

Eugenia PODGÓRSKA

Wpływ procesu fermentacji alkoholowej na zawartość patuliny w podłożu

The Effect of Alcohol Fermentation Process on the Content of Patulin in the Bedding

Patulina jest toksycznym produktem metabolizmu grzybów powodujących zgniliznę owoców. Jak wykazują wyniki wielu badań (7, 10, 12, 16), jest ona obecna w sokach owocowych, stanowiąc tym samym zagrożenie dla zdrowia konsumentów. W a r e z współpr. (16) przeanalizował 13 próbek soku jabłkowego znajdującego się w sprzedaży i wykazał, że 8 z nich zawierało patulinę w stężeniach od 44 do 309 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, a S c o t t i K e n n e d y (12) wykryli od 20 do 120 μg tej toksyny w dm^3 pięciu gatunków kanadyjskiego soku jabłkowego. Inne doniesienia (cyt. za 7) wskazywały na jej obecność w ilościach od 55 do 610 μg w kg soku zagęszczonego wyprodukowanego we Francji.

W Polsce badania nad obecnością patuliny w soku jabłkowym prowadzili C z e r w i e c k i (3), L i p o w s k a i in. (7). C z e r w i e c k i w okresie roku nie stwierdził obecności patuliny w próbkach soków i napojów jabłkowych spotykanych w handlu, natomiast Lipowska i in. wykazali w 34% badanych próbek zagęszczonych soków jabłkowych zawartość patuliny do 50 μg w kg soku, a w 22% próbek – powyżej tej ilości. Udowodniono również (7), że w procesie zagęszczania soków następuje obniżenie zawartości patuliny średnio o 24% i że istnieje ścisła zależność pomiędzy stopniem porażenia surowca mokrą zgnilizną a zawartością patuliny w moszczu. Patulinę wykryto także w sokach winogronowych (13). Jeżeli obok owoców zdrowych do produkcji wina zostaną włączone spleśniałe i nadgniłe grona, to wtedy obecność patuliny, szczególnie ze względu na jej znaczną stałość w soku winogronowym, może być niebezpieczna dla zdrowia konsumenta.

Winogrona, a w naszym kraju jabłka stanowią podstawowy surowiec do produkcji win. P o g o r z e l s k i (10) wykazał obecność patuliny w winie wyprodukowanym z surowca porażonego mokrą zgnilizną w ilości 15 mg/dm^3 , a Lipowska i in. (8) stwierdzili, że podczas fermentacji następuje zmniejszenie zawartości toksyny poniżej poziomu możliwego do wykrycia. Podobne wyniki uzyskali S t i n s o n i współpr. (15) oraz S c o t t i współpr. (13) badając wina sporządzone z moszczów jabłkowych i winogronowych zawierających toksynę. Wyniki badań nad zawartością patuliny w cydrach dowiodły, iż tylko w nielicznych produktach stwierdzono obecność tej toksyny (11).

Zmniejszanie się koncentracji patuliny podczas fermentacji lub jej całkowity zanik może wynikać z obecności siarczynów, wobec których patulina nie jest stabilna, lub z metabolicznej aktywności komórek drożdży (1). Hipoteza ta jest oparta m. in. na wyosobnieniu mutantów *Saccharomyces cerevisiae*, szczególnie wrażliwych na patulinę (6).

Jeżeli w procesie fermentacji alkoholowej w obecności patuliny powstają nie określone dotąd produkty, to mogą być one biologicznie czynne i mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumenta, gdyż jak wykazali C i e g l e r i współpr. (2), produkty reakcji patuliny z cysteiną zachowują działanie teratogenne w testach na zarodkach kurzych.

Do produkcji wina owocowego wykorzystuje się niejednokrotnie jabłka porażone mikroflorą grzybową, dlatego podjęto badania celem określenia wpływu fermentacji alkoholowej prowadzonej przez różne szczepy drożdży winiarskich na zawartość patuliny w podłożu.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

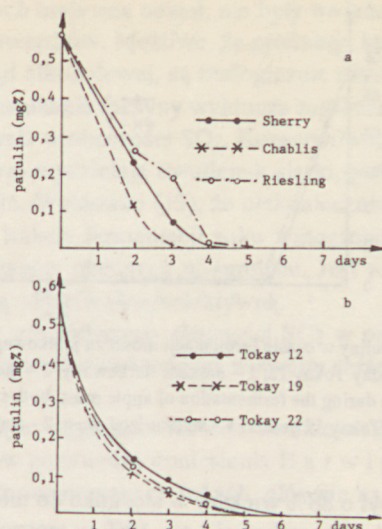
W prowadzonych badaniach stosowano jako podłoża fermentacyjne pożywkę mineralną wzbogaconą w witaminy, moszcz jabłkowy siarkowany, z którego przed użyciem usuwano SO_2 przez gotowanie, i niesiarkowany koncentrat jabłkowy. Stosowane do fermentacji podłoża dosładzano do zawartości 20% sacharozy. Moszcz jabłkowy oraz koncentrat pochodziły z Milejowskich Zakładów Przetwórstwa Owocowo-Warzywnego.

Pożywkę zawierającą w 1 cm^3 5,7 μg patuliny firmy Serva szczepiono drożdżami winiarskimi Tokay 12, 19 i 22 oraz Chablis, Sherry i Riesling. Kontrolę stanowiły podłoża bez patuliny poddawane fermentacji alkoholowej.

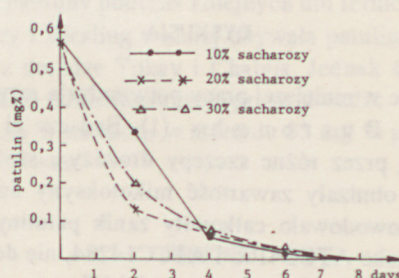
Fermentację prowadzono w temp. 25°C w kolbach stożkowych z czopami fermentacyjnymi. W pobieranych próbkach oznaczano zawartość alkoholu metodą podaną przez K e l l e r m a n n a (5), zawartość SO_2 mikrometodą z p-rozaniliną (9), zawartość ekstraktu refraktometrycznie, zawartość patuliny metodą chromatografii cienkowarstwowej (12), korzystając z płytek firmy Merck z żelem krzemionkowym, w układzie rozpuszczalników a) chloroform-aceton w stosunku objętości 9 : 1, b) toluen-octan etylu-90% kw. mrówkowy (5 : 4 : 1). Do wywołania plam stosowano 0,5% roztwór hydrazonu-3-metylo-2-benzotiazolinonu (MBTH), a do oznaczeń ilościowych densytmeter TLC firmy Vitatron.

PRZEBIEG I WYNIKI BADAŃ

Fermentacja alkoholowa pożywki mineralnej zawierającej w swoim składzie patulinę przebiegała, przy zastosowaniu różnych szczepów drożdży winiarskich, prawidłowo. Zawartość ekstraktu zmniejszyła się z 19% do 9,5-7,5% po 8 dobach fermentacji, a alkoholu etylowego wzrosła do 6-7,0% objętości w zależności od użytych drożdży. Nie stwierdzono obecności SO_2 . Zawartość patuliny zmniejszyła się znacznie po dwóch dobach fermentacji, średnio od 71 do 80%, po trzech dobach o 83 do 90%, a po czterech o 92 do 97%. Po pięciu dobach fermentacji były już tylko ślady toksyny, trudne do ilościowego określenia (ryc. 1). W podłożach poddanych procesowi fermentacji przez drożdże Sherry, Chablis i Riesling w różnym tempie zanikała toksyna. Po dwóch dobach fermentacji największy ubytek patuliny był w przypadku fermentacji prowadzonej przez drożdże Chablis i wynosił 81%, podczas gdy w obecności drożdży Riesling i Sherry od 44 do 60% (ryc. 1a). Po czterech dobach fermentacji ubytek toksyny był tak znaczny, że pozostały jej tylko śladowe stężenia. Drożdże Tokay gat. 12, 19 i 22 podobnie prowadziły fermentację i w tym samym czasie zanikała patulina obecna początkowo w podłożu (ryc. 1b).



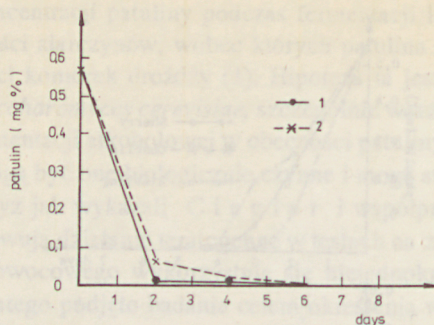
Ryc. 1. Ubytek patuliny w podłożach poddanych procesowi fermentacji przez różne szczepy drożdży winiarskich
The loss of patulin in the beddings affected by fermentation by means of grafts of wine yeasts



Ryc. 2. Wpływ różnych stężeń sacharozy na ubytek patuliny w procesie fermentacji z użyciem drożdży Chablis
The effect of different concentrations of saccharose on the loss of patulin in the process of fermentation by means of Chablis yeasts

W kombinacjach pożywek zawierających trzy różne stężenia sacharozy, a fermentowanych przez drożdże Tokay 12 i Chablis nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości patuliny. Jedynie w próbkach z drożdżami Chablis śladowe ilości toksyny były widoczne na płytkach jeszcze po 8 dobach fermentacji (ryc. 2). W hodowlach zawierających 10% sacharozy wykazano po 2 dobach fermentacji 0,34 mg % patuliny, a z 20% sacharozy - 0,13 mg %, tj. o ok. 60% mniej. Nie stwierdzono żadnych zakłóceń w procesie fermentacji, gdyż w próbach kontrolnych bez toksyny wyniki były podobne w zawartości poszczególnych składników jak w kombinacjach z patuliną.

W moszczu siarkowanym, tj. zawierającym po odpędzeniu dwutlenku siarki 85 mg % SO_2 , fermentacja w obecności 570 μg patuliny w 100 cm^3 podłoża przebiegała podobnie jak w moszczu pozbawionym SO_2 (ryc. 3). Po dwóch dobach fermentacji siarkowanego



Ryc. 3. Zmiany w zawartości patuliny w czasie fermentacji moszczu jabłkowego, siarkowanego i niesiarkowanego z udziałem drożdży Tokay 12; 1 – moszcz siarkowany, 2 – moszcz niesiarkowany
Changes in the content of patulin during the fermentation of apple must, both sulphurized and non-sulphurized, with an addition of Tokay 12 yeasts; 1 – sulphurized must, 2 – non-sulphurized must

moszczu ubytek patuliny był o 88% większy w stosunku do niesiarkowanego i toksyna ta stanowiła ok. 1% zawartości początkowej i ok. 10% w moszczu pozbawionym SO_2 . Po 4 dobach trwania procesu fermentacji wyniki zawartości patuliny były 2-3-krotnie niższe, po sześciu zaś stwierdzono tylko ślady toksyny.

DYSKUSJA

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają rezultaty badań Stinsona i współpr. (14, 15) oraz Burroughs (1). Badacze ci śledzili fermentację soku jabłkowego prowadzoną przez różne szczepy drożdży i stwierdzili, że nie wszystkie użyte szczepy drożdży obniżały zawartość mikotoksyny do poziomu zerowego. Na 8 szczepów 6 z nich powodowało całkowity zanik patuliny w fermentującym soku, a 2 szczepy, oznaczone jako ATCC4105 i ATCC14284, nie doprowadziły do całkowitej likwidacji patuliny w moszczu, gdyż pozostawał jej 1%.

Burroughs przedstawił dynamikę zanikania patuliny w czasie fermentacji alkoholowej z udziałem dwóch szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oznaczonych symbolami CY3 i AWY 35OR używanych w przemysłowym wyrobie cydrów. Autor stwierdził, iż po dwóch dniach fermentacji prowadzonej przez CY3 patulina została zlikwidowana w 72%, a przez AWY 35OR w 74%. Po trzech dniach trwania procesu szczep CY3 rozkładał 92% patuliny, a szczep AWY 35OR 90%.

Badania Lipowskiej i in. (8) wykazały obniżenie zawartości patuliny po tygodniu fermentacji do poziomu, którego nie można było wykryć stosowaną metodą, tj. poniżej $10 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Natomiast Pogorzelski (10) stwierdził obecność toksyny w winie w stężeniu $15 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, gdy użyto do jego produkcji surowiec w 50% porażony mokrą zgnilizną. Stinson i współpr. (14) próbowali określić skład chemiczny i właściwości toksykologiczne produktów, które powstawały z patuliny w czasie fermentacji alkoholowej, stosując toksynę znaczoną węglem C^{14} . Produkty powstałe z patuliny podczas fermentacji były nielotne i rozpuszczalne w wodzie oraz trudne do identyfikacji ze względu na niskie ich stężenia, a niektóre z nich pojawiały się zmiennie. Wysiłki tych autorów oraz Cieglera i innych (2) mające na celu scharakteryzowanie chemicznych produktów rozkładu patuli-

ny lub reakcji, w których brała ona udział, nie były uwieńczone powodzeniem ze względu na niestałość tych związków. Możliwe, że produkty, które mogą powstawać z patuliny w czasie fermentacji alkoholowej, są biologicznie czynne i w takim razie nie można przyjąć, że samoistne zanikanie toksyny wyklucza zagrożenie dla zdrowia.

Patulina jest nietrwała w obecności SO_2 . Konserwowanie moszczów związkami, które w roztworze wodnym wydzielają dwutlenek siarki, jest normalną procedurą w przemysłowym wyrobie win. Wykazano (13), że niekoniecznie SO_2 musi być wprowadzony z moszczem, gdyż w trakcie fermentacji soku winogronowego może być wytwarzany przez drożdże z siarczanów obecnych w surowcu. Jest to cecha genetyczna drożdży i może być ich korzystną właściwością selektywną.

W niniejszej pracy nie wykazano obecności SO_2 w próbach, w których poddawano fermentacji pożywkę mineralną zawierającą w swoim składzie związki siarki lub moszcz niesiarkowany.

Pomimo że w dalszym ciągu nie wiadomo, co dzieje się z patuliną w wyniku fermentacji, większość autorów potwierdza doniesienia Harwiga i in., że patulina zanika w winach, cydrach i podfermentowanych sokach, głównie na skutek działalności fermentacyjnej drożdży.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż patulina obecna w podłożu fermentującym w stężeniu 0,57 mg % zanikała w pierwszym tygodniu fermentacji. Stosowane szczepy drożdży winiarskich różniły się tylko w niewielkim stopniu uzdolnieniami do obniżania poziomu patuliny podczas kolejnych dni fermentacji. W środowisku zawierającym drożdże Sherry i Riesling wolniej ubywała patulina w porównaniu z próbkami fermentowanymi przez drożdże Tokay i Chablis. Jednak śladowe stężenia tej toksyny stwierdzono w próbkach fermentowanych przez drożdże Chablis nawet po 8 dniach. Dwutlenek siarki obecny w moszczu w stężeniu 85 mg % przyspieszył rozkład patuliny w fermentującym środowisku.

PIŚMIENNICTWO

1. Burroughs L. F.: Stability of Patulin to Sulphur Dioxide and to Yeast Fermentation. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60, 1, 1977.
2. Ciegler A., Beckwith A. C., Jackson L. K.: Teratogenicity of Patulin Adducts Formed with Cysteine. Appl. Environ. Microbiol., 31, 664, 1976.
3. Czerwiecki L.: Wykrywanie i ilościowe oznaczanie patuliny w soku jabłkowym. Roczniki PZH, 31, 3, 271, 1980.
4. Harwig J., Scott P. M., Kennedy B. P. C., Chen Y. K.: Disappearance of Patulin from Apple Juice Fermented by *Saccharomyces* sp. Can. Inst. Food Sci. Technol., 6, 45, 1973.
5. Kellermann E.: Rychla metoda na stanovenie alkoholu v roztokach a zaparach. Kvasny prumysl, 1, 11, 1960.
6. Lezi S. Z., Thonart P., Wathélet J. P., Blanpain P., Bechet J.: La Patuline: production, purification, degradation et dosage par CPG. Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires, 36, 4, 121, 1981.
7. Lipowska T., Goszcz H., Kubacki S.: Występowanie patuliny w zagęszczonych sokach jabłkowych. Przem. Ferment. i Owocowo-Warzywny, 5, 25, 1984.
8. Lipowska T., Goszcz H., Januszewski T., Kubacki S.: Stabilność patuliny ze szczególnym uwzględnieniem fermentacji alkoholowej. Przem. Ferment. i Owocowo-Warzywny, 5, 8-10, 1987.
9. Marzenko Z.: Kolorymetryczne oznaczanie pierwiastków. WNT 512, Warszawa 1968.

10. Pogorzelski E., Masior S., Czyżycki A., Łukawska-Pietrzak Z., Adamow-Pia
szczyńska M.: Mykotoksyny w moszczach i winach z jabłek porażonych zgnilizną. *Przem. Ferment. i Rolny*, 5, 11, 1977.
11. Sands D. C., McIntyre J. L., Walton G. S.: Use of Activated Charcoal for the Removal of Patulin from Cider. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 3, 388, 1976.
12. Scott P. M., Kennedy B. P. C.: Improved Method for the Thin Layer Chromatographic Determination of Patulin in Apple Juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 56, 4, 813, 1973.
13. Scott P. M., Fuleki T., Harwig J.: Patulin Content of Juice and Wine Produced from Moldy Grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 2, 434, 1977.
14. Stinson F. B., Osman S. P., Bills D. D.: Water-Soluble Products from Patulin During Alcoholic Fermentation of Apple Juice. *J. Food Science*, 44, 788, 1979.
15. Stinson F. B., Osman S. P., Huhtanen F. N., Bills D. D.: Disappearance of Patulin During Alcoholic Fermentation of Apple Juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 4, 620, 1978.
16. Ware G. M., Trope C. W., Pohland A. E.: Liquid Chromatography Method for Determination of Patulin in Apple Juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57, 1111, 1974.

SUMMARY

The paper presents the results of experiments made with the use of 4 yeast grafts: Tokay, Chablies, Sherry and Riesling on the effect of alcohol fermentation of the apple must, both sulphurized and non-sulphurized, on the content of patulin in the studied beddings.

Patulin was introduced to these beddings before fermentation in the quantity of 0.56 mg % and it disappeared at different periods of the fermentation, but after 6 days of the fermentation, only trace quantities of patulin were found out.

The content of patulin was determined with the method of thin layer chromatography according to Scott and Kennedy (1973).



ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN-POLONIA

SECTIO E

1994

wożenia gnojowicą świeżą oraz jej formami przetworzonymi na

wożenia gnojowicą świeżą oraz jej formami przetworzonymi na
nie procesów biologicznych gleby bielicowej

nawożenia gnojowicą świeżą oraz jej formami przetworzonymi

wożenia gnojowicą świeżą oraz jej formami przetworzonymi na
nie procesów biologicznych gleby brunatnej

zed, J. Bielińska, E. Wielgosz, A. Wyczółkowski:
ach przybrzeżnych dwóch jezior Pojezierza Łęczyńsko-Włó-

onserwantów na aktywność proteolityczną enzymów w sokach
oślin

i e w i a d o m y: Właściwości inhibicyjne nowych związków
-NH- i -O- podstawionych pochodnych kwasu 2,4,6-trihydro-
-A) w zależności od ich struktury

i a d o m y: Wpływ podstawienia S-alkilowego w ugrupowaniu
rybobjęzją pochodnych kwasu sym-trihydroxybenzenokarbo-

30. G. Mącik-Niewiadomy, A. Niewiadomy: Badania nad możliwością wykorzystania N- i O-
dipodstawionych pochodnych monoamidu kwasu węglowego jako związków grzybobójczych
31. A. Niewiadomy: Badania charakteru oddziaływań biologicznych związków szeregu pochodnych typu
 $RCS_2R_1CO_2H$ i NH -rodnikowo podstawionych karbaminianów w stosunku do wybranych bio-
indykatorów roślinnych

5,00

BIBLIOTEKA GŁÓWNA ✓

Akademii Rolniczej
w Lublinie

91485

50

1995

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

BIURO WYDAWNICTW

Plac Marii

Curie - Skłodowskiej 5

20-031 LUBLIN

POLOGNE