

LACTIC ACID FERMENTATION OF APPLES FROM ORGANIC FARMING AS A WAY TO RECEIVE A NEW RANGE OF PRODUCTS – BIO-JUICES

Summary

Taking into account a significance of Poland as a producer of apples, the consumer preferences as well as the growing worldwide popularity of naturally cloudy apple juice, whose specific health benefits have been proven, it seems to be an interesting proposal to use apples as a raw material for the preparation of a new, organic fermented product, called bio-juices. The aim of this study was to determine the suitability of organic apples for preparing fermented, unpasteurized apple juice (bio-juice) using selected starter cultures containing indigenous (autochthonous) strains of lactic acid bacteria (LAB). There was compared the composition of microorganisms occurring in fresh apple juices prepared with conventional and organic apples. Organic juice was fermented spontaneously. From the fermented juice were isolated strains of LAB, which after an assessment of biotechnological characteristics, were used to compose starter cultures. LAB isolates belonged to the species *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus mesenteroides*. Starter cultures were used to initiate lactic acid fermentation of naturally cloudy juice. It was found that apples from organic cultivation were more affected by the presence of unwanted microorganisms than apples from conventional cultivation (crops). Such a high degree of contamination of raw (plant material) confirms the need to use in the process of fermentation starter culture containing strains of LAB, characterized by adequate antimicrobial activity. The effect of developed starter cultures on the fermentation and microbiological and sensory quality of fermented apple juice was evaluated. Juices fermented with the use of starter cultures received in an organoleptic assessment the highest number of points, including the hedonic evaluation of 7.6 to 9.0 (i.e. the maximum). The use of developed starter cultures in the process of fermenting apple juice naturally cloudy (suggest it possible) to obtain a new type of product, safe, characterized by interesting properties not only sensory but also health-related, while eliminating undesirable microorganisms.

Key words: lactic acid fermentation, apples from organic farming

FERMENTACJA MLEKOWA JABŁEK Z UPRAW EKOLOGICZNYCH SPOSOBEM NA OTRZYMANIE NOWEGO ASORTYMENTU PRODUKTÓW – BIOSOKÓW

Streszczenie

Biorąc pod uwagę znaczącą pozycję Polski jako producenta jabłek, preferencje konsumentów, a także rosnącą na całym świecie popularność naturalnie mętnych soków jabłkowych, których szczególne właściwości prozdrowotne zostały udowodnione, ciekawą propozycją będzie wykorzystanie jabłek jako surowca do otrzymywania nowego, ekologicznego produktu fermentowanego, tzw. biosoku, z jabłek. Celem pracy było określenie przydatności jabłek z upraw ekologicznych do otrzymywania fermentowanych, niepasteryzowanych soków jabłkowych (biosoków) z zastosowaniem wyselekcjonowanych kultur starterowych zawierających autochtoniczne szczepy bakterii fermentacji mlekowej (LAB). Porównano skład mikroorganizmów występujących w świeżych sokach z jabłek z upraw konwencjonalnych i ekologicznych. Soki ekologiczne poddano fermentacji spontanicznej. Z soków fermentowanych wyizolowano szczepy LAB, z których po przeprowadzeniu charakterystyki biotechnologicznej, skomponowano kultury starterowe. Wyizolowane szczepy LAB należały do gatunków *Lactobacillus plantarum* oraz *Lactobacillus mesenteroides*. Kultury starterowe zastosowano do zainicjowania fermentacji mlekowej naturalnie mętnych soków wytłoczonych z jabłek ekologicznych. Stwierdzono, że jabłka pochodzące z upraw ekologicznych były w większym stopniu obciążone obecnością drobnoustrojów niepożądanych niż jabłka pochodzące z upraw konwencjonalnych. Tak wysoki stopień zakażenia surowca potwierdza potrzebę stosowania w procesach fermentowania soków kultur starterowych, zawierających szczepy LAB, charakteryzujące się odpowiednią aktywnością antymikrobiologiczną. Oceniono wpływ różnych kultur starterowych na przebieg fermentacji oraz jakość mikrobiologiczną i sensoryczną fermentowanych soków jabłkowych. Fermentowane z udziałem opracowanych kultur starterowych soki jabłkowe w ocenie organoleptycznej otrzymały wysoką liczbę punktów, w tym w ocenie hedonicznej od 7,6 do 9,0 (tj. ocenę maksymalną). Zastosowanie opracowanych kultur starterowych w procesie fermentowania naturalnie mętnych soków jabłkowych tłoczonych na zimno umożliwiło otrzymanie nowego rodzaju produktów, bezpiecznych, charakteryzujących się interesującymi właściwościami nie tylko sensorycznymi, lecz także prozdrowotnymi, przy jednoczesnym wyeliminowaniu mikroorganizmów niepożądanych.

Słowa kluczowe: fermentacja mlekowa, jabłka z upraw ekologicznych

1. Wprowadzenie

Jabłka są wyjątkowo korzystnym pod względem zdrowotnym składnikiem diety. Spożywanie jabłek znacznie zmniejsza zagrożenie chorobami cywilizacyjnymi, nekają-

cymi współczesne, rozwinięte społeczeństwo [9, 10]. Szczególnie dotyczy to nowotworów oraz chorób krążenia i otyłości. Właściwości prozdrowotne jabłka zawdzięczają obecnym w nich związkom flawonowym i polifenolom [18]. Związki te, szczególnie wtedy, gdy działają synergi-

stycznie, wykazują silne działanie antyoksydacyjne. Spośród wszystkich owoców jabłka zawierają najwięcej związków hamujących rozwój nowotworów. Zawarty w jabłkach błonnik przyczynia się do znacznego obniżenia poziomu złego cholesterolu, działa oczyszczająco na organizm poprzez „wymiatanie” z przewodu pokarmowego resztek i szkodliwych produktów przemiany materii, wiązanie i usuwanie z organizmu toksyn, metali ciężkich i wolnych rodników [16]. Jabłka są również źródłem witamin (szczególnie witaminy C i P) oraz magnezu, żelaza i potasu. Są to również owoce niskokaloryczne – 100g jabłka dostarcza organizmowi 52 kcal.

Jabłka są owocami najbardziej rozpowszechnionymi w krajach Europy, szczególnie Europy Zachodniej; uznane są za owoce najchętniej kupowane przez polskich konsumentów [17]. Spożywane są najczęściej na surowo lub w postaci soków. Produkcja soku jabłkowego w Polsce obejmuje przede wszystkim soki klarowne i koncentraty, na które przetwarza się ok. 1 mln. ton jabłek rocznie. Badania naukowe wskazują, że soki takie (tzw. soki 100%) są prawie całkowicie pozbawione związków o działaniu prozdrowotnym - polifenoli, związków flawonowych, witamin i błonnika. Z wyżej wymienionych związków do soku trafia zaledwie 5% z ilości zawartej w świeżych owocach. Alternatywą jest otrzymywanie soków mętnych, produkowanych w sposób tradycyjny, metodą tłoczenia w prasach hydraulicznych, bez obróbki enzymatycznej, klarowania i filtracji, przy zastosowaniu maksymalnej temperatury pasteryzacji 74°C. Zainteresowanie takimi sokami w Europie Zachodniej, USA i Japonii od kilku lat wzrasta. W Niemczech 25%, a w Japonii 80% wszystkich przetworów jabłkowych jest spożywanych w postaci soków naturalnie mętnych. Oszmiański i in. [13] wykazali, że w takich sokach zawartość związków o charakterze antyoksydantów i innych składników o działaniu prozdrowotnym jest wielokrotnie wyższa niż w sokach klarownych. Stwierdzono, że spożycie 700 ml mętnego soku jabłkowego podnosi potencjał antyoksydacyjny organizmu o 52%, dlatego też dorosły człowiek profilaktycznie powinien wypijać dziennie 2 szklanki takiego soku [22].

Wartość biologiczna mętnego soku jabłkowego może ulec intensyfikacji poprzez poddanie go fermentacji mlekowej, która zwiększa przyswajalność cennych składników przez organizm człowieka. Takie przefermentowane, niepasteryzowane soki określane są mianem biosoków. W krajach Europy Zachodniej, m.in. w Szwajcarii, biosoki podawane są w zamkniętych placówkach służby zdrowia jako środki wspomagające leczenie; od kilku lat podawanie biosoków pacjentom z chorobami nowotworowymi jest stosowane w Polsce [20]. Soki takie stanowią nowy asortyment przetworów owocowo-warzywnych. Kiszenie jabłek było szeroko znaną tradycją w przedwojennej Polsce na Kresach Wschodnich. Jabłka kiszane były ze względu na ich walory smakowe i spożywane jako dodatek do dań gorących. Zwyczaj kiszenia jabłek jest dotychczas popularny na Ukrainie.

Owoce pochodzące z upraw konwencjonalnych mogą zawierać ponadnormatywne ilości zanieczyszczeń chemicznych, co wynika zarówno z ogólnego zanieczyszczenia środowiska naturalnego jak i użycia środków ochrony roślin i nawozów mineralnych. Szczególnie niebezpieczne dla zdrowia są azotany, których zawartość w owocach uprawianych metodami ekologicznymi jest od 1,5 do 3 razy mniejsza niż w roślinach uprawianych metodami konwencjonalnymi [14, 19]. Z kolei wykazano, że w niektórych

przypadkach zawartość związków o charakterze antyutleniający jest wyższa w owocach uprawianych metodami ekologicznymi lub w uzyskanych z nich przetworach niż w analogicznych produktach pochodzących z upraw konwencjonalnych. Rembiałkowska i in. [15] stwierdzili, że w soku z jabłek ekologicznych jest zawarte o 22% więcej polifenoli ogółem niż w soku z tych samych odmian jabłek uprawianych metodami konwencjonalnymi.

Z kolei, ze względu na sposób prowadzenia uprawy, bez stosowania nawozów sztucznych i chemicznych środków ochrony roślin (herbicydy, pestycydy, fungicydy) produkty roślinne pochodzące z upraw ekologicznych mogą być 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 [7, 8]. Stwarza to problemy w wykorzystaniu ekologicznych produktów roślinnych w procesach przetwórczych, ponieważ obecność tych grup drobnoustrojów może między innymi wpływać na przebieg procesu fermentacji mlekowej, obniżając zarówno właściwości smakowo-zapachowe, jak i prozdrowotne produktu. Dlatego też celowym jest inicjowanie procesów fermentacji przez wprowadzanie odpowiednich kultur starterowych, zawierających czyste kultury bakterii fermentacji mlekowej o zróżnicowanym składzie gatunkowym, dobranym do surowca [6, 5]. 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 niepasteryzowanych produktach żywe bakterie fermentacji mlekowej wpływają korzystnie na organizm konsumenta poprzez poprawę równowagi mikroflory jelitowej [3, 12]. Natomiast, z punktu widzenia producenta (zakładu przetwórczego), korzyści ze stosowania kultur starterowych polegają na uzyskaniu dobrej i powtarzalnej jakości produktów i ochronie procesu przetwórczego przed zakażeniem mikroflorą niepożądaną.

W większości krajów Unii Europejskiej, szczególnie w Austrii w uprawach ekologicznych jabłka zajmują najwyższe miejsca. Natomiast w Polsce, wśród owoców uprawianych metodami ekologicznymi, jabłka zajmują jedną z ostatnich pozycji, przeciwnie niż w przypadku upraw konwencjonalnych, w których produkcja jabłek w stosunku do innych owoców jest największa i najbardziej rozpowszechniona [1]. Plony jabłek z upraw ekologicznych wynoszą w naszym kraju średnio 12,5 t/ha, co stanowi połowę plonów uzyskiwanych w produkcji konwencjonalnej. Produkcja jabłek metodami ekologicznymi jest znacznie tańsza od uprawy konwencjonalnej, gdzie koszty związane ze zwalczaniem chorób i szkodników mogą osiągać nawet 44,6% kosztów bezpośrednich (w produkcji ekologicznej 33%) [2]. Należy mieć nadzieję, że zwiększenie popytu konsumentów na ekologiczne soki jabłkowe przyczyni się do zwiększenia areалу ekologicznych sadów jabłoniowych.

2. Cel badań

Celem pracy było określenie przydatności jabłek z upraw ekologicznych do otrzymywania fermentowanych, niepasteryzowanych soków jabłkowych z zastosowaniem specjalnie wyselekcjonowanych kultur starterowych składających się z autochtonicznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB).

3. Materiał i metody badań

Przeprowadzono charakterystykę i porównanie mikroflory jabłek pochodzących z upraw ekologicznych oraz konwencjonalnych. Materiał do badań stanowił mętny sok wytłaczany w warunkach laboratoryjnych na zimno, z całych jabłek. W soku oceniono liczbę bakterii fermentacji mlekowej (LAB) i drobnoustrojów patogennych oraz niepożądanych w procesie technologicznym (bakterie z rodzaju *Salmonella* i *Clostridium*, z grupy coli, pleśnie, drożdże i bakterie z rodzaju *Leuconostoc* tworzące śluz). Stosowano metody znormalizowane: liczbę bakterii fermentacji mlekowej oznaczano zgodnie z PN-EN 15787: 2009 i PN-ISO 15214:2002, drobnoustroje z grupy coli według PN-ISO 21528-2:2005, liczbę bakterii z rodzaju *Salmonella* z zastosowaniem specjalistycznego podłoża agarowego Rambach firmy Merck, liczbę bakterii z rodzaju *Leuconostoc* według PN-90 A-75052/09:1994, liczbę bakterii z rodzaju *Clostridium* zgodnie z PN-ISO 15213:2005, liczbę drożdży i pleśni według PN-ISO 21527-2:2009 oraz zgodnie z PN-EN ISO 7954:1999.

Soki z jabłek ekologicznych poddano spontanicznej fermentacji w warunkach laboratoryjnych. Fermentację prowadzono przez 7 dni, w temperaturze pokojowej. Oceniono mikroflorę soków po fermentacji oznaczając liczebność tych samych grup drobnoustrojów co w sokach świeżych oraz wyizolowano z nich bakterie fermentacji mlekowej. Izolację endogennych (autochtonicznych) szczepów LAB przeprowadzono poprzez kilkakrotne pasażowanie w podłożu MRS. Wstępną identyfikację przynależności gatunkowej wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzono na podstawie testów biochemicznych API 50 CH firmy bioMerieux, a następnie poprzez analizę sekwencji genu 16S rRNA.

Przydatność technologiczną wyizolowanych LAB oceniono określając zdolność do wzrostu, syntezy kwasu mlekowego [D(-) i L(+)] w temperaturze 25 i 37°C oraz aktywność antimikrobiologiczną. Ilość syntetyzowanego przez bakterie kwasu mlekowego oceniono metodą enzymatyczną, przy użyciu testów firmy Boehringer-Mannheim, w odciekach po hodowlach prowadzonych w podłożu MRS przez 24 godziny.

Aktywność antimikrobiologiczną wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej oceniono wobec panelu szczepów bakterii patogennych i niepożądanych w procesie produkcji. Jako szczepy wskaźnikowe stosowano bakterie należące do gatunków: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella saintpaul*, *Salmonella virchov*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*, pochodzących z kolekcji IBPRS i z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (PIWET) w Puławach. Oznaczenia przeprowadzono metodą dyfuzyjną, w której podstawą pomia-

ru jest hamowanie wzrostu szczepów wskaźnikowych w podłożu stałym przez odciek po hodowli badanych szczepów LAB. Oceniono również zdolność wyizolowanych szczepów do hamowania rozwoju pleśni z rodzajów *Penicillium*, *Fusarium* i *Aspergillus*, stosując metodę studzienkową.

Wyizolowane szczepy zostały użyte do skomponowania kultur starterowych do kiszenia soku z jabłek ekologicznych. Soki fermentowane były bez dodatku cukru, zastosowano dwie wielkości inokulum kultur starterowych: 10^5 i 10^6 j.t.k/ml soku. Próbę kontrolną stanowił sok poddany fermentacji spontanicznej. Wszystkie warianty fermentacji przeprowadzono w trzech równoległych próbach. Proces fermentacji prowadzono przez 3 dni w temperaturze pokojowej. Soki po fermentacji przechowywano w temperaturze chłodniczej (4-6°C) przez 7 dni. Oceniono jakość mikrobiologiczną oraz sensoryczną otrzymanych produktów biorąc pod uwagę smak, zapach oraz barwę i wygląd (skala 6-punktowa), przeprowadzono również ocenę hedoniczną (w skali 9 punktowej). Do oceny sensorycznej zastosowano metodę według PN-ISO 4121:1998. Ocena została przeprowadzona przez zespół siedmiu przeszkolonych degustatorów.

4. Wyniki i dyskusja

Analizowanym surowcem były naturalnie mętne soki, wytłoczone na zimno z jabłek pochodzących z upraw ekologicznych oraz z upraw konwencjonalnych. W przypadku jabłek z upraw ekologicznych do badań wykorzystano odmiany Kosztel Czerwony oraz Idared najczęściej dostępne w sklepach z żywnością ekologiczną; w przypadku jabłek z upraw konwencjonalnych - popularne odmiany Reneta, Champion, Kortland i Ligol. Wyniki oceny mikroflory soków z jabłek pochodzących z upraw konwencjonalnych przedstawiono w tab. 1, a soków z jabłek ekologicznych w tab. 2.

Na podstawie doniesień literaturowych zakładano, że soki z jabłek ekologicznych będą w większym stopniu obciążone obecnością drobnoustrojów niepożądanych niż soki z jabłek uprawianych w sposób konwencjonalny [7, 8]. Wyższy stopień zanieczyszczenia jabłek ekologicznych stwierdzono w odniesieniu do bakterii z grupy coli, które były obecne we wszystkich próbach soku z jabłek ekologicznych, a tylko w jednej próbie soku z jabłek nie ekologicznych, oraz w przypadku bakterii z rodzaju *Clostridium* i pleśni, których nie wykryto w sokach z jabłek uprawianych w sposób konwencjonalny. Prawie wszystkie soki z jabłek nie ekologicznych zawierały natomiast bakterie z rodzaju *Leuconostoc* na poziomie $10^2 - 10^3$ j.t.k/ml. W sokach z jabłek ekologicznych bakterie tego rodzaju obecne były tylko w jednej z trzech prób, w ilości 10^1 j.t.k/ml.

Tab. 1. Ocena mikrobiologiczna świeżych soków z czterech popularnych odmian jabłek nie ekologicznych (j.t.k/ml)
Table 1. Microbiological evaluation of fresh juice of four popular varieties made of not organic apples (cfu/ml)

Odmiana jabłek	Mikroorganizmy (j.t.k/g)						
	bakterie z grupy coli	bakterie rodzaju <i>Salmonella</i>	pleśnie	drożdże	LAB	bakterie rodzaju <i>Clostridium</i>	bakterie rodzaju <i>Leuconostoc</i>
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

Tab. 2. Ocena mikrobiologiczna świeżych soków z jabłek ekologicznych (liczba mikroorganizmów j.t.k/ml)
 Table 2. Microbiological evaluation of fresh juice made of organic apples (cfu/ml)

Odmiana jabłek	Mikroorganizmy (j.t.k/g)						
	bakterie z grupy <i>coli</i>	bakterie rodzaju <i>Salmonella</i>	pleśnie	drożdże	LAB	bakterie rodzaju <i>Clostridium</i>	bakterie rodzaju <i>Leuconostoc</i>
Idared	4,5x10 ¹	1,0x10 ¹	2,0x10 ²	n.w.	1,5x10 ²	n.w.	3,0x10 ¹
Kosztel czerwony I	1,0x10 ²	n.w.	n.w.	1,0x10 ³	6,0x10 ¹	n.w.	n.w.
Kosztel czerwony II	1,0x10 ¹	n.w.	1,4x10 ³	1,0x10 ¹	2,0x10 ¹	3,0x10 ³	n.w.

I i II partie jabłek odmiany Kosztel czerwony
 n.w. nie wykryto

Tab. 3. Obecność wybranych mikroorganizmów w sokach z jabłek ekologicznych, otrzymanych w wyniku fermentacji spontanicznej, w temperaturze pokojowej (j.t.k/ml)

Table 3. The presence of selected microorganisms in organic apple juices, obtained as a result of spontaneous fermentation, at room temperature (cfu/ml)

Odmiana jabłek	Mikroorganizmy (j.t.k/g)						
	bakterie z grupy <i>coli</i>	bakterie rodzaju <i>Salmonella</i>	pleśnie	drożdże	LAB	bakterie rodzaju <i>Clostridium</i>	bakterie rodzaju <i>Leuconostoc</i>
Idared	1,2x10 ⁶	n.w.	n.w.	7,2x10 ⁵	8,0x10 ⁶	1,0x10 ¹	2,5x10 ³
Kosztel Czerwony I	n.w.	n.w.	n.w.	3,0x10 ⁶	5,0x10 ⁶	2,0x10 ²	n.w.
Kosztel Czerwony II	n.w.	n.w.	1,2x10 ²	5,0x10 ⁴	4,7x10 ⁶	2,5x10 ²	n.w.

n.w. nie wykryto

Tab. 4. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z fermentowanych soków z jabłek ekologicznych, wzrost i ilość syntetyzowanego kwasu mlekowego, w 25°C

Table 4. Lactic acid bacteria strains isolated from fermented organic apple juice, the growth of bacteria and amount of the lactic acid synthesized at 25 °C

Gatunek wg API	Gatunek wg analizy sekwencji 16S rDNA i oznaczenie	Wzrost (log j.t.k/ml)	Ilość kwasu mlekowego (g/l)
<i>L. brevis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> J I	9,5 ± 0,53	5,2 ± 0,32
<i>L. brevis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> J II	9,5 ± 0,24	5,5 ± 0,55
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> J III	9,9 ± 0,27	12,6 ± 0,74
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> J IV	9,9 ± 0,16	11,5 ± 0,55
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> J V	9,8 ± 0,27	5,2 ± 0,05

Tab. 5. Ocena zdolności wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej do hamowania wzrostu szczepów bakterii wskaźnikowych w 25°C

Table 5. Evaluation of the capacity of lactic acid bacteria strains to inhibit the growth of indicator bacteria strains at 25°C

Szczepy bakterii	Wielkość stref zahamowania wzrostu, mm								
	S1	S2	S3	S4	E1	E2	B1	B2	L
<i>L.mesenteroides</i> J I F	-	5	6	8	-	-	7	8	9
<i>L.mesenteroides</i> J II F	-	5	8	8	-	-	7	7	10
<i>L.plantarum</i> J III F	-	10	10	12	15	15	14	12	12
<i>L.plantarum</i> J IV F	-	10	10	12	15	15	13	12	14
<i>L.plantarum</i> J V F	-	10	10	10	15	10	12	11	-

Oznaczenia:

S1 *Salmonella enteritidis*, S2 *Salmonella saintpaul*, S3 *Salmonella typhimurium*, S4 *Salmonella virchow*,

E1 *Escherichia coli* hemolityczna, E2 *Escherichia coli* hemolityczna, B1 *Bacillus subtilis*, B2 *Bacillus cereus*

L *Listeria monocytogenes*

W wyniku fermentacji spontanicznej soków wytłoczonych z jabłek ekologicznych otrzymano produkt, w którym nadal obecne były grupy drobnoustrojów niepożądanych (tab. 3); w niektórych przypadkach ich liczebność wzrosła w stosunku do ich liczby w soku świeżym. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy obecnością poszczególnych grup drobnoustrojów w sokach świeżych i sokach po fermentacji spontanicznej. Przykładowo, w soku z jabłek odmiany Idared po fermentacji liczebność bakterii z grupy *coli* zwiększyła się z poziomu 10¹ do 10⁶ j.t.k/ml, wzrosła liczebność bakterii tworzących śluz z rodzaju *Leuconostoc*,

wykazano również obecność drożdży i bakterii z rodzaju *Clostridium*, które nie zostały wykryte w soku świeżym, wyeliminowane zostały natomiast bakterie z rodzaju *Salmonella* oraz pleśnie obecne w soku świeżym.

We wszystkich sokach poddanych fermentacji spontanicznej liczba bakterii fermentacji mlekowej osiągnęła poziom 10⁶ j.t.k/ml.

Z soków fermentowanych wyizolowano 5 szczepów bakterii fermentacji mlekowej – 2 należące do gatunku *Leuconostoc mesenteroides* i 3 do gatunku *Lactobacillus plantarum*, oznaczono je symbolami od J I do J V. Bakterie

poddano ocenie pod względem podstawowych cech wskaźujących na przydatność technologiczną: zdolności do wzrostu i biosyntezy kwasu mlekowego w temperaturze 25°C, zdolności do hamowania wzrostu bakterii z rodzajów *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria* będących niebezpiecznymi zanieczyszczeniami surowców ekologicznych oraz rozwoju pleśni. Wyniki przedstawiono w tab. 4 i 5 oraz na rys. 1.

Wszystkie wyizolowane szczepy bakterii charakteryzowały się dobrą zdolnością do wzrostu w temperaturze 25°C – na poziomie 10^9 j.t.k/ml. Pod względem ilości syntetyzowanego kwasu mlekowego wyróżniały się szczepy *L. plantarum* oznaczone symbolami J III i J IV. Szczepy należące do gatunku *L. plantarum* wykazywały wyższą aktywność antymikrobiologiczną wobec użytego panelu szczepów patogennych i niepożądanych w procesie produkcji niż szczepy z gatunku *Lc. mesenteroides*; ponadto szczep *L. plantarum* J V charakteryzował się zdolnością do hamowania

rozwoju wszystkich badanych pleśni.

Wyizolowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej zostały zastosowane jako kultury starterowe do fermentowania tłoczonego na zimno soku z jabłek odmiany Kosztel Czerwonny. Wybrane zostały następujące warianty kultur starterowych, skomponowanych w monokulturach i jako kultura dwuskładnikowa: *Lc. mesenteroides* J II, *L. plantarum* J III syntetyzujący największą ilość kwasu mlekowego spośród wyizolowanych szczepów, *L. plantarum* J V jako charakteryzujący się zarówno dobrą aktywnością antymikrobiologiczną, jak i antypleśniową, kultura mieszana zawierająca szczepy *Lc. mesenteroides* J II i *L. plantarum* J V w równych proporcjach.

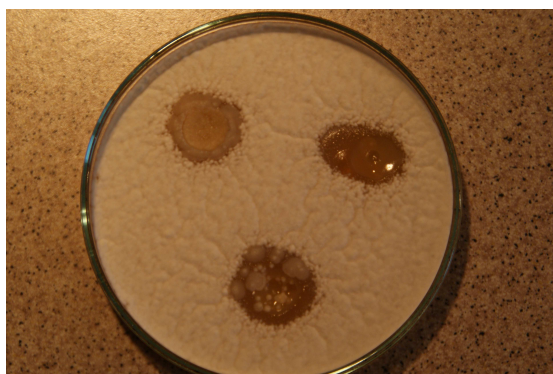
Soki fermentowane były bez dodatku cukru, zastosowano dwie wielkości inokulum 10^5 i 10^6 j.t.k/ml. Próbę kontrolną stanowił sok poddany fermentacji spontanicznej. Dokonano oceny mikrobiologicznej fermentowanych soków, wyniki przedstawiono w tab. 6 i 7.



Aktywność fungicydalna szczepu *L.plantarum* JV wobec *Fusarium* sp.



Aktywność fungicydalna szczepu *L.plantarum* JV wobec *Penicillium* sp.



Aktywność fungicydalna szczepu *L.plantarum* JV wobec *Aspergillus niger*

Rys. 1. Aktywność przeciwrzybiczna (fungicydalna) szczepu *L. plantarum* JV
Fig. 1. Antifungal activity of *L. plantarum* JV strain

Tab. 6. Ocena mikrobiologiczna soków z jabłek fermentowanych z zastosowaniem kultur starterowych o liczebności inokulum 10^5 j.t.k/ml

Table 6. Microbiological evaluation of apple juice fermented using starter cultures with inoculum 10^5 cfu/ml

Wariant fermentacji	Mikroorganizmy (log j.t.k/g)						
	bakterie z grupy <i>coli</i>	bakterie rodzaju <i>Salmonella</i>	pleśnie	drożdże	LAB	bakterie rodzaju <i>Clostridium</i>	bakterie rodzaju <i>Leuconostoc</i>
Fermentacja spontaniczna	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$7,5 \pm 0,53$	<i>n.w</i>	$2,3 \pm 0,32$	<i>n.w</i>
<i>Lc. mesenteroides J II</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$7,3 \pm 0,49$	$3,0 \pm 0,18$	$2,4 \pm 0,12$	<i>n.w</i>
<i>L. plantarum J III</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$7,7 \pm 0,38$	$1,3 \pm 0,06$	$1,8 \pm 0,19$	$4,2 \pm 0,24$
<i>L. plantarum J V</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$6,7 \pm 0,51$	$4,3 \pm 0,42$	$1,8 \pm 0,16$	$4,2 \pm 0,13$
Kultura mieszana	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$6,8 \pm 0,60$	$4,3 \pm 0,12$	$2,3 \pm 0,20$	<i>n.w</i>

Kultura mieszana – *Lc. mesenteroides J II* i *L. plantarum J V* w równych proporcjach

n.w – nie wykryto

Tab. 7. Ocena mikrobiologiczna soków z jabłek fermentowanych z zastosowaniem kultur starterowych o liczebności inokulum 10^6 j.t.k/ml

Table 7. Microbiological evaluation of apple juice fermented using starter cultures with inoculum 10^6 cfu/ml

Wariant fermentacji	Mikroorganizmy (log j.t.k/g)						
	bakterie z grupy <i>coli</i>	bakterie rodzaju <i>Salmonella</i>	pleśnie	drożdże	LAB	bakterie rodzaju <i>Clostridium</i>	bakterie rodzaju <i>Leuconostoc</i>
Fermentacja spontaniczna	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$7,9 \pm 0,12$	$4,3 \pm 0,20$	$1,0 \pm 0,02$	<i>n.w</i>
<i>Lc. mesenteroides J II</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$5,1 \pm 0,05$	$6,3 \pm 0,43$	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>
<i>L. plantarum J III</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$5,8 \pm 0,27$	$6,8 \pm 0,72$	$1,6 \pm 0,22$	$2,5 \pm 0,14$
<i>L. plantarum J V</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$5,3 \pm 0,42$	$7,6 \pm 0,57$	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>
Kultura mieszana	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>	$4,0 \pm 0,38$	$7,8 \pm 0,18$	<i>n.w</i>	<i>n.w</i>

Kultura mieszana – *Lc. mesenteroides J II* i *L. plantarum J V* w równych proporcjach

n.w – nie wykryto

Jakość produktów, otrzymanych w wyniku naturalnej fermentacji mlekowej, jest zależna od mikroorganizmów bytujących na surowcu, których rodzaj i liczebność zależy od takich czynników jak region upraw, ilość opadów w danym roku, skład gleby, rodzaj nawożenia [4]. Owoce pochodzące zarówno z upraw ekologicznych jak i konwencjonalnych mogą być w różnym stopniu zakażone drobnoustrojami niepożądanymi w procesie kiszenia. Ponadto różne partie owoców tej samej odmiany różnią się pod względem bytujących na nich mikroorganizmów autochtonicznych. Stosowanie kultur starterowych powinno zapewnić utworzenie stabilnej mikrobioty oraz przewagę konkurencyjną w środowisku drobnoustrojów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg fermentacji i cechy sensoryczne produktów fermentowanych, a w konsekwencji wysoką, stałą jakość kiszonek. Bardzo istotnym jest zatem dobranie odpowiedniej wielkości inokulum kultury starterowej do danego produktu.

Ocena mikroflory soków jabłkowych fermentowanych przy użyciu opracowanych kultur starterowych o liczebności inokulum 10^5 j.t.k/ml wskazuje, że w przypadku partii surowca obciążonego dużą liczbą mikroorganizmów liczba bakterii zastosowanej kultury starterowej była zbyt mała, aby zdominować środowisko – zostało ono opanowane przez zawarte w soku drożdże, których obecność na wysokim poziomie zainicjowała proces fermentacji alkoholowej. Wprowadzone jako kultury starterowe bakterie fermentacji mlekowej w badanym środowisku nie namnożyły się, a je-

dynie przeżyły na poziomie $10^3 - 10^4$ j.t.k/ml. Zwiększenie liczebności inokulum do 10^6 j.t.k/ml pozwoliło na całkowite wyeliminowanie mikroflory niepożądaney, czyli w tym przypadku bakterii rodzaju *Clostridium* i bakterii rodzaju *Leuconostoc* tworzących śluz, nie zostały ze środowiska wyeliminowane drożdże, a jedynie ich liczebność uległa zmniejszeniu w stosunku do soków fermentowanych z użyciem kultur starterowych zawierających 10^5 j.t.k./ml bakterii. Wyeliminowanie obecności drożdży w procesie fermentacji mlekowej jest praktycznie niemożliwe, gdyż wiele gatunków drożdży toleruje niskie pH, a także pomiędzy licznymi gatunkami drożdży i bakterii fermentacji mlekowej obserwuje się związki o charakterze synergizmu lub komensalizmu (badania IBPRS, dane nie publikowane).

Soki, otrzymane przy użyciu kultur starterowych o liczebności inokulum 10^6 j.t.k/ml poddano ocenie organoleptycznej. Sok poddany fermentacji spontanicznej, stanowiący próbę kontrolną oraz sok fermentowany przy zastosowaniu szczepu *L. plantarum J III* nie zostały poddane ocenie ze względu na obecność w nich bakterii z rodzaju *Clostridium* na poziomie 10^1 j.t.k/ml. Wyniki oceny przedstawiono w tab. 8.

Soki jabłkowe fermentowane przy użyciu zaprojektowanych kultur starterowych otrzymały wysoką liczbę punktów w ocenie hedonicznej („lubię/nie lubię”), która pozwala ocenić czy produkt będzie akceptowany przez konsumentów.

Tab. 8. Ocena organoleptyczna soku z jabłek po fermentacji z udziałem kultur starterowych
 Table 8. Organoleptic assessment of apple juice after fermentation with starter cultures

Wariant doświadczenia Cecha	<i>Lc. mesenteroides</i> J II	<i>L. plantarum</i> J V	Kultura mieszana
Barwa i wygląd	5,0 ± 0,61	5,3 ± 0,32	5,3 ± 0,56
Zapach	5,0 ± 0,70	5,0 ± 0,12	6 ± 0,59
Smak	5,3 ± 0,47	5,0 ± 0,58	6 ± 0,23
Ocena hedoniczna	8,3 ± 0,16	7,6 ± 0,23	9 ± 0,42

Ocena organoleptyczna: skala 1-6 pkt.

Ocena hedoniczna: skala 1-9 pkt.

Kultura mieszana II zawierała szczepy *Lc. mesenteroides* J II i *L. plantarum* J V w równych proporcjach

Najlepszymi właściwościami organoleptycznymi charakteryzował się sok fermentowany z udziałem dwuskładnikowej kultury mieszanej, zawierającej szczepy *Lc. mesenteroides* J II i *L. plantarum* J V. Sok ten pod względem takich cech jak smak, zapach i ocena hedoniczna otrzymał maksymalną liczbę punktów w zastosowanej skali oceny.

5. Wnioski

1. Ze względu na wysokie obciążenie jabłek z upraw ekologicznych mikroflorą niepożądaną, nie ulegającą eliminacji w procesie fermentacji spontanicznej, otrzymanie biosoków z jabłek wymaga wprowadzenia do procesu przetwórczego odpowiedniej kultury starterowej. Zastosowanie opracowanej kultury starterowej pozwoliło na wyeliminowanie z gotowego soku bakterii *Clostridium sp. Leuconostoc sp.*

2. Opracowana, dwuskładnikowa kultura starterowa, zawierająca LAB wyizolowane z naturalnie fermentujących jabłek ekologicznych umożliwiła otrzymanie biosoku jabłkowego, charakteryzującego się bardzo dobrymi właściwościami w ocenie sensorycznej.

3. Zastosowanie kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej do fermentacji soków z jabłek ekologicznych stwarza możliwość wprowadzania na rynek nowego asortymentu biosoków o charakterystycznych walorach smakowo-zapachowych i niskiej zawartości cukrów.

6. Bibliografia

[1] Adamczyk M., Rembiałkowska E., Wasiak-Zys G.: Porównanie jakości sensorycznej jabłek z produkcji ekologicznej i konwencjonalnej oraz po przechowywaniu, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, 2 (47) supl., 11-19.

[2] Brzozowski P., Zmarlicki K., Karmańska M.: Koszty produkcji owoców z upraw ekologicznych i konwencjonalnych, www.inhort.pl/postery, Konferencja ekologiczna, 2011.

[3] Caplice E., Fitzgerald G.: Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.

[4] Desai P., Sheht T.: Controlled fermentation of fermentation of vegetable using mixed inoculum of lactis cultures, *J. Food Sci. Technol.*, 1999, 46, 357-357.

[5] Di Cagno R., Surico R.F., Siragusa S., De Angelis M., Paradiso A., Minervini F., De Gara L., Gobetti M.: Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 127 (3), 220-228.

[6] Gardner N., Savard T., Obermeier P., Caldwell G., Chapagne C.: Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, 64, 261-275.

[7] Grajewski J., Składanowska B., Drymel W., Szczepanik K., Twarużek M., Mikrobiologiczne i mikotoksyczne skażenia wybranych surowców i mieszanek pasz treściwych, IV Konferencja Naukowa "Mikotoksyny w żywności i paszach", 1998, 155-159.

[8] Holley R., Arrus K., Omiński K.H., Tenuta M., Blank G.: Salmonella survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure, *J. Environ. Qual.*, 2006, 35, 1170-1180.

[9] Kanai C., Pomerleau J., Lock K., Mc Kee M.: Getting children to eat more fruit and vegetables: A systematic review, *Prev. Med.*, 2006, 42, 85-95.

[10] Klewicka E., Czyżowska A.: Biological stability of lactofermented beetroot juice during refrigerated storage, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2011, vol. 61, 4, 251-256.

[11] Leroy F., De Vuyst L.: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Sci. Technol.*, 2004, 15, 67-78.

[12] Mäki M.: Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. *in: Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects* (eds. S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 2004, p. 419-430.

[13] Oszmiański J.: Wpływ zabiegów technologicznych na zachowanie przeciwutleniaczy w wybranych sokach owocowych, Materiały z konferencji naukowej, Naturalne przeciwutleniacze - od surowca do organizmu, Poznań, 2007, 9.

[14] Rembiałkowska E.: Zdrowotna i sensoryczna jakość ziemniaków oraz wybranych warzyw z gospodarstw ekologicznych, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa, 2000.

[15] Rembiałkowska E., Hallman E., Adamczyk M., Lipowski J., Jasińska U., Owczarek L.: Wpływ procesów technologicznych na zawartość polifenoli ogółem oraz na potencjał przeciwutleniający przetworów (soku i kremogenu) uzyskanych z jabłek pochodzących z produkcji ekologicznej i konwencjonalnej, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, 1 (46) supl., 121-126.

[16] Sawicki J.: Skażenia żywności. W: Sikorski E. (red.), Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1994.

[17] Trębach A.: Polacy lubią jabłka. *Hasło Ogrodnicze*, 2001, 4, 14-17.

[18] Wojdyło A., Oszmiański J., Laskowski P.: Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56 (15), 6520-6530.

[19] Wojtasik A., Marzec Z., Rutkowska U.: Jakość zdrowotna krajowych racy pokarmowych - badania analityczne i ocena teoretyczna. *Cz. IX Zawartość ołowiu i kadmu w racjach pokarmowych wybranych grup społeczno-dochodowych w Polsce. Żyw. Człow. Metab.*, 2000, XXVII, 2, 153-161.

[20] http://kpodr.com.pl/srodowisko/ekologiczne/ekologiczne_sok_i_z_owocow_dawnych_odmian.php, 2013-04-10

[21] <http://www.nutrivitality.pl/produkty-owocowe-i-warzywne/kiszonki/174-kiszone-jabka-i-buraki.html>, 2013-04-16

[22] www.manufakturaowocu.pl