



Zakład Technologii Fermentacji

Sprawozdanie merytoryczne

z zadania:

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



Warszawa listopad 2011

Warszawa, dnia 10.11.2011

pieczęć i adres jednostki

Minister Rolnictwa
i Rozwoju Wsi
ul. Wspólna 30

decyzja nr RRre-029-28-25/11(39)

00-930 Warszawa

Sprawozdanie merytoryczne

z zadania

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

zrealizowanego na podstawie § 10 ust. 1 pkt 2, ust. 6 i 10 rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 maja 2010r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. Nr 91, poz. 595 oraz Nr 259, poz. 1772).

I. 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

Kierownik /koordynator:

dr hab. Krystyna M. Stecka prof. IBPRS

IBRPS - Zakład Technologii Fermentacji

tel: 22 606 36 49, 22 849 04 25

e-mail: krystyna.steck@ibprs.pl

Spis autorów:

mgr inż. Joanna Rozmierska

mgr Beata Chabłowska

mgr inż. Elżbieta Słowik

dr inż. Katarzyna Piasecka Józwiak

mgr inż. Monika Kliszc

mgr Michał Świątek

mgr Emila Szkudzińska-Rzeszowiak

II. Miejsce realizacji zadania badawczego

Piekarnie produkujące pieczywo ekologiczne:

Bio-Piekarnia Grzybów 1, 09-533 Słubice,

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

Piekarnia Słodka Ryszard Piasecki, 87-100 Toruń

i Zakład Technologii Fermentacji IBPRS,

III. Główne zadania wykonane przez Zakład Technologii Fermentacji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w 2011 roku.

1. Określenie jakości mikrobiologicznej surowców ekologicznych tj. mąki owsianej i pszennej z certyfikatem surowców Eko-rolniczych, w porównaniu do surowców konwencjonalnych.
2. Izolacja i identyfikacja bakterii fermentacji mlekowej i drożdży z mąki ekologicznej owsianej.
3. Selekcja bakterii mlekowych, pod względem cech biotechnologicznych i aktywności antymikrobiologicznej.
4. Dobór wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej do opracowania składu kultur starterowych, do otrzymywania pieczywa pszenno-owsianego.
5. Ocena wpływu nowo wyselekcjonowanych bakterii na jakość mikrobiologiczną i technologiczną zakwasów owsianych i pieczywa ekologicznego pszenno-owsianego.
6. Przygotowanie (receptury) metody otrzymywania pieczywa pszenno-owsianego z zastosowaniem wybranych kultur bakteryjnych i sprawdzenie jej w trzech piekarniach ekologicznych.
7. Badanie /określenie trwałości pieczywa.
8. Opracowanie instrukcji technologicznej dla piekarni.

IV. SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

1. WSTĘP

Postęp techniczny i technologiczny spowodował zmianę nawyków żywieniowych społeczeństw krajów uprzemysłowionych. Dieta przeciętnego mieszkańca USA i Europy charakteryzuje się nadmierną podażą energii, jest bogata w oczyszczone przetwory zbożowe i wysoko przetworzone produkty mięsne. Przyczynia się to do zaburzeń metabolicznych i rozwoju chorób tzw. cywilizacyjnych takich jak: cukrzyca insulinozależna, choroba niedokrwienna, zawał serca. W wyniku prowadzonej kampanii informacyjnej konsumenci na całym świecie zaczynają poszukiwać zdrowych naturalnych produktów spożywczych. Ważna jest dla nich nie tylko cena produktu, ale również jego cechy organoleptyczne, zdrowotne oraz dietetyczne, widoczna jest tendencja powrotu do tradycyjnych metod otrzymywania żywności. Duży nacisk kładzie się na ograniczenie stosowania dodatków do żywności, coraz więcej zwolenników zyskuje ekologiczne rolnictwo i ekologiczne metody produkcji żywności. Ważne miejsce w tym nurcie zajmuje pieczywo ekologiczne, produkowane na naturalnych kwasach piekarskich, bez dodatków technologicznych. W Zakładzie Technologii Fermentacji IBPRS od kilku lat prowadzone są badania nad szerokim zastosowaniem bakterii fermentacji mlekowej w produkcji żywności o walorach prozdrowotnych, funkcjonalnej, przeciwdziałającej otyłości i chorobom układu krążenia. Jednym z kierunków badawczych jest opracowywanie kultur starterowych do różnego rodzaju pieczywa.

Powszechnie spożywane pieczywo wykorzystuje się jako produkt, któremu nadaje się cechy żywności funkcjonalnej poprzez wzbogacanie w dodatki prozdrowotne. Grupą dodatków prozdrowotnych o udokumentowanym korzystnym wpływie na zdrowie są produkty owsiane, zawierające duże ilości beta-glukanów. Beta-glukany to długołańcuchowe polisacharydy zbudowane z cząsteczek glukozy połączonej wiązaniami w układzie beta-1-3; beta-1-4 i/lub beta-1-6. Zaliczane są do niestrawnych wielocukrów i uważane za komponenty włókna pokarmowego. (Thammahiti S., 2004; Waszkiewicz-Robak B., Świdorski F. (2006)).

Udowodniono korzystny wpływ na zdrowie wywierany przez owsiany beta-glukan. Już pięć porcji dziennie produktów zawierających 3g beta glukanu powoduje 5% redukcję poziomu cholesterolu we krwi i zmniejsza ryzyko zawału serca (Bell S. i wsp., 1999). W USA, Szwecji i Wielkiej Brytanii wprowadzono przepisy zdrowotne dotyczące żywności zawierającej beta-glukan. De Grot i współpracownicy jako pierwsi zaobserwowali, że po wzbogaceniu diety w płatki owsiane stężenie cholesterolu całkowitego w osoczu krwi osób zdrowych ulegało zmniejszeniu (De Grot i wsp., 1963). Żywność zawierająca w swym składzie owies lub jego pochodne („oat food”) tj.: mąkę owsianą, płatki owsiane, otręby

owsiane korzystnie wpływa na zdrowie poprzez obniżanie poziomu cholesterolu we krwi, obniżanie stężenia glukozy po posiłkach, poprawienie funkcji trawiennych organizmu (Salmekahllo-Martilla M. i wsp., 2004). Hipocholestrolemiczny efekt obserwowany po wzbogaceniu dziennej racji pokarmowej w przetwory owsiane przypisuje się najczęściej zawartym w nich składnikom włókna pokarmowego, które są rozpuszczalne w wodzie tj.: beta-glukanom. Przetwory owsiane dodawane do żywności powodują ponadto obniżenie poposiłkowego stężenia glukozy i zmniejszenie indeksu glikemicznego produktu.

Owies, z racji swoich walorów prozdrowotnych i dietetycznych, powinien znajdować jak najszersze zastosowanie w produkcji żywności. Od wielu lat przemysł piekarski podejmuje więc liczne próby wykorzystania przetworów owsianych zarówno w roli surowca podstawowego, jak i dodatku do pieczywa (Flander i wsp., 2006).

Wykazano (McKechnie, 1983; Zhang i wsp., 1998), że dzięki dużej zawartości β -glukanów owies charakteryzuje się doskonałą i nader korzystną zdolnością zatrzymywania wilgoci, która przyczynia się do utrzymania świeżości pieczywa przez dłuższy czas, a liczne badania (Forssell i wsp., 1998; Zhang i wsp., 1998) potwierdzają, że dodatek owsa, skrobi lub lecytyny owsianej może znacznie wydłużyć termin przydatności pieczywa do spożycia. Z racji zwiększenia stopnia zatrzymania wody w miększu chleba, obserwuje się również znaczące obniżenie stopnia retrogradacji skrobi w przypadku pieczywa z zawartością min. 10% mąki owsianej. Głównym problemem, który utrudnia stosowanie mąki owsianej w roli podstawowego surowca w produkcji pieczywa jest obniżenie jakości wypieków postępujące w miarę zwiększania udziału owej mąki w cieście. Prawidłowość ta występuje, ponieważ białkom owsa (z racji niskiej zawartości prolaminy, gluteniny i gliadyny) brakuje wysokoplastycznych właściwości glutenu, które odpowiadają za elastyczną konsystencję ciasta pszenne, a tym samym umożliwiają zatrzymywanie w nim pęcherzyków gazu (Brümmer i wsp., 1988; Flander i wsp., 2006; Wolska i wsp., 2009).

W krajach Europy Zachodniej przyjęto, że określenie „pieczywo owsiane” przysługuje wypiekom o zawartości min. 20 g przetworów owsianych na 100 g mąki ogółem. W miarę zwiększania ilości produktów owsianych w cieście powyżej tego poziomu otrzymuje się wypieki, o coraz bardziej niekorzystnych cechach. Pieczywo takie charakteryzuje się znacznie zmniejszoną objętością i spoistością, dużą wilgocą oraz lepką i gumowatą konsystencją.

Niewielkie zmiany objętości wypieków, które występują przy dodatku do 15 g mąki owsianej na 100 g mąki ogółem mogą być kompensowane poprzez znaczne zwiększenie udziału wody w cieście (68-92 g/100 g mąki ogółem) (Gormley i Morrissey, 1993; Omah i Lefkovitch, 1998; Flander i wsp., 2006).

Flander i wsp. (2006) w swoich badaniach wykazali, że stosując jednocześnie dodatek glutenu i zwiększony udział wody w cieście można otrzymać dobrej jakości wypiek, który zawiera nawet 51 g mąki owsianej na 100 g mąki ogółem. Jednym z rozwiązań technologicznych wpływających na poprawę jakości chlebów owsianych, jest wprowadzenie mąki owsianej w formie ukwaszonej z zastosowaniem kultur starterowych, gdyż wyprowadzanie kwasu owsianego z mąki ekologicznej, z racji jej dużych zanieczyszczeń mikroflorą niepożądaną jest bardzo trudne i wieloetapowe.

Stosowanie zakwasów podczas wyrobu pieczywa jest jednym z najstarszych przykładów wykorzystywania procesów biotechnologicznych przez człowieka. Główną funkcją technologiczną zakwasu jest fermentacja mąki, co umożliwia odpowiednie spulchnienie ciasta. W konsekwencji otrzymywany jest wypiek o pożądanej objętości i strukturze miękiszu. Fermentacja zachodząca w zakwasach powoduje również modyfikację cech organoleptycznych pieczywa. Z racji coraz to większego zainteresowania konsumentów żywnością naturalną, produkowaną w sposób tradycyjny, technologie produkcji chleba na zakwasie przeżywają obecnie swój renesans.

Przyjmuje się, że oprócz redukcji pH, kluczowe znaczenie podczas ukwaszania mają zmiany biochemiczne zachodzące w węglowodanach i białkach mąki. Zmiany te warunkowane są aktywnością enzymów - zarówno tych syntetyzowanych przez mikroflorę, jak i tych naturalnie obecnych w mące, a uaktywniających się w kwaśnym środowisku (Arendt i wsp., 2007). Różnorodność mąk i różne kombinacje parametrów fizycznych prowadzenia procesu ukwaszania, warunkują kompleksowość tego procesu i wzajemnych interakcji pomiędzy mikroorganizmami.

Z powodu zwiększonej chłonności wody ciast kwaśnych względem ciast obojętnych wymagają one krótszego czasu mieszania i są mniej zwarte. Prawdopodobnie, zjawisko obniżonej stabilności ukwaszonego ciasta warunkowane jest przez częściowy rozpad białek glutenu. Stosowanie kwasów piekarskich w technologii otrzymywania pieczywa wpływa na obniżenie zawartości fitynianów i zwiększoną dostępność substancji mineralnych w gotowym chlebie, jego funkcja zdrowotna wynika również z niskiego indeksu glikemicznego.

Z racji trudności technologicznych w otrzymaniu dobrej jakości pieczywa o dużej zawartości mąki owsianej, cały czas poszukuje się nowych metod poprawy właściwości piekarniczych ciast pszenno-owsianych. Udowodniono (Bering i wsp., 2006), że fermentacja mlekowa przyczynia się do znacznej redukcji zawartości fitynianów owsianych, przez co następuje zwiększenie przyswajalności pokarmowej mikro i makroelementów (w szczególności żelaza). Wykazano także (Degutyte-Fomins i wsp., 2002), że procesy

fermentacyjne w zakwasach skutkują zwiększeniem rozpuszczalności β -glukanów i białek owsianych w wodzie, z jednoczesnym brakiem negatywnego wpływu na poziom zawartości tych związków. Następuje częściowa depolimeryzacja β -glukanów, która sprzyja poprawie właściwości reologicznych ciast poprzez obniżenie ich lepkości (Degutytte-Fomins i wsp., 2002; Bering i wsp., 2006; Flander i wsp., 2006).

Hüttner i wsp. (2010) dowiedli, że zastosowanie zakwasu w technologii wypieków owsianych intensyfikuje proces kleikowania i hydrolizy skrobi oraz wywiera bardzo korzystny wpływ na objętość uzyskanego pieczywa, strukturę jego miękkiszu i szybkość czerstwienia.

Mikroflora zakwasów piekarskich jest bardzo złożona. Praktycznie wszystkie drobnoustroje charakterystyczne dla mąki obecne są także w zakwasach i cieście, aczkolwiek w procesie odświeżania kwasów i fermentacji w kolejnych fazach następuje selektywne namnażanie jednych i hamowanie rozwoju innych gatunków. Dominującą grupą drobnoustrojów są LAB oraz drożdże. W dojrzałych zakwasach występuje przeciętnie od $1 \cdot 10^9$ do $3-5 \cdot 10^9$ j.t.k./g bakterii mlekowych oraz $1 \cdot 10^6$ do $5 \cdot 10^7$ j.t.k./g drożdży. Obecnie liczba gatunków LAB występujących w kwasach piekarskich szacowana jest na ponad 50 gatunków. Wśród nich ilościowo wyróżniają się przedstawiciele rodzaju *Lactobacillus*. Są to przede wszystkim gatunki takie jak: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus mindensis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus amylovorus* i *Lactobacillus sanfransiscensis*. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są bardzo często izolowane z różnorodnych kwasów piekarskich, ale tylko niektóre z nich występują w większości badanych ekosystemów. Pozostałe rodzaje bakterii mlekowych, do których należą m.in. *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella* i *Leuconostoc* występują w mniejszej liczbie (Cossigani Li wsp., 1996; De Vuyst L., Neysens P., 2005)

W technologii piekarskiej stosowane są od pewnego czasu kultury starterowe zawierające bakterie fermentacji mlekowej (LAB) lub LAB i drożdże. Stosowanie starterów w produkcji pieczywa przynosi korzyści technologiczne, ekonomiczno-organizacyjne, powoduje podniesienie jakości pieczywa oraz wnosi cechy prozdrowotne (Piesiewicz, 2005; Diowks, 2006). Znajdujące się na rynku startery piekarskie przeznaczone są głównie do pieczywa pszenne i pszenno-żytnie i złożone są ze szczepów bakterii tzw. „kolekcyjnych” nie selekcjonowanych z poszczególnych typów mąki.

Mimo obecności na rynku kilku rodzajów gotowych starterów celowym jest poszukiwanie nowych zestawów mikroorganizmów, pozwalających wzbogacić aromat i smak

pieczywa oraz urozmaicić jego asortyment. Zaletą stosowania kultur starterowych jest szybkie zapoczątkowanie fermentacji ciasta, nadanie jej właściwego przebiegu (Piasecka-Jóźwiak i wsp., 2006).

Ważną rolę w stabilizacji wieloskładnikowej populacji kultury starterowej odgrywają, wytwarzane przez bakterie mlekowe, substancje o charakterze bakteriocyn. Bakteriocyny oddziałują hamująco na rozwój bakterii o podobnych wymaganiach środowiskowych, współzawodniczących o zajęcie tej samej niszy ekologicznej. Substancje te wpływają na ograniczenie zakażeń występujących podczas fermentacji, nie zakłócając jednocześnie rozwoju czynnych w zakwasach chlebowych drożdży.

Przeciwdrobnoustrojowa aktywność bakterii mlekowych jest warunkowana przez syntezę i wydzielanie związków hamujących lub ograniczających wzrost innych mikroorganizmów, w tym również mikroflory stanowiącej typowe zakażenia zakwasów piekarskich. W grupie tych związków największe znaczenie mają kwasy organiczne (wśród których dominują kwasy mlekowy i octowy), bakteriocyny oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2). Istotne jest także wypieranie tlenu, które zapobiega rozwojowi pleśni i innych drobnoustrojów aerobowych. Możliwość eliminacji mikrobiologicznych zakażeń na drodze naturalnej fermentacji zakwasów, pozwala w znacznym stopniu ograniczyć, a nawet wyeliminować chemiczne dodatki konserwujące pieczywo (Diowks, 2006).

Ze względu na powszechność spożywania pieczywa jego rola jako źródła substancji/składników odżywczych jest nie do przecenienia, dlatego jakość pieczywa ma tak duże znaczenie. Istnieje pogląd, że ekologiczne rolnictwo i przetwórstwo pozostawia w produktach np. macę większą liczbę zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Zmniejszenie zagrożeń wynikających z zakażeń niepożądaną mikroflorą oraz zwiększenie biodostępności metali dzięki zastosowaniu kultur starterowych, a także duża zawartość błonnika pokarmowego w pieczywie owsianym są argumentami świadczącymi o potrzebie prac nad poprawą jego jakości. Istotne zagadnienie stanowi poprawa właściwości sensorycznych tego rodzaju pieczywa, ponieważ często pieczywo zawierające duży udział mąki ze zbóż bezglutenowych charakteryzuje się niską jakością miękiszu. Innowacyjność projektu polega nie tylko na wykorzystaniu cennego, stwarzającego problemy technologiczne surowca jakim jest ekologiczna mąka owsiana, ale przede wszystkim na zastosowaniu wyselekcjonowanych, unikalnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, jako kultur starterowych do otrzymywania ekologicznego pieczywa owsianego o podwyższonej wartości odżywczej.

2. Cel badań

Celem badań było opracowanie metody otrzymywania pieczywa o jak najwyższej zawartości ekologicznej mąki owsianej, z zastosowaniem specjalnie skomponowanych bakteryjnych kultur starterowych złożonych ze szczepów LAB o unikalnych właściwościach antybakteryjnych i technologicznych.

3. Zakres badań:

- Określenie jakości mikrobiologicznej surowca ekologicznego tj. mąki owsianej i pszennej z certyfikatem surowców Eko-rolniczych, w porównaniu do surowców konwencjonalnych. Oznaczanie w próbkach mąki liczby bakterii patogennych i niepożądanych w procesie produkcyjnym tj. *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, oraz liczby pleśni.
- Badania na wpływem jakości ekologicznej mąki owsianej, na mikroflorę zakwasów piekarskich, wybór materiału biologicznego (zakwasów) do izolacji bakterii.
- Izolację i identyfikację bakterii fermentacji mlekowej i drożdży z ekologicznego materiału biologicznego (zakwasów owsianych). Selekcję bakterii mlekowych, pod względem cech biotechnologicznych i aktywności antymikrobiologicznej (hamowania wzrostu bakterii patogennych i niepożądanych w procesie produkcyjnym oraz pleśni).
- Dobór wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej do opracowania składu kultur starterowych, do otrzymywania pieczywa. Zastosowanie wybranych kultur bakteryjnych do sporządzania owsianych zakwasów piekarskich, w wybranych do badań piekarniach ekologicznych.
- Ocenę wpływu nowo wyselekcjonowanych bakterii na jakość mikrobiologiczną i technologiczną zakwasów owsianych i pieczywa ekologicznego pszenno-owsianego.
- Przygotowanie (receptury) metody otrzymywania pieczywa pszenno-owsianego z zastosowaniem wybranych kultur bakteryjnych.
- Badanie /określenie trwałości pieczywa, jego przydatności do spożycia, czasu do pojawienia się oznak zepsucia mikrobiologicznego, (pobieranie próbek i wykonywanie analiz mikrobiologicznych, w celu oceny jakości mikrobiologicznej pieczywa).

- Opracowanie sprawozdania z wyników badań, opracowanie instrukcji technologicznej dla piekarni.

4. Metody badań

W trzech piekarniach ekologicznych przeprowadzone zostały próby wypieku chleba pszenno-owsianego na kwasie owsianym, wyprowadzonym z zastosowaniem wyselekcjonowanych uprzednio bakteryjnych kultur starterowych, o specyficznych właściwościach antymikrobiologicznych i technologicznych. Skład kultur starterowych do pieczywa owsianego opracowany został na podstawie cech biotechnologicznych bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kwasów piekarskich, sporządzonych z ekologicznej mąki owsianej. Surowcem głównym była ekologiczna mąka owsiana razowa (typ 2000) uzyskana z ziaren owsa nagoziarnistego, wyprodukowana przez firmę Wytwórnę makaronu "BIO" Aleksandra i Mieczysław Babalscy z Pokrzydowa – producenta ekologicznych mąk, kasz i makaronów. Wszystkie pozostałe surowce tj. mąka pszenna posiadały certyfikat ekologiczny.

W pierwszej fazie pracy materiał do badań stanowiła ekologiczna mąka owsiana oraz sporządzone z niej kwasy piekarskie. Charakterystykę mąki owsianej 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:

- Ocenę mikrobiologiczną mąki i „kwasów 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. Oznaczanie liczby bakterii przetrwalnikujących amylolitycznych

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; Oznaczanie liczby bakterii kwaszących przy użyciu agaru Smith-Lorenza z purpurą bromokrezolową

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

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

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

- Izolacja i identyfikacja LAB i drożdży

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. Izolację bakteryjnego DNA wykonano z użyciem zestawu GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit firmy Sigma-Aldrich (USA). Przynależność gatunkową wyizolowanych szczepów bakterii ustalono poprzez analizę sekwencji genu 16S rDNA. Do reakcji PCR użyto primer *forward 16SF* oraz primer *reverse 16SR*. Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler Personal (Eppendorf). Produkty amplifikacji poddawano oczyszczeniu zestawem GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) zgodnie z instrukcją producenta. Tak przygotowany materiał przekazywano do sekwencjonowania przy pomocy automatycznego sekwentora kapilarnego 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN. Odczytane sekwencje składano w kontigi przy pomocy programu BioEdit (Hall,1999), które następnie poddawano analizie porównawczej w bazie GenBank przy zastosowaniu algorytmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Przynależność gatunkową badanych szczepów ustalano na podstawie wyników wskazujących na co najmniej 97%-owy stopień identyczności analizowanych sekwencji z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank.

W celu zróżnicowania wewnątrzgatunkowego wyizolowanych szczepów przeprowadzono reakcję losowej amplifikacji polimorficznego DNA (ang. *random amplification of polymorphic DNA*, RAPD-PCR). Do reakcji PCR użyto jednego z trzech primerów: *M13*, *PRIMO2* lub *RP*. Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler Personal (Eppendorf).

Szczegółową identyfikację gatunkową przynależności blisko spokrewnionych szczepów przeprowadzono poprzez amplifikację fragmentu genu *recA* z udziałem primerów specyficznych gatunkowo *pREV* skojarzonym niezależnie z jednym z trzech następujących starterów: *planF*, *paraF* lub *pentF*. Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler Personal (Eppendorf).

Produkty reakcji RAPD-PCR oraz reakcji PCR ukierunkowanej na odcinek genu *recA* (po 5 µl każdej mieszaniny reakcyjnej) sprawdzano na 2 % żelu agarozowym (Sigma) w obecności wzorca masy DNA O'Range Ruler DNA Ladder (Fermentas). Wizualizacja DNA na żelu następowała dzięki obecności barwnika fluorescencyjnego GelRed (Biotium) dodanego do płynnego żelu (0,05 µl/ml). Elektroforezę prowadzono w 1x stężonym buforze TAE (Sigma). Zastosowano zasilacz EV243 firmy Consort.

- Ocena właściwości biotechnologicznych wyizolowanych LAB

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

Zdolność do syntezy kwasów mlekowego i octowego 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. Do oznaczania ilości, zsyntetyzowanego przez bakterie, kwasu octowego zastosowano test enzymatyczny firmy Boehringer- Mannheim.

Aktywność antybakteryjną badanych szczepów oceniono w odciekach po hodowlach prowadzonych w podłożu MRS w temperaturze 25 i 30 °C, przez 24 godziny. Do badań zastosowano zmodyfikowaną w ZF metodę Pilet, polegającą na pomiarze wielkości stref zahamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych przez stałą ilość (10 mikrolitrów) odcieku pochodzącego. Próbkę odcieku nanoszono na zestalone podłoże o konsystencji miękkiego agaru, uprzednio zaszczepione szczepem wskaźnikowym w ilości 10⁶ komórek/ml. Po 18-20 godzinach inkubacji odczytywano wyniki. Stosowano następujące szczepy wskaźnikowe: *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*

pochodzące z kolekcji IBPRS, Instytutu Weterynarii SGGW, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (PIWET) w Puławach.

Na podstawie uzyskanych wyników badań opracowano skład kultur starterowych. Kryterium wyboru LAB do kultur starterowych była ich aktywność antymikrobiologiczna, ilość syntetyzowanych kwasów organicznych i zdolność do wzrostu oraz ocena kwasu uzyskanego z zastosowaniem szczepu w monokulturze, szczególnie jego zapachu,.

Wykonano próby wypieku pieczywa w trzech piekarniach ekologicznych z zastosowaniem różnej zawartości mąki owsianej ukwaszonej (50%, 40%, 30%) z udziałem skomponowanej wcześniej kultury starterowej. Oceniono jakość pieczywa, łącznie z oceną sensoryczną po 24h od wypieku wg PN-A-74108,

5. Wyniki badań

5.1. Analiza mikrobiologiczna różnych typów mąk

Wykonano analizę mikrobiologiczną mąk ekologicznych i tradycyjnych wyniki przedstawiono w tabeli 1:

Tabela 1. Analiza mikrobiologiczna mąk

Mikroorganizmy:	Rodzaj mąki		
	owsiana ekologiczna [j.t.k./g]	pszenna ekologiczna [j.t.k./g]	pszenna tradycyjna [j.t.k./g]
liczba drobnoustrojów mezofilnych	$1,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
liczba drożdży	$3,0 \times 10^3$	nie wykryto	$3,0 \times 10^2$
liczba bakterii kwaszących	$5,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	nie wykryto
liczba pleśni	$1,2 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$
liczba bakterii śluzowych	nie wykryto	$8,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$
liczba bakterii przetrwalnikujących	nie wykryto	$2,0 \times 10^2$	nie wykryto
liczba bakterii proteolitycznych	nie wykryto	nie wykryto	nie wykryto
liczba bakterii z rodzaju <i>Enterobacteriaceae</i>	$2,4 \times 10^3$ z gr. coli	$1,0 \times 10^4$ z gr. coli	$1,0 \times 10^2$ z gr. coli

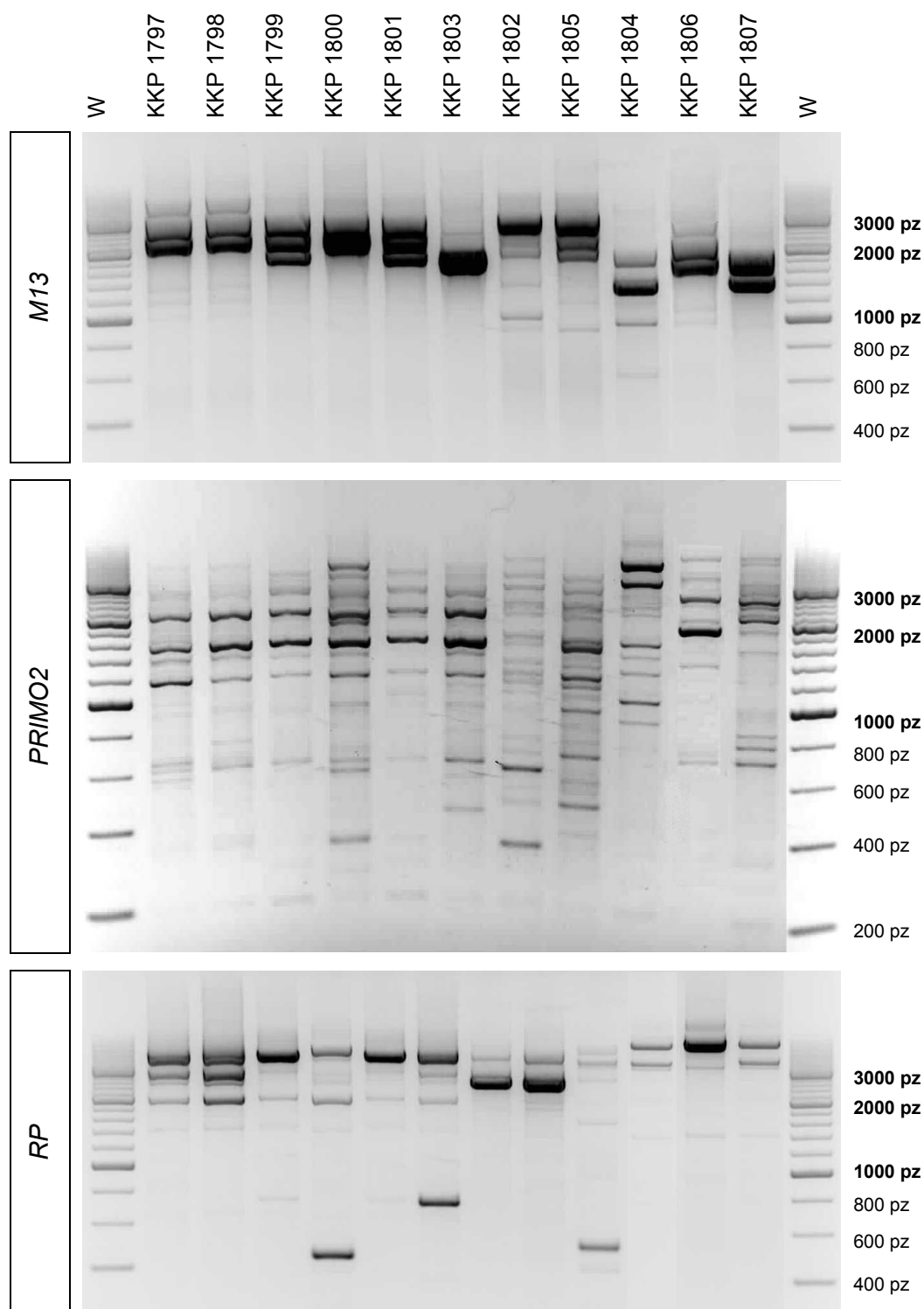
Nie wykonano analizy mąki owsianej tradycyjnej ze względu na jej brak na rynku. Na warszawskim rynku dostępna jest tylko jedną mąka owsiana, przy czym jest to mąka z certyfikatem ekologicznym. Wszystkie badane mąki zawierały zarodniki pleśni i bakterie z grupy *Enterobacteriaceae* na poziomie wyższym niż liczba bakterii fermentacji mlekowej, co świadczy o zasadności wprowadzania bakteryjnych kultur starterowych.

5.2. Izolacja i identyfikacja mikroflory technologicznej z zakwasów owsianych

Z ekologicznej mąki owsianej 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 przedstawiają tabele 2 i 3.

Tabela 2. Identyfikacja genetyczna (16S rDNA) wyizolowanych szczepów LAB.

Oznaczenie kolekcyjne szczepu	Identyfikacja metodą genetyczną (16S rDNA)
KKP 1797	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KKP 1798	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KKP 1799	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KKP 1800	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KKP 1801	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KKP 1802	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 1803	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KKP 1804	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 1805	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 1806	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 1807	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>



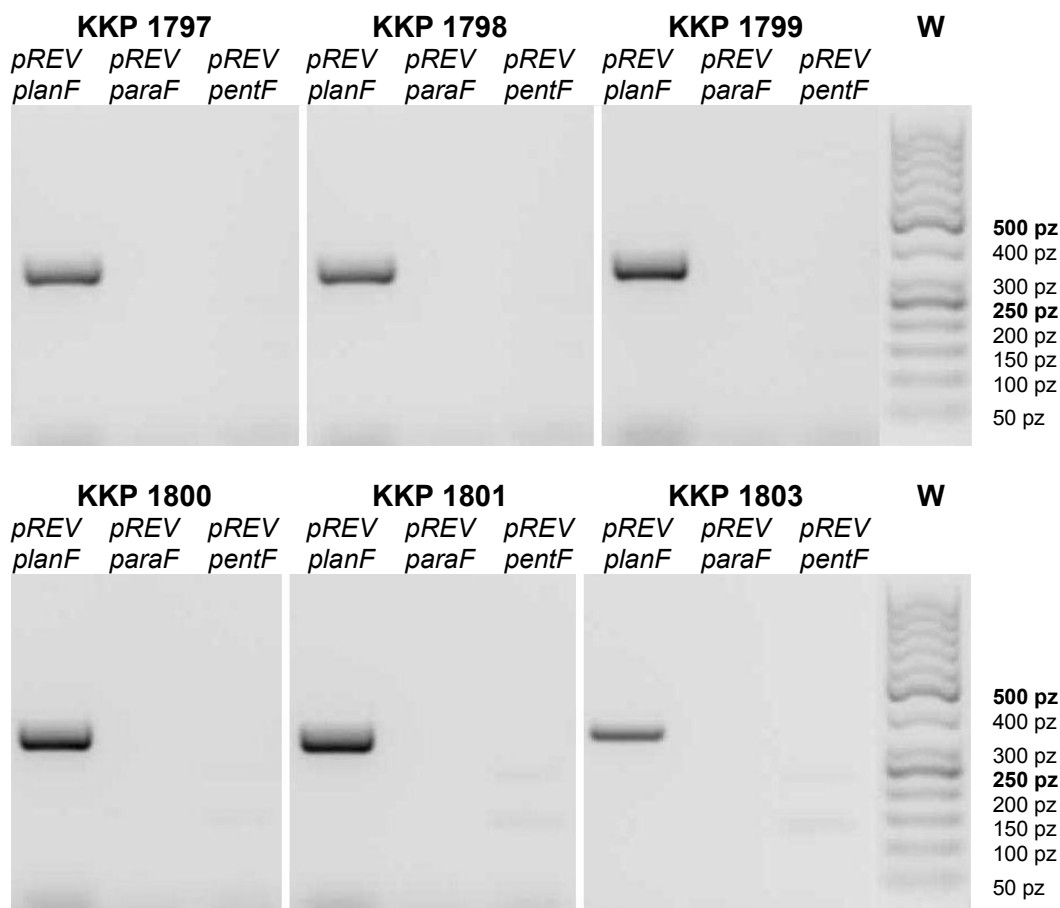
Fot. 1. Różnicowanie szczepów izolowanych z owsa metodą RAPD-PCR przy udziale primera *M13*, *PRIMO2* lub *RP*. W – wzorzec długości nici DNA.

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. Tak krótka sekwencja oraz dodatkowo zwiększone stężenie jonów magnezu w mieszaninie reakcyjnej sprzyjały częstszemu przyłączaniu się primerów do obu nici genomowego DNA i w konsekwencji powstawaniu od kilku do kilkunastu produktów amplifikacji o różnych długościach.

Elektroforeza produktów kolejnych reakcji RAPD-PCR wykazała dużą heterogenność wyizolowanych szczepów LAB. Na podstawie otrzymanych wzorów spośród wszystkich 11 izolatów bakterii wyodrębniono 9 różnych szczepów. Dwa szczepy (KKP 1799 i KKP 1801) dawały podobny układ prążków niezależnie od rodzaju primera, który uczestniczył w przeprowadzonych reakcjach. Szczepy KKP 1797 i KKP 1798 poddane reakcji z udziałem primera *M13* lub *RP* również wykazywały podobieństwo względem siebie; różnice w budowie genomu zostały udokumentowane dzięki zastosowaniu primera *PRIMO2*.

Należy jednocześnie podkreślić wysoki stopień pokrewieństwa filogenetycznego szczepów *L. plantarum* potwierdzony obecnością w większości tożsamyh produktów reakcji RAPD-PCR we wzorach dla każdego ze szczepów.



Fot. 2. Amplifikacja fragmentu genu *recA* szczepów izolowanych z owsa przeprowadzona z udziałem primerów *pREV/planF*, *pREV/paraF* lub *pREV/pentF*. W – wzorzec długości nici DNA.

W przypadku szczepów *L. plantarum* wyniki analizy porównawczej sekwencji genu 16S rDNA były niejednoznaczne i informowały o jednakowym podobieństwie badanych sekwencji do sekwencji 16S rDNA bakterii *L. paraplantarum* i *L. pentosaceus*. Bakterie *L. plantarum*, *L. paraplantarum* i *L. pentosaceus* wykazują bardzo wysoki stopień identyczności sekwencji genu kodującego 16S rRNA, co wynika z bliskiego pokrewieństwa tych gatunków. W celu doprecyzowania tożsamości taksonomicznej badanych izolatów wykonano specyficzną gatunkowo reakcję PCR ukierunkowaną na gen *recA* z udziałem primerów umożliwiających specyficzną amplifikację sekwencji charakterystycznych dla każdego z trzech wymienionych wyżej gatunków.

Przeprowadzone niezależnie reakcje PCR zakończyły się wydajną amplifikacją w mieszaninach reakcyjnych z primerami *pREV/planF* specyficznymi dla *L. plantarum*. W ten sposób otrzymano charakterystyczny produkt o długości ok. 350 pb w przypadku każdego badanego szczepu. W reakcjach z primerami *pREV/paraF* lub *pREV/pentF* nie

zaobserwowano żadnych produktów amplifikacji lub długość i mała intensywność prążków świadczyły o niespecyficzności produktu.

Najczęściej izolowanym z naturalnie fermentujących zakwasów owsianych gatunkiem bakterii kwasu mlekowego był *Lactobacillus plantarum*; wyizolowano także najwięcej szczepów tego gatunku. Duży odsetek wyizolowanych LAB stanowiły również bakterie z rodzaju *Pediococcus* (po dwa odmienne szczepy *P. acidilactici* – z zakwasów prowadzonych w temperaturze 37°C oraz *P. pentosaceus* – z zakwasów prowadzonych w temperaturze 30°C). Z pojedynczej linii komórkowej wyodrębniono ponadto jeden szczep *Leuconostoc mesenteroides* (z zakwasu prowadzonego w temperaturze 30 °C).

Tabela 3. Wyniki identyfikacji biochemicznej (API). Szczepy drożdży wyizolowane z naturalnie fermentujących zakwasów owsianych.

Przyjęte oznaczenie kolekcyjne szczepu	Biochemiczna metoda identyfikacji szczepów (API)
ZF01	<i>Candida crusei</i>
ZF02	<i>Candida glabrata</i>

Z naturalnie fermentujących zakwasów owsianych wyizolowano dwa gatunki drożdży z rodzaju *Candida* (po jednym szczepie z każdego). Oba wyizolowane szczepy drożdży, z racji swoich cech metabolicznych (brak fermentacji maltozy), nie są przydatne w piekarstwie.

5.3. Selekcja bakterii mlekowych, pod względem cech biotechnologicznych i aktywności antymikrobiologicznej

Przeprowadzono ocenę wzrostu wyizolowanych szczepów LAB w bulionie płynnym MRS podczas hodowli w temperaturach: 25, 30 i 37 °C. Czas prowadzenia hodowli wynosił 24 h. Wyniki przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Wzrost wyizolowanych szczepów LAB w hodowli prowadzonej przez 24 h w podłożu MRS w temperaturach: 25, 30, 37 °C.

Szczep	Wzrost [j.t.k/ml]		
	25 °C	30 °C	37 °C
KKP 1797	$5,7 \times 10^9$	$6,7 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
KKP 1798	$3,2 \times 10^9$	$6,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$
KKP 1799	$3,7 \times 10^9$	$5,7 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
KKP 1800	$6,3 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$	15×10^9
KKP 1801	$5,2 \times 10^9$	$5,4 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$
KKP 1802	$3,2 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$
KKP 1803	$2,2 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
KKP 1804	$2,9 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
KKP 1805	$2,8 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$
KKP 1806	$5,2 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
KKP 1807	$4,3 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$

Wszystkie badane szczepy, z wyjątkiem szczepu KKP1800 charakteryzowały się wzrostem na poziomie 10^9 j.t.k./ml we wszystkich trzech temperaturach prowadzenia hodowli. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia przyjęto, że temperaturą optymalną do prowadzenia wspólnej hodowli testowanych szczepów jest temperatura 30°C. Przeprowadzono oznaczenie ilości biosyntetyzowanego kwasu mlekowego po 24 h wzrostu w odciekach po hodowli w bulionie MRS, w optymalnej temperaturze hodowli (30 °C). Wyniki przedstawia tabela 5.

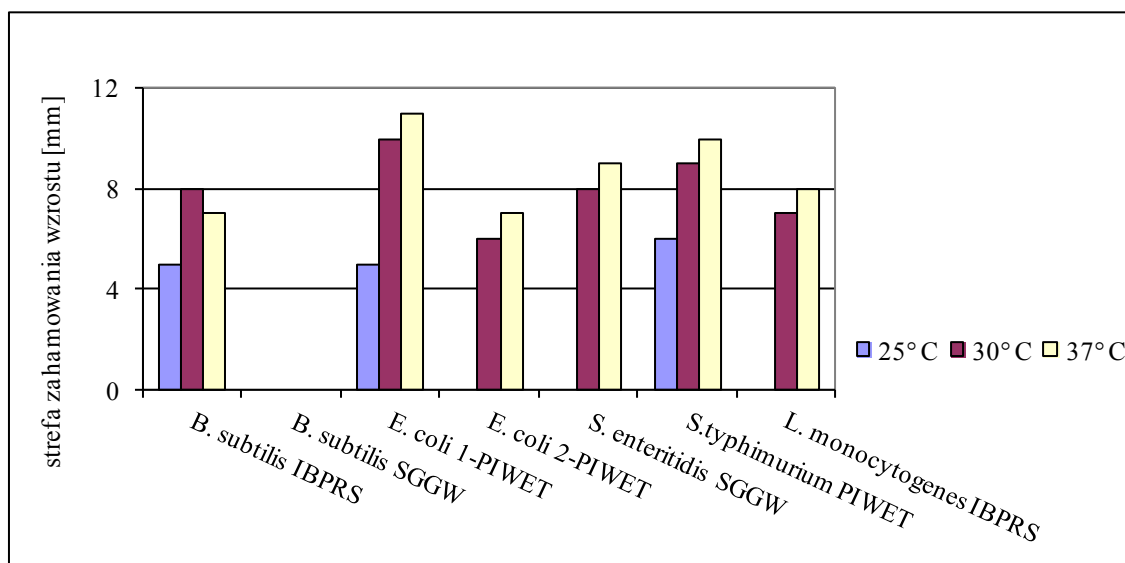
Tabela 5. Biosynteza kwasu mlekowego i octowego przez badane szczepy LAB w temperaturze 30 °C, po 24 h hodowli w podłożu MRS.

Nazwa i symbol szczepu	Ilość kwasu mlekowego g/l			kwas octowy, g/l
	Forma D-	Forma L+	Suma kwasu	
KKP 1797	6,9	7,5	14,4	0,23
KKP 1798	9,1	2,8	11,9	0,22
KKP 1799	9,0	2,2	11,2	0,18
KKP 1800	10,8	2,3	12,1	0,17
KKP 1801	13,2	2,5	15,7	0,14
KKP 1802	6,0	5,9	11,9	0,28
KKP 1803	10,1	3,0	13,1	0,26
KKP 1804	2,7	9,3	12,0	0,19
KKP 1805	4,0	7,3	11,3	0,14
KKP 1806	3,5	9,9	13,4	0,14
KKP 1807	5,4	0,0	5,4	5,5

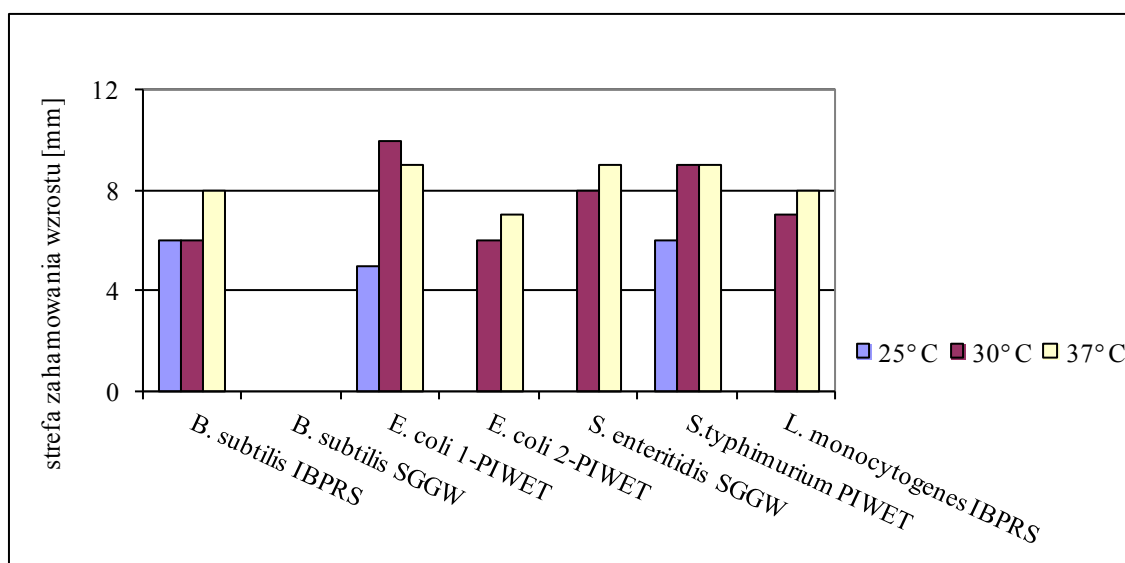
Największą ogólną ilością biosyntetyzowanego kwasu mlekowego charakteryzował się szczep KKP 1801, który syntetyzował jednocześnie najwięcej kwasu D-mlekowego. Biosynteza kwasu L-mlekowego najwydajniej przebiegała w przypadku szczepów: KKP 1804, KKP 1805 i KKP 1806. Szczep KKP 1807, który syntetyzował tylko kwas D-mlekowy, charakteryzował się również najmniejszą ogólną ilością biosyntetyzowanego kwasu mlekowego. Szczep KKP 1802 syntetyzował największą ilość kwasu octowego, w porównaniu z pozostałymi szczepami. Poziom średni syntezy kwasu octowego charakteryzował szczepy: KKP 1797, KKP 1798, KKP 1799, KKP 1800, KKP 1803 i KKP 1804. Szczepy: KKP 1801, KKP 1805 i KKP 1806 syntetyzowały kwas octowy w istotnie mniejszej ilości. Najmniejszą ilość kwasu octowego syntetyzował szczep KKP 1807.

Przeprowadzono ocenę aktywności antybakteryjnej wyizolowanych szczepów LAB. Do przeprowadzenia doświadczenia użyto odcieków pohodowlanych z hodowli w podłożu MRS w temperaturach: 37, 30 i 25 °C. Czas trwania hodowli wynosił 24 h.

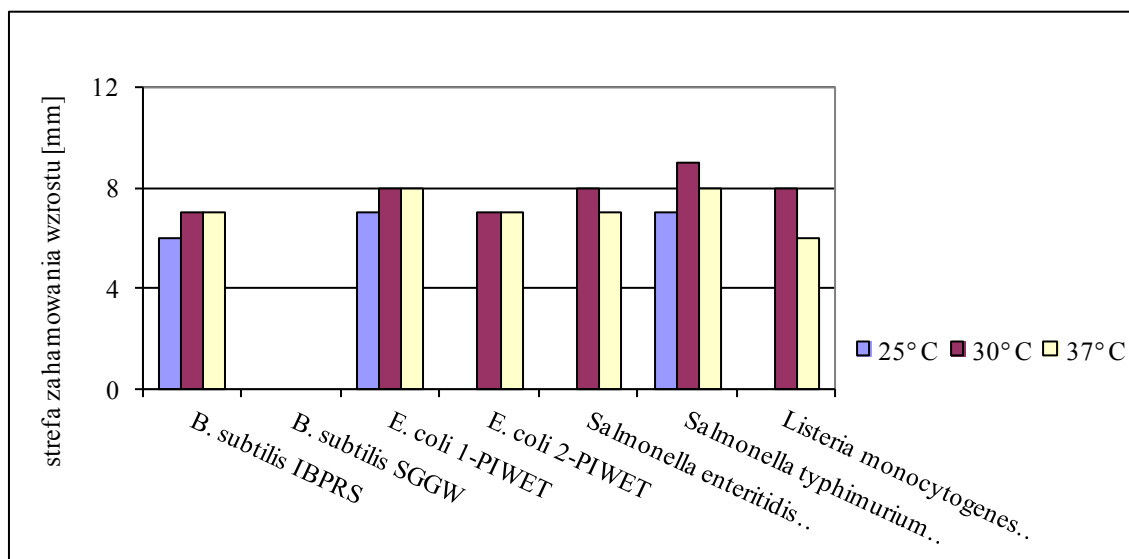
Wyniki oceny aktywności antybakteryjnej wyizolowanych szczepów LAB przedstawiono na wykresach 1-11.



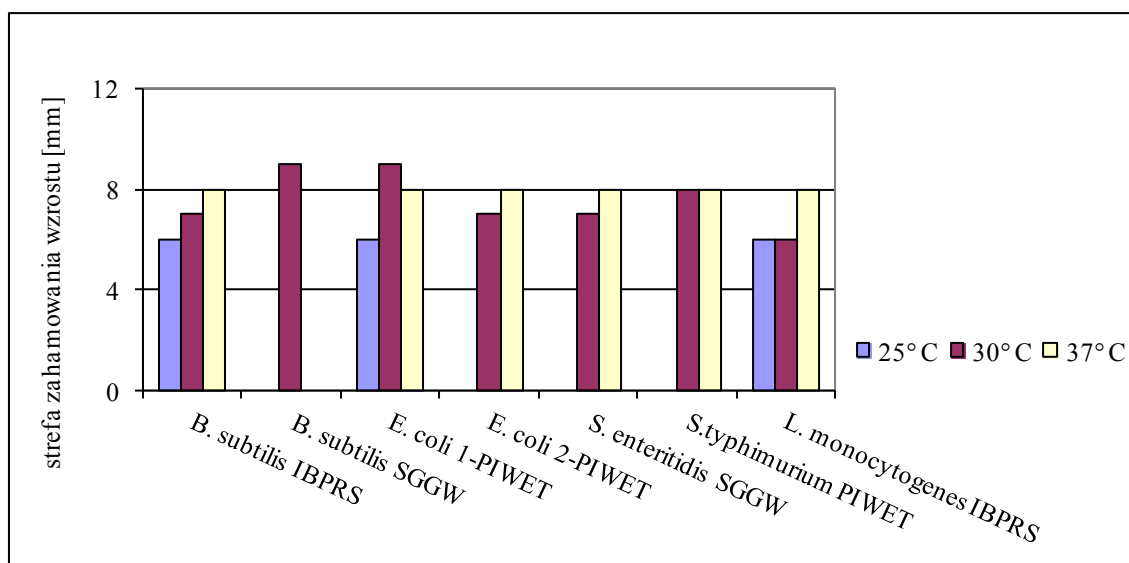
Wykres 1. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1797



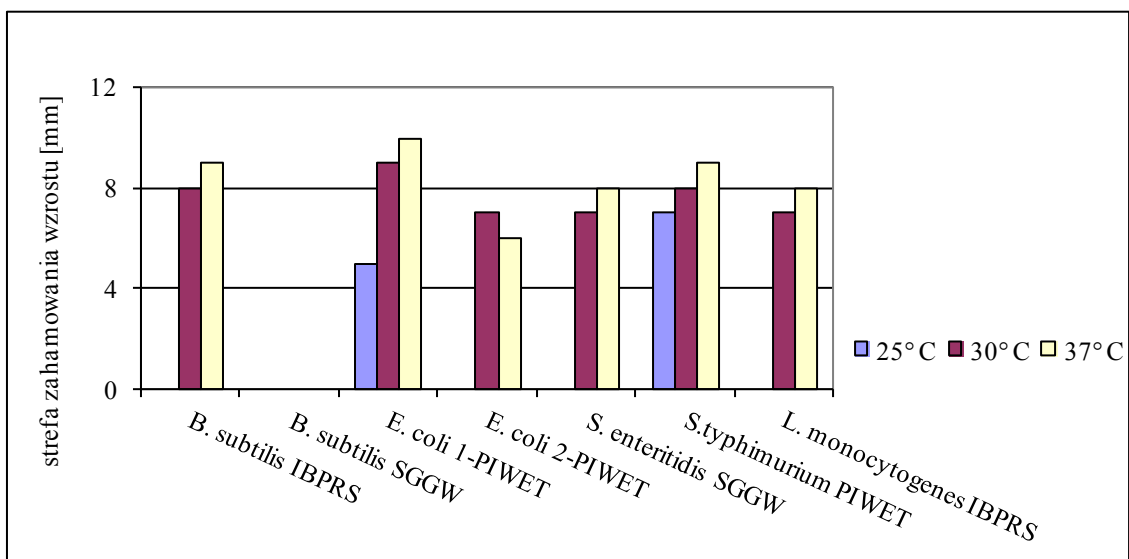
Wykres 2. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1798



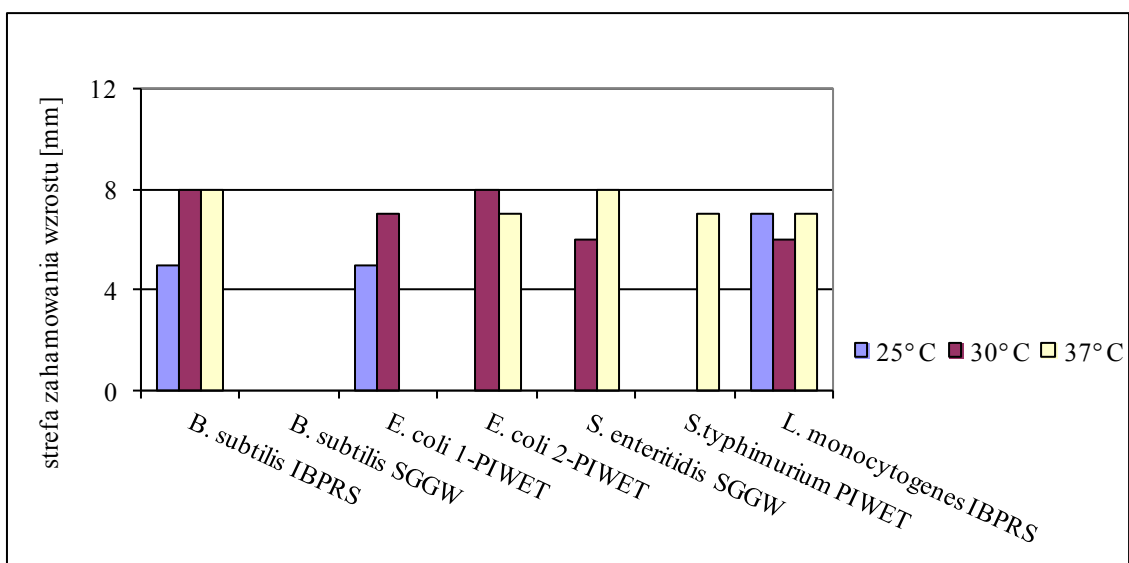
Wykres 3. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1799



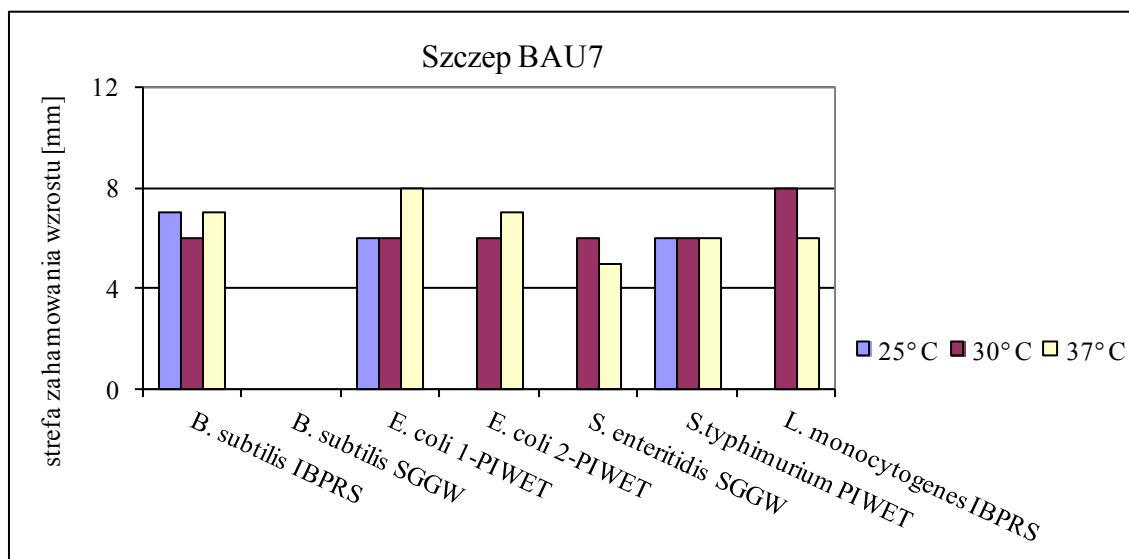
Wykres 4. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1800



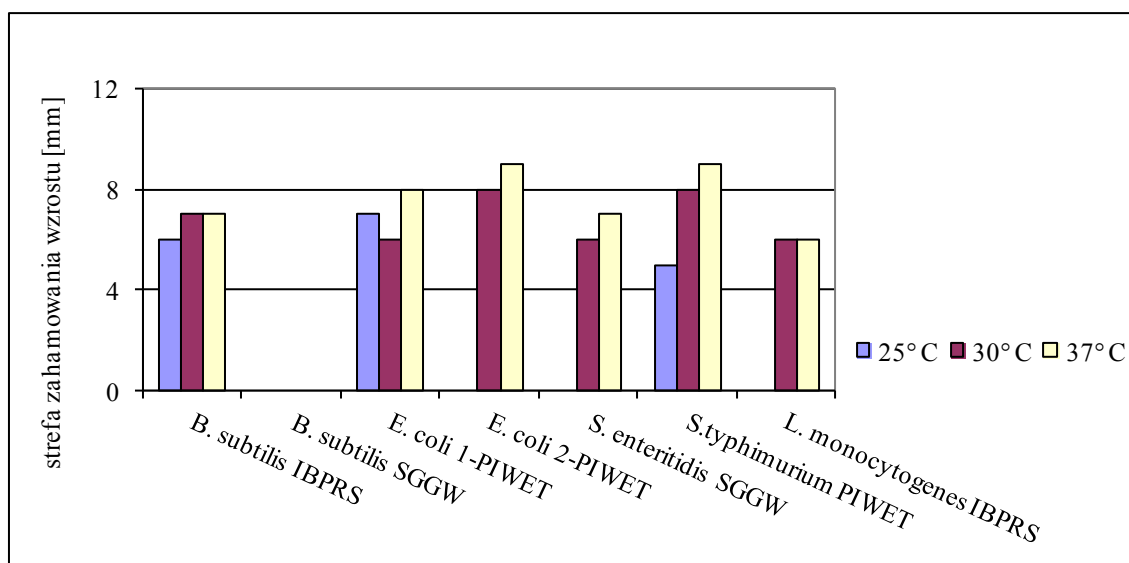
Wykres 5. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1801



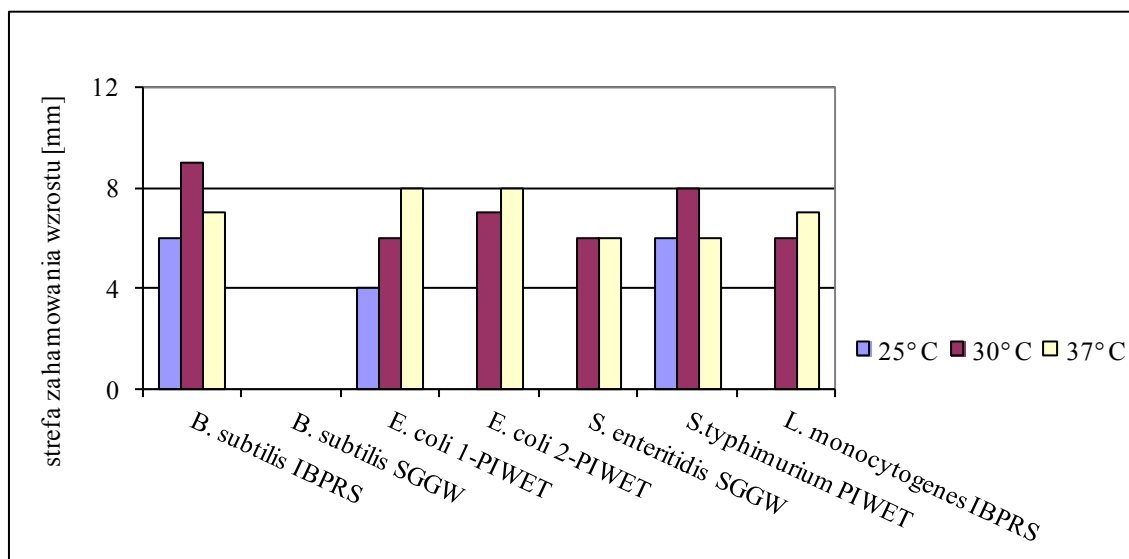
Wykres 6. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1802



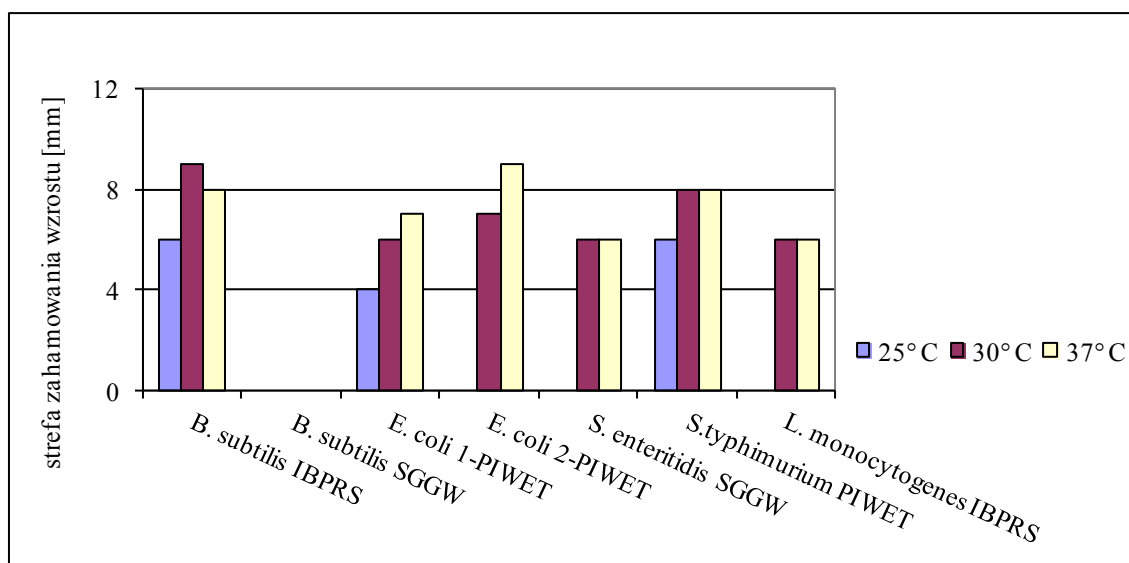
Wykres 7. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1803



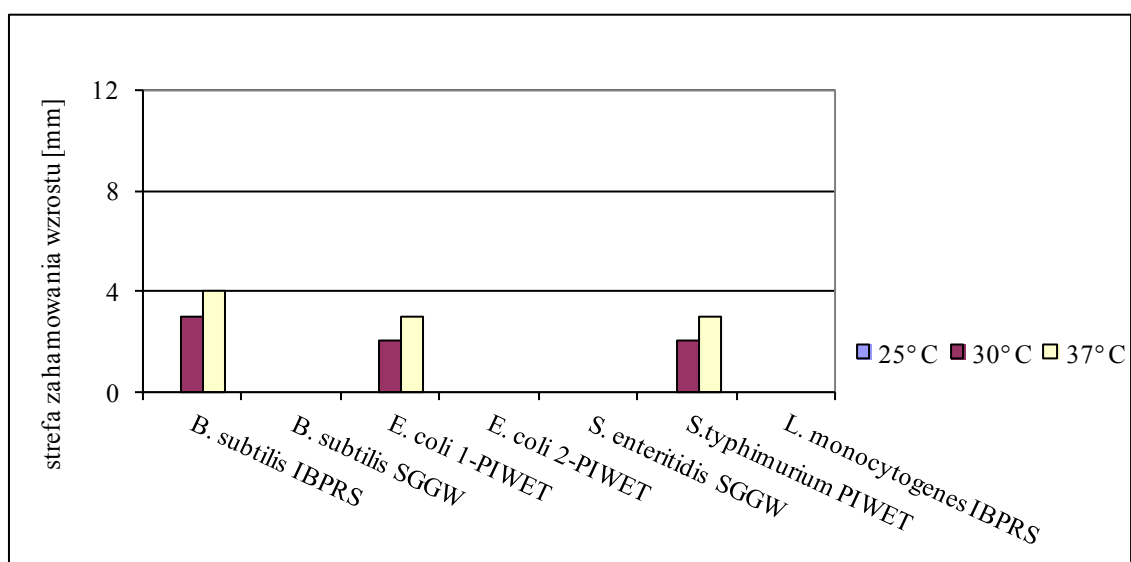
Wykres 8. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1804



Wykres 9. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1805



Wykres 10. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1806



Wykres 11. Aktywność antybakteryjna szczepu KKP 1807

Badane szczepy LAB nie wykazywały aktywności hamującej tylko względem szczepu wskaźnikowego *B. subtilis* SGGW. Aktywność antybakteryjna analizowanych szczepów względem pozostałych szczepów wskaźnikowych jest porównywalna po ich hodowli w 37 i 30°C. Podczas hodowli w temperaturze 25°C badane szczepy wykazywały zupełny brak (w odniesieniu do szczepów wskaźnikowych: *E. coli* PIWET 2, *Salmonella enteritidis* SGGW i *Listeria monocytogenes* SGGW) lub znacznie mniejszą aktywność antybakteryjną w odniesieniu do pozostałych wariantów temperaturowych. Spośród badanych szczepów LAB najmniejszą aktywność antybakteryjną (lub jej całkowity brak w przypadku hodowli w temperaturze 25°C) wykazywał szczep KKP 1807.

5.4. Dobór wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej do opracowania składu kultur starterowych, do otrzymywania pieczywa.

W ramach analizy fizykochemicznej zakwasów otrzymanych z użyciem poszczególnych monokultur starterowych oznaczono pH i kwasowość ogólną. Wyniki przedstawia tabela 6.

Tabela 6. Ocena fizykochemiczna zakwasów otrzymanych z użyciem poszczególnych monokultur starterowych, w wyniku trwającej przez 24 h jednostopniowej fermentacji w temperaturze 30°C.

Monokultura	pH	Kwasowość ogólna [°kw]
Próba kontrolna (0 h)	5,90	3,77
KKP 1797	3,81	12,44
KKP 1798	3,66	13,28
KKP 1799	3,80	12,38
KKP 1800	3,99	12,16
KKP 1801	4,31	11,44
KKP 1802	4,23	10,52
KKP 1803	4,19	10,49
KKP 1804	4,41	8,22
KKP 1805	4,18	10,74
KKP 1806	4,33	9,42
KKP 1807	4,17	10,30

Jednostopniowa fermentacja w temperaturze 30°C, prowadzona z udziałem odpowiednich monokultur starterowych umożliwia osiągnięcie znacznie większego zakwaszenia niż wielostopniowa fermentacja spontaniczna w tej samej temperaturze. Wykazano również, że proces ukwaszania w temperaturze 30°C zachodzi najwydajniej w przypadku zakwasów przygotowanych z udziałem monokultury KKP 1798, a także monokultur: KKP 1799, KKP 1797 oraz KKP 1800. Szczepem ukwaszającym najmniej efektywnie okazał się szczep KKP 1804.

Wykonano analizę sensoryczną zakwasów otrzymanych z udziałem poszczególnych monokultur, wyniki przedstawia Tabela 7.

Tabela 7. Ocena sensoryczna zakwasów otrzymanych z udziałem poszczególnych monokultur po 24 h fermentacji w temperaturze 30°C.

Monokultura	Ocena
Próba kontrolna (0 h)	Konsystencja gęsta, ciastowa. Barwa beżowa. Tekstura chropowata. Zapach lekko orzechowy, owsiany, przyjemny.
KKP 1797	Konsystencja stosunkowo półpłynna, lekko spieniona. Barwa beżowa. Tekstura gładka. Zapach wyraźnie kwaśny (kwaśne mleko), roślinny (siano), chlebowy, mączny, przyjemny.
KKP 1798	Konsystencja gęsta. Barwa beżowa. Tekstura ziarnista. Zapach kwaśny, roślinny (siano, szczaw), chlebowy, mączny, przyjemny.
KKP 1799	Konsystencja gęsta. Barwa beżowa. Tekstura grudkowata, ziarnista. Zapach słodkawy, lekko kwaśny, mączny, przyjemny.
KKP 1800	Konsystencja bardzo gęsta. Barwa beżowa. Tekstura grudkowata. Zapach kwaśnego mleka, roślinny, mdły, nieprzyjemny.
KKP 1801	Konsystencja gęsta. Barwa beżowa. Tekstura grudkowata. Zapach kwaśny, kiszonkowy, lekko gryzący.
KKP 1802	Konsystencja półpłynna, ciągnąca się. Barwa beżowa. Tekstura ziarnista. Zapach roślinny (mokra, butwiejąca ściółka leśna), kwaśny, lekko octowy, umiarkowanie przyjemny.
KKP 1803	Konsystencja półpłynna, „oleista”. Barwa beżowa. Tekstura gładka. Zapach kwaśny, lekko kiszonkowy, słodkawy, mączny, przyjemny.
KKP 1804	Konsystencja półpłynna. Barwa beżowa. Tekstura gładka. Zapach lekko kwaśny i octowy, mączny, orzechowy, przyjemny.
KKP 1805	Konsystencja półpłynna, „oleista”. Barwa beżowa. Tekstura gładka. Zapach słodki, słodowy, drożdżowy, przyjemny.
KKP 1806	Konsystencja gęsta. Barwa beżowa. Tekstura gładka. Zapach, słodki, lekko kwaśny, mączny, przyjemny.
KKP 1807	Konsystencja wyrośniętego ciasta, gęsta bardzo spieniona, pulchna, ciągnąca się, gumowata. Barwa beżowa. Tekstura ziarnista. Ostry zapach fermentacyjny, kiszonkowy, kwaśny, bardzo wyrazisty.

Zakwasy uzyskane z udziałem poszczególnych monokultur starterowych charakteryzowały się indywidualnymi, zróżnicowanymi właściwościami sensorycznymi.

Przeprowadzono analizę mikrobiologiczną zakwasów otrzymanych z udziałem poszczególnych monokultur starterowych przed i po jednostopniowej, trwającej 24 h fermentacji w temperaturze 30°C. Oznaczano: ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę: bakterii kwaszących, drożdży, bakterii proteolitycznych, bakterii śluzowych, bakterii przetrwalnikujących, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i pleśni, wyniki przedstawiono w tabeli 8 i 9.

Tabela 8. Analiza mikrobiologiczna zakwasów przed procesem fermentacji z dodatkiem monokultur starterowych (po zaszczerpieniu mąki)

Szczep LAB	Grupa oznaczanych drobnoustrojów, liczba bakterii w j.t.k./g zakwasu							
	ogólna liczba bakterii	bakterie kwaszące	drożdże	bakterie proteolityczne	bakterie śluzowe	pleśnie	bakterie z rodzaju <i>Enterobacteriaceae</i>	bakterie przetrwalnikujące
KKP 1797	$2,8 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$1,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$	n.w.	$1,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$
KKP 1798	$2,0 \times 10^9$	$1,85 \times 10^9$	$1,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	n.w.	$1,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$
KKP 1799	$1,6 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	n.w.	$1,9 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$
KKP 1800	$2,7 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	n.w.	$2,3 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$
KKP 1801	$2,7 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$1,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	n.w.	$1,8 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
KKP 1802	$4,0 \times 10^9$	$0,9 \times 10^9$	$1,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	n.w.	$1,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$
KKP 1803	$2,3 \times 10^9$	$8,35 \times 10^9$	$1,8 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	n.w.	$3,1 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$
KKP 1804	$6,7 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	n.w.	$2,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$
KKP 1805	$8,3 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	n.w.	$1,3 \times 10^3$	$1,9 \times 10^2$
KKP 1806	$2,0 \times 10^8$	$6,3 \times 10^9$	$1,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	n.w.	$2,5 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
KKP 1807	$5,0 \times 10^9$	$5,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	n.w.	$1,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$

Tabela 9. Analiza mikrobiologiczna zakwasów po 24h procesie fermentacji z zastosowaniem monokultur starterowych

szczep LAB	Grupa oznaczanych drobnoustrojów, liczba bakterii w jtk/g zakwasu							
	ogólna liczba bakterii	bakterie kwaszące	drożdże	bakterie proteolityczne	bakterie śluzowe	pleśnie	bakterie z rodzaju Enterobacteriaceae	bakterie przetrawnikujące
KKP 1797	$6,5 \times 10^9$	$6,3 \times 10^9$	$2,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	$5,6 \times 10^2$
KKP 1798	$3,5 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	$4,8 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$	n.w.	$1,7 \times 10^4$	n.w.
KKP 1799	$4,8 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$4,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	n.w.	$6,2 \times 10^4$	n.w.
KKP 1800	$2,9 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$2,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	$2,4 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	n.w.
KKP 1801	$3,3 \times 10^9$	$2,73 \times 10^9$	$2,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	n.w.	$2,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$	n.w.
KKP 1802	$2,5 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$2,6 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	n.w.	$1,8 \times 10^3$	$3,8 \times 10^4$	n.w.
KKP 1803	$4,3 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$1,8 \times 10^6$	$5,7 \times 10^2$	n.w.	$1,3 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	n.w.
KKP 1804	$1,45 \times 10^9$	$1,25 \times 10^9$	$9,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$4,25 \times 10^4$	n.w.
KKP 1805	$9,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$1,7 \times 10^6$	$3,5 \times 10^2$	n.w.	$1,7 \times 10^3$	$1,95 \times 10^4$	$1,7 \times 10^2$
KKP 1806	$2,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$	$1,4 \times 10^6$	$1,8 \times 10^3$	n.w.	n.w.	$3,0 \times 10^4$	n.w.
KKP 1807	$5,3 \times 10^9$	$4,7 \times 10^9$	$1,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	n.w.	$2,1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^2$

n.w.- nie wykryto

W wyniku działania kultur starterowych po 24 godzinnej fermentacji zakwasów owsianych zauważono nieznaczny przyrost liczby bakterii fermentacji mlekowej, ich ilość utrzymywała się na poziomie $10^{9 \text{ j.t.k./ml}}$, w momencie zaszczerpienia mąki i po procesie jej fermentacji. Zastosowanie monokultur starterowych sprzyjało rozwojowi drożdży (pożądanych w zakwasach), ograniczało rozwój bakterii śluzowych i przetrwalnikujących. 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. Zastosowane monokultury starterowe nie ograniczyły rozwoju drobnoustrojów z rodzaju *Enterobacteriaceae*, w większości wariantów doświadczenia zahamowały rozwój przetrwalników.

5.5 Ocena wpływu bakterii w kulturach mieszanych na jakość mikrobiologiczną i technologiczną zakwasów owsianych.

Dokonano selekcji wyizolowanych szczepów LAB, w rezultacie której wybrano siedem szczepów. Szczepy te posłużyły do sporządzenia trzech mieszanych kultur starterowych. Podczas doboru szczepów kierowano się następującymi kryteriami: wzrost w poszczególnych temperaturach, ilość syntetyzowanego kwasu mlekowego i octowego, aktywność antymikrobiologiczna 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. Opierając się na wszystkich dotychczas przeprowadzonych badaniach, dokonano selekcji wyizolowanych szczepów LAB, w rezultacie której wybrano siedem szczepów. Szczepy te posłużyły do sporządzenia trzech mieszanych kultur starterowych. Skład mieszanych kultur starterowych przedstawiono w tabeli nr 10.

Tabela 10. Skład skomponowanych mieszanych kultur starterowych.

Przyjęta nazwa kultury mieszanej	Skład
KM1	KKP 1797, KKP 1803, KKP 1804, KKP 1805, KKP 1807
KM2	KKP 1797, KKP 1798, KKP 1802
KM3	KKP 1802, KKP 1803, KKP 1798, KKP 1805

W ramach analizy fizykochemicznej zakwasów otrzymanych z użyciem mieszanych kultur starterowych oznaczono pH i kwasowość ogólną. Wyniki przedstawia Tabela 11.

Tabela 11. 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 (0 h)	5,86	3,85
KM1	3,84	14,95
KM2	3,95	14,81
KM3	3,96	14,83

Zastosowanie mieszanych kultur starterowych w celu przeprowadzenia jednostopniowej fermentacji zakwasów w temperaturze 30°C umożliwia osiągnięcie zdecydowanie większego stopnia ukwaszenia niż stosowanie pojedynczych monokultur. Wystąpiły istotne różnice w poziomie ukwaszenia pomiędzy zakwasami przygotowanymi z użyciem poszczególnych mieszanych kultur starterowych.

Tabela 12. Ocena sensoryczna zakwasów otrzymanych z udziałem mieszanych kultur starterowych po 24 h fermentacji w temperaturze 30°C.

Mieszana kultura starterowa	Ocena
Próba kontrolna (0 h)	Konsystencja gęsta, ciastowa. Barwa beżowa. Tekstura chropowata. Zapach lekko orzechowy, owsiany, przyjemny.
KM1	Konsystencja wyrośniętego ciasta, gęsta, ciągnąca się, bardzo spieniona. Barwa beżowa. Tekstura ziarnista. Zapach bardzo intensywny, słodko-kwaśny, intensywnie orzechowy, lekko mleczny, roślinny (szczaw), drożdżowy, mączny, bardzo przyjemny.
KM2	Konsystencja bardzo gęsta. Barwa beżowa. Tekstura chropowata. Zapach ostrzejszy niż w przypadku KM1, kwaśny, roślinny (szczaw, siano), mączny, przyjemny.
KM3	Konsystencja gęsta. Barwa beżowa. Tekstura chropowata. Zapach najostrejszy spośród zakwasów ocenianych w tym doświadczeniu, kwaśny, mączny, przyjemny.

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 KM1.

Przeprowadzono analizę mikrobiologiczną zakwasów otrzymanych z udziałem mieszanych kultur starterowych po jednostopniowej, trwającej 24 h fermentacji w temperaturze 30°C. Oznaczano: ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę: bakterii kwaszących, drożdży, bakterii proteolitycznych, bakterii śluzowych, bakterii przetrwalnikujących, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i pleśni. Wyniki przedstawiono w tabelach 13 i 14.

Tabela 13. Analiza mikrobiologiczna zakwasów przed procesem fermentacji z zastosowaniem mieszanych kultur starterowych (po zaszczepleniu mąki)

Kultura starterowa	Grupa oznaczanych drobnoustrojów, liczba bakterii w jtk/g zakwasu							
	ogólna liczba bakterii	bakterie kwaszące	drożdże	bakterie proteolityczne	bakterie śluzowe	pleśnie	Enterobacteriaceae	bakterie przetrwalnikujące
KM1	$1,1 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	n.w.	$2,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$
KM2	$1,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	n.w.	$2,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$
KM3	$1,7 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,9 \times 10^2$	n.w.	$1,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$

Tabela 14. Analiza mikrobiologiczna zakwasów po 24h procesie fermentacji z zastosowaniem mieszanych kultur starterowych

Kultura starterowa	Grupa oznaczanych drobnoustrojów, liczba bakterii w j.t.k./g zakwasu							
	ogólna liczba bakterii	bakterie kwaszące	drożdże	bakterie proteolityczne	bakterie śluzowe	pleśnie	Enterobacteriaceae	bakterie przetrwalnikujące
KM1	$5,4 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$2,2 \times 10^2$	n.w.	n.w.	n.w.
KM2	$2,5 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$3,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	n.w.	n.w.
KM3	$3,9 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$5,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	n.w.

n.w- nie wykryto

W trakcie fermentacji wszystkich zakwasów przygotowanych z udziałem poszczególnych mieszanych kultur starterowych następuje istotny przyrost ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby bakterii kwaszących, drożdży, bakterii proteolitycznych, bakterii śluzowych. Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że w trakcie fermentacji wszystkich zakwasów przygotowanych z udziałem poszczególnych mieszanych kultur starterowych następuje całkowite zahamowanie rozwoju przetrwalników. W trakcie fermentacji zakwasów przygotowanych z udziałem kultur KM1 i KM2 następowało całkowite zahamowanie rozwoju bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. W przypadku zakwasu przygotowanego z udziałem kultury KM3 stwierdzono istotne zmniejszenie liczby tych bakterii w trakcie fermentacji. Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że w trakcie fermentacji zakwasu przygotowanego z udziałem kultury KM1 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 owsianych 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 (zarówno w temperaturze 30, jak i 37°C).

Na podstawie przeprowadzonych ocen i analiz uznano również, że największą zdolnością kompleksowej poprawy cech zakwasów owsianych charakteryzuje się kultura KM1. W kolejnym etapie badań analizowano jej przydatność w próbnym wypieku.

5.6. Przygotowanie (receptury) metody otrzymywania pieczywa pszenno-owsianego z zastosowaniem wybranych kultur bakteryjnych. Otrzymanie partii próbnego ekologicznego pieczywa owsianego.

Recepturę pieczywa ekologicznego pieczywa pszenno-owsianego opracowywano w trzech piekarniach: w piekarni Vini z Rogoźnika, piekarni Słodka z Torunia i Bio-Piekarni Grzybów. W doświadczeniach stosowano ocenioną jako najlepszą kulturę mieszaną o symbolu I składającą się z następujących szczepów: KKP 1797, KKP 1803, KKP 1804, KKP 1805, KKP 1807. Każdorazowo w IBPRS hodowano kulturę mieszaną na podłożu produkcyjnym, odwirowywano i w formie pasty dodawano do mąki celem uzyskania zakwasu

owsianego. Poniżej przedstawiono przebieg doświadczeń i ocenę pieczywa wyprodukowanego w piekarniach.

5.6.1. Przebieg doświadczeń wykonanych w piekarni Słodka w Toruniu

Chleb wypiekano z mąki ekologicznej: pszennej typ 550 i owsianej całościarnowej w różnych proporcjach, na zakwasie owsianym, z dodatkiem drożdży do ciasta.

Tabela.15. Wyróżniki farinograficzne ciasta z mąki pszennej typ 550 (próba kontrolna) i z 30% udziałem owsianej całościarnowej.

	Wodochłonność [%]	Czas rozwoju [min.]	Stalność ciasta [min.]	Rozmięczenie po 12 min. [FU]	Liczba jakości
Próba kontrolna	53,2	1,2	0,8	160	17
Mieszanka mąka	54,5	1,2	0,9	154	18

Liczba opadania mąki pszennej - 167 s.

Wytwarzanie kwasów piekarskich

Kwas piekarski sporządzono z mąki owsianej. Prowadzono go 1.fazowo wg następującego schematu:

Kwas:

Mąka owsiana	8.000 g
Woda	8.000 cm ³
Kultura starterowa, 1%	73 g

Ogółem 16.073 g

Fermentację kwasu piekarskiego prowadzono w temperaturze 30°C przez 18 h.

Wytwarzanie ciasta i wypiek chleba

Mąkę owsianą wprowadzano do ciasta z kwasem piekarskim (30% lub 50%). Ciasta przygotowywano w oparciu o następujące receptury:

Tabela 16. Skład ciasta:

Receptura	30% mąki owsianej	50% mąki owsianej
Kwas piekarski	6.000 g	10.000 g
Mąka pszenna typ550	7.000 g	5.000 g
Drożdże (2%)	200 g	200 g
Sól (1,7%)	170 g	170 g
Gluten pszenny (8%)	-	-
Woda	3.500 cm ³	1.500 cm ³

Ciasta sporządzano w mieszarce spiralnej. Po mieszeniu ciasto poddawano fermentacji w masie przez ok. 20 min. Po tym czasie ciasto dzielono na kęsy o masie 820 g, które poddawano rozrostowi w formach.

Otrzymywanie chleba

Bochenki wypiekano w piecu komorowym.

Wyniki badań:

Tabela 17. Kwasowość kwasu:

Czas fermentacji [h]	pH	Kwasowość [stopnie]
0	6,29	2,2
22h	3,7 (pomiar w piekarni)	-

Tabela 18. Badania ciasta:

Próba	Wydajność
30% mąki owsianej	165
50% mąki owsianej	165

Tabela 19. Wyniki badań chleba:

Próba	Objętość 100g chleba [cm ³]	Wilgotność miękkiszu [%]	Kwasowość miękkiszu [stopnie]	pH miękkiszu	Ocena organoleptyczna [pkt]	Suma punktów +8*
30% mąki owsianej	286	43,9	4,0	4,3	17	25
50% mąki owsianej	253	43,7	4,1	4,0	15	23

Podczas oceny nie brano pod uwagę wskaźników fizykochemicznych (do sumy uzyskanych punktów dodano +8 jako ekwiwalent punktów przypadających na wskaźniki fizykochemiczne).

5.6.2. Przebieg doświadczeń wykonanych w Bio piekarni w Grzybowie

Chleb wypiekano z mąki ekologicznej: pszennej typ 550 i owsianej całościarnowej w różnych proporcjach, na zakwasie owsianym, z dodatkiem drożdży do ciasta.

Tabela.20. Wyróżniki farinograficzne ciasta z mąki pszennej typ 550 (próba kontrolna) i z 30% udziałem owsianej całościarnowej

	Wodochłonność [%]	Czas rozwoju [min.]	Stałość ciasta [min.]	Rozmiękczenie po 12 min. [FU]	Liczba jakości
Próba kontrolna	53,2	1,2	0,8	160	17
Mieszanka mąk	54,5	1,2	0,9	154	18

Liczba opadania mąki pszennej - 167 s , wskazuje na pochodzenie z porośniętego ziarna

Wytwarzanie kwasów piekarskich

Kwas piekarski sporządzono z mąki owsianej. Prowadzono go 1.fazowo wg następującego schematu:

Kwas

Mąka owsiana	4.500 g
Woda	4.500 cm ³
Kultura starterowa, 1%	45 g

Ogółem 9.045 g

Fermentację kwasu piekarskiego prowadzono w temperaturze 30°C przez 18 h.

Wytwarzanie ciasta i wypiek chleba

Mąkę owsianą wprowadzano do ciasta całą z kwasem piekarskim (30% lub 50%). Ciasta przygotowywano w oparciu o następujące receptury:

Tabela 21. Skład ciasta:

Receptura	30% mąki owsianej	50% mąki owsianej
Kwas piekarski	1.500 g	2.500 g
Mąka pszenna typ550	1.625 g	1.125 g
Drożdże (2%)	50 g	50 g
Sól (1,7%)	45 g	45 g
Gluten pszenny (5%)	125 g	125 g
Woda	720 cm ³	325 cm ³

Ciasta sporządzano ręcznie. Po mieszeniu ciasto poddawano fermentacji w masie przez ok.20 min. Po tym czasie ciasto dzielono na kęsy o masie 820 g, które poddawano rozrostowi w formach.

Chleb

Bochenki wypiekano w piecu komorowym.

Wyniki badań:

Tabela 22. Kwasowość kwasu:

Czas fermentacji [h]	pH	Kwasowość [stopnie]
0	6,2	2,2
22	3,9 (pomiar w IBPRS tj. po 18 h)	7,6

Tabela 23. Badania ciasta:

Próba	Wydajność [%]	Fermentacja w masie [min]	Rozrost kęsów [min]
30% mąki owsianej	159	45	55
50% mąki owsianej	163	35	50

Tabela 24. Wyniki badań chleba:

Próba	Objętość 100g chleba [cm ³]	Wilgotność miękiszu [%]	Kwasowość miękiszu [stopnie]	pH miękiszu	Ocena organoleptyczna [pkt]	Suma punktów + 8*
30% mąki owsianej	275	43,4	2,4	5,6	25	33
50% mąki owsianej	212	44,4	2,6	5,1	18	26

Podczas oceny nie brano pod uwagę wskaźników fizykochemicznych (do sumy uzyskanych punktów dodano +8 jako ekwiwalent punktów przypadających na wskaźniki fizykochemiczne).

5.6.3. Przebieg doświadczeń wykonanych w piekarni Vini w Rogoźniku

Chleb wypiekano z mąki ekologicznej: pszennej typ 550 węgierskiej i owsianej całościowej w różnych proporcjach, na kwasie owsianym, z dodatkiem drożdży do ciasta.

Mąka pszenna węgierska wg atestu charakteryzowała się zawartością glutenu 32%, rozplywalnością glutenu 3,5 mm, liczbą opadania 320 s.

Wytwarzanie kwasów piekarskich

Kwas piekarski sporządzono z mąki owsianej. Prowadzono go 1-fazowo wg schematu:

Kwas

Mąka owsiana	10.000 g
Woda	10.000 cm ³
Kultura starterowa, 1%	100 g

Ogółem 20.100 g

Fermentację kwasu piekarskiego prowadzono przez 20 i 42 h

Wytwarzanie ciasta i wypiek chleba

Całą mąkę owsianą wprowadzano do ciasta z kwasem piekarskim (30% lub 40%). Ciasta przygotowywano w oparciu o następujące receptury:

Tabela 25. Skład ciasta:

Receptura	1 40% mąki owsianej	2 30% mąki owsianej	3 40% mąki owsianej
Kwas piekarski	10.000 g, 24,5°C	6.000 g, 24,5°C	3.000 g,
Mąka pszenna typ 550	7.000 g	7.000 g	2.100 g
Drożdże	200 g (1,6%)	200 g (2%)	70 g (1,9%)
Sól	170 g (1,4%)	170 g (1,7%)	70 g (1,9%)
Woda	2.320 cm ³ , 30 °C	3.420 cm ³ , 30 °C	880 cm ³ , 30 °C
mieszanie I+ II bieg	4+6 min	4+6,5 min	4+5,5 min
temp. ciasta	30,6 °C	32 °C	27°C
czas ferm. w masie	20 min	20 min	43 min
masa kęsa	400 g	400 g	450 g
rozrost	60 min, w 32 °C	60 min, w 32 °C	60 min, w 32 °C
wypiek	210 °C, 45 min	210 °C, 45 min	210 °C, 45 min

Wypiek odbywał się w piecu wózkowym w 210 °C.

Wyniki badań

Tabela 26. Kwasowość kwasu:

Czas fermentacji, h	pH	Kwasowość, stopnie
20 h	3,92	7,0
42 h	3,79	8,7

Tabela 27. Badania ciasta:

Próba	Wydajność	pH	kwasowość, stopnie
40% mąki owsianej	161	4,4	5,8
30% mąki owsianej	164	4,5	5,8
40% mąki owsianej	166	4,1	6,4

Tabela 28. Wyniki badań chleba:

Próba	Objętość 100g chleba [cm ³]	Wilgotność miękkiszu [%]	Kwasowość miękkiszu [stopnie]	pH miękkiszu	Ocena organoleptyczna [pkt]	Suma punktów +8*
40% mąki owsianej	268	42,7	2,9	4,3	24	32
30% mąki owsianej	343	43,0	2,7	4,5	27	35
40% mąki owsianej	265	43,0	3,1	4,2	28	36

Podczas oceny nie brano pod uwagę wskaźników fizykochemicznych (do sumy uzyskanych punktów dodano +8 jako ekwiwalent punktów przypadających na wskaźniki fizykochemiczne).

Próby zastosowania kultury starterowej w piekarniach dały najlepsze wyniki w przypadku piekarni Vini. Wypieki uzyskane w tej piekarni były dostatecznie wyrośnięte, natomiast miękisz charakteryzował się dobrą elastycznością, dostateczną krawalnością i nieco nierównomierną porowatością. Smak i zapach były odpowiednio intensywne, zbalansowane i bardzo aromatyczne. Bukiet smakowo-zapachowy mąki owsianej i zakwasu był bardzo dobrze wyczuwalny.

Jedna z prób z 40% udziałem mąki owsianej w kwasie została zaklasyfikowana do I klasy jakościowej pieczywa, uzyskując 36 punktów za ocenę organoleptyczną w połączeniu z ekwiwalentem punktów przypadających na wskaźniki fizykochemiczne, pozostałe dwie próby wypieków zakwalifikowały się do II klasy jakościowej, uzyskując odpowiednio 32 i 35 punktów.

5.6.4. Badanie /określenie trwałości pieczywa, jego przydatności do spożycia, czasu do pojawienia się oznak zepsucia mikrobiologicznego

Próbki pieczywa otrzymane w trzech piekarniach przechowywano w temperaturze pokojowej i oznaczano w nich zawartość pleśni po 2, 4, 6 dobach od wypieku. Wyniki zamieszczono w tabelach 29-31

Tabela 29. Trwałość mikrobiologiczna pieczywa z piekarni Słodka w Toruniu

Rodzaj pieczywa	Zawartość pleśni [j.t.k./g]		
	po 2 dobach	po 4 dobach	po 6 dobach
Z 30% dodatkiem mąki owsianej	n.w.	n.w.	2×10^2
Z 50% dodatkiem mąki owsianej	n.w.	n.w.	$8,8 \times 10^1$

Tabela 30. Trwałość mikrobiologiczna pieczywa z Bio piekarni w Grzybowie

Rodzaj pieczywa	Zawartość pleśni [j.t.k./g]		
	po 2 dobach	po 4 dobach	po 6 dobach
Z 30% dodatkiem mąki owsianej	n.w.	n.w.	$4,6 \times 10^2$
Z 50% dodatkiem mąki owsianej	n.w.	n.w.	$1,2 \times 10^2$

Tabela 31. Trwałość mikrobiologiczna pieczywa z piekarni Vini z Rogoźnika

Rodzaj pieczywa	Zawartość pleśni [j.t.k./g]		
	po 2 dobach	po 4 dobach	po 6 dobach
Z 30% dodatkiem mąki owsianej	n.w.	n.w.	$7,9 \times 10^1$
Z 40% dodatkiem mąki owsianej	n.w.	n.w.	$1,2 \times 10^1$
Z 40% dodatkiem mąki owsianej	n.w.	n.w.	$3,1 \times 10^1$

n.w. nie wykryto

Objawy mikrobiologicznego zepsucia pieczywa pszenno-owsianego pojawiały się po sześciu dobach przechowywania, we wszystkich wariantach doświadczeń. Pieczywo z większą zawartością mąki owsianej, którą zawsze wprowadzano w formie ukwaszonej charakteryzowało się niższym rozwojem pleśni w trakcie przechowywania.

6. Opracowanie instrukcji technologicznej dotyczącej uzyskiwania pieczywa pszenno-owsianego

Dokumentacja techniczno technologiczna chleba owsianego ekologicznego

1. Receptura

A. Opis

Chleb owsiany ekologiczny produkowany jest z surowców rolnictwa ekologicznego, na kwasie owsianym 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 owsiana 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 owsiane ekologiczne | - do 0,50 kg |
| olej jadalny do smarowania form | - do 0,30 kg |
| wydajność średnia przy masie jednostkowej | - 0,45 kg |
| bochenki fermentujące w formach | - 135 szt. |

C. Zalecenia technologiczne

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

C. 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 owsianego ekologicznego powinna charakteryzować się bardzo dobrą wartością wypiekową - wyższą niż mąka stosowana do produkcji zwykłego chleba pszenne. Wynika to z konieczności zrównoważenia ujemnego wpływu na ciasto mąki owsianej, 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.

Kwas przygotowany jest z całej mąki owsianej przewidzianej recepturą, z dodatkiem, do zapoczątkowania fermentacji, kultury starterowej bakterii fermentacji mlekowej KM1 w ilości 0,1% w stosunku do mąki użytej do sporządzenia kwasu. Fermentacja kwasu prowadzona jest przez 24 godziny w temperaturze 30°C.

Ciasto przygotowuje się z dojrzałego kwasu, 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 owsianej 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 owsiany ekologiczny

Nazwa fazy fermentacji	Faza poprzednia	Mąka pszenna ekologiczna	Mąka owsiana całościarna	Starter fermentacji	Woda	Drożdże	Sól	Masa ogółem	Temperatura fermentacji	Czas fermentacji
	kg	kg	kg	g	l	kg	kg	kg	°C	godziny
Kwas	-	-	30	30-50	30	-	-	60,03	30	24
Ciasto	60,03	70	-	-	ok. 34	2	1,7	ok. 167,73	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 owsianych i posypać płatkami owsianymi. 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 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 równolegle 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 owsiana całościarna ekologiczna* (22%), drożdże, sól, płatki owsiane 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 owsianego ekologicznego pakowanego wynosi 3 dni. Okres ten może być zmieniony na podstawie badań przechowalniczych chleba owsianego 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

7. Podsumownie

W wyniku wielostopniowej, spontanicznej fermentacji zakwasów przygotowanych z użyciem razowej mąki owsianej nie udało się uzyskać zakwasów o kompleksowo korzystnych cechach technologicznych. Wykorzystywana mąka owsiana wykazywała znaczne zanieczyszczenie mikrobiologiczne (bakterie przetrwalnikujące oraz bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*).

W toku izolacji szczepów LAB naturalnie bytujących w mące owsianej wyodrębniono zarówno gatunki często izolowane z różnych typów zakwasów (*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*), jak i gatunki rzadko spotykane w typowych zakwasach (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*). Wszystkie wyizolowane szczepy LAB zaliczono do grona bakterii mezofilnych.

Wyizolowane szczepy LAB syntetyzowały kwas mlekowy z różną wydajnością oraz małe ilości kwasu octowego. Większość wyizolowanych szczepów (z wyjątkiem KKP 1807) wykazywała znaczną aktywność hamującą względem prawie wszystkich, użytych w badaniach patogennych szczepów wskaźnikowych (z wyjątkiem szczepu *B. subtilis* z kolekcji Instytutu Weterynarii SGGW).

W toku izolacji szczepów drożdży naturalnie bytujących w mące owsianej nie wyodrębniono gatunków typowych dla zakwasów. Z dużą częstotliwością izolowano natomiast gatunki rzadko spotykane w typowych zakwasach (*Candida crusei*, *Candida glabrata*).

Poprzez zastosowanie wyizolowanych szczepów LAB jako monokultur starterowych w procesie jednostopniowej fermentacji w temperaturze 30°C, która trwała 24 h uzyskano znacznie wyższe kwasowości ogólne niż w rezultacie wielostopniowej, spontanicznej fermentacji w tej samej temperaturze, która trwała łącznie 96 h. Nastąpiła również poprawa jakości mikrobiologicznej zakwasów (w zależności od szczepu: zahamowanie wzrostu przetrwalników, zahamowanie wzrostu pleśni, ograniczenie aktywności metabolicznej lub ograniczanie wzrostu bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*). Zakwasy otrzymane w ten sposób charakteryzowały się zróżnicowanymi właściwościami sensorycznymi.

Mieszane kultury starterowe pozwoliły na uzyskanie jeszcze większego stopnia ukwaszenia zakwasów owsianych niż w przypadku zastosowania monokultur starterowych (w tych samych warunkach prowadzenia procesu) oraz warunkowały ich jeszcze bardziej zróżnicowany bukiet smakowo-zapachowy. Miała również miejsce jeszcze dalej idąca poprawa jakości mikrobiologicznej (całkowite zahamowanie rozwoju bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*).

W wyniku stosowania kultur starterowych następowało ograniczenie wzrostu naturalnej mikroflory bytującej w mące (drożdży, bakterii o właściwościach proteolitycznych i śluzotwórczych).

Zastosowanie zakwasu przygotowanego z udziałem mieszanej kultury starterowej KM1 umożliwiło uzyskanie dobrej jakości pieczywa (I klasa jakościowa wg normy PN-A-74108:1996) o dużej zawartości mąki owsianej (40% mąki ogółem) bez zastosowania dodatków polepszających. Najlepsze rezultaty uzyskano w piekarni Vini – wszystkie trzy warianty wypieków charakteryzowały się dobrą jakością organoleptyczną i właściwymi cechami miękiszu.

8. Wnioski

1. Wszystkie badane mąki zawierały zarodniki pleśni i bakterie z grupy *Enterobacteriaceae* na poziomie wyższym niż liczba bakterii fermentacji mlekowej, co świadczy o zasadności wprowadzania bakteryjnych kultur starterowych.
2. Izolacja i selekcja bakterii fermentacji mlekowej z naturalnie fermentujących zakwasów piekarskich uzyskanych z określonych surowców (mąk) jest sposobem na otrzymanie efektywnie działających kultur starterowych w określonym środowisku.
3. Opracowana kultura starterowa, składająca się z pięciu szczepów LAB, ograniczała rozwój pleśni w zakwasie.
4. Zastosowanie zakwasu przygotowanego z udziałem mieszanej kultury starterowej umożliwia otrzymanie dobrej jakości pieczywa z 40%-owym udziałem mąki owsianej, bez zastosowania dodatków polepszających.
5. Zastosowanie mieszanych kultur starterowych wpływa na poprawę jakości mikrobiologicznej zakwasów oraz warunkuje bardziej zróżnicowany bukiet smakowo-zapachowy.

Piśmiennictwo:

1. Arendt E. K., Ryan L. A. M., Dal Bello F. (2007): Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24 (22); 165-174.
2. Bell S., Goldman V., Bistrian B., Arnold A., Ostroff G., Armour-Forse R. (1999): Effect of beta-glukan oats and yeast on serum lipids, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39 (2), 189-202.
3. Bering S., Suchdev S., Sjøtov L., Berggren A., Tetens I., Bukhave K. (2006): A lactic acid-fermented oat gruel increases non-haem iron absorption from a phytate-rich meal in healthy women of childbearing age. *British Journal of Nutrition*, 96; 80–85.
4. Brümmer J. M., Morgenstern G., Neumann H. (1988): Herstellung von Hafer-, Gerste-, Mais-, Reis-, Hirse- und Buchweizenbrot. *Getreide, Mehl und Brot*, 5; 153-158.
5. Cossigani L., Gobetti M., Damini P., Corsetti A., Siminetti M. S., Manfredi G.: The sourdough microflora. Microbiological, biochemical and breadmaking characteristics of dough's fermented with freeze-dried mixed starters, freeze-dried wheat sourdough and mixed fresh-cell starters. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 1996, 203, 88-94.
6. De Groot A.P., Luyken R., Pikaar N.A.: Cholesterol – lowering effect of rolled oats. *Lancet*, II, 1963, 303-304.
7. De Vuyst L., Neysens P.: The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 2005, 16, 43-56.
8. Degutyte-Fomins L., Sontag-Strohm T., Salovaara, H. (2002): Oat bran fermentation by rye sourdough. *Cereal Chemistry*, 79; 345–348
9. Diowksz A.: Pieczywo na zakwasie kluczem do zdrowia, *Przegląd Piek. i Cukier.*, 1, 2006, 2-5.
10. Flander L., Salamenkallio-Marttila M., Suortti T., Autio K. (2006): Optimization of ingredients and baking process for improved wholemeal oat bread quality. *LWT – Food Science and Technology*, 40 (5); 860-870.
11. Forssell P., Shamek S., Härkönen H., Poutanen K. (1998): Effects of native and enzymatically hydrolysed soya and oat lecithins in starch phase transitions and bread baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76; 31-38.
12. Gormley T. R., Morrissey A. (1993): A note on the evaluation of wheaten breads containing oat flour or oat flakes. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 32; 205–209.

13. McKechnie R. (1983): Oat products in bakery foods. *Cereal Foods World*, 28; 635-637
14. Omah B. D., Lefkovitch L. P. (1988): Optimal oxidant requirement of wheat-oat composite flours. *Die Nahrung*, 32 (6); 527–
15. Piasecka-Józwiak K., Chabłowska B., Słowik E., Rozmierska J., Stecka K.: Zastosowanie kultur starterowych (wyselekcjonowanych bakterii mlekowych) do poprawy jakości pieczywa mieszanego i żytniego, *Żywność, suplement nr1* (46), 2006, 100 – 113.
16. Piesiewicz H.: Wzrost znaczenia czystych kultur starterowych, *Przegląd Piek. i Cukier.*, 4, 2005, 14-17.
17. Salmekahllo-Martilla M., Heinio R.-L., Myllymaki O., Lille M., Autio K., Poutanen K. (2004): Relating microstructure, sensory and instrumental texture of processed oat. *Agr.Food Sci.*, 13, 124 – 137.
18. Thammahiti S., Suphantharika M., Phaesuwan T., Verduyn C. (2004): Preparation of spent brewer's yeast beta-glukans for potential application in food industry, *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 21-29.
19. Waszkiewicz-Robak B., Świdorski F.: (2006) Beta glukany jako nowe, bioaktywne składniki żywności, *Materiały XXXVII Sesji Naukowej KNoŻ PAN*, Gdynia 26-27 września, 145.
20. Wolska P., Ceglińska A., Rudzińska A. (2009): Wpływ dodatku produktów owsianych na jakość pieczywa pszennego. *Nauka Przyroda Technologie*, 3 (4)
21. Zhang D. C., Moore W. R., Doehlert D. C. (1998): Effects of oat grain hydrothermal treatments on wheat-oat flour dough properties and breadbaking quality. *Cereal Chemistry*, 75; 602-605