

Załącznik nr 6 - METODYKI BADAWCZE

Cel i kontekst przetargu

Zamawiający poszukuje wyspecjalizowanego laboratorium, które będzie w sposób kompleksowy i powtarzalny analizować multiteksturalne wielowarstwowe batony wysokoproteinowe. Niniejszy dokument stanowi opis **metodyk badawczych**, które muszą zostać ujęte w ofercie. Opisy zostały przygotowane w formie narracyjnej, aby jednoznacznie przedstawić cel, zasadę działania, kluczowe parametry i oczekiwane rezultaty każdej z technik.

Opisy:

1. Metody fizyko-chemiczne i sensoryczne

1.1 Analizy sensoryczne i wizualne

Panel sensoryczny

W ramach panelu co najmniej dziesięciu przeszkolonych degustatorów, certyfikowanych zgodnie z ISO 8586, ocenia produkt w warunkach sali degustacyjnej o kontrolowanym oświetleniu i temperaturze. Każda próbka zostaje zrandomizowana i zaszyfrowana, dzięki czemu paneliści nie znają jej pochodzenia. Degustatorzy przyznają punkty w skali od 0 do 10 dla pięciu atrybutów: smak, zapach, konsystencja, wygląd i ogólne wrażenie. Wyniki zapisywane są bezpośrednio co pozwala od razu obliczyć średnią, odchylenie standardowe oraz przeprowadzić analizę statystyczną p. (ANOVA), wykazującą istotne różnice między próbkami.

Badanie koloru

Postrzeganą barwę sprawdza się dwójako. W pierwszym etapie analityk porównuje produkt ze wzorcami RAL lub NCS w kabinie świetlnej o świetle dziennym D65, co pozwala uchwycić odchylenia widoczne „gołym okiem”. Następnie kolorymetr lub minispektrofotometr mierzy wartości w przestrzeni CIELAB (L^* , a^* , b^*), zapewniając wynik obiektywny i liczbowy – z dokładnością do $\pm 0,1$ jednostki.

1.2 Analizy fizykochemiczne

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

DSC mierzy przepływ ciepła do próbki czekolady podczas programowanego ogrzewania i chłodzenia. Pojawiające się piki topnienia i krystalizacji odzwierciedlają polimorficzne przejścia tłuszczu kakaowego. Parametry takie jak temperatura topnienia (T_m) czy ciepło topnienia (ΔH) informują, czy proces temperowania czekolady był prawidłowy i czy produkt zachowa połysk w trakcie magazynowania.

Aktywność wody (a_w)

Przy użyciu higrometru dew-pointowego mierzona jest równowagowa wilgotność względna atmosfery nad próbką w 25 °C. Wynik a_w opisuje ilość wody dostępnej dla rozwoju mikroorganizmów. Im niższe a_w , tym dłuższy okres trwałości; dla batonów wysokobiałkowych dążymy zwykle do $<0,6$.

Wilgotność całkowita

Próbka trafia do pieca, suszarki lub wagosuszarki halogenowej, gdzie jest ogrzewana do stałej masy. Ubytek masy, wyrażony procentowo, stanowi oficjalny wskaźnik wilgotności zgodny z ISO 712 (produkty zbożowe) lub ISO 1442 (produkty mięsne). Dane te są niezbędne do obliczenia wartości odżywczej i kontroli procesu wypieku/suszenia.

Zawartość białka i wskaźnik PDI

Szybki analizator Sprint wykorzystuje specyficzną reakcję barwną z grupami aminowymi. Wynik pojawia się w ciągu pięciu minut i obejmuje nie tylko ilość, lecz – poprzez obliczenie wskaźnika PDI – także stopień rozpuszczalności białka, który przekłada się na jego funkcjonalność w recepturze.

Zawartość tłuszczu (NMR)

Metoda rezonansu magnetycznego jądrowego mierzy sygnał protonów w łańcuchach lipidowych, dzięki czemu w kilkadziesiąt sekund uzyskujemy zawartość tłuszczu bez użycia rozpuszczalników. Jest to technika przyjazna środowisku i idealna do kontroli jakości w linii produkcyjnej.

Zawartość błonnika i węglowodanów

Sekwencja enzymatyczna usuwa skrobię i białko, a masa pozostałego osadu (po etapie filtracji i suszenia) odpowiada całkowitej zawartości błonnika. Metoda AOAC 991.43 pozwala jednocześnie rozdzielić frakcje rozpuszczalne i nierozpuszczalne. Ta metoda i inne wskazane wcześniej są niezbędne do oznaczenia węglowodanów metodą różnicową wg następującego wzoru:
$$\text{CHO} = 100 - (\% \text{ wody} + \% \text{ białka} + \% \text{ tłuszczu} + \% \text{ popiołu} + \% \text{ błonnika pokarmowego})$$

Stabilność emulsji (Lumisizer)

Analizator przyspiesza proces sedymentacji poprzez wirowanie probówek i skanowanie ich w podczerwieni co kilkadziesiąt sekund. Oprogramowanie oblicza czas rozdziału faz, szybkość kremowania i stabilność w funkcji temperatury, pozwalając przewidzieć okres trwałości mlecznych mas proteinowych.

Mykotoksyny (ELISA)

Screening wykonuje się testami immunoenzymatycznymi o czułości na poziomie poniżej 2 µg/kg.

Alergeny (gluten, orzechy, białka mleka)

Szybkie testy immunochromatograficzne (lateral flow) umożliwiają wstępny rezultat w ciągu 10 minut, natomiast ostateczna, ilościowa analiza ELISA podaje stężenie białek alergennych z dokładnością do ppm. Dzięki temu producent może zwolnić partię zgodnie z wymaganiami prawa i etykietowania.

2. Metody mikrobiologiczne

2.1 Klasyczne metody hodowlane

Ogólna liczba drobnoustrojów (TVC)

Rozcieńczona próbka jest zaszczipiana na agarze Plate Count Agar, a po 72 godzinach inkubacji w 30 °C liczone są kolonie. Wynik, wyrażony jako jtk/g (CFU/g), stanowi podstawowy wskaźnik higieny procesu produkcyjnego.

Pleśnie i drożdże

Użycie podłoża z chlorkiem dichloranu benzenu (DRBC) hamuje wzrost bakterii, dzięki czemu po pięciu dniach w 25 °C widoczne są wyłącznie kolonie grzybów strzępkowych i drożdży. Metoda ta jest kluczowa dla wyrobów o przedłużonej trwałości.

Bacillus cereus

Na podłożu MYP agar kolonie *B. cereus* tworzą różowe halo z precypitatem lecitinazy. Test potwierdzający i zliczenie zapewniają, że poziom patogenu nie przekracza progu bezpieczeństwa.

Bakterie redukujące siarczyny

Podłoże TSC inkubowane w warunkach beztlenowych pozwala na selektywny wzrost bakterii, które redukują siarczyny do siarkowodoru, tworząc czarne kolonie. Parametr ten jest szczególnie istotny w produktach białkowych pakowanych w modyfikowanej atmosferze.

2.2 Metody molekularne (PCR)

Salmonella spp.

Próbka jest wstępnie namnażana w bulionie BPW, aby podnieść liczbę komórek Salmonelli, po czym DNA izoluje się i amplifikuje gen *invA* w czasie rzeczywistym. Dzięki temu obecność nawet pojedynczej komórki w 25 g produktu zostanie wykryta w mniej niż 24 godziny.

Listeria monocytogenes

Dwustopniowe wzbogacanie w bulionach Fraser selekcjonuje Listerię, a test PCR na gen *hlyA* potwierdza jej patogenność. Metoda spełnia wymagania ISO 11290-1 i zapewnia wysoki poziom ochrony konsumenta.

Escherichia coli (w 1 g)

Próbkę rozsiewa się na agarze TBX, a błękitne kolonie oznaczają podejrzane szczepy *E. coli*. Dopełnieniem jest PCR weryfikujący obecność genu *uidA*, co eliminuje wynik fałszywie dodatni i dostarcza ilościowy wynik w granicy 10 CFU/g.

Opis techniczny:

1. Metody fizyko-chemiczne oraz sensoryczne

1.1 Analizy sensoryczne i wizualne

Element	Wymagany opis
1.1.1 Panel sensoryczny	Cel: Kompleksowa ocena akceptacji konsumenckiej produktu. Personel: ≥ 10 wyszkolonych panelistów certyfikowanych zgodnie z ISO 8586; okresowa kalibracja. Parametry: smak, zapach, konsystencja, wygląd, ogólne wrażenie (skala 0–10). Procedura: Randomizacja próbek, neutralizacja smaku). Wynik: średnia, odchylenie standardowe, analiza ANOVA na istotność między próbkami.
1.1.2 Badanie koloru	Metoda A (wizualna): Porównanie produktu ze wzorcami RAL/NCS w kabinie standaryzującej D65 (ISO 3668). Metoda B (instrumentalna): Kolorymetr/minispektrofotometr, raportowanie w przestrzeni CIELAB (L^* , a^* , b^*) $\pm 0,1$ jednostki.

1.2 Analizy fizykochemiczne

Nr	Parametr	Metoda / norma	Wybrane wymagania
1	DSC – czekolada	ISO 11357; temp. skanowania 1 °C/min	Raport: entalpia (J/g), pik topnienia T_m , krystalizacja T_c , polimorfia tłuszczu kakaowego.
2	Aktywność wody (aw)	ISO 18787	Przyrząd: higrometr z termostatem $25 \pm 0,2$ °C; zakres 0,050–1,000 aw.
3	Wilgotność	ISO 712 (zboża) / ISO 1442 (mięso)	Wagosuszarka halogenowa 105 °C lub suszarka konwekcyjna 103 ± 2 °C.
4	Białko (szybkie) & PDI	AOAC 984.13 / Sprint; PDI ISO 14244	Sprint: czas < 5 min; PDI – rozproszenie 10 % zawiesiny, spektrofotometr 540 nm.
5	Tłuszcz (NMR)	AOAC 985.23; Oracle NMR	Granica wykrywalności 0,1 %. Bez rozpuszczalników.
6	Błonnik	AOAC 991.43 / ISO 5498	Enzymy: α -amylaza, proteaza, amyloglukozydaza.
7	Stabilność emulsji	Lumisizer 6100	Przyspieszone wirowanie 4000 rpm, 25 °C, profil skanów co 60 s.

8	Mykotoksyny	ELISA, AOAC 2003.02 lub ISO 16050	LOD < 2 ppb.
9	Alergeny (gluten, orzechy, mleko)	ISO 21415-2 (gluten) / ELISA/RIDASCREEN	Wymagana detekcja < 5 ppm (gluten), <1 ppm (białka mleka/orzechów).

2. Metody mikrobiologiczne

2.1 Podstawowe metody hodowlane

Parametr	Norma	Podłoże & inkubacja	LOQ
Ogólna liczba drobnoustrojów (TVC)	ISO 4833-1:2013	PCA, 30 °C ± 1, 72 h	10 jtk/g
Pleśnie i drożdże	ISO 21527-1/2	DRBC/YPD, 25 °C, 5 dni	10 jtk/g
<i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932:2004	MYP agar, 37 °C, 24 h + test lecitinazy	10 jtk/g
Bakterie redukujące siarczyny	ISO 15213:2003	TSC agar, 37 °C, 48 h w anaerobiozie	10 jtk/g
<i>Escherichia coli</i> (w 1 g)	ISO 16649-2 (hodowla) z confirmacją PCR	TBX 44 °C ± 0,5, 24 h	10 jtk/g

2.2 Metody PCR (real-time)

Organizm	Norma	Etap przed-PCR	LOD
<i>Salmonella spp.</i>	ISO 6579-1:2017	BPW 37 °C ± 1, 18 h	1 CFU/25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1:2017	Half-Fraser 24 h + Fraser 24 h	1 CFU/25 g