

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235639**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426316**

(22) Data zgłoszenia: **12.07.2018**

(51) Int.Cl.

**A23B 9/26 (2006.01)**

**A23B 7/10 (2006.01)**

**A23L 11/20 (2016.01)**

**A23L 33/145 (2016.01)**

(54)

**Sposób wytwarzania fermentowanych kiełków roślin strączkowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**13.01.2020 BUP 02/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**21.09.2020 WUP 14/20**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**GRAŻYNA BUDRYN, Łódź, PL**

**ELŻBIETA KLEWICKA, Łódź, PL**

**JOANNA GRZELCZYK, Łódź, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzec. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska**

**PL 235639 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania fermentowanych kiełków roślin strączkowych, charakteryzujących się zawartością izoflawonoidów wyższą od zawartości izoflawonoidów w nasionach niefermentowanych i fermentowanymi, kiełkach niefermentowanych oraz siewkach roślin strączkowych i jednocześnie charakteryzujących się zmniejszoną zawartością mikroflory chorobotwórczej czyli większym bezpieczeństwem mikrobiologicznym.

Z opisu patentowego EP 1865794 jest znany sposób otrzymywania sfermentowanego produktu białkowego o dobrych właściwościach odżywczych i jednocześnie polepszonych właściwościach organoleptycznych, w drodze fermentacji roślin strączkowych w obecności drożdży.

Znany jest sposób fermentowania nasion roślin strączkowych z użyciem bakterii, *Lactobacillus plantarum* MTCC 1325 opisany w czasopiśmie *Probiotics Antimicrobial Proteins*. 2017, doi: 10.1007/s12602-017-9328-0).

Z czasopisma *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19, 6112–24 znany jest sposób kiełkowania nasion roślin strączkowych w świetle białym.

Znany jest także szczep bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979, pierwotnie opisany jako *Lactobacillus pentosus* ŁOCK 0979, który w 2017 roku został reklasyfikowany w oparciu o analizę sekwencji 16sRNA do gatunku *Lactobacillus casei*, a jego sekwencja nukleotydowa została zdeponowana w GenBank National Center for Biotechnology Information pod numerem: Accession number MG451815. Ponadto właściwości metaboliczne i przeciwrzybowe tego szczepu zostały opisane w czasopiśmie *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018 10 (2): 186–200. Szczep *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 charakteryzuje się zdolnością wykorzystywania polioli i ich galaktozylowych pochodnych obecnych w środowisku wzrostowym do syntezy związków o aktywności przeciwrzybowej, takich jak kwasy hydroksytłuszczowe, cykliczne dipeptydy oraz niskocząsteczkowe związki białkowe.

Uprawę kiełków w przemyśle spożywczym najczęściej prowadzi się są w bębnoch rotacyjnych oraz na tacy, przy zachowaniu wysokiej wilgotności, co powoduje zagrożenie rozwojem mikroflory chorobotwórczej, mimo stosowanej dezynfekcji nasion oraz technologii przemysłowej przed procesem uprawnym. Spożywanie kiełków w postaci surowej niesie ze sobą zagrożenie zatrucia pokarmowego.

Celem wynalazku jest zwiększenie zawartości izoflawonów i kumestanów, w szczególności w postaci łatwo przyswajalnych aglikonów w roślinach strączkowych, zgodnie z założeniem, że fermentowane kiełki roślin strączkowych mogą zawierać zwiększoną zawartość związków z grupy fitoestrogenowych izoflawonów w porównaniu do nasion, nasion fermentowanych, kiełków i siewek roślin strączkowych, stanowiąc cenny naturalny produkt o podwyższonej zawartości izoflawonoidów. Celem dodatkowym jest zwiększenie bezpieczeństwa mikrobiologicznego kiełków roślin strączkowych.

Sposób wytwarzania fermentowanych kiełków roślin strączkowych **według wynalazku** polega na tym, że kiełki roślin strączkowych zalewa się zawiesiną szczepu bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 w soli fizjologicznej, o stężeniu komórek  $1 \times 10^7$ – $1 \times 10^8$  jtk/ml stosując 30–90 ml roztworu bakterii na 50 g kiełków i poddaje w tym roztworze fermentacji w temperaturze 30°C w czasie 48–72 godziny, przy czym sfermentowane kiełki przeznacza się bezpośrednio do spożycia jako produkt świeży lub poddaje utrwaleniu. Fermentacji poddaje się kiełki wyhodowane w komorze klimatycznej systemem fitotronowym, przy wilgotności względnej 80% w temperaturze 18–25°C w czasie 2–11 dni przy oświetleniu światłem białym o długości fali 400–700 nm, niebieskim o długości fali 450 nm, czerwonym o długości fali 650 nm, UVA o długości fali 340 nm, UVB o długości fali 310 nm. Zawiesinę szczepu bakterii sporządza się z zamrożonych form bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 poprzez dwukrotny pasaż po 24 godziny w podłożu MRS broth i następnie namnażanie na podłożu MRS broth w czasie 24 godzin, odwirowanie przy szybkości 10.000 rpm w czasie 20 minut w temperaturze 4°C i zawieszanie w soli fizjologicznej. Fermentacji poddaje się kiełki roślin strączkowych, jak czerwona koniczyna (*Trifolium pratense* L.), lucerna (*Medicago sativa* L.), soczewica (*Lens culinaris* Medik.), ciecierzycy (*Cicer arietinum* L.) Sfermentowane kiełki poddaje się utrwaleniu przez suszenie, korzystnie liofilizację.

Sposób według wynalazku umożliwia otrzymanie fermentowanych kiełków roślin strączkowych charakteryzujących się zwiększoną zawartością izoflawonów i kumestanów w porównaniu z zawartością tych związków w nasionach niefermentowanych i fermentowanych, kiełkach niefermentowanych oraz siewkach roślin strączkowych, z zachowaniem wysokiej jakości mikrobiologicznej. I tak na przykład w kiełkach koniczyny czerwonej zawartość izoflawonoidów bezpośrednio po uprawie wynosi 1,1 g/100 g ss., zaś w tych samych kiełkach po fermentacji jest równa 5,5 g/100 g ss.. Fermentowanie kiełków przyczynia się także do redukcji mikroflory chorobotwórczej w nich zawartej: zawartości pleśni o 1 log<sub>10</sub> jtk/g,

bakterii *E. coli* i *Klebsiella sp.* o  $2 \log_{10}$  jtk/g, *S. aureus* i *S. saprophyticus* o  $3 \log_{10}$  jtk/g i nie stwierdza się obecności *Salmonella sp.* i *Shigella sp.* Fermentacja kielków z użyciem bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 nie wymaga dużych nakładów kosztowych ze względu na krótki czas jej realizacji i dzięki temu kielki fermentowane sposobem według wynalazku charakteryzują się dużym potencjałem wykorzystania przemysłowego jako żywność funkcjonalna, suplementy do żywności, do środków leczniczych.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady z powołaniem się na rysunek, przedstawiający wykres ilustrujący zawartość izoflawonoidów w kielkach koniczyny czerwonej poddanych fermentacji i w niefermentowanych kielkach tej koniczyny.

#### Przykład 1

Kielkowanie nasion koniczyny czerwonej przeprowadzono w komorze klimatycznej systemem fitotronowym. Hodowlę kielków prowadzono przez okres 11 dni w względnej wilgotności wynoszącej 80%, w temperaturach 18°C w świetle UVB (310 nm). Pierwszego dnia uprawy nasiona nasączono wodą o czystości do celów spożywczych, a w kolejnych dniach nawadniano optymalnie w celu utrzymania wilgotności uprawy. W następnym etapie kielki poddano fermentacji. W tym celu zamrożone formy bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 pasażowano dwukrotnie po 24 godziny w podłożu bulionowym MRS broth, następnie namnażano na podłożu MRS broth w ciągu 24 godzin i po odwirowaniu przy szybkości 10.000 rpm w czasie 20 minut w temperaturze 4°C sporządzono z nich zawiesinę w soli fizjologicznej, o stężeniu komórek  $2 \times 10^7$  jtk/ml. Fermentację wyhodowanych kielków zawieszoną bakterii prowadzono 2 dni w temperaturze 30°C. Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach czerwonej koniczyny oznaczono poprzez ekstrakcję 0,5 g liofilizowanych kielków mieszaniną metanolu i wody w 50°C, pod ciśnieniem 10 MPa w czasie 20 minut.

Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach czerwonej koniczyny były następujące:

izoflawonoidy ogółem	5503,70 mg/100 g ss.
w tym:	
ononina	42,16 mg/100 g ss.
sissotryna	0,89 mg/100 g ss.
genistyna	0,40 mg/100 g ss.
daidzeina	6,12 mg/100 g ss.
biochanina A	530,01 mg/100 g ss.
genisteina	167,54 mg/100 g ss.
formononetyna	1,18 mg/100 g ss.
kumestrol	4755,38 mg/100 g ss.

Dla porównania w analogiczny sposób oznaczono zawartość i skład izoflawonoidów w wyhodowanych w analogicznych warunkach i niefermentowanych kielkach czerwonej koniczyny.

Zawartość i skład izoflawonoidów w niefermentowanych kielkach czerwonej koniczyny były następujące:

izoflawonoidy ogółem	1323,21 mg/100 g ss.
w tym:	
pueraryna	1,61 mg/100 g ss.
daidzyna	5,76 mg/100 g ss.
ononina	375,38 mg/100 g ss.
glicytyna	3,30 mg/100 g ss.
sissotryna	23,04 mg/100 g ss.
genistyna	69,89 mg/100 g ss.
daidzeina	69,71 mg/100 g ss.
biochanina A	222,12 mg/100 g ss.
genisteina	98,27 mg/100 g ss.
formononetyna	453,67 mg/100 g ss.
kumestrol	0,45 mg/100 g ss.

Na rysunku przedstawiono wykres ilustrujący zawartość izoflawonoidów w kielkach koniczyny czerwonej poddanych fermentacji (—) i w niefermentowanych kielkach tej koniczyny (- - -). Analizę wartości izoflawonoidów przeprowadzono na chromatografie typu LC-ESI-MS.

## Przykład 2

Kielkowanie nasion koniczyny czerwonej przeprowadzono w komorze klimatycznej systemem fitotronowym. Hodowlę kielków prowadzono przez okres 3 dni przy względnej wilgotności wynoszącej 80%, w temperaturach 25°C w świetle białym (400–700 nm). W następnym etapie kielki poddano fermentacji zawiesiną bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 (przygotowaną jak w przykładzie 1), o stężeniu komórek  $1 \times 10^7$  jtk/ml. Fermentację wyhodowanych kielków prowadzono 2 dni w temperaturze 30°C. Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach czerwonej koniczyny oznaczono jak w przykładzie 1.

Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach czerwonej koniczyny były następujące:

izoflawonoidy ogółem	2715,86 mg/100 g ss.
w tym:	
daidzyna	0,10 mg/100 g ss.
ononina	21,80 mg/100 g ss.
glicytyna	0,16 mg/100 g ss.
sissotryna	0,33 mg/100 g ss.
genistyna	0,12 mg/100 g ss.
daidzeina	2,27 mg/100 g ss.
biochanina A	162,56 mg/100 g ss.
genisteina	65,70 mg/100 g ss.
formononetyna	341,47 mg/100 g ss.
kumestrol	2121,46 mg/100 g ss.

Dla porównania w analogiczny sposób oznaczono zawartość i skład izoflawonoidów w kielkach czerwonej koniczyny wyhodowanych przez 3 dni w świetle UVA (340 nm), w temperaturze 25°C, nie poddanych fermentowaniu.

Zawartość i skład izoflawonoidów w niefermentowanych kielkach czerwonej koniczyny były następujące:

izoflawonoidy ogółem	921,34 mg/100 g ss.
w tym:	
pueraryna	0,02 mg/100 d ss.
daidzyna	1,66 mg/100 g ss.
ononina	585,10 mg/100 g ss.
glicytyna	0,66 mg/100 g ss.
sissotryna	31,25 mg/100 g ss.
genistyna	30,09 mg/100 g ss.
daidzeina	3,81 mg/100 g ss.
biochanina A	9,93 mg/100 g ss.
genisteina	9,65 mg/100 g ss.
formononetyna	249,17 mg/100 g ss.

## Przykład 3

Kielkowanie nasion ciecierzycy przeprowadzono w komorze klimatycznej systemem fitotronowym. Hodowlę kielków prowadzono przez okres 10 dni przy względnej wilgotności wynoszącej 80%, w temperaturach 18°C w świetle niebieskim (450 nm). Wyhodowane kielki poddano fermentacji stosując zawiesiną bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 (przygotowaną jak w przykładzie 1), o stężeniu komórek  $5 \times 10^7$  jtk/ml. Fermentację wyhodowanych kielków prowadzono 4 dni w temperaturze 30°C. Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach ciecierzycy oznaczono jak w przykładzie 1.

Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach ciecierzycy były następujące:

izoflawonoidy ogółem	3817,10 mg/100 g ss.
w tym:	
daidzyna	0,18 mg/100 g ss.
ononina	465,50 mg/100 g ss.
glicytyna	1,55 mg/100 g ss.
sissotryna	102,16 mg/100 g ss.
genistyna	0,30 mg/100 g ss.
daidzeina	1,37 mg/100 g ss.
biochanina A	1102,65 mg/100 g ss.

genisteina	5,92 mg/100 g ss.
formononetyna	2133,23 mg/100 g ss.
kumestrol	4,25 mg/100 g ss.

Dla porównania w analogiczny sposób oznaczono zawartość i skład izoflawonoidów w wyhodowanych w analogicznych warunkach i niefermentowanych kielkach ciecierzycy.

Zawartość i skład izoflawonoidów w niefermentowanych kielkach ciecierzycy były następujące:

izoflawonoidy ogółem	1522,64 mg/100 g ss.
w tym:	
daidzyna	0,10 mg/100 g ss.
ononina	329,49 mg/100 g ss.
glicytyna	0,33 mg/100 g ss.
sissotryna	113,62 mg/100 g ss.
genistyna	4,21 mg/100 g ss.
daidzeina	0,71 mg/100 g ss.
biochanina A	305,76 mg/100 g ss.
genisteina	1,98 mg/100 g ss.
formononetyna	765,59 mg/100 g ss.
kumestrol	0,87 mg/100 g ss.

#### Przykład 4

Kielkowanie nasion ciecierzycy przeprowadzono w komorze klimatycznej systemem fitotronowym. Hodowlę kielków prowadzono przez okres 8 dni przy względnej wilgotności wynoszącej 80%, w temperaturach 18°C w świetle UVB (310 nm). Wyhodowane kielki poddano fermentacji stosując zawiesinę bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 (przygotowaną jak w przykładzie 1), o stężeniu komórek  $1 \times 10^8$  jtk/ml. Fermentację wyhodowanych kielków prowadzono 4 dni w temperaturze 30°C. Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach ciecierzycy oznaczono jak w przykładzie 1.

Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach ciecierzycy były następujące:

izoflawonoidy ogółem	2094,91 mg/100 g ss.
w tym:	
daidzyna	0,04 mg/100 g ss.
ononina	108,85 mg/100 g ss.
glicytyna	0,57 mg/100 g ss.
sissotryna	22,16 mg/100 g ss.
genistyna	0,76 mg/100 g ss.
biochanina A	256,05 mg/100 g ss.
genisteina	12,18 mg/100 g ss.
formononetyna	676,41 mg/100 g ss.
kumestrol	1017,92 mg/100 g ss.

Dla porównania w analogiczny sposób oznaczono zawartość i skład izoflawonoidów w wyhodowanych w analogicznych warunkach i niefermentowanych kielkach ciecierzycy.

Zawartość i skład izoflawonoidów w niefermentowanych kielkach ciecierzycy były następujące:

izoflawonoidy ogółem	485,97 mg/100 g ss.
w tym:	
daidzyna	0,51 mg/100 g ss.
ononina	88,09 mg/100 g ss.
glicytyna	4,08 mg/100 g ss.
sissotryna	24,64 mg/100 g ss.
genistyna	0,52 mg/100 g ss.
daidzeina	0,47 mg/100 g ss.
biochanina A	75,68 mg/100 g ss.
genisteina	0,66 mg/100 g ss.
formononetyna	289,75 mg/100 g ss.
kumestrol	1,59 mg/100 g ss.

## Przykład 5

Kielkowanie nasion lucerny przeprowadzono w komorze klimatycznej systemem fitotronowym. Hodowlę kielków prowadzono przez okres 7 dni przy względnej wilgotności wynoszącej 80%, w temperaturach 18°C w świetle UVA (340 nm). Wyhodowane kielki poddano fermentacji stosując zawiesinę bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 (przygotowaną jak w przykładzie 1), o stężeniu komórek  $6 \times 10^7$  jtk/ml. Fermentację wyhodowanych kielków prowadzono 2 dni w temperaturze 30°C. Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach lucerny oznaczono jak w przykładzie 1. Zawartość i skład izoflawonoidów w fermentowanych kielkach lucerny były następujące:

izoflawonoidy ogółem	289,69 mg/100 g ss.
w tym:	
pueraryna	0,06 mg/100 g ss.
daidzyna	0,73 mg/100 g ss.
ononina	22,72 mg/100 g ss.
glicytyna	0,84 mg/100 g ss.
sissotryna	23,93 mg/100 g ss.
genistyna	1,28 mg/100 g ss.
daidzeina	58,99 mg/100 g ss.
biochanina A	18,50 mg/100 g ss.
genisteina	62,98 mg/100 g ss.
formononetyna	97,50 mg/100 g ss.
kumestrol	2,16 mg/100 g ss.

Dla porównania w analogiczny sposób oznaczono zawartość i skład izoflawonoidów w wyhodowanych w analogicznych warunkach i niefermentowanych kielkach lucerny. Zawartość i skład izoflawonoidów w niefermentowanych kielkach lucerny były następujące:

izoflawonoidy ogółem	193,43 mg/100 g ss.
w tym:	
ononina	1,38 mg/100 g ss.
glicytyna	0,05 mg/100 g ss.
sissotryna	16,26 mg/100 g ss.
daidzeina	80,19 mg/100 g ss.
biochanina A	1,92 mg/100 g ss.
genisteina	75,03 mg/100 g ss.
formononetyna	18,59 mg/100 g ss.

## Przykład 6

Kielkowanie nasion czerwonej koniczyny przeprowadzono w komorze klimatycznej systemem fitotronowym. Hodowlę kielków prowadzono przez okres 3 dni przy względnej wilgotności wynoszącej 80%, w temperaturach 25°C w świetle białym (400–700 nm). Wyhodowane kielki poddano fermentacji stosując zawiesinę bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 (przygotowaną jak w przykładzie 1), o stężeniu komórek  $1 \times 10^7$  jtk/ml. Fermentację wyhodowanych kielków prowadzono 2 dni w temperaturze 30°C.

Fermentowane kielki poddano analizie mikrobiologicznej, która wykazała obecność bakterii *Lactobacillus* sp. w ilości 9,82 Log<sub>10</sub> jtk/ml

Wyniki oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego były następujące:

całkowita liczba pleśni	1,32 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozo <sup>+</sup> ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp.)	2,08 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozo <sup>-</sup> ( <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.)	nie wykryto
<i>Staphylococcus</i> sp. mannitol <sup>+</sup> ( <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> )	7,08 Log <sub>10</sub> jtk/g
<i>Staphylococcus</i> sp. mannitol <sup>-</sup> ( <i>S. epidermidis</i> )	nie wykryto

Dla porównania oznaczono obecność bakterii *Lactobacillus* sp. i dokonano oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego kielków czerwonej koniczyny wyhodowanych w analogicznych warunkach, ale niefermentowanych.

Bakterie fermentacji mlekowej *Lactobacillus* sp. były obecne w ilości 8,28 Log<sub>10</sub> jtk/ml.

Wyniki oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego były następujące:

całkowita liczba pleśni	3,76 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>+</sup> ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp.)	4,75 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>-</sup> ( <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.)	2,58 Log <sub>10</sub> jtk/g

Staphylococcus sp. mannitol <sup>+</sup> ( <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> )	7,88 Log <sub>10</sub> jtk/g
Staphylococcus sp. mannitol <sup>-</sup> ( <i>S. epidermidis</i> )	nie wykryto

## P r z y k ł a d 7

Kiełkowanie nasion ciecierzycy przeprowadzono w komorze klimatycznej systemem fitotronowym. Hodowlę kiełków prowadzono przez okres 10 dni przy względnej wilgotności wynoszącej 80%, w temperaturach 18°C w świetle niebieskim (450 nm). Wyhodowane kiełki poddano fermentacji stosując zawiesinę bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 (przygotowaną jak w przykładzie 1), o stężeniu komórek  $5 \times 10^7$  jtk/ml. Fermentację wyhodowanych kiełków prowadzono 4 dni w temperaturze 30°C. Fermentowane kiełki poddano analizie mikrobiologicznej, która wykazała obecność bakterii *Lactobacillus* sp. w ilości 9,62 Log<sub>10</sub> jtk/ml.

Wyniki oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego były następujące:	
całkowita liczba pleśni	3,34 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>+</sup> ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp.)	4,38 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>-</sup> ( <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.)	nie wykryto
Staphylococcus sp. mannitol <sup>+</sup> ( <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> )	0,60 Log <sub>10</sub> jtk/g
Staphylococcus sp. mannitol <sup>-</sup> ( <i>S. epidermidis</i> )	nie wykryto.

Dla porównania oznaczono obecność bakterii *Lactobacillus* sp i dokonano oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego kiełków ciecierzycy wyhodowanych w analogicznych warunkach, ale niefermentowanych.

Bakterie fermentacji mlekowej *Lactobacillus* sp. były obecne w ilości 8,20 Log<sub>10</sub> jtk/ml.

Wyniki oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego były następujące:	
całkowita liczba pleśni	4,55 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>+</sup> ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp.)	5,80 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>-</sup> ( <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.)	2,58 Log <sub>10</sub> jtk/g
Staphylococcus sp. mannitol <sup>+</sup> ( <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> )	3,71 Log <sub>10</sub> jtk/g
Staphylococcus sp. mannitol <sup>-</sup> ( <i>S. epidermidis</i> )	nie wykryto

## P r z y k ł a d 8

Kiełkowanie nasion soczewicy przeprowadzono w komorze klimatycznej systemem fitotronowym. Hodowlę kiełków prowadzono przez okres 7 dni przy względnej wilgotności wynoszącej 80%, w temperaturach 25°C w świetle białym (400–700 nm). Wyhodowane kiełki poddano fermentacji stosując zawiesinę bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 (przygotowaną jak w przykładzie 1), o stężeniu komórek  $8 \times 10^7$  jtk/ml. Fermentację wyhodowanych kiełków prowadzono 3 dni w temperaturze 30°C. Fermentowane kiełki poddano analizie mikrobiologicznej, która wykazała obecność bakterii *Lactobacillus* sp. w ilości 9,72 Log<sub>10</sub> jtk/ml.

Wyniki oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego były następujące:	
całkowita liczba pleśni	2,30 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>+</sup> ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp.)	4,83 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>-</sup> ( <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.)	nie wykryto
Staphylococcus sp. mannitol <sup>+</sup> ( <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> )	nie wykryto
Staphylococcus sp. mannitol <sup>-</sup> ( <i>S. epidermidis</i> )	nie wykryto

Dla porównania oznaczono obecność bakterii *Lactobacillus* sp. i dokonano oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego kiełków soczewicy wyhodowanych w analogicznych warunkach, ale niefermentowanych.

Bakterie fermentacji mlekowej *Lactobacillus* sp. były obecne w ilości 8,30 Log<sub>10</sub> jtk/ml.

Wyniki oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego były następujące:	
całkowita liczba pleśni	4,54 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>+</sup> ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp.)	5,28 Log <sub>10</sub> jtk/g
Gram-ujemne bakterie laktozy <sup>-</sup> ( <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.)	nie wykryto
Staphylococcus sp. mannitol <sup>+</sup> ( <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> )	2,74 Log <sub>10</sub> jtk/g
Staphylococcus sp. mannitol <sup>-</sup> ( <i>S. epidermidis</i> )	nie wykryto

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania fermentowanych kiełków roślin strączkowych, **znamienny tym**, że kiełki roślin strączkowych zalewa się zawiesiną szczepu bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 w soli fizjologicznej, o stężeniu komórek  $1 \times 10^7$ – $1 \times 10^8$  jtk/ml stosując 30–90 ml roztworu bakterii na 50 g kiełków i poddaje w tym roztworze fermentacji w temperaturze 30°C w czasie 48–72 godziny, po czym sfermentowane kiełki przeznacza się bezpośrednio do spożycia jako produkt świeży lub poddaje utrwaleniu.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że fermentacji poddaje się kiełki wyhodowane w komorze klimatycznej systemem fitotronowym, przy wilgotności względnej 80% w temperaturze 18–25°C w czasie 2–11 dni przy oświetleniu światłem białym o długości fali 400–700 nm, niebieskim o długości fali 450 nm, czerwonym o długości fali 650 nm, UVA o długości fali 340 nm, UVB o długości fali 310 nm.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiesinę szczepu bakterii sporządza się z zamrożonych form bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 poprzez dwukrotny pasaż po 24 godzinach w podłożu MRS broth i następnie namnażanie na podłożu MRS broth w czasie 24 godzin, odwirowanie przy szybkości 10 000 rpm w czasie 20 minut w temperaturze 4°C i zawieszanie w soli fizjologicznej.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że fermentacji poddaje się kiełki roślin strączkowych, jak czerwona koniczyna (*Trifolium pratense* L.), lucerna (*Medicago sativa* L.), soczewica (*Lens culinaris* Medik.), ciecierzycą (*Cicer arietinum* L.).
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sfermentowane kiełki poddaje się utrwaleniu przez suszenie, korzystnie liofilizację.

## Rysunek

