

W pracach nad podnoszeniem poziomu jakościowego polskiego mleka szczególna rola przypada jego producentom i organom urzędowego nadzoru. Podstawowe nawyki higieniczne konieczne przy użytkowaniu mleka i zrozumienie potrzeby ich stosowania są niestety, obce większości polskich producentów mleka. Udokumentowana już dawno prawda, że jakość mikrobiologiczna mleka zależy głównie od higieny jego uzyskiwania, a zastosowanie tzw. minimum sanitarnego (czystość wymion, rąk naczyń) pozwalała na kilkusetkrotne obniżenie ogólnej liczby bakterii w mleku, nie znajdują ciągle jeszcze powszechnego zrozumienia u dostawców mleka (6, 7, 19, 41, 44). Nie można pominąć także znaczenia negatywnych przesłanek ekonomicznych (m. in. zbyt niska zapłata za mleko), które nie wpływają mobilizująco na producentów mleka.

W tej sytuacji zaznacza się szczególna rola służby sanitarno-weterynaryjnej. Ustawą z 6 listopada 1992 r. — o zmianie ustawy o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia, poszerzony został zakres uprawień służby weterynaryjnej w nadzorze sanitarnym nad zdrowotną jakością mleka. Dotyczy on, poza pozyskiwaniem mleka, także jego transportu i przetwórstwa. Oznacza to nie tylko poszerzenie kompetencji polskiej służby wet., ale konieczność jej ściślejszej specjalizacji, opracowania odpowiedniego systemu kontroli jakości mleka i rzeczywiste egzekwowanie postanowień prawnych.

Piśmiennictwo

1. Rocznik statystyczny 1992. GUS, Warszawa 1992.
2. Bonczar G., Jawoszek M., Maindok B., Sas E.: Przegł. ml. nr 10, 27, 1989.
3. Bonczar G., Morava P.: Przegł. ml. nr 1, 1, 1991.
4. Bujak H., Fronczek R., Króliński J.: Życie wet. 68, 114, 1993.
5. Burzyński A.: Przegł. ml. nr 5, 27, 1985.
6. Burzyński A.: Przegł. ml. nr 3, 15, 1988.

7. Burzyński A., Zajac M.: Przegł. ml. nr 2, 13, 1987.
8. Council Directive 92/43/EEC of 16 June 1992.
9. Czykier-Wieźba D.: Przegł. ml. nr 2, 17, 1992.
10. Fabjańska E.: Przegł. ml. nr 3, 18, 1988.
11. Fabjańska E.: Przegł. ml. nr 7, 10, 1988.
12. Fabjańska E.: Przegł. ml. nr 6, 18, 1991.
13. Proposal for a Council Directive amending the Annexes to Council Directives 83/332/EEC and 83/353/EEC. Com (92) 161 final, Brussels 30 April 1992.
14. Górski J., Nikodemowska E.: Przegł. ml. nr 1, 18, 1991.
15. Intern. Dairy Federation: Detection of inhibitors in milk and milk products. Bull. No 220, 1987.
16. Intern. Dairy Federation, Bull. No 2, 262/1992.
17. Juszkiewicz T., Kozak A., Dmytrow-Wisniewska H.: Medycyna Wet. 49, 351, 1993.
18. Juszkiewicz T., Niewiadomska A.: Medycyna Wet. 40, 323, 1984.
19. Kielsznia R.: Przegł. ml. nr 4, 19, 1991.
20. Kisza J.: Przegł. ml. nr 3, 3, 1990.
21. Kisza J.: Przegł. ml. nr 1, 1, 1993.
22. Kretowska-Kulas M.: Przegł. ml. nr 6, 12, 1989.
23. Krojer M.: Milchwiss. 58, 153, 1973.
24. Krzyżanowski J., Łopuszyński W., Krakowski L., Szczubiak M.: Medycyna Wet. 49, 14, 1993.
25. Krzyżanowski J., Szczubiak M., Krakowski L., Łopuszyński W., Sieradzki J.: Medycyna Wet. 48, 84, 1992.
26. Lipińska E.: Przegł. ml. nr 7, 34, 1988.
27. Lipińska E.: Przegł. ml. nr 3, 59, 1992.
28. Majewski T.: Medycyna Wet. 41, 21, 1985.
29. Malinowski E., Kłossowska A. i wsp.: Medycyna Wet. 48, 216, 1992.
30. Miłko K.: Przegł. ml. nr 3, 23, 1983.
31. Miłko K.: Przegł. ml. nr 2, 9, 1989.
32. Mołska J.: Przegł. ml. nr 3, 97, 1987.
33. Mołska J.: Zarys mikrobiologii mleczarskiej. PWRiL, Warszawa, 1988.
34. Mołska J., Beldzikowska W., Celejewska M.: Przegł. ml. nr 6, 134, 1992.
35. Piątkiewicz A.: Przegł. ml. nr 6, 11, 1988.
36. Pijanowski E.: Zarys chemii i technologii mleczarstwa. T. 1, PWRiL, Warszawa 1980.
37. PN-77/A-86031. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne.
38. PN-81/A-83002. Mleko surowe do skupu.
39. PN-91/A-86033. Mleko. Wykrywanie antybiotyków i innych substancji hamujących.
40. Regulation EEC No 2377/90. Annexes I and III. Brussels 1990.
41. Sawicka J., Herma B., Bonczar G.: Przem. spoż. nr 4, 10, 1986.
42. Skibniewska K. A., Smoczyński S.: Przegł. ml. nr 5, 4, 1989.
43. Uści-Rauva E., Mołska J.: Przegł. ml. nr 4, 35, 1986.
44. Zajac M., Burzyński A.: Przegł. ml. nr 2, 17, 1985.
45. Zajac M., Burzyński A.: Przegł. ml. nr 7, 19, 1988.
46. Zapletal P.: Przegł. ml. nr 2, 59, 1992.
47. Zmarlicki S., Bender E., Zakrzewski E.: Przegł. ml. nr 6, 4, 1991.
48. Żmudziński J., Juszkiewicz T.: Medycyna Wet. 48, 213, 1992.
49. Węgierska norma dla mleka surowego. MSZ 3393, 1992.

Adres autora: prof. dr hab. Elżbieta Pelczyńska, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

PIOTR SZYMAŃSKI, ZDZISŁAW E. SIKORSKI

artykuł przeglądowy

Zastosowanie metod enzymatycznych do oznaczania świeżości ryb

Katedra Technologii Utrwalania Żywności, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, ul. Narutowicza 11/12, 80-552 Gdańsk-Wrzeszcz

Wprowadzenie

Obiektywnym wskaźnikiem świeżości może być związek łatwo i szybko oznaczalny, który w świeżo złowionej rybie danego gatunku jest nieobecny lub występuje w stałych ilościach, zaś w czasie przechowywania surowca tworzy się lub rozkłada ze stałą szybkością. Nad stworzeniem obiektywnych wskaźników świeżości ryb pracuje się szczególnie w Japonii, ze względu na duże spożycie surowych produktów rybnych. Takie surowe dania, sporządzone z ryb nie pierwszej świeżości, mogłyby być potencjalnie dużym zagrożeniem zdrowotnym dla konsumenta.

Świeżość surowca stanowi zwykle o jego przeznaczeniu i w konsekwencji o jego cenie. Do przy-

rządania tradycyjnych japońskich potraw z surowych ryb, np. tuńczyków, nadaje się tylko surowiec przechowywany w lodzie nie dłużej niż około 2 dni. Taka ryba uzyskuje na rynku w Tokio cenę wielokrotnie wyższą niż surowiec przeznaczony do innego rodzaju przetwórstwa. Zatem w warunkach dużej konkurencji wśród eksporterów, stosowanie obiektywnego wskaźnika świeżości ułatwia ustalenie warunków obrotu surowcami, zapewniających zachowanie ich jakości po dostarczeniu na giełdę i uzyskanie odpowiedniej ceny.

Tak istotna ocena świeżości ryb w okresie do około 1—2 dni po połowie sprawia największe trudności. Nie jest łatwo sensorycznie ocenić stopień świeżości ryby w pierwszych dniach po złowieniu i przewidzieć jak długo zachowa ona pożądaną

cechy jakościowe w czasie przechowywania w lodzie. Dlatego dużą przydatność mają testy obiektywne, świadczące o skutkach biochemicznych przemian w tkankach. W pierwszym okresie po śnięciu ryby w przemianach jakości nie uczestniczą jeszcze w dużym stopniu procesy mikrobiologiczne. Zatem do obiektywnej oceny świeżości ryb w tym okresie można stosować tylko metody oparte na reakcjach katalizowanych przez enzymy endogenne.

Zasada oznaczeń

Obecnie jako zasadę wielu oznaczeń świeżości wykorzystuje się reakcje degradacji ATP:



gdzie ATP — adenzyno-5'-trifosforan, ADP — adenzyno-5'-difosforan, AMP — adenzyno-5'-monofosforan, IMP — inozyno-5'-monofosforan, HxR — incyzyna, Hx — hipoksantyna, X — ksantyna i U — kwas moczowy.

IMP, nadający pożądany smak mięsu ryb, nagromadza się bardzo szybko w wyniku działania dezaminazy adenylowej. Fosfomonoesterazy defosforują IMP do obojętnej smakowo HxR, przekształcanie następnie w gorzką Hx. Szybkość rozkładu nukleotydów zależy od stopnia zmęczenia ryby w czasie połowu oraz od gatunku, temperatury przechowywania, pH i wielu innych czynników.

Etapy rozkładu HxR oraz Hx determinują szybkość przemian w szlaku. W czasie przechowywania ryb te związki akumulują się w mięśniach. Zatem o stanie świeżości ryby świadczy zawartość w mięsie różnych produktów rozkładu ATP. Wskaźnik świeżości ryb zdefiniowano (3) jako:

$$K = \frac{\text{HxR} + \text{Hx}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx}} \cdot 100\%$$

Świeżo złowioną rybę charakteryzują wartości K rzędu kilku ‰. Po 1—2 dniach przechowywania w lodzie wartość ta wzrasta do około 20‰, m.in. w przypadku mięsa mintaja i dorsza pacyficznego. Taka wartość wskaźnika K często jest już zbyt wysoka, by zaklasyfikować surowiec do I klasy świeżości.

Wskutek szybkiego rozpadu ATP, ADP i AMP, zawartość tych nukleotydów w mięsie można pominąć już po upływie pierwszej doby po śnięciu ryby. Korzysta się więc również z uproszczonej formy wskaźnika:

$$K_1 = \frac{\text{HxR} + \text{Hx}}{\text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx}} \cdot 100\%$$

Badania zawartości HxR i Hx w mięśniach różnych gatunków ryb wskazują, że związki te w rybach danego gatunku występują względem siebie w stałych stosunkach ilościowych (1). Według kryterium stosunku stężenia HxR do Hx, gatunki ryb zaklasyfikowano do trzech grup:

1. grupa gatunków tworzących HxR ($\text{HxR}/\text{Hx} > 5$), do których należą m.in.: tuńczyki, halibuty, makrele, ostroboki, sardela japońska, śledź pacyficzny i krewetki,

2. grupa gatunków tworzących Hx ($\text{Hx}/\text{HxR} > 5$), do których zalicza się niektóre ryby płastugowate, skorpenowate, kulbinowate i głowonogi,

3. grupa gatunków pośrednich np.: większość dorszowatych, łososiowatych i węgorzowatych.

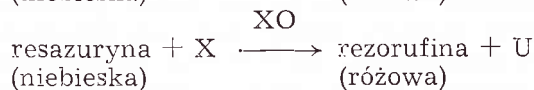
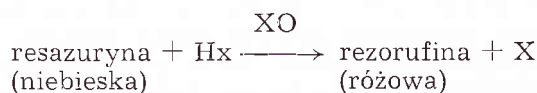
Taki podział daje możliwość uproszczenia oznaczeń. Świeżość ryb tych gatunków, które należą do grupy tworzących Hx można scharakteryzować wartością wskaźnika H:

$$H = \frac{\text{Hx}}{\text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx}} \cdot 100\%$$

nieznacznie tylko różniącą się od wartości wskaźnika K_1 (5).

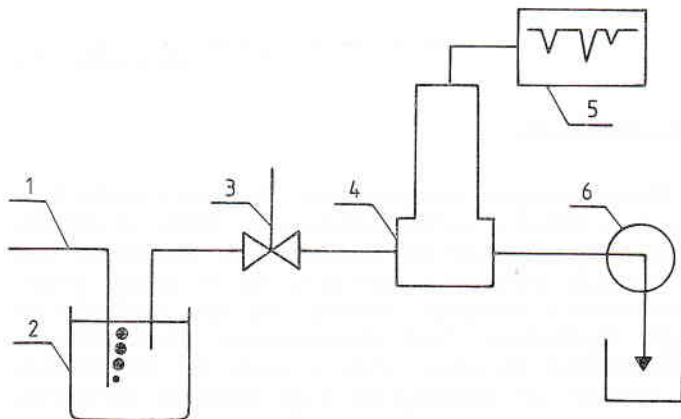
Metody oznaczeń

Jedną z prostszych metod badania świeżości ryb polega na oznaczaniu stężenia Hx przez zastosowanie enzymatycznych pasków testowych. Stężenie Hx wzrasta liniowo w czasie pierwszych kilku dni przechowywania ryb. Zanurzenie paska, zawierającego unieruchomioną oksydazę ksantynową (HO) i resazurynę, w ekstrakcie z tkanki mięśniowej wywołuje zmianę barwy zredukowanego wskaźnika z niebieskiej na różową (2).



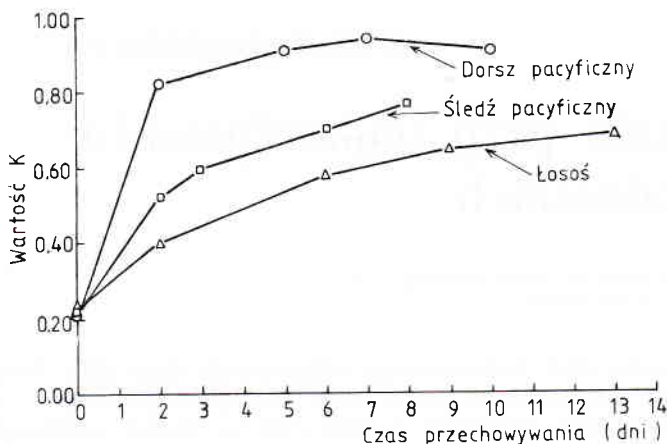
Wadą metody jest możliwość tylko orientacyjnego wstępnego oznaczenia stężenia Hx, podobnie jak przy określaniu pH za pomocą papierków wskaźnikowych. Nie jest to zatem wystarczająco precyzyjna metoda badania świeżości ryby.

Dokładniejsze wyniki pomiarów stężeń Hx, w postaci wartości liczbowych, daje zastosowanie specyficznego czujnika enzymatycznego (7). Wartością mierzoną jest spadek natężenia prądu, proporcjonalny do zmniejszenia stężenia tlenu w próbce. Próbkę wcześniej napowietrza się w celu nasycenia jej tlenem, używanym w reakcjach enzymatycznych podczas oznaczenia. Określenie stężenia Hx jest możliwe po wyznaczeniu krzywej wzorcowej. Połączenie membrany zawierającej kowalencyjnie unieruchomioną XO z elektrodą tlenową, umożliwi wielokrotne wykorzystanie czujnika bez utraty aktywności enzymu.



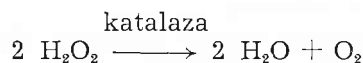
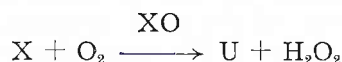
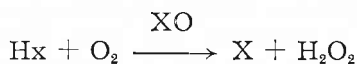
Ryc. 1. Schemat aparaturowy oznaczania produktów degradacji ATP metodami enzymatycznymi w ekstraktach mięśni

Objaśnienia: 1 — powietrze, 2 — bufor, 3 — nastrzyk próbki, 4 — czujnik enzymatyczny, 5 — rejestrator, 6 — pompa perystaltyczna.



Ryc. 2. Zmiany wartości K próbek z mięśni przechowywanych w lodzie. Badano ekstrakty mięśni metodą polarograficzną, wg (4)

Do oznaczeń Hx stosuje się również połączenie membrany z osadzoną na niej oksydazą ksantynową z elektrodą polarograficzną (6). Oznacza się nadtlenek wodoru oraz kwas moczowy tworzący się podczas reakcji enzymatycznej. Niestabilny w roztworze nadtlenek wodoru można rozłożyć przez immobilizację katalazy.



Wówczas oznacza się tylko kwas moczowy (5).

Przez jednoczesne unieruchomienie nukleotydyazy (NT), fosforylasy nukleozydowej (NP) oraz XO, w podobny sposób za pomocą jednej elektrody można oznaczyć IMP. Wykorzystując małą kolumnę anionitową oraz zestaw burorów eluujących produkty rozkładu ATP i regulujących aktywność enzymów można kolejno otrzymać wszystkie dane niezbędne do wyznaczenia wartości K_1 (8).

Istnieje również zmodyfikowana metoda, pozwalająca określić wartość K_1 przez zastosowanie układu czterech elektrod: elektrody tlenowej, jako elektrody odniesienia, czujnika Hx, czujnika HxR oraz czujnika IMP (9).

Ostatnio opracowano metodę oznaczania związków szlaku degradacji ATP przez ich rozdzielanie techniką elektroforezy kapilarnej i detekcję w UV (5). Stężenia związków oblicza się na podstawie porównania powierzchni pików elektroforegramu uzyskanego przy badaniu ekstraktu z elektroforegramem ekstraktu ze znaną ilością dodatku wzorców. Wprawdzie koszt aparatury do elektroforezy kapilarnej jest bardzo duży, lecz najdroższe elementy w zestawie: detektor, zasilacz wysokiego napięcia i rejestrator, są jednakowe z używanymi w innych technikach rozdzielania substancji. Wobec tego, w celu pełniejszego wykorzystania sprzętu, można je stosować np. w chromatografii cieczowej lub spektroskopii masowej. Ponadto w skład zestawu do CE wchodzi kapilara oraz zbiorniczki z buforem, w których zanurza się elektrody zasilacza i końce kapilary. Zaletą stosowania CE do wyznaczania wartości K jest

zmniejszenie ilości operacji niezbędnych do wykonania oznaczeń.

Podsumowanie

Wszystkie przedstawione metody mają szansę szerszego zastosowania wobec dostępności sprzętu technicznego, preaktywowanych membran oraz enzymów. Zarówno przygotowanie próbek, jak i same oznaczenia nie są czasochłonne, a zastosowanie komputera do rejestracji i obróbki danych dodatkowo skraca czas oczekiwania na wynik. Do przygotowania próbek i wyznaczenia wartości K_1 metodą wykorzystującą układ czterech elektrod potrzeba 15 minut, w tym do samego oznaczenia — 8 minut.

Trwałość czujników enzymatycznych pozwala na ich przechowywanie od 15 do 30 dni w temperaturze 5°C , a stabilność enzymów umożliwia wykonanie do 100 oznaczeń z powtarzalnością wyników w zakresie błędów od 3 do 8%.

Firma EAC Corp. (Japonia) rozpoczęła niedawno sprzedaż papierków wskaźnikowych do testowania świeżości ryb, skorupiaków i mięsa. W związku ze wzrostem konsumpcji świeżych ryb i sprzedażą gotowych dań z ryb, można oczekiwać zwiększenia popytu na proste metody określania świeżości ryb. Wyznaczanie wartości K stosuje się również w praktyce laboratoryjnej do określania świeżości ryb przeznaczonych do badań naukowych.

Piśmiennictwo

1. Ehira S., Uchiyama H.: Determination of fish freshness using K value, an index for estimating the freshness of fish.; International Symposium on Seafood Quality Determination. Anchorage 1986, Alaska, USA.
2. Jahns F. D., Howe J. L., Coduri R. J., Rand A. G.: Food Technol. 30 (7), 27, 1976.
3. Karube I., Matsuoka H., Suzuki S., Watanabe E., Toyama K.: J. Agric. Food Chem. 32, 314, 1984.
4. Luong J. H. T., Male K. B., Huynh M. D.: J. Food Sci. 56, 335, 1991.
5. Luong J. H. T., Male K. B., Masson C., Nguyen A. L.: J. Food Sci. 57, 77, 1992.
6. Mulchandani A., Luong J. H. T., Male K. B.: Anal. Chim. Acta 221, 215, 1989.
7. Watanabe E., Toyama K., Karube I., Matsuoka H., Suzuki S.: J. Food Sci. 48, 493, 1983.
8. Watanabe E., Toyama K., Karube I., Matsuoka H., Suzuki S.: J. Food Sci. 49, 114, 1984.
9. Watanabe E., Endo H., Takeuchi N., Hayashi T., Toyama K.: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 52, 189, 1986.

Adres autora: Piotr Szymański, ul. Leczkowa 18/510, Gdańsk-Wrzeszcz

EAST I. J., KERLIN R. L., EISEMANN C. H.: Zahamowanie wzrostu larw *Lucilla cuprina* karmionych surowicą owiec otrzymujących leki przeciw pasożytnicze. (Reduced growth of *Lucilla cuprina* fed serum from sheep treated with anthelmintics). Aust. Vet. J. 69, 286—287, 1992 (11)

Prześledzono wpływ trzech leków przeciw pasożytniczych stosowanych u owiec, a mianowicie chlorowodoru lewamizolu (8,0 mg/kg), closantelu (7,5 mg/kg) i ivermectinu (0,2 mg/kg) na rozwój *Lucilla cuprina*. Zarówno ivermectin, jak i closantel znacznie hamowały tempo wzrostu larw *L. cuprina* hodowanych in vitro na surowicy owiec leczonych tymi preparatami. Natomiast surowica owiec leczonych chlorowodorkiem lewamizolu nie wywierała działania hamującego. To hamujące działanie ivermectinu utrzymywało się przez okres 6 dni po zaprzestaniu leczenia, a closantelu przez 21 dni. Niższe dawki leków działały znacznie słabiej hamująco na wzrost larw. Okres 21 dni, w którym utrzymuje się aktywność closantelu w pełni wystarcza do ochrony owiec przed *L. cuprina*.