

Możliwości wpływu wyizolowanych mikroorganizmów na skład chemiczny Śliwownicy Łąckiej

Śliwownicę łącką możemy zaliczyć do żywności fermentowanej za pomocą mikroflory naturalnie występującej na surowcu. Jest to unikatowa mieszanka mikroorganizmów, nie odtwarzalna w warunkach laboratoryjnych, czy też przemysłowych i nadająca produktowi ostatecznemu niepowtarzalne cechy organoleptyczne oraz kształtująca jego skład chemiczny. Fermentacja za pomocą dziko występujących drobnoustrojów była znana już od zarania dziejów ludzkości, a pierwsze o niej wzmianki pochodzą z okresu 6000-5000 lat p.n.e. Obecnie uległa ona znacznym modyfikacjom, a zasada wykorzystywania kilku różnych mikroorganizmów (często należących do zupełnie innych grup systematycznych), stosowana jest w produkcji szerokiej gamy artykułów żywnościowych na całym świecie, począwszy od wyrobów mlecznych takich jak kefir (drożdże i bakterie kwasu mlekowego), poprzez różnego rodzaju napoje alkoholowe, których surowcem są zboża (lambic, sake, merissa, kaffir), po fermentowanie liści herbaty i tytoniu (Dalton, 1995). Zastosowanie kilku różnych gatunków mikroorganizmów do prowadzenia procesu fermentacji powoduje, że końcowy produkt jest znacznie bogatszy w często cenne związki i przewyższa jakość artykułu powstałego przy zastosowaniu każdego szczepu z osobna.

Wszystkie drobnoustroje wyizolowane w trakcie badania powietrza w sadzie śliwki Węgierki Zwykłej, mogą mieć swój negatywny lub pozytywny wpływ na związki wchodzące w skład produktu gotowego, którym jest śliwownica.

Podczas fermentacji, oddziaływać będą głównie mikroorganizmy

znajdujące się na powierzchni owoców, w mniejszym stopniu te które dostaną się do moszczu z innych miejsc (powietrza, kadzi fermentacyjnej, ludzi przygotowujących nastawy). Dlatego też w tym rozdziale brano pod uwagę głównie organizmy obecne w atmosferze podczas badań pochodzących z okresu najbliższego „śliwkobraniu” (31.08. i 8.10.).

Wyizolowane bakterie, pomimo stosunkowo licznej ich populacji w powietrzu, nie należą do organizmów o właściwościach fermentacyjnych. Jak podają źródła literaturowe, niektórzy przedstawiciele sklasyfikowanej mikroflory bakteryjnej, posiadają wprawdzie zdolność fermentowania cukrów, jednakże nie są w stanie czynić tego na dużą skalę, a tym samym nie przyczyniają się do powstania alkoholu (lub innych produktów tego „beztlenowego oddychania”).

Dość liczne gatunki z rodzaju *Micrococcus* posiadają zdolność wytwarzania w obecności glukozy a ,a -trehalozy – nie redukującego dwucukru. Jest to węglowodan występujący naturalnie u owadów, alg, grzybów, drożdży oraz niektórych bakterii, spełniający u nich rolę substancji zapasowej (Ahmad i inni,1980), i wykorzystywany przez komórki w warunkach głodowania. Gdy ma miejsce taki przypadek, komórka drożdżowa zużywa prawie całą ilość trehalozy (35-90 %) i tylko 30-40% glikogenu (Sałek,1984). Wytwarzana tym samym przez bakterie z rodzaju *Micrococcus* trehaloza, może być wykorzystywana przez inne mikroorganizmy (drożdżowe i pleśniowe) do wzrostu, stwarzając im lepsze warunki rozwoju (biostymulator).

Szczepy które przez sadowników są uważane za szkodniki i dlatego zwalczane, często posiadają enzymy, które w przypadku procesu fermentacji, mogą być bardzo przydatnymi czynnikami, rozkładającymi ściany komórkowe, oraz rozluźniającymi miąższ owoców. Zhydrolizowane w ten sposób związki, z reguły będące polimerami, mogą stanowić źródło cennych cukrów dla fermentacji. Rozluźniona struktura, jest również środowiskiem w którym łatwiej jest mikroorganizmom prowadzić wspomniany proces.

Duża część każdej roślinnej ściany komórkowej, zbudowana jest z celulozy. Enzymem mogącym „poprzecinać” złożoną strukturę tego wielocukru jest celulaza, kompleks enzymatyczny składający się z endoglukanazy i egzoglukanazy. Obydwa wymienione białka potrafią rozłożyć łańcuchy celulozy do celobiozy. Dalsza hydroliza prowadzona jest przy wykorzystaniu β -glukozydazy, w wyniku czego powstają dwie cząsteczki glukozy. Wszystkie powyższe enzymy zostały stwierdzone i wyizolowane u przedstawicieli rodzaju *Cladosporium* (Abrha i Gashe, 1992), jak wspomniano w poprzednim rozdziale, najbardziej rozpowszechnionego grzyba strzępkowego podczas prowadzonych badań. Kompleks endo- i egzoglukanazy charakteryzuje się dużą trwałością, oraz szerokim zakresem działania (pH 4 do 8, optimum temperatury 60°C). Tak więc rodzaj, który uważany jest za szkodnika wywołującego choroby na jabłkach, gruszkach oraz owocach jagodowych (Müller, 1974), w przypadku fermentacji może mieć znaczenie pozytywne.

Enzymy celulolityczne występują również w innym wyizolowanym szczepie, *Trichoderma viride* (reesei). Działalność powyższych substancji wyosobnionych z tej pleśni, jest szczególnie silna w środowisku o konsystencji stałej lub półstałej, a więc takiej jaka ma miejsce podczas fermentacji moszczu śliwkowego. Omawiany gatunek grzyba, charakteryzuje się niezwykle dużą „siłą” celulolityczną (znacznie wyższą od rodzaju *Cladosporium*), jednakże stosunkowo niską aktywnością charakteryzuje się trzeci z enzymów potrzebnych do całkowitego rozłożenia celulozy – β -glukozydaza. W przypadku jednakże kiedy podczas procesu, w kadzi znajdują się inne mikroorganizmy, głównie przedstawiciele rodzaju *Aspergillus*, może nastąpić całkowite scukrzenie celulozy pochodzącej ze śliwek (Madamwar i Patel, 1992).

β -glukozydaza obecna również w innym z wyizolowanych szczepów pleśniowych – *Humicola grisea*, jest szczególnie silnie wytwarzana w środowisku bogatym w karboksymetylowaną celulozę (CMC) oraz celobiozę. Tym samym enzym ten może stać się

elementem systemu degradującego celulozę w układzie. Wspomniany biokatalizator składa się z trzech aktywnych komponentów, a jego produkcja jest aktywowana przez wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe enzymy indukowane obecnością celobiozy (Polizeli i inni, 1996).

Omawiany grzyb strzępkowy posiada ponadto zdolność do hydrolizowania, innych składników ścian komórkowych, obecnych w hemicelulozach – ksylanów. Na pożywkach płynnych wytwarza on dwa rodzaje endoksyłanaz różniących się masą cząsteczkową tzw. Xyl I i Xyl II. Produktami tworzącymi się po hydrolizie są ksylo-oligosacharydy (ksylotetrozy, ksylotriozy i ksylobiozy) oraz śladowo ksyloza, mogąca ulec odfermentowaniu. Aktywności ksyłanolitycznej towarzyszy u tego gatunku, aktywność celulolityczna, charakteryzująca się jednak znacznie mniejszą siłą (Rana i inni, 1996).

Substancje pektynowe są kompleksem strukturalnych polisacharydów występującym w ścianie komórkowej roślin wyższych. Zawierają one różną, ale z reguły wysoką ilość częściowo zmetylowanych cząsteczek kwasu galakturonowego powiązanych wiązaniami α -1,4. Tak zbudowany związek nazywany jest pektyną, podczas gdy związek pozbawiony grup metylowych, jest znany jako kwas pektynowy lub kwas poligalakturonowy. Enzymy które hydrolizują substancje pektynowe, znane są pod nazwami enzymy pektynowe, pektynazy lub enzymy pektynolityczne. Są one klasyfikowane głównie do dwóch grup: pektynoesteraz (PE) (mogących odszczepiać grupy metoksyłowe) oraz depolimeraz (skracających długość łańcuchów kwasu poligalakturonowego). Enzymy depolimeryzujące są dzielone na kolejne dwie grupy: poligalakturonazy (PG), które rozdzielają cząsteczki kwasu galakturonowego poprzez hydrolizę, oraz liazy pektynowe (PL), które czynią to na drodze β -eliminacji. Powyższe enzymy są wytwarzane przez szczepy wyizolowane z łąckiego sadu, tym samym mogą one brać znaczący udział w procesie fermentacji. Zarówno poligalakturonaza, jak i pektynoesteraza są wytwarzane przez przedstawicieli rodzaju

Rhodotorula, tak więc obydwie wyizolowane gatunki (*R. graminis* i *R. mucilaginosa*) mogą brać udział w rozkładzie pektyn śliwkowych (Blanco i inni, 1999). Produktem powstającym w wyniku tego procesu są cząsteczki kwasu galakturonowego, mogące być wykorzystane przez inne organizmy do fermentacji, oraz metanol powstający z odłączanych grup metoksyłowych. Metanol jako substancja lotna z parą wodną, stosunkowo łatwo przechodzi do śliwowicy, gdzie ze względu na swoją szkodliwość w dużych ilościach stanowić może poważny problem zdrowotny dla konsumenta.

Innym wyizolowanym szczepem posiadającym zdolność do wytwarzania enzymów pektynolitycznych, a konkretnie poligalakturonazy jest *Botrytis cinerea*. Jest to pospolicie występujący grzyb strzępkowy, patogenny dla roślin i „siejący” spustoszenia w winnicach oraz sadach owocowych, gdzie powoduje pojawianie się szarych plam, oraz wysychanie owoców (Ellis, 1995). Szkodnik ten atakuje głównie rośliny osłabione oraz uszkodzone owoce. Powszechnie nazywany jest „szarą pleśnią”. Prowadzone są obecnie liczne badania nad środkami zwalczającymi ten grzyb, jednakże z powodu dużej odporności na środki chemiczne, ich skuteczność jest niewielka (McQuilken i inni, 1994). W przypadku produkcji Śliwowicy Łąckiej może być wykorzystana zdolność pleśni do rozmiękczenia owoców, poprzez wytwarzanie poligalakturonazy. Badania prowadzone na izolatach tego enzymu, wykazały silne jego zróżnicowanie, zarówno pod względem budowy, jak i optymalnych warunków działania, nawet wtedy kiedy był wyodrębniany z tego samego szczepu (Magro i inni, 1980).

Wspomniana już przy omawianiu właściwości celulolitycznych – *Trichoderma viride*, posiada również zdolność wytwarzania aminotransferaz – asparaginianowej (GOT) oraz alaninowej (GPT). GPT jest związany z konwersją alaniny do pirogronianu, a GOT przekształca 2-oksoglutaran w asparaginian. U grzybów, podejrzewa się, że oba enzymy są odpowiedzialne za syntezę tzw. drugorzędowych aminokwasów z pierwszorzędowych. Obecność

powyższych enzymów podczas fermentacji, może spowodować wzrost kwasowości nastawu (z obojętnej alaniny tworzy się kwaśny asparaginian), oraz zachwiać poziomem różnych kwasów organicznych obecnych w środowisku, ponieważ obydwie białka mogą również wykorzystywać zarówno różne aminokwasy (metionina, seryna, glicyna), jak i inne kwasy organiczne (jabłkowy, szczawiooctowy) (Eze i Echetebe, 1980).

Niezwykle istotnym składnikiem gotowej śliwowicy są cyjanowodór oraz jego pochodne – cyjanki. Powstają one z glikozydów cyjanogennych, syntezowanych z aminokwasów przy udziale b-glukozydazy i liazy hydroksynitrylowej. Wspomniane glikozydy z których najczęściej występującymi są amygdalina i prunazyna, stanowią składniki pestek wiśni, śliwek, moreli, brzoskwini, migdałów, oraz innych owoców pestkowych. Enzymatyczna hydroliza amygdaliny i związków jej podobnych, prowadzi do powstania cyjanowodoru. W ściśle określonych ilościach pełni on pozytywną rolę, kształtując bukiet niektórych napojów alkoholowych. Jak stwierdzono, napoje fermentowane przez mikroflorę autochtoniczną, zawierały znacznie większe ilości cyjanowodoru, niż te przy powstawaniu których brały udział drożdże szlachetne (Nielepkowicz-Charczuk i Balcerek, 1996).

W środowisku występują jednakże mikroorganizmy posiadające zdolność zdegradować cyjanki, lub ich nadmiar, do związków mniej szkodliwych. Przykładem może być tutaj jeden z wyizolowanych szczepów – przedstawiciel rodzaju *Fusarium* sp. Potrafi on asymilować cyjanowodór i jego pochodne, i wykorzystywać jako źródło azotu, oraz/lub węgla, z czego droga ich konwersji wiedzie poprzez NH_3 . W przypadku dostatecznej ilości źródeł węgla i azotu, cyjanki przekształcane są przez enzym hydratazę cyjankową w amid kwasu mrówkowego według reakcji:



W inny sposób funkcjonuje monooksygenaza cyjankowa występująca

u przedstawicieli rodzaju *Pseudomonas*, którego przedstawicieli wyizolowano z powietrza w okresie zbioru śliwek. W tym przypadku końcowym produktem reakcji był cyjanian, a sumarycznie przebieg reakcji kształtuje się następująco:



Tak więc obecność powyższych organizmów w fermentującym zacierze, może obniżyć zawartość cyjanowodoru w śliwowicy, jednakże potrzebne jest przeprowadzenie dalszych badań w tym kierunku (Dubey i Holmes, 1995).

Znaczny procent soku śliwkowego stanowią związki fenolowe, oraz pochodne kwasu benzoesowego, wpływające na jego aktywność przeciwutleniającą. Liczne mikroorganizmy wykazują zdolność enzymatycznego przekształcania tych związków w pochodne mogące mieć swój wpływ na cechy organoleptyczne powstającej śliwowicy.

Wśród wyizolowanej mikroflory wyróżniają się pod tym względem oba gatunki z rodzaju *Rhodotorula*: *Rhodotorula mucilaginosa* i *graminis*. Drugi z nich posiada enzym 4-hydroksylazę benzoesową, która podstawia w pozycję 4, kwasu benzoesowego, grupę wodorotlenową. Powstający kwas 4-hydroksybenzoesowy, może przyłączyć, kolejną grupą hydroksylową przy udziale enzymu 3-hydroksylazy kwasu 4-hydroksybenzoesowego. Enzym ten został wyizolowany z licznej grupy drożdży i pleśni wśród której znajdują się gatunki z rodzaju *Penicillium*, *Rhodotorula mucilaginosa*, oraz *Trichoderma viride*. Powstający kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy jest substratem do wytwarzania przez drobnoustroje całej gamy produktów pochodnych katecholu.

Obecność przedstawicieli z rodzajów *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Rhodotorula* może prowadzić do rozerwania pierścienia aromatycznego w katecholu, w wyniku czego powstaną początkowo kwasy diowe i ich pochodne, a w końcowym efekcie laktony (mukonolaktony) (Wright, 1993). Wiele z półproduktów powyższych reakcji ma temperatury wrzenia zbliżone do

panujących podczas destylacji, przez co należy sądzić że będą one przechodzić do destylatu, a więc tym samym wpływać w sposób bezpośredni na produkt gotowy – śliwownicę.

Ważną rolę podczas przebiegu fermentacji mogą odgrywać szczepy z rodzaju *Mucor*. Wykorzystują one krótkołańcuchowe kwasy monokarboksylowe tj. octowy, propionowy, butylowy i walerianowy, do produkcji długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (np. kwasu gamma-linolenowego (GLA)). Obniżają tym samym kwasowość nastawu, oraz zawartość powyższych kwasów w produkcie gotowym. Wiadomo bowiem że krótkołańcuchowe kwasy organiczne, w przeciwieństwie do długołańcuchowych przechodzą do destylatu, ponieważ temperatury wrzenia ostatnich osiągają wartości 180-200 °C (du Preez i inni,1996)

Niezwykle istotny wpływ na przebieg fermentacji oraz cechy produktu gotowego będą miały gatunki z rodzaju *Rhizopus*. Wykazują one zdolność wykorzystywania węglowodanów i poliolii do produkcji etanolu, oraz kwasów tj. mlekowy i fumarowy. Wytwarzanie tych substancji jest możliwe przy obecności w środowisku szerokiej gamy substratów, a najwyższa wydajność występuje, kiedy zużywana jest maltoza i sacharoza – ponad 60 g/l kwasu mlekowego. Z pozostałych cukrów wartość ta jest nieco mniejsza i kształtuje się średnio na poziomie 45 g/l. W przypadku wytwarzania kwasu mlekowego z poliolii, jej wielkość kształtuje się na znacznie niższym poziomie i waha się w granicach 2-5 g/l (Rosenberg i inni,1994). Wydajność produkcji etanolu oraz kwasu fumarowego, zależy od gatunku grzyba z rodzaju *Rhizopus*. Ogólnie przyjmuje wartości od 0 do 25 g/l etanolu, średnio około 13 g/l. Kwas fumarowy produkowany jest w ilości około 20 g/l (Soccol i inni,1994). Wytwarzanie alkoholu przez pleśnie z tego rodzaju bezpośrednio wpływa na jego zawartość w śliwownicy. Natomiast obydwa produkowane kwasy nie mogą przechodzić do destylatu ponieważ posiadają znacznie wyższe temperatury wrzenia od temperatury destylacji, stąd też ich udział w składzie spirytusu śliwkowego, polega na

tworzeniu łatwotlotnych estrów z alkoholami, które nadają charakterystyczne cechy jego bukietowi smakowo-zapachowemu.

Wpływ mikroflory obecnej w powietrzu na Śliwowicę łącką, nie musi być tylko pozytywny. Wyizolowano liczne mikroorganizmy mogące wytwarzać groźne dla zdrowia ludzkiego mykotoksyny. Literatura nie podaje jednakże charakterystyki fizyko-chemicznej poszczególnych z nich, trudno więc stwierdzić czy mogą one przechodzić do destylatu.

Przykładem organizmu silnie toksynotwórczego jest rodzaj *Alternaria*. Występuje ona bardzo szeroko w badanym środowisku, co potwierdzają wyniki omówione w poprzednim rozdziale. Z rodzaju *Alternaria* wyizolowano ponad 30 metabolitów, które mogą mieć negatywny wpływ na rośliny i zwierzęta. Główne toksyny wytwarzane przez te grzyby należą do trzech różnych grup strukturalnych są to: pochodne dibenzo-a -pironu, grupa metabolitów zawierających azot oraz pochodne perylenu. Pleśnie z rodzaju *Alternaria* nie zostały jeszcze dostatecznie scharakteryzowane, szczególnie pod względem toksykologicznym. Dotychczasowe badania wykazują toksyczność dla ssaków, pewną aktywność karcinogenną, mutagenną i cytotoksyczność poszczególnych metabolitów. Uważa się, że przy prawidłowej praktyce technologicznej w rozwiniętych społeczeństwach, ostre zatrucia ludzi i zwierząt żywnością i paszą skażoną toksynami *Alternaria* są mało prawdopodobne. Istnieje natomiast możliwość wystąpienia chronicznej toksykozy, jeżeli toksyny są obecne w niewielkich ilościach w spożywanej systematycznie żywności (Giryn,1991).

Jak widać z powyższej charakterystyki, wpływ wyizolowanej mikroflory powietrza na Śliwowicę łącką jest bardzo silny. Jednakże z powodu niezwyklej złożoności procesów mających miejsce podczas fermentacji, a także oddziaływań synergistycznych oraz antagonistycznych poszczególnych drobnoustrojów na siebie, niezwykle trudno jest jednoznacznie stwierdzić, że proces ten przebiega według takiego, a nie innego schematu. Celem poszerzenia naszej wiedzy na ten temat,

potrzebne są dalsze analizy w tym kierunku, które na pewno pozwolą zrozumieć mechanizmy mające swoje miejsce podczas procesu fermentacji śliwek przy udziale ich autochtonicznej mikroflory.

Jeśli potrzebujesz pomocy w napisaniu pracy z zakresu ochrony środowiska, to polecamy serwis [pisanie prac](#) - prace z ekologii i innych kierunków pisane na (prawie) każdy temat.