

Sprawozdanie merytoryczne

z zadania w zakresie rolnictwa ekologicznego w 2011r.

„Ekologiczne metody przetwórstwa owoców i warzyw z uwzględnieniem właściwości prozdrowotnych otrzymanych produktów.”

zrealizowanego na podstawie § 10 ust. 1 pkt 2, ust. 6 i 10 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 oraz Nr 259, poz. 1772).

Decyzja Nr RRre-029-29-26/11(40) z dnia 18.05.2011

I. Jednostka badawczo-rozwojowa

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

Zakład Technologii Fermentacji

ul. Rakowiecka 36

02-532 Warszawa

tel: 22 848 02 24, 22 849 50 39, 22 606 36 00

fax: 22 849 04 26, e-mail: zf@ibprs.pl

Kierownik /koordynator:

dr hab. Krystyna M. Stecka prof. IBPRS

IBRPS - Zakład Technologii Fermentacji

tel: 606 36 49, 849 04 25

e-mail: krystyna.stecka@ibprs.pl

Status prawny działania jednostki:

JBR-KRS nr 0000126823

Spis autorów:

mgr Beata Chabłowska

mgr inż. Joanna Rozmierska

dr inż. Katarzyna Piasecka Jóźwiak

mgr inż. Monika Kliszczyk

mgr Michał Świątek

mgr Emila Szkudzińska-Rzeszowiak

II. Miejsce realizacji zadania badawczego

IBPRS Zakład Technologii Fermentacji, Warszawa oraz **Żywność Ekologiczna Bio-Food sp. z o.o. Przetwórstwo owoców i warzyw ekologicznych w Ciechocinie.**

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

Zadania realizowane były w IBPRS oraz w przedsiębiorstwie **Żywność Ekologiczna Bio-Food sp. z o.o. w Ciechocinie.**

1. Charakterystyka mikroflory typowej dla surowców roślinnych stosowanych w badaniach (buraki, ogórki, jabłka, papryka) pochodzących z upraw ekologicznych i konwencjonalnych.
2. Izolacja i identyfikacja bakterii fermentacji mlekowej z naturalnie fermentujących warzyw i owoców pochodzących z upraw ekologicznych. Selekcja bakterii mlekowych, pod względem cech biotechnologicznych i aktywności antymikrobiologicznej (hamowanie wzrostu bakterii patogennych i niepożądanych w procesie produkcyjnym oraz pleśni).
3. Dobór wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej do kultur starterowych do otrzymywania fermentowanych warzyw i soków warzywno-owocowych. Zastosowanie wybranych kultur bakteryjnych do sporządzania fermentowanych soków warzywno-owocowych, w wybranych do badań ekologicznych przetwórnich owoców i warzyw.
4. Ocena wpływu skomponowanych kultur starterowych na jakość mikrobiologiczną (w tym określenie aktywności antymikrobiologicznej soków fermentowanych) i sensoryczną fermentowanych soków warzywno-owocowych.
5. Badanie wpływu wyselekcjonowanych kultur starterowych na trwałość kiszonych warzyw i soków, w tym ocena liczby komórek LAB w czasie przechowywania.
6. Przygotowanie (receptury) metody otrzymywania fermentowanych soków warzywno-owocowych z zastosowaniem wybranych kultur bakteryjnych. Otrzymanie partii próbnej ekologicznych soków warzywno-owocowych.
7. Opracowanie sprawozdania z wyników badań, opracowanie instrukcji technologicznej dla przetwórni.

IV. Sprawozdanie merytoryczne

1. Wstęp

Rolnictwo ekologiczne jest jedną z gałęzi gospodarki, intensywnie rozwijaną w Unii Europejskiej. Komisja Europejska w lipcu 2008 r., w ramach Europejskiego Planu Działań na rzecz Żywności Ekologicznej i Rolnictwa Ekologicznego, zainaugurowała nową Kampanię na rzecz Rolnictwa Ekologicznego, której głównym celem jest zwiększenie świadomości konsumentów oraz osiągnięcie lepszej rozpoznawalności producentów ekologicznych (www.organic-farming.europa.eu).

W ostatnich latach wzrost sprzedaży produktów ekologicznych w krajach UE sięgał (w zależności od kraju) od 5 do 30 %, co stwarza nowe możliwości dla producentów i przetwórców ekologicznych. W wielu krajach, np. w Irlandii, producenci żywności ekologicznej są w stanie zaspokoić jedynie 30 % zapotrzebowania konsumentów, a reszta produktów pochodzi z importu. Popyt na produkty ekologiczne rośnie również w Wielkiej Brytanii, gdzie wszystkie duże supermarkety posiadają działy z żywnością ekologiczną. W tym kraju również większość ekologicznych produktów żywnościowych (około 80 %) pochodzi z importu. Wzrost zainteresowania takimi produktami odnotowuje się również w Holandii i Belgii (Górka, 2001).

Na podstawie tych danych można spodziewać się otwarcia nowych rynków zbytu i możliwości eksportowania produktów dla producentów żywności ekologicznej.

Obecnie największym producentem i eksporterem żywności ekologicznej w Europie są Włochy, gdzie areał przeznaczony pod uprawy głównie owoców i warzyw ekologicznych, wynosi ponad 1 mln hektarów (dla porównania w Polsce około 170 tys. ha).

Z uwagi na specyfikę produkcji, tj. około 20 % niższe plony osiągane przy uprawie roślin metodami ekologicznymi przy jednoczesnej konieczności zaangażowania większego areału, wysokie koszty wynikające z nakładu pracy oraz corocznej kontroli i certyfikacji, żywność ekologiczna będzie zawsze droższa od żywności wytwarzanej metodami konwencjonalnymi i przemysłowymi (www.rolnictwoekologiczne.org.pl), ale w miarę wzrostu popytu i zwiększania produkcji różnice cen będą zapewne maleć. Ponadto zwiększanie świadomości konsumentów powinno spowodować większe zainteresowanie produktami ekologicznymi jako potencjalnie bardziej bezpiecznymi i lepiej kontrolowanymi niż żywność konwencjonalna (Rembiałkowska, 2007).

W Polsce na razie rynek produktów ekologicznych rozwija się zbyt wolno w stosunku do ekologicznego rolnictwa i przetwórstwa – produkty ekologiczne obecne są nadal głównie w specjalistycznych sklepach, natomiast nie są powszechnie dostępne w supermarketach. Szacuje się, że liczba polskich konsumentów, kupujących żywność ekologiczną to około 7 %, a obroty tego rynku sięgają około 50 mln EUR (Pankiewicz).

Pomimo tych ograniczeń w Polsce szybko wzrasta liczba przetwórní ekologicznych, których zasady działania reguluje (podobnie jak zasady produkcji rolnej) prawo unijne, na mocy Rozporządzenia Rady 834/2007 z dn. 28 czerwca 2007 r. Produkty takich zakładów charakteryzuje niski stopień przetworzenia, odmienne technologie produkcyjne oraz bardzo ograniczone możliwości stosowania dodatków do żywności (w przetwórstwie

konwencjonalnym jest ich dopuszczonych około 500, zaś w ekologicznym około 20 i one wszystkie muszą być substancjami naturalnymi (Rembiałkowska, 2007).

Jedną z najważniejszych metod przetwarzania surowców roślinnych jest ich fermentowanie. Kiszonki warzywne, popularne w Polsce od stuleci, są obecnie szeroko polecane przez dietetyków i lekarzy ze względu na ich właściwości prozdrowotne (Rutkowski i wsp. 1997; Caplice i wsp.1999), 7). Są niskokaloryczne, gdyż zawarty w świeżych warzywach cukier zostaje w dużej mierze zużyty w procesie fermentacji, zawierają kwas mlekowy, nie tylko nadający produktom przyjemny, orzeźwiający smak, lecz również obniżający pH w jelitach co stwarza korzystne warunki dla rozwoju mikroflory jelitowej, zdolnej do syntezy enzymów, rozkładających powstające w jelitach związki potencjalnie kancerogenne. Kiszone warzywa są także cennym źródłem witaminy C, witamin z grupy B oraz antyoksydantów, które wspomagają organizm w obronie przed działalnością wolnych rodników. Wartość antyoksydacyjna kiszonek może być dwukrotnie wyższa niż świeżych warzyw.

Obecnie bardzo często fermentacji poddawane są nie tylko całe warzywa, lecz również soki warzywne, np. z buraków, selera, pietruszki, marchwi itp.(Gardner i wsp.2001).

Kiszonki swoje prozdrowotne i organoleptyczne właściwości zawdzięczają procesowi fermentacji prowadzonemu przez bakterie fermentacji mlekowej. Głównym produktem metabolizmu tej grupy drobnoustrojów jest, w przypadku bakterii homofermentatywnych, kwas mlekowy, oraz – w przypadku gatunków heterofermentatywnych – także kwas octowy i niewielkie ilości kwasu propionowego lub mrówkowego. W procesie powstawania kiszonek główną rolę pełni kwas mlekowy, który szybko obniża pH środowiska, uniemożliwiając lub ograniczając rozwój innych, niepożądanych w kiszonkach grup drobnoustrojów, w tym również drożdży i pleśni. Podczas fermentacji mlekowej oprócz kwasu syntetyzowane są również w niewielkich ilościach inne metabolity takie jak: diacetyl, aldehyd octowy, alkohol etylowy, n-propanol, alkohole amyłowe czy też acetoina, które nadają kiszonkom specyficzne właściwości smakowo-zapachowe. W procesie powstawania kiszonek fermentowanych w sposób tradycyjny (spontaniczny) uczestniczy bardzo bogata mikroflora składająca się niejednokrotnie z kilkudziesięciu, a nawet stu kilkudziesięciu, szczepów bakterii fermentacji mlekowej odpowiadających za charakterystyczny, niepowtarzalny smak produktów. Szczególne właściwości prozdrowotne kiszonki warzywne zawdzięczają jednak - podobnie jak kefiry i jogurty - obecności żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej. Produkty fermentowane poddane pasteryzacji tracą istotną część swoich właściwości prozdrowotnych.

Kiszonki warzywne, w tym fermentowane soki warzywne, można oczywiście pozyskiwać na drodze fermentacji spontanicznej, jednakże jakość kiszonek warzywnych otrzymanych w wyniku naturalnej fermentacji mlekowej jest w znacznym stopniu zależna od mikroorganizmów bytujących w surowcu (Desai, Sheit, 1997; Akpınar-Bayazit i wsp.2007). Na skład tej mikroflory mają wpływ takie czynniki jak region upraw, ilość opadów w danym roku, skład gleby i inne. Dodatkowo, z uwagi na sposób nawożenia, głównie przy użyciu nawozów naturalnych (gnojowica, obornik, kompost) bez zastosowania chemicznych środków ochrony roślin (herbicydy, pestycydy, fungicydy) produkty roślinne pochodzące z upraw ekologicznych są w znacznie większym stopniu obciążone mikroflorą niepożądaną i patogenną niż te, które pochodzą z upraw konwencjonalnych. W roślinnych surowcach ekologicznych obecne są zazwyczaj bakterie z rodzajów *Salmonella* i *Clostridium*, bakterie z grupy coli oraz pleśnie zdolne do syntezy mikotoksyn (Grajewski i wsp.1998, Holley i

wsp.2006). Jest to poważny problem, zarówno w żywieniu zwierząt hodowlanych, jak i w wykorzystaniu ekologicznych produktów roślinnych w procesach przetwórczych, ponieważ obecność tych grup drobnoustrojów może np. wpływać na przebieg procesu fermentacji mlekowej w sposób znacznie obniżający zarówno właściwości smakowo-zapachowe, jak i prozdrowotne produktu. Na zakażenia pałeczkami *Salmonella* są szczególnie narażone rosnące w glebie warzywa korzeniowe (buraki, marchew, seler), gdyż bakterie te mogą przeżywać w glebie nawet do 33 tygodni (Zaleski i wsp.2005). Dlatego też celowym jest inicjowanie procesów fermentacji warzyw przez wprowadzanie odpowiednich kultur starterowych, zawierających czyste kultury bakterii fermentacji mlekowej o zróżnicowanym składzie gatunkowym, dobranym do surowca (Savard i wsp. 2000). Z punktu widzenia konsumenta stosowanie takich kultur jest korzystne z uwagi na poprawę walorów smakowo-zapachowych i – często – konsystencji produktów, a także ich jakości higienicznej i bezpieczeństwa zdrowotnego. Dodatkowo, zawarte w produktach żywe bakterie fermentacji mlekowej oddziałują prozdrowotnie na organizm konsumenta poprzez poprawę równowagi mikroflory jelitowej (Usajewicz, 2005). Natomiast, z punktu widzenia producenta (zakładu przetwórczego), korzyści polegają na uzyskaniu dobrej i powtarzalnej jakości produktów i ochronie procesu przetwórczego przed zakażeniem mikroflorą niepożądaną.

W procesie kiszenia (fermentacji mlekowej) warzyw eliminacja drobnoustrojów niepożądanych i patogennych (głównie bakterii z rodzajów *Salmonella* i *Escherichia*, drożdży oraz pleśni) następuje zarówno podczas fermentacji spontanicznej, jak i inocyowanej dodatkiem kultury starterowej. Jednakże w środowisku, do którego wprowadzono kulturę starterową w odpowiedniej liczebności, proces eliminacji rozpoczyna się znacznie wcześniej. Podczas spontanicznej fermentacji warzyw bakterie fermentacji mlekowej opanowują środowisko przeważnie pod koniec drugiej doby, natomiast kultura starterowa, wprowadzona w liczebności od 10^5 do 10^6 j.t.k. na gram lub mililitr produktu opanowuje środowisko w sposób natychmiastowy (badania własne ZTF IBPRS, wyniki niepublikowane). W ten sposób czas, w którym drobnoustroje niepożądane mogą się rozwijać w produkcie i wydzielać do niego szkodliwe metabolity (toksyny, mikotoksyny) zostaje znacznie ograniczony.

W kulturach starterowych, przeznaczonych do otrzymywania różnych produktów fermentowanych, często stosowane są kolekcyjne szczepy drobnoustrojów o różnych źródłach pochodzenia, dobrane na podstawie charakterystyki biochemicznej, fizjologicznej i genetycznej. W ostatnich latach konsumenci coraz częściej zauważają, że produkowanie żywności w ten sposób prowadzi do utraty tradycyjnego, charakterystycznego smaku (tracimy tzw. "smaki dzieciństwa") i do ujednolicenia smaku wyrobów niezależnie od kraju i regionu.

Za charakterystyczne właściwości sensoryczne produktów fermentowanych odpowiedzialne są tzw. endogenne, zawarte w surowcu, szczepy bakterii fermentacji mlekowej, którym ostatnio poświęca się coraz większą uwagę (przyjęte zostało dla nich określenie Non-Starter Lactic Acid Bacteria – NSLAB) (Ammor i wsp. 2004). W obrębie szeroko pojętych badań mikrobiologicznych rozwija się nowy kierunek – ekologia drobnoustrojów.

Sporządzenie wieloskładnikowych kultur starterowych do kiszenia warzyw i owoców (soków warzywnych i owocowych), zawierających bakterie fermentacji mlekowej naturalnie obecne w surowcu (wyizolowane z odpowiednich surowców roślinnych) pozwoliłoby na zachowanie charakterystycznego, tradycyjnego smaku kiszonek przy jednoczesnym osiągnięciu wszelkich korzyści płynących ze stosowania kultur starterowych. W

przetwórstwie ekologicznym należałoby zastosować bakterie wyizolowane z owoców i warzyw pochodzących z gospodarstw (upraw) ekologicznych, gdyż według Rozporządzenia Rady WE nr 834/2007 w rolnictwie ekologicznym można stosować wyłącznie kultury zawierające bakterie wyizolowane ze środowiska naturalnego.

Podkreślić należy, że warzywa fermentowane, w tym również soki, nie muszą być poddawane procesowi pasteryzacji, o ile będą przechowywane w warunkach chłodniczych. Wtedy ich przydatność do spożycia maksymalnie może wynosić około 6 tygodni, a gwarantowany bezpieczny okres na pewno nie jest krótszy niż 3 tygodnie (badania własne ZTF IBPRS, wyniki niepublikowane). Rezygnacja z procesu pasteryzacji będzie sprzyjała zwiększeniu prozdrowotnych właściwości fermentowanych produktów owocowych i warzywnych dzięki obecności w nich żywych, wyselekcjonowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej.

2. Cel badań

Celem zrealizowanych badań była próba poprawy jakości i właściwości prozdrowotnych ekologicznych kiszonek warzywnych i owocowych przy zastosowaniu wyselekcjonowanych kultur bakterii fermentacji mlekowej.

3. Zakres badań

- W pierwszym etapie prac została przeprowadzona charakterystyka i porównanie mikroflory surowców pochodzących z upraw ekologicznych oraz konwencjonalnych. Oceniono liczbę bakterii fermentacji mlekowej (LAB) jak i drobnoustrojów patogennych oraz niepożądanych w procesie przetwórczym (bakterie z rodzaju *Salmonella* i *Clostridium*, z rodziny Enterobacteriaceae, pleśnie i drożdże).
- W IBPRS wykonano w skali laboratoryjnej kiszonki z warzyw i owoców ekologicznych poprzez poddanie ich spontanicznej fermentacji. Z otrzymanych kiszonek oraz surowych owoców i warzyw wyizolowano bakterie fermentacji mlekowej.
- Wyizolowane bakterie fermentacji mlekowej zidentyfikowano pod względem przynależności gatunkowej
- Przeprowadzono charakterystykę biotechnologiczną nowo wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej w aspekcie ich przydatności do zastosowania w kulturach starterowych do otrzymywania fermentowanych warzyw i soków warzywno-owocowych.
- Na podstawie uzyskanych wyników badań został opracowany skład kultur starterowych. Opracowane kultury starterowe użyto do sporządzenia kiszonek warzywnych oraz fermentowanych soków warzywno-owocowych w warunkach mikrotechnicznych w IBPRS.
- Oceniono jakość mikrobiologiczną oraz sensoryczną otrzymanych produktów.
- W przetwórni warzyw i owoców ekologicznych BioFood przeprowadzono próby otrzymywania kiszonek warzywnych oraz fermentowanych soków z warzyw i

owoców, pochodzących z upraw ekologicznych. Do zapoczątkowania procesu fermentacji zastosowano kultury starterowe zawierające nowo wyizolowane bakterie fermentacji mlekowej będące mikroflorą autochtoniczną roślinnych surowców ekologicznych. Oceniono jakość sensoryczną otrzymanych produktów

- Na podstawie wyników tych prób opracowano metodę produkcji ekologicznych soków z kiszonych warzyw.

4. Metody badań

W pracy zastosowano następujące metody mikrobiologiczne:

- oznaczanie liczby bakterii fermentacji mlekowej (na podłożu agarowym MRS, zgodnie z normą PN-EN 15787: 2009 oraz przy użyciu agaru Smith-Lorenza z purpurą bromokrezolową według PN-ISO 15214:2002)
- wykrywanie i identyfikacja drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* (według PN-ISO 21528-2:2005 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Cz. 2 Metoda płytkowa).
- oznaczanie liczby bakterii *Salmonella spp.* z zastosowaniem specjalistycznego podłoża agarowego Rambach firmy Merck,
- oznaczanie liczby bakterii tworzących śluz PN-90 A-75052/09:1994;
- oznaczanie liczby bakterii z rodzaju *Clostridium* (zgodnie z PN-ISO 15213:2005 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby bakterii redukujących siarczan (IV) rosnących w warunkach beztlenowych)
- oznaczanie drożdży i pleśni (według 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 oraz w podłożu agar YGC zgodnie z PN-EN ISO 7954:1999)

Izolację szczepów LAB przeprowadzono poprzez kilkakrotne pasażowanie w podłożu MRS. Tak oczyszczony materiał był wstępnie oceniony poprzez obserwację morfologii komórek w obrazie mikroskopowym. Identyfikację przynależności gatunkowej wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzono za pomocą testów API 50 CH firmy BioMerieux oraz metodą genetyczną poprzez analizę sekwencji genu 16S rDNA.

Izolację DNA przeprowadzano z 2 ml bakteryjnej hodowli nocnej za pomocą GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma). 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, 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.

Dodatkowo wykonano analizę fingerprinting DNA wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej metodą RAPD-PCR. 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).

Ponadto przeprowadzono analizę genu *recA*. Amplifikację fragmentu genu *recA* przeprowadzono 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 i reakcji PCR ukierunkowanej na gen *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) przez 50 min pod napięciem 10 V/cm, natężeniem 300 mA. Zastosowano zasilacz EV243 firmy Consort.

Ocena właściwości biotechnologicznych wyizolowanych LAB obejmowała ocenę zdolności do wzrostu, do syntezy kwasu mlekowego [D(-) i L(+)] oraz aktywność antymikrobiologiczną wobec panelu szczepów patogennych i niepożądanych w procesie produkcji. Badania wykonano w temperaturze 25°C i 37°C,

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 metodą enzymatyczną, przy użyciu testów firmy Boehringer- Mannheim.

Aktywność antybakteryjną badanych szczepów oceniono wobec panelu szczepów wskaźnikowych należących do gatunków: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella saintpaul*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* oraz z rodzaju *Bacillus*, pochodzących z kolekcji IBPRS i z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (PIWET) w Puławach.

Na podstawie uzyskanych wyników badań opracowano skład kultur starterowych.

Wstępnym kryterium wyboru LAB do kultur starterowych była ich wysoka aktywność antymikrobiologiczna, ilość syntetyzowanego kwasu mlekowego oraz dobry wzrost w temperaturach 25°C i 37°C.

Opracowane kultury starterowe zostały użyte do sporządzenia kiszonek warzywnych oraz fermentowanych soków warzywno- owocowych w warunkach mikrotechnicznych w IBPRS .

Oceniono jakość mikrobiologiczną oraz sensoryczną otrzymanych produktów.

Do oceny sensorycznej zastosowano metodę opisaną w PN-ISO 4121:1998. Ocena ogólnej akceptowalności produktu przez zespół degustatorów spełniających wymagania odnośnej normy.

Otrzymane kiszonki, wykazujące odpowiednią jakość mikrobiologiczną i sensoryczną były przechowywane w warunkach chłodniczych przez okres pięciu tygodni. Po tym okresie oceniono ich trwałość, oznaczając przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej.

Szczepy bakterii fermentacji mlekowej, których zastosowanie pozwoliło na uzyskanie charakteryzujących się najwyższą jakością organoleptyczną i mikrobiologiczną produktów zostały użyte w zakładzie przetwórstwa owoców i warzyw ekologicznych Żywność Ekologiczna Bio Food Sp. z o.o. w Ciechocinie. Ocena organoleptyczna produktów została wykonana przez przedstawicieli firmy Bio - Food według metodyki IBPRS, po przeszkoleniu przez pracownika Zakładu Technologii Fermentacji IBPRS.

5. Wyniki badań

Charakterystyka mikroflory surowców pochodzących z upraw ekologicznych oraz konwencjonalnych

W warzywach i owocach wybranych do kiszenia oznaczono liczbę bakterii fermentacji mlekowej oraz liczebność drobnoustrojów patogennych i nie pożądaných w procesie przetwórczym (bakterie z rodzajów *Salmonella* i *Clostridium*, z grupy coli, pleśnie, drożdże i bakterie śluzowe). Materiał do badań stanowiły warzywa i owoce zakupione na potrzeby projektu w kilku warszawskich sklepach z żywnością ekologiczną. Ocenę wykonano w surowcu przygotowanym do kiszenia w warunkach laboratoryjnych – warzywa i owoce były myte, obierane, rozdrabniane i zalewane solanką. Niewątpliwie czystość mikrobiologiczna tak przygotowanego surowca nie odzwierciedla warunków panujących w przemyśle, gdzie surowiec jest jedynie myty i rozdrabniany. Warunki sporządzania kiszonek odpowiadały warunkom ich otrzymywania w gospodarstwie domowym. Dodatkowo oceniono również mikroflorę kiszonek otrzymanych w wyniku trwającej siedem dni fermentacji spontanicznej, gdyż były one jednym ze źródeł do izolacji szczepów bakterii fermentacji mlekowej.

Pierwszym ocenionym surowcem były buraki ekologiczne. Oceniono pięć partii tego surowca, pochodzących z różnych sklepów. W przypadku tego warzywa udało się również ocenić mikroflorę buraków przygotowanych do kiszenia w warunkach przemysłowych.

Dla porównania wykonano ocenę mikroflory dwóch partii buraków z upraw nie ekologicznych. Surowiec z upraw nie ekologicznych nie był poddawany fermentacji. Wyniki przedstawiono w tabelach 1-3.

Tabela 1

Ocena mikroflory buraków ekologicznych przygotowanych do kiszenia (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$1,7 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^1$	<i>n.w.</i>	$2,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	<i>n.w.</i>
Partia II	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	<i>n.w.</i>	$3,0 \times 10^2$	<i>n.w.</i>	$5,0 \times 10^1$
Partia III	$5,0 \times 10^3$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	$3,0 \times 10^1$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>
Partia IV	$1,0 \times 10^7$	<i>n.w.</i>	$1,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	<i>n.w.</i>	$4,0 \times 10^1$	$3,2 \times 10^5$
Partia V	<i>n.w.</i>	$1,0 \times 10^1$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>

Partia I, II i III, V – buraki myte, obierane, szatkowane, kiszone w ZF

Partia IV – buraki przygotowane do kiszenia w warunkach przemysłowych (Bio-food Ciechocin) myte, nieobierane, krojone ; n.w. nie wykryto

Tabela 2

Ocena mikroflory buraków ekologicznych po 7 dniach fermentacji spontanicznej w temperaturze pokojowej (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	<i>n.w.</i>	$2,0 \times 10^2$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	$1,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^2$	<i>n.w.</i>
Partia II	$3,0 \times 10^1$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	$5,0 \times 10^7$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>
Partia III	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	$1,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^6$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>
Partia IV	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	$1,0 \times 10^2$	<i>n.w.</i>	$1,0 \times 10^8$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>
Partia V	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>	$8,0 \times 10^7$	<i>n.w.</i>	<i>n.w.</i>

Tabela 3

Ocena mikroflory buraków nie ekologicznych (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$4,0 \times 10^4$	n.w.	n.w.	n.w.	$3,0 \times 10^3$	n.w.	$1,0 \times 10^3$
Partia II	$7,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^2$	n.w.	$2,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^1$	n.w.	$2,0 \times 10^2$

n.w. - nie wykryto

W burakach pochodzących z upraw ekologicznych wykazano duże zróżnicowanie mikroflory w zależności od partii surowca. W większości przypadków (partie I – IV) wykazano obecność bakterii z grupy coli na poziomie 10^3 - 10^7 j.t.k/ml. Zgodnie z przewidywaniami, najgorszą czystością mikrobiologiczną charakteryzowała się partia IV, przygotowana do kiszenia w warunkach przemysłowych, gdzie warzywa były tylko myte – liczebność bakterii z grupy coli była na poziomie 10^7 j.t.k/ml, również liczebność pleśni, drożdży i bakterii śluzowych była w tym przypadku najwyższa. Najlepszą czystością mikrobiologiczną charakteryzowała się partia V, w której wykazano jedynie obecność pojedynczych komórek bakterii z rodzaju *Salmonella*. Przebadane partie buraków charakteryzowały się niską liczebnością bakterii fermentacji mlekowej – w dwóch przypadkach nie wykazano obecności tej grupy bakterii, w pozostałych ich liczba była na poziomie od 10^1 do 10^3 j.t.k/ml. Charakterystyka mikrobiologiczna buraków pochodzących z upraw nie ekologicznych nie różniła się w sposób znaczący od charakterystyki surowca ekologicznego. W procesie spontanicznej fermentacji większość drobnoustrojów nie pożądanych uległa wyeliminowaniu, jednakże w jednym przypadku (partia II) przeżyły nieliczne komórki bakterii z grupy coli, w partii II bakterie z rodzaju *Salmonella*, w partii I bakterie z rodzaju *Clostridium* i w partii IV pleśnie oraz nieliczne bakterie śluzowe. Jakkolwiek liczebność tych grup drobnoustrojów nie była wysoka, to jednak ich obecność w produkcie przeznaczonym do spożycia „na surowo” (bez pasteryzacji) jest niedopuszczalna. Po procesie fermentacji liczebność bakterii fermentacji mlekowej osiągnęła poziom od 10^6 do 10^8 j.t.k/ml., czyli poza jednym przypadkiem (partia III) była zadowalająca.

Kolejnym ocenionym surowcem była papryka. W przypadku tego warzywa udało się ocenić jedynie kiszonki przygotowane w warunkach laboratoryjnych, gdyż w trakcie trwania projektu papryka nie była przetwarzana w warunkach przemysłowych. Paprykę do kiszenia myto, pozbawiano gniazd nasiennych i krojono. Analogicznie jak w przypadku buraków oceniono mikroflorę papryki przygotowanej do kiszenia, poddanej spontanicznej fermentacji oraz papryki z upraw nie ekologicznych. Wyniki przedstawiono w tabelach 4 – 6.

Tabela 4

Ocena mikroflory papryki ekologicznej przygotowanej do kiszenia (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$8,0 \times 10^4$	n.w.	$2,5 \times 10^2$	n.w.	$4,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	n.w.
Partia II	$1,3 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.

n.w. - nie wykryto

Tabela 5

Ocena mikroflory papryki ekologicznej po 7 dniach fermentacji spontanicznej w temperaturze pokojowej (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$3,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	n.w.	n.w.	$3,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^2$	n.w.
Partia II	n.w.	$4,0 \times 10^1$	n.w.	$3,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$	n.w.	n.w.

n.w. - nie wykryto

Tabela 6

Ocena mikroflory papryki nie ekologicznej (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$5,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^3$	n.w.	$4,0 \times 10^1$
Partia II	$3,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	n.w.	$4,0 \times 10^1$	$6,5 \times 10^2$	n.w.	$5,7 \times 10^1$

n.w. - nie wykryto

Podobnie jak w przypadku buraków mikroflora papryki z upraw ekologicznych i nie ekologicznych nie różniła się w sposób znaczący. W papryce nie ekologicznej wykazano obecność bakterii śluzowych, których nie wykryto w papryce ekologicznej. Liczba bakterii fermentacji mlekowej w obu przypadkach była zbliżona i wynosiła od $7,0 \times 10^1$ do $4,0 \times 10^3$ j.t.k/ml. W papryce poddanej fermentacji spontanicznej niestety przeżyły wszystkie grupy drobnoustrojów nie pożądanych – w partii I bakterie z grupy coli na poziomie 10^3 j.t.k/ml i *Clostridium* na poziomie 10^2 j.t.k/ml, w obydwu partiach bakterie z rodzaju *Salmonella*, w

partii II liczebność drożdży wzrosła z 10^2 do 10^5 j.t.k/ml. Jest to o tyle nie oczekiwane, że liczba bakterii fermentacji mlekowej osiągnęła poziom 10^8 j.t.k/ml, a więc była wysoka.

W tabelach od 7 do 9 przedstawiono charakterystykę mikrobiologiczną jabłek. W przypadku tego surowca oceniano jabłka ekologiczne przygotowane do kiszenia w postaci krojonej (ze skórą i gniazdami nasiennymi), soku z jabłek obieranych, otrzymanego przy użyciu sokowirówki oraz, w postaci uzyskanych przy użyciu szatkownicy, wiórków z jabłek obieranych. Jabłka szatkowane mieszane były z szatkowanymi burakami w proporcji 1:2. Podobnie jak w przypadku papryki jabłka oceniane były wyłącznie w warunkach laboratoryjnych, gdyż w trakcie trwania projektu jabłka nie były przetwarzane w warunkach przemysłowych. Do oceny mikroflory jabłek z upraw nie ekologicznych wybrano cztery różne odmiany, najczęściej spotykane w handlu: Reneta, Champion, Kortland i Ligol.

Tabela 7

Ocena mikroflory jabłek ekologicznych przygotowanych do kiszenia (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$4,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$	n.w.	$1,5 \times 10^2$	n.w.	n.w.
Partia II	$1,0 \times 10^2$	n.w.	n.w.	$1,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.
Partia III	$1,0 \times 10^2$	n.w.	n.w.	$4,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^4$	n.w.	n.w.
Partia IV	$1,0 \times 10^1$	n.w.	$1,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$
Partia V	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$	$2,2 \times 10^1$	$2,8 \times 10^3$	$3,1 \times 10^1$

*Partia I – jabłka krojone, Partia II i IV – sok z jabłek, Partia III i V – szatkowane jabłka z burakami
n.w. nie wykryto*

Tabela 8

Ocena mikroflory jabłek ekologicznych po 7 dniach fermentacji spontanicznej w temperaturze pokojowej (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$1,2 \times 10^6$	n.w	n.w	$7,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^1$	$2,5 \times 10^3$
Partia II	n.w	n.w	n.w	$3,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^2$	n.w
Partia III	n.w	n.w	$1,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^7$	n.w	n.w
Partia IV	n.w	n.w	$1,2 \times 10^2$	$5,0 \times 10^4$	$4,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^2$	n.w.
Partia V	n.w	n.w	$8,0 \times 10^1$	$4,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^7$	$2,8 \times 10^2$	n.w

n.w. nie wykryto

Tabela 9

Charakterystyka mikroflory czterech popularnych odmian jabłek nie ekologicznych (j.t.k/ml)

Odmiana jabłek	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Reneta	n.w	n.w	n.w	$2,0 \times 10^3$	n.w	n.w	n.w
Champion	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	n.w	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	n.w	$2,0 \times 10^3$
Kortland	n.w	n.w	n.w	$1,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	n.w	$1,0 \times 10^3$
Ligol	n.w	n.w	n.w	$7,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	n.w	$1,0 \times 10^2$

n.w. nie wykryto

W przypadku jabłek stwierdzono największe różnice mikroflory pomiędzy surowcem ekologicznym i nie ekologicznym. We wszystkich partiach jabłek ekologicznych wykazano obecność bakterii z grupy coli, natomiast w przypadku jabłek nie ekologicznych tylko w owocach z odmiany Champion. W owocach nie ekologicznych nie wykryto w ogóle obecności pleśni oraz bakterii z rodzaju *Clostridium*. Liczba bakterii fermentacji mlekowej w obydwu przypadkach była na zbliżonym poziomie. Po procesie fermentacji spontanicznej w większości partii (I, II, IV i V) przeżyły bakterie z rodzaju *Clostridium*, w partii I bardzo znacznemu namnożeniu uległy bakterie z grupy coli, liczba ich wzrosła z 10^1 do 10^6 j.t.k/ml. Bakterie fermentacji mlekowej osiągnęły niższą liczebność niż w przypadku fermentowanych buraków i papryki – w partiach I, II i IV na poziomie 10^6 j.t.k/ml, w pozostałych dwóch – 10^7 j.t.k/ml.

Kolejnym analizowanym surowcem były ogórki pochodzące z upraw ekologicznych i nie ekologicznych. Wyniki przedstawiono w tabelach od 10 do 12.

Tabela 10

Ocena mikroflory ogórków ekologicznych przygotowanych do kiszenia (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$2,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^3$	n.w	$2,0 \times 10^2$
Partia II	$7,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$

n.w- nie wykryto

Tabela 11

Ocena mikroflory ogórków ekologicznych po 7 dniach fermentacji spontanicznej w temperaturze pokojowej (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	n.w	n.w	$2,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^8$	n.w	n.w
Partia II	n.w	n.w	$3,4 \times 10^3$	$4,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^8$	n.w	$1,0 \times 10^1$

n.w- nie wykryto

Tabela 12

Ocena mikroflory ogórków nie ekologicznych (j.t.k/ml)

Nr partii	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$1,2 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	Nie wykryto	$8,0 \times 10^2$	n.w	$1,0 \times 10^3$
Partia II	$2,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$	n.w	n.w

n.w- nie wykryto

Wykazano, że podobnie jak w przypadku innych analizowanych w projekcie warzyw, mikroflora ogórków z upraw ekologicznych i nie ekologicznych nie różniła się w sposób znaczący. W procesie fermentacji spontanicznej bakterie fermentacji mlekowej osiągnęły liczebność na poziomie 10^8 j.t.k/ml, pomimo tego ogórki kiszone zawierały dość dużą liczbę pleśni (na poziomie 10^3 j.t.k/ml) oraz drożdży (na poziomie od 10^4 do 10^5 j.t.k/ml).

W projekcie wykonano również próbę kiszenia pietruszki ekologicznej. Pietruszkę kiszono w postaci uzyskanego, przy użyciu sokowirówki, soku z obranych warzyw oraz w postaci „wiórków” uzyskanych przy użyciu szatkownicy. Wyniki oceny mikroflory przedstawiono w tabelach 13 – 15.

Tabela 13

Ocena mikroflory pietruszki ekologicznej przygotowanej do kiszenia (j.t.k/ml)

	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$1,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$	n.w	$7,0 \times 10^2$	n.w	$4,0 \times 10^3$
Partia II	$9,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	n.w.	$1,0 \times 10^2$	n.w	$7,0 \times 10^2$

Partia I – sok

Partia II – pietruszka szatkowana

n.w- nie wykryto

Tabela 14

Ocena mikroflory pietruszki ekologicznej po 7 dniach kiszenia w temperaturze pokojowej (j.t.k/ml)

	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$3,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.	n.w.	$4,0 \times 10^7$	n.w.	n.w.
Partia II	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	$4,0 \times 10^8$	n.w.	n.w

Partia I – sok, Partia II – pietruszka szatkowana

n.w- nie wykryto

Tabela 15

Ocena mikroflory pietruszki nie ekologicznej (j.t.k/ml)

	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$3,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^3$	$2,7 \times 10^1$	n.w.	$4,8 \times 10^2$	n.w.	$7,5 \times 10^2$
Partia II	$1,2 \times 10^3$	$6,5 \times 10^2$	$4,5 \times 10^1$	n.w.	$45,2 \times 10^2$	n.w.	$3,5 \times 10^2$

Partia I – sok, Partia II – pietruszka szatkowana

n.w- nie wykryto

Podobnie jak w przypadku pozostałych warzyw mikroflora pietruszki pochodzącej z upraw ekologicznych i nie ekologicznych nie różniła się w sposób znaczący. W wyniku procesu fermentacji spontanicznej liczba bakterii fermentacji mlekowej osiągnęła poziom $10^7 - 10^8$ j.t.k/ml, natomiast mikroorganizmy nie pożądane uległy praktycznie całkowitej eliminacji – jedynie w partii I (sok) przeżyły nieliczne bakterie z grupy coli.

W warunkach przemysłowych, w przetwórci warzyw ekologicznych Bio – Food, podjęto próbę przygotowania kiszonej cukinii. Wykonano jedną partię produktu, w ilości 20 kg. Oceniono mikroflorę cukinii przygotowanej do kiszenia oraz po siedmiu dniach fermentacji spontanicznej. Wyniki przedstawiono w tabeli 16. Z uwagi na fakt, że fermentowana cukinia uzyskiwała negatywną opinię producenta dalszych prób fermentowania tego warzywa nie wykonano, jak również nie podjęto izolacji szczepów bakterii fermentacji mlekowej z tego środowiska.

Tabela 16

Ocena mikroflory cukinii ekologicznej (j.t.k/ml)

	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Partia I	$7,0 \times 10^5$	n.w.	$8,0 \times 10^2$	n.w.	$1,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^4$
Partia II	n.w.	n.w.	$3,0 \times 10^1$	n.w.	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^4$

Partia I – cukinia przygotowana do kiszenia

Partia II – cukinia po siedmiu dniach fermentacji spontanicznej

n.w- nie wykryto

Dla porównania oceniono mikroflorę jednej partii cukinii nie ekologicznej. Podobnie jak w cukinii pochodzącej z upraw ekologicznych nie wykryto bakterii z rodzaju *Salmonella*, nie wykazano obecności bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz stwierdzono obecność bakterii z grupy coli w ilości $5,0 \times 10^1$ jtk/ml. Liczba pleśni, drożdży i bakterii śluzowych w cukinii pochodzącej z upraw ekologicznych i nie ekologicznych była na zbliżonym poziomie.

W tabeli nr 17 przedstawiono ocenę mikroflory wszystkich przebadanych w projekcie surowców ekologicznych. Jak widać, różnice w obecności mikroorganizmów nie pożądanych są dość znaczne i zależą od partii warzyw, co ma bardzo duży wpływ na przebieg i efekt końcowy procesu technologicznego.

Tabela 17

**Obecność drobnoustrojów niepożądanych oraz bakterii fermentacji mlekowej w surowcach ekologicznych przygotowanych do kiszenia
(j.t.k/ml)**

Rodzaj surowca	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	Bakterie fermentacji mlekowej
Buraki	$5,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^7$	$0 - 6,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^1 - 1,0 \times 10^3$	$0 - 2,0 \times 10^2$	$0 - 5,0 \times 10^2$	$0 - 3,2 \times 10^5$	$0 - 2,2 \times 10^3$
Papryka	$1,3 \times 10^3 - 8,0 \times 10^4$	$0 - 5,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2 - 6,0 \times 10^2$	$0 - 2,0 \times 10^2$	$0 - 1,0 \times 10^2$	n.w.	$7,0 \times 10^1 - 4,0 \times 10^3$
Jabłka	$4,5 \times 10^1 - 1,0 \times 10^2$	$0 - 1,0 \times 10^1$	$0 - 2,0 \times 10^2$	$0 - 1,0 \times 10^3$	$0 - 2,6 \times 10^2$	$0 - 1,6 \times 10^4$	$6,0 \times 10^1 - 6,0 \times 10^4$
Ogórki	$7,0 \times 10^2 - 2,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^2 - 6,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 4,0 \times 10^2$	$0 - 4,0 \times 10^1$	$0 - 1,0 \times 10^1$	$0 - 1,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2 - 4,0 \times 10^3$
Pietruszka	$9,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2 - 2,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1 - 6,0 \times 10^1$	n.w	n.w	$7,0 \times 10^2 - 4,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 7,0 \times 10^2$
Cukinia	$0 - 7,0 \times 10^5$	n.w	$0 - 8,0 \times 10^2$	n.w	$0 - 2,0 \times 10^1$	$0 - 4,0 \times 10^4$	$0 - 1,0 \times 10^4$

n.w. –nie wykryto

Izolacja i identyfikacja bakterii fermentacji mlekowej z warzyw i owoców pochodzących z upraw ekologicznych

Z przebadanych w ramach realizacji projektu ekologicznych buraków, papryki, ogórków i jabłek wyizolowano szczepy bakterii fermentacji mlekowej w celu komponowania kultur starterowych dla przetwórstwa ekologicznego. Izolację prowadzono z materiału przed i po procesie fermentacji spontanicznej. Pietruszka i cukinia, jakkolwiek ocenione pod względem mikrobiologicznym, nie były środowiskiem do izolacji bakterii fermentacji mlekowej, gdyż uzyskane z nich produkty fermentowane, nie wzbudziły zainteresowania producenta żywności ekologicznej. Przynależność gatunkową wyizolowanych szczepów określono wstępnie przy użyciu enzymatycznych testów API BioMerieux, a następnie poprzez analizę materiału genetycznego. Wyniki izolacji przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18

Szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z warzyw i owoców ekologicznych

Źródło izolacji	Gatunek wg API	Gatunek wg analizy sekwencji 16S rDNA
Buraki nie fermentowane	<i>Lactobacillus delbruecki</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> B I N
Buraki nie fermentowane	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> B II N
Buraki fermentowane	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> B I F
Buraki fermentowane	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> B II F
Buraki fermentowane	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i> B III F
Buraki fermentowane	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> B IV F
Buraki fermentowane	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> B V F
Papryka nie fermentowana	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> P I N
Papryka fermentowana	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> P I F
Papryka fermentowana	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> P II F
Papryka fermentowana	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> P III F
Papryka fermentowana	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> P IV F
Jabłka nie fermentowane	<i>Lactobacillus delbruecki lactis</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
Jabłka fermentowane	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> J I F
Jabłka fermentowane	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> J II F
Jabłka fermentowane	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> J III F
Jabłka fermentowane	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> J IV F
Jabłka fermentowane	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> J V F
Ogórki fermentowane	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus diolivorans</i> O I F
Ogórki fermentowane	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus diolivorans</i> O II F
Ogórki fermentowane	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus diolivorans</i> O III F
Ogórki fermentowane	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> O IV F

Szczepy wyizolowane z buraków oznaczono symbolem B, z papryki symbolem P, z jabłek symbolem J oraz z ogórków symbolem O. Literą N oznaczono szczepy wyizolowane z surowca niefermentowanego, natomiast literą F szczepy pochodzące z kiszonek uzyskanych po procesie fermentacji spontanicznej. Łącznie ze wszystkich badanych środowisk wyizolowano 21 szczepów, z których większość należała do gatunku *Lactobacillus plantarum*. Z jabłek niefermentowanych wyizolowano szczep, który we wstępnej charakterystyce, przy użyciu testów API został zakwalifikowany do gatunku *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*, natomiast po poddaniu analizie genetycznej został zidentyfikowany jako *Staphylococcus pasteurii*. Jest to gatunek gronkowca z grupy koagulazoujemnych, dla których organizm ludzki jest naturalnym gospodarzem (Kloos, 1997). Gronkowce tego gatunku są izolowane z żywności, zanieczyszczonej wody i ścieków, ale również z materiałów klinicznych. *S. pasteurii* należy do tej samej grupy bakterii, co *S. epidermidis*, odpowiedzialny za dużą część zakażeń szpitalnych, szczególnie u osób z wszczepami materiałów obcych i obniżoną odpornością (Hryniewicz, 1996). W ostatnich latach wzrasta oporność gronkowców na większość dostępnych w leczeniu antybiotyków (Sobiś – Glinkowska, Szewczyk, 2004). Szczep ten został wyeliminowany z dalszych badań.

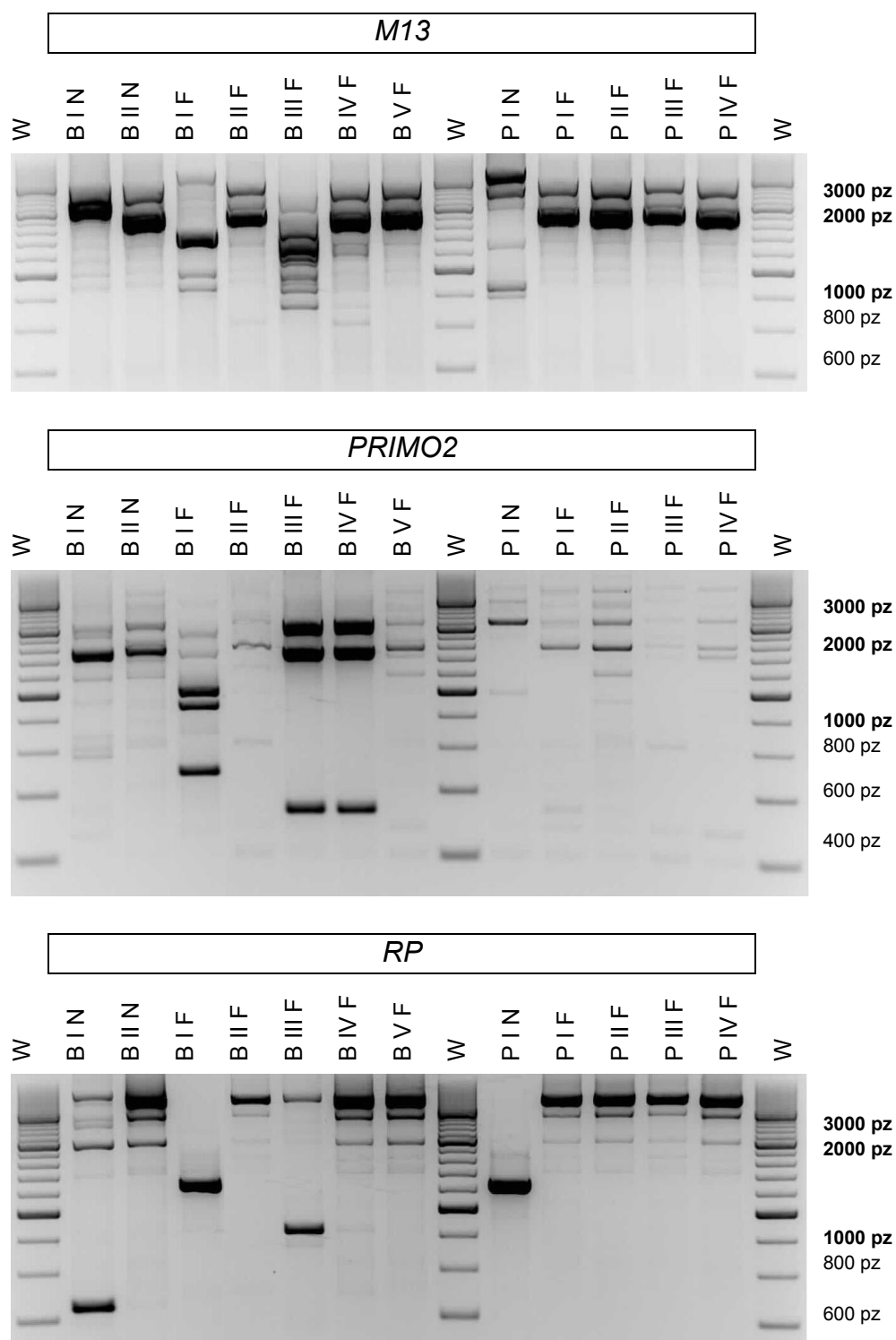
W celu oceny zróżnicowania wewnątrzgatunkowego szczepów izolowanych z surowców ekologicznych przeprowadzona została również reakcja RAPD-PCR. Reakcja przebiegała w obecności jednego z trzech różnych primerów (*M13*, *PRIMO2* lub *RP*). Każdy z primerów zbudowany był z 10 do 15 nukleotydów. Tak krótka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

Wyniki reakcji RAPD-PCR z primerem *M13*, przeprowadzonej w pierwszej kolejności, wykazały obecność 8 różnych szczepów lub grup szczepów. Były to dwa szczepy *Lc. mesenteroides* (PIN izolowany z papryki oraz jednorodne JIF i JIIF izolowane z jabłek), jeden szczep *Sc. pasteurii* (JIN izolowany z jabłek), jeden szczep *L. fermentum* (BIIF izolowany z buraków). W przypadku *L. plantarum* otrzymano unikatowe wzory prążków dla szczepów BIF i BIVF izolowanych z buraków oraz dla szczepu JVF izolowanego z jabłek. Pozostałe szczepy *L. plantarum* izolowane z każdego z badanych surowców dawały podobne wzory produktów. Do grupy tej przyporządkowano w sumie 9 szczepów izolowanych z: buraków (BIIN, BIIF, BVF), papryki (PIF, PIIF, PIIIF, PIVF) i jabłek (JIIF, JIVF).

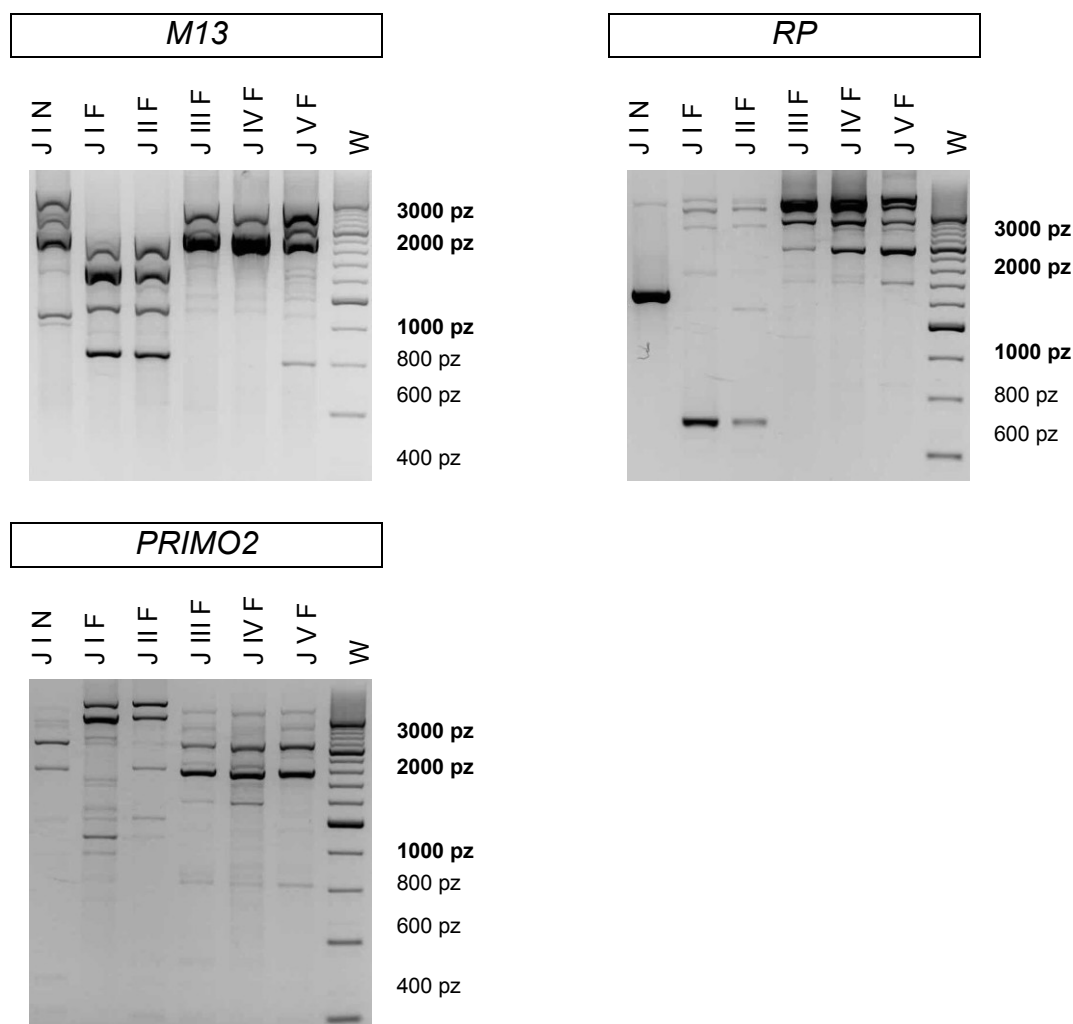
Udokumentowana w ten sposób homogenność ostatniej grupy szczepów *L. plantarum* zweryfikowana została dzięki przeprowadzonej w kolejnym etapie reakcji RAPD-PCR z primerami *RP* lub *PRIMO2*. Otrzymane w ten sposób elektroforegramy były podstawą do wyodrębnienia z tej grupy szczepu PIVF, który wyróżniał się obecnością dwóch produktów o długości ok. 1600 pz powstałych w mieszaninie reakcyjnej zawierającej primer *PRIMO2*.

Dzięki reakcjom RAPD-PCR z primerami *PRIMO2* i *RP* udokumentowano również różnice sekwencji genomu pomiędzy szczepami *Lc. mesenteroides* izolowanymi z jabłek (JIF i JIIF) początkowo zaklasyfikowanymi jako jednorodne w oparciu o wynik reakcji z primerem *M13*.

Wyniki przedstawiono na rysunkach 1 i 2.



Rys. 1. Różnicowanie szczepów izolowanych z ekologicznych buraków i papryki metodą RAPD-PCR przy udziale primera *M13*, *PRIMO2* lub *RP*. W – wzorzec długości DNA.

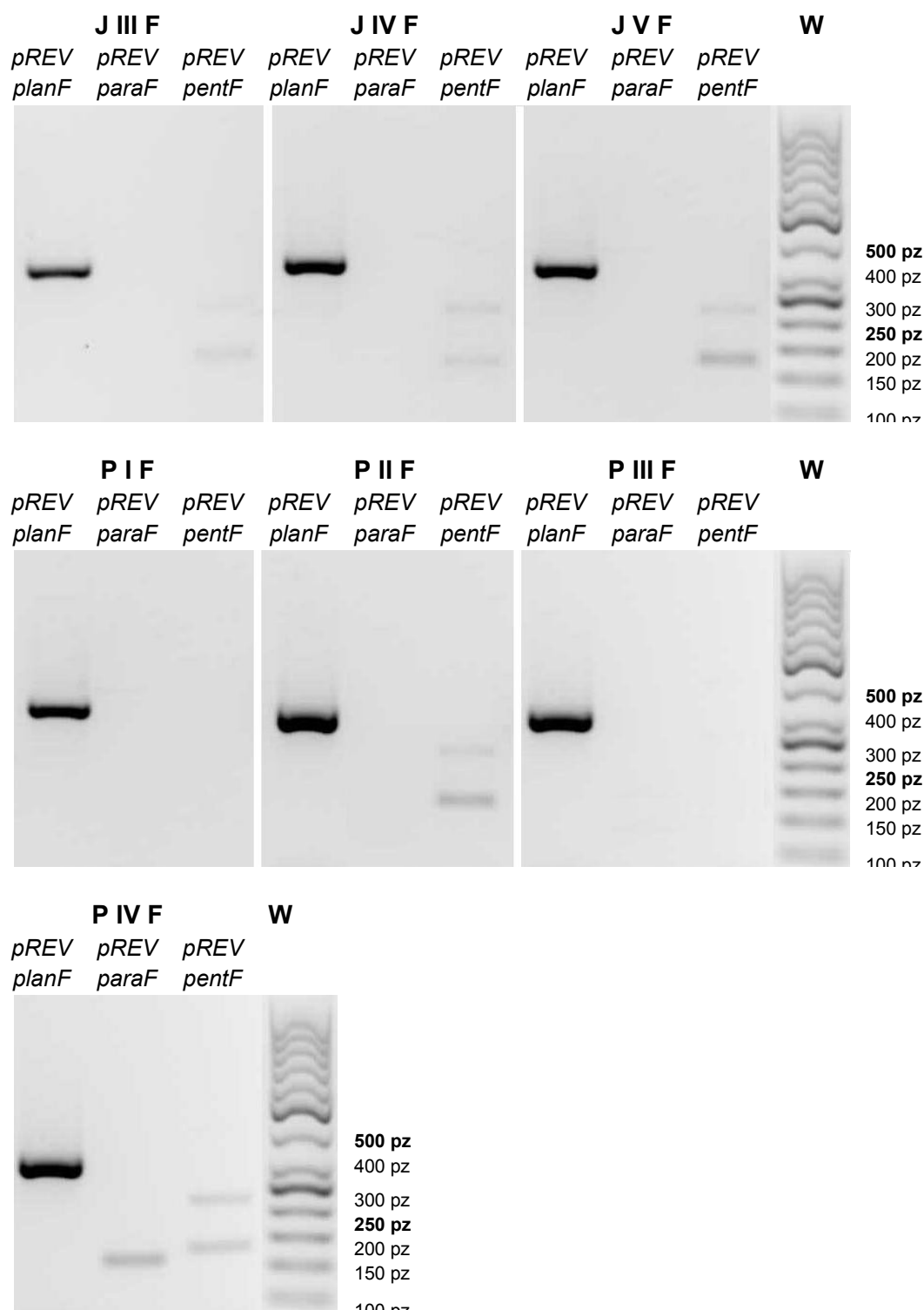


Rys. 2. Różnicowanie szczepów izolowanych z ekologicznych jabłek metodą RAPD-PCR przy udziale primera *M13*, *PRIMO2* lub *RP*. W – wzorzec długości nici DNA.

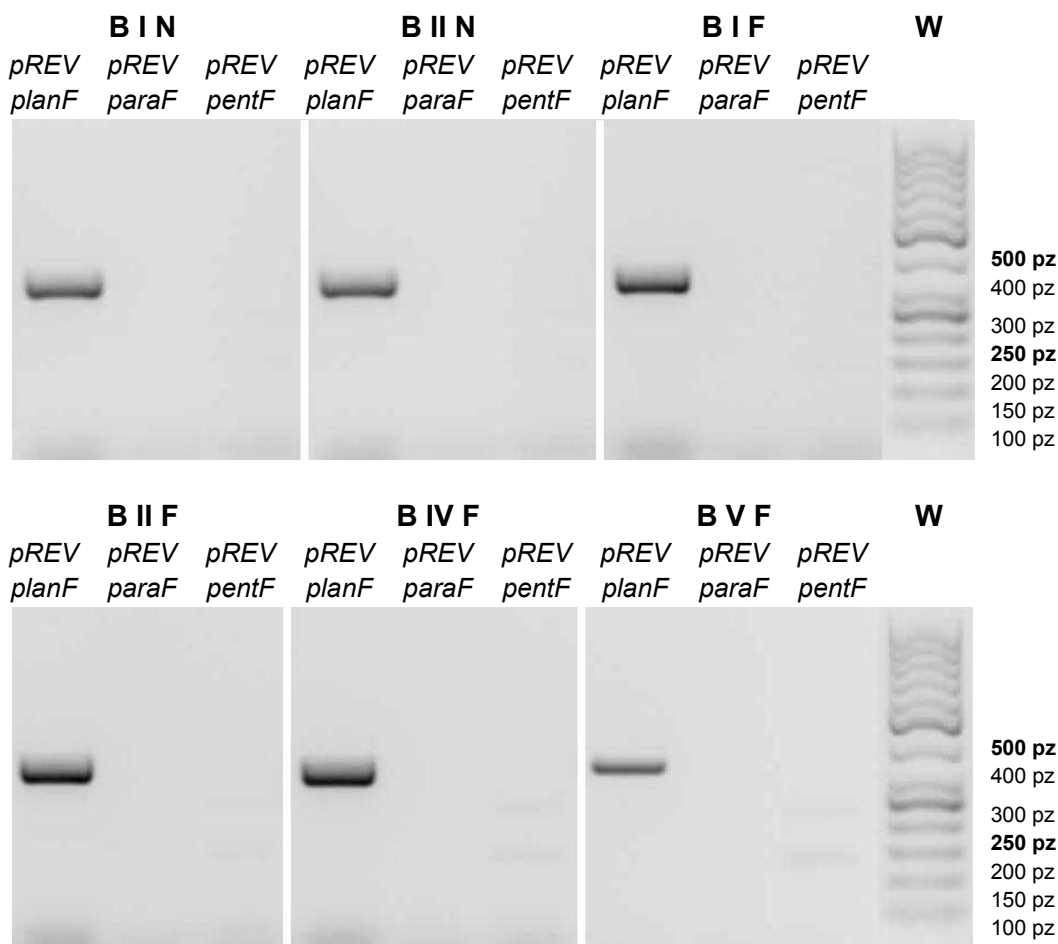
W przypadku szczepów *L. plantarum* wyniki analizy porównawczej sekwencji genu 16S rDNA były niejednoznaczne i informowały o jednakowym podobieństwie badanych sekwencji do sekwencji 16S rDNA bakterii *L. paraplantarum* i *L. pentosaceus*. Bakterie *L. plantarum*, *L. paraplantarum* i *L. pentosaceus* 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 pz 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.

Wyniki przedstawiono na rysunkach 3 i 4.



Rys. 3. Amplifikacja fragmentu genu *recA* szczepów izolowanych z ekologicznych jabłek i papryki przeprowadzona z udziałem primerów *pREV/planF*, *pREV/paraF* lub *pREV/pentF*. W – wzorzec długości nici DNA.



Rys. 4. Amplifikacja fragmentu genu *recA* szczepów izolowanych z ekologicznych buraków przeprowadzona z udziałem primerów *pREV/planF*, *pREV/paraF* lub *pREV/pentF*. W – wzorzec długości nici DNA.

Charakterystyka biotechnologiczna nowo wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej

W celu określenia przydatności nowo wyizolowanych szczepów do zastosowania w kulturach starterowych do otrzymywania fermentowanych warzyw i owoców przeprowadzono ich charakterystykę biotechnologiczną. Pierwszym ocenionym parametrem była zdolność szczepów do wzrostu. Ocenę przeprowadzono w dwóch temperaturach - 37° (standardowa temperatura hodowli szczepów bakterii fermentacji mlekowej) i 25° C (temperatura fermentacji prowadzonej w warunkach przemysłowych). Wyniki oceny zdolności do wzrostu nowo wyizolowanych szczepów przedstawiono w tabeli nr 19.

Tabela 19

Ocena zdolności do wzrostu szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z surowców ekologicznych (j.t.k/ml)

Symbol szczepu	temp. 37°C	temp. 25°C
<i>Lactobacillus plantarum B I N</i>	$1,6 \times 10^8$	$7,3 \times 10^6$
<i>Lactobacillus plantarum B II N</i>	$1,0 \times 10^8$	$6,4 \times 10^6$
<i>Lactobacillus plantarum B I F</i>	$1,5 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum B II F</i>	$1,3 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
<i>Lactobacillus fermentum B III F</i>	$1,1 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum B IV F</i>	$1,0 \times 10^9$	$5,3 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum B V F</i>	$5,6 \times 10^9$	$7,8 \times 10^9$
<i>Leuconostoc mesenteroides P I N</i>	$1,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^7$
<i>Lactobacillus plantarum P I F</i>	$4,1 \times 10^9$	$7,2 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum P II F</i>	$3,6 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum P III F</i>	$4,0 \times 10^9$	$7,7 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum P IV F</i>	$4,2 \times 10^9$	$9,3 \times 10^9$
<i>Leuconostoc mesenteroides J I F</i>	$5,0 \times 10^8$	$3,2 \times 10^9$
<i>Leuconostoc mesenteroides J II F</i>	$2,0 \times 10^8$	$3,2 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum J III F</i>	$6,0 \times 10^9$	$8,0 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum J IV F</i>	$2,8 \times 10^9$	$7,7 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum J V F</i>	$3,6 \times 10^9$	$6,5 \times 10^9$
<i>Lactobacillus diolivorans O I F</i>	$4,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
<i>Lactobacillus diolivorans O II F</i>	$2,2 \times 10^9$	$7,7 \times 10^8$
<i>Lactobacillus diolivorans O III F</i>	$1,8 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
<i>Lactobacillus brevis O IV F</i>	$4,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$

Hodowle prowadzono w podłożu MRS przez 24 godziny.

Większość wyizolowanych szczepów charakteryzowała się jednakowo dobrym wzrostem, w obydwu badanych temperaturach. Jedynie w przypadku dwóch szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum*, wyizolowanych z buraków niefermentowanych, wzrost w temperaturze 25° C był wyraźnie gorszy niż w temperaturze 37° C i był na poziomie 10^6 j.t.k/ml. Również szczep *Leuconostoc mesenteroides* wyizolowany z papryki nie fermentowanej charakteryzował się słabszym wzrostem w temperaturze 25° C – liczebność komórek była na poziomie 10^7 j.t.k/ml, podczas gdy w 37°C wynosiła 10^9 j.t.k/ml.

Kolejnym ocenianym parametrem była zdolność badanych szczepów do biosyntezy kwasu mlekowego. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 20.

Tabela 20

Ilość kwasu mlekowego syntetyzowana przez wyizolowane szczepy (g/l)

Symbol szczepu	Temperatura 37°C			Temperatura 25°C		
	Forma D	Forma L	Suma	Forma D	Forma L	Suma
<i>Lactobacillus plantarum B I N</i>	0,6	2,4	3,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus plantarum B II N</i>	0,3	2,1	2,4	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus plantarum B I F</i>	9,2	3,2	12,4	9,2	0,0	9,2
<i>Lactobacillus plantarum B II F</i>	7,4	0,8	8,2	6,7	0,0	6,7
<i>Lactobacillus fermentum B III F</i>	4,3	2,3	6,6	3,4	1,9	5,3
<i>Lactobacillus plantarum B IV F</i>	5,9	4,8	10,7	6,7	3,5	10,2
<i>Lactobacillus plantarum B V F</i>	8,6	4,5	13,1	10,1	2,1	12,2
<i>Leuconostoc mesenteroides P I N</i>	1,3	0,2	1,5	0,2	0,8	1,0
<i>Lactobacillus plantarum P I F</i>	7,8	2,9	10,7	10,9	1,8	12,7
<i>Lactobacillus plantarum P II F</i>	7,1	3,1	10,2	10,1	1,8	11,9
<i>Lactobacillus plantarum P III F</i>	6,2	2,8	9,0	10,6	2,5	13,1
<i>Lactobacillus plantarum P IV F</i>	8,0	2,7	10,7	9,3	1,4	10,7
<i>Leuconostoc mesenteroides J I F</i>	4,0	0,0	4,0	5,2	0,0	5,2
<i>Leuconostoc mesenteroides J II F</i>	4,2	0,2	4,4	4,7	0,8	5,5
<i>Lactobacillus plantarum J III F</i>	7,9	5,7	13,6	10,4	2,2	12,6
<i>Lactobacillus plantarum J IV F</i>	8,9	3,5	12,4	9,1	2,4	11,5
<i>Lactobacillus plantarum J V F</i>	8,9	2,8	11,7	4,9	0,3	5,2
<i>Lactobacillus diolivorans O I F</i>	2,0	0,3	2,3	0,8	1,6	2,4
<i>Lactobacillus diolivorans O II F</i>	2,5	0,4	2,9	0,4	0,3	0,7

<i>Lactobacillus diolivorans</i> O III F	5,5	6,2	11,7	1,0	2,8	3,8
<i>Lactobacillus brevis</i> O IV F	2,0	0,8	2,8	2,4	2,4	4,8

Hodowle prowadzono w podłożu MRS przez 24 godziny

Wyizolowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej charakteryzowały się bardzo dużym zróżnicowaniem pod względem ilości syntetyzowanego kwasu mlekowego. W przypadku większości badanych szczepów ilość kwasu mlekowego syntetyzowanego w temperaturach 25° i 37° C była zbliżona i osiągała wartości od 2,4 do 13,1 g/l. Szczepy wyizolowane z surowca nie poddanego fermentacji syntetyzowały wyraźnie mniej kwasu od szczepów wyizolowanych z surowca fermentowanego – od 1,5 do 3,0 g/l. W przypadku dwóch z tych szczepów, wyizolowanych z buraków niefermentowanych, w odcieku po hodowlach prowadzonych w temperaturze 25° w ogóle nie wykazano obecności tego metabolitu. W grupie szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z owoców i warzyw fermentowanych zdecydowanie wyróżniała się grupa szczepów pochodzących z ogórków. Szczepy te syntetyzowały w temperaturze 25° C niewielkie ilości kwasu – od 0,7 do 4,8 g/l. W przypadku szczepu oznaczonego symbolem O III F zaobserwowano znaczną dysproporcję pomiędzy ilością kwasu syntetyzowanego w 37° C (11,7 g/l) i 25° C (3,8 g/l).

Na podstawie wykonanej oceny biosyntezy kwasu mlekowego można stwierdzić, że większość szczepów pochodzących z surowca fermentowanego nadaje się do włączenia w skład kultur starterowych do kiszenia owoców i warzyw.

Kolejnym aspektem oceny biotechnologicznej nowo wyizolowanych szczepów była zdolność do hamowania rozwoju bakterii patogennych i niepożądanych w żywności. Ocenę wykonano wobec panelu jedenastu szczepów wskaźnikowych, należących do rodzajów *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria* i *Bacillus*. Wyniki, wyrażone w wielkości średnicy stref zahamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych przez jednakowe ilości odcieku po hodowli szczepów bakterii fermentacji mlekowej, przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21

Ocena zdolności wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej do hamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych

Badane szczepy	°C	S. enteri- tidis 1	S. enteri- tidis 2	S. saint- paul	S. typhi- murium	S. virchow	E. coli 1	E. coli 2	B. subtilis	B. cereus	L. monocy- togenes 1	L. monocy- togenes 2
<i>Lactobacillus plantarum</i> B I N	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	37	-	-	5	-	5	-	-	-	-	-	5
<i>Lactobacillus plantarum</i> B II N	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Lactobacillus plantarum</i> B I F	25	-	-	10	10	12	16	15	12	12	-	
	37	-	-	10	10	11	19	24	17	17	-	
<i>Lactobacillus plantarum</i> B II F	25	-	-	8	6	10	14	15	9	9	-	
	37	-	-	5	5	10	-	-	9	8	-	
<i>Lactobacillus fermentum</i> B III F	25	-	-	10	10	10	12	15	10	9	-	10
	37	-	-	10	10	12	12	15	10	10	-	13
<i>Lactobacillus plantarum</i> B IV F	25	-	-	10	10	10	12	17	14	14	-	-
	37	-	-	12	12	10	12	17	12	13	-	13
<i>Lactobacillus plantarum</i> B V F	25	-	-	10	10	10	15	17	12	14	-	-
	37	-	-	10	10	10	15	17	14	17	-	12
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> P I N	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	37	-	-	4	5	5	-	-	-	-	-	12
<i>Lactobacillus plantarum</i> P I F	25	-	-	10	7	10	15	15	17	13	-	5
	37	-	-	10	10	10	18	24	20	13	-	12
<i>Lactobacillus plantarum</i> P II F	25	-	-	10	8	10	15	15	17	14	-	-
	37	-	-	10	10	12	18	24	20	18	-	-
<i>Lactobacillus</i>	25	-	-	10	8	10	15	15	18	14	-	-

<i>plantarum P III F</i>	37	-	-	10	10	10	14	20	19	16	-	-
<i>Lactobacillus plantarum P IV F</i>	25	-	-	10	8	10	12	15	14	13	-	10
	37	-	-	10	10	10	18	20	18	15	-	11
<i>Leuconostoc mesenteroides J I F</i>	25	-	-	5	6	8	-	-	7	8	-	9
	37	-	-	4	5	8	-	-	5	7	-	11
<i>Leuconostoc mesenteroides J II F</i>	25	-	-	5	8	8	-	-	7	7	-	10
	37	-	-	4	5	7	-	-	5	6	-	10
<i>Lactobacillus plantarum J III F</i>	25	-	-	10	10	12	15	15	14	12	-	12
	37	-	-	9	11	11	24	24	16	15	-	12
<i>Lactobacillus plantarum J IV F</i>	25	-	-	10	10	12	15	15	13	12	-	14
	37	-	-	9	10	11	19	20	15	15	-	14
<i>actobacillus plantarum J V F</i>	25	-	-	10	10	10	15	10	12	11	-	-
	37	-	-	11	10	10	20	25	15	15	-	-
<i>Lactobacillus diolivorans O I F</i>	25	-	-	5	-	5	-	-	-	-	-	10
	37	-	-	9	8	5	15	-	11	10	-	17
<i>Lactobacillus diolivorans O II F</i>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	37	-	-	8	8	9	15	-	9	10	-	11
<i>Lactobacillus Diolivorans O III F</i>	25	-	-	5	-	5	10	10	15	12	-	10
	37	-	-	12	5	10	10	10	14	13	-	13
<i>Lactobacillus brevis O IV F</i>	25	-	-	5	-	5	-	-	6	7	-	12
	37	-	-	5	9	9	15	-	14	11	-	12

Wartości liczbowe zawarte w tabeli przedstawiają wielkość stref zahamowania wzrostu wyrażoną w mm

W grupie wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej szczepy pochodzące z surowca niefermentowanego wyróżniały się znikomą aktywnością antybakteryjną, co jest skorelowane z niewielką ilością syntetyzowanego kwasu mlekowego. Wszystkie szczepy wyizolowane z surowca poddanego fermentacji charakteryzowały się dobrą lub bardzo dobrą zdolnością do hamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych (w niektórych przypadkach wielkość stref zahamowania wzrostu miała średnicę nawet 20 mm). Badane szczepy hamowały rozwój ośmiu z jedenastu użytych w doświadczeniu szczepów bakterii patogennych i niepożądanych w żywności, w tym trzech gatunków z rodzaju *Salmonella*, dwóch gatunków z rodzaju *Escherichia*, dwóch gatunków z rodzaju *Bacillus* oraz jednego z rodzaju *Listeria*. Nieoczekiwanie wysoką aktywnością antybakteryjną w stosunku do niewielkich ilości syntetyzowanego kwasu, charakteryzowały się szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z kiszonek ogórków. Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność szczepów do komponowania kultur starterowych do kiszenia warzyw i owoców.

Opracowanie składu kultur starterowych. Użycie kultur starterowych do sporządzenia kiszonek oraz ocena jakości sensorycznej i mikrobiologicznej otrzymanych produktów

W następnej fazie realizacji projektu opracowano skład kultur starterowych zawierających nowo wyizolowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Przy wyborze szczepów kierowano się zarówno wynikami wykonanej oceny przydatności biotechnologicznej, jak i potrzebą zachowania możliwie dużej różnorodności gatunkowej. Dlatego też w wykonanych doświadczeniach zastosowano szczepy wyizolowane z surowca nie poddanego fermentacji pomimo iż uzyskały one gorsze wyniki w charakterystyce przydatności biotechnologicznej. Kultury starterowe zastosowano w próbach kiszenia owoców i warzyw w warunkach laboratoryjnych. Otrzymane kiszonki poddawano ocenie mikrobiologicznej oraz przy odpowiedniej czystości mikrobiologicznej również ocenie organoleptycznej.

Pierwszym, poddanym fermentacji ukierunkowanej (przy użyciu kultur starterowych) surowcem były buraki ćwikłowe, z których po procesie fermentacji uzyskiwano sok. Wyniki oceny mikrobiologicznej i organoleptycznej przedstawiono w tabelach 22 i 23.

Tabela 22

Ocena mikrobiologiczna fermentowanego soku z buraków ćwikłowych (j.t.k/ml) - doświadczenie 1

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia	LAB po 5 tygodniach przechowywania
Fermentacja spontaniczna	$3,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.	$4,0 \times 10^6$	n.w.	n.w.	$4,5 \times 10^7$	$9,0 \times 10^5$
L. plantarum B I N	n.w.	n.w.	n.w.	$2,0 \times 10^7$	n.w.	n.w.	$2,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$
L. plantarum B II F	n.w.	n.w.	n.w.	$8,0 \times 10^3$	n.w.	n.w.	$4,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$
L.fermentum B III F	$6,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.	$1,6 \times 10^4$	n.w.	n.w.	$3,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
L. plantarum B IV F	n.w.	n.w.	n.w.	$2,0 \times 10^4$	n.w.	n.w.	$5,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$
Kultura mieszana I	n.w.	n.w.	n.w.	$3,2 \times 10^5$	n.w.	n.w.	$5,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
Kultura mieszana II	n.w.	n.w.	n.w.	$3,0 \times 10^5$	n.w.	n.w.	$3,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^6$

Kultura mieszana I zawierała szczepy L. plantarum B I N, L. fermentum B III F, L. plantarum IV F w równych proporcjach.

Kultura mieszana II zawierała szczepy L. plantarum B I N, L. plantarum IV F, L. plantarum B V F w równych proporcjach.

Do kiszenia zastosowano solankę zawierającą 2,5 % soli, początkowa liczebność bakterii kultury starterowej wynosiła 10^5 j.t.k/ml zalewy.

Tabela 23

Ocena organoleptyczna fermentowanego soku z buraków ćwikłowych - doświadczenie 1

Wariant doświadczenia cecha	Fermentacja spontan.	L. plantarum B I N	L. plantarum B II F	L. fermentum B III F	L. plantarum B IV F	Kultura mieszana I	Kultura mieszana II
Barwa i wygląd	5,75	5,75	5,75	6,0	5,5	4,5	5,5
Zapach	5,25	4,25	4,37	4,5	4,62	5,0	4,62
Smak	4,25	4,5	4,62	4,37	5,0	4,33	5,0
Ocena hedoniczna	6,25	6,75	7,25	7,0	7,0	6,75	6,25

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Kultura mieszana I zawierała szczepy L. plantarum B I N, L. fermentum B III F, L. plantarum IV F w równych proporcjach.

Kultura mieszana II zawierała szczepy L. plantarum B I N, L. plantarum IV F, L. plantarum B V F w równych proporcjach.

W wyniku fermentacji spontanicznej oraz przy użyciu kultury mieszanej I uzyskano sok o barwie brązowo-czerwonej, mętny. W przypadku użycia jako kultury starterowej szczepu *L. plantarum* B I N powierzchnia soku pokryta była kożuchem drożdży. Na podstawie tych wyników obydwie warianty kultur starterowych wyeliminowano z dalszych badań. Wynik oceny mikrobiologicznej otrzymanych soków był zasadniczo korzystny, gdyż nie wykazano w nich obecności bakterii patogennych. Jedynie w przypadku próby kontrolnej oraz użycia jako kultury starterowej szczepu *L. fermentum* B III F przeżyły nieliczne komórki bakterii z grupy *coli*. Liczba bakterii fermentacji mlekowej we wszystkich sokach otrzymanych przy użyciu kultur starterowych była wysoka i wynosiła 10^8 j.t.k/ml (w próbie kontrolnej 10^7 j.t.k/ml). Niestety, w znacznym stopniu namnożyły się w badanych sokach drożdże – na poziomie od 10^4 do 10^7 j.t.k/ml. Jest to trudne do uniknięcia, gdyż wiele szczepów drożdży dobrze toleruje niskie pH, a także wchodzi z bakteriami fermentacji mlekowej w zależności o charakterze synergistycznym lub komensalnym (badania IBPRS, dane nie publikowane). Natomiast istotnym jest, że w sokach były nieobecne pleśnie. Po 5 tygodniach przechowywania w sokach uzyskanych przy użyciu kultur starterowych liczba żywych bakterii fermentacji mlekowej była nadal wysoka i wynosiła od 10^6 do 10^8 j.t.k/ml. Wyjątek stanowił sok fermentowany przy użyciu szczepu *L. plantarum* B I N, w którym liczba bakterii fermentacji mlekowej wynosiła 10^5 j.t.k/ml i była niższa niż w próbie kontrolnej.

W dalszej części realizacji projektu ponownie wykonano próby otrzymywania fermentowanego soku z buraków przy użyciu kultur starterowych. W doświadczeniach ponownie użyte zostały szczepy *L. plantarum* B II F, *L. fermentum* B III F oraz *L. plantarum* B IV F, dla których uzyskano w pierwszej części doświadczeń najlepsze wyniki oceny organoleptycznej i kulturę mieszaną II, dla której wynik oceny był poprawny. Ponadto do doświadczeń włączono szczep *L. plantarum* B V F, który nie był do tej pory oceniany. W tych doświadczeniach nieznacznie zwiększono ilość soli w solance (z 2,5 % na 3%), natomiast nie zwiększono liczebności kultury starterowej – pozostała ona na poziomie 10^5 j.t.k/ml zalewy. Otrzymane soki poddano ocenie mikrobiologicznej i organoleptycznej, wyniki przedstawiono w tabelach 24 i 25.

Tabela 24

Ocena mikrobiologiczna fermentowanego soku z buraków ćwikłowych (j.t.k/ml) - doświadczenie 2

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia	LAB po 5 tygodniach przechowywania
Fermentacja spontaniczna	n.w.	n.w.	$4,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	n.w.	n.w.	$4,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
<i>L. plantarum</i> B II F	n.w.	n.w.	n.w.	$2,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.	$2,0 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$
<i>L. fermentum</i> B III F	n.w.	n.w.	n.w.	$1,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.	$1,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> B IV F	n.w.	n.w.	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	n.w.	n.w.	$1,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$
<i>L. plantarum</i> B V F	n.w.	n.w.	n.w.	$6,0 \times 10^2$	n.w.	n.w.	$2,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$
Kultura mieszana II	n.w.	n.w.	n.w.	$6,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.	$3,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$

Kultura mieszana II zawierała szczepy L. plantarum B I N, L. plantarum IV F, L. plantarum B V F w równych proporcjach.

n.w. - nie wykryto

Tabela 25

Ocena organoleptyczna soku z buraków ćwikłowych - doświadczenie 2

Wariant doświadczenia	Fermentacja spontaniczna	L. plantarum B II F	L. fermentum B III F	L. plantarum B IV F	L. plantarum B V F	Kultura mieszana II
Cecha						
Barwa i wygląd	2,0	6,0	5,75	6,0	6	6,0
Zapach	2,0	4,25	5,25	4,75	5	3,5
Smak	2,0	4,50	5,25	4,75	5,25	3,5
Ocena hedoniczna	1,5	5,75	8,0	7,0	9	4,25

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Kultura mieszana II zawierała szczepy L. plantarum B I N, L. plantarum IV F, L. plantarum B V F w równych proporcjach.

Otrzymane w tej części doświadczeń soki charakteryzowały się dobrą jakością mikrobiologiczną. Nie wykazano obecności bakterii niepożądanych. W dwóch przypadkach – próba kontrolna i kultura starterowa *L. plantarum* B IV F – wykazano obecność nielicznych pleśni. Liczba bakterii fermentacji mlekowej była wysoka i wynosiła 10^8 j.t.k/ml (w próbie kontrolnej 10^7 j.t.k/ml). Po 5 tygodniach przechowywania liczba ta pozostała na poziomie 10^7 – 10^8 j.t.k/ml. We wszystkich przypadkach wykazano obecność drożdży ale na dużo niższym poziomie niż w poprzednim doświadczeniu. Liczebność drożdży była na poziomie 10^1 – 10^2 j.t.k/ml w sokach otrzymanych przy użyciu kultur starterowych i na poziomie 10^3 j.t.k/ml w próbie kontrolnej.

W ocenie hedonicznej najlepiej wypadły soki otrzymane przy użyciu szczepów B III F, B IV F i B V F (maksymalna ocena w stosowanej punktacji). Nisko oceniony został sok otrzymany przy użyciu kultury mieszanej II i szczególnie nisko wypadła w ocenie hedonicznej próba kontrolna.

W celu potwierdzenia dotychczas uzyskanych wyników dotyczących rezultatów stosowania kultur starterowych do otrzymywania fermentowanego soku z ekologicznych buraków ćwikłowych doświadczenie powtórzono po raz trzeci. Jako kultury starterowe zostały użyte szczepy *L.fermentum* BIIIF i *L.plantarum* BVF, które w dotychczasowych doświadczeniach uzyskały najlepsze wyniki w ocenie organoleptycznej. W doświadczeniu zwiększono liczebność bakterii kultury starterowej z 10^5 j.t.k/ml do 10^6 j.t.k/ml. Wytypowane szczepy zostały zastosowane jako monokultury oraz w postaci kultury mieszanej. Uzyskane soki poddano ocenie mikrobiologicznej i organoleptycznej. Wyniki przedstawiono w Tabelach 26 i 27.

Tabela 26

Ocena mikrobiologiczna fermentowanego soku z buraków ćwikłowych (j.t.k/ml) - doświadczenie 3

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia	LAB po 5 tygodniach przechowywania
Fermentacja spontaniczna	n.w.	n.w.	$2,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^3$	n.w.	n.w.	$4,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
L.fermentum B III F	n.w.	n.w.	n.w.	$1,0 \times 10^1$	n.w.	n.w.	$1,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
L. plantarum B V F	n.w.	n.w.	n.w.	$1,5 \times 10^3$	n.w.	n.w.	$6,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$
Kultura mieszana III	n.w.	n.w.	n.w.	$8,0 \times 10^2$	n.w.	n.w.	$7,8 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$

Kultura mieszana III zawierała szczepy L. fermentum B III F i L. plantarum B V F w równych proporcjach.

n.w. - nie wykryto

Tabela 27

Ocena organoleptyczna soku z kiszonych buraków - doświadczenie 3

Wariant doświadczenia cecha	L.fermentum B III F	L. plantarum B V F	Kultura mieszana III
Barwa i wygląd	5,6	6	6,3
Zapach	4,6	6	6
Smak	4	5,6	5,3
Ocena hedoniczna	7	8	8

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Kultura mieszana III zawierała szczepy *L. fermentum B III F* i *L. plantarum B V F* w równych proporcjach.

W trzeciej próbie otrzymywania fermentowanych soków z buraków w wyniku fermentacji spontanicznej uzyskano sok o barwie brunatno-czerwonej i konsystencji bardzo gęstego kisielu. Ze względu na te cechy organoleptyczne sok uzyskany w efekcie fermentacji spontanicznej nie został poddany ocenie organoleptycznej, jakkolwiek jego charakterystyka mikrobiologiczna nie budziła zastrzeżeń – poza nielicznymi pleśniami (na poziomie 10^1 j.t.k/ml) w soku tym nie były obecne mikroorganizmy niepożądane. Soki otrzymane z użyciem kultur starterowych BIIIF i BVF oraz mieszaniny tych szczepów charakteryzowały się również dobrą jakością mikrobiologiczną i otrzymały dobre wyniki w ocenie organoleptycznej. We wszystkich sokach liczba bakterii fermentacji mlekowej była na poziomie 10^8 j.t.k/ml, tak więc zwiększenie liczebności inokulum nie wpłynęło na ostateczną liczbę bakterii fermentacji mlekowej w produkcie. Po pięciu tygodniach przechowywania liczba bakterii fermentacji mlekowej w zasadzie nie uległa obniżeniu.

W wyniku wszystkich przeprowadzonych doświadczeń, dotyczących otrzymywania fermentowanych soków z buraków, do przeprowadzenia prób w zakładzie przetwórczym i otrzymania próbnej partii towaru zostały wybrane dwa szczepy - *L.fermentum* BIIIF i *L.plantarum* BVF.

W kolejnym etapie realizacji projektu wykonano próby otrzymywania papryki kiszzonej przy użyciu kultur starterowych zawierających bakterie fermentacji mlekowej wyizolowane z papryki ekologicznej. Ponieważ z papryki fermentowanej wyizolowano wyłącznie szczepy należące do gatunku *L.plantarum*, zdecydowano się na użycie jako jednego z wariantów kultur starterowych szczepu *Leuconostoc mesenteroides*, wyizolowanego z papryki niefermentowanej, pomimo tego, że w charakterystyce biotechnologicznej nie został on oceniony wysoko. Wyniki oceny mikrobiologicznej i organoleptycznej kiszzonej papryki przedstawiono w Tabelach 28 i 29.

Tabela 28

Ocena mikrobiologiczna kiszonej papryki (j.t.k/ml)

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia	LAB po 5 tygodniach przechowywania
Fermentacja spontaniczna	$3,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	n.w.	$3,0 \times 10^7$	n.w.	n.w.	$1,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
<i>Lc. mesenteroides</i> P I N	n.w.	n.w.	n.w.	$1,5 \times 10^7$	n.w.	n.w.	$3,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> P I F	n.w.	n.w.	n.w.	$3,5 \times 10^7$	n.w.	n.w.	$4,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> P III F	n.w.	n.w.	n.w.	$3,0 \times 10^7$	n.w.	n.w.	$3,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$
Kultura mieszana	n.w.	n.w.	n.w.	$2,5 \times 10^5$	n.w.	n.w.	$1,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$

Kultura mieszana zawierała szczepy Lc. mesenteroides P I N, L. plantarum P I F, L. plantarum P III F w równych proporcjach.
n.w. nie wykryto

Tabela 29

Ocena organoleptyczna kiszonej papryki

Wariant doświadczenia Cecha	Fermentacja spontaniczna	<i>Lc. mesenteroides</i> P I N	<i>L. plantarum</i> P I F	<i>L. plantarum</i> P III F	Kultura mieszana
Barwa i wygląd	6	6	6	6	6
Zapach	5,33	4,83	4,83	4	4,66
Smak	5,33	4,66	5,16	3,66	5,5
Konsystencja	5,66	4,66	6,0	5	5,0
Ocena hedoniczna	8,33	6,66	5,0	6	7,66

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Kultura mieszana zawierała szczepy Lc. mesenteroides P I N, L. plantarum P I F, L. plantarum P III F w równych proporcjach.

Ocena mikrobiologiczna kiszzonej papryki wykazała, że w próbie kontrolnej przeżyły nieliczne bakterie z grupy coli i z rodzaju Salmonella. W próbach otrzymanych przy zastosowaniu kultur starterowych obecności tych bakterii nie wykazano. W żadnej z prób nie wykazano również obecności pleśni, bakterii śluzowych i bakterii z rodzaju Clostridium. Liczba bakterii fermentacji mlekowej we wszystkich próbach osiągnęła poziom 10^8 j.t.k/ml zalewy i liczebność ta w zasadzie nie uległa zmianie po pięciu tygodniach przechowywania. We wszystkich próbach niestety rozwinęły się drożdże, które osiągnęły liczebność 10^7 j.t.k/ml zalewy, za wyjątkiem próby uzyskanej przy użyciu mieszanej kultury starterowej – tu liczba drożdży była na poziomie 10^5 j.t.k/ml zalewy.

W ocenie organoleptycznej najlepiej wypadła papryka uzyskana w wyniku fermentacji spontanicznej oraz w wyniku zastosowania mieszanej kultury starterowej. Otrzymane wartości oceny hedonicznej były na bardzo zbliżonym poziomie: 8,33 i 7,66 pkt.

Następnie wykonano próbę otrzymywania fermentowanych soków jabłkowych. Soki poddano fermentacji spontanicznej i ukierunkowanej, przy użyciu trzech różnych kultur starterowych zawierających bakterie fermentacji mlekowej wyizolowane z jabłek ekologicznych. Soki poddano ocenie mikrobiologicznej. Wyniki przedstawiono w Tabeli 30.

Tabela 30

Ocena mikrobiologiczna soków z kiszonych jabłek (j.t.k/ml) - doświadczenie 1

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia
Fermentacja spontaniczna	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$3,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^2$	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>
Lc. mesenteroides J I F	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$2,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^2$	<i>n.w</i>	$1,0 \times 10^1$
L. plantarum J IV F	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$5,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^1$	$1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$
Kultura mieszana I	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$6,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^2$	<i>n.w</i>	$2,0 \times 10^3$

Kultura mieszana I zawierała szczepy Lc. mesenteroides J I F, L. plantarum J IV F w równych proporcjach.

Sok fermentowano bez dodatku cukru, wielkość inokulum wynosiła 10^5 jtk/ml

n.w. - nie wykryto

We wszystkich badanych sokach jabłkowych namnożyły się drożdże, natomiast liczba bakterii fermentacji mlekowej, pomimo zastosowania kultur starterowych w liczbie 10^5 j.t.k/ml soku, była bardzo niska – od 10^1 j.t.k/ml do 10^3 j.t.k/ml. W próbie kontrolnej, poddanej fermentacji spontanicznej, w ogóle nie wykazano obecności bakterii fermentacji mlekowej. Świadczy to o tym, że bakteriom fermentacji mlekowej nie udało się opanować środowiska – zostało ono zdominowane przez zawarte w soku drożdże i w rzeczywistości doszło do fermentacji typu alkoholowego. Ponieważ dodatkowo we wszystkich sokach, otrzymanych w tym doświadczeniu, wykazano po fermentacji obecność bakterii z rodzaju *Clostridium* na poziomie 10^2 j.t.k/ml, soki te nie zostały poddane ocenie organoleptycznej i nie były przechowywane.

Próbie otrzymywania fermentowanego soku jabłkowego powtórzono, zwiększając liczebność inokulum z 10^5 j.t.k/ml do 10^6 j.t.k/ml. W doświadczeniu szczep *L.plantarum* JIVF zastąpiono szczepem *L.plantarum* JVF. Wyniki oceny mikrobiologicznej i organoleptycznej soków przedstawiono w Tabelach 31 i 32.

Tabela 31

Ocena mikrobiologiczna soków z kiszonych jabłek (j.t.k/ml) - doświadczenie 2

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia
Fermentacja spontaniczna	n.w.	n.w.	n.w.	$8,4 \times 10^5$	n.w.	n.w.	$2,0 \times 10^3$
Lc. mesenteroides J II F	$1,0 \times 10^1$	n.w.	$2,0 \times 10^1$	$1,2 \times 10^6$	n.w.	n.w.	$2,0 \times 10^4$
L. plantarum J V F	n.w.	n.w.	n.w.	$1,9 \times 10^6$	n.w.	n.w.	$7,0 \times 10^4$
Kultura mieszana II	n.w.	n.w.	n.w.	$9,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$	n.w.	$5,0 \times 10^4$

Kultura mieszana II zawierała szczepy Lc. mesenteroides J II F, L. plantarum J V F w równych proporcjach.

Sok fermentowano bez dodatku cukru, wielkość inokulum wynosiła 10^6 jtk/ml.

Tabela 32

Ocena organoleptyczna soku z jabłek

Wariant doświadczenia Cecha	Fermentacja spontaniczna	Lc. mesenteroides J II F	L. plantarum J V F	Kultura mieszana II
Barwa i wygląd	5	5	5,3	5,3
Zapach	5	5	5	6
Smak	5,3	5,3	5	6
Ocena hedoniczna	8	8,3	7,6	9

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Kultura mieszana II zawierała szczepy Lc. mesenteroides J II F, L. plantarum J V F w równych proporcjach.

Pomimo zwiększenia liczebności inokulum w soku jabłkowym fermentowanym przy zastosowaniu kultur starterowych liczba bakterii fermentacji mlekowej osiągnęła poziom zaledwie 10^4 j.t.k/ml, natomiast liczba drożdży była na poziomie 10^5 - 10^6 j.t.k/ml. Ze względu na brak w otrzymanych sokach bakterii patogennych zostały one poddane ocenie organoleptycznej i w ocenie hedonicznej uzyskały nieoczekiwanie wysoką liczbę punktów – od 7,6 do 9,0 (tj. ocena maksymalna).

W kolejnym etapie realizacji projektu wykonano próby otrzymywania fermentowanego soku warzywno-owocowego, w tym przypadku buraczano-jabłkowego. Z uwagi na fakt, że do otrzymywania soków użyto buraków i jabłek w proporcji 2:1, jako kultury starterowe zastosowane zostały szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z buraków ekologicznych. Soki buraczano-jabłkowe uzyskiwano w identyczny sposób jak soki z buraków. Wyniki oceny mikrobiologicznej i organoleptycznej soków obrazują tabele 33 i 34.

Tabela 33

**Ocena mikrobiologiczna soku buraczano – jabłkowego (j.t.k/ml) –
doświadczenie 1**

Wariant doświadcze- nia	Grupa coli	Salmo- nella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia
Fermentacja spontaniczna	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	$1,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	$2,0 \times 10^7$
<i>L. fermentum</i> B III F	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	$1,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^5$	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	$2,3 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> B IV F	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	$1,0 \times 10^4$	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	$1,6 \times 10^7$
Kultura mieszana	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	$5,0 \times 10^5$	<i>n. w.</i>	<i>n. w.</i>	$2,0 \times 10^6$

*Kultura mieszana zawierała szczep *L. plantarum* B I N, *L. fermentum* B IV F, *L. plantarum* BV F w równych proporcjach (te same szczepy zawierała kultura mieszana II zastosowana do kiszenia buraków).*

Soki fermentowano bez dodatku soli, wielkość inokulum wynosiła 10^5 jtk/ml.

n. w. – nie wykryto

Tabela 34

Ocena organoleptyczna soku buraczano- jabłkowego - doświadczenie 1

Wariant doświadczenia Cecha	Fermentacja spontaniczna	L. fermentum B III F	L. plantarum B IV F	Kultura mieszana
Barwa i wygląd	5,6	5,6	6	4,6
Zapach	5,3	5,6	5,3	4,3
Smak	4	4,3	4,3	3,6
Ocena hedoniczna	5	5,3	6	4,3

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

*Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt. Kultura mieszana zawierała szczep *L. plantarum* B I N, *L. fermentum* B IV F, *L. plantarum* BV F w równych proporcjach (te same szczepy zawierała kultura mieszana II zastosowana do kiszenia buraków).*

W ocenie mikrobiologicznej w żadnym z soków nie wykazano obecności bakterii patogennych, natomiast w dwóch przypadkach – soku fermentowanego spontanicznie i z kulturą starterową BIIIF - namnożyły się pleśnie i ich liczba osiągnęła poziom 10^4 j.t.k/ml. We wszystkich sokach rozwinęły się drożdże w liczbie od 10^4 j.t.k/ml do 10^5 j.t.k/ml. Soki buraczano-jabłkowe nie uzyskały dobrych wyników w ocenie organoleptycznej, a najgorzej oceniony został sok otrzymany z użyciem mieszanej kultury starterowej – w soku tym również wykazano najniższą liczebność bakterii mlekowych. Najlepiej w badanej grupie oceniony został sok otrzymany z użyciem kultury starterowej BIVF. Z uwagi na mierną ocenę organoleptyczną, grupa soków otrzymanych w doświadczeniu 1, nie była przechowywana.

Próby otrzymywania fermentowanych soków buraczano-jabłkowych powtórzono zwiększając liczebność inokulum z 10^5 j.t.k/ml do 10^6 j.t.k/ml. Zamiast szczepu *L. fermentum* BIIIF w tych doświadczeniach użyto szczepu *Lc. mesenteroides* JIIF. Wyniki oceny tych soków przedstawiono w Tabelach 35 i 36.

Tabela 35

Ocena mikrobiologiczna soku buraczano – jabłkowego (j.t.k/ml) - doświadczenie 2

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia
Fermentacja spontaniczna	$1,3 \times 10^4$	n. w.	$3,4 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4$	n. w.	n. w.	$5,0 \times 10^8$
Lc. mesenteroides J II F	n. w.	n. w.	$2,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^5$	n. w.	n. w.	$1,2 \times 10^8$
L. plantarum B IV F	n. w.	n. w.	$1,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$	n. w.	n. w.	$2,7 \times 10^8$
Kultura mieszana	n. w.	n. w.	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^3$	n. w.	n. w.	$8,0 \times 10^8$

Kultura mieszana zawierała szczepy L. plantarum B IV F i Lc. mesenteroides J II F w równych proporcjach.

Soki fermentowano bez dodatku soli, wielkość inokulum wynosiła 10^6 j.t.k/ml.

n. w. – nie wykryto

Tabela 36

Ocena organoleptyczna soku buraczano- jabłkowego - doświadczenie 2

Wariant doświadczenia Cecha	Fermentacja spontaniczna	Lc. mesenteroides J II F	L. plantarum B IV F	Kultura mieszana
Barwa i wygląd	3	5,3	5,6	4,6
Zapach	2,6	3,6	5	4
Smak	3,3	3,3	5	3
Ocena hedoniczna	5,3	6,3	8	5

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Kultura mieszana zawierała szczepy L. plantarum B IV F i Lc. mesenteroides J II F w równych proporcjach.

Pomimo faktu, że w badanej grupie soków liczba bakterii fermentacji mlekowej osiągnęła poziom 10^8 j.t.k/ml, to we wszystkich wariantach soków wykryto obecność pleśni na poziomie 10^2 - 10^3 j.t.k/ml. Liczba drożdży była na poziomie od 10^3 j.t.k/ml do 10^6 j.t.k/ml. W tym doświadczeniu jedynie sok otrzymany przy zastosowaniu szczepu *L. plantarum* BIVF został korzystnie oceniony pod względem organoleptycznym i w ocenie hedonicznej uzyskał 8,0 pkt.

Kolejnym – i ostatnim – warzywem, którego próbę fermentacji podjęto w ramach realizacji projektu, była pietruszka ekologiczna. Pietruszkę kiszone w postaci cieniutkich "wiórków", które mogłyby stanowić dodatek do surówek, oraz w postaci soku. Ponieważ w pierwszym etapie realizacji projektu nie wyizolowano (z braku surowca) szczepów bakterii fermentacji mlekowej z pietruszki ekologicznej, w skład kultury starterowej włączono szczepy wyizolowane z buraków i papryki. Pietruszkę kiszoną w postaci "wiórków" oceniono pod

względem mikrobiologicznym i organoleptycznym, natomiast sok z pietruszki został oceniony tylko pod względem mikrobiologicznym, gdyż po procesie fermentacji charakteryzował się niekorzystnymi właściwościami: sok rozwarstwiony, barwa żółto-brunatna, mętny. Pietruszka szatkowana, kiszona w postaci cienkich "wiórków", zachowała po procesie fermentacji barwę kremową. Wyniki oceny fermentowanej pietruszki przedstawiono w Tabelach 37, 38 i 39.

Tabela 37

Ocena mikrobiologiczna pietruszki kiszonej w postaci „wiórków” (j.t.k/ml)

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia
Fermentacja spontaniczna	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$4,0 \times 10^8$
Kultura mieszana	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$2,5 \times 10^9$

Kultura mieszana do kiszenia pietruszki zawierała szczepy L. plantarum B II F, Lc. mesenteroides P I N, L. plantarum P I F, L. plantarum P III F w równych proporcjach.

Dodatek soli wynosił 2,5%, wielkość inokulum wynosiła 10^5 j.t.k/ml zalewy

n.w. nie wykryto

Tabela 38

Ocena organoleptyczna pietruszki kiszonej w postaci „wiórków”

Wariant doświadczenia	Fermentacja spontaniczna	Kultura mieszana
Cecha		
Barwa i wygląd	5,5	5,25
Zapach	5,25	5,5
Smak	4,75	3,75
Konsystencja	5,25	5,0
Ocena hedoniczna	7	5,25

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt. Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Tabela 39

Ocena mikrobiologiczna soku z kiszonej pietruszki (j.t.k/ml)

Wariant doświadczenia	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB po zakończeniu kiszenia
Fermentacja spontaniczna	$3,0 \times 10^1$	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$4,0 \times 10^7$
Kultura mieszana	<i>n.w.</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$1,2 \times 10^9$

Kultura mieszana do kiszenia pietruszki zawierała szczepy L. plantarum B II F, Lc. mesenteroides P I N, L. plantarum P I F, L. plantarum P III F w równych proporcjach.

Dodatek soli wynosił 2,5%, wielkość inokulum wynosiła 10^5 j.t.k/ml zalewy

n.w. nie wykryto

Obie postacie fermentowanej pietruszki wypadły korzystnie w ocenie mikrobiologicznej, natomiast w ocenie organoleptycznej pietruszka poddana fermentacji spontanicznej uzyskała lepszą ocenę od pietruszki fermentowanej przy użyciu kultury starterowej, ale żaden z tych wariantów nie został oceniony wysoko.

Otrzymanie partii próbnej ekologicznych soków warzywnych:

Na podstawie wyników wszystkich przeprowadzonych badań, do przeprowadzenia doświadczeń w skali przemysłowej (partia próbna) wytypowano otrzymywanie fermentowanych soków z buraków ćwikłowych. Próby zostały wykonane w kwaszarni firmy Bio-Food Sp. z o.o. w Ciechocinie. Jako kultury starterowe użyte zostały szczepy *L.plantarum* BVF i *L. fermentum* BIIIF w monokulturach. Wielkość inokulum wynosiła 10^5 j.t.k/ml zalewy. Ponadto sporządzona została próba kontrolna poddana fermentacji spontanicznej. Fermentację prowadzono przez pięć dni. Otrzymane soki zostały poddane ocenie organoleptycznej przez właściciela kwaszarni i jej personel. Z powodu braku odpowiednich warunków nie wykonano oceny mikrobiologicznej. Wyniki oceny organoleptycznej przedstawiono w Tabeli 40.

Tabela 40

Ocena organoleptyczna otrzymanych w skali produkcyjnej soków z kiszonego buraka

Wariant doświadczenia	Fermentacja spontaniczna	<i>L. plantarum</i> B VF	<i>L. fermentum</i> B III F
Cecha			
Barwa i wygląd	5	5	5
Zapach	3	5	4
Smak	2,5	5	4
Ocena hedoniczna	4,5	9,5	7

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Obydwa soki uzyskane przy użyciu kultur starterowych zostały wysoko ocenione pod względem hedonicznym, przy czym sok otrzymany z kulturą BVF dostał maksymalną notę 9,0 pkt. Wyraźnie gorszymi cechami charakteryzował się sok otrzymany w wyniku fermentacji spontanicznej, który oceniono na 4,5 pkt.

6. Instrukcja technologiczna dla przetwórnicy

We współpracy z firmą Bio – Food, w oparciu o dotychczas stosowane w przetwórnicy procedury została opracowana instrukcja technologiczna otrzymywania fermentowanego, niepasteryzowanego soku z buraków ćwikłowych ekologicznych.

6.1 Przyjęcie surowca-PUNKT krytyczny HACCP

Buraki przyjmowane do przetwórstwa muszą pochodzić z gospodarstw (upraw) ekologicznych. Każdy producent przed dostarczeniem warzyw musi przedstawić aktualny

certyfi kat gospodarstwa ekologicznego. Buraki dostarczone do zakładu sprawdza się zgodnie z normą na warzywa świeże, w trakcie sortowania odrzuca się buraki nie spełniające wymogów normy.

6.2 .Obróbka wstępna buraków

- mycie warzyw

Buraki przed przerobem myje się w myjce bębnowej wykonanej ze stali kwasoodpornej. Proces mycia obejmuje zasadnicze mycie warzyw oraz płukanie.

- rozdrobnienie buraków

Buraki przeznaczone do kwaszenia rozdrabniane są na krajanke przy pomocy rozdrabniacza Urchel, rozdrobniony jest również czosnek, który służy jak inhibitor w procesie kwaszenia. Krajankę z buraków i czosnku bezpośrednio z rozdrabniacza Urchel napełniane są zbiorniki do kwaszenia.

6.3. Przygotowanie solanki

Do produkcji warzyw kwaszonych przygotowuje się roztwór 1,95% solanki, woda wcześniej jest pasteryzowana i schładzana do temperatury 30° C. Rozdrobnione warzywa zalewane są całkowicie przygotowaną wcześniej solanką.

6.4. Przygotowanie kultury starterowej

Szczepy przeznaczone do użycia jako kultura starterowa dostarczane będą do przetwórci w postaci biomasy żywych komórek nadającej się do przechowywania w warunkach chłodniczych przez okres minimum dziesięć dni. Bezpośrednio przed rozpoczęciem procesu fermentacji odpowiednia porcja biomasy powinna zostać odważona i rozprowadzona przy użyciu wody pasteryzowanej do konsystencji mleczka, a następnie dodana bezpośrednio do zbiornika zawierającego rozdrobnione buraki i solankę. Ostateczna liczba bakterii fermentacji mlekowej w zbiorniku, w momencie rozpoczęcia ukwaszania buraków, powinna wynosić 10^6 j.t.k./ml zalewy.

6.4. Fermentacja buraków

Proces kwaszenia prowadzi się w zbiornikach, które umieszczane są w kwaszarni. Temperatura w kwaszarni przez cały czas trwania procesu utrzymywana jest na poziomie 25°C. Proces kwaszenia powinien być prowadzony przez siedem dni.

6.5. Tłoczenie soku kwaszonego

Po zakończeniu procesu fermentacji mlekowej z ukwaszonej krajanki buraka i czosnku wraz z zalewą tłoczy się sok na prasie harmonijkowej. Sok ten po tłoczeniu magazynowany jest w zbiorniku buforowym i przechowywany w temperaturze chłodniczej.

6.6. Napelnianie i zamykanie opakowań (rozlew do butelek)

Spasteryzowany sok przepompowywany jest na monoblok gdzie następuje napelnienie butelki oraz zamykanie zakrywką aluminiową ze specjalną wkładką przeznaczoną do pasteryzacji.

6.7. Etykietowanie/Datowanie

Butelki z gotowym sokiem etykietowane są na automatycznej etykieciarce ETYMAX

6.8. Pakowanie, magazynowanie

Butelki z naklejonymi etykietami pakowane są w kartony, kartony na palety. Gotowy towar przechowywany jest w suchym magazynie w temperaturze poniżej 10 °C.

6.9. Dystrybucja

Dystrybucja produktów odbywa się z magazynu wyrobów gotowych na podstawie zlecenia przekazanego z działu handlowego. Fermentowany, niepasteryzowany sok z buraków musi podlegać dystrybucji i przechowywaniu w warunkach chłodniczych.

7. Podsumowanie i dyskusja:

Jedną z gałęzi gospodarki, intensywnie rozwijaną w Unii Europejskiej, jest rolnictwo ekologiczne. W Polsce na razie rynek produktów ekologicznych rozwija się zbyt wolno w porównaniu z innymi krajami, jednakże relatywnie szybko wzrasta liczba przetwórci ekologicznych. Jednym ze sposobów rozwoju rynku produktów ekologicznych w Polsce może być wprowadzenie nowych, atrakcyjnych wyrobów, takich jak kiszonki warzywne, owocowe i owocowo-warzywne, nie poddane procesowi pasteryzacji, czyli zawierające żywe kultury bakterii. Wiadomym jest, że z uwagi na sposób nawożenia (przy użyciu nawozów naturalnych) produkty roślinne z upraw ekologicznych są w większym stopniu obciążone mikroflorą niepożądaną i patogenną niż te, które pochodzą z upraw konwencjonalnych. Obecność tego rodzaju drobnoustrojów jest niedopuszczalna w produktach spożywczych i należy ze szczególną ostrożnością traktować kiszonki i soki nie poddawane pasteryzacji. Dlatego też w ramach realizacji niniejszego projektu została podjęta próba poprawy jakości i właściwości prozdrowotnych ekologicznych kiszonek warzywnych i owocowych przy zastosowaniu wyselekcjonowanych kultur bakterii fermentacji mlekowej.

Przebadane zostały takie surowce pochodzące z upraw ekologicznych jak: buraki, papryka, ogórki, jabłka i pietruszka. Oceniono mikroflorę tych surowców pod względem obecności drobnoustrojów niepożądanych i patogennych, takich jak bakterie z grupy coli, z rodzajów *Salmonella* i *Clostridium*, bakterie śluzowe, pleśnie i drożdże, oraz pod względem obecności i liczebności bakterii fermentacji mlekowej, odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg procesu fermentacji. Mikroflorę surowców pochodzących z upraw ekologicznych porównano z mikroflorą odpowiednich surowców pochodzących z upraw nie ekologicznych. Wykazano, że mikroflora przebadanych warzyw pochodzących z upraw ekologicznych i konwencjonalnych nie różni się w sposób znaczący, za wyjątkiem obecności bakterii z rodzaju *Clostridium*, obecnych w większości próbek warzyw ekologicznych, a nieobecnych w zbadanych próbach warzyw z upraw konwencjonalnych. Wykazano bardzo duże zróżnicowanie pod względem obecności drobnoustrojów niepożądanych pomiędzy różnymi partiami surowców, co determinuje przebieg produkcji w zakładzie przetwórczym i jakość produktu. W takiej sytuacji, dla zapewnienia powtarzalnej jakości produktu konieczne jest wprowadzenie kultur starterowych. Surowcem, w przypadku którego wykazano znaczną różnicę w charakterystyce mikrobiologicznej pomiędzy tym, który pochodził z upraw ekologicznych, a tym z upraw konwencjonalnych, nieoczekiwanie okazały się jabłka. Jabłka z upraw ekologicznych na ogół charakteryzowały się obecnością bakterii z rodzaju *Clostridium*, których nie wykryto w czterech zbadanych odmianach jabłek z upraw konwencjonalnych. Jest to o tyle dziwne, że w czasie swojej wegetacji jabłko nie styka się z glebą, tak więc sposób nawożenia nie powinien mieć zasadniczego wpływu na obecne na nim drobnoustroje. Zwiększonej liczebności tego rodzaju bakterii należałoby raczej spodziewać się w warzywach korzeniowych.

Z przebadanych warzyw i owoców ekologicznych, zarówno nie fermentowanych, jak i poddanych fermentacji spontanicznej, wyizolowano 21 szczepów bakterii fermentacji mlekowej w celu użycia ich do komponowania kultur starterowych dla przetwórstwa ekologicznego. Szczepy te zostały poddane w warunkach laboratoryjnych charakterystyce biotechnologicznej i wykazano, że poza nielicznymi wyjątkami większość z nich może być włączona w skład kultur starterowych do kiszenia owoców lub warzyw. W warunkach laboratoryjnych wykonano liczne próby fermentacji surowców takich jak buraki, jabłka, papryka, pietruszka oraz soki z jabłek i pietruszki. Wykonano również próby otrzymywania warzywno-owocowego soku z buraków i jabłek. Najlepsze efekty uzyskano w przypadku prób otrzymywania soku z buraków ćwikłowych i rezultaty tych prób zostały z powodzeniem potwierdzone w warunkach przetwórczości ekologicznej Bio-Food Sp. z o.o. w Ciechocinie. Otrzymane z zastosowaniem kultur starterowych soki buraczane zostały wysoko ocenione pod względem organoleptycznym. Na podstawie wykonanych badań wydaje się, że w przypadku takiego surowca jak buraki ćwikłowe lepiej sprawdzają się kultury starterowe zawierające pojedyncze szczepy bakterii fermentacji mlekowej niż kultury wieloskładnikowe. Ponieważ korzenie buraków ćwikłowych, zwłaszcza pochodzące z upraw ekologicznych, są dobrym źródłem związków bioaktywnych o właściwościach antyoksydacyjnych (antocjany, kwasy fenolowe, witamina C) i mogą być polecane w profilaktyce zdrowotnej (Kazimierczak i wsp., 2011), wprowadzenie do handlu takiego produktu jak fermentowany sok burakowy byłoby korzystne dla konsumentów. Jediną trudnością jest zapewnienie podczas

magazynowania i dystrybucji warunków chłodniczych, ale przykłady z praktyki (tzw. soki jednodniowe) dowodzą, że jest to możliwe.

Otrzymane wyniki nie wykluczają możliwości otrzymywania dobrej jakości kiszonek z pozostałych badanych surowców ekologicznych, ale opracowanie więcej niż jednego produktu gotowego do wdrożenia w przetwórnictwo ekologiczne wymaga dłuższego okresu badań niż czas trwania tego projektu.

8. Wnioski:

- Na podstawie wyników badań stwierdzono, że za wyjątkiem obecności bakterii z rodzaju *Clostridium* przebadane warzywa z upraw ekologicznych nie były bardziej obciążone mikroflorą niepożądaną niż warzywa z upraw konwencjonalnych. Surowcem szczególnie zakażonym bakteriami *Clostridium* okazały się jabłka z upraw ekologicznych.
- Wykazano bardzo duże zróżnicowanie pod względem obecności drobnoustrojów niepożądanych pomiędzy różnymi partiami surowców ekologicznych, co determinuje przebieg produkcji w zakładzie przetwórczym i jakość produktu. W takiej sytuacji, dla zapewnienia powtarzalnej jakości produktu konieczne jest wprowadzenie kultur starterowych.
- W efekcie realizacji projektu, opracowano dwie kultury do otrzymywania fermentowanego soku z buraków ćwikłowych, charakteryzującego się dobrymi i bardzo dobrymi właściwościami organoleptycznymi. Wykazano, że w przypadku fermentowania buraków ćwikłowych lepsze efekty daje stosowanie kultur starterowych składających się z pojedynczych szczepów bakterii fermentacji mlekowej niż kultur mieszanych.
- Przy zachowaniu warunków chłodniczych niepasteryzowane fermentowane soki z buraków ćwikłowych mogą być przechowywane i dystrybuowane przez okres minimum czterech tygodni przy zachowaniu wysokiej liczby żywych bakterii fermentacji mlekowej.

9. Piśmiennictwo:

- 1) Akpinar-Bayizit A., Ozcan-Yilsay T., Yitmaz L., 2007, Study of the use of yoghurt, whey, lactic acid and starter culture on carrot fermentation, Polish J. of Food and Nutrition Sci., vol. 57, 2, 147-150.
- 2) Ammor S., Dufour E., Chevalier I., 2004, "Ecologie microbienne dirigée au niveau des ateliers fermiers de salaison: sélection de bactéries lactiques pour l'élaboration de ferment". En Résumés de Communications de 13^{ème} Colloque des Bactéries Lactiques, Nantes, 8-10 Septembre, p.9.
- 3) Caplice E., Fitzgerald G., 1999. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50, 131-149
- 4) Desai P., Sheit T., 1997, Controlled fermentation of fermentation of vegetable using mixed inoculum of lactic cultures, J. Food Sci. Technol.-Mysore, 46.357-357.

- 5) Gardner N.J., Savard T., Obermeier P., Caldwell G., Champagne C.P., 2001, "Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures", *International Journal of Food Microbiology*, 64: 261-275),
- 6) Górka Wojciech, 2001, *HASŁO ogrodnicze* nr 03.
- 7) Grajewski J., Składanowska B., Drymel W., Szczepanik K., Twarużek M., 1998, Mikrobiologiczne i mikotoksyczne skażenia wybranych surowców i mieszanek pasz treściwych, IV Konferencja Naukowa "Mikotoksyny w żywności i paszach", 155-159.
- 8) Holley R., Arrus K., Omiński K.H., Tenuta M., Blank G., 2006, Salmonella survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure, *J. Environ. Qual.*, 35, 1170-1180.
- 9) Hryniewicz W., 1996, "Oporność gronkowców na metacyklinę. Terapia i leki", 24: 145-151.
- 10) Kazimierzczak B., Hallman E., Treščinska V., Rembiałkowska E., 2011, "Ocena wartości odżywczej dwóch odmian z buraków ćwikłowych (*Beta vulgaris*) z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej", *Journal of research and applications in agricultural engeneering*, Poznań, 56 (3), 206-210.
- 11) Kloos W. E., 1997, "Taxonomy and systematic of staphylococci indigenous to humans", W: *The staphylococci in human disease*, Ed. Crossley K. B., Archer G. L., Churchill Livingstone, New York, 113-135.
- 12) Pankiewicz J. Z., www.Ecoportal.com.pl
- 13) Rembiałkowska E., 2007, www.ekoedu.uw.pl (strony poświęcone Dekadzie Edukacji dla Zrównoważonego Rozwoju ONZ, koordynowanej przez UNESCO).
- 14) Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K., Czapski J., Kamiński E., Pluta A.; 1997, "Substancje dodatkowe i składniki żywności", *Agro & Food Technology*, Warszawa, str.13-19).
- 15) Savard T., Champagne C., Beaulieu C. 2000, Influence of *Leuconostoc mesenteroides* proportions in the inoculums on the fermentation of carrot based mixed vegetables. *Sciences des Aliments*. 20, 6, 603-610.
- 16) Sobiś-Glinkowska M., Szewczyk E. M., 2004, "Gronkowce koagulazoujemne w odpadach komunalnych, Medycyna doświadczalna i mikrobiologia", 56, 19-27.
- 17) Usajewicz I., 2005, "Bakterie fermentacji mlekowej – wykorzystanie i funkcja w żywności". Materiały z I Konferencji Naukowej IBPRS pt. "Wykorzystanie bakterii mlekowych do otrzymywania produktów żywnościowych wysokiej jakości i o podwyższonej wartości odżywczej", Warszawa 27-28 października 2005
- 18) www.organic-farming.europa.eu
- 19) www.rolnictwoekologiczne.org.pl
- 20) Zaleski K., Josephson K.L., Gerba C.P., Pepper I.L., 2005, Survival, growth and regrowth of enteric indicator and pathogenic bacteria in biosolidis, compost, soil and land applied biosolids. *J.Res.Sci.Technol.*, 2, 49-63.