

INITIATED LACTIC ACID FERMENTATION OF CUCUMBERS FROM ORGANIC FARM BY APPLICATION OF SELECTED STARTER CULTURES OF LACTIC ACID BACTERIA

Summary

The quality of fermented vegetables, obtained by natural lactic acid fermentation is dependent on the bacteria in the raw material. Vegetables from both organic and conventional production are infected with varying degrees of unwanted microorganisms in the process of fermentation (bacteria of the genus *Enterobacteriaceae*, molds). The use of selected starter cultures, compared with spontaneous fermentation, should provide the proper development of microflora responsible for fermentation and sensory characteristics and ensure a constant quality. The aim of this work was to develop a starter culture consisting of lactic acid bacteria (LAB) strains selected from endogenously occurring in organic cucumbers. Microflora, naturally occurring on cucumbers from organic and conventional farming, was compared. Spontaneously fermented cucumbers were the source of LAB strains from which after biotechnological characterization starter culture was composed. Bacteria with high antimicrobial activity against pathogenic bacteria of the species *E. coli*, *Salmonella sp.*, and against yeasts of the genus *Geotrichum candidum* were selected for use in starter culture. Selected strains were used to initiate the lactic acid fermentation of organic farming cucumbers. The effects of the LAB strains used as a starter cultures was evaluated in terms of microbiological and sensory quality after 7 days of fermentation. Developed starter culture allows to obtain fermented cucumbers with palatability equal to proper quality of spontaneously fermented products while ensuring the microbiological safety. It is advantageous to use autochthonous bacteria in starter cultures in order to preserve the natural flavor characteristics typical for traditional product

Key words: cucumbers; ecological cultivation; lactic acid fermentation; bacteria; experimentation

UKIERUNKOWANA FERMENTACJA MLEKOWA OGÓRKÓW Z UPRAW EKOLOGICZNYCH PRZY ZASTOSOWANIU WYSELEKCJONOWANYCH KULTUR STARTEROWYCH BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ

Streszczenie

Jakość kiszonek warzywnych, otrzymanych w wyniku naturalnej fermentacji mlekowej, jest zależna od mikroorganizmów bytujących na surowcu. Warzywa pochodzące zarówno z upraw ekologicznych jak i konwencjonalnych są w różnym stopniu zakażone drobnoustrojami niepożądanymi w procesie kiszenia (bakteriami z rodzaju *Enterobacteriaceae*, pleśniami). Stosowanie wyselekcjonowanych kultur starterowych, w porównaniu z prowadzeniem fermentacji spontanicznej, powinno zapewnić właściwy rozwój mikroflory odpowiedzialnej za fermentację i cechy sensoryczne oraz stałą jakość kiszonek. Celem pracy było opracowanie kultury starterowej składającej się z bakterii fermentacji mlekowej (LAB) wyselekcjonowanych spośród szczepów endogenicznie występujących na ogórkach ekologicznych. Porównano mikroflorę występującą naturalnie, na ogórkach z upraw ekologicznych i konwencjonalnych, które następnie poddawano fermentacji. Spontanicznie fermentujące ogórki z upraw ekologicznych stanowiły źródło izolacji szczepów LAB, z których po przeprowadzeniu ich charakterystyki biotechnologicznej, skomponowano kulturę starterową. Do zastosowania w kulturze starterowej wybrano szczepy bakterii, charakteryzujące się wysoką aktywnością antybakteryjną, między innymi skierowaną przeciwko szczepom bakterii patogennych z gatunków *E. coli*, *Salmonella sp.*, oraz przeciwko drożdżom z gatunku *Geotrichum candidum*. Wybrane szczepy wykorzystano do zainicjowania fermentacji mlekowej ogórków z upraw ekologicznych. Oceniono wpływ badanych szczepów LAB na jakość mikrobiologiczną i sensoryczną kiszonek po 7 dniach fermentacji. Opracowana kultura starterowa umożliwia uzyskanie kiszonych ogórków dorównujących smakowitością dobrej jakości kiszonom uzyskanym w wyniku fermentacji spontanicznej, przy zapewnieniu bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Stosowanie w kulturach starterowych bakterii autochtonicznych jest korzystne w celu zachowania w produktach cech smakowo-zapachowych charakterystycznych dla kiszonek otrzymywanych tradycyjnie.

Słowa kluczowe: ogórki; uprawa ekologiczna; fermentacja mlekowa; bakterie; badania

1. Wprowadzenie

W Unii Europejskiej stale zwiększa się zapotrzebowanie konsumentów na produkty ekologiczne, co stwarza potrzebę stosowania odpowiednich metod ich przetwarzania. W krajach rozwiniętych spożywa się zbyt mało owoców oraz (szczególnie) warzyw, które stanowią znakomitą ochronę przed wystąpieniem chorób cywilizacyjnych. Owoce i wa-

rzywa są względnie tanie, łatwo dostępne, lekkostrawne, ale na ogół wymagają „obróbki” przed spożyciem, przede wszystkim – warzywa (mycie, obieranie, rozdrabnianie, gotowanie), co zniechęca część konsumentów do sięgania po nie na co dzień [10]. Zalecana dla dorosłego człowieka dobową porcja owoców i warzyw powinna wynosić 400 g, przy czym warzywa powinny stanowić połowę tej ilości. Dobrą metodą przetwarzania surowców roślinnych jest ich

fermentowanie. Kiszonki warzywne, popularne w Polsce od stuleci, są pod względem smakowitości produktami bardziej atrakcyjnymi dla klientów niż warzywa poddane obróbce termicznej, ponadto są również polecane przez dietetyków i lekarzy ze względu na ich właściwości prozdrowotne [1, 18]. Należą do produktów niskokalorycznych, gdyż zawarty w świeżych warzywach cukier zostaje w dużej mierze zużyty w procesie fermentacji. Kwas mlekowy, zawarty w kiszonkach warzywnych nie tylko nadając produktom przyjemny, orzeźwiający smak, lecz również obniża pH w jelitach, co stwarza korzystne warunki do rozwoju mikroflory jelitowej, zdolnej do syntezy enzymów, rozkładających powstające w jelitach związki potencjalnie kancerogenne. Kiszone warzywa są także cennym źródłem witaminy C i witamin z grupy B.

W Polsce najczęściej wybieranymi przez konsumentów kiszonkami są kiszona kapusta i kiszone ogórki. Z punktu widzenia zdrowia konsumentów, najbardziej korzystnym rozwiązaniem byłoby spożywanie warzyw i owoców uprawianych metodami ekologicznymi. Ocenia się, że zawartość azotanów w takich produktach jest od 1,5 do 3 razy mniejsza niż w roślinach uprawianych metodami konwencjonalnymi [17].

Poza składem chemicznym i rodzajem surowca, z jakiego zostały sporządzone, kiszonki swoje prozdrowotne i organoleptyczne właściwości zawdzięczają obecności bakterii fermentacji mlekowej i ich metabolitom takim jak kwas mlekowy, kwas octowy, kwasy lotne, diacetyl, aldehyd octowy, alkohol etylowy, n-propanol, alkohole amylove, acetoina. Zawartość tych związków oraz proporcje między nimi nadają kiszonkom specyficzne właściwości smakowo-zapachowe. Za charakterystyczne właściwości sensoryczne produktów fermentowanych odpowiedzialne są endogenne, zawarte w surowcu, szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Izolowanie tych szczepów i włączanie w skład kultur starterowych, przeznaczonych do fermentowania surowca, z którego pochodzą, przyczynia się do zachowania charakterystycznego, tradycyjnego smaku produktów [4, 6, 8, 15].

Kiszonki warzywne można otrzymywać na drodze fermentacji spontanicznej. Jednak badania [7, 9, 11] wykazały, że warzywa pochodzące z upraw ekologicznych są surowcem wymagającym stosowania kultur starterowych nie tylko z powodu otrzymywania produktów o odpowiednich walorach smakowo zapachowych i powtarzalnej jakości, lecz także z powodu utrzymania ich bezpieczeństwa zdrowotnego. W przypadku kiszenia ogórków częstą przyczyną obniżenia jakości produktu są zakażenia drożdżami z gatunków *Geotrichum candidum*, *Pichia manshurica* i *Issachenkia occidentalis*. Grzyby te utleniają kwasy organiczne odpowiedzialne za trwałość kiszonki, a w wyniku obniżenia kwasowości środowiska stwarzają dogodne warunki do rozwoju bakterii gnilnych [5, 13]. Dlatego celowe jest inicjowanie fermentacji warzyw przez wprowadzanie kultur starterowych o odpowiednio dobranym składzie [1, 3, 12, 19].

2. Cel badań

Celem pracy było opracowanie kultury starterowej do kiszenia ogórków, składającej się z bakterii fermentacji mlekowej (LAB) endogennie występujących na ogórkach ekologicznych. Głównym kryterium selekcji bakterii była ich aktywność antagonistyczna wobec niepożądanych gatunków bakterii i drożdży.

3. Materiał i metody badań

Przeprowadzono charakterystykę i porównanie mikroflory ogórków pochodzących z upraw ekologicznych oraz konwencjonalnych. Oceniono liczbę bakterii fermentacji mlekowej (LAB) i drobnoustrojów patogennych oraz niepożądanych w procesie technologicznym (bakterie z rodzaju *Salmonella* i *Clostridium*, z rodziny *Enterobacteriaceae*, pleśnie i drożdże). Stosowano metody znormalizowane: liczbę bakterii fermentacji mlekowej oznaczano zgodnie z PN-EN 15787: 2009 i PN-ISO 15214:2002, drobnoustroje z rodziny *Enterobacteriaceae* według PN-ISO 21528-2:2005, liczbę bakterii *Salmonella spp.* z zastosowaniem specjalistycznego podłoża agarowego Rambach firmy Merck, liczbę bakterii tworzących śluz 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.

W warunkach laboratoryjnych wykonano kiszonki z ogórków ekologicznych poddając je spontanicznej fermentacji, w zalewach zawierających 2,5% NaCl. Fermentacje prowadzono przez 7 dni, w temperaturze pokojowej. Z otrzymanych kiszonek wyizolowano bakterie fermentacji mlekowej. Izolację endogennych (autochtonicznych) szczepów LAB przeprowadzono przez 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 antymikrobiologiczną. 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 antymikrobiologiczną wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej oceniono wobec panelu szczepów bakterii patogennych i niepożądanych w procesie produkcji oraz wobec drożdży z gatunku *Geotrichum candidum*. Jako szczepy wskaźnikowe stosowano bakterie należące do gatunków: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella saintpaul*, *Salmonella virchow*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*, pochodzących z kolekcji IBPRS i z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (PIWET) w Puławach. Oznaczenia przeprowadzono metodami dyfuzyjnymi. Do oceny aktywności antybakteryjnej zastosowano zmodyfikowaną metodę Pilet i wsp. [16], w której podstawą pomiaru jest hamowanie wzrostu szczepów wskaźnikowych w podłożu stałym przez odciek po hodowli badanych szczepów LAB. Natomiast zdolność szczepów LAB do hamowania wzrostu drożdży *Geotrichum candidum* oceniono metodą dyfuzyjną według Magnusson i Schnürer [14], w której na płytce zawierające podłoże stałe MRS z wykonanymi eż posiewami LAB po 48 h wzrostu nanoszono podłoże YEPD z 0,7% agaru zaszczerpione komórkami *Geotrichum candidum* i po 24 h obserwowano strefy zahamowania wzrostu drożdży przez linie posiewów LAB.

Wyizolowane szczepy zostały użyte jako kultury starterowe do kiszenia ogórków ekologicznych, a liczebność kultury starterowej wynosiła 10⁶ jtk/ml zalewy.

Oceniono jakość mikrobiologiczną oraz sensoryczną otrzymanych produktów. Do oceny sensorycznej zastosowano metodę według PN-ISO 4121:1998. Ocena została przeprowadzona przez zespół przeszkolonych degustatorów.

4. Wyniki i dyskusja

Analizowanym surowcem były ogórki pochodzące z upraw ekologicznych (E) zakupione w warszawskich sklepach z żywnością ekologiczną oraz ogórki z upraw konwencjonalnych (K). Porównanie mikroflory surowców przedstawiono w tab. 1.

Z doniesień literaturowych wynika, że produkty roślinne pochodzące z upraw ekologicznych są w znacznie większym stopniu obciążone mikroflorą niepożądaną, niż produkty z upraw konwencjonalnych. Należy spodziewać się w nich bakterii z rodzajów *Salmonella* i *Clostridium*, bakterii z grupy *coli* oraz pleśni zdolnych do syntezy mikotoksyn [7, 9]. Wbrew oczekiwaniom wykazano (tab. 1), że mikroflora ogórków z upraw ekologicznych i konwencjonalnych nie różniła się w sposób znaczący. Różnice stwierdzono w odniesieniu do bakterii z grupy *coli*, których liczebność w ogórkach z upraw konwencjonalnych była wyższa niż w ogórkach ekologicznych oraz bakterii przetrwalnikujących z rodzaju *Clostridium*, które były obecne w dwóch, na trzy badane, partiach surowca ekologicznego, natomiast nie występowały w surowcu z upraw konwencjonalnych. Podobne wyniki autorzy uzyskali w trakcie realizacji zadania z zakresu rolnictwa ekologicznego w 2011 roku, w ramach, którego przebadano szereg warzyw pochodzących z upraw ekologicznych i konwencjonalnych oraz jabłka. Nie wykazano znacznych różnic mikroflory pomiędzy surowcami roślinnymi ekologicznymi a surowcami z upraw konwen-

cjonalnych za wyjątkiem bakterii z rodzaju *Clostridium*, które były obecne w większości partii wszystkich badanych surowców ekologicznych [20]. Na przykładzie buraków z upraw ekologicznych stwierdzono, że mikroflora warzyw dostępnych w handlu detalicznym istotnie różniła się od mikroflory warzyw dostarczanych do przetwórci. Warzywa te w dużo wyższym stopniu są zakażone bakteriami niepożądanymi.

Ogórki pochodzące z upraw ekologicznych poddano fermentacji spontanicznej, a po 7 dniach oceniono mikroflorę kiszzonek (tab. 2).

W wyniku fermentacji spontanicznej badanych partii surowca bakterie fermentacji mlekowej osiągnęły liczebność na poziomie 10^8 j.t.k/ml, ale pomimo tego w kiszzonekach rozwinęły się pleśnie (na poziomie 10^3 j.t.k/ml) oraz drożdże (na poziomie od 10^4 do 10^5 j.t.k/ml). Z uzyskanych kiszzonek wyizolowano 10 szczepów bakterii fermentacji mlekowej: 5 należących do gatunku *Lactobacillus plantarum*, dwa do gatunku *Pediococcus acidilactici*, dwa do gatunku *Lactobacillus diolivorans* i jeden należący do gatunku *Lactobacillus brevis*. Nowo wyizolowane szczepy bakterii oznaczono symbolami Kolekcji Kultur Przemysłowych IBPRS - KKP (tab. 3).

Wyizolowane szczepy LAB poddano charakterystyce pod względem podstawowych cech istotnych technologicznych, w warunkach laboratoryjnych. Oceniono zdolność do wzrostu i syntezy kwasu mlekowego oraz aktywność antimikrobiologiczną skierowaną przeciw grupom bakterii mogących stanowić niebezpieczne zanieczyszczenie surowców z upraw ekologicznych (z rodzajów *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*) i niepożądanych w procesie technologicznym (*Bacillus*). Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 3, 4 oraz na rys. 1.

Tab. 1. Porównanie mikroflory ogórków z upraw ekologicznych i konwencjonalnych (j.t.k/g)

Tab. 1. Comparison of microflora of cucumbers from conventional and organic farming

Rodzaj surowca	Badane grupy mikroorganizmów, liczba j.t.k./g						
	Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Clostridium	Bakterie śluzowe	LAB
Ogórki E	$7,0 \times 10^2$ - $2,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$ - $1,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$ - $3,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$ - $4,0 \times 10^1$	n.w - $1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$ - $2,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$ - $4,0 \times 10^3$
Ogórki K	$1,2 \times 10^3$ - $2,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$ - $6,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$ - $4,0 \times 10^2$	n.w.- $2,0 \times 10^1$	n.w	n.w. - $1,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$ - $1,0 \times 10^3$

n.w. –nie wykryto, ogórki E - ogórki z upraw ekologicznych, wyniki oceny trzech partii surowca, ogórki K - ogórki z upraw konwencjonalnych, wyniki oceny trzech partii surowca,

LAB (lactic acid bacteria) - bakterie fermentacji mlekowej.

Tab. 2. Ocena mikroflory trzech partii ogórków ekologicznych po 7 dniach fermentacji spontanicznej (j.t.k/g)

Tab. 2. Evaluation of three series of ecological cucumbers microflora after 7 days of fermentation, (cfu/g)

Badane grupy mikroorganizmów, liczba j.t.k./g						
Grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie ferm. mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
n.w	n.w	$2,5 \times 10^3$ - $3,4 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$ - $4,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^8$ - $5,0 \times 10^8$	n.w	n.w. - $1,0 \times 10^1$

n.w- nie wykryto

Tab. 3. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z kiszzonek ogórków ekologicznych, wzrost w temperaturze 25°C

Tab. 3. Lactic acid bacteria strains isolated from fermented organic cucumber, growth in 25°C

Przynależność gatunkowa szczepów na podstawie analizy 16Sr RNA, symbole	Wzrost w temp. 25°C, j.k.t./ml
<i>Lactobacillus plantarum</i> KKP 1838	$6,4 \times 10^9$
<i>Pediococcus acidilactici</i> KKP 1839	$1,1 \times 10^9$
<i>Pediococcus acidilactici</i> KKP 1840	$1,5 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum</i> KKP 1841	$4,6 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum</i> KKP 1842	$3,3 \times 10^9$

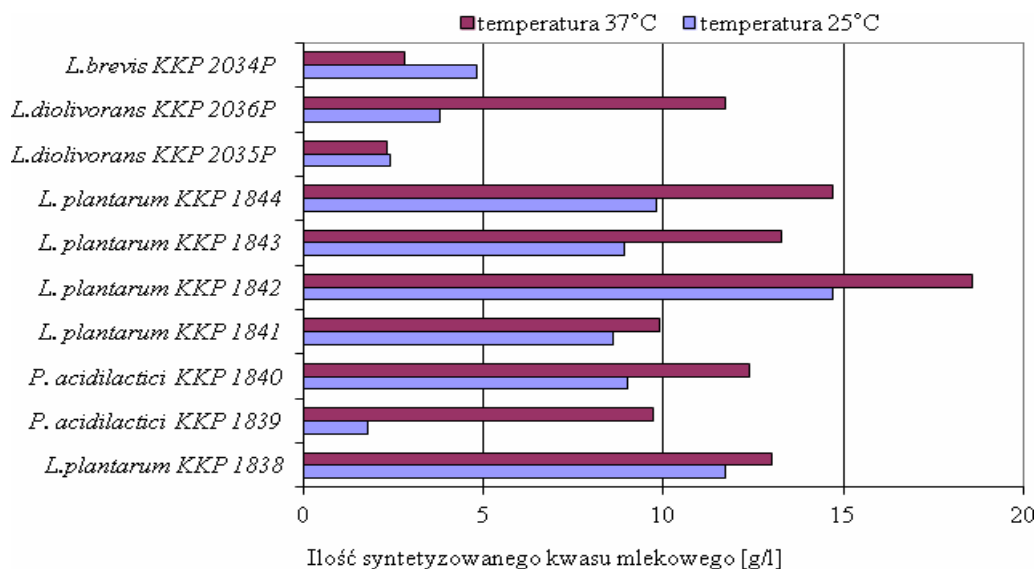
Przynależność gatunkowa szczepów na podstawie analizy 16Sr RNA, symbole	Wzrost w temp. 25°C, j.k.t./ml
<i>Lactobacillus plantarum</i> KKP 1843	$8,0 \times 10^8$
<i>Lactobacillus plantarum</i> KKP 1844	$7,3 \times 10^9$
<i>Lactobacillus diolivorans</i> KKP 2035P	$1,5 \times 10^9$
<i>Lactobacillus diolivorans</i> KKP 2036P	$1,4 \times 10^9$
<i>Lactobacillus brevis</i> KKP 2034P	$1,6 \times 10^9$

Z danych niepublikowanych wynika, że wyizolowane szczepy charakteryzowały się jednakowo dobrą zdolnością do wzrostu w temperaturze 25 i 37°C. Jednak wykazano, że występowały pomiędzy nimi istotne różnice w ilości syntetyzowanego kwasu mlekowego (rys. 1). Największą ilość kwasu syntetyzowały szczepy: *L. plantarum* KKP 1842, *L. plantarum* KKP 1844, *L. plantarum* KKP 1843, *L. plantarum* KKP 1838, a najniższą *L. diolivorans* KKP 2035P i *L. brevis* 2034P. Z wyjątkiem szczepów *L. plantarum* KKP 1838 i *L. diolivorans* KKP 2035P ilość kwasu syntetyzowanego w temperaturze 37°C była zdecydowanie wyższa niż w 25°C.

Wszystkie badane szczepy wykazały mniejszą lub więk-

szą zdolność do hamowania wzrostu szczepów z grupy bakterii wskaźnikowych. Spośród wyizolowanych szczepów LAB najniższą aktywnością antybakteryjną charakteryzowały się szczepy *L. diolivorans* KKP 2035P i *L. brevis* KKP 2034P, a najwyższą *L. diolivorans* KKP 2036P. W aktywności antybakteryjnej pozostałych szczepów nie wykazano istotnych różnic (tab. 4).

W wyniku oznaczania aktywności wyizolowanych szczepów skierowanej przeciwko drożdżom kożuchującym z gatunku *Geotrichum candidum* wykazano, że do hamowania ich rozwoju są zdolne dwa szczepy LAB: *L. brevis* KKP 2034P, *P. acidilactici* KKP 1840.



Rys. 1. Synteza kwasu mlekowego przez bakterie fermentacji mlekowej wyizolowane z kiszonych, ekologicznych ogórków, w temperaturze 25°C i 37°C, g/l

Fig. 1. Production of lactic acid by lactic acid bacteria isolated from fermented organic cucumber, in 25°C and 37°C temperature, g/l

Tab. 4. Ocena aktywności antybakteryjnej wyizolowanych szczepów LAB, wobec szczepów bakterii wskaźnikowych (strefy zahamowania wzrostu, mm)

Tab. 4. Evaluation of antibacterial activity of isolated LAB strains, against indicator bacteria strains (inhibition zones, mm)

Badane szczepy LAB	Wielkość stref zahamowania wzrostu szczepów bakterii wskaźnikowych, mm									
	S 1	S 2	S 3	S4	E1	E2	B1	B2	L1	L2
<i>L. plantarum</i> KKP1838	8	4	6	5	8	9	-	6	5	-
<i>P. acidilactici</i> KKP 1839	7	7	6	5	-	7	-	6	5	-
<i>P. acidilactici</i> KKP 1840	4	5	3	5	5	-	-	4	5	-
<i>L. plantarum</i> KKP 1841	5	10	7	7	3	7	-	8	7	-
<i>L. plantarum</i> KKP 1842	5	4	7	6	5	6	-	8	7	-
<i>L. plantarum</i> KKP 1843	7	7	6	6	6	6	-	5	7	-
<i>L. plantarum</i> KKP 1844	5	5	6	8	6	7	-	8	6	-
<i>L. diolivorans</i> KKP 2035P	-	5	-	5	-	-	-	-	-	10
<i>L. diolivorans</i> KKP 2036P	-	5	-	5	10	10	15	12	-	10
<i>L. brevis</i> KKP 2034P	-	5	-	5	-	-	6	7	-	12

Oznaczenia:

S1 *Salmonella enteritidis*

S2 *Salmonella saintpaul*

S 3 *Salmonella typhimurium*

S4 *Salmonella virchow*

E1 *Escherichia coli* hemolityczna

E2 *Escherichia coli* hemolityczna

B1 *Bacillus subtilis*

B2 *Bacillus cereus*

L1 *Listeria monocytogenes*

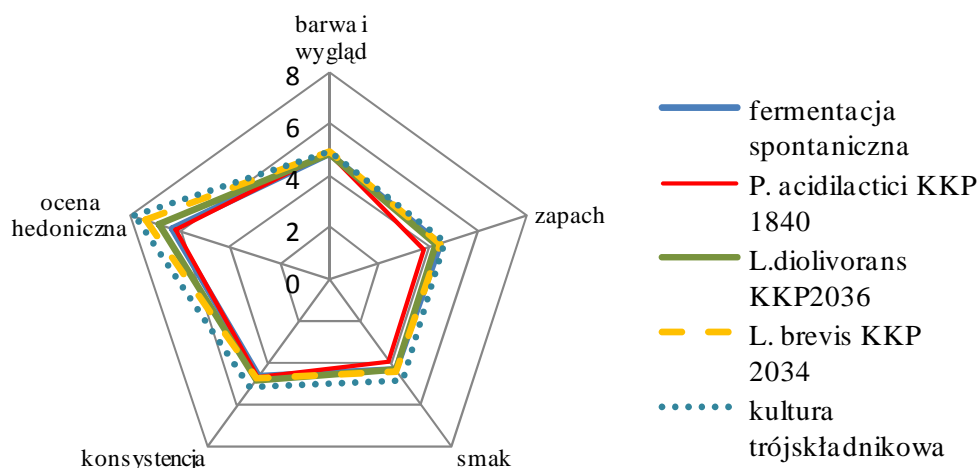
L2 *Listeria monocytogenes*

Tab. 5. Ocena mikroflory ogórków ekologicznych po 7 dniach fermentacji przy użyciu kultur starterowych (j.t.k/ml)
 Table 5. Evaluation of microflora of organic cucumber after 7 days of fermentation using starter cultures (cfu/g)

Próba/ wariant kiszenia	Grupy mikroorganizmów, j.t.k./ml						
	grupa coli	Salmonella	Pleśnie	Drożdże	Bakterie fermentacji mlekowej	Clostridium	Bakterie śluzowe
Fermentacja spontaniczna	n.w.	n.w.	1,2x 10 ³	1,5x 10 ⁵	4,0x10 ⁸	n.w.	1,2x10 ¹
<i>P. acidilactici</i> KKP 1840	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	1,4x10 ⁹	n.w.	n.w.
<i>L.diolivorans</i> KKP 2036P	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	2,5x10 ⁹	n.w.	n.w.
<i>L. brevis</i> KKP 2034P	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	2,0x10 ⁹	n.w.	n.w.
Kultura trójskładnikowa	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	2,50x10 ⁹	n.w.	n.w.

n.w- nie wykryto

kultura trójskładnikowa zawierająca *P. acidilactici* KKP 1840, *L.diolivorans* KKP 2036P *L. brevis* KKP 2034P



Rys. 2. Ocena sensoryczna ogórków kiszonych przy użyciu kultur starterowych po 7 dniach fermentacji
 Fig. 2. Sensory assesment of cucumber fermented (pickled) at using starter cultures after 7 days of fermentation

Ponieważ w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie biokonserwacją, czyli zastosowaniem żywych mikroorganizmów i/lub ich metabolitów do zapobiegania psuciu się produktów spożywczych lub wydłużania czasu ich przydatności do spożycia [2], obydwa szczepy LAB zdolne do hamowania wzrostu drożdży kożuchujących zostały wytypowane do włączenia w skład kultur starterowych do kiszenia ogórków ekologicznych. Jako trzeci szczep do dalszych badań wybrany został *L. diolivorans* KKP 2036P, z uwagi na jego wysoką aktywność skierowaną przeciw szczepom patogennym i niepożądanym w procesie technologicznym. Szczep ten jest zdolny do hamowania wzrostu ośmiu z jedenastu szczepów zastosowanego panelu bakterii wskaźnikowych. Aktywność antimikrobiologiczna LAB, w tym szczególnie antyfungicydalna nie jest cechą przypisaną do gatunku bakterii, lecz określa ona właściwości mające charakter szczepowy. Dlatego poszukuje się bakterii o takich właściwościach, w celu zastosowania ich w funkcjonalnych kulturach starterowych lub w biokonserwacji [2, 12, 14]. Szczepy LAB, wybrane do zastosowania w kulturach starterowych, użyte zostały do kiszenia ogórków ekologicznych, w warunkach laboratoryjnych, w monokulturach oraz w kulturze mieszanej zawierającej trzy szczepy w równych proporcjach. Wielkość inokulum wynosiła 10⁶ j.t.k. LAB na ml zalewy. Próba kontrolną były ogórki poddane fermentacji spontanicznej. Oceniono mikroflorę i właściwości organoleptyczne kiszonek, a wyniki przedstawiono w tab. 5 i na rys. 2.

W przypadku oceny mikroflory uzyskanych kiszonek wykazano, że szczepy bakterii fermentacji mlekowej wytypowane do stosowania jako kultury starterowe do kiszenia

ogórków ekologicznych jednakowo dobrze hamowały rozwój mikroflory niepożądaną zarówno w monokulturach, jak i w kulturze mieszanej. W ocenianych kiszonkach nie wykryto obecności drożdży, pleśni, bakterii z grupy coli, z rodzajów *Salmonella* i *Clostridium* oraz bakterii śluzowych. Należy jednak zwrócić uwagę, że użyte partie ogórków charakteryzowały się dobrą czystością mikrobiologiczną. Liczebność bakterii fermentacji mlekowej po siedmiu dniach fermentacji stwierdzono na poziomie dziewięciu logarytmów i była o rząd wielkości wyższa niż liczba LAB w kiszonce po fermentacji spontanicznej. Natomiast ogórki kiszone uzyskane przy zastosowaniu kultury starterowej trójskładnikowej charakteryzowały się najlepszymi właściwościami organoleptycznymi pod względem smaku i zapachu oraz w ocenie hedonistycznej („lubie/ nie lubię”), która jest szczególnie istotna pod względem akceptacji konsumpcyjnej.

5. Wnioski

1. Opracowana kultura starterowa złożona z bakterii fermentacji mlekowej stanowiących endogenną mikroflorę ogórków z upraw ekologicznych umożliwia otrzymanie produktu (ogórków kiszonych) o pożądanym walorach smakowo-zapachowych.
2. Aktywność antimikrobiologiczna (w tym antydrożdżowa) szczepów bakterii wchodzących w skład opracowanej kultury pozwala sądzić, że jej stosowanie zapewni wysoki stopień kontroli procesu fermentacji w warunkach przetwórci ekologicznych oraz umożliwi standaryzację jakości produktu.

6. Bibliografia

- [1] Caplice E., Fitzgerald G.: Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, 50, 131-149.
- [2] Coda R., Cassone A., Rizzello C., Nionelli I., Cardinali G., Gobetti M.: Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77(10), 3484-3492.
- [3] Desai P., Sheit T.: Controlled fermentation of vegetable using mixed inoculum of lactic cultures. *J. Food Sci. Technol.*, 1997, 34, 155-158.
- [4] 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.
- [5] Franco W., Perez-Diaz I., Johanningsmeier S., McFeeters R.: Characteristic of spoilage-associated secondary cucumber fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78 (4), 1273-1284.
- [6] Gardner N., Savard T., Obermeier P., Caldwell G., Champagne 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] Hansen E.: Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 78, 119-131.
- [9] 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.
- [10] Kidoń M., Czapski J.: Wpływ obróbki termicznej na zawartość barwników betalainowych i zdolność przeciwutleniającą buraka ćwikłowego. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2007, 1(50), 124-131.
- [11] Klewicka E., Motyl I., Libudzisz Z.: Fermentation of beet juice by bacteria of genus *Lactobacillus* sp. *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 218, 178-183.
- [12] Leroy F., De Vuyst L.: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 2004, 15, 67-78.
- [13] Libudzisz Z., Kowal K.: *Mikrobiologia Techniczna*, t. I WPL, 2000, s. 304.
- [14] Magnusson J., Schnurer J.: *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous Antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67 (1), 1-5.
- [15] 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, 419-430.
- [16] Pilet M., Dusset X., Barre R., Novel G., Desmazeaud M., Piard J.: Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 1995, 58, 256-262.
- [17] Rembiałkowska E.: Zdrowotna i sensoryczna jakość ziemniaków oraz wybranych warzyw z gospodarstw ekologicznych, Fundacja Rozwój SGGW, 2000, Warszawa.
- [18] Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K., Czapski J., Kamiński E., Pluta A.: Substancje dodatkowe i składniki żywności, *Agro & Food Technology*, Warszawa, 1997, 13-19.
- [19] Savard T., Champagne C., Beaulieu C. Influence of *Leuconostoc mesenteroides* proportions in the inoculums on the fermentation of carrot based mixed vegetables. *Sciences des Aliments*. 2000, 20, 6, 603-610.
- [20] Stecka K., Chabłowska B., Rozmierska J., Piasecka-Józwiak K., Kliszcz M., Świątek M., Szkudzińska-Rzeszowiak E.: Sprawozdanie z zadania w zakresie rolnictwa ekologicznego w 2011 r. „Ekologiczne metody przetwórstwa owoców i warzyw z uwzględnieniem właściwości prozdrowotnych otrzymanych produktów”, 2011; www.ibprs.pl