

APLICAȚII ALE CONTROLULUI CU MATERIALE FUNCȚIONALIZATE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ, CONFORM NORMATIVELOR UNIUNII EUROPENE (HACCP)

Prof. dr. ing. Gorduza V.M.
Ing. Doroffel C.D.
Conf. dr. Șuteu D.

Rezumat

Denumirea de HACCP este de sorginte engleză „*Hazard Analysis, Critical Control Points*” și reprezintă o metodă modernă, în acord cu noua legislație și regulamentele Uniunii Europene.

Conform acestei legislații, producătorii sunt responsabili pentru calitatea produselor lor, în mod expres sub aspectul sănătății consumatorilor și igienei spațiilor de fabricație. Metoda HACCP este echivalentă cu *Analiza riscurilor în punctele critice de control (ARCCP)* [1].

Normele HACCP trebuie corelate cu utilizările enzimelor și preparatelor enzimatice imobilizate în biotehnologii alimentare.

Producerea și folosirea enzimelor este o caracteristică a biotehnologiilor alimentare. Utilizarea unor preparate enzimatice, ca aditivi alimentari, implică standarde severe de puritate și de asigurare a controlului stabilității în produsele finite, fără a periclită sănătatea consumatorilor.

Separarea enzimelor din amestecuri de proveniență naturală sau biotehnologică și controlul proceselor de prelucrare sunt realizabile prin aplicarea cromatografiei de afinitate cu liganzi biomimetici [2-7].

Abstract

HACCP is an important subject, because its use has been prescribed in many of the current international food quality assurance directives and regulations. Under these, the emphasis has been switched to the situation where the manufacturer is required to demonstrate and keep detailed records that every reasonable precaution has been taken to ensure that the product will be safe to eat.

In the future, food manufacturers who wish to export their products will be required to use HACCP in their quality assurance procedures as condition of the importing country. The European Union is in the process of inspecting and licensing all countries that export food products to member States to ensure that they have quality management and inspection systems that fully comply with those applied within European Union. The application of HACCP is an important part of this.

Obținerea enzimelor.

Sursele de obținere a enzimelor sunt țesuturile vegetale sau animale și microorganismele. De exemplu, insulina și α -chimotripsina se extrag din pancreasul animalelor sacrificate, glucozo-izomeraza

din diverse specii de bacterii sau mușcăiuri etc. [5]

Natura sursei de enzimă (plantă, animal sau microorganism) dictează disponibilitatea, costul materialului - sursă, ușurința recuperării etc. (tabel 1)

Tabelul 1

Surse de enzime

Sursa generală	Sursa specifică	Avantaje / Dezavantaje	Exemple
Animale	Sânge uman, țesuturi de bovine, porcine și ovine.	Nu este o sursă viabilă pe termen lung; Disponibilitate în cantitate mare; Enzimele sunt de stabilitate mică; Purificarea este adesea complexă.	lipază pancreatică, renină, tripsină
Plante	Frunze, fructe	Purificarea poate fi o problemă.	papaină
Microorganisme	Bacterii, alge, fungii și drojdii	Tehnologie avansată și purificare simplă; Mare varietate de activități enzimatică; Un număr limitat de microorganisme pot fi utilizate în industria alimentară.	proteaze, amilaze, lipaze

Majoritatea enzimelor utilizate provin din surse microbiene (bacterii, fungii, mușcăiuri și actinomicete), prin procese de fermentație.

- ✗ Când sunt utilizate preparatele enzimatică brute este necesară doar concentrarea prin ultrafiltrare, precipitarea extractului primar sau imobilizarea celulelor întregi.
- ✗ Când este necesară îndepărtarea proteinelor contaminante trebuie aplicate metode de purificare mai complexe.

Obținerea enzimelor comportă următoarele etape (Figura 1) [5]:

- pregătirea sursei;
- extracția enzimelor prin dezagregarea celulelor și separarea subfracțiunilor celulare;
- izolarea enzimei prin fracționarea fazei proteice;
- purificarea enzimei la produs cristalinizat.

Particularitățile utilizării enzimelor

Printre enzimele utilizate industrial se numără: glucozoizomeraza, amilazele, proteazele pancreatice și acil-amidazele (Tabelul 2) [5].

Aplicațiile industriale ale enzimelor prezintă avantaje legate de selectivitate și specificitate, asigurarea efectului catalitic în condiții blânde de reacție, fără formarea unor produși secundari.

Avantajele utilizării enzimelor derivă din: mărirea catalitică a vitezei și specificitatea de reacție.

Abilitatea enzimelor de a crește viteza de reacție cu câteva ordine de mărime este de interes pentru perfectarea reacțiilor în condiții blânde.

Consecințele acestor condiții sunt: tehnologii simple, reducerea formării produșilor secundari și posibilitatea aplicării în industria alimentară.

Specificitatea de substrat a enzimelor asigură stereoselectivitatea biosintezelor și reduce interferența substraturilor indesezirabile.

Tehnicile de purificare vizează izolarea unei enzime dintr-un amestec complex, având caracteristici corespunzătoare de: puritate,

productivitate și eficiență. Noile tehnici de purificare a enzimelor includ ultrafiltrarea cu membrane selective și tehnici cromatografice performante, precum cromatografia de afinitate (Figura 2.) [6]

Între enzimele microbiene utilizate în procese biotehnologice predomină hidrolazele, deoarece au acțiune biocatalitică în absența cofactorilor. Se folosesc în panificație, fermentația alcoolică și a berii.

În biotehnologii, enzimele se folosesc în special sub forma *preparatelor enzimatiche*, immobilizate pe suporturi solide.

Preparatele enzimatiche sunt comercializate în diferite forme condiționate, precum: pudră amorfă sau microcristalină, soluție, formă adsorbită sau legată covalent.

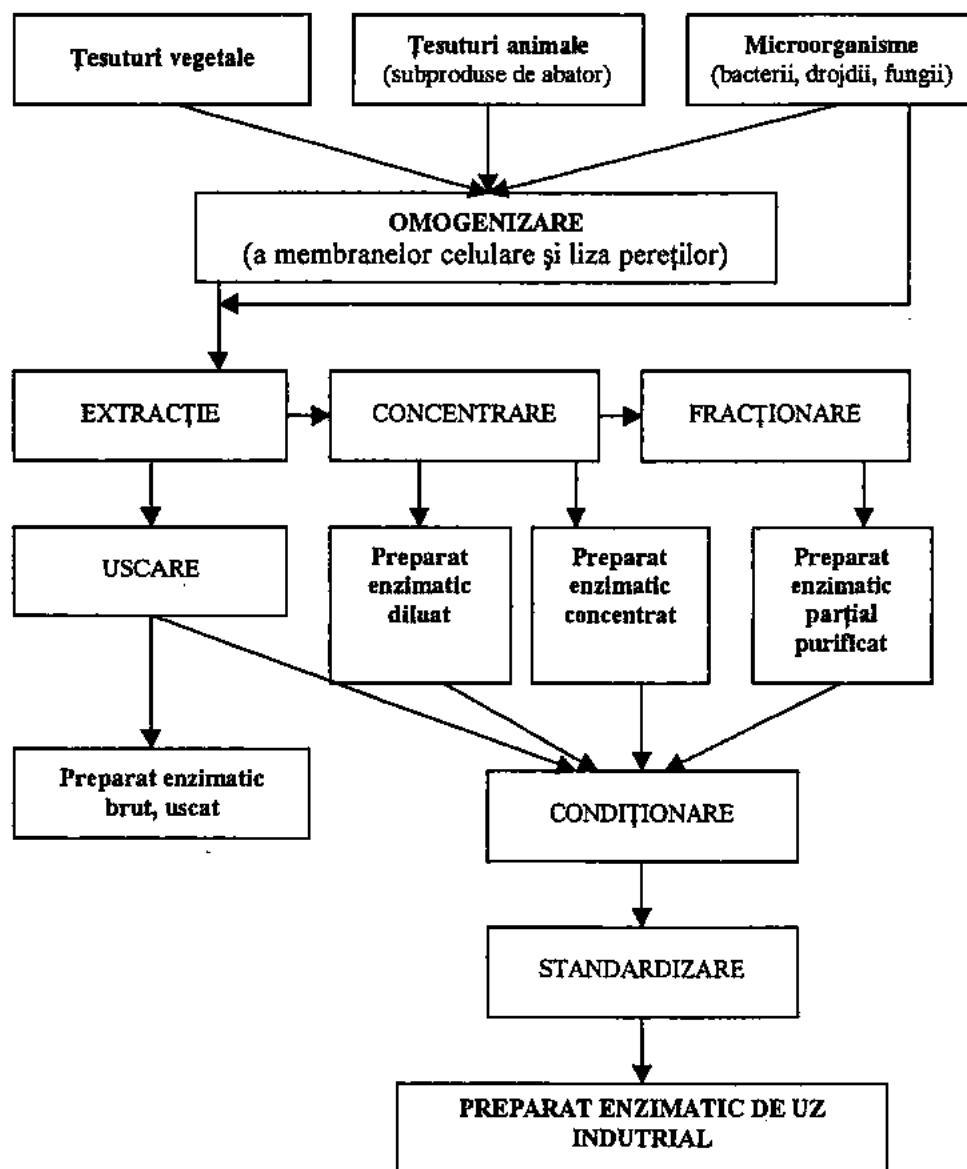


Fig. 1 Obținerea enzimelor

Etapele separării enzimelor

Formele lichide sau pulverulente ale preparatelor enzimatică conțin diferiți aditivi. Sunt preferate preparatele lichide, deoarece pot fi ușor dozate și nu intervin efecte de prăfuire în secțiile de fabricație.

Imobilizarea enzimelor pe suport solid permite utilizarea repetată, recuperarea ușoară, oprirea reacției prin filtrare, operarea continuă, obținerea unor produse pure, controlul eficient al procesului etc.

Tehnicile de încapsulare și granulare a preparatelor enzimatică elimină problemele potențiale ale toxicității enzimelor, precum și efectul pulberilor, care expun operatorii la reacții alergice.

Utilizarea enzimelor în reacții în fază omogenă apoasă prezintă unele dezavantaje. Enzimele nerecuperate determină impurificarea produselor, inacceptabilă în cazul alimentelor.

Imobilizarea enzimelor asigură: creșterea stabilității structurale, conservarea activității cu posibilitatea refolosirii biocatalizatorului; operarea în flux continuu; avantajul stopării reacției enzimatică la momentul dorit, evitarea trecerii enzimei în produsul transformării, diminuând costurile procesului tehnologic.

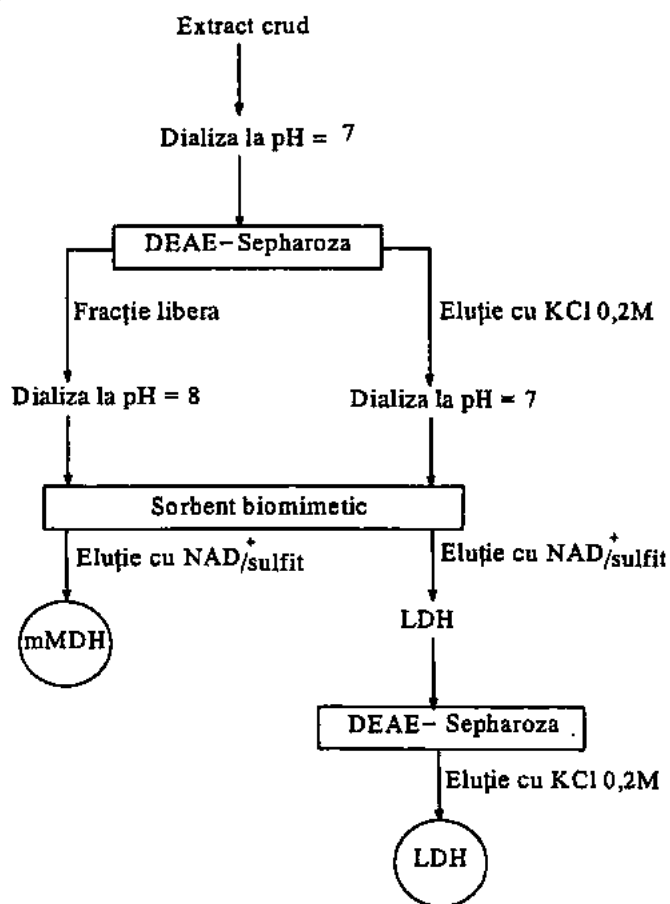


Fig. 2. Purificarea prin cromatografie de afinitate a L-malat dehidrogenazei (MDH) și a lactat dehidrogenazei (LDH) pe bază de extract de inimă de bovine prin cromatografie de afinitate

Tabelul 2

Surse și utilizări ale unor enzime

Enzima	Acțiunea	Sursa	Utilizări
□-amilază	Hidroliza amidonului la maltoză și oligozaharide	<i>Aspergillus oryzae</i>	Ameliorarea preparatelor de panificație; adjuvant digestiv
		<i>Bacillus subtilis</i>	Lichefierea amidonului în industriile fermentative (etanol, bere); obținerea enzimatică a glucozei;
		Maiț	Industria fermentativă (bere, acid lactic)
□-amilază	Hidroliza amidonului la maltoză și dextrine	Maiț, fungi	Obținerea siropului de maltoză (în asociere cu □-amilaza) în industria fermentativă și a glucozei.
Amiloglucozidaza	Hidroliza amidonului la maltoză și dextrine	<i>Aspergillus niger</i> și <i>Aspergillus oryzae</i>	Fabricarea siropului de glucoză, a glucozei și dextrozei.
Pectinaze	Degradarea pectinelor din fructe	<i>Aspergillus</i>	Limpezirea sucurilor de fructe
Celulază	Hidroliza celulozei la glucoză	<i>Trichoderma Viride</i>	Prepararea fructelor și legumelor deshidratate; extracția uleiului vegetal.
□-Glucanază	Degradarea glucanului, xitanului și arabanului	<i>Bacillus subtilis</i>	Reducerea viscozității berii.
Lactază	Hidroliza lactozei la glucoză și galactoză	<i>Saccharomyces fragilis</i>	Aditiv pentru înghețată; prevenirea intoleranței la lactoză.
Dextranază	Degradarea dextranului	<i>P. funiculosum</i>	Scăderea viscozității siropului de zaharoză;
Lizozim	Degradarea pereților bacterieni	Albuș de ou	Adaos la hrana copiilor.
Invertază	Hidroliza zaharozei	Drojdie de panificație	Hidroliza zaharozei din gemuri, fabricarea bom-boanelor cu miez moale.
Papaina	Hidroliza proteinelor	Suc de papaia	Stabilizarea berii, frăge-zirea cămii, gelifierea deserturilor, prepararea concentratelor de pește.
Bromelaina	Hidroliza proteinelor	Suc de ananas	
Tripsina	Hidroliza proteinelor	Pancreas bovin	Adjuvant digestiv
Chimotripsina	Hidroliza proteinelor	Pancreas bovin	Adjuvant digestiv

Pepsina

Renina

Enzima	Acțiunea	Sursa	Utilizări
	Hidroliza proteinelor	Mucoasa stomacală bovină	Adjuvant digestiv
	Hidroliza proteinelor	Stomac de vițel	Coagularea laptelui în industria de brânzeturi.
Proteaza fungică	Hidroliza proteinelor	<i>A. oryzae</i>	Tratarea aluatului
Proteaza bacteriană	Hidroliza proteinelor	<i>Bacillus subtilis</i>	În industria berii fără malț
Lipaza	Hidroliza grăsimilor	Pancreas fungii	Aromatizarea margarinei, înghețatei, ciocolatei, brânzeturilor
Ribonucleaza	Scindarea ARN la nucleotide	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Streptomyces griseus</i>	Obținerea nucleotidelor de aromatzare
Glucozooxidaza	Oxidarea glucozei la acid gluconic	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Prevenirea degradării culorii și aromei maionezelor și sucurilor de fructe
Catalaza	$H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$	<i>A. niger</i> și <i>Penicillium</i>	Antioxidant alimentar
Glucozoizomerază	Transformarea glucozei în fructoză	<i>L. brevis</i> , <i>S. olivaceus</i>	Obținerea siropului de fructoză din siropul de glucoză.

Aplicațiile enzimelor în biotehnologii alimentare

Industria alimentară utilizează enzime din diferite clase, mai importante fiind: amilazele, proteinazele, pectinazele, lipazele, celulazele etc.[3,5,7]

Amilazele - α -amilaza, amiloglucozidaza și glucozoizomeraza se utilizează în industria amidonului.

Produsele de hidroliză ale amidonului, precum: maltodextrinele, siropurile de glucoză și fructoză, sunt aditivi, stabilizatori, adezivi, aglutinanți pentru dulciuri, sucuri, gemuri, conserve, înghețată, alimente pentru sugari, iaurturi, brânzeturi, fiind de interes și pentru fermentația berii și a vinului etc.

Glucozoizomeraza (G.I.) este una dintre cele mai importante enzime

industriale. Catalizează transformarea glucozei din siropurile rezultate la zaharificarea amidonului în fructoză.

Fructoza este mai dulce decât glucoza, iar siropul care conține 51% glucoză și 42% fructoză este un înlocuitor al zaharozei, folosit în industria alimentară.

Cea mai studiată familie de Glucozoizomeraze (G.I) este produsă de specii de *Streptomyces* (*albus*, *wendmorensis*, *olivo-cromogenes*, *bikiniensis* etc.). Biosinteza are loc pe un mediu de: extract de porumb, tărâțe de grâu, $MgSO_4$, $NaCl$, la $30^\circ C$ și aerare (*S. wendmorensis*), cu adaos de $CoCl_2$ (*S. albus*) sau cu sursă de carbon peptonă, extract de drojdii și extract de carne (*S. bikiniensis*).

Biomasa are tendință de aglomerare în granule compacte, cu inhibarea producției de G.I. Adăsurii de agar-agar sau carboximetil - celuloză favorizează dezvoltarea unui miceliu filamentar, care este mai productiv.

Biomasa poate fi folosită ca atare sau poate fi imobilizată. Prin imobilizare cu colagen, la pH=11 și tratare ulterioară cu tananți rezultă un complex reticulat, cu activitatea de 25% din cea inițială, condiționat sub formă de membrană.

Prin centrifugarea biomasei la pH=6,3 și atomizarea concentratului se obține o pulbere, care amestecată cu aldehydă glutarică dă, după extrudare, microgranule, cu activitate de 20-30% din cea inițială.

Produsul purificat se obține din biomasă, prin filtrare, spălare cu apă demineralizată, uscare, suspendare în soluție de CoCl_2 0,05 M, la pH=6,25 și 58°C, filtrare de materialul celular, concentrare, precipitare cu acetonă, centrifugare, dializă și liofilizare. Produsul este fracționat prin gel-cromatografie pe poli-acrilamidă.

α -Amilazele sunt enzime care hidrolizează legăturile endo 1,4- α -glicozidice din oligo- și polizaharide.

Producători fungici de α -amilaze sunt: *Streptomyces albus*, *S. tosaensis*, *A. oryzae*, *Rhizopus oryzae*. Pentru obținerea α -amilazei fungice sunt utilizate sușe de: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Endomycopsis*.

Se folosesc preparate enzimactice brute, cu activitate α -amilazică și glucozidazică.

Complexul α -amilazic din fungi este utilizat în panificație, pentru mărirea porozității, menținerea prospețimii, producerea unei coji rumene, reducerea

timpilor de prelucrare a aluatului și posibilitatea folosirii făinii din cerealele recoltate timpuriu.

α -Amilazele bacteriene pot fi obținute industrial cu tulpini selecționate din speciile *Bacillus subtilis*, *B. subtilis amyloliquefaciens*, *B. macerans*, *B. licheniformis* etc.

α -Amilaza din *B. subtilis* este o metal-enzimă termostabilă, cu pH optim 6,0, și temperatură optimă 60°C. Termostabilitatea sa crește în prezența ionului de calciu. Complexul α -amilazic bacterian catalizează hidroliza amidonului, acționând asupra punților 1,4 α -endo din amiloză și amilopectină.

α -Amilaza bacteriană este utilizată în procese biotehnologice pentru: glucoză, bere, spirt și dextrine.

Proteinazele sunt valorificate în hidroliza nespecifică a substraturilor proteice, cu mase moleculare mari. Se utilizează în panificație, în industria berii, în prelucrarea cărnii și producerea de gelatină. Se folosesc și ca aromatizanți.

Sunt folosite pentru recuperarea proteinelor ce rezultă ca rezidii din carcasele de animale în abatoare și din pește în instalațiile de prelucrare. Produsul rezultat este aditiv pentru supe și conserve de carne.

Proteinazele sunt suplimente pentru hrana animalelor.

Pectinazele sunt utilizate pentru piureuri de fructe și legume, în extracția și limpezirea sucurilor de fructe (mere, pere, struguri) și a vinului, precum și ca adjuvant în extracția uleiului de măsline.

Lipazele se folosesc ca aditivi aromatizanți pentru creme, cafea, zahăr

candel, supe sau produse de patiserie și panificație. Sunt utilizate și pentru maturarea accelerată a brânzeturilor.

Celulazele sunt aditivi digestivi, utilizați drept complemente alimentare.

Prin fermentație microbiană pot fi sintetizați aminoacizi (DL-alanină, L-arginină, L-histidină, L-serină etc.) utilizați ca precursori pentru: îndulcitori artificiali (aspartam) și ca suplimente nutriționale.

Enzimele termostabile trebuie să corespundă următoarelor condiții:

- să fie enzime mezofile, stabile și disponibile comercial;
- prin imobilizare să rezulte enzime cu termostabilitate crescută;
- stabilizare prin adaos de: substraturi, cofactori, ioni metalici, săruri, zaharide, polioli, polietilenglicol;
- creșterea concentrației solutului prin înlocuirea fazei apoase cu o fază organică;
- creșterea stabilității intrinseci și a termostabilității prin mutageneza unei enzime.

O variantă de interes este utilizarea microorganismelor termofile, care se dezvoltă la 45 - 55 °C. Termofilele extreme (cu temperaturi optime 70-105 °C, și temperatură maximă de 110 °C) provin din bacterii de tip *Pyrodictium*. Enzimele termostabile sunt rezistente la denaturare și degradare.

Enzime artificiale. Interesul pentru producerea de enzime artificiale a fost stimulat de posibilitatea realizării unor reacții biomimetice, în condiții de stabilitate și reproductibilitate, soldate cu menținerea activității catalitice și a specificității enzimelor.

Pentru proiectarea enzimelor artificiale sunt folosite diferite sisteme de model, printre care compușii de incluziune cu α - și β -ciclodextrine, implicând legături de hidrogen cu grupele hidroxil.

Aplicațiile HACCP

- presupun un grad înalt de specialitate;
- se realizează pentru un anumit produs care se fabrică într-o întreprindere, cu o anumită dotare și un anumit personal.

Planul de analiză a riscurilor este aplicat inițial în sfera producției și în final extins pentru etapele post-fabricație [1].

Etapa 1: constă în **definirea termenilor de referință**, în corelație cu următoarele elemente:

- specificarea produsului/procesului;
- stabilirea tipului de risc (microbiologic, chimic, fizic);
- obiectivul studiului (calitatea sau inocuitatea);
- punctul final reprezentat de încheierea fabricației sau momentul consumului.

Etapa 2 presupune **Selectarea echipei HACCP:**

- membri din diverse domenii;
- președinte cu experiență în aplicarea HACCP;
- specialist în asigurarea și controlul calității;
- specialist în probleme de producție/proces;

- inginer cu cunoștințe despre proiectarea și exploatarea igienică a fabricii;
- alocarea de resurse adecvate realizării studiului;
- implicarea echipei în instruirea HACCP a întregului personal.

Etapa 3 - Descrierea produsului presupune cunoașterea:

- modului de ambalare;
- termenului de valabilitate;
- instrucțiunilor de utilizare;
- condițiilor de depozitare și distribuție;
- compoziției;
- structurii;
- modului de prelucrare.

Etapa 4 - Utilizarea intenționată a produsului vizează stabilirea grupurilor de destinație:

- presupune posibilitatea ca produsul să fie consumat de grupuri de populație, susceptibile la îmbolnăvire (vârstnici, copii, persoane cu imunitatea scăzută).

➤ **Etapa 5 – Construirea diagramei de flux a procesului:**

- se aplică principiul că „un desen valorează mai mult decât o mie de cuvinte”.

Etapa 6 – Verificarea diagramei de flux prin comparație cu situația existentă în practică.

- Această verificare se impune deoarece apar uneori diferențe chiar de la un schimb la altul, în funcție de modul de conducere a procesului.

Etapa 7 – Identificarea riscurilor.

- Riscul este definit ca un element de natură biologică, fizică, chimică, ce poate construi o amenințare la adresa sănătății oamenilor.
- ◆ Un produs alimentar poate fi afectat de trei categorii de riscuri:
 - ✦ risc biologic:
 - riscuri bacteriene;
 - riscuri virale;
 - parazitologice.
 - ✦ risc chimic;
 - ✦ risc fizic.
- ◆ În această etapă se vor analiza și mărimile care vor ține sub control riscurile.

Etapa 8 – Determinarea punctelor critice de control.

Se impune o distincție între puncte de control (C.P.) și punctele critice de control (CCP) (tabelul 3).

Tabelul 3

CCP	CP
<ul style="list-style-type: none"> - pasteurizarea laptelui; - sterilizarea cutiilor de conserve 	<ul style="list-style-type: none"> - instalarea de tăvi cu dezinfectant pentru încălțăminte la intrarea în secția de conserve; - combaterea dăunătorilor.

Etapa 9 – Stabilirea limitelor critice în punctele critice de control.

Motto-ul de bază aplicat la această etapă ar fi: „Nu se va fabrica un produs dacă procesul tehnologic nu asigură inocuitatea acestuia”.

Etapa 10 – Monitorizarea punctelor critice de control – se poate realiza prin 5 modalități:

- observarea vizuală;
- aprecierea senzorială;
- măsurători fizice;
- testări chimice;
- analize microbiologice.

Etapa 11 – Măsuri corective ce se aplică la depășirea limitelor critice:

- ☛ se întrerupe operația, dacă este necesar;
- ☛ se izolează produsele suspecte (carantină);
- ☛ se identifică și se corectează cauza deviației;
- ☛ se ia o decizie privind destinația produselor izolate;
- ☛ se înregistrează faptele petrecute și măsurile luate;
- ☛ se poate revizui și îmbunătăți planul H.A.C.C.P.

Etapa 12 – Verificarea programului H.A.C.C.P.

Prin verificare se realizează asigurarea calității igienice:

- ☛ verificarea se face periodic
- ☛ verificarea vizează modul de funcționare și eficiența întregului program H.A.C.C.P.

Etapa 13 – Implementarea sistemului H.A.C.C.P.

– presupune introducerea sistemului într-o unitate de fabricare, preparare sau servire a produselor alimentare.

Etapa 14 – Instruirea H.A.C.C.P.

Pentru ca introducerea acestui program să fie eficientă este esențială instruirea personalului și conștientizarea consumatorilor privind principiile și aplicațiile H.A.C.C.P.

- Sunt de interes normativele HACCP pentru:

☛ Industria laptelui

- În terminologia HACCP, *Mycobacterium tuberculosis* a fost identificat ca un risc potențial, iar pasteurizarea ca CCP.
- Ulterior *Salmonella*, *Campylobacter* și *Listeria monocytogenes* au completat lista riscurilor potențiale din laptele crud, iar pasteurizarea s-a dovedit a fi principala măsură preventivă.

☛ Industria cărnii normele GMP se referă la:

- practicile igienice de manipulare;
- proiectarea igienică a instalațiilor și a secțiilor de prelucrare.
- programele de igienizare;
- care vizează foarte multe aspecte legate de curățenia

echipamentelor, controlul insectelor și dăunătorilor etc.;

≪ **diferite spații de producție și centre comerciale:**

- abatoare;
- fabricarea conservelor cu aciditate scăzută;
- sectorul produselor alimentare refrigerate;
- industria margarinei;
- asimilarea de produse noi, eventual cu aditivi speciali;

- comercializarea cu amănuntul a produselor alimentare:
 - supermagazine,
 - magazine mici cu amănuntul etc.

Respectarea normelor HACCP [1] și valorificarea unor metode performante de separare prin cromatografie de afinitate cu liganzi biomimetici a enzimelor și alimentelor, precum și dozarea aditivilor alimentari constituie condițiile pentru creșterea calității vieții și protecția consumatorului [4-7].

Bibliografie

1. *Normativele HACCP ale Comunității Europene.*
2. Banu, C., "Biotehnologii în industria alimentară", Editura Tehnică, București, 2000.
3. Tărăbășanu-Mihăilă, C., Boscornea C., Gorduza V.M., "Compuși naturali – Alimente", Editura Semne, București, 2001.
4. Gorduza, V.M., Tărăbășanu-Mihăilă C., Athanasiu A., Gorduza E.V., "Coloranți organici cu aplicații neconvenționale (în optoelectronică și biotehnologii)", Editura Uni-Press, București, 2000.
5. Gorduza, V.M., Tofan L., Șuteu D., Gorduza E.V., " Biomateriale – Biotehnologii – Biocontrol", Editura CERMI, Iași, 2002
6. Clonis, Y.D., Labron N.E., Kotsira V.P., *J. Chromatogr., A*, 2000,891(1),33.