

Małgorzata Wroniak¹, Edyta Lipińska², Stanisław Błażej²

PRÓBY OCENY JAKOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ RYNKOWYCH OLEJÓW TŁOCZONYCH NA ZIMNO

¹Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych

Kierownik: Prof. dr hab. *K. Krygier*

²Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Kierownik: Dr hab. *S. Błażej*, prof. SGGW

Wydział Nauk o Żywności

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Przeprowadzono ocenę jakości mikrobiologicznej 17 rynkowych olejów tłoczonych na zimno. Ogólna liczba drobnoustrojów w badanych olejach tłoczonych na zimno wahała się od 0 do 1,4 10³ jtk/cm³, natomiast liczba drożdży od 0 do 1,2 10² jtk/cm³. W badanych olejach nie stwierdzono obecności pleśni oraz bakterii lipolitycznych i beztlenowych. W siedmiu próbkach nie stwierdzono wzrostu żadnych drobnoustrojów.

Słowa kluczowe: oliwa z oliwek *extra virgin*, oleje tłoczone na zimno, jakość mikrobiologiczna, drobnoustroje.

Key words: extra virgin olive oil, cold pressed oils, microbiological quality, microorganisms.

Oleje tłoczone na zimno, a wśród nich ceniona od wieków dziewicza oliwa (*extra virgin*) to oleje uzyskane, wyłącznie metodami mechanicznymi przez tłoczenie lub odwirowanie oleju. Oleje te nie są poddawane chemicznemu oczyszczaniu - dopuszczona jest jedynie naturalna dekantacja, filtrowanie lub odwirowanie zanieczyszczeń stałych (1).

Jakość olejów tłoczonych na zimno zależy głównie od jakości surowca użytego do tłoczenia (2, 3). Niska jakość surowca (uszkodzenie nasion/owoców, wysoki stopień zanieczyszczenia chemicznego - metale ciężkie, pozostałości środków ochrony roślin, WWA- wysokie zanieczyszczenie mikrobiologiczne nasion - liczne bakterie, drożdże, czy pleśnie – mikotoksyny) wpływa na złą jakość oleju, dyskwalifikując go pod względem bezpieczeństwa zdrowotnego (4, 5, 6). Oleje charakteryzują się śladową ilością wody, więc nie są odpowiednim środowiskiem do rozwoju drobnoustrojów, jednakże wykorzystanie tych olejów do celów kulinarnych do przygotowania sosów, majonezów czy sałatek może stwarzać zagrożenie związane z rozwojem mikroorganizmów (7). Jednocześnie brakuje danych literaturowych, szczególnie nowych, dotyczących bezpieczeństwa mikrobiologicznego olejów tłoczonych na zimno z nasion poza nielicznymi dotyczącymi dziewiczej oliwy z oliwek (8, 9, 10).

Celem pracy było opracowanie właściwej metodyki oznaczeń mikrobiologicznych i próby oceny czystości mikrobiologicznej wybranych olejów tłoczonych na zimno, w tym dziewiczej oliwy z oliwek.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 17 olejów, w tym 8 prób oliwy z oliwek extra virgin oraz 9 olejów z nasion (2 słonecznikowe, 1 kukurydziany, 1 z pestek winogron, 1 z pestek dyni, 1 arachidowy, 1 sezamowy, 1 sojowy, 1 rzepakowy), zakupionych w handlu detalicznym. Były to marki dominujące na rynku polskim, pochodzące z Hiszpanii, Włoch, Grecji, Niemiec, Polski, Austrii. Wszystkie oleje były w okresie przydatności do spożycia, w butelkach z ciemnego szkła. Przechowywano je w ciemnym i suchym miejscu w temperaturze pokojowej.

Badania mikrobiologiczne obejmowały oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów, oznaczenie liczby grzybów, oznaczenie liczby bakterii lipolitycznych oraz liczby bakterii beztlenowych. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Ogólną liczbę drobnoustrojów oznaczano metodą hodowlaną, płytkową posiewając włącznie 1 cm³ próbki bezpośrednio lub po rozcieńczeniu 1:10 na podłoże bulionowe z agarem (11). Po 48-72 h hodowli w temp. 28°C liczono kolonie, wyniki interpretowano zgodnie z PN-ISO 4833. Oznaczenie liczby grzybów (drożdży i pleśni) wykonano na podłożu *Sabouranda* z glukozą. Próbkę inkubowano w temp. 28-30°C przez 48-96 h (12). Oznaczenie liczby bakterii lipolitycznych przeprowadzono na podłożu z tributyriną (11). Próbkę inkubowano 72 h w temperaturze 30°C. Liczbę bakterii beztlenowych oznaczano na podłożu *Wilson - Blaira* (12). Po wykonanym metodą włąbną posiewie na płytce wylewano dodatkowo 2% agar w celu oddzielenia hodowli od tlenu atmosferycznego. Do izolacji wyrosłych kolonii wykorzystano bulion zwykły, brzczkę (11) i podłoże *Mc Conkey'a* (12).

Identyfikację wyizolowanych szczepów prowadzono według schematu *Vanderzanta* i *Nickelzona* w modyfikacji (13). Do identyfikacji drożdży zastosowano również paski diagnostyczne Api 20 C AUX [BioMerieux], a do identyfikacji gronkowców, mikrokoków i spokrewnionych rodzajów zestaw Api Staph [BioMerieux]. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

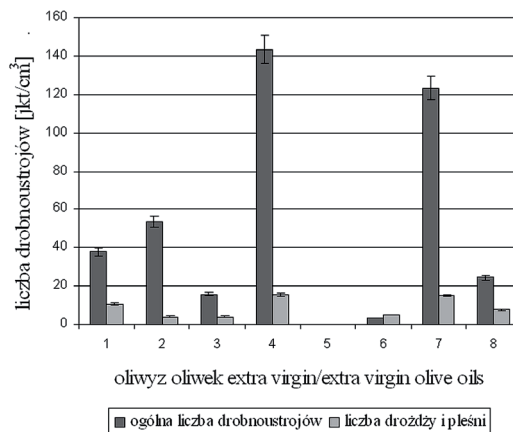
Do oznaczenia poszczególnych grup drobnoustrojów potrzebna była modyfikacja zastosowanych podłoży i płynów do rozcieńczeń poprzez dodatek odpowiedniej ilości czynnika zestalającego i emulgatora. Optymalna dawka agaru Bacto do podłoży wynosiła 4%. Do przygotowania płynów do rozcieńczeń użyto 8 cm³ płynu *Ringera* i 1 cm³ Tweenu 80. W posiewie bezpośrednim zastosowano 1 cm³ 25% Tweenu 80.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Dotychczasowe polskie wymagania dotyczące jakości olejów tłoczonych na zimno i oliwy z oliwek pomijają aspekty mikrobiologiczne. Brakuje norm jak również metodyki wykonania oznaczeń mikrobiologicznych dla tego rodzaju produktów, co

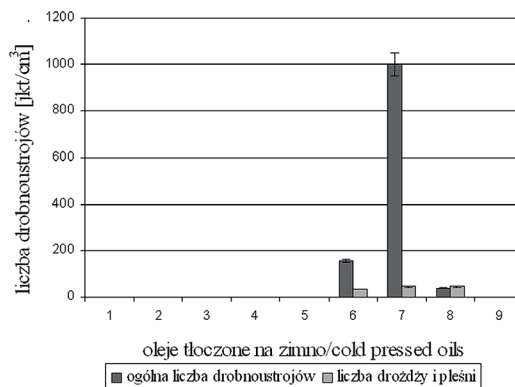
między innymi było przedmiotem niniejszych badań. Ustalono optymalną dawkę agaru Bacto do podłoża, która wynosiła 4% oraz opracowano skład płynów do rozcieńczeń. Stwierdzono, że do przygotowania płynów do rozcieńczeń powinno stosować się 8 cm³ płynu *Ringera* i 1 cm³ Tweenu 80. W posiewie bezpośrednim również wprowadzono modyfikację używając dodatkowo 1 cm³ 25% Tweedu 80.

Ogólna liczba drobnoustrojów w badanych oliwach z oliwek wahała się od 0 do $1,6 \cdot 10^2$ jtk/cm³, natomiast liczba drożdży od 0 do $4,6 \cdot 10^1$ jtk/cm³ (ryc. 1). Bez zanieczyszczeń mikrobiologicznych była jedna próbka oliwy. Prawdopodobnie większość produkowanych próbek oliwy była rozlewana przez dystrybutorów, co mogło być przyczyną większego zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Ponieważ oliwa jest często składnikiem majonezów, sosów i sałatek jej stopień zanieczyszczenia drobnoustrojami może decydować o jakości mikrobiologicznej produktów powstałych z jej udziałem. Z pośród badanych próbek olejów tłoczonych na zimno tylko w 3 olejach (pochodzących od tego samego producenta) arachidowym, sezamowym i sojowym, stwierdzono obecność drobnoustrojów, zarówno bakterii, jak i drożdży. W oleju arachidowym średnia liczba bakterii wynosiła $1,6 \cdot 10^2$ jtk/cm³, sezamowym $1 \cdot 10^3$ jtk/cm³, a sojowym $3,7 \cdot 10^1$ jtk/cm³ (ryc. 2). W oleju arachidowym średnia liczba drożdży wynosiła $3,2 \cdot 10^1$ jtk/cm³, w sezamowym i sojowym po $4,3 \cdot 10^1$ jtk/cm³. Na tak różnicowaną jakość mikrobiologiczną badanych olejów uzyskiwanych na zimno na pewno miał wpływ stopień zanieczyszczenia surowca oraz higiena produkcji. *Łaniewska - Moroz i in.* (1995) wykazali, że w porównaniu do surowca otrzymane oleje zawierały od 10 do 100 razy mniej drobnoustrojów. Biorąc pod uwagę temperaturę procesu technologicznego, która nie przekracza 40°C występowanie mikroflory wydaje się nieuniknione (7). Jednak w sześciu próbkach olejów tłoczonych na zimno nie stwierdzono obecności drobnoustrojów, co można tłumaczyć niekorzystnymi warunkami do rozwoju drobnoustrojów, jakie stwarzają te produkty lub warunkami higienicznymi w czasie produkcji, czystością zbiorników i opakowań. W badanych olejach i oliwach nie stwierdzono obecności pleśni, bakterii lipolitycznych i bakterii beztlenowych.



Ryc. 1. Liczba drobnoustrojów w badanych oliwach extra virgin ($n=3$)

Fig. 1. The number of microorganisms in the analyzed extra virgin olive oil ($n=3$)



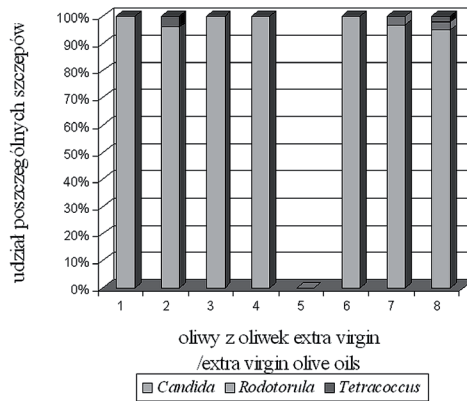
Ryc. 2. Liczba drobnoustrojów w badanych olejach tłoczonych na zimno, gdzie: 1) słonecznikowy (1), 2) kukurydziany, 3) z pestek winogron, 4) słonecznikowy (2), 5) z pestek dyni, 6) arachidowy, 7) sezamowy, 8) sojowy, 9) rzepakowy($n=3$)

Fig. 2. The number of microorganisms in the analyzed cold-pressed oils, where: 1) sunflowerseed (1), 2) corn, 3) from grape seeds, 4) sunflowerseed (2), 5) from pumpkin seeds, 6), peanut, 7), sesame, 8), soybean 9) rapeseed($n=3$)

W badanych próbkach olejów wyizolowano a następnie zidentyfikowano bakterie z rodzaju *Tetracoccus* i *Staphylococcus* oraz drożdże z rodzaju *Candida*, *Pichia* i *Rhodotorula*. Z oliwy wyizolowano: bakterie z rodzaju *Tetracoccus* oraz drożdże z rodzaju *Candida* i *Rhodotorula* (ryc. 3). Z pozostałych olejów tłoczonych na zimno wyizolowano drożdże z rodzaju *Candida* i *Pichia* oraz bakterie z rodzaju *Tetracoccus* i *Staphylococcus* (ryc. 4).

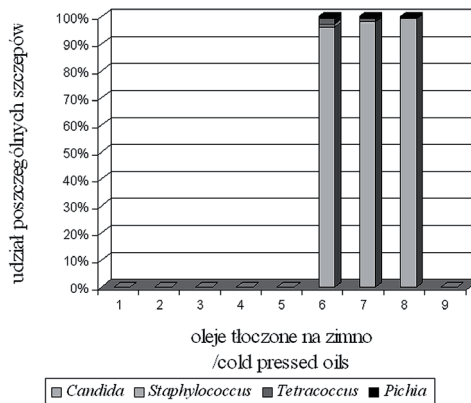
W oliwach najliczniejszą grupą spośród wyizolowanych drobnoustrojów stanowiły drożdże z rodzaju *Candida* (w czterech oliwach stanowiły 100% mikroflory a w pozostałych od 95 do 97%) (ryc. 3). Bakterie z rodzaju *Tetracoccus* oraz drożdże z rodzaju *Rhodotorula* występowały sporadycznie i w niewielkiej liczbie (ich obecność stwierdzono tylko w dwóch badanych próbkach oliwy). Obecność w oliwie tak licznej grupy drożdży z rodzaju *Candida* potwierdzają badania prowadzone przez *Ciafardini* i *Zullo* (2002) w środowisku produkcyjnym. Izolowali oni głównie drożdże z rodzaju *Candida* i okazjonalnie pleśnie *Aspergillus spp.* Biorąc pod uwagę cykl produkcyjny oliwy występowanie tej mikroflory jest nieuniknione (8).

Wśród wyizolowanych z pozostałych olejów tłoczonych na zimno drobnoustrojów dominowały również drożdże *Candida*, w trzech olejach stanowiły one 98,4% (ryc. 4). Pozostałe zidentyfikowane drobnoustroje to: drożdże z rodzaju *Pichia* (0,8%) w dwóch olejach oraz bakterie z rodzaju *Tetracoccus* (1,8%), wyizolowane z trzech próbek olejów. W jednej próbce oleju zidentyfikowano bakterie z rodzaju *Staphylococcus* (2,7%).



Ryc. 3. Udział poszczególnych grup drobnoustrojów wyizolowanych z badanych prób oliwy extra virgin ($n=3$)

Fig. 3. Share of individual groups of microorganisms isolated from the analyzed samples of olive oil extra virgin ($n=3$)



Ryc. 4. Udział poszczególnych grup drobnoustrojów wyizolowanych z badanych prób olejów tłoczonych na zimno, gdzie: 1) słonecznikowy, 2) kukurydziany, 3) z pestek winogron, 4) słonecznikowy (2), 5) z pestek dyni, 6) arachidowy, 7) sezamowy, 8) sojowy, 9) rzepakowy ($n=3$)

Fig. 4. Share of individual groups of microorganisms isolated from the analyzed samples of cold-pressed oils, where: 1) sunflowerseed (1), 2) corn, 3) from grape seeds, 4) sunflowerseed (2), 5) from pumpkin seeds, 6) peanut, 7), sesame, 8), soybean 9) rapeseed ($n=3$)

Rodzaj *Candida* należy do mikroflory występującej na surowcach, w powietrzu w pomieszczeniach produkcyjnych skąd łatwo mogą przeniknąć do produktu. Bakterie z rodzajów *Tetracoccus* i *Staphylococcus* oraz drożdże z rodzaju *Rhodotorula* to drobnoustroje rozpowszechnione w powietrzu, które wraz z opadającym pyłem mogą dostać się do produktu (14). Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* mogą

występować również na powierzchni ciała człowieka, zwierząt, w glebie, w wodzie. Niektóre gatunki z rodzaju *Staphylococcus* mogą być chorobotwórcze (15). Należy podkreślić, że przeprowadzona na tym etapie badań identyfikacja nie wykluczyła obecności bakterii *Staphylococcus aureus*, więc ten produkt powinien być poddany bardziej wnikliwej analizie.

WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono potrzebę modyfikacji metodyki badań – składu podłoża i płynów do rozcieńczeń przez dodatek odpowiedniego emulgatora i czynnika zestalającego.

2. Obecność drobnoustrojów stwierdzono w 10 olejach, spośród 17 przebadanych. Poziom zanieczyszczeń w badanych próbkach olejów nie przekroczył 10^3 jtk/cm³. Dominującą mikroflorą były drożdże z rodzaju *Candida*.

3. Badania miały charakter pilotażowy, a zatem wymagają kontynuacji celem wiarygodnego stwierdzenia czy rodzaj i liczba wykrytych drobnoustrojów w olejach tłoczonych na zimno nie stanowi zagrożenia dla zdrowia konsumenta.

M. Wroniak, E. Lipińska, S. Błazejak

ATTEMPTS TO MICROBIOLOGICAL QUALITY ASSESSMENT OF MARKET COLD PRESSED OILS

Summary

The aim of the work was to develop research methodology and microbiological quality assessment of cold pressed oils. The research material included 17 oils (8 of extra virgin olive oils and 9 cold pressed oils: 2 sunflowerseed, corn, grapeseed, pumpkinseed, peanut, sesame, soybean, rapeseed).

The optimal agar additive for microbiological nutrients as well as Tween 80 for dilution liquids has been established. It was stated that total amount of microorganisms ranged from 0 to $1,4 \cdot 10^3$ cfu/cm³, whereas the amount of yeast oscillated between 0 and $1,2 \cdot 10^2$ cfu/cm³. In the examined samples there were no presence of mold, lipolytic and anaerobic bacteria found. In seven sample of cold pressed oils there was no growth of microorganisms. During the experiment 5 strains of microorganisms were identified and isolated. There are *Tetracoccus* and *Staphylococcus* bacteria and *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia* yeast. The most numerous group of microorganisms were *Candida* (mean ab. 97%).

PIŚMIENNICTWO

1. *Codex Alimentarius FAO/WHO*: Codex standard for named vegetable oils. Codex Stan 210 (Amended 2003, 2005), 1-13. - 2. *Rotkiewicz D., Konopka I.*: Trwałość olejów rzepakowych tłoczonych na zimno z nasion o zróżnicowanej jakości. *Rośliny Oleiste*, 1998; 19: 2, 583-591. - 3. *Wroniak M., Krygier K.*: Oleje tłoczone na zimno. *Przem. Spoż.* 2006; 7: 30-32, 34. - 4. *Jankowski P. S., Karpiński R., Cozel A., Krygier K., Cieślak B., Bartnikowska E., Obiedziński M. W.*: Badania porównawcze wybranych skażeń chemicznych w olejach roślinnych. *Rośliny Oleiste*, 1998; 19: 279-289. - 5. *Bielecka M., Biedrzycka E., Biedrzycka El., Śmieszek M.*: Wpływ uszkodzeń i wilgotności nasion rzepaku na ich jakość mikrobiologiczną. *Rośliny Oleiste*, 1992; 14: 134-140. - 6. *Bielecka M., Biedrzycka E., Biedrzycka El., Śmieszek M.*: Warunki zbioru

i przechowywania a jakość nasion rzepaku. Część II. Jakość mikrobiologiczna. *Rośliny Oleiste*, 1994; 15: 135-143. – 7. *Laniewska-Moroz L., Warmińska-Radyko I., Nowak-Polakowska H., Zadernowski R.*: Mikroflora oleju rzepakowego tłoczonego na zimno. *Rośliny Oleiste*, 1995; 16: 267-273. – 8. *Ciafardini, G., Zullo B.A.*: Microbiological activity in stored olive oil. *Intl. J. Food Micro.* 2002; 75: 111-118. – 9. *Zullo, BA, Cioccia G., Ciafardini G.*: Distribution of dimorphic yeast species in commercial extra virgin olive oil. *Food Micro.* 2010; 27: 1035-1042. – 10. *Palumbo M., Harris L. J.*: Report - Microbiological Food Safety of Olive Oil A Review of the Literature, 2011; www.olivecenter.ucdavis.edu. 11. *Błażej S. Gientka I. (red.)*: Wybrane zagadnienia z mikrobiologii żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2010; 35-67. – 12. *Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.*: Mikrobiologia Żywności. PZWL, 1983; 427-495. – 13. *Raczyńska – Cabaj A.*: Wpływ wybranych stymulatorów wzrostu na cechy biochemiczne przemysłowych drożdży piekarskich w procesie hodowli i przechowywania. Praca doktorska. Wydział Technologii Żywności, SGGW, Warszawa, 2002; – 14. *Schlegel G. H.* Mikrobiologia ogólna PWN, 1996; – 15. *Zakowska Z., Stobińska H.*. Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź, 2000;

Adres. ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa.

Badania częściowo sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki - N N312 256740.