

## BADANIA METAPOPOPULACYJNE WYBRANYCH FERMENTOWANYCH PRODUKTÓW POCHODZENIA ROŚLINNEGO

Katarzyna Ratajczak, Agnieszka Piotrowska-Cyplik, Kamila Myszk

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Zakład Fermentacji i Biosyntezy

ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

karat@up.poznan.pl

### Streszczenie

Celem pracy była ocena metagenomu populacji mikroorganizmów obecnych w kiszanej kapuście białej (*Brassica oleracea* var. *capitata* var. *alba*), kiszonych ogórkach siewnych (*Cucumis sativus*) oraz sproszkowanej formie czosnku pospolitego (*Allium sativum*) i chrzaniu pospolitego (*Armoracia rusticana*). Przeprowadzono analizy pH, zawartości cukrów redukujących oraz kwasowości ogólnej kiszzonek, a także ocenę jakości mikrobiologicznej sproszkowanych przypraw, wykorzystując metody płytkowe oraz analizy metapopulacyjne produktów kiszonych i przypraw. Wykazano, że otrzymaną kiszoną kapustę cechowały bardzo dobre wartości pH i zawartości cukrów redukujących oraz niższa niż optymalna kwasowość ogólna. Kiszone ogórki charakteryzowały się bardzo dobrymi parametrami fizykochemicznymi. Analiza metagenomowa wykazała, że mikroflora kiszzonego ogórka siewnego w 71% składała się z bakterii kwasu mlekowego i dominowała w niej rodzina *Lactobacillaceae*. Natomiast w kiszonej kapuście białej tylko 22% całkowitej mikroflory stanowiły bakterie kwasu mlekowego i nie wykryto w niej dominujących rodzin bakterii. Zidentyfikowana mikroflora w czosnku pospolitym oraz chrzanie pospolitym należała do bakterii kwasu mlekowego. W obu przyprawach dominującymi grupami bakterii były *Streptococcaceae*, *Leuconostocaceae* i *Lactobacillaceae*. Przeprowadzone dodatkowo posiewy horyzontalne potwierdziły obecność bakterii kwasu mlekowego w obu sproszkowanych przyprawach.

**Słowa kluczowe:** żywność fermentowana, mikroflora, metapopulacja, bezpieczeństwo żywności

## ANALYSIS OF METAPOPOPULATION OF SELECTED FERMENTED FOODS OF PLANT ORIGIN

### Summary

The goal of this study was to evaluate the population of microorganisms present in fermented white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* var. *alba*), pickled cucumbers (*Cucumis sativus*), powdered garlic (*Allium sativum*) and powdered horseradish (*A Armoracia rusticana*). Analysis of pH, reducing sugars' content and titratable acidity of samples was performed. The microbiological quality of fermented foods was assessed with the use of next generation sequencing. The microbiological quality of powdered spices was analyzed with traditional plate methods and next generation sequencing. It was shown that the obtained sauerkraut was characterized by very good pH and reducing sugars' content, but lower than optimum titratable acidity. Pickled cucumbers were characterized by very good physicochemical parameters. Metagenomic analysis showed that the microflora of pickled cucumber in 71% consisted of lactic acid bacteria and was dominated by the *Lactobacillaceae* family. In sauerkraut only 22% of the total microflora was lactic acid bacteria and no dominant family was determined. The identified microflora in garlic and horseradish belonged primarily to lactic acid bacteria. In both spices the dominant groups of bacteria were *Streptococcaceae*, *Leuconostocaceae* and *Lactobacillaceae*. Further horizontal cultures confirmed the presence of lactic acid bacteria in both powdered spices.

**Key words:** fermented foods, microflora, metapopulation, food safety

### WSTĘP

Fermentacja mlekowa jest jedną z najstarszych metod konserwowania żywności różnego pochodzenia. Zapewnia ona trwałość oraz chroni przed zepsuciem produkty spożywcze. Żywność fermentowana jest lekkostrawna, zawiera mało kalorii, duże ilości witamin i związków mineralnych, a także dodatnio wpływa na odporność organizmu, regulację ciśnienia krwi oraz wykazuje właściwości antyoksydacyjne [Libudzisz 2006; Makinen i in. 2012]. Kiszenie polega na fermentacyjnej przemianie cukrów prostych na kwas mlekowy przez mikroorganizmy. Kwas mlekowy obniża pH środowiska i powoduje zahamowanie wzrostu wielu niepożądanych w żywności drobnoustrojów. Przyjmuje się, że spadek pH do wartości poniżej 4,2 zapewnia trwale zakonserwowanie surowca roślinnego [Kruk 1999].

Warunki, w jakich prowadzony jest proces fermentacji mlekowej surowców pochodzenia

roślinnego, stanowią kluczowy element wpływający na jakość otrzymanej kiszonki. Temperatura, stopień zasolenia oraz parametry surowca poddanego kiszeniu wpływają na przebieg fermentacji oraz determinują ostateczną mikroflorę obecną w produkcie końcowym. Za optymalną temperaturę w początkowych dniach fermentacji przyjmuje się 20–22°C, przy czym aby zapewnić wysoką jakość kiszonki, temperatura powinna być stopniowo obniżana w kolejnych etapach procesu. Optymalna zawartość cukrów w materiale roślinnym oraz stężenie dodanej do niego soli różni się znacząco w zależności od surowca roślinnego. Istotne jest jednak, że zbyt wysoka bądź niska temperatura i zasolenie lub niedostateczna ilość cukrów w surowcu poddawany fermentacji mlekowej prowadzą do rozwoju niepożądanego mikroflory, między innymi pleśni i drożdży, a także potencjalnych patogenów. Efektem tego może być zarówno obniżenie jakości fermentowanego produktu (np. mięknięcie ogórków, gorzki zapach kapusty), jak i jego całkowite zepsucie [Elkner 2004; Wize 2007; Purwin i in. 2012]. Profil mikroflory obecnej w fermentowanych produktach pochodzenia roślinnego zależy od mikroorganizmów epifitycznych pierwotnie znajdujących się w materiale roślinnym, będących najczęściej odbiciem mikroflory glebowej. Główną część mikroflory kiszonych stanowią bakterie kwasu mlekowego (LAB, z ang. *lactic acid bacteria*), które naturalnie występują także w organizmie człowieka. Bakterie fermentacji mlekowej są filogenetycznie niejednorodne. Należą one do następujących rodzin: *Aerococcaceae*, *Bacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* i *Streptomycetaceae* [Sanders, Huis 1999]. Jednakże na żywności pochodzenia roślinnego często występują także mikroorganizmy patogenne, takie jak *Salmonella* ssp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* czy bakterie z grupy coli. Proces fermentacji mlekowej oraz niektóre dodatki, takie jak czosnek czy chrzan, które posiadają w swoim składzie substancje działające bakteriobójczo lub bakteriostatycznie, sprzyjają zahamowaniu rozwoju szkodliwej mikroflory przy jednoczesnym propagowaniu wzrostu bakterii LAB [Lu i in. 2016].

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła kiszona kapusta biała (*Brassica oleracea* var. *capitata* var. *alba*) odmiana „Zenon” oraz kiszony ogórek siewny (*Cucumis sativus*) odmiana „Karaoke”, a także sproszkowana forma czosnku pospolitego (*Allium sativum*) i chrzanu pospolitego (*Armoracia rusticana*).

Fermentacja mlekowa prowadzona była w pięciolitrowych naczyniach fermentacyjnych wykonanych z kamionki. Każdy układ fermentacyjny zawierał 5 kg materiału roślinnego

z dodatkiem 40 g sproszkowanego czosnku oraz 40 g sproszkowanego chrzanu. W przypadku kapusty białej dodatek NaCl wynosił 2,5%, natomiast w przypadku ogórka siewnego 5%. Fermentacja prowadzona była przez 28 dni, w temperaturze 22°C przez pierwsze 7 dni oraz w temperaturze 19°C przez pozostały okres.

Oznaczenia pH surowców oraz kiszonek dokonano przy użyciu pehametru typ CP-411 (Elmetron). Kwasowość ogólną kiszonek oznaczono metodą wg Gawęckiego i in. [1990]. Kwasowość kiszonki wyrażono w przeliczeniu na kwas mlekowy w 100 g kiszonki. Zawartość cukrów redukujących w surowcach i kiszonkach oznaczano poprzez rozdrobnienie 5 g materiału roślinnego i zawieszenie go w 100 ml wody destylowanej, a następnie wytrząsanie. Roztwór sączono. Z przesączu pobierano 1 ml płynu i dodawano 1 ml kwasu 3,5-dwunitrosalicylowego. Próby wstawiano do wrzącej łaźni wodnej na 10 minut. Do każdej próby dodawano 10 ml wody destylowanej. Pomiar ekstynkcji prowadzono przy długości fali 530 nm, przy użyciu spektrofotometru HALO SB-10 (Dynamica). Oznaczono także zdolność buforową oraz minimum cukrowe surowców wg Gawęckiego i in. [1990]. Pomiarów dokonywano przy użyciu pehametru CP-411 (Elmetron).

W sproszkowanych przyprawach (czosnku pospolitym oraz chrzanie pospolitym) przeprowadzono oznaczenia jakości mikrobiologicznej z użyciem tradycyjnych posiewów płytkowych. Posiewy przeprowadzono w celu oznaczenia liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych i psychrofilnych zgodnie z normą PN-EN ISO 4833-1:2013-12, liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* zgodnie z normą PN-ISO 21528-2:2005, liczby bakterii redukujących siarczynę zgodnie z normą PN-ISO 15213:2005, liczby bakterii kwasu mlekowego zgodnie z normą PN-ISO 15214:2002, obecności pałeczek *Listeria monocytogenes* zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 oraz obecności pałeczek *Salmonella* ssp. zgodnie z normą PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007.

Identyfikacji genetycznej wyizolowanego DNA dokonano poprzez przeprowadzenie reakcji PCR z użyciem 100 ng genomowego DNA oraz 50 µl mieszaniny reakcyjnej (skład: 1 x PCR mieszanina reakcji, 0,25 µM każdego ze starterów i 5U Taq polimerazy DNA (A&A Biotechnology). Produkty reakcji oczyszczono w kolumnach Clean-Up (A&A Biotechnology) według instrukcji producenta. Normalizację biblioteki przeprowadzono, stosując zestaw Quant-iT HS ds.-DNA assai (Invitrogen) na fluorymetrze Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono instrumentalnie MiSeq Illumina i chemicznie V2 (2x250bp). Dane analizowano za pomocą oprogramowania GreenGenes v13\_5.

## WYNIKI I DYSKUSJA

**Tabela 1.** Zmiany właściwości fizykochemicznych kapusty białej oraz ogórka siewnego w trakcie procesu fermentacji mlekowej

*Changes in physiochemical properties of white cabbage and cucumber during lactic fermentation*

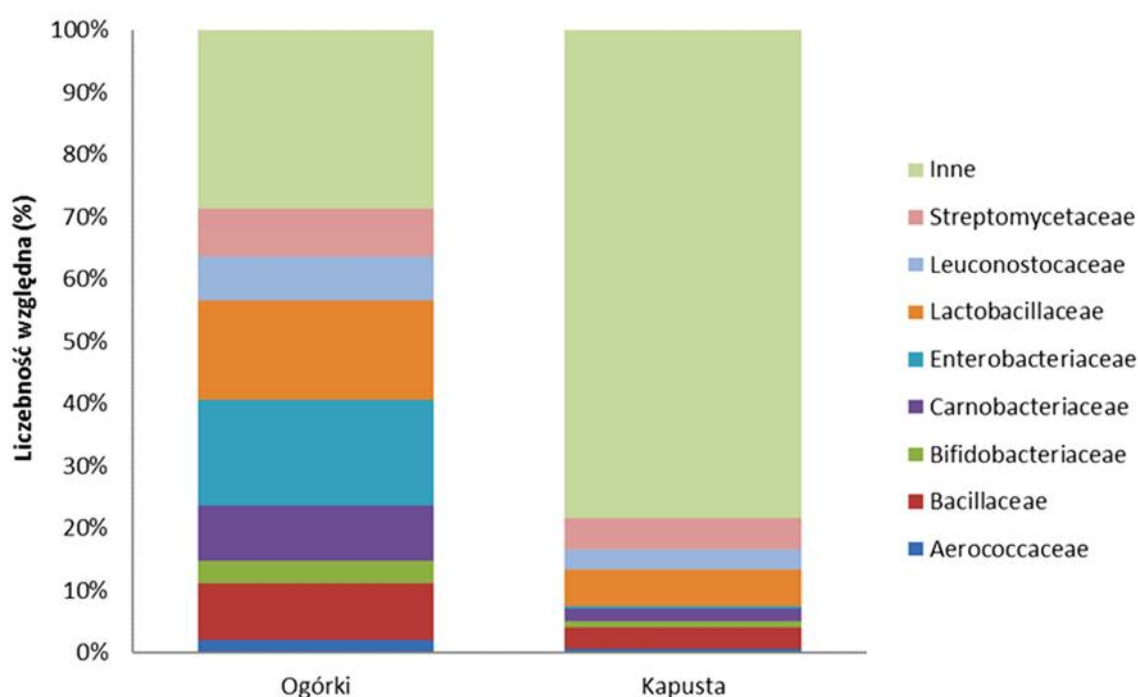
Doba	Kapusta biała				Ogórek siewny			
	pH	Minimum cukrowe*	Cukry redukujące*	Kwasowość ogólna**	pH	Minimum cukrowe*	Cukry redukujące*	Kwasowość ogólna**
0	6,5	1,071	1,28	-	6,34	0,82	0,94	-
2	4,83	-	0,77	0,29	4,37	-	0,68	0,37
6	4,41	-	0,53	0,59	4,05	-	0,55	0,52
14	4,19	-	0,28	0,67	3,91	-	0,4	0,74
28	3,92	-	0,12	0,94	3,65	-	0,11	1,06

\* [%]

\*\* [g kwasu mlekowego/100 g kiszonki]

Wyniki analiz fizykochemicznych kiszonych kapusty białej i ogórka siewnego przedstawiono w tabeli 1. Wartość pH oraz zawartość cukrów redukujących w stosunku do minimum cukrowego w obu surowcach spełniała wymogi jakościowe materiału roślinnego dopuszczanego do kiszenia [Holzapfel, Schillinger 2002; Breidt i in. 2013]. Spadek pH w obu materiałach roślinnych zachodził najgwałtowniej w trakcie pierwszych dwóch dób doświadczenia. Tendencja ta jest charakterystyczna dla fermentacji mlekowej surowców pochodzenia roślinnego i pozwala na zahamowanie rozwoju mikroflory gnilnej [Karovičová, Kohajdová 2003]. Wartości pH osiągnięte po zakończeniu procesu fermentacji mlekowej w kapuście białej oraz ogórku siewnym – odpowiednio 3,92 oraz 3,65 – mieściły się w zakresie pH 3,2–4,0, pożądanym dla kiszonek dobrej jakości [Pijanowski i in. 2009]. Wraz ze spadkiem pH w obu materiałach roślinnych następował wzrost kwasowości ogólnej.

Kwasowość ogólna w kiszzonej kapuście białej po upływie 28 dni fermentacji wyniosła w przeliczeniu na kwas mlekowy w 100 g kiszonki 0,94 g, co według Polskiej Normy zakwalifikowało ją jako produkt zdatny do spożycia, ale należący do klasy II [Elkner 2003]. Natomiast kiszony ogórek siewny, którego kwasowość ogólna po zakończeniu fermentacji wyniosła 1,06 g, spełniał wymogi Polskiej Normy odnośnie stopnia zakwaszenia produktu [PN-72/A-77700]. Można przypuszczać, że dłużej prowadzona fermentacja obu surowców skutkowałaby wyższymi wartościami kwasowości ogólnej, przy odpowiednim spadku pH. Zawartość cukrów redukujących w obu gotowych kiszonych produktach była niska (odpowiednio 0,12% oraz 0,11% w kapuście białej oraz ogórku siewnym) i odpowiadała około 90% rozkładowi cukrów zawartych w surowcu początkowym.



**Rysunek 1.** Stosunek rodzin bakterii kwasu mlekowego obecnych w kiszzonej kapuście białej i ogórku siewnym  
*Ratio of families of lactic acid bacteria present in sauerkraut and pickled cucumbers*

Po przeprowadzonej fermentacji mlekowej wykonano badania metapopulacyjne w celu określenia składu populacyjnego bakterii w kiszonce z ogórków i z kapusty. Jak pokazano na rysunku 1, w kiszonce z ogórków zidentyfikowano bakterie należące do 105 rodzin, z czego bakterie należące do grupy bakterii fermentacji mlekowej stanowiły 71% liczebności względnej bakterii zidentyfikowanych w kiszonce. Natomiast w kiszonce z kapusty zidentyfikowano 72 rodziny bakterii, z czego tylko 22% liczebności względnej

mikroorganizmów należało do bakterii fermentacji mlekowej. W metabiome bakteryjnym kiszonki z ogórka siewnego (rysunek 1) dominowały bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae* (17%) i *Lactobacillaceae* (16%), przy czym bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* nie są obserwowane w typowej kiszonce z ogórków, w przeciwieństwie do rodzajów *Lactobacillus*, *Pediococcus* oraz *Weisella* [Di Cagno i in. 2015]. W kiszonce z kapusty białej nie odnotowano dominującej rodziny bakterii. W znaczących ilościach zidentyfikowano bakterie z rodziny *Lactobacillaceae* (6%), *Streptomycetaceae* (5%) oraz *Bacillaceae* (3,8%), przy czym w kiszonkach o wysokiej jakości obserwuje się dominację przede wszystkim gatunków *Lactobacillus plantarum*, a także *Lactobacillus brevis* oraz *Leuconostoc mesenteroides* [Beganović i in. 2014]. Zawartość bakterii z rodzin *Aerococcaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae* i *Leuconostocaceae* mieściła się w zakresie od 1% do 3%. W badaniach Plengvidhya i in. [2007] dowiedziono, że bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz bakterie kwasu mlekowego są obecne w komercyjnej kiszonej kapuście na poziomie 6,2–6,3 log jtk/g, przy czym podczas trwania procesu fermentacji liczba bakterii *Enterobacteriaceae* malała przy wzroście liczby bakterii kwasu mlekowego. Identyfikacja genetyczna szczepów bakterii kwasu mlekowego z użyciem bazy danych ITS-PCR wykazała, że dominującą grupą bakterii kwasu mlekowego w kapuście kiszonej jest rodzina *Leuconostocaceae*, przede wszystkim *Leuconostoc mesenteroides*, oraz rodzina *Lactobacillaceae*. W kiszonej kapuście stosunek poszczególnych grup bakterii kwasu mlekowego do siebie, a zwłaszcza *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Lactobacillus plantarum*, zależy przede wszystkim od etapu fermentacji mlekowej. W zaawansowanym stadium fermentacji zazwyczaj obserwuje się dominację bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [Abriouel i in. 2008], co jest zgodne z wynikami (rysunek 1) otrzymanymi przy użyciu sekwencjonowania drugiej generacji. Przeprowadzone przez Elmaci i in. [2015] badania z użyciem testów API wykazały obecność w kiszonych ogórkach bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*, natomiast nie wykazały obecności bakterii z rodziny *Enterococcus*, *Aerococcus* i *Weisella*. Jednakże przeprowadzone w tym samym eksperymencie sekwencjonowanie genu 16s rRNA wybranych prób dowiodło obecności *Enterococcus casseliflavus*. Do dominujących grup mikroorganizmów należały rodziny *Lactobacillaceae* oraz *Leuconostocaceae*, co jest zgodne z wynikami (rysunek 1) otrzymanymi przy użyciu sekwencjonowania drugiej generacji.

**Tabela 2.** Wyniki oznaczeń jakości mikrobiologicznej sproszkowanej formy czosnku pospolitego oraz chrzanu pospolitego  
*Results of analysis of microbiological quality of powdered garlic and horseradish*

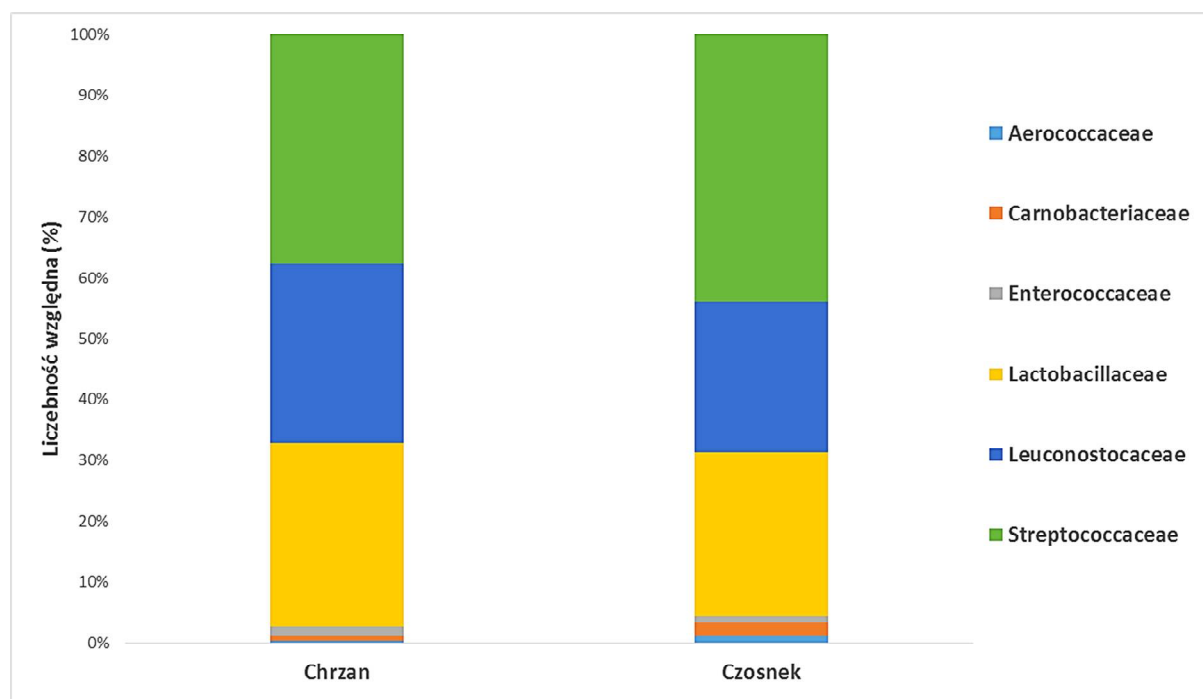
Oznaczenie	Czosnek pospolity	Chrzan pospolity
	[log jtk/ml]	
Liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych	3,15	3,14
Liczba drobnoustrojów tlenowych psychrofilnych	2,1	2,16
Liczba bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	Nieobecne w 0,1 g	1,1
Liczba bakterii redukujących siarczany (IV)	Nieobecne w 0,1 g	Nieobecne w 0,1 g
Liczba bakterii kwasu mlekowego	2,62	4,85
Obecność pałeczek <i>Listeria monocytogenes</i>	Nieobecne w 25 g	Nieobecne w 25 g
Obecność pałeczek <i>Salmonella</i> ssp.	Nieobecne w 25 g	Nieobecne w 25 g

Wyniki wykonanych analiz jakości mikrobiologicznej sproszkowanej formy czosnku pospolitego oraz chrzanu pospolitego przedstawiono w tabeli 2. Analizy te wykazały, że w czosnku obecne są bakterie tlenowe mezofilne i psychrofilne na poziomie odpowiednio 3,15 i 2,1 log jtk/g oraz bakterie kwasu mlekowego na poziomie 2,62 log jtk/g. Natomiast w chrzanie wykryto bakterie tlenowe mezofilne i psychrofilne na poziomie odpowiednio 3,14 i 2,16 log jtk/g, bakterie kwasu mlekowego na poziomie 4,85 log jtk/g oraz bakterie z grupy *Enterobacteriaceae* na poziomie 1,1 log jtk/g. W żadnej z badanych sproszkowanych przypraw nie wykazano obecności pałeczek *Listeria monocytogenes* oraz pałeczek *Salmonella* ssp. Badania Jung i in. [2012] wykazały, że bakterie kwasu mlekowego mogą występować w czosnku pospolitym w ilości 4,88–8,13 log jtk/g. W tym samym eksperymencie posiewy nie wykazały wpływu dodatku czosnku na mikroflorę kapusty w trakcie fermentacji. Z kolei inne badania wykazały, że wpływ na mikroflorę czosnku pospolitego ma również obranie ząbków czosnku. Nieobrane ząbki czosnku pospolitego wykazywały obecność bakterii tlenowych mezofilnych na poziomie 6,1–8,1 log jtk/g, natomiast obrane ząbki 1,1–3,1 log jtk/g. Wśród mikroorganizmów obecnych na nieobranych ząbkach czosnku zidentyfikowano bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas* i *Enterobacter*, a także drożdże z rodzaju *Cryptococcus*. Bakterie kwasu mlekowego stanowiły 50% zidentyfikowanej posiewowo



mikroflory [Shim, Kyung 1999].

Przeprowadzone badania metagenomowe nad mikroflorą czosnku pospolitego oraz chrzaniu pospolitemu pozwoliły na zidentyfikowanie sześciu rodzin bakterii: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* i *Streptococcaceae*. Analiza mikrobiomu potwierdziła wyniki z przeprowadzonych wcześniej posiewów horyzontalnych, że dominującą grupą mikroorganizmów obecną w obu przyprawach były bakterie kwasu mlekowego (rysunek 2). Przede wszystkim były to rodziny *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* i *Leuconostocaceae*, stanowiące łącznie 97% zidentyfikowanych bakterii w chrzanie pospolitym oraz 95% w czosnku pospolitym, przy czym w obu próbach dominująca była rodzina *Streptococcaceae*. Badania Jung i in. [2012] z użyciem sekwencjonowania genu 16s rRNA nad mikroflorą czosnku pospolitego wykazały, że to bakterie z rodzaju *Leuconostoc* stanowią 77% zasiedlających go bakterii kwasu mlekowego. W eksperymencie tym sekwencjonowanie pozwoliło na zidentyfikowanie trzech grup bakterii kwasu mlekowego, należących do rodzajów *Leuconostoc*, *Weisella* i *Lactobacillus*.



**Rysunek 2.** Stosunek rodzin bakterii kwasu mlekowego obecnych w sproszkowanym czosnku pospolitym oraz chrzanie pospolitym  
*Ratio of families of lactic acid bacteria present in powdered garlic and horseradish*

Brakuje doniesień literaturowych odnośnie mikroflory chrzanu pospolitego. Zarówno czosnek pospolity, jak i chrzan pospolity są roślinami wytwarzającymi naturalne środki bakteriobójcze lub bakteriostatyczne. Dodatek chrzanu japońskiego jest popularną metodą zapewniania bezpieczeństwa żywności niskoprzetworzonej (tzw. RTE, z ang. *ready-to-eat*) ze względu na silne bakteriobójcze działanie izotiocyjanianu allilu względem m.in. *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli* O157:H7. Badania Lu i in. [2016] wykazały, że dodatek chrzanu japońskiego miał wpływ bakteriostatyczny na oba te patogeny w stężeniu 1%. Także badania Park i in. [2013] wykazały, że izotiocyjaniany obecne w ekstrakcie z chrzanu pospolitego miały działanie przeciwdrobnoustrojowe względem *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus mutans* czy *Candida albicans*. Natomiast jedną z grup związków bakteriobójczych obserwowanych w czosnku pospolitym są oleorezyny, powodujące inhibicję wzrostu *Bacillus coagulans* w stężeniu 1,25% [Ergün, Baysal 2016]. Badania Venâncio i in. [2017] dowiodły, że ekstrakt z czosnku pospolitego i czosnku bulwiastego był w stanie redukować stan zapalny *in vivo* wywołany przez *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Jak wykazały badania (rysunek 2), w żadnej ze sproszkowanych form czosnku i chrzanu nie stwierdzono obecności *Enterobacteriaceae* wykrytych w kiszonym ogórku, a także w kiszonej kapuście (rysunek 1). Otrzymane dzięki sekwencjonowaniu drugiej generacji profile mikrobiologiczne produktów fermentowanych oraz sproszkowanych przypraw nie wskazują na znaczący wpływ czosnku pospolitego oraz chrzanu pospolitego na kształtowanie się mikroflory kiszonej kapusty i kiszonego ogórka.

## WNIOSKI

1. Otrzymana żywność fermentowana (kiszona kapusta oraz kiszony ogórek) charakteryzowała się dobrą jakością definiowaną przez parametry fizykochemiczne.
2. Analiza metapopulacji wykazała, że w kiszonej kapuście bakterie kwasu mlekowego stanowiły zaledwie 22% całkowitej mikroflory. W przypadku kiszonego ogórka bakterie kwasu mlekowego stanowiły 71% całkowitej mikroflory, jednak dominującą rodzinę stanowiła potencjalnie patogenna rodzina *Enterobacteriaceae*.
3. Analiza metagenomowa nie wykazała wpływu dodatku czosnku i chrzanu do kapusty białej i ogórka siewnego w trakcie procesu fermentacji mlekowej na ostateczną mikroflorę obecną w produktach kiszonych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abriouel H., Omar N. B., Pérez Pulido R., López R. L., Ortega E., Martínez M., Gálvez A. (2008). Vegetable fermentations. W: Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. Springer
2. Beganović J., Kos B., Pavunc A. L., Uroić K., Jokić M., Šušković J. (2014). Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. Microbiol. Res., 169, 623-632
3. Breidt F., Pérez-Díaz I., McFeeters M. F., Lee C. H. (2013). Fermented vegetables. W: Food microbiology: fundamentals and frontiers. Waszyngton: ASM Press
4. Di Cagno R., Filannino P, Gobbetti M. (2015). Vegetable and fruit fermentation by lactic acid bacteria. W: Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd
5. Elkner K. (2003). Jakość kapusty kwaszonej. Hasło Ogrodnicze, 9, 80-81
6. Elkner K. (2004). Jakość ogórków kiszonych (cz.1). Hasło Ogrodnicze, 8, 80-82
7. Elmacı S.M., Tokahtlı M., Dursun D., Özçelik F., Şanlıbaba P. (2015). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. Folia Microbiol., 60, 241-251
8. Ergün A. R., Baysal T. (2016). The antimicrobial effects of thyme, garlic and basil oleoresins against *Bacillus coagulans* in tomato sauce. J. Food Biochem., 41  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.12296/abstract>
9. Gawęcki K. (1990). Kiszunki. Skrypt do ćwiczeń z żywienia zwierząt i paszownictwa. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe
10. Holzapfel W. H., Schillinger U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. Food Res. Int., 35, 109-116
11. Jung H. J., Hong Y., Yang H. S., Chang H. C., Kim H. Y. (2012). Distribution of lactic acid bacteria in garlic (*Allium sativum*) and green onion (*Allium fistulosum*) using SDS-PAGE whole cell protein pattern comparison and 16S rRNA gene sequence analysis. Food Sci. Biotechnol., 21 (5), 1457-1462
12. Karovičová J., Kohajdová Z. (2003). Lactic acid fermented vegetable juices. Hort. Sci., 30 (4), 152-158
13. Kruk K. (1999). Kapusta głowiasta biała. Odmiany wczesne. Owoce, Warzywa, Kwiaty, 21, 21
14. Libudzisz Z. (2006). Żywność probiotyczna. W: Mikroorganizmy w żywności i żywieniu. Poznań: Wyd. AR im. Augusta Cieszkowskiego

15. Lu Z., Dockery C. R., Crosby M., Chavarria K., Patterson B., Giedd M. (2016). Antibacterial activities of Wasabi against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1403  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01403/full>
16. Makinen K., Berger B., Bel-Rhliid R., Ananta E. (2012). Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J. Biotechnol.*, 162, 356-365
17. Park H. W., Choi K. D., Shin I. S. (2013). Antimicrobial activity of isothiocyanates (ITCs) extracted from Horseradish (*Armoracia rusticana*) root against oral microorganisms. *Biocontrol Sci.*, 18 (3), 163-168
18. Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A. (2009): Fermentacyjne ukiszanie – kiszenie żywności. W: Ogólna technologia żywności. Warszawa: WN-T
19. Plengvidhya V., Breidt Jr F., Lu Z., Fleming H. P. (2007). DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (23), 7697-7702
20. PN-72/A-77700. Przetwory warzywne. Kapusta kwaszona
21. PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby
22. PN-EN ISO 4833-1:2013-12. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30°C
23. PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.
24. PN-ISO 15213:2005. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby bakterii redukujących siarczan (IV) rosnących w warunkach beztlenowych
25. PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C
26. PN-ISO 21528-2:2005. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Część 2: Metoda płytkowa
27. Purwin C., Lipiński K., Pysera B. (2012). Jakość higieniczna kiszonek. *Życie Weterynaryjne*, 87, 37-40
28. Sanders M. E., Huis in't Veld J. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Ant van Leeuwenhoek*, 76, 293-315

29. Shim S. T., Kyung K. H. (1999). Natural microflora of prepeeled garlic and their resistance to garlic antimicrobial activity. *Food Microbiol.*, 16, 165-172
30. Venâncio P. C., Figueroba S. R., Nani B. D., Ferreira L. E. N., Muniz B. V., de Sá Del Fiol F., Sartoratto A., Rosa E. A. R., Groppo F. C. (2017). Antimicrobial activity of two garlic species (*Allium sativum* and *A. tuberosum*) against *Staphylococci* infection. *In vivo* study in rats. *Adv. Pharm. Bull.*, 7 (1), 115-121
31. Wize A. (2007). Warzywa kapustne w centrum uwagi (część 2). *Hasło Ogrodnicze*, 1, 114-116