Maciej OZIEMBŁOWSKI[1], Damian MAKSIMOWSKI[2], Anna MIERNIK[3], Sylwester TABOR[3], Agnieszka NAWIRSKA-OLSZAŃSKA[1], Magdalena TRENKA[1]

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności (1)
Cold brew coffee / Etno Cafe sp. z o.o, Wrocław (2)
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki (3)

doi:10.15199/48.2020.01.34

Wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) na parametry ultrasłabej luminescencji oraz redukcję liczby komórek wybranych drobnoustrojów w ekstraktach kawy typu *cold brew*

Streszczenie. *W pracy badano poziom ultrasłabej luminescencji jako emisję fotonów z ekstraktów kawy typu cold brew po oddziaływaniach pulsacyjnych pól elektrycznych (PEF). Analizowano również intensywność emisji fotonów w trakcie trwania eksperymentu. Określono także poziom inaktywacji bakterii gronkowca oraz drożdży po utrwalaniu PEF. Nie stwierdzono różnicy emisji fotonów z niepasteryzowanych ekstraktach kawy typu cold brew w porównaniu do prób poddanych oddziaływaniom PEF, co uznać należy za potencjalnie korzystne zjawisko. Oddziaływania PEF w skuteczny sposób, w porównaniu do próby kontrolnej, obniżyły liczbę komórek bakterii (gronkowców) - o 0,3358D oraz drożdży – o ponad 2,5315D.*

Abstract*. The level of ultra-weak luminescence as the emission of photons from cold brew coffee extracts after the pulsed electric fields (PEF) treatment was examined. The intensity of photon emission during the experiment was also analyzed. The level of inactivation of staph bacteria and yeast after PEF treatment was also determined. There was no difference in photon emission from unpasteurized cold brew coffee compared to samples exposed to PEF, which should be considered a potentially beneficial phenomenon. PEF treatment effectively reduced the number of bacterial (staphylococci) cells by 0.3358D and yeast - by over 2.5315D compared to the control sample.*
(Impact of pulsed electric field (PEF) on the parameters of ultra-low luminescence and reduction of the number of cells of selected microorganisms in cold brew coffee extracts)*.*

Słowa kluczowe: ekstrakty kawy typu *cold brew*, pulsacyjne pola elektryczne, ultra słaba luminescencja, redukcja drobnoustrojów
Keywords: *cold brew* coffee extracts, pulsed electric fields, ultra weak luminescence, reduction of microorganisms

Wstęp

Pulsacyjne pola elektryczne (PEF) są jedną z metod utrwalania płynnych produktów spożywczych, również w ramach tzw. technologii płotkowej [1]. Ogólną ideą utrwalania PEF jest inaktywacja drobnoustrojów znajdujących się w płynie spożywczym za pomocą wysokonapięciowych impulsów. Utrwalane medium znajdować się musi pomiędzy dwoma elektrodami. Możliwy jest stacjonarny tryb pracy lub przepływowy. Oddziaływania PEF są skuteczne względem wegetatywnych form drobnoustrojów, zaś mało skuteczne lub nieskuteczne w przypadku form przetrwalnikujących [2]. Głównym powodem coraz większej popularności technologii PEF jest jej stosunkowo mniejszy wpływ na pogorszenie cech sensorycznych, fizycznych i chemicznych utrwalanych produktów w porównaniu do innych technologii, głównie termicznych. Innym atutem oddziaływań PEF jest zazwyczaj mniejsza energochłonność procesów technologicznych w porównaniu do klasycznych metod utrwalania [3]. Oddziaływania PEF mogą być ukierunkowane na zastosowanie wysokich wartości natężenia pola elektrycznego (powyżej 25 kV/cm) oraz dużej liczby impulsów (powyżej 200). Przy tego typu wysokoenergetycznych oddziaływaniach efekt utrwalania płynnego produktu spożywczego może być równie skuteczny jak klasyczna pasteryzacja. W przypadku zastosowania niższych wartości natężenia pola elektrycznego (poniżej 15 kV/cm) oraz mniejszej liczby impulsów PEF (poniżej 100) zazwyczaj niezbędne jest zastosowanie innego czynnika utrwalającego dla uzyskania odpowiedniego bezpieczeństwa mikrobiologicznego. W zależności od surowca i jego składu chemicznego oraz kwasowości czynnej często używa się dodatkowego czynnika lub grupy czynników wzmacniających efekt letalny w odniesieniu do mikroorganizmów obecnych w utrwalanym produkcie. Do takich dodatkowych czynników zaliczyć można m.in. promieniowanie UV, wysokoenergetyczne impulsy światła, zastosowanie wybranych dodatków, oddziaływania wysokich ciśnień i inne.

Pomiary ultrasłabej luminescencji (USL) mogą być jedną z uzupełniających fizycznych metod analizy jakości produktów spożywczych. Intensywność emisji fotonów z żywności może być pośrednio związana ze stopniem jej technologicznego przetworzenia. W chwili obecnej nie ma dowodów wskazujących, że żywność o określonym poziomie emisji fotonów jest lepsza od podobnej żywności, ale charakteryzującej się inną emisją fotonów. Wprawdzie są hipotezy wskazujące, że produkty spożywcze o optymalnym poziomie emisji fotonów mogą w fizyczny sposób wspomagać procesy związane z metabolizmem człowieka, to nie wiadomo jaki dokładnie byłby to mechanizm [4]. Niezależnie od stanu faktycznego w tej kwestii dotychczasowe badania własne dotyczące ultrasłabej luminescencji wykazały statystycznie istotne zróżnicowanie zależne od rodzaju produktu spożywczego oraz sposobu jego wytworzenia [5].

W przypadku kawy napoje na bazie palonego ziarna przygotowywane są różnymi metodami. Sposoby wytworzenia można podzielić na dwa rodzaje – metodę przelewową i immersyjną. Metoda przelewowa polega na przelaniu strumienia ciepłej wody przez warstwę zmielonych ziaren umieszczonych w filtrze, w którym zachodzi proces ekstrakcji i grawitacyjnego odsączania powstającego napoju do umieszczonego poniżej zbiornika. W domowych warunkach najczęściej wykorzystywanymi do przygotowania danego rodzaju kawy są ekspresy przelewowe, w których woda po uprzednim podgrzaniu zostaje przepompowana z zbiornika buforowego równymi strumieniami przez ziarna. W metodzie immersyjnej woda całkowicie zakrywa zmielone ziarna, co skutkuje pełniejszą i bardziej równomierną ekstrakcją [6].

Nowatorskim rozwiązaniem dla metody immersyjnej jest kawa typu *cold brew*. Z technologicznego punktu widzenia *cold brew coffee* jest produktem długotrwałej ekstrakcji palonej i mielonej kawy, która pozostaje w bezpośrednim kontakcie z wodą. Zimne parzenie jest przeprowadzane w temperaturze pokojowej (20–25 °C lub niższej) przez dłuższy czas niż tradycyjne metody parzenia na gorąco, z

typowymi czasami zaparzania od 8 do 24 godzin [7]. W tym sposobie to czas, a nie wysoka temperatura pozwala otrzymać napój kawowy o odmiennych właściwościach fizykochemicznych i sensorycznych w porównaniu do produktów uzyskanych tradycyjnymi metodami parzenia. Zmieniając typowy, gorący profil ekstrakcji na *cold brew* uzyskuje się produkt w odczuciu o mniejszej kwasowości, który bardziej odzwierciedla naturalny smak i aromat surowca.

Celem pracy była analiza emisji fotonów z ekstraktów kawy typu *cold brew* przed i po oddziaływaniach pulsacyjnych pól elektrycznych z jednoczesnym określeniem poziomu inaktywacji wybranych drobnoustrojów po takich oddziaływaniach.

Materiały i metody

Surowcem do badań była nieutrwalona klasyczna wersja ekstraktu kawy *cold brew*, w skład której wchodziła woda oraz kawa Arabica, przygotowana według receptury stosowanej w firmie Etno Cafe sp. z o.o. Próbą kontrolną był ekstrakt nie poddany oddziaływaniom PEF. Warianty badawcze stanowiły identyczne kawy poddane dwóm oddziaływaniom PEF o różnym stopniu intensywności. Mniej intensywne oddziaływania charakteryzowały się natężeniem pola elektrycznego na poziomie 27,40 kV/cm przy 400 impulsach PEF z interwałem czasowym wynoszącym 15 sekund. Silniejsze oddziaływania PEF przeprowadzone były przy natężeniu pola elektrycznego wynoszącym 34,25 kV/cm przy 400 impulsach z odstępem czasowym pomiędzy nimi wynoszącym 10 sekund. Utrwalanie PEF przeprowadzono w urządzeniu Ertec SU-1 (Rys. 1) w stacjonarnej celce (Rys. 2), w której odległość pomiędzy elektrodami wynosiła 0,73 cm, co odpowiadało objętości ekstraktu kawy poddanej oddziaływaniom PEF na poziomie 8,5 cm^3 [8].

Do oznaczenia liczby fotonów wykorzystano stanowisko pomiarowe przedstawione na Rysunku 3, które służy do badań ultrasłabej emisji fotonowej z surowców i produktów pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego poprzez pomiar zaników fluorescencji metodą skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów techniką TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting) za pomocą fotopowielacza umieszczonego nad komorą pomiarową, której parametry były regulowane przy wykorzystaniu oryginalnego oprogramowania BioLumi. Dokładną metodologię pomiaru emisji fotonów z próbek żywności w ramach analizy ultrasłabej luminescencji przedstawiono we wcześniejszych pracach zespołu [9]. W bieżących badaniach sposób oznaczenia emisji fotonów był standardowy według odpowiednich procedur laboratoryjnych [10].

Rys. 1. Generator pulsacyjnych pól elektrycznych (PEF) ERTEC SU-1 – widok ogólny urządzenia [11]

W ramach analizy mikrobiologicznej oznaczono liczbę bakterii (gronkowców) oraz drożdży do czego wykorzystano metodę seryjnych rozcieńczeń według Kocha i metodę płytek lanych. Rozcieńczenia badanego materiału zostały wykonane przy użyciu sterylnego roztworu soli fizjologicznej. Na płytki Petriego przeniesiono po 1 cm^3 z każdego rozcieńczenia i zalano odpowiednią pożywką. Doświadczenie wykonano w 2 powtórzeniach. Do izolacji wykorzystano podłoża –YPD Medium (BioMaxima, Warszawa, Polska) dla drożdży oraz Brain Heart Infusion Agar (BioMaxima, Warszawa, Polska) dla gronkowców. Podłoża zostały wysterylizowane w autoklawie w 121°C w ciągu 15 min.

Rys. 2. Komora urządzenia do generowania pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) ERTEC SU-1 z widoczną celką badawczą i elektrodą [11]

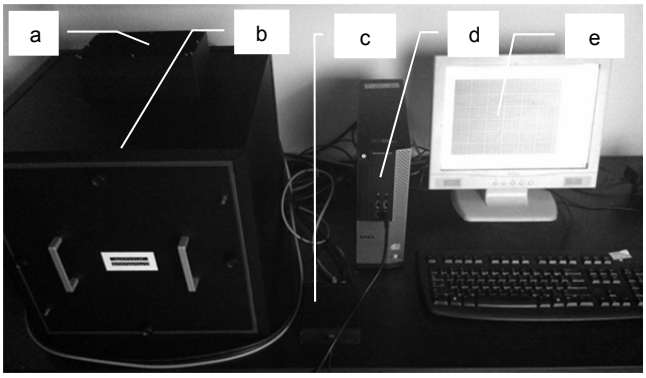
Płytki były inkubowane w temperaturze 37°C przez 24h dla bakterii oraz w temperaturze 28°C przez 72h dla drożdży. Po okresie inkubacji zliczono kolonie na płytkach, następnie zawartość mikroorganizmów przeliczono na jednostki tworzące kolonie – CFU. Liczbę jednostek tworzących kolonie obliczono wg wzoru:

$$\mathrm{CFU} = \frac{liczba\ kolonii * rozcieńczenie}{objętość\ inokulum}$$

Dodatkowo stopień redukcji liczby mikroorganizmów obliczono wg wzoru:

$$R = \log N/No$$

gdzie: N – liczba komórek, zdolna do wytworzenia kolonii, znajdująca się w 1 cm^3 próbki kontrolnej ; No – liczba komórek, zdolna do wytworzenia kolonii, znajdująca się w 1 cm^3 próbki utrwalonej. Wielkość redukcji odpowiadająca 1 rzędowi redukcji (1D) równa jest 90% inaktywacji drobnoustrojów w odniesieniu do próby kontrolnej.



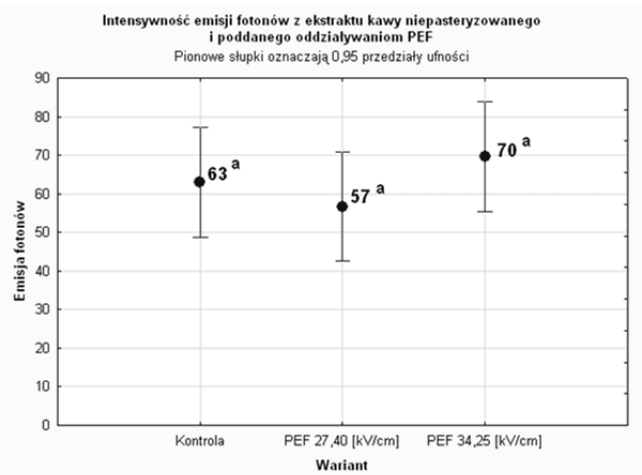
Rys. 3. Prototypowy układ pomiarowy umożliwiający rejestrację liczby fotonów emitowanych z produktów spożywczych: a-element światłoczuły (fotopowielacz), b-komora pomiarowa, c-interfejs, d-komputer, e-program BioLumi [10]

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej (analiza wariancji, test Duncana) wykorzystując do tego program *Statistica 12.5*.

Wyniki

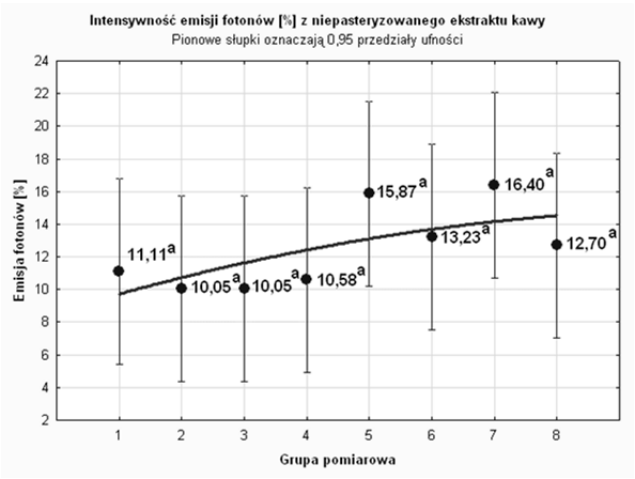
Emisja fotonów z kontrolnego ekstraktu kawy wynosiła 63umownych jednostek emisji fotonów (JEF) i stanowiła poziom odniesienia dla emisji prób poddanych oddziaływaniom PEF, dla których wartość ta wynosiła 57 i 70 JEF (Rys. 4). Oddziaływania PEF nie wpłynęły w sposób statystycznie istotny na emisję fotonów, co traktować należy jako zjawisko potencjalnie korzystne wskazujące na neutralność technologii PEF w odniesieniu do wielkości emisji fotonów. Przyczyny większej lub mniejszej emisji fotonów po oddziaływaniach różnych technologii na żywność trudno jest w tej chwili jednoznacznie wyjaśnić. Zjawisko to może być związane zarówno z tzw. emisją spontaniczną jak i wymuszoną elektronów znajdujących się na poziomach wzbudzonych i wracających na niższe poziomy energetyczne przy równoczesnej emisji fotonów. Niemniej zarejestrowana podczas naszego eksperymentu emisja fotonów może być uzależniona od wielu, nierozpoznanych na chwilę obecną czynników zmienności, dlatego trudno jest w tej chwili stawiać jednoznaczne hipotezy, bez przeprowadzenia większej ilości podobnych eksperymentów.

Dodatkowo przeprowadzono analizę emisji fotonów (podczas 10 minutowego pomiaru) ze wszystkich wariantów ekstraktów kawy typu *cold brew*. W tym celu cały okres pomiaru podzielono na 8 grup pomiarowych. Pierwsza grupa pomiarowa odpowiadała pierwszym 75 sekundom pomiaru czyli 75 zliczeniom odbywającym się co 1 sekundę. Ilość zliczeń w każdej grupie pomiarowej podana została na rysunku 5 (dotyczącym próby kontrolnej) jako wartość procentowa odnosząca się do całego sześciuset-sekundowego pomiaru, traktowanego jako 100%. Wszystkie 8 grup pomiarowych zostało porównanych ze sobą z wykorzystaniem analizy wariancji oraz testu Duncana (*post hoc*).



Rys. 4. Intensywność emisji fotonów z niepasteryzowanego ekstraktu kawy oraz poddanego oddziaływaniom PEF (p≤0,05)

Stwierdzono, że emisja fotonów z ekstraktu kawy dla wszystkich wariantów badawczych nie zmieniała się w statystycznie istotny sposób podczas analizy, tak samo jak wcześniej przeanalizowana pod tym względem w innych pracach emisja fotonów z próbek ziemniaków, marchwi, jaj oraz piw rzemieślniczych [12, 13, 14]. Inną zależność stwierdzono we wcześniejszych badaniach w stosunku do próbek gruszek i jabłek, gdzie zauważono statystycznie istotny spadek emisji fotonów z tych owoców podczas trwania pomiarów [12]. Intensywność emisji fotonów z ekstraktu kawy typu *cold brew* podczas przeprowadzonych analiz była na podobnym poziomie również w próbach po oddziaływaniach PEF. Oznacza to, że utrwalanie ekstraktów kawy typu *cold brew* pulsacyjnymi polami elektrycznymi nie powodowało zmiany intensywności emisji fotonów w trakcie pomiarów ultrasłabej luminescencji.



Rys. 5. Intensywność emisji fotonów z niepasteryzowanego ekstraktu kawy w trakcie trwania pomiaru (10 minut) w zależności od grupy pomiarowej (czasu) (p≤0,05)

Na podstawie przeprowadzonych analiz mikrobiologicznych stwierdzono redukcję liczby komórek bakterii (gronkowców) oraz drożdży w badanych próbkach po oddziaływaniach PEF (Tab. 1).

Oddziaływania PEF były skuteczną technologią powodującą obniżenie liczby komórek bakterii (gronkowców) w ekstraktach kawy (o 0,2688D-0,3358D) w porównaniu do próby kontrolnej. W jeszcze większym stopniu miała miejsce redukcja liczby komórek drożdży po oddziaływaniach PEF przy natężeniu pola elektrycznego wynoszącym 34,25 [kV/cm], gdyż była ona na poziomie ponad dwóch rzędów (ponad 2,5315D) w odniesieniu do liczby komórek drożdży w niepasteryzowanym ekstrakcie kawy. Silniejsze oddziaływania PEF o natężeniu pola elektrycznego wynoszącym 34.25 kV/cm skutkowały statystycznie istotnie większą redukcją zarówno bakterii gronkowca jak i drożdży w porównaniu do słabszego utrwalania PEF, tj. na poziomie 27,40 kV/cm.

Tabela 1. Stopień redukcji bakterii gronkowców oraz drożdży po oddziaływaniach pulsacyjnego pola elektrycznego (n=2). Różne litery (w kolumnach) oznaczają różne grupy jednorodne (p≤0,05)

	Bakterie (gronkowce)		Drożdże	
	CFU	D	CFU	D
Kontrola	65	-	$3,4*10^2$	-
PEF 27,40 [kV/cm] 400 impulsów co 15 sekund	35	$0,2688^a$	50	$0,8325^a$
PEF 34,25 [kV/cm] 400 impulsów co 10 sekund	30	$0,3358^b$	<1	$>2,5315^b$

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono różnicy emisji fotonów z niepasteryzowanej kawy typu *cold brew* w porównaniu do prób poddanych oddziaływaniom PEF, co uznać należy za potencjalnie korzystne zjawisko. Oddziaływania PEF w skuteczny sposób, w porównaniu do próby kontrolnej, obniżyły liczbę komórek bakterii (gronkowców) o 0,3358D oraz drożdży – o ponad 2,5315D. Przedstawione wyniki wskazują na przydatność metody PEF jako alternatywnego sposobu utrwalania ekstraktów kawy sporządzonych na zimno.

***Autorzy**: dr hab. inż. Maciej Oziembłowski, mgr Magdalena Trenka, dr hab. inż. Agnieszka Nawirska-Olszańska, prof. UPWr, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, ul. Chełmońskiego 37, 51-630 Wrocław, e-mail: maciej.oziemblowski@upwr.edu.pl,mgr inż. Damian Maksimowski,Cold brew coffee / Etno Cafe sp. z o.o, Wrocław, e-mail: d.maksimowski@10g.pl, mgr inż. Anna Miernik, dr hab. inż. Sylwester Tabor, prof. UR, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki 30-149 Kraków, ul. Balicka 116 b, e-mail:sylwester.tabor@ur.krakow.pl*

LITERATURA

[1] Khan I.,Tango Ch.N., Miskeen S., Lee B.H., Oh D.H. Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety - A review, Food Control 73 (2017), 1426-1444.

[2] Kempkes M.A., Tokusoglu O. PEF systems for industrial food processing and related applications. In: Improving Food Quality with Novel Food Processing Technologies. Ed. Tokusoglu O., Swanson B.G., CRC Press, Boca Raton, London, New York. (2015) 427-453.

[3] Tokusoglu O., Barbosa-Canovas G.V., Zhang H.Q. Improving liquid egg quality by Pulsed Electrical Field Processing. In: Improving Food Quality with Novel Food Processing Technologies. Ed. Tokusoglu O., Swanson B.G., CRC Press, Boca Raton, London, New York. (2015) 413-425.

[4] Popp F.A., Yan Y., Delayedluminescence of biologicalsystems in terms of coherentstates, (2002), PhysicsLetters, A 293, 9397.

[5] Oziembłowski M., Dróżdż M., Kiełbasa P., Dróżdż T., Gąsiorski A., Nawara P., Tabor S., Ultra słaba luminescencja (USL) jako potencjalna metoda oceny jakości żywności tradycyjnej, Przegląd Elektrotechniczny, 93 (2017), 12, 131-134

[6] Arnot B., Kawa dla zdrowia (2019) Wydawnictwo Vivante. Białystok, 141-171.

[7] Cordoba, N., Pataquiva, L., Osorio, C. *et al.* Effect of grinding, extraction time and type of coffee on the physicochemical and flavour characteristics of cold brew coffee. *Sci Rep* 9 (2019), 8440.

[8] Oziembłowski M., Dróżdż T., Wrona P., 2013. Oddziaływanie Pulsacyjnych Pól Elektrycznych (PEF) na mikroorganizmy w kontekście technologii żywności. Przegląd Elektrotechniczny, 89 (2013), 12, 222-225.

[9] Kiełbasa P., Dróżdż T., Nawara P., Dróżdż M., Wykorzystanie emisji biofotonów do parametryzacji jakościowej produktów spożywczych, Przegląd Elektrotechniczny, 93 (2017), 1, 153-156.

[10] Kiełbasa P., Badania ultrasłabej emisji fotonowej z surowców i produktów biologicznych, procedura badawcza, (2018), Laboratorium Eksperymentalnych Technik Badawczych Surowców i Produktów Biologicznych Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

[11] Oziembłowski M., Wpływ pulsacyjnych pól elektrycznych (PEF) oraz skoncentrowanego pola mikrofalowego (CMF) na wybrane cechy płynnych produktów jajczarskich (2019), Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

[12] Oziembłowski M., Dróżdż M., Juliszewski T., Trzyniec K., Wpływ naświetlania światłem białym lub niebieskim na wielkość emisji fotonów w wybranych produktach spożywczych, Przegląd Elektrotechniczny, 94 (2018), 2, 104-107

[13] Oziembłowski M., Dróżdż M., Nawara P., Trzyniec K., Popardowski E., Nawirska-Olszańska A. Analysis of ultra-weakphotonemission from craftbeers. Applications of Electromagnetics in Modern Techniques and Medicine (PTZE). Racławice, Poland, 9-12 Sept. 2018, (2018) 175-178, DOI:10.1109/PTZE.2018.8503228, URL: https://ieeexplore.ieee.org/document/8503228

[14] Galazka-Czarnecka I.; Korzeniewska E.; Czarnecki A. Sojka M., Kielbasa P., Drozdz T: Evaluation of Quality of Eggs from Hens Kept in Caged and Free-Range Systems Using Traditional Methods and Ultra-Weak Luminescence, Applied Sciences-Basel 2019 Vol.: 9 no: 12 Article Number: 2430