ezek a különbségek azonban nem voltak olyan nagyok, hogy a minták egyébként intenzív eredeti színe mellett vizuálisan is érzékelhető különbségekben is megnyilvánulhattak volna.
- 4) Az összes antocianin-tartalom mintegy 20 %-kal csökkent a 80 °C-on 5 percig hőkezelt, s csupán 3 %-kal a 600 MPa-on nyomáskezelt mintákban.
- 5) Érdekes tapasztalatunk volt, hogy a szamócapüré minták tárolása folyamán a hőkezelt mintákéval ellentétben a nyomáskezelt minták viszkozitása megnőtt, különösen a hűtött mintáké.
- 6) Az elektronikus orral végzett mérések adatainak diszkriminancia analízise a kezeletlen mintákat jobban elkülönítette a hőkezelttől, mint a nyomáskezeléssel pasztörözöttektől.
- 7) Az elektronikus nyelv használata nem bizonyult olyan érzékeny elkülönítő módszernek, mint az elektronikus orr.

- 8) A luminometriás antioxidáns-kapacitás mérés a párhuzamos eredmények nagy szórása miatt meglehetősen bizonytalan volt, de arra utalt, hogy mindkét kezelés tendenciájában, de egymástól statisztikailag nem szignifikánsan különbözve, csökkentette az antioxidáns kapacitást.
- 9) A NIR spektrumok minőségpont (PQS) módszerrel való értékelése nem mutatott számottevő különbségekre a kontrol és a kezelt minták között.

A tárolhatóság szempontjából, különösen a nem-termikusan pasztörözött termékeknél esetleg számolni kell szöveti enzimes folyamatok tárolás közbeni megnyilvánulásával. Ezért a Leuveni Katolikus Egyetem Élelmiszertechnológiai Laboratóriumával együttműködésben vizsgáltuk szamócából izolált polifenol-oxidáz enzim-preparátum hőkezelés ill. hidrosztatikus nyomás okozta inaktiválódása kinetikáját és a két kezelés kombinációjának a hatását. Az inaktiválódás kétfázisú kinetikát mutatott. A hőstabilabb enzim-frakció inaktiválódása elsőrendű kinetikai modellel kellően leírható volt. A kombinált kezelés enzim-inaktiváló hatása szinergens volt, kivéve a nagyhőmérsékletű melegítést, amely esetén antagonista hatás jelentkezett. A kombinált kezelés inaktivációs sebességi állandójának hőmérséklet/nyomás függése másodrendű polinom modellel volt leírható.

A tárolás közbeni minőség-változások fekete-ribiszke pürén végzett vizsgálatai szerint a tárolási hőmérséklettől (4 °C vs. 20 °C) nagymértékben függtek, különösen a legérzékenyebbek bizonyult aszkorbinsav- és antocianin-tartalom csökkenés, jelezve, hogy a pasztörözött termékek minőségmegőrzése csak hűtőtárolás esetén biztosítható. Az aszkorbinsav-tartalom mindkét módon végzett pasztörözés termékeiben csökkent, de a 8 heti hűtőtárolás végén a hőkezelt terméké volt a kisebb. Nem enzimes barnulás a 8 heti tárolás folyamán csupán a szobahőmérsékleten tartásnál volt számottevő.

Az eredményeket összegezve az a következtetés volt levonható, hogy bár egyes minőségjellemzőket tekintve a nyomáskezelt bogyógyümölcs termékek jobb minőségben készíthetők, mint a hőkezeléssel pasztörözöttek, ez a jobb minőség még hűtőtárolás esetén is csak akkor lesz megőrizhető, ha nyomás-kezelés előtt a terméket vákuumozással megszabadítjuk a püré készítésekor belekeverődő oxigéntől (levegőtől). Az elektronikus orr vizsgálataink szerint alkalmas lehet a vizsgált gyümölcs-termékek romlásának és aroma-minősége változásának gyors és objektív mérésére.

## 2. Tyúktojás és komponenseinek változásai nem-termikus pasztörözési módszerek alkalmazásának a hatására

Az ételfertőzések gyakorisági statisztikáját vezető élelmiszerek közé a tojás és a tojással készült termékek tartoznak, ezért a tojást, ill. élelmiszeripari és vendéglátóipari nyersanyagként használt tojás-melanzsot vagy a külön is forgalmazott fehérjét és sárgáját fogyasztásuk mikrobiológiai biztonsága érdekében érdemes volna mikroba-pusztító beavatkozásnak alávetni. A tojás fő komponensei azonban hőkezelésre nagyon érzékenyek, s már enyhe hőterhelés is ronthatja funkcionális tulajdonságaikat.

Az 1970-es évek vége óta a tojással közvetített fő kórokozó baktérium a *Salmonella* Enteritidis, amelyről kiderült, hogy, bár viszonylag kis gyakorisággal, egyes fág-típusai már a fertőzött tojó szervezetében, a tojás kialakulása közben is bekerülhetnek a képződő tojásba és 10 °C-nál nagyobb hőmérsékleten az intakt tojás belsejében is tovább szaporodhatnak. Felületi fertőtlenítéssel az ilyen belső szennyezettség nem szüntethető meg, s ha a tojást meg is főzik, olyan mérvű főzést, amelynél a tojás-sárgája még nem szilárdul meg, a *Salmonella* Enteritidis túlélheti. Felmerült ezért, hogy a héjas tojás egészének a fertőtlenítését próbáljuk meg „hideg úton”, kellő áthatolóképességű gamma sugárkezeléssel, a folyékony tojástermékek esetén pedig a besugárzáson kívül alternatívaként alkalmazzuk az újabb nem-termikus pasztörözési technológiát, a nagy hidrosztatikus nyomást is. Vizsgálataink célja az volt, hogy megállapítsuk, ezek a nem-termikus, de mikrobiológiailag hatékony technológiák nem járnak-e, ill. milyen mértékben járnak a nem mikrobiológiai minőség-jellemzők változásaival.

A héjas tojást 0.5 és 3.0 kGy közötti, különböző sugárdózisokkal kezelve sugárdózistól függő mértékű változásokat tapasztaltunk:

A besugárzott tojások feltörésekor a tojásfehérjének a friss friss tojásra jellemző, „sűrű fehérje”-része nem jelentkezett, s a fehérje egészének a fokozott szétterülése, valamint a sárgája burkoló-membránjának a „törékenysége” miatt a sárgája kiszakadása következett be a „tükörtojásban”. Vizsgáltuk a kezeletlen tojásokéhoz viszonyítva a besugárzott tojások fehérjéjének a felferhetőségét és hab-stabilitását és érzékszervi bíráló bizottság bevonásával a sárgájuk színét és „lágytojások” készítése után azok illatát és állományát is. Megállapítható volt, hogy a szalmonellák

besugárzásos inaktiválásához minimálisan szükséges 1.5 kGy-s sugárdózis már kisebb-nagyobb nemkívánatos változásokat okozott a funkcionális tulajdonságokban és az érzékszervi jellemzőkben. Ezek mértéke azonban még nem volt akkora, ami miatt a sugárkezelt tojás használata a mikrobiológiai veszélyekre különösen érzékeny fogyasztói populációk, ill. bizonyos ipari felhasználók számára kompromisszumos megoldásként ne volna ajánlható.

A folyékony tojásfehérje besugárzás vagy a hidrosztatikus nyomás-kezelés hatására bekövetkező változásainak jellemzésére dinamikus pásztázó mikroklorimetriát (mikro-DSC vizsgálatokat), spektrofluorometriás méréseket, „elektronikus orral” végzett vizsgálatokat és közeli infravörös spektroszkópiát is használtunk. A tojássárgája lé nem-termikus pasztörözéseit követően pedig karotinoid-tartalom, valamint lipid- és koleszterin-oxidáció vizsgálatokat végeztünk.

A sugárkezeléssel ellentétben, amelynél a fentiek szerint inkább bizonyos mérvű fehérje-degradáció következett be, a nagy hidrosztatikus nyomás alkalmazása esetén a tojásfehérje komponenseinek a nyomás-kezelés mértékétől függő, a DSC-vizsgálatokkal (SETARAM MicroDSC III. típusú készülékkel) jól követhető denaturációja volt tapasztalható, ami a triptofánnak tulajdonítható, JOBIN-YVON spektrofluoriméterrel mért fluoreszcencia-spektrum változásában is megnyilvánult. Az elektronikus orral végzett vizsgálatok a tojásfehérje illó komponenseinek összetételében jeleztek változásokat mindkét nem-termikus kezelés hatására, de az azonos mikrobiológiai hatású besugárzás után nagyobb mértékben, mint a nyomás-kezelés esetén. A METRINIR 10-17 (Merika Kft., Budapest) készülékkel végzett NIR-spektroszkópiát (a második derivált spektrumokat) csakúgy, mint az elektronikus orr szenzorjainak jelválasztait különféle kemometriai adatfeldolgozó módszerekkel értékeltük. Az alkalmazott multivariáns statisztikai módszerekként a hazai kidolgozású (Dr. Kaffka Károly és munkatársai által bevezetett) polár-spektrum transzformációs és „minőségpont” technikát (Polar Qualification System, PQS) és az ugyancsak hazai METRIKA cég Sample Recognition Tool (SRT) szoftverjét, valamint összehasonításként főkomponens analízist (PCA), kanonikus diszkriminancia analízist (CDA), illetőleg az utóbbi két módszer kombinációját is alkalmaztunk. Az elektronikus orral kapott eredményeket illetően a PCA és a CDA módszerek kevésbé érzékeny elválasztást adtak, mint a PQS módszer és a főkomponens analízis volt a legkevésbé hatékony osztályozó technika. A második derivált NIR spektrumok kemometriás elemzésekor már a kanonikus diszkriminációs analízis is jól elkülönült

adat-klaszterokat eredményezett a kezeletlen és a kétféle kezeléssel pasztörözött (3 kGy, ill. 400 MPa) minták között. A legjobb elválasztási hatásúnak ez esetben is a PQS technika, továbbá az SRT algoritmus használata bizonyult, a kereszt-validáció szerint 100 %-os mértékben elkülönítve egymástól a kezelésektől függően a NIR spektrumokat.

A folyékony tojássárgája vizsgálatait tekintve, a sugárkezelés számottevő karotinoid degradációt okozott, míg a nyomáskezelésnek nem volt ilyen hatása. A tojássárgája lipidjeinek a peroxid száma is szignifikáns mértékben megnőtt a sugárkezelés hatására, míg a nyomáskezelés esetén ilyen jellegű lipid-oxidáció csupán a tojássárgája nyomáskezeléses pasztörözése utáni hűtőtárolás folyamán jelentkezett. Koleszterin oxidációs termékek képződése elhanyagolhatóan csekély mértékű volt mindkét nem-termikus pasztöröző kezelésnél és a termékminták 1 hónapnyi hűtőtárolása folyamán.

A folyékony tojás-komponensek vizsgálataiból a következő összefoglaló következtetések voltak levonhatók:

- 1) Mikrobiológiailag eredményes, pasztöröző hatás elérhető a folyékony tojás-komponenseknek mind besugárzásos, mind nagy hidrosztatikus nyomásos kezelésével.
- 2) A kétféle nem-termikus pasztörözési módszer azonban kisebb-nagyobb mérvű, részben a kezelés mibenlétére specifikus fiziko-kémiai változásokat is okoz.
- 3) A sugárkezelés a fehérje-viszkozitás csökkenésében is megnyilvánuló részleges degradációval, a tojássárgája színanyagainak degradációjával és lipidjeinek részleges oxidációjával jár, s idegen illat képződik, ami a fehérjeminták elektronikus orral való, komplex illóanyag-vizsgálatával is jellemezhető.
- 4) Nyomáskezeléssel mind a tojásfehérjében, mind a sárgájában a kezelés mértékétől függő fehérje denaturáció is jelentkezik, ami a nyomás nagyságának tovább növelésével aggregálódást (gélképződést) is okoz. Ezek a hatások DSC mikrokalorimetriával is jól jellemezhetőek.
- 5) A nemkívánatos minőségváltozások megelőzése érdekében a sugárzásos pasztörözést célszerű a tojástermékek fagyasztott állapotában végezni.

- 6) Figyelemre méltó, hogy a hidrosztatikus nyomás indukálta géleknek a főzés során kialakulókétől eltérő megjelenési formája és reológiai jellemzői vannak, ami bizonyos gyártásfejlesztési szempontból kiaknázható lehet.

### *3. Hűtve, aerob csomagolásban tartott szeletelt sertéshús minőség-változásainak detektálása és követése műszeres gyorsmódszerekkel*

Annak tanulmányozását, hogy műszeres gyorsmódszerek milyen lehetőséget biztosíthatnak gyorsan romló és a kereskedelmi forgalomban gyakran nem megfelelő etikával forgalmazott élelmiszerek frissességének elvesztése és romlásának a hagyományos ellenőrzési eljárásoknál jobb és hatékonyabb ellenőrzésére, szeletelt és aerob csomagolásban tartott sertéshúst választottunk. A romlást okozó baktériumok szaporodásának monitorozására automatikus konduktimetriát, a komplex illóanyag együttes változásának jellemzésére elektronikus orral végzett „head-space” vizsgálatokat, a komplex kémiai változások összességének gyors észlelésére közeli infravörös spektroszkópiát használtunk. A kísérleti tételek tárolási hőmérséklete egymást követő kísérlet-sorozatainkban 4, 8 és 12 °C volt.

A baktérium-szaporodást a húsminták homogenátuma célszerű hígításaival beoltott, megfelelő impedimetriás tápoldatokkal képezett tenyészeteket Malthus Microbiological Analyzer típusú automatikus konduktimetriás eszközrendszerben inkubáltuk 30 °C-on. A tenyészetek konduktancia változását a műszer automatikusan és folyamatosan regisztrálta. A konduktimetriás szaporodási görbék változásának idő-függéséből megállapítható „detekciós időtartamokat” hagyományos, szélesztéses lemezöntéses élőcsíraszám-adatokkal, mint referenciákkal vetettük össze. A baktérium-szaporodási görbék kinetikai paramétereit a ComBase nemzetközi prediktív mikrobiológiai adatbázis szoftverjei közül a DMfit programcsomag használatával állapítottuk meg. Lineáris regressziót tapasztaltunk a logaritmikus élőcsíraszámok és a konduktimetriás detekciós idők között. Megállapítható volt, hogy az igen munkaigényes és hosszan tartó (napokat igénybe vevő) hagyományos, lemezöntéses élőcsíra-számolási módszerrel ellentétben a konduktimetriás módszerrel 8 órán belül kideríthető, hogy húsminták romlást okozó, pszichotróf baktérium-populációjának a grammonkénti élőcsíraszám a romlottság szempontjából kritikus  $10^7$  szintet elérte, vagy meghaladta-e.

Az érzékszervileg észlelhető változások regisztrálása mellett az elektronikus orr kemoszensor jeleinek az adatfeldolgozásakor a húsvizsgálataink kapcsán is főkomponens analízist (SensTool szoftver-csomaggal) és kanonikus diszkriminancia analízist (SPSS 10 statisztikai szoftver) alkalmaztunk és a részleges legkisebb négyzetek (PLS)- regresszió-számítással modelleztük a kemoszensor jelek alapján becsülhető és a mért élőcsíraszámok közötti kapcsolatot. Robusztusabb kalibrációs modell érdekében szenzor-szelekciós technikával kiválasztottuk a 23 szenzor közül azt a kilencet, amelyek meghatározóak voltak az elektronikus orr hatékonysága szempontjából, mert ily módon csökkent szenzor számmal is, a redundáns információk elhagyásával lényegében alig változott a korrelációs koefficiens ( $r=0.899$ ,  $0.890$  helyett) és a standard hiba (SEP) logaritmusos élőcsíraszámokban kifejezett értéke (SEP =  $0.352$  logaritmusos élőcsíraszám,  $0.326$  helyett). Ez a tapasztalatunk lehetőséget ígér arra, hogy a jövőben néhány szenzorból álló, hordozható, specifikus módszerrel is lehetővé válhat hasonló, de helyi ellenőrzésre alkalmas technikát megvalósítani, ami a húsok bakteriológiai romlása korábban vagy legalábbis az olfaktorikussal észlelhetővel egyidejűleg ad objektív eredményt.

A bakteriológiai vizsgálatainkkal egyidőben a három hőmérsékletű tárolás-sorozat folyamán párhuzamos mintákon elvégzett NIR (diffúz-reflektancia) spektrumfelvételek az  $1000 - 1800$  nm hullámhossz-tartományra korlátozva, a második derivált spektrumok képzésével és multiplikatív szórás korrekcióval végzett adat-előkezelést alkalmazva kíséreltük meg a húsminták frissességének a tárolási időtől függő elvesztésével, ill. baktériumos romlásával járó kémiai összetételi változások jellemzését. Ehhez itt is főkomponens analízist, kanonikus diszkriminancia analízist és a PLS kemometriai model (a műszeresen előre-jelelhető és a ténylegesen mért „aerob összes élőcsíraszám” közötti korreláció) számítását használtuk. A PLS-regresszió korrelációs koefficiens ( $r = 0.977$ ) és az élőcsíraszám becslés standard hibája (SEP =  $0.438$  logaritmusos egység) ez esetben is ígéretesnek mutatkozott ahhoz, hogy a közeli infravörös diffúziós reflektancia méréseket multivariáns statisztikai módszerekkel kombinálva húsminták frissességének elvesztését, ill. bakteriológiai romlását ilyen spektroszkópiai gyorsmódszerrel is detektálni lehet. Kellően megbízható és a gyakorlati életben is alkalmazható műszeres ellenőrzés megalapozása azonban még sok további, hasonló kísérletet igényel.



## *Epilógus*

Az OTKA projektünk keretében elvégzett és e zárójelentésben összefoglalt alapozó kutatómunkánk részletei már megjelent vagy közlés alatt lévő publikációinkban megtalálhatók.

Beszámolónkban itt bemutatott kutatómunkánk tapasztalatai megerősítették azt a meggyőződésünket, hogy az élelmiszer-minőség és annak változásai felügyeletének egyre inkább szükségessé váló, tudományos továbbfejlesztése multidiszciplináris megközelítést igényel, amely során egyaránt fel kell használni az alkalmazott élelmiszer-fizika, az élelmiszer-mikrobiológia és –kémia ismeretanyagát és az ezek komplex vizsgálatára képes, gyors, főként roncsolás-mentes műszeres eljárásokat kell fejleszteni. Az élelmiszer-lánc korszerű jogszabályozására törekvőknek, az élelmiszerek forgalmazásában érintett vállalkozásoknak, az illetékes kormányzerveknek és a fogyasztóknak egyaránt érdeke, hogy az élelmiszerek minőségéről és az élelmiszer-tételek „nyomon-követhetőségéről” teljes körű információk álljanak rendelkezésre. Erre szükség van abban az értelemben is, hogy milyen kezeléseken ment át az élelmiszer, s milyen időtartam/hőmérséklet-történet van mögötte, mert ezek a frissességre és a minőségre, különösen a gyorsan romló termékekre, nagymértékben hatnak. Az ezt célzó kutatások kezdeti eredményei azt ígérik, hogy hosszabb távon lehetővé válhat olyan „multi-szenzor” típusú érzékelők kifejlesztése, amelyek a gyors fizikai technikák ötvözésével és miniatürizált változataik révén hordozható, helyszíni vizsgálatra is alkalmas ellenőrzési „fegyvertárat” jelentenének. Munkánk ilyen irányú folytathatóságát csak akkor remélhetjük, ha a 2006-ban benyújtott, „Development of nondestructive instrumental methods and their chemometric analyses for evaluation of processing and storage effects on quality parameters of selected foods” című, NI típusú OTKA pályázatunk anyagi támogatást nyer.