

Warszawa, dnia 12.11.2012

.....
pieczęć wnioskodawcy i adres

Minister Rolnictwa
i Rozwoju Wsi
ul. Wspólna 30
00-930 Warszawa

SPRAWOZDANIE
z zadania w zakresie rolnictwa ekologicznego w 2012r.

**„Ekologiczne metody produkcji pieczywa i produktów zbożowych oraz metody
wydłużania trwałości, świeżości i parametrów przechowalniczych tych
wyrobów.”**

wykonanego z dotacji przyznanej na podstawie § 10 ust 1 rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 maja 2010 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. Nr 91, poz. 595 i Nr 259, poz.1772 oraz z 2011 r. nr 121, poz. 691).

Jednostka badawczo-rozwojowa

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

Zakład Technologii Fermentacji

ul. Rakowiecka 36

02-532 Warszawa

tel.: 848 02 24, 849 50 39, 606 36 00

fax: 849 04 26 (28), e-mail: ibprs@ibprs.pl

nr konta 58 2030 0045 1110 0000 0029 2680

w banku BGŻ SA Filia I O/Warszawa

status prawny działania jednostki:

JBR-KRS nr 0000126823

.....
główny księgowy

.....
pieczęć i podpis wnioskodawcy

Otrzymują:
Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi
Departament Promocji i Komunikacji, Wydział Rolnictwa Ekologicznego

Kierownik /koordynator:

dr inż. Katarzyna Piasecka-Józwiak

IBRPS - Zakład Technologii Fermentacji

tel.: 606 36 49, 849 04 25

e-mail: piasecka@ibprs.pl

Spis autorów:

mgr inż. Joanna Rozmierska

mgr Beata Chabłowska

mgr inż. Michał Świątek

mgr inż. Elżbieta Słowik

dr hab. Krystyna Stecka prof. IBPRS

mgr Emilia Szkudzińska-Rzeszowiak

mgr inż. Monika Kliszc

dr Renata Choińska

mgr inż. Joanna Bucka

mgr inż. Elżbieta Bartosiak

II. Miejsce realizacji zadania badawczego

Piekarnie produkujące pieczywo ekologiczne:

Eko Piekarnia „Słodka”, 87-100 Toruń

Piekarnia VINI, 42-582 Rogoźnik, ul. Kościuszki 107

Zakład Technologii Fermentacji IBPRS.

III. Główne zadania do wykonania przez Zakład Technologii Fermentacji, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, w roku 2012

Zakres planowanych w bieżącym roku badań będzie obejmował zadania:

1. Określenie jakości surowca ekologicznego tj. mąki jęczmiennej i pszennej z certyfikatem surowców Eko-rolniczych:

- badania mikrobiologiczne obejmujące charakterystykę mikroflory mąki,
- badania fizykochemiczne, w tym wartość wypiekowa mąki na podstawie oceny reologicznej ciast
- zawartość β -glukanu,
- oznaczanie w próbkach mąki liczby bakterii patogennych i niepożądanych w procesie produkcyjnym tj. bakterii z grupy coli, *Salmonella spp.*, bakterii z rodzaju *Bacillus* oraz liczby pleśni.

2. Izolacja i identyfikacja bakterii fermentacji mlekowej (LAB) z ekologicznego materiału biologicznego (zakwasów jęczmiennych). Charakterystyka a następnie selekcja szczepów na podstawie ich właściwości biotechnologicznych (zdolności do wzrostu, syntezy kwasów organicznych, syntezy związków wpływających na aromat pieczywa).

3. Ocena przydatności szczepów LAB stosowanych w monokulturach i kulturach mieszanych do otrzymywania zakwasów jęczmiennych:

- badania cech smakowo- zapachowych oraz właściwości fizyko-chemicznych otrzymanych z ich udziałem zakwasów,
- badanie zdolności wyizolowanych szczepów LAB do hamowania wzrostu pleśni,
- ocena wpływu kultur LAB na stopień zachowania β -glukanu w pieczywie.

4. Ocena przydatności wybranej kultury starterowej do otrzymywania ekologicznego pieczywa z udziałem mąki jęczmiennej. Opracowanie składu i receptury pieczywa (porcji wprowadzanej mąki jęczmiennej):

- badania w skali laboratoryjnej,
- badania w skali technicznej w wybranych piekarniach.

5. Ocena jakości i wartości odżywczej otrzymanego pieczywa.

6. Określenie trwałości pieczywa, czasu do pojawienia się oznak zepsucia mikrobiologicznego.

IV. Sprawozdanie merytoryczne

1. Wstęp

Ze względu na duży udział w diecie pieczywo, będące nośnikiem takich składników żywności o istotnej wartości żywieniowej jak witaminy czy błonnik pokarmowy, może być ważnym elementem jej oddziaływania na zdrowie ludzi. Dlatego badania nad opracowywaniem nowych rodzajów pieczywa wchodzą w zakres realizowanych szeroko w Unii Europejskiej projektów, dotyczących żywności funkcjonalnej, przeciwdziałającej otyłości i chorobom układu krążenia.

Coraz powszechniejsze jest spożywanie produktów wysoko przetworzonych, o niskiej zawartości włókna pokarmowego, witamin i składników mineralnych. Jednocześnie jednak wśród konsumentów obserwowana jest tendencja polegająca na wzroście zainteresowania wpływem żywności na zdrowie. Dla dużej grupy odbiorców ważna jest nie tylko cena produktu, ale również jego cechy organoleptyczne, zdrowotne oraz dietetyczne. Pojawiają się specjalne produkty, których marketing opiera się o „wartość dodaną” poza podstawową funkcję odżywczą. Rozpowszechnienie tego typu produktów zależy, poza reklamą, od tradycji żywieniowych oraz świadomości odbiorców. Pewnym kompromisem jest np. wprowadzanie różnego rodzaju pieczywa białego wzbogaconego w dodatki funkcjonalne np. całe ziarna zbóż, mąki niechlebowe, błonniki roślinne np. z jabłek, inuliny.

Zwiększenie spożycia „zdrowszego” ciemnego pieczywa promowane jest przez dietetyków i lekarzy w mediach. Jakkolwiek w Polsce nie ma opracowanego programu promocji pieczywa i jego roli w żywieniu człowieka (Kawka 2010), to podobnie jak w całej Europie, promowana jest żywność produkowana tradycyjnie i ekologiczna. Produkty takie, w tym pieczywo, wytwarzane rzemieślniczo cieszą się dużym zaufaniem konsumentów, którzy wiedzą, że otrzymają produkt naturalny, otrzymany z wysokiej jakości surowca, pozbawiony dodatku różnego rodzaju substancji chemicznych (konserwantów i polepszaczy), charakteryzujący się niepowtarzalnymi walorami smakowo-zapachowymi.

Rośnie zainteresowanie konsumpcją produktów zbożowych charakteryzujących się zwiększoną, w stosunku do pieczywa produkowanego z jasnej mąki, zawartością substancji bioaktywnych (np. błonnika pokarmowego), kojarzonych z żywnością ekologiczną. Ostatnio sięga się także po surowce nie stosowane powszechnie w pieczywie takie jak jęczmień, orkisz, kukurydza ryż, proso czy zboża „stare, dawne” takie jak kamut (starożytna odmiana

pszenicy), teff (miłek abisyński), odznaczające się dużą (w porównaniu do „zwykłej” mąki pszennej) zawartością cennych składników odżywczych.

Stosowanie w produkcji pieczywa mąk z pełnego ziarna, dodatku płatków i wykorzystywanie mąki z tzw. zbóż niechlebowych (owsa, jęczmienia, prosa, gryki, ryżu i kukurydzy) wpływa na proces technologiczny w piekarni i jakość pieczywa. Ze względu na niską wartość technologiczną, to jest niską zawartość lub brak glutenu (Czerwińska, 2010; Meroni i wsp. 2009), mąki wytworzone z tzw. niechlebowych zbóż są zazwyczaj mieszane z pszeną. Na przykład już 5% dodatek mąki jęczmiennej do mąki pszennej powoduje zwiększenie wodochłonności takiej mieszanki mąk, przy jednoczesnym pewnym pogorszeniu jakości ciasta wyrażonej obniżeniem tolerancji na mieszenie (Karolini-Szkaradzińska i wsp. 2006). Prowadzenie produkcji ekologicznej dodatkowo ogranicza możliwość użycia stosowanych dość powszechnie „polepszaczy”. Biorąc jednak pod uwagę wartość odżywczą takiego pieczywa, warto pracować nad poprawą jego cech organoleptycznych poprzez optymalizację technologii.

Sposobem modyfikowania składu i smaku pieczywa może być jednoczesne stosowanie dodatków wpływających na jego wartość żywieniową, a także kultur starterowych wpływających korzystnie na parametry technologiczne (Corsetti i in. 2000, Arendt, 2007). Fermentacja ciasta przy udziale kultur starterowych może wpływać na wartość odżywczą pieczywa poprzez obniżanie lub zwiększanie zawartości składników, a także zwiększenie ich biodostępności. Stosowanie zakwasów piekarskich w produkcji pieczywa jest uznanym sposobem podwyższania jego jakości sensorycznej, szczególnie przydatnym przy korzystaniu z mąki bogatej we włókno pokarmowe (Katina 2005, Katina i wsp. 2007, Poutanen i in. 2009, Piesiewicz 2009).

W Zakładzie Technologii Fermentacji od kilku lat prowadzone są badania nad szerokim zastosowaniem bakterii fermentacji mlekowej w produkcji żywności o walorach prozdrowotnych. Jednym z kierunków badawczych jest opracowywanie kultur starterowych do różnego rodzaju pieczywa tj. pszenno-żytniego, pszennych ciabatt i pieczywa pszenno-owsianego przy wykorzystaniu naturalnej (autochtonicznej) mikroflory tych surowców. Znaczenie naturalnej bioróżnorodności organizmów, w tym mikroorganizmów, związanych z poszczególnymi regionami docenia się np. we Włoszech tworząc, w celu ich zachowania regionalne MicroBanki.

Jęczmień, podobnie jak owies jest uznawany za roślinę zbożową XXI wieku. Jęczmień i jego produkty są bogatym źródłem błonnika pokarmowego, nieskrobiowych polisachrydów, w szczególności beta-glukanów i pentozanów, związków antyoksydacyjnych (to jest

tokoferoli i tokotrienoli), witamin grupy B, składników mineralnych (P, K, Ca, Mg, Se). Zawartość błonnika pokarmowego w całościarnowej mące jęczmiennej ogółem wynosi około 17% (w tym błonnik nierozpuszczalny stanowi 12,0%), natomiast według Czerwińskiej (2005) w mące jęczmiennej zawartość błonnika wynosi około 10%. Mąka jęczmienna jest produktem ubocznym przy wyrobie kasz i płatków.

Produkty jęczmienne zawierają w swym składzie stosunkowo duże ilości beta-glukanów. Beta-glukany roślinne to długołańcuchowe polisacharydy zbudowane z cząsteczek glukozy połączonej wiązaniami 1-3 i 1-4 β -glikozydowymi. Zaliczane są do niestrawnych wielocukrów i uważane za komponenty włókna pokarmowego (Waszkiewicz-Robak, Świdorski, 2006).

W wielu badaniach udowodniono, że dieta bogata w β -glukan wspomaga kontrolę cukrzycy, wpływa na obniżenie poziomu glukozy we krwi po posiłkach, sprzyja obniżeniu poziomu cholesterolu we krwi, obniża ryzyko zapadania na choroby serca i niektóre nowotwory, β -glukan sprzyja także rozwojowi pożytecznej mikroflory jelitowej. Zawartość β -glukanu w produktach pochodzenia jęczmiennego zależy m.in. od ich rodzaju i odmiany jęczmienia wynosi od około 4,7% s.m. w ziarnie do około 3,7% s.m. w mące całościarnowej.

Owies i jęczmień zawierają liczną grupę związków polifenolowych (kwasy fenolowe, flawonoidy, fitoestogeny). Jęczmień charakteryzuje się większą aktywnością przeciwutleniającą niż owies i zboża chlebne (Kawka 2010).

W porównaniu do mąki pszennej z mąki jęczmiennej podczas uwadniania i miesienia znacznie trudniej powstaje kompleks glutenowy, ze względu na zastąpienie gliadyn przez hordeiny. Po dodaniu do mąki pszennej tych ubogich w siarkę prolamin mąka staje się znacznie „słabsza”, co wyraża się obniżeniem czasu miesienia (krótszym czasem) i zwiększeniem oporności na zrywanie. Stwierdzono korelacje pomiędzy zwiększeniem dodatku jęczmienia, a obniżeniem zdolności zatrzymywania gazu w cieście.

Na jakość mąki, właściwości farinograficzne ciasta i cechy chleba jęczmiennego wpływają warunki panujące w okresie wzrostu jęczmienia. Mąka odmian ozimych charakteryzuje się większą wodochłonnością i tworzy kleiki o większej lepkości niż mąka odmian jarych.

W ciastach z mąki jęczmiennej obserwowano występowanie krótkiego czasu rozwoju. Rodzaj mąki, sposób wprowadzenia do ciasta i jej procentowy udział w masie, a także metoda prowadzenia ciasta, wpływają na zróżnicowanie wskaźników jakościowych ciasta i pieczywa pszenno-jęczmiennego. Obserwowano zmiany wydajności ciasta, objętości takiego pieczywa, jego kwasowości i wilgotności, struktury mięksiszu, jego zapachu i smaku (Kawka 2005, Kawka i in. 2007).

Ważna jest granulacja dodawanych produktów jęczmiennych; do wzrostu wodochłonności mąki pszennej przyczynia się zwłaszcza dodatek takich produktów jęczmiennych jak płatki, otręby, wysłodziny. Według Kawki (2005) zdolność wiązania wody przez mąkę jęczmienną wynika z wyższej w stosunku do mąki pszennej zawartości nieskrobiowych polisacharydów.

W cieście pszenno- jęczmiennym zmiany zachodzące w układzie białkowym i sacharydowym oraz obecność w nim nieskrobiowych polisacharydów wywierają wpływ na zdolność do zatrzymywania i wytwarzania gazów oraz jakość ciasta i pieczywa. Całoziarnowa mąka jęczmienna w cieście pszenno-jęczmiennym przyczynia się do osłabienia właściwości lekko sprężystych glutenu, a tym samym zdolności zatrzymywania gazów. Niefermentowany chleb plackowy z jęczmienia charakteryzuje się ciężkim, słabo spulchnionym miększem (Kawka 2005). W badaniach prowadzonych przez Zannini i współpracowników (2009) stwierdzono, że wraz ze wzrostem udziału mąki jęczmiennej w cieście ulega zmniejszeniu jego objętość.

W badaniach nad otrzymywaniem pieczywa pszenno-jęczmiennego Kawka i współpracownicy (2007), aby uzyskać pieczywo o wyższej objętości dodawali gluten witalny, w ilości 5 lub 10%. Jednak Marklinder i współpracownicy (1996) stwierdzili, że nie zawsze wprowadzenie mąki jęczmiennej do receptury powoduje zmniejszenie objętości pieczywa, zależy to także od użytej odmiany jęczmienia. W wymienionych badaniach 14 na 20 zbadanych chlebów charakteryzowało się zmniejszoną objętością, a 6 zwiększoną w porównaniu do wypieków kontrolnych. W badaniach tych procentowy udział mąki jęczmiennej (całoziarnowej) wynosił od 30 do 50%. Wraz ze wzrostem udziału jej dodatku rosła kwasowość, a także wydajność ciasta.

Rozbieżności w ocenie wpływu mąki i innych dodatków pochodzenia jęczmiennego na właściwości fizyczne ciast są dość duże i mogą być spowodowane użyciem produktów zróżnicowanych pod względem jakości i granulacji. Mąki stosowane w opisywanych badaniach były zazwyczaj otrzymywane w młynkach laboratoryjnych.

Jak wspomniano powyżej, fermentacja ciasta z udziałem bakterii fermentacji mlekowej (LAB), wywiera korzystny wpływ na właściwości organoleptyczne, strukturę i trwałość wyrobów piekarskich. Wpływa na polepszenie jakości sensorycznej wyrobów z pełnego ziarna, pieczywa bogatego w błonnik lub bezglutenowego, modyfikuje strukturę skrobi prowadząc do jej wolniejszego trawienia, co przyczynia się do obniżenia indeksu glikemicznego. Można także stosując technologię „pieczywa na zakwasie” modulować poziom i biodostępność związków bioaktywnych, w tym mineralnych. Nowoczesnym

sposobem wpływania na przebieg fermentacji jest zastosowanie w piekarstwie odpowiednio dobranych kultur starterowych.

Markinder wraz ze współpracownikami (1995, 1996) jako pierwsi badali możliwość otrzymywania zakwasów jęczmiennych i ich zastosowanie do produkcji pieczywa jęczmiennego. Jakkolwiek w badaniach tych nie stwierdzono wpływu wprowadzania zakwasów na objętość pieczywa, to wykazano pozytywny wpływ fermentacji przy udziale LAB na właściwości sensoryczne pieczywa jęczmiennego (zwłaszcza jego aromat) i biodostępność Zn i Fe. Stwierdzono również, że LAB częściowo powodują zmniejszenie zawartości β -glukanu w pieczywie, jego degradacja wywołana jest ponadto przez endogenne enzymy pochodzące z mąki jęczmiennej.

W badaniach Zannini i wsp.(2009) stwierdzono, że w porównaniu do zakwasów pszennych i z udziałem mąki pszennej liczba bakterii w zakwasach jęczmiennych była o rząd wielkości większa, zaobserwowano także znaczniejsze obniżenie pH ciasta. Spośród różnych wprowadzanych w mieszanym inokulum szczepów, w porównaniu do zakwasu pszennego, w którym dominował *L.plantarum*, w ciastach z udziałem mąki jęczmiennej stwierdzono większą różnorodność szczepów, które utrzymywały się w ustabilizowanym (prowadzonym przez dwa miesiące) zakwasie. W zakwasie jęczmiennym stwierdzono, poza *L.plantarum* obecność *L.brevis* co według autorów jest związane ze zdolnością *L. brevis* do degradacji β -glukanów. Wnioskiem z tych badań było także stwierdzenie, że autochtoniczna populacja bakterii ciast zawierających mąkę jęczmienną poprzez presję selekcyjną w dużym stopniu zdominowała bakterie wprowadzone z inokulum. Według Kawki (Kawka i wsp. 2010 b) korzystniejsze ze względu na jakość pieczywa z udziałem mąki owsianej i jęczmiennej jest stosowanie starterów fermentacji zawierających większą liczbę bakterii w stosunku do liczby drożdży.

Wiadomo, że podczas prowadzenia tradycyjnych ciast zakwasowych poprzez selekcję szczepów ustala się w nich dynamiczna populacja mikroorganizmów dostosowanych (zaadaptowanych) do endogennych (tj. typu mąki, dostępności składników odżywczych, aktywności enzymatycznej) oraz egzogennych parametrów fermentacji (temperatura i czas trwania fermentacji, liczba odświeżeń). Zaobserwowano, że zakwasy piekarskie, w tym sporządzane z nietypowych surowców, charakteryzują się specyficzną mikroflorą i stosowanie przemysłowych kultur starterowych nie jest w tym przypadku polecane (Moroni i wsp., 2009). Kultura starterowa do zastosowania w ekosystemie ciasta powinna zatem być dobrana z uwzględnieniem przeważających w nim mikroorganizmów. W rezultacie aktywność populacji wpływa na wiele właściwości produktów, w tym objętość i teksturę

pieczywa, jego aromat, i wartość żywieniową (Scheirlinck i wsp. 2007, De Vuyst, Vancannet, 2007).

Kolejną zaletą stosowania kultur starterowych jest ich wpływ na wydłużenie trwałości pieczywa m.in. poprzez ograniczenie rozwoju pleśni.

Pojawiają się prace mające na celu izolację z zakwasów piekarskich szczepów LAB wykazujących zdolność do hamowania rozwoju pleśni. Szczepy takie mogły by być stosowane w biokonserwacji pieczywa. Zannini i wsp. (2009) wyizolowali z zakwasów pszennych ciasta chlebowego i ciasta słodkiego 217 szczepów LAB i zbadali ich aktywność antymikrobiologiczną wobec pleśni *Aspergillus heteromorphus*, *Eurotium niveglaucum* oraz *Penicilium roseopurpureum*, wyizolowanych z pomieszczeń piekarni rzemieślniczych oraz spleśniałych produktów piekarskich (tzw. zwrotów). W grupie wyizolowanych szczepów LAB 21 izolatów charakteryzowało się silną aktywnością antypleśniową sugerującą, że mogą być one w przyszłości stosowane w biokonserwacji pieczywa.

Zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego pieczywa jest szczególnie ważne ze względu na jego częste spożywanie, a co za tym idzie możliwość kumulacji szkodliwych substancji w organizmie. Miśniakiewicz (2010) stwierdziła, że stosowanie fermentacji (mlekowej i/lub alkoholowej) podczas produkcji pieczywa znacznie zmniejsza zawartość w pieczywie ochratoksyny A (OTA). Piotrowska i Żakowska (2005) wykazały, że stopień degradacji tej mikotoksyny w zależności od składu mikroorganizmów użytych do fermentacji może być różny, najbardziej skuteczna w rozkładzie OTA okazała się fermentacja prowadzona z udziałem mieszanej kultury bakterii mlekowych.

Z drugiej strony jak podaje Kawka (2010) włączenie mąki jęczmiennej do składu mieszanki wypiekowej powoduje wydłużenie czasu świeżości pieczywa.

2. Cel badań

Celem badań było opracowanie metody otrzymywania pieczywa o jak najwyższej zawartości ekologicznej mąki jęczmiennej, z zastosowaniem specjalnie skomponowanych bakteryjnych kultur starterowych złożonych ze szczepów LAB charakteryzujących się zdolnością ograniczania rozwoju pleśni w zakwasach piekarskich. Opracowana metoda powinna przynieść również korzyści w postaci wydłużenia trwałości pieczywa.

3. Zakres badań

1. Określenie jakości surowca ekologicznego tj. mąki jęczmiennej i pszennej z certyfikatem surowców Eko-rolniczych:

- badania mikrobiologiczne obejmujące charakterystykę mikroflory mąki,
- badania fizykochemiczne, w tym wartość wypiekowa mąki na podstawie oceny reologicznej ciast
- zawartość β -glukanu,
- oznaczanie w próbkach mąki liczby bakterii patogennych i niepożądanych w procesie produkcyjnym tj. bakterii z grupy coli, *Salmonella spp.*, bakterii z rodzaju *Bacillus* oraz liczby pleśni.

2. Izolacja i identyfikacja bakterii fermentacji mlekowej (LAB) z ekologicznego materiału biologicznego (zakwasów jęczmiennych).

Charakterystyka, a następnie selekcja szczepów, na podstawie ich właściwości biotechnologicznych (zdolności do wzrostu, syntezy kwasów organicznych, syntezy związków wpływających na aromat pieczywa).

3. Ocena przydatności szczepów LAB stosowanych w monokulturach i kulturach mieszanych do otrzymywania zakwasów jęczmiennych:

- badania cech smakowo- zapachowych oraz właściwości fizyko-chemicznych otrzymanych z ich udziałem zakwasów,
- badanie zdolności wyizolowanych szczepów LAB do hamowania wzrostu pleśni,
- ocena wpływu kultur LAB na stopień zachowania β -glukanu w pieczywie.

4. Ocena przydatności wybranej kultury starterowej do otrzymywania ekologicznego pieczywa z udziałem mąki jęczmiennej. Opracowanie składu i receptury pieczywa (proporcji wprowadzanej mąki jęczmiennej):

- badania w skali laboratoryjnej,
- badania w skali technicznej w wybranych piekarniach.

5. Ocena jakości i wartości odżywczej otrzymanego pieczywa.

6. Określenie trwałości pieczywa, czasu do pojawienia się oznak zepsucia mikrobiologicznego.

4. Metody badań

W dwóch piekarniach ekologicznych przeprowadzone zostały próby wypieku chleba pszenno-jęczmiennego na zakwasie jęczmiennym, wyprowadzonym z zastosowaniem wyselekcjonowanych uprzednio bakteryjnych kultur starterowych, o specyficznych właściwościach antymikrobiologicznych i technologicznych. Skład kultur starterowych do pieczywa jęczmiennego opracowany został na podstawie cech biotechnologicznych bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z zakwasów piekarskich, sporządzonych z ekologicznej mąki jęczmiennej.

Surowcem głównym była ekologiczna mąka jęczmienna wyprodukowana przez firmę Wytwórnę makaronu "BIO" Aleksandra i Mieczysław Babalscy z Pokrzydowa – producenta ekologicznych mąk, kasz i makaronów. Wszystkie pozostałe surowce tj. mąka pszenna miały certyfikat ekologiczny.

W pierwszej fazie pracy materiał do badań stanowiła ekologiczna mąka jęczmienna oraz sporządzone z niej zakwasy piekarskie. Charakterystykę mąki jęczmiennej i pszennej użytej do przygotowania zakwasów przeprowadzono według metod PN, przy użyciu odpowiednich podłoży mikrobiologicznych do namnażania, selekcji oraz identyfikacji drobnoustrojów. Poniżej opisano metody i materiały:

- Badania fizykochemicznych (zawartość białka, popiołu) wykonano według metod znormalizowanych: białko PN-EN ISO 20483:2007; popiół PN-EN ISO 2171:2010
- Badanie farinograficzne mąki (próba kontrolna) przeprowadzano zgodnie z PN ISO 5530-1, kolejne oznaczenia wykonywano wg ww. normy zmodyfikowanej w ten sposób, że oprócz mąki i wody do ciasta wprowadzano mąkę jęczmienną.

Zgodnie z PN-ISO 5530-1 oznaczano parametry farinograficzne: czas rozwoju, stałość ciasta, rozmiękczenie ciasta, liczba jakości Ciasto wytwarzano z mąki i wody w mieszarce farinograficznej, w temperaturze 30°C. Opór stawiany mieszadłom przez ciasto był rejestrowany w postaci wykresu. Do sporządzenia wykresu tzw. „krzywej normalnej” niezbędne jest ustalenie wodochłonności mąki tj. objętości wody potrzebnej do wytworzenia ciasta o maksimum konsystencji na poziomie 500 FU (wyrażana w ml/ 100 g mąki o wilgotności 14%).

- Oznaczenie zawartości β -glukanu w próbkach mąki, zakwasach i pieczywie wykonano metodą enzymatyczną wg Analytica EBC 3.10.1, 4.16.1, przy użyciu testu MEGAZYME K-BGLU (metoda jest specyficzna dla [(1-3)(1-4)]- β -D-glukanu).

Wilgotność dostarczonych próbek oznaczono metodą wagową (suszenie 180 minut w temp. 105-107°C).

- Oznaczenie zawartości wybranych mikotoksyn w próbkach mąki oraz w zakwasie.

Oznaczenia wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wg metodyki IBPRS procedury badawcze PB ZAŻ 54. Oznaczenie aflatoksyny B₁ oraz sumy aflatoksyn B₁+B₂+G₁+G₂ metodą HPLC, oraz PB ZAŻ 56. Oznaczenie deoksyniwalenolu (DON) metodą HPLC.

- Ocenę mikrobiologiczną mąki i zakwasów piekarskich wykonano według:

PN-EN ISO 4833:2004+Ap1:2005 Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne zasady oznaczania liczby drobnoustrojów. Metoda płytkowa w 30°C. Agar PCA (Merck) z ekstraktem drożdżowym, glukozą i peptonem kazeinowym – do oznaczania ogólnej liczby bakterii mezofilnych i przetrwalnikujących [PN-EN ISO 4833:2004];

PN-ISO 21528-2:2005 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Cz. 2 Metoda płytkowa.

PN-ISO 21527-2:2009 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część 2: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95.

PN-EN ISO 7954:1999; Agar YGC (Merck) z ekstraktem drożdżowym, glukozą i chloramfenikolem – do izolacji drożdży oraz oznaczania ich ogólnej liczby

PN-A-74134-4:1998 Wyroby i półprodukty ciastkarskie. Badania mikrobiologiczne. Oznaczenie liczby bakterii przetrwalnikujących amylolytycznych

PN-ISO 7251:2006 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby przypuszczalnych *Escherichia coli*. Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby.

PN-ISO 15214:2002; Oznaczenie liczby bakterii kwaszących przy użyciu agaru Smith-Lorenza z purpurą bromokrezolową

PN-EN ISO 6887-1:2000; Oznaczenie liczby bakterii proteolitycznych

PN-90 A-75052/09:1994; Oznaczenie liczby bakterii tworzących śluz

PN-EN ISO 7932:2005; Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby bakterii przypuszczalnych *Bacillus cereus*. Metoda liczenia kolonii w temperaturze 30°C.

Ponadto przeprowadzono ocenę fizykochemiczną i sensoryczną zakwasów jęczmiennych w trakcie kolejnych faz ukwaszania.

Izolacja i identyfikacja LAB

Izolację i identyfikację bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzono z wykorzystaniem odpowiednich podłoży (MRS z purpurą bromokrezolową i aktidionem). Z materiału mikrobiologicznego (pojedyncze kolonie) wyhodowanego z zakwasów piekarskich wyizolowano bakterie fermentacji mlekowej. Materiał ten poddany został oczyszczeniu poprzez kilkakrotne pasażowanie w odpowiednich podłożach i wstępnie oceniony poprzez obserwację morfologii komórek w preparatach mikroskopowych przy użyciu mikroskopu Nikon Optiphot.

Przynależność gatunkową wyizolowanych linii komórkowych LAB oznaczono poprzez identyfikację zamplifikowanego genu 16S rDNA.

Izolacja genomowego DNA bakterii

Izolację genomowego DNA przeprowadzono z 1 ml bakteryjnej hodowli nocnej za pomocą GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma). Stężenie i czystość wyizolowanego DNA mierzono przy pomocy Biofotometru 6131 (Eppendorf).

Amplifikacja genu 16S rDNA

Wyizolowane szczepy poddawano identyfikacji gatunkowej poprzez analizę sekwencji genu 16S rDNA wg procedury opisanej przez Zawadzka-Skomiła i in. [2009] z modyfikacjami. Do reakcji PCR użyto primery *16SF* i *16SR*.

Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler Personal (Eppendorf) wg programu opisanego przez Zawadzka-Skomiła [2009]. Produkty amplifikacji poddawano oczyszczeniu zestawem GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) zgodnie z instrukcją producenta. Tak przygotowany materiał przekazywano do sekwencjonowania (Genomed S.A.). Odczytane sekwencje składano w kontigi przy pomocy programu BioEdit, które następnie poddawano analizie porównawczej w bazie GenBank przy zastosowaniu programu BLAST [Zhang i in., 2000]. Przynależność gatunkową badanych szczepów ustalano na podstawie wyników wskazujących na co najmniej 97%-owy stopień identyczności analizowanych sekwencji z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank.

RAPD-fingerprinting

W celu zbadania zróżnicowania wewnątrzgatunkowego szczepów LAB przeprowadzono reakcję losowej amplifikacji polimorficznego DNA (ang. *random amplification of polymorphic DNA*, RAPD-PCR). Procedurę przeprowadzono wg metodyki opisanej przez Zawadzka-Skomiła i in. [2009] z modyfikacjami. Do reakcji PCR użyto jednego z trzech primerów: *M13*, *PRIMO2* lub *RP*. Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze peqSTAR2X Gradient (peqlab) wg Zawadzka-Skomiła i in. [2009]. Produkt

reakcji PCR (po 5 μ l każdej mieszaniny reakcyjnej) sprawdzano na 1,8 % żelu agarozowym (Sigma) w obecności wzorca masy DNA O'Range Ruler 200 bp DNA Ladder (Fermentas). Wizualizacja DNA na żelu następowała dzięki obecności barwnika fluorescencyjnego GelRed (Biotium) dodanego do płynnego żelu (0,05 μ l/ml). Elektroforezę prowadzono w 1x stężonym buforze TAE przez 50 min pod napięciem 10 V/cm, natężeniem 300 mA. Zastosowano zasilacz EV243 firmy Consort. Uzyskany wynik rozdziału utrwalano za pomocą kamery G:BOX HR firmy Syngene.

Analizę metodą RAPD-PCR przeprowadzono w trzech powtórzeniach, jako matrycowe DNA stosując materiał wyizolowany z trzech niezależnych hodowli szczepów LAB.

- **Ocena właściwości biotechnologicznych wyizolowanych LAB**

Ocenę zdolności do wzrostu wyizolowanych szczepów wykonano w podłożu laboratoryjnym (MRS) przy zastosowaniu standardowych metod mikrobiologicznych.

Zdolność do syntezy kwasu mlekowego oceniono w odciekach po hodowlach prowadzonych w podłożu MRS przez jedną dobę. Ilość zsyntetyzowanego kwasu D(-) i L(+) mlekowego oznaczono przy użyciu spektrofotometru firmy Beckman oraz testów enzymatycznych firmy Boehringer - Mannheim, przy długości fali 340 nm.

Oznaczono również zawartość kwasu mlekowego w zakwasach otrzymanych z udziałem monokultur nowo wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej.

Stężenie zsyntetyzowanego przez bakterie, kwasu octowego oznaczono w zakwasach przygotowanych z udziałem monokultur wyizolowanych szczepów metodą chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (FID).

- **Aktywność antymikrobiologiczną badanych szczepów skierowaną przeciw pleśniam oceniono metodą studzienkową.**

Do badań zastosowano zmodyfikowaną w ZF metodę opisaną przez Magnusson i wsp. [2003], polegającą na pomiarze wielkości stref zahamowania wzrostu szczepów pleśni w podłożu YGC zaszczipionym zarodnikami pleśni, przez bakterie rosnące w podłożu MRS o konsystencji miękkiego agaru, uprzednio zaszczipione szczepem wskaźnikowym bakterii w ilości 10^6 komórek/ml wypełniającym studzienki. Stosowano następujące gatunki pleśni *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* pochodzące z kolekcji IBPRS.

Na podstawie uzyskanych wyników badań opracowano skład kultur starterowych. Kryterium wyboru LAB do kultur starterowych była ich aktywność antymikrobiologiczna skierowana przeciw pleśniam, ilość syntetyzowanych kwasów organicznych i zdolność do wzrostu oraz

ocena zakwasu uzyskanego z zastosowaniem szczepu w monokulturze, szczególnie jego zapachu..

- **Z udziałem opracowanych kultur starterowych przygotowano zakwasy piekarskie, a następnie ciasta, z których otrzymano wypieki.**

Do wyrobu ciast stosowano zakwas piekarski o wydajności 200%, który otrzymano z zastosowaniem wybranej w poprzednim etapie badań mieszanej kultury starterowej dodawanej w ilości 1% w stosunku do mąki. Fermentację zakwasu prowadzono przez 24 h w komorze fermentacyjnej IBIS KFK. Po zakończeniu fermentacji zakwasu przeprowadzono jego analizę mikrobiologiczną, fizykochemiczną i sensoryczną. W zakwasach oznaczano także zawartość produktów fermentacji.

W ramach oceny ogólnej i fizykochemicznej zakwasów i ciast według normy PN-A-74100:1992 wykonano: oznaczenie pH i kwasowości ogólnej metodą miareczkową i ocenę sensoryczną (wygląd zewnętrzny, barwa, struktura, konsystencja i zapach) wg. PN-A-74100:1992 [23]. Ciasta do wypieków zostały przygotowane z użyciem miesiarki spiralnej IBIS typu NS. Ciasta poddawano fermentacji w komorze fermentacyjnej, przez 30 minut (temperatura 30 °C, wilgotność 80%). Następnie dzielono je na kęsy o masie 250 g, umieszczano w foremkach i fermentowano przez kolejne kilkadziesiąt minut (temperatura 35 °C, wilgotność 80%), aż do uzyskania optymalnego rozrostu. Przeprowadzono analizę sensoryczną i fizykochemiczną uzyskanych ciast (oznaczano: pH, kwasowość ogólną oraz temperaturę). Wypiek chleba prowadzono w piecu Piccolo firmy Winkler Wachtel przez 40 minut, w temperaturze 230 °C. Wilgotność komory wypiekowej wynosiła ok. 85%. Uzyskane pieczywo było ważone po 24 h od wypieku w celu określenia straty piecowej. Wykonano analizę fizykochemiczną, w ramach której oznaczano: objętość (V_{100}) – za pomocą aparatu Sa-Wy, wilgotność, pH i kwasowość ogólną. Przeprowadzono również punktową ocenę organoleptyczną wypieków wg. PN.

- Oceniono jakość pieczywa, łącznie z oceną sensoryczną po 24h od wypieku wg PN-A-74108:1996. W ocenie sensorycznej pieczywa brano pod uwagę wygląd zewnętrzny pieczywa, ocenę miękiszu (elastyczność porowatość, spójność, kruchość), skórki (pęcherze pęknięcia, barwa, grubość, smak i zapach).
- Wykonano próby wypieku pieczywa w trzech piekarniach ekologicznych z zastosowaniem różnej zawartości mąki jęczmiennej (50%, 40%, 30%) z udziałem skomponowanej wcześniej kultury starterowej.

5. Wyniki badań

5.1. Określenie jakości surowca ekologicznego

- **Badania mikrobiologiczne mąki ekologicznej pszennej i jęczmiennej**

Wykonano charakterystykę mikrobiologiczną mąk ekologicznych i tradycyjnej, w tym oznaczono liczbę bakterii patogennych i niepożądanych w procesie produkcyjnym, wyniki przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Analiza mikrobiologiczna mąki pszennej

Mikroorganizmy:	Rodzaj mąki	
	pszenna ekologiczna [j.t.k./g]	pszenna tradycyjna [j.t.k./g]
liczba drobnoustrojów mezofilnych	$4,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
liczba drożdży	nie wykryto	$3,0 \times 10^2$
liczba bakterii kwaszących	$6,0 \times 10^2$	nie wykryto
liczba pleśni	$7,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$
liczba bakterii śluzowych	$4,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$
liczba bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i>	$2,0 \times 10^2$	nie wykryto
liczba bakterii proteolitycznych	nie wykryto	nie wykryto
liczba bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	$1,0 \times 10^4$ z grupy coli	$1,0 \times 10^2$ z grupy coli

n.w. –nie wykryto

Tabela 2 Analiza mikrobiologiczna ekologicznej mąki jęczmiennej (cztery partie)

Mikroorganizmy:	Rodzaj mąki			
	Jęczmienna ekologiczna (razowa) [j.t.k./g]	Jęczmienna ekologiczna partia I [j.t.k./g]	Jęczmienna ekologiczna partia II [j.t.k./g]	Jęczmienna ekologiczna partia III [j.t.k./g]
liczba drobnoustrojów mezofilnych	$2,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$
liczba drożdży	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	n.w.	n.w.
liczba bakterii kwaszących	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^2$
liczba pleśni	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$
liczba bakterii śluzowych	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
liczba <i>Bacillus cereus</i>	$5,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
liczba <i>Bacillus subtilis</i>	n.w.	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^4$
liczba bakterii proteolitycznych	n.w.	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	nie wykryto
liczba bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	$1,3 \times 10^5$ z gr. coli	$8,6 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5$ z grupy coli	$2,0 \times 10^6$ z grupy coli

Wykonano analizy mąki jęczmiennej ekologicznej pochodzącej z czterech różnych partii (różne daty przydatności do spożycia).

Wszystkie badane mąki zawierały zarodniki pleśni i bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* na poziomie wyższym niż liczba bakterii fermentacji mlekowej, co świadczy o zasadności

wprowadzania bakteryjnych kultur starterowych. Nie stwierdzono w nich bakterii rodzaju *Salmonella*. W mąkach wykryto także obecność bakterii przetrwalnikujących *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis*, których obecność (*B.subtilis*) może być przyczyną psucia się pieczywa. Mąka razowa o zawartości popiołu 2,3%, przygotowana specjalnie przez Wytwórnę na potrzeby niniejszego projektu nie odbiegała od pozostałych próbek pod względem liczby poszczególnych grup drobnoustrojów, a nawet zawierała mniejszą liczbę bakterii z rodzaju *Bacillus*.

- **Badania fizykochemiczne mąki**

Badania fizykochemiczne mąki obejmowały oznaczenie podstawowych parametrów tj. zawartość białka, popiołu, wilgotność, w przypadku mąki pszennej dodatkowo charakterystykę glutenu. Wykonano ponadto badania farinograficzne mieszanek mąki pszennej z jęczmienną. Wyniki przedstawiono w tabelach 3 i 4.

Tabela 3. Skład chemiczny mąki pszennej i mąki jęczmiennej

Skład chemiczny	Mąka pszena	Mąka jęczmienna	Mąka jęczmienna	Mąka jęczmienna
Woda (%)	13,3	12,8	11,7	13,4
Białko ogółem (%)	14,36	10,70	11,27	12,36
Gluten %	32,25			
Rozpływalność (mm)	3,0			
Liczba opadania Hagberga	368			
popiół	0,53	2,3	2,0	1,52

Badania farinograficzne

Badania wykonywane za pomocą farinografu pozwoliły na ocenę wodorochłonności mąki i zachowania się ciasta podczas mieszania, a więc w momencie budowania struktury glutenowej ciasta. Wykres farinograficzny przedstawia zmiany konsystencji ciasta w kolejnych fazach mieszania: wzrost konsystencji (rozwój ciasta), niezmiennosc konsystencji (stałość) i spadek konsystencji (rozmiękczenie).

Badania farinograficzne przeprowadzono dla ciast otrzymanych w ten sposób, że oprócz mąki i wody do ciasta wprowadzano mąkę jęczmienną jak w punktach 2-4:

1. ciasto z mąki pszennej typ 550 (100%) i wody
2. ciasto z mąki pszennej typ 550 (100% - 30%), wody i mąki jęczmiennej (30% ogólnej ilości mąki)
3. ciasto z mąki pszennej typ 550 (100%- 40%), wody i maki jęczmiennej (40% ogólnej ilości mąki)
4. ciasto z mąki pszennej typ 550 (100%- 60%), wody i mąki jęczmiennej 60% ogólnej ilości mąki

Badanie farinograficzne mąki (próba kontrolna) przeprowadzono zgodnie z PN ISO 5530-1,

Tabela.4 Wyniki oceny farinograficznej mieszanki mąki pszennej i mąki jęczmiennej

Udział mąki jęczmiennej, %	Wodochłonność, %	Czas rozwoju, min	Stażność ciasta, min	Rozmiękczenie po 12 min, FU	Liczba jakości
0	53,7	2,8	7,0	76	81
30	57,9	1,9	6,8	77	82
40	57,9	1,7	5,8	80	75
60	60,2	6,7	10,9	36	160

Dodatek mąki jęczmiennej spowodował wzrost wodochłonności mieszanek w stosunku do wodochłonności mąki pszennej. Mieszanki zawierające 30 i 40 % mąki jęczmiennej charakteryzowały się dość wysoką stałością ciasta i niskim rozmiękczeniem, zachowywały się zatem w badaniu farinograficznym jak mąki mocne. Liczba jakości kształtowała się na poziomie odpowiednim do wypieku.

- **Oznaczenie zawartości β -glukanu,**

Wyniki oznaczenia zawartości β -glukanu przedstawiono w tabeli 5

Tabela 5. Zawartość β -glukanu w mące jęczmiennej całościarnowej

Próbka	Wilgotność, %	β -glukan, % s.m.
mąka jęczmienna BIO, partia I	9,1	2,82
mąka jęczmienna BIO, partia II	8,7	3,36
mąka jęczmienna BIO, partia III	13,0	3,62
mąka jęczmienna BIO partia IV	11,4	3,50
mąka jęczmienna popiół 2,3%	12,4	4,02

Podane wyniki stanowią średnią z co najmniej dwóch równoległych oznaczeń.

- Oznaczenie zawartości wybranych mikotoksyn w mące jęczmiennej oraz w zakwasie.

Oznaczenie aflatoksyny B₁ oraz sumy aflatoksyn B₁+B₂+G₁+G₂, a także deoksyniwalenolu (DON) wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC wg metodyki IBPRS.

Tabela 6. Zawartość wybranych mikotoksyn w mące jęczmiennej oraz w zakwasie

Lp.	Rodzaj próby	Jednostki	Aflatoksyna B ₁	Σ aflatoksyn B+ G	DON
1	Mąka jęczmienna	µg/kg	<0,1	<0,4	<20
2	Mąka jęczmienna razowa	µg/kg	<0,1	<0,4	<20
3	zakwas	µg/kg	<0,1	<0,4	<20
Granica oznaczalności		µg/kg	0,1	0,4	20
NDZ*		µg/kg	2	4	750

*NDZ-najwyższa dopuszczalna zawartość wg Rozporządzenia Komisji (WE) Nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006

W żadnej z przebadanych próbek mąki i zakwasu nie stwierdzono obecności aflatoksyn oraz deoksyniwalenolu powyżej granicy oznaczalności tj. odpowiednio 0,1 µg/kg i 20 µg/kg.

5.2.

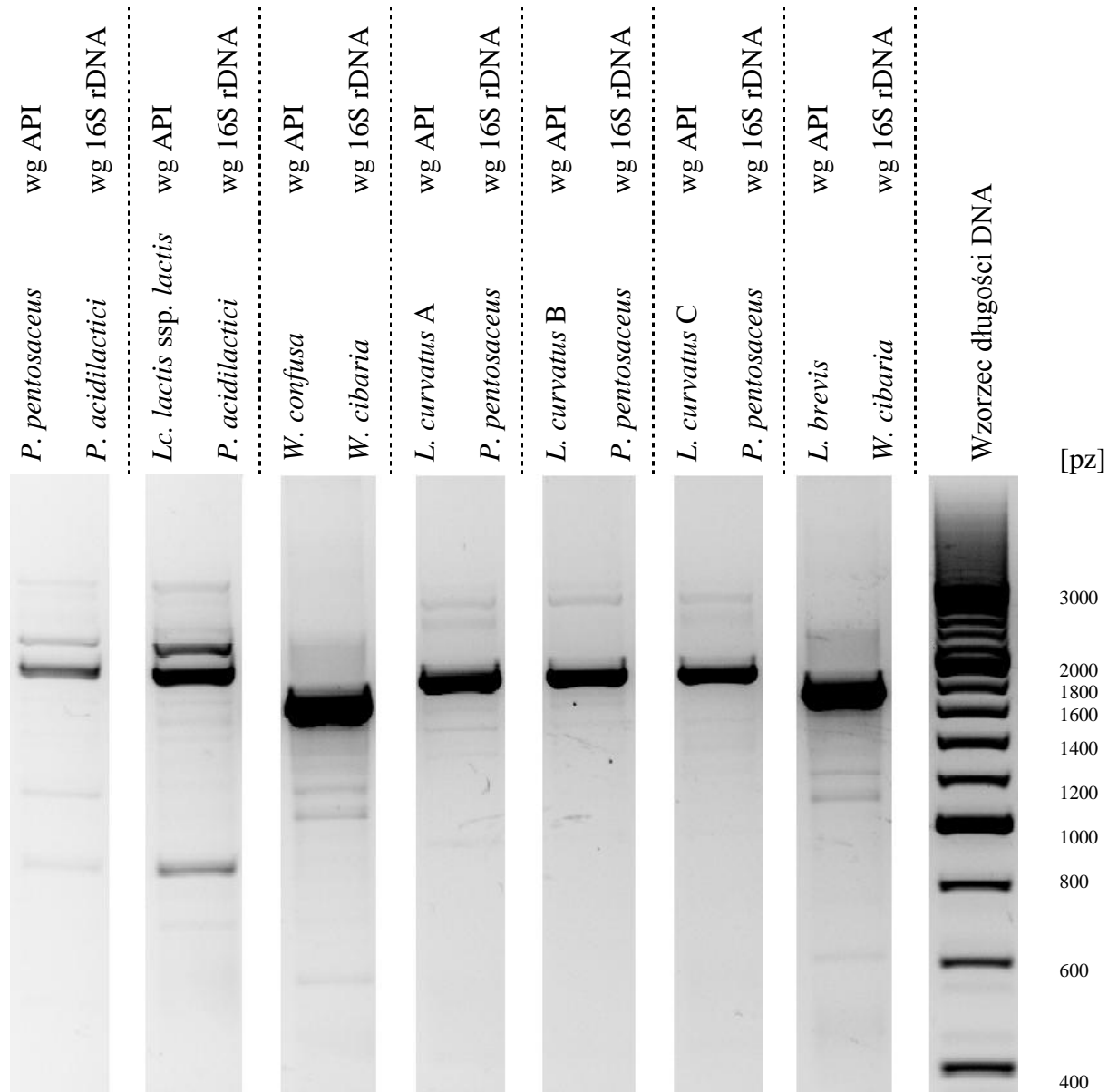
1. Izolacja i identyfikacja mikroflory technologicznej z zakwasów jęczmiennych

Z ekologicznej mąki jęczmiennej sporządzano kwasy piekarskie, które odświeżano przez kilka dób, aż do uzyskania stabilnej mikroflory i korzystnych cech organoleptycznych kwasów. Kwasy prowadzono w dwóch temperaturach tj.: 30 i 37°C. Z zakwasów o najkorzystniejszych cechach sensorycznych wyizolowano drobnoustroje technologicznie pożądane w piekarstwie, czyli bakterie fermentacji mlekowej i drożdże. Następnie wykonano identyfikację genetyczną wyizolowanych LAB i identyfikację za pomocą testów API wyizolowanych drożdży, wyniki tych identyfikacji przedstawia tabela 7.

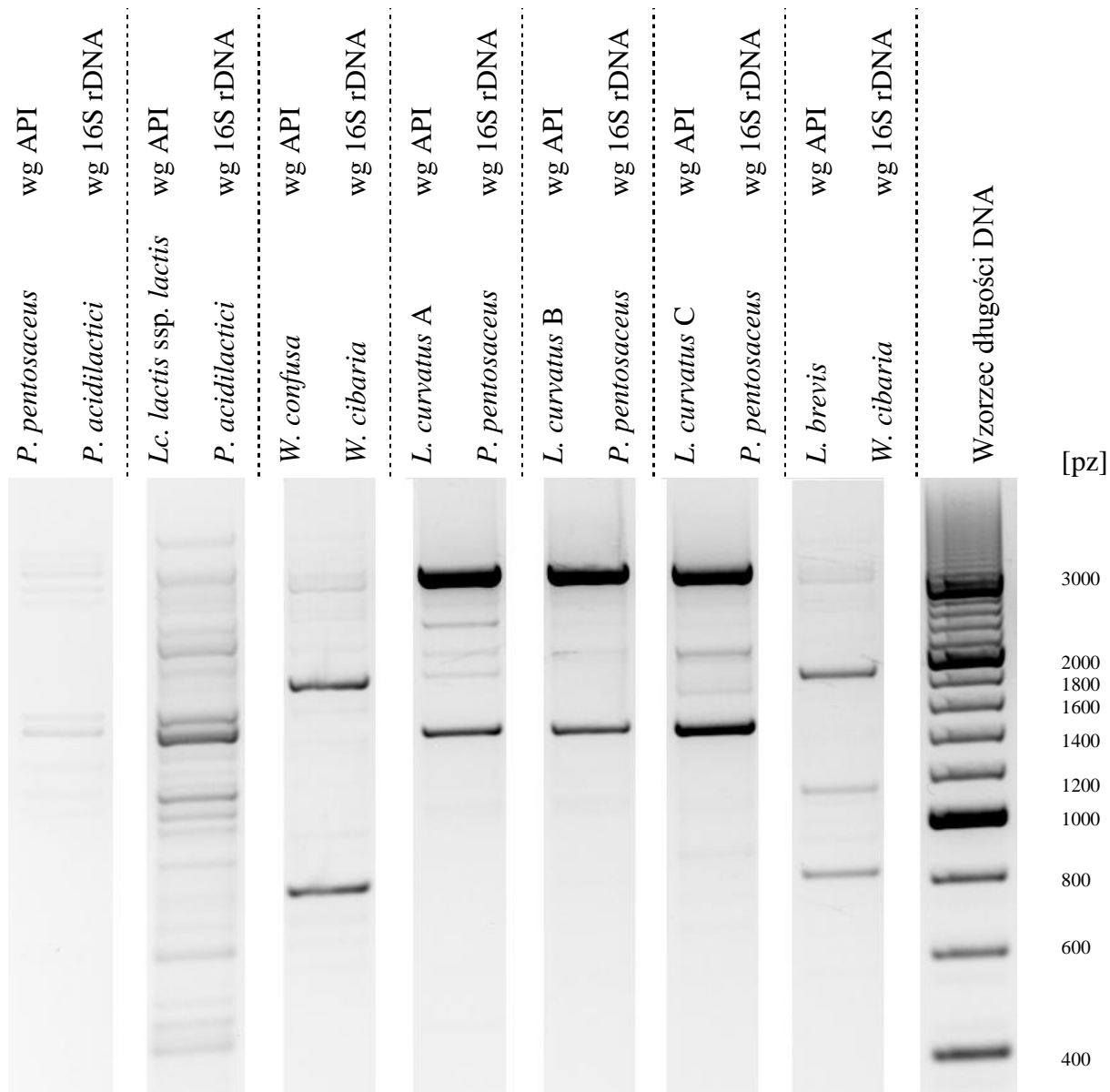
Tabela 7. Identyfikacja genetyczna (16S rDNA) wyizolowanych szczepów LAB.

Oznaczenie szczepu	Identyfikacja metodą biochemiczną	Identyfikacja metodą genetyczną (16S rDNA)
1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
2	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
3	<i>Weissella confusa</i>	<i>Weissella cibaria</i>
4	<i>Lactobacillus curvatus A</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
5	<i>Lactobacillus curvatus B</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
6	<i>Lactobacillus curvatus C</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
7	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Weissella cibaria</i>
8	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	<i>Weissella cibaria</i>

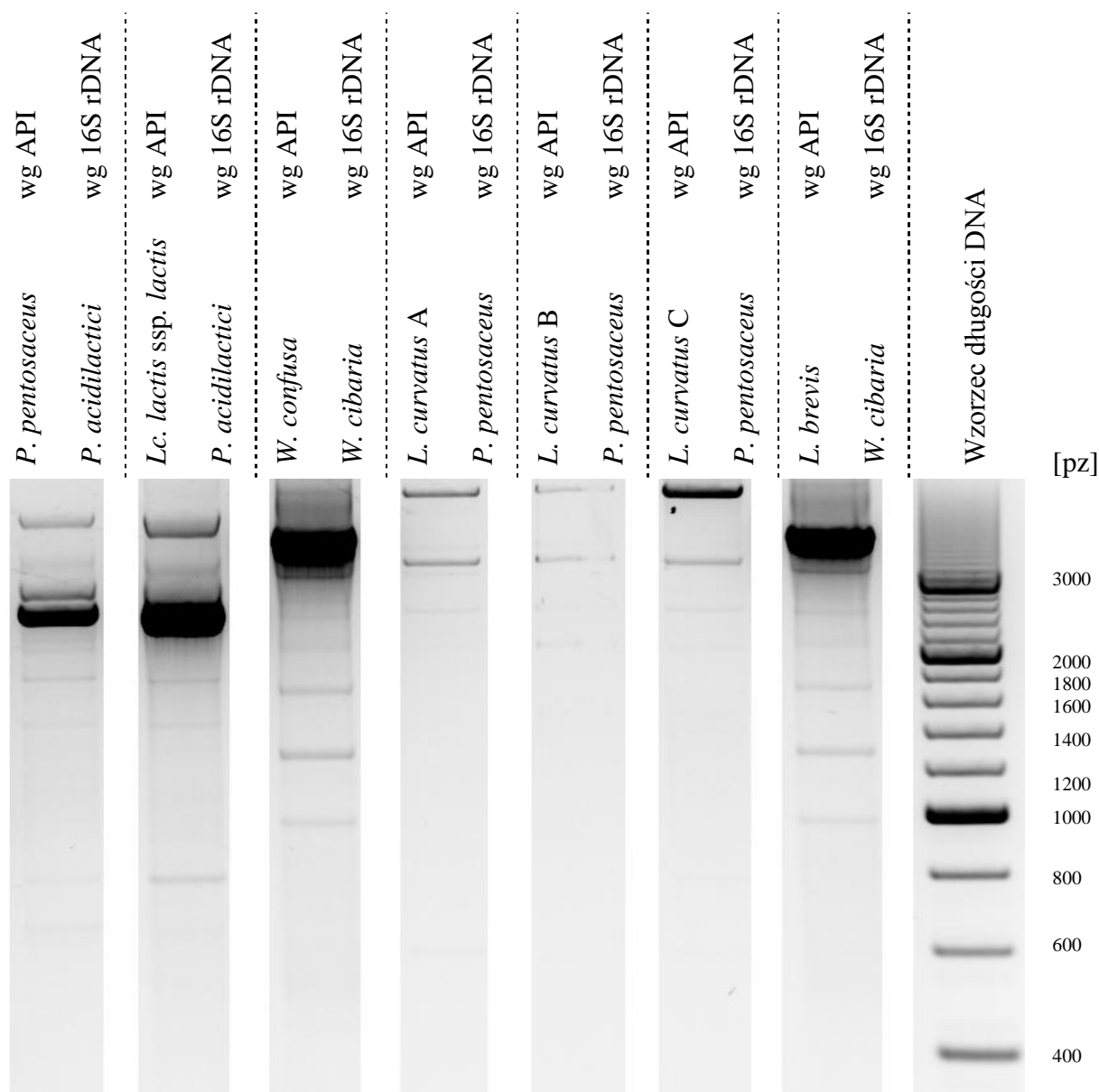
W celu oceny zróżnicowania wewnątrzgatunkowego szczepów izolowanych z surowców ekologicznych przeprowadzona została reakcja RAPD-PCR. Reakcja przebiegała w obecności jednego z trzech różnych primerów (*M13*, *PRIMO2* lub *RP*). Każdy z primerów zbudowany był z 10 do 15 nukleotydów.



Rys. 1. Różnicowanie szczepów izolowanych z mąki jęczmiennej metodą RAPD-PCR przy udziale primera M13.



Rys. 2. Różnicowanie szczepów izolowanych z mąki jęczmiennej metodą RAPD-PCR przy udziale primera *PRIMO2*.



Rys. 3. Różnicowanie szczepów izolowanych z mąki jęczmiennej metodą RAPD-PCR przy udziale primera *RP*.

Mikroflora LAB mąki jęczmiennej zdominowana była przez szczepy z gatunku *P. acidilactici* (2 szczepy), *P. pentosaceus* (3 szczepy) i *W. cibaria* (2 szczepy). Ze względu na wyniki testu API, wg których każdy z wyizolowanych szczepów charakteryzował się odmiennym profilem fermentacyjnym, podjęto próbę zbadania zróżnicowania wewnątrzgatunkowego tych organizmów. W tym celu przeprowadzona została reakcja RAPD-PCR. Amplifikacja przebiegała w obecności DNA genomowego badanych szczepów oraz jednego z trzech różnych primerów (*M13*, *PRIMO2* lub *RP*). Otrzymane w ten sposób RAPD-wzory stanowiły podstawę do oceny genetycznego pokrewieństwa badanych szczepów.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na bliskie pokrewieństwo szczepów LAB w obrębie każdego gatunku. Primery *M13* i *RP* charakteryzowały się niską siłą dyskryminacyjną, a wzory produktów amplifikacji otrzymanych w obecności tych oligonukleotydów wskazywały na brak zróżnicowania wewnątrzgatunkowego badanych organizmów (Rys. 1 i 3). Wyniki reakcji RAPD-PCR z zastosowaniem primera *PRIMO2* pozwoliły potwierdzić wyniki analiz identyfikacji fenotypowej (Rys. 2). W ten sposób wyodrębniono trzy różne szczepy wśród izolatów zidentyfikowanych jako *P. pentosaceus*, w których przypadku jako różnicujące można uznać produkty o długości ok. 2000 pz i ok. 1800 pz, charakterystyczne dla odpowiednio: *P. pentosaceus* A3 i *P. pentosaceus* C4. Zróżnicowanie szczepów *W. cibaria* możliwe było w oparciu o produkt o długości ok. 1200 pz, powstający jedynie w wyniku amplifikacji DNA pochodzącego od szczepu pierwotnie zidentyfikowanego jako *L. brevis*. Pojedyncze różnice można zaobserwować również pośród szczepów *P. acidilactici*, jednak w tym przypadku niewystarczająca wydajność reakcji RAPD-PCR uniemożliwiła precyzyjną charakterystykę produktów różnicujących.

Należy jednak podkreślić wysoki stopień pokrewieństwa filogenetycznego szczepów reprezentujących każdy z opisanych gatunków. Bakterie fermentacji mlekowej obecne w zakwasach jęczmiennych wyprowadzonych w warunkach laboratoryjnych należały do gatunków określanych jako homofermentacyjne poza szczepem który w wyniku testu biochemicznego został przypisany do gatunku *Lactobacillus brevis* a następnie na podstawie sekwencji 16S rDNA zidentyfikowany jako *Weissella cibaria*.

5.2.

2. Charakterystyka i selekcja szczepów na podstawie ich właściwości biotechnologicznych

- **Ocena zdolności do wzrostu i syntezy kwasu mlekowego**

Przeprowadzono ocenę wzrostu wyizolowanych szczepów LAB w bulionie płynnym MRS podczas hodowli w temperaturach: 25, 30 °C. Czas prowadzenia hodowli wynosił 24 h.

Tabela. 8. Wzrost szczepów LAB wyizolowanych z jęczmiennej mąki ekologicznej, hodowanych w podłożu MRS, przez 24 h. w temperaturach: 25, 30 °C.

	Nazwa szczepu	Wzrost (jtk/ml)	
		25°C	30°C
1.	<i>Pediococcus acidilactici</i> 1	4,0x10 ⁸	8,7 x 10 ⁸
2.	<i>Pediococcus acidilactici</i> 2	3,2x10 ⁹	1.2 x 10 ⁹
3.	<i>Weissella cibaria</i> 3	4,6x10 ⁹	1,1 x 10 ⁹
4.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A	1,0x10 ⁹	2,3 x 10 ⁹
5.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> B	8,0x10 ⁸	1,5 x 10 ⁹
6.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> C	1,0x10 ⁹	1,5 x 10 ⁹
7.	<i>Weissella cibaria</i> 7	6,0x10 ⁸	2,7 x 10 ⁹
8.	<i>Weissella cibaria</i> 8	7,0x10 ⁸	1,3 x 10 ⁹

Wszystkie badane szczepy, z wyjątkiem szczepu charakteryzowały się wzrostem na poziomie 10⁹ j.t.k./ml w dwóch temperaturach prowadzenia hodowli. Przeprowadzono oznaczenie ilości biosyntetyzowanego kwasu mlekowego po 24 h wzrostu w odciekach po hodowli w bulionie MRS, w temperaturach hodowli (25°C i 30°C). Wyniki przedstawia tabela 5.

Tabela 9. Biosynteza kwasu mlekowego przez badane szczepy LAB w temperaturze 30°C, po 24 h hodowli w podłożu MRS [g/l].

symbol	Nazwa szczepu	Ilość kwasu mlekowego, g/l		
		Forma D-	Forma L+	Suma kwasu
1	<i>P. acidilactici</i> KKP 1	4,8	7,0	11,8
2	<i>P. acidilactici</i> KKP 2	5,3	6,2	11,5
3	<i>Weissella cibaria</i> KKP 3	6,8	5,3	12,1
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A	2,2	5,8	8,0
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> B	1,4	4,6	6,0
6	<i>Pediococcus pentosaceus</i> C	2,6	7,4	10,0
7	<i>Weissella cibaria</i> KKP 7	2,2	3,2	5,4

8	<i>Weissella cibaria</i> KKP 8	4,1	5,8	9,9
---	--------------------------------	-----	-----	-----

Tabela 10. Biosynteza kwasu mlekowego przez badane szczepy LAB w temperaturze 25°C, po 24 h hodowli w podłożu MRS [g/l].

symbol	Nazwa szczepu	Ilość kwasu mlekowego. g/l		
		Forma D-	Forma L+	Suma kwasu
1	<i>P. acidilactici</i> 1	3,4	6,3	9,7
2	<i>P. acidilactici</i> 2	4,6	5,2	10,8
3	<i>Weissella cibaria</i> 3	5,6	4,8	11,4
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A	2,4	5,8	8,2
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> B	1,5	4,3	5,8
6	<i>Pediococcus pentosaceus</i> C	2,4	7,1	9,5
7	<i>Weissella cibaria</i> 7	2,1	2,9	5,0
8	<i>Weissella cibaria</i> 8	2,9	4,3	7,2

Największą ogólną ilością biosyntetyzowanego kwasu mlekowego charakteryzował się szczep *Weissella cibaria* 3, który syntetyzował jednocześnie najwięcej kwasu D-mlekowego, drugi pod tym względem był szczep *Pediococcus acidilactici* 2. Biosynteza kwasu L-mlekowego najwydajniej przebiegała w przypadku szczepów: *Pediococcus pentosaceus* 6 i *P. acidilactici* 1.

Zdolność nowo wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej do syntezy kwasu octowego i innych produktów hetrofermentacji mlekowej oceniono w sporządzonych z ich udziałem zakwasach, wyniki przedstawiono w punkcie 5.3..

- **Badanie zdolności wyizolowanych szczepów LAB do hamowania wzrostu pleśni (aktywności antypleśniowej)**

Zdolność wyizolowanych szczepów LAB do hamowania wzrostu pleśni badano jako zdolność szczepów do ograniczania wzrostu pleśni w zakwasach.

Aktywność antypleśniową (fungicydalną) stwierdzono w przypadku szczepów z gatunków *Weissella cibaria* i *P. acidilactici*. W badaniach Zannini i wsp. (2009) aktywność

antymikrobiologiczną wobec pleśni *Aspergillus heteromorphus*, *Eurotium niveglaucum* oraz *Penicilium roseopurpureum*, w grupie wyizolowanych 217 szczepów LAB 21 izolatów charakteryzowało się silną aktywnością antypleśniową co sugeruje, że nie jest to właściwość powszechna wśród bakterii fermentacji mlekowej.

5.3. Ocena przydatności wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej do opracowania kultur starterowych, do otrzymywania pieczywa jęczmiennego.

Zakwasy jęczmienne sporządzone z użyciem wszystkich wyizolowanych szczepów scharakteryzowano pod względem przydatności technologicznej tj oceniono ich właściwości organoleptyczne i fizykochemiczne.

- **Badanie cech smakowo-zapachowych oraz właściwości fizyko-chemicznych zakwasów otrzymanych z udziałem monokultur wyizolowanych szczepów LAB**

Wykonano analizę sensoryczną zakwasów otrzymanych z udziałem poszczególnych monokultur, a także stanowiącego próbę kontrolną zakwasu otrzymanego w wyniku fermentacji spontanicznej, wyniki przedstawia tabela 12.

Ze względu na możliwość korzystania w piekarni z tzw. odświeżania zakwasów przeprowadzono ocenę właściwości zakwasów otrzymywanych w systemie codziennego odświeżania. Charakterystykę organoleptyczną zakwasów otrzymanych po 48, 72 i 96 godzinach, w porównaniu do zakwasów 24 godzinnych przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Ocena sensoryczna zakwasów otrzymanych z udziałem poszczególnych monokultur po fermentacji zakwasów odświeżanych co 24 h, w temperaturze 30°C.

Zastosowana monokultura szczepu bakterii	Ocena zakwasów po 24 h i po odświeżeniu			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Próba kontrolna	z: kwaśny, mleczny k: lekko spieniona b: beżowa	z: wyraźnie kwaśny, ostry, mleczny, mączny k: półpłynna b: beżowa	z: ostry, wyraźnie kwaśny, szczawiowy k: rozluźniona, gładka b: beżowa	z: kwaśny k: luźna, gładka b: jasnobeżowa
<i>Pediococcus acidilactici</i>	z : kwaśny, sianowaty, trawiasty k: niespieniona b: beżowa	z: łagodnie kwaśny k: zwarta, gęsta b: beżowa	z: kwiatowy, estrowy, słodki k: gęsta, ziarnista b: beżowa	z: kwiatowy, słodki k: gęsta, ziarnista b: beżowa

<i>Pediococcus acidilactici</i> ²	z: lekko kwaśny, mączny k: gęsta, zwarta b: beżowa	z: łagodnie kwaśny, przyjemny, estrowy k: luźna b: beżowa	z: kwiatowy, jabłkowy, owocowy, kwaśny k: gęsta, ziarnista b: beżowa	z: jabłkowy, owocowy, kwaśny k: gęsta, ziarnista b: beżowa
<i>Weissella cibaria</i> ³	z: lekko kwaśny, sianowaty, trawiasty k: puszysta b: jasnobieżowa	z: kwaśny, sianowaty, szczawiowy k: gęsta, grudkowata b: beżowa	z: kwaśny, mleczny k: gładka, rozluźniona (luźniejsza niż w poprzednich) b: jasnobieżowa	z: kwaśny k: gładka, rozluźniona b: jasnobieżowa
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ⁴	z: lekko kwaśny, mleczny, mączny k: luźna b: beżowa	z: kwaśny, mączny, estrowy k: gęsta, grudkowata b: beżowa	z: estrowy, kwiatowy, alkoholowy, owocowy k: gładka (jak w 3) b: jasnobieżowa	z: kwiatowy, owocowy k: gęsta, gładka b: beżowa
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ^{5B}	z: kwaśny, trawiasty, szczawiowy k: zwarta b: beżowa	z: kwaśny, kwiatowy, estrowy k: gęsta, grudkowata b: beżowa	z: estrowy, kwiatowy, alkoholowy, drożdżowy k: gęsta, ziarnista (jak w 1 i 2) b: beżowa	z: kwiatowy, drożdżowy k: gęsta b: beżowa
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ^{C6}	z: lekko kwaśny, szczawiowy k: zwarta b: beżowa	z: kwaśny, drożdżowy orzechowy, kwiatowy, estrowy k: rozluźniona, gładka b: beżowa	z: estrowy, kwiatowy, alkoholowy, owocowy, drożdżowy k: gęsta, ziarnista (jak poprzednie) b: beżowa	z: kwiatowy, drożdżowy owocowy k: gęsta, ziarnista b: beżowa
<i>Weissella cibaria</i> ⁷	z: b. kwaśny, mleczny, szczawiowy k: bardzo spieniona b: beżowa	z: kwaśny, ostry, octowy k: rozluźniona, gładka b: beżowa	z: estrowy, kwiatowy, alkoholowy, owocowy, drożdżowy k: gęsta, ziarnista b: beżowa	z: kwiatowy, owocowy k: gęsta, ziarnista b: beżowa
<i>Weissella cibaria</i> ⁸	z: kwaśny, mleczny, roślinny, szczawiowy lekko spieniona b: beżowa	z: kwaśny, ostry, octowy k: rozluźniona, gładka b: beżowa	z: estrowy, kwiatowy, alkoholowy, owocowy, drożdżowy k: dość luźna ziarnista b: beżowa	z: kwiatowy, owocowy k: dość luźna gęsta, ziarnista b: beżowa

z: zapach; k: konsystencja, b: barwa

Zakwasy uzyskane z udziałem poszczególnych monokultur starterowych charakteryzowały się indywidualnymi, zróżnicowanymi właściwościami sensorycznymi. W większości zakwasów był wyczuwalny charakterystyczny zapach z nutą estrowo-kwiatową.

W ramach analizy fizykochemicznej zakwasów otrzymanych z użyciem poszczególnych monokultur starterowych oznaczono pH i kwasowość ogólną. Wyniki przedstawia tabela 13.

Tabela 13. Ocena fizykochemiczna zakwasów otrzymanych z użyciem poszczególnych monokultur starterowych, w wyniku trwającej przez 24 h jednostopniowej fermentacji w temperaturze 30°C oraz po odświeżaniu.

Monokultura	pH				Kwasowość ogólna [°kw]			
	24h	odświeżenie			24h	odświeżenie		
		48h	72h	96h		48h	72h	96h
Próba kontrolna	4,07	4,05	4,03	4,03	12,2	13,7	15,4	16,0
<i>Pediococcus acidilactici</i> 1	4,01	4,03	4,03	4,06	15,1	14,8	14,6	14,6
<i>Pediococcus acidilactici</i> 2	3,98	4,01	4,01	4,05	16,3	14,4	13,0	12,3
<i>Weisella cibaria</i> 3	4,38	4,30	4,22	4,21	12,7	13,8	14,1	14,3
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A 4	4,07	4,04	4,00	3,97	18,6	14,6	14,4	13,1
<i>Pediococcus pentosaceus</i> B 5	4,00	4,04	4,06	4,09	13,6	12,5	11,8	10,0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> C 6	4,34	4,22	4,12	4,07	15,5	14,3	13,6	13,0
<i>Weisella cibaria</i> 7	3,97	4,02	4,01	4,05	14,4	14,5	14,4	14,6
<i>Weisella</i>	4,05	4,00		4,04	13,6	13,8	14,2	14,0

<i>cibaria 8</i>			4,02					
------------------	--	--	------	--	--	--	--	--

Jednostopniowa fermentacja w temperaturze 30°C, prowadzona z udziałem odpowiednich monokultur złożonych z biomasy szczepów LAB umożliwiła osiągnięcie większego zakwaszenia niż wielostopniowa fermentacja spontaniczna w tej samej temperaturze. Stwierdzono, że proces ukwaszania w temperaturze 30°C zachodzi najwydajniej w przypadku zakwasów przygotowanych z udziałem monokultur: *Pediococcus pentosaceus* A 4 oraz *Pediococcus acidilactici* 2. Przy zastosowaniu odświeżania zakwasów (wielostopniowa fermentacja) z udziałem szczepów należących do gatunków *Pediococcus acidilactici* oraz *Pediococcus pentosaceus* zaobserwowano, że kwasowość kolejnych faz ulegała obniżeniu. Natomiast w przypadku zakwasów uzyskanych z udziałem monokultur szczepów gatunku *Weissella cibaria* kwasowość kolejnych faz utrzymywała się na podobnym poziomie. Podobnej zależności nie stwierdzono w odniesieniu do ilości kwasu mlekowego syntetyzowanego przez bakterie w zakwasach z inokulum bakterii rodzaju *Peddiococcus* (Tabela 14.).

- **Badanie zdolności nowo wyizolowanych szczepów LAB do syntezy kwasu mlekowego, octowego i innych produktów fermentacji w sporządzonych z ich udziałem zakwasach**

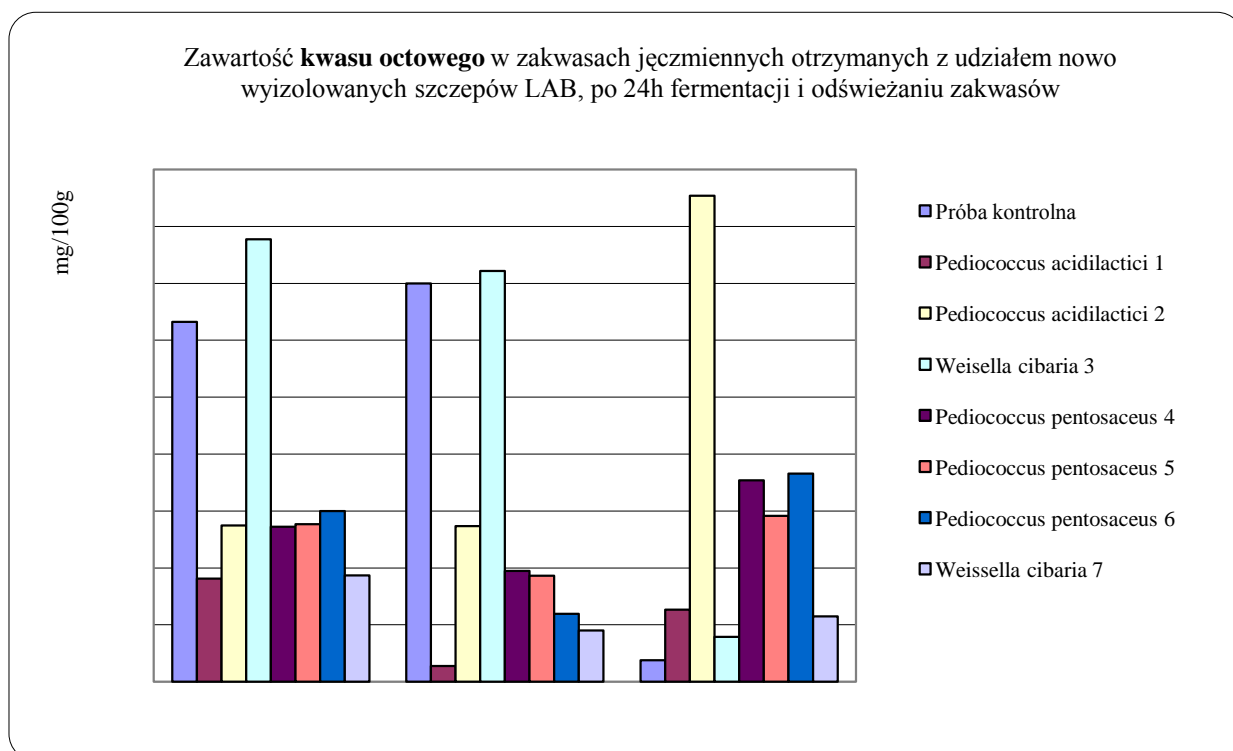
W zakwasach po 24h fermentacji najwyższe stężenie kwasu mlekowego oznaczono w zakwasie z udziałem *Pediococcus acidilactici* 2. W przypadku zakwasów otrzymanych z udziałem monokultur starterów bakterii z rodzaju *Weissella* zawartość kwasu mlekowego w zakwasach po 3 krotnym odświeżeniu wzrosła.

Tabela 14. Zawartość kwasu mlekowego w zakwasach otrzymanych z udziałem poszczególnych szczepów LAB, po 24 h fermentacji oraz po 3 krotnym odświeżeniu (96h fermentacji) [g/100g]

Symbol próbki	Czas fermentacji	kwas D - mlekowy	kwas L - mlekowy	Suma kwasu mlekowego
Próba kontrolna	24 h	0,10	0,18	0,28
	96 h	0,40	0,49	0,89
<i>Pediococcus acidilactici</i> 1	24 h	0,40	0,31	0,71
	96 h	0,38	0,44	0,82
<i>Pediococcus acidilactici</i> 2	24 h	0,42	0,50	0,92
	96 h	0,33	0,20	0,53

<i>Weissella cibaria</i> 3	24 h	0,18	0,09	0,27
	96 h	0,33	0,20	0,53
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A 4	24 h	0,24	0,41	0,65
	96 h	0,37	0,38	0,75
<i>P. pentosaceus</i> B 5	24 h	0,31	0,55	0,86
	96 h	0,27	0,32	0,59
<i>Pediococcus pentosaceus</i> C 6	24 h	0,44	0,36	0,80
	96 h	0,39	0,34	0,73
<i>Weissella cibaria</i> 7	24 h	0,14	0,18	0,32
	96 h	0,46	0,35	0,81
<i>Weissella cibaria</i> 8	24h	0,12	0,17	0,39
	96h	0,40	0,30	0,70

W zakwasach otrzymanych z udziałem monokultur poszczególnych szczepów bakterii oznaczono zawartość kwasu octowego oraz innych związków będących produktami fermentacji



Rys.4. Zawartość kwasu octowego w zakwasach otrzymanych z udziałem monokultur wyizolowanych LAB, po 24 f fermentacji i odświeżaniu zakwasów.

Zawartość kwasu octowego zmieniała się w zakwasach otrzymanych z udziałem monokultur poszczególnych szczepów LAB w sposób zróżnicowany. W zakwasie otrzymanym po 24 godzinnej fermentacji najwięcej kwasu octowego oznaczono w zakwasie z *Weissella cibaria*³ oraz zakwasie otrzymanym w wyniku fermentacji spontanicznej, w obu przypadkach zmniejszyła się ona po 3 krotnym odświeżeniu zakwasu (fermentacja 96h). W zakwasach z udziałem bakterii gatunku *Pediococcus pentosaceus* i szczepu *Weissella cibaria*⁷ poziom kwasu octowego utrzymywał się na poziomie około 5-15mg/100g. Odwrotnie w przypadku zakwasu otrzymanego z udziałem *Pediococcus acidilactici* 2, w wyniku odświeżania zawartość kwasu octowego tym zakwasie wzrosła.

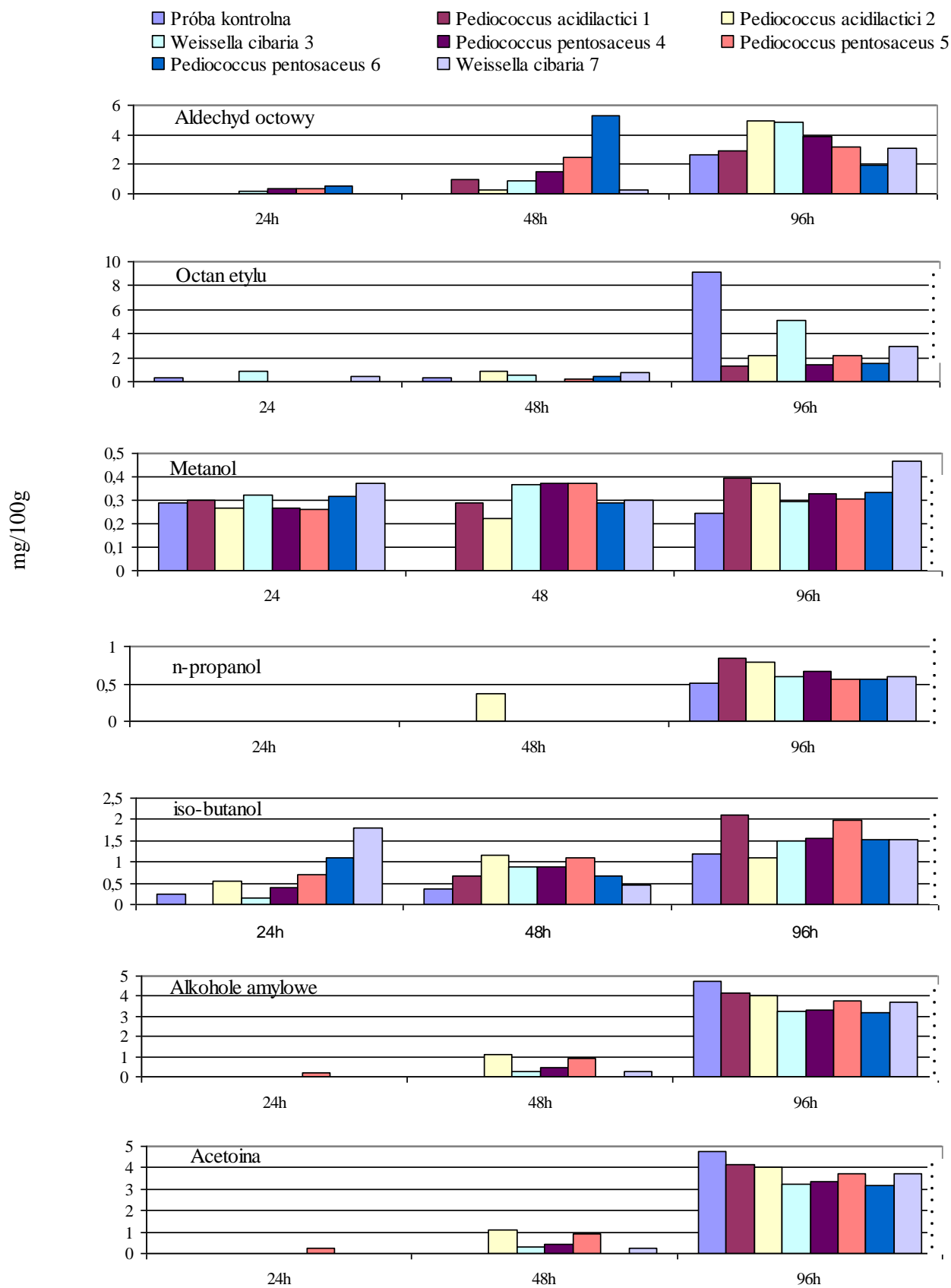
- **Ocena wpływu kultur starterowych na zawartość wybranych ubocznych produktów fermentacji w zakwasach jęczmiennych**

Wpływ kultur starterowych na zawartość wybranych ubocznych produktów fermentacji w zakwasach jęczmiennych obrazują wykresy przedstawione na rys. 2

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) syntetyzują związki zapachowe w specyficzny, właściwy dla gatunków a nawet szczepów sposób (Katina 2005). W przypadku homofermentacyjnych LAB charakterystyczna jest synteza takich związków jak diacetyl, aldehyd octowy, heksanal natomiast heterofermentacyjne w większym stopniu syntetyzują octan etylu, alkohole i aldehydy; z kolei produktami fermentacji prowadzonej przez drożdże są m.in. izoalkohole. W badanych zakwasach po pierwszej dobie fermentacji obecne były: aldehyd octowy, metanol, iso-butanol i octan etylu. Octan etylu wykryto tylko w zakwasach z udziałem *Weissella cibaria* 3, *Weissella cibaria* 7. Dopiero po czwartej dobie pojawiły się w próbach takie związki jak n-propanol, diacetyl.

Diacetyl pojawił się w zakwasach dopiero po 96 godzinach fermentacji w zakwasie fermentującym w sposób spontaniczny. Ogólnie biorąc więcej związków będących ubocznymi produktami fermentacji zostało oznaczonych w zakwasach wyprowadzonych z udziałem monokultur szczepów należących do rodzaju *Pediococcus* niż należących do rodzaju *Weissella*. W analizie związków smakowo-zapachowych oznaczonych metodą GC-MS wykryto aldehydy (3-metylobutanal, mleczan etylu), alkohol furfurylowy, ketony (2 hydroksy-2-cyklopenten-1-on), pirany (3-hydroksy-2-metylo-4H-piran-4-on).

Rysunek 5. Zawartość poszczególnych produktów fermentacji w zakwasach jęczmiennych otrzymanych z udziałem wybranych szczepów LAB, po 24 h fermentacji i odświeżaniu



- **Badanie wpływu poszczególnych monokultur starterowych sporządzonych z nowo wyizolowanych szczepów LAB na skład drobnoustrojów zakwasów.**

Przeprowadzono analizę mikrobiologiczną zakwasów otrzymanych z udziałem poszczególnych monokultur starterowych bezpośrednio po dodaniu kultury starterowej oraz 24 h fermentacji w temperaturze 30°C i odświeżaniu tj. po 48 i 72 h fermentacji. Oznaczano: liczbę bakterii kwaszących, drożdży i pleśni, wyniki przedstawiono w tabeli 15, 16 17.

Tabela 15. Wpływ kultury starterowej na liczbę bakterii fermentacji mlekowej w zakwasach jęczmiennych po czasie fermentacji 24 h i po odświeżaniu jedno (48h) i dwukrotnym (72 h).

Nazwa szczepu	Liczba LAB po fermentacji (j.t.k./g)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
próba kontrolna fermentacja spontaniczna	1×10^3	$1,4 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$
<i>Pediococcus acidilactici</i> 1	$1,6 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
<i>Pediococcus acidilactici</i> 2	$2,6 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$
<i>Weisella cibaria</i> 3	$7,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A 4	$3,8 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$
<i>Pediococcus pentosaceus</i> B 5	$4,6 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$
<i>Pediococcus pentosaceus</i> C 6	$6,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$
<i>Weisella cibaria</i> 7	$2,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$

Tabela 16. Wpływ kultury starterowej na liczbę pleśni w zakwasach jęczmiennych po czasie fermentacji 24h i po odświeżaniu jedno (48h) i dwukrotnym (72 h).

Nazwa szczepu	liczba pleśni [j.t.k./g] po fermentacji			
	0 h	24 h	48 h	72 h
próba kontrolna	1,0x10 ²	1,0x10 ²	2,0x10 ²	1,0x10 ⁴
<i>Pediococcus acidilactici</i> 1		2,0x10 ²	1,0x10 ⁵	n.w.
<i>Pediococcus acidilactici</i> 2		3,0x10 ⁴	1,0x10 ⁵	1,0x10 ⁴
<i>Weisella cibaria</i> 3		2,0x10 ⁴	1,2x10 ⁵	n.w.
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A 4		1,0x10 ²	1,0x10 ⁵	1,0x10 ⁴
<i>Pediococcus pentosaceus</i> B 5		2,0x10 ⁵	6,0x10 ⁴	1,0x10 ⁵
<i>Pediococcus pentosaceus</i> C 6		4,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	n.w.
<i>Weisella cibaria</i> 7		3,7x10 ³	3,0x10 ³	n.w.
<i>Weisella cibaria</i> 8		4,2x10 ³	4,8x10 ²	n.w.

n.w.- nie wykryto

Tabela 17. Wpływ kultury starterowej na liczbę drożdży w zakwasach jęczmiennych po czasie fermentacji 24h i po odświeżaniu jedno (48h) i dwukrotnym (72 h).

Nazwa szczepu	liczba drożdży [j.t.k./g] po czasie fermentacji		
	24 h	48 h	72 h
Próba kontrolna	5,0x10 ⁴	5,0x10 ⁵	5,0x10 ⁶
<i>Pediococcus acidilactici</i> 1	4,8 x10 ⁴	6,0x10 ⁶	1,2x10 ⁸
<i>Pediococcus acidilactici</i> 2	4,7 x10 ⁵	6,0x10 ⁷	1,2x10 ⁸
<i>Weisella cibaria</i> 3	2,9 x10 ⁵	2,5x10 ⁶	7,2x10 ⁷
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A 4	2,8 x10 ³	2,4x10 ⁷	1,2x10 ⁸
<i>Pediococcus pentosaceus</i> B 5	2,6 x10 ⁵	1,4x10 ⁸	1,2x10 ⁸
<i>Pediococcus pentosaceus</i> C 6	1,8 x 10 ⁵	4,8x10 ⁷	7,2x10 ⁷
<i>Weisella cibaria</i> 7	9,4 x 10 ⁵	1,0x10 ⁷	9,6x10 ⁷

n.w.- nie wykryto

Tabela 18 . Wpływ kultury starterowej na liczbę bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w zakwasach jęczmiennych po czasie fermentacji 24h i po odświeżaniu jedno (48h) i dwukrotnym (72 h)..

Nazwa szczepu	liczba bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> [j.t.k./g] po czasie fermentacji		
	24 h	48 h	72 h
Próba kontrolna	$1,8 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$
<i>Pediococcus acidilactici</i> 1	$2,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	n.w.
<i>Pediococcus acidilactici</i> 2	$4,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^1$
<i>Weisella cibaria</i> 3	$2,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	n.w.
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A 4	$2,6 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^2$
<i>Pediococcus pentosaceus</i> B 5	$3,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^1$
<i>Pediococcus pentosaceus</i> C 6	$2,6 \times 10^4$	$4,8 \times 10^7$	$7,2 \times 10^2$
<i>Weisella cibaria</i> 7	$3,2 \times 10^4$	n.w.	n.w.
<i>Weisella cibaria</i> 8	$4,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^2$	n.w.

n.w.- nie wykryto

Nie zaobserwowano znaczących różnic w odniesieniu do składu drobnoustrojów wchodzących w skład ekosystemów zakwasów uzyskanych z udziałem monokultur poszczególnych szczepów LAB.

W wyniku działania kultur starterowych po 24 godzinnej fermentacji zakwasów jęczmiennych zaobserwowano nieznaczny przyrost liczby bakterii fermentacji mlekowej, ich liczba utrzymywała się na poziomie 10^9 j.t.k./ml, w momencie zaszczepienia ciasta i po procesie jej fermentacji. Zastosowanie monokultur starterowych sprzyjało rozwojowi drożdży (pożądanych w zakwasach), ograniczało rozwój bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* chociaż dopiero po fermentacji wydłużonej do 48 i 72 godzin, czyli po zastosowaniu odświeżania zakwasów. Pleśni nie wykryto w stadium wyjściowym zakwasów tj. po dodaniu wody i kultury starterowej do mąki, natomiast po 24h fermentacji w 7 próbkach rozwinęły się pleśnie, najprawdopodobniej w związku ze sprzyjającym zakwaszeniem środowiska zakwasów piekarskich.

5.5

Ocena przydatności wyselekcjonowanych kultur mieszanych, zawierających wyizolowane szczepy LAB do otrzymywania zakwasów jęczmiennych, na podstawie jakości mikrobiologicznej i technologicznej zakwasów.

W wyniku selekcji wyizolowanych szczepów LAB, wybrano szczepy, które posłużyły do sporządzenia trzech mieszanych kultur starterowych. Podczas doboru szczepów kierowano się następującymi kryteriami: wzrost w poszczególnych temperaturach, ilość syntetyzowanego kwasu mlekowego, zdolność do syntetyzowania produktów fermentacji wpływających na zapach, aktywność antymikrobiologiczną skierowaną przeciwko pleśnionom (*Weissella cibaria* 7) oraz indywidualna zdolność każdego z nich do modyfikowania przebiegu fermentacji i pozytywnego wpływania na cechy zakwasu. Starano się również, aby skomponowane kultury mieszane były jak najbardziej różnorodnie gatunkowo, a także by różniły się liczbą szczepów składowych. Skład mieszanych kultur starterowych przedstawiono w tabeli nr 19.

Tabela 19. Skład skomponowanych mieszanych kultur starterowych.

Przyjęta nazwa kultury mieszanej	Skład
K 1	<i>Pediococcus acidilactici</i> 1, <i>P.acidilactici</i> 2, <i>Weissella cibaria</i> 3, <i>P. pentosaceus</i> 4A, <i>P. pentosaceus</i> 5B, <i>Pediococcus pentosaceus</i> 6C, <i>Weissella cibaria</i> 7, wszystkie szczepy pozostawały w stosunku 1:1
K 2	<i>P.acidilactici</i> 2, <i>Weissella cibaria</i> 3, <i>Weissella cibaria</i> 7 w stosunku 1:1:1
K 3	<i>P.acidilactici</i> 2, <i>Weissella cibaria</i> 7 w stosunku 2:1

Opracowane kultury starterowe zostały użyte do sporządzenia zakwasów jęczmiennych, które zostały ocenione pod względem organoleptycznym i mikrobiologicznym po 24 godzinach fermentacji oraz po 48 godzinach fermentacji (po odświeżeniu) i 72 godzinach fermentacji (po dwukrotnym odświeżeniu). Oceniono również zakwas poddany fermentacji spontanicznej – próba kontrolna (A).

Tabela 20. Ocena sensoryczna zakwasów otrzymanych z udziałem mieszanych kultur starterowych po 24 h fermentacji w temperaturze 30°C i po odświeżaniu jedno (48h) i dwukrotnym (72 h).

3

Zastosowana kultura starterowa	Czas fermentacji		
	24 h	48 h	72 h
Próba kontrolna Fermentacja spontaniczna	z: kiszonkowy, siana, z nutą gnilną, lekko mączny s: spękana, porowata (spulchnionego ciasta) k: gęsta, jednorodna b: beżowa, błyszcząca	z: lekko kwaskowy, słodowy, przyjemny, brak nuty gnilnej k: pasty, gęsta, sucha b: powierzchnia szaro-brązowa, wewnątrz jasnokremowe	z: kwiatowy, estrowy, słodki k: pasty, luźniejsza niż po 48 h b: powierzchnia ciemnoszara
K 1 (B)	z: siana, słodko-kwiatowy, bez nuty gnilnej, estrowy s: porowata (spulchnionego ciasta) b: beżowa, mało błyszcząca	z: kwiatowy, estrowy, brak nuty kwaśnej k: pasty, gęsta, sucha b: powierzchnia jasnobrązowa, wewnątrz szarawe	z: kwaśny, słodowy, kwiatowy k: pasty, grudkowata b: szaro-beżowa
K 2 (C)	z: szczawiowy, kwaskowaty, lekko słodowy (na kwaśno), bez nuty estrowej k: gęsta, jednorodna b: beżowa, lekko błyszcząca	z: kwiatowy, słodowy, estrowy, leciutka nuta kwasowa k: pasty, gęsta, sucha b: powierzchnia ciemno beżowa, wewnątrz beżowe	z: estrowy, drożdżowy, kwaśny, słodki, alkoholowy k: pasty, grudkowata b: szaro-beżowa
K 3 (D)	z: przyjemny, mocno kwiatowy, inny niż pozostałe(ew. estrowy, owocowy), kwasowość nie wyczuwalna k: gęsta, jednorodna b: beżowa	z: kwiatowy, słodowy, estrowy, nuta kwasowa k: pasty, gęsta, wyraźnie sucha b: powierzchnia ciemno beżowa, wewnątrz beżowe	z: estrowy, kwiatowy, alkoholowy k: pasty, grudkowata b: szaro-beżowa

z: zapach, s: struktura, k: konsystencja, b: barwa

Analiza fizykochemiczna zakwasów otrzymanych z użyciem mieszanych kultur starterowych obejmowała oznaczenie pH i kwasowości ogólnej. Oznaczenia przeprowadzono po fermentacji jednostopniowej 24 godzinnej, a także po odświeżeniu zakwasów. Wyniki przedstawiono w tabelach 21 i 22.

Tabela 21. Analiza fizykochemiczna zakwasów otrzymanych z użyciem mieszanych kultur starterowych, w wyniku trwającej 24 h jednostopniowej fermentacji w temperaturze 30 °C.

Mieszana kultura starterowa	pH	Kwasowość ogólna [°kw]
Próba kontrolna	5,05	9,6
K1	3,85	16,1
K2	3,94	16,8
K3	3,88	16,4

Zastosowanie wszystkich badanych kultur starterowych do sporządzenia zakwasu powodowało znaczne przyspieszenie procesu fermentacji i zwiększenie stężenia kwasów organicznych w zakwasie w porównaniu do fermentacji spontanicznej. W przypadku wszystkich zakwasów pH zmniejszyło się do wartości poniżej 4, a kwasowość osiągnęła (w przypadku kultury starterowej K2) nawet 16,8 [°kw].

Tabela 22. Charakterystyka technologiczna kwasów piekarskich przy stosowaniu odświeżania i tj po fermentacji 24 h i po odświeżaniu jedno (48h) i dwukrotnym (72 h).

Rodzaj startera fermentacji	Faza fermentacji	Czas fermentacji	Kwasowość ogólna, stopnie	pH
0	I	0		
		24 h	9,6	5,05
	II (1. odświeżenie)	0	5,0	5,9
		24 h	15,8	3,97
	III (2. odświeżenie)	0	5,6	5,55
		24 h	15,7	3,94
K1	I	0		
		24 h	16,1	3,85
	II (1. odświeżenie)	0	6,0	5,58
		24 h	16,2	3,80
	III (2. odświeżenie)	0	5,6	5,55
		24 h	16,0	3,89
K2	I	0		
		24 h	16,8	3,94

	II	0	5,8	5,63
	(1. odświeżenie)	24 h	17,4	3,76
	III	0	5,6	5,50
	(2. odświeżenie)	24 h	15,9	3,90
K3	I	0		
		24 h	16,4	3,88
	II	0	5,85	5,61
	(1. odświeżenie)	24 h	16,6	3,79
	III	0	5,6	5,52
	(2. odświeżenie)	24 h	15,9	3,86

Zastosowanie mieszanych kultur starterowych w celu przeprowadzenia jednostopniowej fermentacji zakwasów w temperaturze 30°C umożliwia osiągnięcie zdecydowanie większego stopnia ukwaszenia niż stosowanie pojedynczych monokultur. Zaobserwowano różnice w poziomie ukwaszenia pomiędzy zakwasami przygotowanymi z użyciem poszczególnych mieszanych kultur starterowych, w przypadku użycia każdej z badanych kultur najwyższą kwasowością charakteryzowały się zakwasy otrzymane po odświeżeniu. Podczas kolejnych odświeżeń najmniejszym zmianom ulegała kwasowość zakwasu prowadzonego z użyciem kultury starterowej K3.

Zakwasy uzyskane z udziałem poszczególnych mieszanych kultur starterowych charakteryzowały się indywidualnymi, zróżnicowanymi właściwościami sensorycznymi. Subiektywna ocena wykazała, że najlepszymi cechami sensorycznymi charakteryzował się zakwas przygotowany z udziałem kultury **K3**.

- **wpływ wyselekcjonowanych kultur starterowych na zawartość β -glukanu w zakwasach jęczmiennych otrzymanych w wyniku 24h fermentacji.**

Ze względu na wartość żywieniową β -glukanu wskazane jest, aby jego zawartość w pieczywie była jak najwyższa. Podczas fermentacji zakwasu i ciasta jego zawartość ulega zmniejszeniu ze względu na działalność enzymów mąki oraz zużywanie β -glukanu przez bakterie. Zdolność metabolizowania β -glukanu jest zróżnicowana pośród bakterii.

Zaobserwowano różnice w zawartości β -glukanu w zakwasach jęczmiennych otrzymanych z udziałem opracowanych kultur starterowych w wyniku 24h fermentacji. Największy, sięgający 80% początkowej zawartości, ubytek β -glukanu w stosunku do jego zawartości w

mące stwierdzono w zakwasie otrzymanym w wyniku fermentacji spontanicznej tj. prowadzonej przez niezdefiniowane szczepy bakterii oraz w zakwasie uzyskanym przy udziale kultury starterowej złożonej z 7 szczepów LAB aż do .

Przeprowadzono analizę mikrobiologiczną zakwasów otrzymanych z udziałem mieszanych kultur starterowych po jednostopniowej, trwającej 24 h fermentacji w temperaturze 30°C.

Tabela 24. Wpływ mieszanych kultur starterowych na skład mikroorganizmów zakwasów po fermentacji 24h i po odświeżaniu jedno (48h) i dwukrotnym (72 h).

Kultura starterowa	Fermentacja	Liczna/obecność grupy drobnoustrojów [j.t.k./g]				
		LAB	drożdże	pleśnie	bakterie z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> grupa coli	bakterie z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> rodzaj <i>Salmonella</i>
Kontrola (A)	0	3,0x10 ²	brak	2,5x10 ⁵	2,0x10 ⁴	3,0x10 ⁴
	24 h	6,0x10 ⁷	7,0x10 ³	5,0x10 ⁴	1,0 x10 ⁶	n.w.
	48 h	3,2x10 ⁹	1,9x10 ⁶	3,0x10 ⁴	1,0x10 ⁶	n.w.
	72 h	1,3x10 ⁹	1,3x10 ⁸	brak	7,0x10 ³	n.w.
K 1 (B)	0	3,0x10 ⁸	7,0x10 ⁴	8,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	3,0x10 ⁴
	24 h	1,3x10 ⁹	8,0x10 ⁶	3,0x10 ⁴	n.w.	n.w.
	48 h	1,8x10 ⁹	1,5x10 ⁸	brak	n.w.	n.w.
	72 h	2,8x10 ⁹	1,2x10 ⁸	brak	n.w.	n.w.
K 2(C)	0	-	-	-	-	-
	24 h	4,0x10 ⁸	3,0x10 ⁶	4,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	n.w.
	48 h	2,0x10 ⁹	9,0x10 ⁷	brak	1,0x10 ¹	n.w.
	72 h	3,0x10 ⁹	1,9x10 ⁸	brak	n.w.	n.w.
K 3 (D)	0	-	-	-	-	-
	24 h	4,0x10 ⁸	1,9x10 ⁷	3,0x10 ⁴	9,0x10 ⁴	n.w.
	48 h	7,0x10 ⁸	5,0x10 ⁷	brak	n.w.	n.w.
	72 h	1,8x10 ⁹	7,4x10 ⁷	brak	n.w.	n.w.

n.w.- nie wykryto

W trakcie fermentacji wszystkich zakwasów przygotowanych z udziałem poszczególnych mieszanych kultur starterowych następował istotny przyrost ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby bakterii kwaszących, drożdży, bakterii proteolitycznych, bakterii śluzowych.. W trakcie fermentacji zakwasów przygotowanych z udziałem kultur K1 i K2 następowało całkowite zahamowanie rozwoju bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* należących do grupy coli i rodzaju *Salmonella*.. W przypadku zakwasu przygotowanego z udziałem kultury K3 stwierdzono istotne zmniejszenie liczby tych bakterii w trakcie fermentacji. Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że w trakcie fermentacji zakwasu przygotowanego z udziałem kultury K1 następuje całkowite zahamowanie rozwoju pleśni. W przypadku zakwasów przygotowanych z zastosowaniem pozostałych kultur stwierdzono rozwój pleśni. Podczas oceny wpływu poszczególnych mieszanych kultur starterowych LAB na proces fermentacji i cechy zakwasów jęczmiennych wykazano, że zastosowanie każdej z analizowanych kultur mieszanych w procesie jednostopniowej, trwającej 24 h fermentacji w temperaturze 30°C umożliwia wytworzenie w pełni dojrzałych zakwasów, charakteryzujących się zdecydowanie lepszymi właściwościami niż zakwasy otrzymane w wyniku fermentacji z udziałem monokultur starterowych oraz zakwasy uzyskane podczas wielostopniowej, spontanicznej fermentacji.

Na podstawie przeprowadzonych ocen i analiz uznano również, że kultury K2 K3 charakteryzują się zdolnością kompleksowej poprawy cech zakwasów na zbliżonym poziomie. W kolejnym etapie badań analizowano jej przydatność w próbnym wypiekach.

W celu wyboru kultury starterowej do przeprowadzenia prób technologicznych w piekarniach przeprowadzono badania laboratoryjne polegające na zastosowaniu zakwasów wyprodukowanych na dwa różne sposoby, z udziałem kultur starterowych K2 i K3 do otrzymania pieczywa pszenno-jęczmiennego.

5.6. Opracowanie technologii produkcji (receptury, metody prowadzenia ciasta) pieczywa pszenno-jęczmiennego z zastosowaniem wybranych kultur bakteryjnych. Otrzymanie partii próbnego ekologicznego pieczywa jęczmiennego.

Recepturę pieczywa ekologicznego pszenno-jęczmiennego opracowywano w laboratorium a następnie zastosowano do otrzymania wypieków w dwóch piekarniach: w piekarni Vini z Rogoźnika i piekarni Słodka z Torunia.

W doświadczeniach laboratoryjnych stosowano ocenione jako dobre kultury mieszane o symbolu K2 i K3 składające się odpowiednio z następujących szczepów: K2 z *P.acidilactici* 2, *Weissella cibaria* 3, *W. cibaria* 7 w stosunku 1:1:1, K3 z *P.acidilactici* 2, *W. cibaria* 7 w stosunku 2:1. Każdorazowo w IBPRS hodowano kulturę mieszaną na podłożu produkcyjnym, odwirowywano i w formie pasty dodawano do mąki celem uzyskania zakwasu jęczmiennego.

Tabela 25. Charakterystyka fizykochemiczna zakwasów otrzymanych z użyciem mieszanych kultur starterowych, w wyniku trwającej 24 h jednostopniowej fermentacji w temperaturze 30 °C.

Mieszana kultura starterowa	pH	Kwasowość ogólna [°kw]
Próba kontrolna	5,02	9,5
K1	3,80	16,3
K2	3,92	16,7
K3	3,90	16,3

Następnie sprawdzono możliwość zastosowania dwóch różnych sposobów wyprowadzania zakwasu.

- **Przygotowanie ciasta i wypiek chleba w skali mikrotechnicznej**

Ciasta wytwarzano z kwasów prowadzonych 1.fazowo. Z kwasem piekarskim wprowadzano do ciasta całą mąkę jęczmienną (30%). Ciasta przygotowywano w oparciu o następującą recepturę:

składniki ciasta	masa
1. zakwas piekarski	600 g
2. Mąka pszenna typ550	700 g
3. Drożdże	20 g
4. Sól	17 g
5. Woda	365 cm ³

Tabela 26. Właściwości ciast w zależności od rodzaju użytej kultury starterowej

Kultura starterowa	Kwasowość ogólna stopnie	pH	Czas rozrostu końcowego, min
--------------------	--------------------------	----	------------------------------

Próbka kontrolna	8,4	5,33	42
K1	9,4	4,37	40
K2	9,2	4,50	40
K3	9,0	4,40	33

Tabela 27. Jakość chleba w zależności od rodzaju kultury starterowej

Kultura starterowa	Objętość 100g chleba cm ³	Wilgotność miękiszu %	Kwasowość miękiszu, stopnie	pH miękiszu	Twardość G	Ocena organoleptyczna pkt
Próba kontrolna	286	45,5	3,6	4,87	2050	Miękisz gorzkawy, kruszący się 33,5
K 1	259	45,6	4,4	4,29	2300	zapach lekko słodowy, miękisz kruszący się, pory nierównomierne, smak kwaskowy 34,8
K 2	256	45,1	4,8	4,32	1975	zapach słodowy, lekko kwaskowy, miękisz o równomiernych porach, chleb aromatyczny smak lekko kwaśny 34,3
K 3	249	45,9	4,7	4,28	2150	zapach słodowy, smak wyczuwalnie kwaskowy, chleb aromatyczny 36,3

Najwyższą ocenę organoleptyczną uzyskało pieczywo otrzymane z udziałem kultury K3. Ponieważ jednak pieczywo z K2 i K3 nie różniło się w sposób istotny, dlatego w dalszych badaniach sprawdzono wpływ zmiany sposobu wyprowadzania zakwasu z udziałem obu kultur starterowych na cechy otrzymywanego z jego udziałem pieczywa.

- **Doskonalenie sposobu przygotowania zakwasu do otrzymywania pieczywa z udziałem maki jęczmiennej ekologicznej, próby w skali mikrotechnicznej**

Przygotowanie zakwasów piekarskich

Zakwasy piekarskie sporządzono z mąki jęczmiennej i wody. Stosowano kultury starterowe K2 i K3 oraz różne metody prowadzenia zakwasów polegające na zmianie ilości wody stosowanej do otrzymania zakwasu (różne wydajności) oraz temperatury prowadzenia fermentacji. Zastosowano zakwasy o wydajności 200% i 300% i temperatury 25 i 30°C.

Warianty zakwasów:

- kultura K3 (*P.acidilactici* KKP2, *Weissella cibaria* KKP7 w stosunku 2:1)
 - zakwas A, wydajność 300, temperatura 25° C
 - zakwas B, wydajność 200, temperatura 30° C
- kultura K2 (*P.acidilactici* KKP2, *Weissella cibaria* KKP3, *Weissella cibaria* KKP7) w stosunku 1:1:1)
 - zakwas C, wydajność 300, temperatura 25° C
 - zakwas D, wydajność 200, temperatura 30° C

W/ w kultury starterowe zostały użyte do sporządzenia zakwasów jęczmiennych, które zostały ocenione pod względem organoleptycznym, fizykochemicznym i mikrobiologicznym po 24 h fermentacji.

Tabela 28. Ocena organoleptyczna zakwasów w zależności od zastosowanej kultury starterowej i sposobu prowadzenia zakwasu.

zakwas A K3, w. 300%	Zapach: wyraźnie kwaśny, zbożowy, lekko octowy Struktura: rozwarstwiony (koniec fermentacji)
zakwas B K3, w. 200%	Zapach: wyraźnie kwaśny, lekko octowy Konsystencja: gęsta, grudkowata
zakwas C K2, w. 300%	Zapach: wyraźnie kwaśny, lekko octowy Konsystencja: luźna, z gazami, napowietrzony
zakwas D K2, w. 200%	Zapach: wyraźnie kwaśny, octowy, szczawiowy Konsystencja: gęsta, grudkowata

Tabela 29. Charakterystyka technologiczna zakwasów piekarskich prowadzonych 1.fazowo przez 24 h, otrzymanych z kulturami starterowymi K2 i K3 przy zastosowaniu różnej wydajności zakwasu

próba	Kultura starterowa	Sposób prowadzenia zakwasu			Właściwości zakwasu	
		Wydajność	temp., [°C]	Czas fermentacji [h]	Kwasowość ogólna, [°k]	pH
zakwas A	K3	300	25	0	2,6	5,95
				24 h	12,0	3,93
zakwas B	K3	200	30	0	4,0	5,94
				24 h	17,3	3,87
zakwas C	K2	300	25	0	2,2	5,99
				24 h	12,0	3,98
zakwas D	K2	200	30	0	3,6	5,93
				24 h	18,0	3,96

W przypadku obydwu badanych kultur starterowych zwiększenie wydajności ciasta przy sporządzaniu zakwasu (zwiększenie dodatku wody) i obniżenie temperatury prowadzenia fermentacji spowodowało obniżenie kwasowości otrzymanych zakwasów. W takich warunkach przewagę uzyskują bakterie prowadzące fermentację na drodze heterofermentacyjnej, oprócz kwasu mlekowego syntetyzowany jest kwas octowy i inne produkty odpowiedzialne za powstawanie bogatego aromatu. Zakwasy sporządzone z udziałem mąki o wysokiej zawartości popiołu charakteryzują się właściwościami buforującymi i stosunkowo wysoką zawartością pentozanów, co sprzyja powstawaniu większej w stosunku do mąki o niskiej zawartości popiołu, ilości kwasu octowego.

Tabela 30. Ocena mikrobiologiczna zakwasów otrzymanych z kulturami starterowymi K2 i K3 przy zastosowaniu różnej wydajności zakwasu

Kultura starterowa, zakwas	czas fermentacji	Grupa drobnoustrojów, j.t.k./g				
		LAB	drożdże	pleśnie	bakterie z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	
					grupa <i>coli</i>	rodzaj <i>Salmonella</i>
K2 (C) w 300	0	$1,1 \times 10^8$	brak	$5,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$
	24 h	$6,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$

K2 (D) w 200	0	$1,2 \times 10^8$	brak	$5,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$
	24 h	$5,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$6,2 \times 10^2$
K3 (A) w 300	0	$1,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^1$	$4,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$
	24 h	$5,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^3$	n.w.	$2,0 \times 10^2$
K3 (B) w 200	0	$1,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^1$	$5,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$
	24 h	$1,6 \times 10^9$	$5,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^2$

*n.w. –nie wykryto

Zakwasy wykorzystano do sporządzenia ciast, a następnie wypieku pieczywa. Ocena ciast przedstawiona została w tabeli 31

Tabela 31. Właściwości ciast w zależności od rodzaju użytego kwasu jęczmiennego (z zakwasem wprowadzano 30% mąki ogółem) i udziału mąki jęczmiennej

Ciasto	Rodzaj zakwasu	Udział mąki jęczmiennej, % mąki ogółem	Udział mąki wprowadzonej z kwasem	Wydajność ciasta	Kwasowość ogólna, stopnie	pH	Czas rozrostu końcowego, min
1	A (K3)	30	30	169	9,0	4,28	40
2	B (K3)	30	30	169	9,2	4,26	36
3	A (K3)	40	30	172	9,0	4,39	33
4	B (K3)	40	30	169	9,0	4,26	30
5	C (K2)	30	30	169	8,6	4,33	40

Zakwasy wyprowadzone z kulturami starterowymi K2 i K3 charakteryzowały się zbliżonym składem mikroorganizmów, za wyjątkiem mniejszej liczby lub braku bakterii należących do grupy coli. Nie zaobserwowano również wyraźnych tendencji w zmianie parametrów fizykochemicznych ciast wyprowadzonych z udziałem zakwasów o wydajności 300% i 200%. Wypiek chleba przeprowadzono z użyciem mąki ekologicznej: pszennej typ 550 węgierskiej i jęczmiennej całościarnowej (razowej) w proporcji 70:30 i 60:40, na zakwasie jęczmiennym, z dodatkiem drożdży do ciasta.

Tabela 32. Jakość chleba w zależności od rodzaju kultury starterowej, prowadzenia zakwasu i udziału mąki jęczmiennej

Wariant doświadczenia				Oceniane wyróżniki					
chleb	kultura	rodzaj zakwasu	udział mąki jęczmiennej, % mąki ogółem	objętość 100g chleba cm ³	wilgotność miękiszu	kwasowość miękiszu, stopnie	pH miękiszu	twardość, G	ocena organoleptyczna pkt
1	III	A w 300	30	250	46,6	5,3	4,37	2300	miękkiz gumowaty smak i zapach kwaśny 33
2	III	B w 200	30	252	45,0	5,0	4,36	2200	smak łagodny 33,5
3	III	A w 300	40	255	46,2	5,3	4,45	2700	miękkiz kleisty, smak kwaśny 34
4	III	B w 200	40	244	46,7	5,0	4,43	2550	miękkiz kleisty, smak kwaśny 35,3
5	II	C w 300	30	250	45,8	5,3	4,41	2100	miękkiz kleisty, smak kwaśny 35,8

Nie zaobserwowano wyraźnego wpływu sposobu prowadzenia zakwasu na większość ocenianych parametrów pieczywa otrzymanego z ich udziałem za wyjątkiem twardości miękiszu. Pieczywo z udziałem 30% mąki jęczmiennej (całość w zakwasie), otrzymane z udziałem zakwasów o wyższej wydajności (300) było bardziej twarde niż otrzymane z zakwasami o wydajności 200.

Ogólnie biorąc pieczywo pszenno-jęczmienne zawierające zarówno 30% jak i 40% mąki jęczmiennej charakteryzowała się wyrazistym przyjemnym smakiem, było bardzo aromatyczne z nutą słodową, miękkiz, choć przyjemnie rozpluwający się w ustach, był jednak dość twardy.

Do prób technologicznych w piekarniach zdecydowano się użyć kulturę starterową K3, przy wyprowadzaniu zakwasu stosowano wydajność 200%.

5.6. Przebieg doświadczeń i ocena pieczywa wyprodukowanego w piekarniach.

- **Otrzymanie partii próbnych ekologicznego pieczywa jęczmiennego w piekarni**

Vini, ocena pieczywa

We wszystkich doświadczenia wykonanych w piekarni zakwas otrzymywano według schematu:

1. mąka jęczmienna 500 g^g
2. woda 500 cm³
3. kultura starterowa, 0,5% - 2,5 g

Ogółem 1002,5 g
I ciasto (udział mąki jęczmiennej 30%)

1. zakwas 1850 g
2. mąka pszenna 2158 g
3. drożdże 62 g
4. sól 52 g^g
5. woda 1145 cm³

Ogółem 5267 g
 mieszanie ciasta 5 +4 min
 fermentacja ciasta - 1 godz.
 naważki 550 g i 500 g
 rozrost 50 min
 wypiek 45 min w temp. 195°C

II. Ciasto (udział mąki jęczmiennej 40%)

1. kwas 1850 g
2. mąka jęczmienna 308 g
3. mąka pszenna 1848 g
4. drożdże 62 g
5. sól 52 g^g
6. woda 1195 cm³

Ogółem 5315 g

Fermentacja ciasta trwała 50 min, naważka 500 g, rozrost 40 min.

Zaobserwowano, że ciasto z 10% dodatkiem maki jęczmiennej nie ukwaszonej szybciej się starzeje wymaga krótszego prowadzenia i skrócenia rozrostu kęsów ciasta.

Tabela 33. Jakość chleba w zależności od udziału mąki jęczmiennej. Próby technologiczne.

Udział mąki jęczmienia	Objętość 100g	Wilgotność miękiszu, %	kwasowość miękiszu,	pH miękiszu	Twardość, G	Ocena

nej, % mąki ogółem	chleba cm³		[°K]		1 dzień po wypieku	4 dzień po wypieku	organoleptyczna pkt
30	273	46,1	4,8	4,33	1950	2550	36,0
40	256	47,0	5,0	4,34	2150	2600	32,7

Tabela 34. Ocena mikrobiologiczna pieczywa, **po pierwszej dobie**

Grupy drobnoustrojów	Próby pieczywa, Liczba komórek (j.t.k/ml)	
	chleb z 30% mąki jęczmiennej	chleb z 40% mąki jęczmiennej
bakterie fermentacji mlekowej	$3,6 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$
ogólna liczba bakterii	$1,8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
Bakterie przetrawnikujące	$2,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
<i>Bacillus cereus</i>	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
<i>Bacillus subtilis</i>	n.w.	n.w.
bakterie rodzaju <i>Leuconostoc</i>	n.w.	n.w.
drożdże	n.w.	n.w.
Pleśnie	n.w.	n.w.
bakterie z grupy coli	n.w.	n.w.
bakterie <i>Salmonella</i>	n.w.	n.w.
trwałość oceniana poprzez objawy pleśnienia	po 7 dobach pojedyncze kolonie pleśni na powierzchni chleba	po 7 dobach brak oznak pleśnienia na powierzchni chleba

n.w. –nie wykryto

Próby zastosowania kultury starterowej w piekarni Vini oceniono pozytywnie. Otrzymane pieczywo było dostatecznie wyrośnięte, mięksiz charakteryzował się dobrą elastycznością, dostateczną krajalnością i dość równomierną porowatością. Smak i zapach były odpowiednio intensywne, zrównoważone i bardzo aromatyczne. Bukiet smakowo-zapachowy zakwasu określono jako typowo słodowy, z wyczuwalną nutą kwaskową, był on bardzo dobrze wyczuwalny.

Jedna z prób z 30% udziałem mąki jęczmiennej w zakwasie została zaklasyfikowana do I klasy jakościowej pieczywa, uzyskując 36 punktów za ocenę organoleptyczną w połączeniu z ekwiwalentem punktów przypadających na wskaźniki fizykochemiczne, druga próba w piekarni została zakwalifikowana do II klasy jakościowej.

- **Przebieg doświadczeń wykonanych w piekarni w Toruniu, ocena pieczywa**

Chleb wypiekano z mąki ekologicznej: pszennej typ 550 i jęczmiennej całościowej w różnych proporcjach, na zakwasie jęczmiennym, z dodatkiem drożdży do ciasta.

W pierwszej serii doświadczeń stosowano mąkę jęczmienną całościową o zawartości popiołu 2,0%, w drugiej serii doświadczeń zastosowano mąkę jęczmienną razową o zawartości popiołu 2,3% i wysokiej zawartości błonnika pokarmowego tj. 22,3% .

Fermentację zakwasu piekarskiego prowadzono dwufazowo w temperaturze 25 - 30°C, I faza została wyprowadzona z użyciem kultury starterowej K2 w formie liofilizatu w proporcji 0,5% kultury starterowej w stosunku do mąki, po 26 godzinach fermentacji całość I fazy użyto do zapoczątkowania fermentacji fazy II, w ilości 10%. Zakwas fazy drugiej po 24h fermentacji użyto do przygotowania ciasta.

- Próba z mąki jęczmiennej o zawartości popiołu 2,0

Receptura	1 40% mąki jęczmiennej 30 % w zakwasie	2 30% mąki jęczmiennej
zakwas piekarski	6.000 g,	6.000 g,
mąka pszenna typ550	7.000 g	7.000 g
mąka jęczmienna	1.000 g	-
drożdże	200 g	200 g
Sól	170 g	170 g
Woda	3.800 cm ³	4.000 cm ³
mieszanie I+ II bieg	4+6 min	4+6,5 min
masa kęsa	400g i 700 g	400 g i 700g
wypiek	210 °C, 45 i 50 min	210 °C, 45 i 50 min

- Próba z mąki o zawartości popiołu 2,3.

Receptura	1 50% mąki jęczmiennej 30 % w zakwasie	2 50% mąki jęczmiennej 40% w zakwasie
zakwas piekarski	5.400 g,	7.200 g,
mąka pszenna typ550	4.500 g	4.500 g
mąka jęczmienna	1.800 g	900 g
drożdże	180 g	180 g
Sól	150 g	150 g
Woda	4.000 cm ³ ,	3.800 cm ³ ,
mieszanie I+ II bieg	4+6 min	4+6,5 min
masa kęsa	400g i 700 g	400 g i 700g
wypiek	210 °C, 40 i 50 min	210 °C, 40 i 50 min

wydajność chleba - 134

Tabela 35. Jakość chleba w zależności od udziału mąki jęczmiennej

Wariant doświadczenia (udział mąki jęczmiennej, udział mąki j. w kwasie)	objętość 100g chleba, cm ³	Wilgotność, %	kwasowość stopnie	pH	Twardość mięksizu		
					po 1dobie	po 4	po 7
30 % (30% w zakwasie)	320	43,0	4,7	4,28	2600	3650	4150
40 % (30% w zakwasie)	317	43,0	4,2	4,38	2925	3900	4550
50% (30% w zakwasie)	229	44,0	8,3	4,31	3700	-	-
50% (40% w zakwasie)	203	44,8	9,8	4,11	3850	-	-

W przypadku pieczywa z zawartością jęczmienia 50%, stwierdzono że twardość mięksizu po 4 dobach od wypieku była zbyt wysoka i powodowała jego nieprzydatność do konsumpcji.

Tabela 35.

Ocena organoleptyczna pieczywa otrzymanego podczas prób technologicznych

Mąka, popiołowość	Wariant doświadczenia (udział mąki jęczmiennej, w tym w zakwasie)	Ocena organoleptyczna
zakwas z mąki o popiołowości 2,0	30 % (całość w zakwasie)	36
	40 % (30 w zakwasie)	35,5
zakwas z mąki o popiołowości 2,3	50% (30% w zakwasie)	31,5
	50% (40% w zakwasie)	30

Objawy mikrobiologicznego zepsucia pieczywa pszenno-jęczmiennego pojawiały się dopiero po siedmiu dobach przechowywania, w pieczywie o zawartości maki jęczmiennej 30%. Pieczywo z większą zawartością mąki jęczmiennej, którą wprowadzano w formie ukwaszonej charakteryzowało się niższym rozwojem pleśni w trakcie przechowywania.

Tabela 36. Ocena mikrobiologiczna pieczywa z udziałem mąki o zawartości popiołu 2,0

Grupy drobnoustrojów	Próby pieczywa, liczba komórek (j.t.k/ml)	
	chleb z 30% mąki jęczmiennej (całość w zakwasie)	chleb z 40% mąki jęczmiennej (10% w zakwasie)
LAB	$2,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$
ogólna liczba bakterii	$1,6 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$

bakterie przetrwalnikujace	2,0x10 ¹	1,0x10 ¹
<i>Bacillus cereus</i>	2,0x 10 ¹	1,6x 10 ¹
<i>Bacillus subtilis</i>	n.w.	n.w.
bakterie rodzaju <i>Leuconostoc</i>	n.w.	n.w.
drożdże	n.w.	n.w.
pleśnie	1,4x 10 ¹	n.w.
bakterie z grupy coli	n.w.	n.w.
bakterie <i>Salmonella</i>	n.w.	n.w.
trwałość oceniana poprzez objawy pleśnienia	po 7 dobach pojedyncze ogniska pleśni na powierzchni chleba	po 7 dobach brak oznak pleśnienia na powierzchni chleba

n.w. nie wykryto

Tabela 37. Ocena mikrobiologiczna pieczywa z udziałem mąki o zawartości popiołu 2,3

Grupy drobnoustrojów	Próby pieczywa, Liczba komórek (j.t.k/ml)	
	chleb z 50% mąki jęczmiennej (30% w zakwasie)	chleb z 50% mąki jęczmiennej (40% w zakwasie)
LAB	1,2x 10 ²	2,0x10 ¹
ogólna liczba bakterii	1,4x10 ²	1,7x10 ²
bakterie przetrwalnikujace	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹
<i>Bacillus cereus</i>	1,3x 10 ¹	n.w.
<i>Bacillus subtilis</i>	n.w.	n.w.
bakterie śluzowe	n.w.	n.w.
drożdże	n.w.	n.w.
Pleśnie	n.w.	n.w.
bakterie z grupy coli	n.w.	n.w.
bakterie <i>Salmonella</i>	n.w.	n.w.
trwałość oceniana poprzez objawy pleśnienia	po 7 dobach brak oznak pleśnienia na powierzchni chleba	po 7 dobach brak oznak pleśnienia na powierzchni chleba

n.w. nie wykryto

6. 1. Ocena wartości odżywczej pieczywa

Otrzymane pieczywo oceniono pod względem wartości odżywczej. Określono poziom zawartości białka (metodą Kiejdahla), tłuszczu (metodą Soxhleta), popiołu (metodą

grawimetryczną), wody (w wagosuszarce) a także β -glukan metodą enzymatyczną przy użyciu spektrometru Beckman. Zbadano również zawartość błonnika metodą enzymatyczno-wagową, (metodą AOAC 991 43:1994), zawartość węglowodanów obliczona została jako pozostały składnik z różnicy:

$$ZWG = 100 - (ZW+ZP+ZB+ZT+ZB)$$

Gdzie odpowiednio:

ZWG – zawartość węglowodanów (g/100g)

ZW – zawartość wody (g/100g)

ZP – zawartość popiołu (g/100g)

ZB – zawartość białka (g/100g)

ZT – zawartość tłuszczu (g/100g)

ZB – zawartość błonnika (g/100g)

Do obliczeń wartości energetycznej pieczywa przyjęte zostały średnie współczynniki energetyczne Atwatera, które wynoszą odpowiednio: dla białka 4kcal/g, dla tłuszczów 9 kcal/g, dla węglowodanów 4kcal/g. Kaloryczność błonnika kiedyś określana jako 0 kcal obecnie przyjmowana jest jako 2 kcal. Obliczenia te wykonane zostały na podstawie metody opisanej w Dzienniku Ustaw 2007/137 poz. 967.

Wartość energetyczną pieczywa pszenno-jęczmiennego przedstawiono w tabeli **38**.

W tabeli umieszczono również zawartość β -glukanu, który nie był brany pod uwagę przy obliczeniu wartości odżywczej pieczywa.

Warto zaznaczyć, że biorąc pod uwagę dużą redukcję β -glukanu w zakwasie w stosunku do jego zawartości w mące, trudno jest uzyskać pieczywo o wysokiej zawartości β -glukanu nie stosując żadnych dodatków. W przeprowadzonych próbach wszystkie wypieki można uznać za produkty o podwyższonej zawartości β -glukanu.

Tabela 38. Składniki pokarmowe i wartość energetyczna pieczywa pszenno-jęczmiennego w przeliczeniu na 100g produktu

Próbka chleba	Zawartość składników w %							Wartość energetyczna na kcal/100g
	β -glukan	błonnik	białko	popiół	tłuszcz	woda	węglowodany z różnicy	
30 % m.j.	0,5	3,5	6,5	0,85	0,35	43	45,8	219,4
40 % m.j. (30% w	0,6	4	6,5	0,91	0,35	43	45,2	218,1

zakwasie)								
50% m.j. (30% w zakwasie)	0,7	6,0	6,6	1,3	0,16	44,8	31,2	204,3
50% m.j. (40% w zakwasie)	0,7	5,9	6,5	1,3	0,15	44	42,2	207,8

m.j.- mąka jęczmienna

Pieczywo pszenno-jęczmienne charakteryzowało się stosunkowo niską kalorycznością i wysoką zawartością błonnika pokarmowego a także β -glukanu. Zgodnie z Rozporządzeniem WE nr 1924/2006 może być opatrzone oświadczeniem, że zawiera podwyższoną zawartość tych składników w stosunku do pieczywa pszenne, ponieważ zawiera je w ilości co najmniej 30% większej w porównaniu do podobnego produktu. Jednak brakuje specjalnych przepisów odnoszących się bezpośrednio do określenia jakie produkty można określić jako źródło β -glukanu jęczmiennego.

W przypadku pieczywa zawierającego 50% mąki jęczmiennej razowej (30% w zakwasie) można użyć w oświadczeniu sformułowanie „wysoka zawartość błonnika pokarmowego”, a w przypadku pozostałych wypieków „źródło błonnika pokarmowego”.

Opracowanie instrukcji technologicznej otrzymywania ekologicznego pieczywa pszenno-jęczmiennego

Dokumentacja techniczno technologiczna chleba jęczmiennego ekologicznego

1. Receptura

A. Opis

Chleb jęczmienny ekologiczny produkowany jest z surowców rolnictwa ekologicznego, na kwasie jęczmiennym uzyskanym z zastosowaniem kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej, z dodatkiem drożdży, w bochenkach fermentujących w formach.

B. Receptura

1. mąka pszenna typ 550 ekologiczna - 70,00 kg
2. mąka jęczmienna całościarna ekologiczna - 30,00 kg
3. drożdże - 2,00 kg
4. sól - 1,70 kg
5. kultura starterowa - od 0,03 do 0,05 kg
6. do posypywania powierzchni
- płatki jęczmienne ekologiczne - do 0,50 kg

olej jadalny do smarowania form	- do 0,30 kg
C. Wydajność średnia przy masie jednostkowej bochenki fermentujące w formach	- 0,45 kg
(kg chleba ze 100 kg mąki)	- 135

D. Zalecenia technologiczne

1. Przed posypaniem powierzchni ukształtowanych kęsów ciasta należy posmarować ją kleikiem z płatków jęczmiennych, otrzymanym przez zalanie 1 części płatków 10 częściami gorącej wody, zamieszaniu i pozostawieniu na ok. 2 godziny.

E. Wymagania jakościowe - wg ZN

Wartość energetyczna kcal/100g (kJ/100 g) należy oznaczać po wypieku.

2. Wymagania dotyczące surowców

Surowce ekologiczne muszą posiadać aktualne certyfikaty zgodności z wymogami rolnictwa ekologicznego, wystawione przez jednostki certyfikujące, zatwierdzone w państwach UE.

Mąka pszenna ekologiczna do produkcji chleba jęczmiennego ekologicznego powinna charakteryzować się bardzo dobrą wartością wypiekową - wyższą niż mąka stosowana do produkcji zwykłego chleba pszennego. Wynika to z konieczności zrównoważenia ujemnego wpływu na ciasto mąki jęczmiennej, która obniża sprężystość i zwiększa plastyczność ciasta.

3. Proces technologiczny

Na każdym etapie procesu technologicznego począwszy od przyjmowania surowców po dostarczanie gotowych wyrobów do sprzedaży detalicznej należy zapobiegać zmieszaniu surowców i produktów ekologicznych z konwencjonalnymi. Szczególnej staranności w tym względzie należy dołożyć w przypadku równoległej produkcji wyrobów konwencjonalnych i ekologicznych. Produkcja taka powinna być rozdzielona w przestrzeni (osobne budynki lub linie technologiczne) lub czasie (produkcja wyrobów ekologicznych i konwencjonalnych powinna być prowadzona w inne dni). W przypadku wykorzystania tej samej linii produkcyjnej do dwóch rodzajów produkcji, przed produkcją wyrobów ekologicznych urządzenia muszą być dokładnie oczyszczone i fakt ten musi być odnotowywany w dokumentacji.

3.1. Wytwarzanie ciasta

Wytwarzanie ciasta odbywa się metodą dwufazową kwas-ciasto. Schemat technologiczny przedstawiono w tabeli 1.

Zakwas przygotowany jest z mąki jęczmienny w ilości przewidzianej recepturą, z dodatkiem, do zapoczątkowania fermentacji, kultury starterowej bakterii fermentacji

mlekowej K1 w ilości 0,1% w stosunku do mąki użytej do sporządzenia kwasu. Fermentacja kwasu prowadzona jest przez 24 godziny w temperaturze 30°C.

Ciasto przygotowywane jest z dojrzałego zakwasu, do którego dodawane są pozostałe składniki przewidziane recepturą i woda. Drożdże powinny być dodawane po rozplawieniu w wodzie a sól w postaci wodnego roztworu. Wydajność ciasta z 30% udziałem całościarnowej mąki jęczmienny jest o ok. 1,5% wyższa niż ciasta uzyskanego z samej mąki pszennej typ 550.

Ciasto powinno być mieszane do uzyskania optymalnego rozwoju. Temperatura ciasta po mieszeniu powinna wynosić ok. 28°C. Fermentacja ciasta w masie prowadzona jest przez 30 min.

Tabela 31. Schemat fermentacji ciasta na chleb jęczmienny ekologiczny

Nazwa fazy fermentacji	Faza poprzednia	Mąka pszenna ekologiczna	Mąka jęczmienna całościarnowa	Starter fermentacji	Woda	Drożdże	Sól	Masa ogółem	Temperatura fermentacji	Czas fermentacji
	kg	kg	kg	g	l	kg	kg	kg	°C	godziny
zakwas	-	-	30	30-50	30	-	-	60,03	30	24
Ciasto	60,03	70	-	-	ok. 38	2	1,7	ok. 171,73	28-30	30 min

3.2. Dzielenie ciasta i fermentacja kęsów

Dojrzałe ciasto dzieli się za pomocą dzielarki na kęsy o masie zwiększonej o wielkość upieku (ok. 13%) w stosunku do masy gotowego wyrobu. Kęsy z dzielarki mogą być

podawane bezpośrednio do forem. Powierzchnię kęsów ciasta należy posmarować kleikiem z płatków jęczmiennych i posypać płatkami jęczmiennymi. Kleik do smarowania powierzchni kęsów otrzymuje się poprzez zalanie 1 części płatków 10 częściami gorącej wody, zamieszaniu i pozostawieniu na ok. 2 godziny.

Kęsy ciasta poddaje się fermentacji końcowej w komorze fermentacyjnej o temperaturze ok. 35°C i wilgotności względnej powietrza 75%.

3.3. Wypiek

Wypiek prowadzi się sposobem tradycyjnym dwustopniowym - zapiekanie w temperaturze wyższej, dopiekanie w temperaturze niższej, z zastosowaniem parametrów uzależnionych od typu pieca, w czasie pozwalającym na uzyskanie upieku na poziomie ok.13%.

4. Znakowanie, pakowanie, przechowywanie i transport

Pakowanie

Bochenki przeznaczone do pakowania należy wystudzić i zapakować - ręcznie lub za pomocą pakowarek.

Znakowanie

Znakowanie musi być zgodne z ogólnymi wymogami dotyczącymi znakowania produktów spożywczych a także wymogami dotyczącymi produktów ekologicznych.

Obowiązkowe oznaczenia wyrobów paczkowanych związane z ekologicznymi metodami produkcji:

- nazwa produktu z odniesieniem do jego ekologiczności,
- nazwa producenta,
- logo UE,
- miejsce produkcji surowców rolniczych (w tym samym polu widzenia co logo),
- nr kodowy organu kontroli lub jednostki certyfikującej,
- wskazanie składników ekologicznych w składzie surowcowym.

Projekty etykiet produktów ekologicznych powinny być zatwierdzone przez jednostkę certyfikującą.

W przypadku produkcji w zakładzie równoległe wyrobów ekologicznych i konwencjonalnych, ich etykiety powinny wyraźnie różnić się od siebie.

Przykład oznakowania składu surowcowego na etykiecie:

Składniki: mąka pszenna typ 550 ekologiczna*, woda, mąka jęczmienna całościarna ekologiczna* (22%), drożdże, sól, płatki jęczmienne ekologiczne*, kultura starterowa, olej.

* 99,7% składników rolniczych pochodzi z rolnictwa ekologicznego

rolnictwo UE (ewentualnie: rolnictwo polskie)

Przechowywanie i transport

Wyroby gotowe ekologiczne i konwencjonalne mogą być przechowywane w tych samych obiektach i transportowane w tych samych jednostkach transportowych pod warunkiem ich fizycznego rozdzielenia i właściwego oznakowania.

W transporcie do produktów musi być dołączona dokumentacja z odniesieniem do statusu produktu (czy ekologiczny), z informacją dotyczącą jednostki certyfikującej, danych producenta.

5. Okres minimalnej trwałości

Okres minimalnej trwałości chleba jęczmiennego ekologicznego pakowanego wynosi 3 dni.

Okres ten może być zmieniony na podstawie badań przechowalniczych chleba jęczmiennego ekologicznego wyprodukowanego w danej piekarni.

6. Dokumenty związane

Rozporządzenie (WE) Nr 834/2007 z późniejszymi zmianami.

Rozporządzenie (WE) Nr 889/2008 z późniejszymi zmianami.

Ustawa z dnia 25 czerwca 2009 r. o rolnictwie ekologicznym

Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 marca 2010 r. w sprawie niektórych warunków produkcji ekologicznej

Podsumowanie

Opracowano funkcjonalne kultury starterowe, które wykorzystano w celu otrzymania ekologicznego pieczywa pszenno-jęczmiennego o wysokiej zawartości mąki jęczmiennej, wyróżniającego się specyficznym smakiem i zapachem, wysoką wartością żywieniową charakteryzującego się przedłużoną trwałością, a także bezpieczeństwem zdrowotnym.

Dobór bakterii fermentacji mlekowej do kultur starterowych przeprowadzano w kilku etapach obejmujących ich izolację ze spontanicznie fermentujących zakwasów z mąki jęczmiennej, charakterystykę pod względem właściwości biotechnologicznych (zdolność do syntezy kwasu mlekowego i innych metabolitów, zdolność do hamowania rozwoju pleśni w zakwasach). Oceniono właściwości fizyko-chemiczne zakwasów otrzymanych z udziałem monokultur nowo wyizolowanych szczepów. Wyizolowane LAB należały do rodzaju *Pediococcus* i *Weissella*. Spośród bakterii należących do tego samego gatunku: *Pediococcus acidilactici* (2 szczepy), *Weissella cibaria* (3 szczepy), *Pediococcus pentosaceus* (3 szczepy) poszczególne izolaty różniły się pod względem profili fermentacyjnych. Bakterie fermentacji mlekowej charakteryzowały się umiarkowaną, jednak wystarczającą do zakwaszenia

środoiska ciasta na właściwym poziomie, zdolnością do syntezy kwasu mlekowego. Kwas octowy w stosunku do kwasu mlekowego w zakwasach pozostawał w proporcji nie większej niż 1:10. Wyizolowane LAB charakteryzowały się zdolnością do syntezy związków wpływających korzystnie na smak i zapach pieczywa. Na podstawie cech, wpływających na przydatność szczepów LAB do prowadzenia fermentacji zakwasów, opracowano skład trzech kultur starterowych zawierających odpowiednio siedem, trzy i dwa spośród badanych szczepów bakterii. Wszystkie kultury nadawały właściwy przebiegu fermentacji zakwasów jęczmiennych i ciasta oraz nadawały się do wyprowadzenia zakwasu z zastosowaniem odświeżania. Ostatecznie do badań w piekarniach wybrano kulturę zawierającą dwa szczepy ze względu na to, że pieczywo otrzymane z jej udziałem ocenione zostało jako najlepsze pod względem walorów smakowo-zapachowych. Korzystne jest także ograniczenie liczbowego składu szczepów wchodzących w skład kultury ze względu na łatwość jej przygotowania. Kulturę starterową zastosowano w dwóch piekarniach ekologicznych do otrzymania pieczywa pszenno-jęczmiennego o zawartości mąki jęczmiennej 30,40 i 50%, z czego do 40% mąki wprowadzano w postaci zakwasu. Ze względu na ekologiczny charakter produktu w wypiekach nie stosowano żadnych dodatków np. glutenu witalnego lub naturalnych emulgatorów.

Otrzymane pieczywo pszenno-jęczmienne charakteryzowało się wyraźnym charakterystycznym aromatem słodowo-kwaskowym. Pieczywo z 30% dodatkiem mąki jęczmiennej wprowadzonej w postaci zakwasu oceniono jako należące do I klasy. Wprowadzenie do receptury dodatku jeszcze 10% mąki jęczmiennej (do zawartości ogółem 40%) wpłynęło na niewielkie obniżenie jakości pieczywa spowodowane przede wszystkim wzrostem twardości miększu. Dalsze zwiększenie udziału mąki jęczmiennej a także zastosowanie mąki o zawartości błonnika pokarmowego 22% spowodowało zwiększenie kwasowości pieczywa i negatywnie wpłynęło na jego twardość, która była główną przyczyną ograniczenia trwałości pieczywa. Wszystkie wypieki charakteryzowały się natomiast bardzo dobrą jakością mikrobiologiczną, oznaki pleśnienia pojawiały się najwcześniej po 6 dniach. Zastosowanie mąki jęczmiennej całościowej, w tym o zawartości błonnika 22% umożliwiło uzyskanie pieczywa ekologicznego pszenno-jęczmiennego o stosunkowo niskiej kaloryczności i wysokiej zawartości błonnika pokarmowego a także β -glukanu, a więc charakteryzującego się „gęstością odżywczą”. Zgodnie z Rozporządzeniem WE nr 1924/2006 może być opatrzone oświadczeniem, że zawiera podwyższoną zawartość tych składników w stosunku do pieczywa pszennego, ponieważ zawiera je w ilości co najmniej 30% większej w porównaniu do podobnego produktu.

W przypadku pieczywa zawierającego 50% mąki jęczmiennej razowej (30% w zakwasie) można użyć w oświadczeniu sformułowania „produkt jest bogaty w błonnik pokarmowy”.

6. Piśmiennictwo:

1. Arent E. Ryan L. Dal Bello F.; (2007), Impact of sourdough on texture of bread. *Food Microbiology*. 24,165-174
2. Corsetti A, Gobbetti M, De Marco B, Balestrieri F, Paoletti F, Russi L, Rossi J.: (2000), Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *J. Agric Food Chem.*, 48(7), 3044-51.
3. Czerwińska D. (2010), Mąki niechlebowe i ich zastosowanie. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 5, 4-5
4. Goesaert H., Brijs K., Veraverbeke W., Courin C., Gebruers K., Delcour J: (2005), Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Food Trends in Science and Technology*, 16 (1-3), 12-30
5. Karolini –Szkardzińska Z., Subda H., Czubaszek A.: (2006) Wpływ dodatku mąki jęczmiennej na właściwości ciasta i pieczywa uzyskiwanego z mąki pszenic jarych i ozimych. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2 (47), 124-132
6. Katina K: (2005), Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread, academic dissertation, VTT Helsinki, Finland
7. Katina K., Arendt E., Liukkonen K., Autio K., Flander L., Poutanen K (2005): Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science and Technology*, , vol 16, iss.1-3,104-112
8. Kawka A. Rausch P., Świerczyński J.: (2007) Możliwość stosowania kultur starterowych do produkcji pieczywa pszenno-jęczmiennego. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*. 6,(55), 219-233
9. Kawka A.: (2010) Współczesne trendy w produkcji piekarskiej –wykorzystanie owsa i jęczmienia jako zbóż niechlebowych. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*.3 970), 25-43
10. Kawka A., Górecka D.: (2010) Porównanie składu chemicznego pieczywa pszenno-owsianego i pszenno-jęczmiennego z udziałem zakwasów fermentowanych z udziałem zakwasów fermentowanych starterem LV2. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*.3

970), 44-55

11. Marklinder I., Johansson (1996): Influence of lactic acid bacteria on technological, nutritional and sensory properties of barley sour doughbread. *Food Quality Pref.*, 7, 285-292
12. Marklinder I., Johansson L., Haglund A., Nagel- Held B., Seibel W.: (1996), Effects of flours from different barley varieties on barley sour dough bread. *Food Quality and Preference*, 7, 275-284
13. Meroni A., Dal Bello F., Arendt E.: (2009) Sourdough in gluten –free bread making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiology*, 26, 676-684
14. Miśniakiewicz M.: (2010) Wpływ procesu fermentacji na poziom zanieczyszczeń ciasta chlebowego. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*.6 (73),67-82
15. Piasecka-Jóźwiak K., Chabłowska B., Słowik E., Rozmierska J., Stecka K.M.: (2006), Zastosowanie kultur starterowych (wyselekcjonowanych szczepów bakterii mlekowych do poprawy jakości pieczywa mieszanego i żytniego. *Żywność, Nauka, Techno. Jakość.*, (13), Suplement 1 (46), 100-113.
16. Piesiewicz H. (2009), Aspekty technologiczne produkcji pieczywa na naturalnych zakwasach. *Przegląd piekarski i Cukierniczy*. 4, 6-10
17. Piotrowska M., Żakowska Z.: (2005) The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strain. *Pol.J. microbiolo*.4 (54), 279-286
18. Poutanen K., Flander L., Katina K., (2009) Sourdough and cereal fermentation in nutritional perspective. *Food Microbiology* 26, 693-699
19. Staszewska E., Janik M.: (1999), Zastosowanie kultur starterowych w piekarstwie. *Przegląd. Piekarski i Cukierniczy*, 2, 6-9.
20. Stepaniak L.: Zakwasy do ciasta – mikrobiologia i biochemia. *Przemysł Spożywczy*, 2000, 3, 44-46.
21. Staszewska E., Piesiewicz H.: Tradycyjne wytwarzanie ciast żytnich i mieszanych (cz.I). *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, 2005, 11, 8-13
22. Waszkiewicz-Robak B., Świdorski F.: (2006) Beta glukany jako nowe, bioaktywne składniki żywności, *Materiały XXXVII Sesji Naukowej KNoŻ PAN*, Gdynia 26-27 września, 145.
23. Zannini E., Garofalo C. Aquilanti L., Santarelli S., Silvestri, Clementi F. (2009) Microbiological and technological characterization of sourdough destined for bread making with barley flour. *Food Microbiology*, 26, 744-753