

5 **BAKTERYJNA KULTURA STARTEROWA, ZAKWAS JĄ ZAWIERAJĄCY, SPOSÓB
WYTWARZANIA PIECZYWA I ZASTOSOWANIE BAKTERYJNEJ KULTURY
STARTEROWEJ LUB ZAKWASU DO WYTWARZANIA PIECZYWA**

DZIEDZINA TECHNIKI

10 Przedmiotem wynalazku jest bakteryjna kultura starterowa zawierająca bakterie fermentacji mlekowej w postaci biomasy do prowadzenia zakwasów z mąki razowej lub pełnoziarnistej, obejmująca bakterie fermentacji mlekowej wyselekcjonowane pod kątem optymalnego efektu technologicznego i właściwości funkcjonalnych pieczywa razowego lub pełnoziarnistego. Przedmiotem wynalazku jest również zakwas zawierający bakteryjną kulturę starterową według
15 wynalazku, sposób wytwarzania pieczywa i zastosowanie bakteryjnej kultury starterowej lub zakwasu według wynalazku do wytwarzania pieczywa.

STAN TECHNIKI

 Spożycie chlebów z mąki razowej, polecane jest przez specjalistów ds. żywienia człowieka,
20 jako bardzo bogatych we włókno pokarmowe i wiele składników bioaktywnych, które nadają im charakter żywności o działaniu prozdrowotnym (Bartnikowska, 2009; Jurga, 2011). Pieczywo takie zalecane jest ponadto w dietach odchudzających, ponieważ charakteryzuje się niskim indeksem glikemicznym (około 50), w odróżnieniu od pieczywa z mąki jasnej (70-95) (Gambuś i Litwinek, <http://dieta.mp.pl/zasady/show.html?id=74904>). Pieczywo to spełnia zatem zalecenia
25 WHO w programie zwalczania otyłości, dotyczące preferencji spożywania produktów, których indeks glikemiczny nie przekracza 70. Coraz większa świadomość konsumentów wymusza zatem na producentach pieczywa dbałość o pokrycie zapotrzebowania rynku na pieczywo o działaniu funkcjonalnym, wyprodukowane zarówno z tradycyjnych surowców chlebowych, tj. razowej mąki żytniej, czy pszennej jak również z surowców niekonwencjonalnych, a nawet
30 reliktowych, tzn. z mąki orkiszowej (*Triticum spelta*). W związku z trudnościami ze spełnieniem tych wymagań, na rynku na ogół dostępne są głównie produkty tylko z udziałem mąk z pełnego przemiału, produkowane z zakwasów na bazie mąki jasnej lub przy udziale mieszanek piekarniczych zawierających również wiele innych dodatków, co prawda dozwolonych, jednakże na pewno nie zalecanych przez dietetyków jako wyroby prozdrowotne i nie mieszczące się w
35 kategoriach pieczywa tradycyjnego i ekologicznego. Wyprodukowanie smacznego i akceptowanego chleba żytniego wymaga ukwaszenia mąki, natomiast pieczywo pszenne, w tym orkiszowe, wypiekane jest głównie z udziałem drożdży, w oparciu o fermentację alkoholową. W dobie stosowania kultur starterowych do produkcji zakwasów piekarskich, zalecane jest

stosowanie ukwaszania wszystkich rodzajów mąki, ze względu na korzystne procesy zachodzące podczas jej fermentacji: przede wszystkim wytwarzanie kwasów organicznych wpływających na smak i aromat pieczywa, produkcję witamin z grupy B, inaktywację organizmów patogennych, rozkład fitynianów, a tym samym zwiększenie przyswajalności składników mineralnych, rozkład mikotoksyn i wydłużenie świeżości pieczywa. Fityniany (sole kwasu fitynowego z różnymi pierwiastkami) występujące powszechnie w ziarnach zbóż stanowią główną rezerwę fosforu, mioinozytolu oraz składników mineralnych (Chayen, 1994; Graf i Eaton, 1990). Sześćfosforan mioinozytolu (IP_6) w zbożach stanowi 94-97% całkowitej zawartości fitynianów (Kasim i Edwards, 1998; Pontoppidan i wsp., 2007). Najwięcej fitynianów znajduje się w zewnętrznej warstwie ziarna oraz w zarodku, z tego powodu produkty z mąki pełnoziarnistej zawierają większe stężenia tych związków niż produkty z mąk białych, wysokoczyszczonych (Pontoppidan i wsp., 2007). Sześć reaktywnych grup fosforanowych odpowiada za silne właściwości kompleksujące, zwłaszcza w stosunku do dodatnio naładowanych cząsteczek białek, aminokwasów i dwuwartościowych metali, powodując obniżenie ich funkcjonalności, strawności i absorpcji (Żyła, 2005). Fityniany ograniczają wykorzystanie z przewodu pokarmowego pierwiastków takich jak: Ca, Mg, Fe, Zn, Se, a także Cu, Co i Mn (Ahn i wsp., 2004; Liu i wsp., 1998; Park i wsp., 2006; Sandberg i wsp., 1999; Zhou and Erdman, 1995). Negatywny wpływ na biodostępność wymienionych pierwiastków dotyczy tylko IP_6 i pięćfosforanu mioinozytolu (IP_5) (García-Esteba i wsp., 1999; Plaami, 1997; Sandberg i wsp., 1989). W przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt monogastrycznych IP_6 i IP_5 hamują także aktywność enzymów istotną w procesach trawienia, zwłaszcza białek i skrobi (Żyła, 2005). W procesie produkcji pieczywa za aktywność fosforolityczną prowadzącą do powstania niższych fosforanów mioinozytolu i mioinozytolu odpowiadają enzymy obecne w mące, odpowiednie dla enzymów pH powstające w trakcie fermentacji, jak również fitazy produkowane przez niektóre mikroorganizmy (bakterie mlekowe lub drożdże) (De Angelis, 2003; Duliński i wsp., 2015). Niższe fosforany mioinozytolu (IP_1 - IP_4) zaledwie w niewielkim stopniu wiążą składniki mineralne lub też tworzone przez nie kompleksy, są lepiej rozpuszczalne w wodzie, a dzięki temu bardziej dostępne dla organizmu ludzi i zwierząt. Jednocześnie w literaturze można znaleźć dane dotyczące możliwego terapeutycznego zastosowania związków uwalnianych z IP_6 – mioinozytolu i jego niższych fosforanów (Liu i wsp., 1998).

Chociaż na fermentację mąki i produkcję żurów ma wpływ wiele czynników, to najważniejsza jest jakość startera fermentacji, dlatego w ostatnich latach prowadzone są intensywne prace badawcze z różnymi kompozycjami starterów, tj. odpowiednio dobranych i wyselekcjonowanych kultur bakteryjnych i drożdżowych, będących wiernym odtworzeniem biocenozy zakwasów chlebowych, gwarantujących zachowanie wymaganych technologicznie cech ciasta, a produktowi finalnemu nadanie korzystnych właściwości pożądaných przez konsumentów. Jedną z barier technologicznych, utrudniających powtarzalność jakościową pieczywa, szczególnie żytniego i z mąk ze zbóż pierwotnych, jest znikoma podaż na rynku dostępnych wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych i kultur starterowych do zakwasów i

żurów. Należy podkreślić, że obecnie stosowane kultury starterowe, były selekcjonowane pod kątem prawidłowej fermentacji i związanej z tym aktywności kwaszącej, ewentualnie produkcji aromatów. Biorąc pod uwagę potencjał bakterii mlekowych, zarówno pod względem cech technologicznych jak i funkcjonalnych, istnieją ogromne możliwości wprowadzania nowych kultur starterowych o pożądanych właściwościach. Produkcja i różnorodność kultur starterowych dla piekarnictwa jest bardzo niewielka, w porównaniu do innej branży spożywczej opartej na fermentacji mlekowej, jaką jest mleczarstwo.

ISTOTA WYNAŁAZKU

Wyizolowane ze spontanicznych żurów (wyprodukowanych na bazie mąki razowej) odpowiednie szczepy oraz właściwie skomponowane kultury starterowe z przeznaczeniem do ich użycia w takim samym środowisku, z udziałem szczepów wykazujących korzystne aktywności technologiczne i funkcjonalne, będące przedmiotem wynalazku, stanowią przewagę nad obecnie stosowanymi i ogólnie dostępnymi kulturami starterowymi. Powszechnie wiadomo, iż proces fermentacji, jak również efekt końcowy jakim jest pieczywo, w ogromnym stopniu zależą od użytej mąki, warunków klimatycznych, naturalnej bioróżnorodności pochodzącej z ziaren. Nawet najlepiej opracowane kultury starterowe wytworzone w innym regionie świata nie muszą sprawdzać się w odmiennych warunkach. Należy podkreślić fakt, iż bakterie mlekowe będące przedmiotem wynalazku zostały wyizolowane z żurów wytwarzanych na bazie polskich mąk razowych. Stanowi to niewątpliwie dużą zaletę w porównaniu do starterów produkowanych w innych krajach - przystosowanych do pracy w odmiennym środowisku. Wyizolowane kultury bakteryjne powinny wykazywać się najlepszym przystosowaniem do takiego typu zakwasów. Zgodnie z wiedzą twórców niniejszego wynalazku, nie wprowadzono dotychczas na rynek polski produktów dedykowanych pieczywom razowym. Pomimo obecności na rynku kilku rodzajów starterów, istnieje duże zapotrzebowanie na nowe zestawy mikroorganizmów, które można byłoby wyraźnie zidentyfikować, charakteryzujące się niezaprzeczalnymi zaletami, pozwalającymi wzbogacić aromat i smak pieczywa oraz urozmaicić jego asortyment. Obserwuje się wzrost zapotrzebowania na nowe startery do wyrobu pieczywa z mąki z pełnego przemiału również dlatego, że stale rośnie popyt na różne rodzaje zdrowego pieczywa wytwarzanego z naturalnych składników.

Celem wynalazku było opracowanie składu kultury starterowej do prowadzenia zakwasów z mąki razowej dla pieczywa w pełni razowego, zawierającej bakterie fermentacji mlekowej wyselekcjonowane pod kątem optymalnego efektu technologicznego i właściwości funkcjonalnych pieczywa razowego.

Opisane są, szczepy:

- **Lactobacillus plantarum** (oznaczony wewnątrz jako 2MI8 lub IBB3249) zdeponowany w PCM (Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu) w dniu 5 maja 2017 pod nr: **B/00117**,

oraz:

- **Lactobacillus plantarum** (oznaczony wewnętrznie jako 6PIII6B lub IBB3255) zdeponowany w PCM w dniu 5 maja 2017 pod nr: **B/00118**,

5 - **Lactobacillus brevis** (oznaczony wewnętrznie jako 2MIII4 lub IBB 3227) zdeponowany w PCM w dniu 5 maja 2017 pod nr: **B/00119**, i

- **Weisella confusa** (oznaczony wewnętrznie jako 6PI3 lub IBB3282) zdeponowany w PCM w dniu 5 maja 2017 pod nr: **B/00120**.

Ponadto przedstawione są kultury starterowe, w skład których wchodzi:

10 - Lactobacillus plantarum zdeponowany w PCM jako B/00117 w połączeniu z Lactobacillus plantarum zdeponowany w PCM jako B/00118 i Lactobacillus brevis zdeponowany w PCM jako B/00119 – **Zestaw 11**, korzystnie przy stosunku poszczególnych szczepów w mieszaninie wynoszącym odpowiednio 1:1:1,

15 - Lactobacillus plantarum zdeponowany jako B/00117 w połączeniu z Lactobacillus plantarum zdeponowanym jako B/00118 i Lactobacillus brevis zdeponowanym jako B/00119 oraz Weisella confusa zdeponowany jako B/00120 – **Zestaw 12**, korzystnie przy stosunku poszczególnych szczepów w mieszaninie wynoszącym odpowiednio 1:1:1:1, lub

- Lactobacillus plantarum zdeponowany jako B/00117 i Weisella confusa zdeponowany jako B/00120 – **Zestaw 12B** ograniczony do dwóch szczepów przy czym stosunek poszczególnych szczepów w mieszaninie korzystnie wynosi odpowiednio 3:1.

20 Wynalazek dotyczy bakteryjnej kultury starterowej zawierającej mieszaną kulturę bakterii fermentacji mlekowej w postaci biomasy zawierającej szczepu Lactobacillus plantarum zdeponowany jako B/00117 w połączeniu z Lactobacillus plantarum zdeponowanym jako B/00118 i Lactobacillus brevis zdeponowanym jako B/00119 oraz Weisella confusa zdeponowany jako B/00120.

25 W korzystnej bakteryjnej kulturze starterowej stosunek szczepów Lactobacillus plantarum zdeponowanego jako B/00117 do Lactobacillus plantarum zdeponowanego jako B/00118 do Lactobacillus brevis zdeponowanego jako B/00119 do Weisella confusa zdeponowanego jako B/00120 wynosi odpowiednio 1:1:1:1.

Kultura według wynalazku korzystnie zawiera co najmniej 1×10^{10} jtk/ml bakterii w biomacie.

30 Wynalazek dotyczy również nowych szczepów bakteryjnych: Lactobacillus plantarum - zdeponowany pod nr: B/00117, Lactobacillus plantarum zdeponowany pod nr: B/00118, Lactobacillus brevis zdeponowany pod nr: B/00119 i Weisella confusa zdeponowany pod nr: B/00120.

35 Przedmiotem wynalazku jest również kompozycja bakteryjna zawierająca co najmniej jeden nowy szczep bakteryjny według wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania pieczywa, który obejmuje etap dodawania nowego szczepu bakteryjnego według wynalazku i/lub kompozycji bakteryjnej według wynalazku.

Zastosowanie nowego szczepu według wynalazku i/lub kompozycji bakteryjnej według wynalazku do wytwarzania pieczywa jest również przedmiotem wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest także zakwas z mąki razowej lub pełnoziarnistej, który zawiera kulturę starterową według wynalazku.

- 5 Korzystnie zakwas jest z mąki razowej, żytniej i jest przeznaczony do wyrobu pieczywa bez dodatku drożdży.

W korzystnym zakwasie kulturą starterową jest bakteryjna kultura starterowa zawierająca bakterie fermentacji mlekowej w postaci biomasy według wynalazku.

- 10 W kolejnym korzystnym przykładzie wykonania, zakwas jest z mąki razowej, żytniej i jest przeznaczony do wyrobu pieczywa z dodatkiem drożdży.

W innym korzystnym przykładzie wykonania zakwasu, kultura starterowa zawiera zasadniczo wyłącznie szczepy *Lactobacillus plantarum* zdeponowany jako B/00117, *Lactobacillus plantarum* zdeponowany jako B/00118, *Lactobacillus brevis* zdeponowany jako B/00119 oraz *Weisella confusa* zdeponowany jako B/00120 w stosunku 1:1:1:1.

- 15 W kolejnym przykładzie wykonania, korzystny zakwas jest z mąki orkiszowej.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób wytwarzania pieczywa, który obejmuje etap dodawania kultury starterowej według wynalazku lub zakwasu według wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie kultury starterowej według wynalazku lub zakwasu według wynalazku do wytwarzania pieczywa.

- 20 W niniejszym opisie określenie „zawiera” dany szczep lub szczepy bakteryjne oznacza, że obecne mogą być również inne, niewymienione szczepy bakteryjne. Określenie „zawiera zasadniczo wyłącznie” dany szczep lub szczepy bakteryjne oznacza, że inne, niewymienione szczepy bakteryjne mogą być obecne jedynie w niewielkich ilościach, bez istotnego wpływu na właściwości biologiczne tak opisywanej mieszaniny szczepów.

- 25 W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „mąka razowa” rozumie się mąkę określoną jako typ 2000 wg Polskiej Normy PN-A-74032: 2002 *Przetwory zbożowe. Mąka żytnia*.

- 30 W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „mąka pełnoziarnista” rozumie się mąkę określoną jako pełnoziarnista, bez ograniczenia do typu mąki; o zawartości popiołu od 1,21% do 2,00%, klasyfikującą się jako typ: 1400 (mąka sitkowa), 1850 (mąka graham) lub 2000 (mąka razowa) w zależności od partii mąki wg Polskiej Normy: PN-A-74022:2003 *Przetwory zbożowe. Mąka pszenna*.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „mąka orkiszowa” rozumie się mąkę, w której zawartość mąki z pszenicy orkisz (*Triticum spelta*) wynosi 100%.

- 35 W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „zaczątek” rozumie się pierwszą fazę prowadzenia ciasta metodą trójfazową wyprowadzoną z mąki i wody w stosunku 2:3 z dodatkiem kultury starterowej.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „zakwas” rozumie się drugą fazę prowadzenia ciasta metodą trójfazową otrzymaną z jednej części zaczątku oraz dziewięciu części mąki i wody w stosunku 2:3.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „ciasto właściwe” rozumie się trzecią fazę prowadzenia ciasta metodą trójfazową otrzymaną przez dodanie zakwasu do mąki, wody, soli oraz w przypadku ciasta do wypieku pieczywa z dodatkiem drożdży - drożdży piekarskich i wymieszanie.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „chleb” rozumie się przefermentowane ciasto, podzielone na kęsy, zostawione do rozrostu i wypieczone.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „pieczywo” rozumie się ogólne określenie dotyczące wyrobów wypiekanych z mąki, wody i soli, w szczególności chlebów.

KRÓTKI OPIS FIGUR

Fig. 1 przedstawia aktywność kwaszącą kultury starterowej do prowadzenia zakwasów z mąki razowej wyrażoną jako kwasowość czynna oraz kwasowość miareczkowa monitorowaną podczas procesu fermentacji (0-1 doby, zaczątek; 1-2 doby, zakwas) oraz w trakcie przechowywania zakwasu w 12 °C (2-7 doby) dla mąki razowej żytniej względem kultury starterowej komercyjnej.

Fig. 2 przedstawia aktywność kwaszącą kultury starterowej do prowadzenia zakwasów z mąki razowej wyrażoną jako kwasowość czynna oraz kwasowość miareczkowa monitorowaną podczas procesu fermentacji (0-1 doby, zaczątek; 1-2 doby, zakwas) oraz w trakcie przechowywania zakwasu w 12 °C (2-7 doby) dla mąki pełnoziarnistej orkiszowej.

Fig. 3 przedstawia liczbę drobnoustrojów w próbkach zakwasów z mąki razowej żytniej wytworzonych z udziałem kultury starterowej względem kultury starterowej komercyjnej oraz zakwasu spontanicznego po 72 h fermentacji.

Fig. 4 przedstawia liczbę drobnoustrojów w próbkach zakwasów z mąki pełnoziarnistej orkiszowej wytworzonych z udziałem kultury starterowej względem zakwasu spontanicznego po 72 h fermentacji.

Fig. 5 przedstawia strukturę taksonomiczną bakterii na poziomie rzędu Lactobacillales w zakwasie z mąki razowej żytniej wytworzonym z udziałem Zestawu 12 kultury starterowej oraz w zakwasie spontanicznym żytnim po 72 h fermentacji. Uwzględniono wyniki stanowiące minimum 0,5% wszystkich odczytów przypisanych do rzędu Lactobacillales.

Fig. 6 przedstawia obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RAPD z użyciem startera RAPD-B10 oraz RAPD-GACA dla szczepów wchodzących w skład kultury starterowej: 1 - B/00117, 2 - B/00118, 3 - B/00119, 4 - B/00120; M - marker wielkości DNA.

Szczepy bakterii fermentacji mlekowej do zastosowania w kulturze starterowej według wynalazku wyizolowano z żurów produkowanych wyłącznie z razowej mąki żytniej i wyselekcjonowano spośród grupy nowo wyizolowanych kilkudziesięciu szczepów. Szczepy

zostały zidentyfikowane do gatunków na podstawie testów API 50CH, metodą sekwencjonowania genów kodujących 16S rRNA oraz metodą spektroskopii masowej (MALDI TOF MS). Otrzymane sekwencje nukleotydowe wykazały zgodność na poziomie 99% lub 100% z sekwencjami odpowiedniego gatunku zdeponowanymi w bazie GenBank. Różnicowanie izolatów w obrębie gatunków przeprowadzono przy użyciu metody RAPD-PCR. Szczepy reprezentujące dominujące gatunki występujące w żurach dobrano pod kątem szerokiego spektrum katabolizmu cukrów, zdolności do wytwarzania egzopolisacharydów i właściwości przeciwdrobnoustrojowych ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciw bakteriom przetrwalnikującym z rodzaju *Bacillus*. Szczep *Lactobacillus plantarum* IBB3249 zdeponowany jako B/00117 jest zdolny do katabolizmu 21 cukrów spośród badanych 49 cukrów, natomiast *Lactobacillus plantarum* IBB3255 zdeponowany jako B/00118 fermentuje 20 cukrów. Szczep *Lactobacillus brevis* IBB 3227 zdeponowany jako B/00119 cechuje aktywność przeciw bakteriom przetrwalnikującym *Brevibacillus brevis*. Szczep *Weisella confusa* IBB3282 zdeponowany jako B/00120 wytwarza egzopolisacharyd - dekstran (glukooligosacharyd - GOS) na podłożu zawierającym sacharozę. Wszystkie szczepy są zdolne do rozkładu maltozy.

Wyselekcjonowane szczepy bakterii według opisu w Przykładzie 1 w postaci kultur mieszanych otrzymanych jak w Przykładzie 2 zastosowano do przygotowania zakwasów z mąki razowej żytniej i porównano wobec kultury komercyjnej przeznaczonej do ukwaszania mąki żytniej. Zestawy kultur starterowych testowane były pod kątem optymalnej fermentacji zakwasów. Bakteryjną kulturę starterową będącą przedmiotem wynalazku cechuje optymalna aktywność kwasząca, a uzyskane zakwasy pozostają stabilne przez 5 dni do końca okresu monitorowania co zostało pokazane w Przykładzie 3 i na **Fig. 1**.

Kulturę starterową przetestowano również na mące pszennej orkiszowej uzyskując odpowiednio ukwaszone i stabilne zakwasy jak przedstawiono w Przykładzie 4 (**Fig. 2**).

Uzyskane w Przykładzie 3 zakwasy na mące razowej żytniej wykorzystano do wytworzenia pieczywa razowego żytniego bez (Przykład 5) i z dodatkiem drożdży (Przykład 6), które porównano z pieczywem wyprodukowanym z użyciem kultury komercyjnej przeznaczonej do ukwaszania mąki żytniej oraz z pieczywem wyprodukowanym na bazie zakwasów spontanicznych. Wytypowane zestawy kultur starterowych testowane były również pod kątem zdolności do rozkładu fitynianów, zmniejszających biodostępność mikro- i makroelementów, zarówno dla mikroflory zakwasów, jak również ludzi - konsumentów chleba oraz pod kątem możliwości uzyskania wysokiej jakości pieczywa wytworzonego z ich udziałem. Ponadto zakwasy otrzymane na mące pełnoziarnistej pszennej orkiszowej (Przykład 4) wykorzystano do wyprodukowania pieczywa orkiszowego z dodatkiem drożdży (Przykład 7).

Dla wszystkich otrzymanych zakwasów w Przykładzie 3 i 4 przeprowadzono analizę mikrobiologiczną metodami zależnymi od hodowli przedstawioną odpowiednio dla zakwasów na mące razowej żytniej w Przykładzie 8 (**Fig. 3**), a dla zakwasów na mące pełnoziarnistej orkiszowej w Przykładzie 9 (**Fig. 4**). Ocena ilościowa bakterii tlenowych i beztlenowych oraz termofilnych

i mezofilnych bakterii mlekowych pokazuje, że wartości te są podobne w żurach spontanicznych i suplementowanych. Liczba mezofilnych bakterii mlekowych była podobna jak dla zakwasów spontanicznych ok. 10^9 jtk/ml. We wszystkich próbkach liczba ta wynosiła od 5×10^8 do $9,6 \times 10^9$ jtk/ml. Podobnie jak dla zakwasów spontanicznych obserwowano także o 2-3 rzędy logarytmiczne 5 mniejszą liczbę drożdży w porównaniu do liczby mezofilnych bakterii mlekowych. Dla żadnej próbki żurów nie wyhodowano pleśni. Zauważono ponadto, że zastosowanie niektórych zestawów kultury starterowej znacząco obniżyło liczbę bakterii przetrwalnikujących (do poziomu ok. 10^2 jtk/ml) w porównaniu do żurów spontanicznych gdzie liczba ta wynosiła ok. 10^4 jtk/ml. Efekt zahamowania rozwoju bakterii przetrwalnikujących przez zastosowanie kultury starterowej 10 stanowiącej przedmiot wynalazku był porównywalny do wyników uzyskanych dla kultury starterowej komercyjnej.

Ponadto, dla zakwasu otrzymanego w Przykładzie 3 na mące razowej żytniej z udziałem Zestawu 12 kultury starterowej wykonano analizę różnorodności bakterii metodami niezależnymi od hodowli (Przykład 10). Wyniki przedstawiono względem zakwasu spontanicznego żytniego po 15 72 h fermentacji (**Fig. 5**). Rezultaty otrzymane w wyniku analizy bioinformatycznej pokazują, że środowisko zakwasów zdominowane jest przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Kolejnymi najliczniej reprezentowanymi grupami były niesklasyfikowane *Lactobacillales* oraz rodzaj *Weissella*.

Analiza mikrobiologiczna zależna i niezależna od hodowli wskazują na duże podobieństwo 20 zakwasów uzyskanych z udziałem kultury starterowej stanowiącej przedmiot wynalazku do zakwasów kontrolnych spontanicznych bądź wytworzonych na bazie kultury starterowej komercyjnej. Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność zastosowania takiej kultury starterowej do fermentacji mąki w celu wytworzenia zakwasów piekarskich o odpowiednim składzie mikroorganizmów.

25 Cel wynalazku został osiągnięty ponieważ opracowana kultura starterowa składająca się z bakterii fermentacji mlekowej pozwoliła na uzyskanie cechujących się odpowiednią bioróżnorodnością, dobrą aktywnością kwaszącą, stabilnych zakwasów z mąki razowej żytniej lub pełnoziarnistej pszennej orkiszowej. Z wykorzystaniem zakwasów na bazie kultury starterowej 30 będącej przedmiotem wynalazku uzyskuje się pieczywo o podobnej lub lepszej jakości niż chleby wytworzone z udziałem porównywanej kultury komercyjnej, czy zakwasów spontanicznych. Ponadto wykazano, iż pieczywo razowe żytnie powstające dzięki zastosowaniu kultury starterowej charakteryzuje się niską zawartością fosforanów mio-inozytolu, w szczególności 35 wyższych form (IP_6 i IP_5) co wpływa na zwiększoną biodostępność mikro- i makroelementów obecnych w pieczywie. Powstające w wyniku aktywności fitaz: mio-inozytol i jego niższe fosforany są związkami biostymulującymi o właściwościach prozdrowotnych.

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady wykonania, nieograniczające jego zakresu.

PRZYKŁADY

Przykład 1

W trakcie analizy mikrobiologicznej żurów spontanicznych na bazie mąki razowej żytniej przeprowadzono izolację bakterii kwasu mlekowego w celu utworzenia kolekcji drobnoustrojów gromadzącej m.in. bakterie o potencjalnie wysokim przystosowaniu do środowiska żurów na bazie mąk razowych. Bakterie izolowano z podłoży stałych MRS, PCM oraz Blickfeldta. Oceniono makroskopowo i mikroskopowo morfologię wszystkich izolatów. Utworzona została kolekcja 90 izolatów o potencjalnie wysokim przystosowaniu do środowiska żurów na bazie mąk razowych. Bakterie z utworzonej kolekcji zidentyfikowane zostały metodą sekwencjonowania genów kodujących 16S rRNA. Określono ich przynależność gatunkową. W tym celu wyizolowano DNA genomowe poszczególnych izolatów z zastosowaniem lizy enzymatycznej (lizozym i mutanolizyna) przy użyciu gotowych zestawów do izolacji DNA genomowego firmy A&A Biotechnology (Polska). Następnie na matrycy wyizolowanego DNA przeprowadzono amplifikację genów kodujących 16S rRNA z wykorzystaniem starterów specyficznych dla bakterii właściwych. Produkty reakcji PCR oczyszczono i oddano do sekwencjonowania w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN. Otrzymane sekwencje nukleotydowe przygotowano do dalszych analiz, korzystając z programu Clone Manager. Uzyskane sekwencje nukleotydowe porównano z bazami sekwencji nukleotydowych, stosując program BLAST. Dla wybranych grup mikroorganizmów należących do rodzajów: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* oraz *Weissella* przeprowadzono różnicowanie izolatów w obrębie gatunków przy użyciu metody losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD). Analizę RAPD wykonano na matrycy wyizolowanego DNA w dwóch powtórzeniach dla każdego z dwóch rodzajów starterów RAPD-GACA (SEQ ID NO. 1: : GACAGACAGACAGACA) oraz RAPD-B10 (SEQ ID NO. 2: CTGCTGGGAC). Produkty amplifikacji rozdzielano w żelach agarozowych, wizualizowano w świetle UV i fotografowano. Uzyskane obrazy analizowano z wykorzystaniem oprogramowania firmy Syngen umożliwiającego porównanie profili otrzymanych prążków. Przeprowadzona analiza pozwoliła na zróżnicowanie izolatów należących do określonego gatunku, a tym samym wyodrębnienie szczepów charakteryzujących się unikalnym genotypem. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RAPD z użyciem startera RAPD-B10 oraz RAPD-GACA dla szczepów wchodzących w skład kultury starterowej według wynalazku przedstawiono na **Fig. 6**. Przynależność gatunkową szczepów wchodzących w skład kultury starterowej stanowiącej przedmiot wynalazku potwierdzono metodą spektroskopii masowej z użyciem aparatu MALDI TOF przy dokonywaniu depozytu do PCM. Zgromadzone szczepy bakterii scharakteryzowano pod względem właściwości fizjologicznych i biochemicznych. Bakterie przebadano pod kątem właściwości amylolitycznych, zdolności do produkcji i wydzielania egzopolisacharydów, zakwaszania podłoża, produkcji związków tworzących aromat oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Wszystkie bakterie posiadające właściwości amylolityczne zostały zidentyfikowane do rodzaju *Enterococcus*. Wśród izolatów

wytwarzających egzopolisacharydy na podłożu z sacharozą (jako jedynym źródłem węgla) znalazły się bakterie należące do rodzajów *Weissella* i *Leuconostoc*.

Wśród bakterii kwaszących wyizolowanych z podłoża Blickfeldta wytypowano bakterie należące do rodzajów *Lactococcus* i *Enterococcus*. Ponadto z innych podłoży wyizolowano więcej bakterii o potencjale kwaszącym tj. bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, dla których podłoże Blickfeldta nie było podłożem optymalnym. Wśród izolatów posiadających zdolności metabolizmu soli cytrynianu do związków tworzących aromat (diacetyl, acetoina), zidentyfikowano wyłącznie bakterie należące do rodzaju *Enterococcus*. Oznaczono właściwości antagonistyczne dla izolatów z mąki żytniej, dla których stwierdzono działanie antagonistyczne wobec bakterii przetrwalnikujących z rodzajów *Bacillus*, *Brevibacillus* i *Lysinibacillus*. Dla wybranych izolatów pozyskanych z żurów przebadano profile metaboliczne wykorzystując zestawy API 50 CH. Szczepy wchodzące w skład kultury starterowej charakteryzują się zdolnością do katabolizmu następujących cukrów:

B/00117 (L-arabinoza, D-ryboza, D-galaktoza, D-glukoza, D-fruktoza, D-mannoza, D-mannitol, N-acetylo-glukozamina, Amigdalina, Arbutyna, Eskulina, Salicyna, D-celobioza, D-maltoza, D-laktoza, D-melibioza, D-sacharoza, D-trehaloza, D-melezytoza, D-rafinoza, β -gentiobioza);

B/00118 (D-ryboza, D-galaktoza, D-glukoza, D-fruktoza, D-mannoza, D-mannitol, D-sorbitol, N-acetylo-glukozamina, Amigdalina, Arbutyna, Eskulina, Salicyna, D-celobioza, D-maltoza, D-laktoza, D-melibioza, D-sacharoza, D-trehaloza, D-rafinoza, β -gentiobioza);

B/00119 (L-arabinoza, D-ryboza, D-ksyloza, Metylo- β -D-ksylopiranozyd, D-galaktoza, D-glukoza, D-fruktoza, Amigdalina, Eskulina, D-maltoza, D-melibioza);

B/00120 (D-ryboza, D-ksyloza, D-galaktoza, D-glukoza, D-fruktoza, D-mannoza, N-acetylo-glukozamina, Amigdalina, Arbutyna, Eskulina, Salicyna, D-celobioza, D-maltoza, D-sacharoza, β -gentiobioza, Glukonian, 2-Keto-glukonian).

Dla wyizolowanych szczepów, posiadających korzystne właściwości technologiczne i/lub szerokie spektrum zdolności katabolicznych przeprowadzono testy na koegzystencję, umożliwiające dobór szczepów niewykluczających się wzajemnie, mogących wchodzić w skład wieloszczepowych kultur starterowych.

Na podstawie przeprowadzonej charakterystyki fenotypowej szczepów opracowano zestawy bakterii mlekowych do testowych kultur starterowych.

30

Przykład 2

Kulturę starterową do otrzymywania zakwasu z mąki razowej składającą się z bakterii fermentacji mlekowej otrzymano z wykorzystaniem 2-litrowego fermentora szklanego Biostat B plus, firmy Sartorius. Biomase każdego szczepu uzyskiwano osobno poprzez zaszczepienie podłoża hodowlanego MRS 3% (10% w przypadku *Weissella confusa*) inokulum hodowli nocnej uzyskanej z pojedynczej kolonii. Wszystkie procesy fermentacyjne prowadzono w temperaturze 37°C; dla *Lactobacillus* zastosowano system fed-batch z suplementacją źródła węgla (3 g glukozy/h) przez 16 h (od 12 do 28 h). Namnażanie biomasy bakteryjnej przeprowadzono bez natleniania i

35

napowietrzania. Monitorowano i kontrolowano wartość pH na poziomie 6,5 wykorzystując 10 M roztwór NaOH. Proces prowadzono przez 30 h dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i 7 h dla *Weisella*.

W celu zagęszczenia biomasy, urobek z każdego fermentora wirowano w temperaturze 4°C, przy 5 6 tys. obr./min przez 15 minut, następnie przemywano roztworem 0,9% NaCl i ponownie wirowano. Otrzymany osad zawieszono w roztworze o właściwościach krioprotekcyjnych (0,9% NaCl, 20% trehaloza) i mrożono w ciekłym azocie. Porcje bakterii przechowywano w -80 °C. Liczba bakterii w mrożonych próbkach określana była poprzez wysiewanie 10-krotnych rozcieńczeń w soli fizjologicznej na podłoże stałe i określanie liczby bakterii tworzących kolonie 10 (jtk/ml).

Następnie zmieszano biomasę szczepów bakterii:

Lactobacillus plantarum zdeponowany jako B/00117 ze szczepami *Lactobacillus plantarum* zdeponowany jako B/00118 i *Lactobacillus brevis* zdeponowany jako B/00119 w proporcji 1:1:1 –

Zestaw 11;

15 *Lactobacillus plantarum* zdeponowany jako B/00117, *Lactobacillus plantarum* zdeponowany jako B/00118, *Lactobacillus brevis* zdeponowany jako B/00119 i *Weisella confusa* zdeponowany jako B/00120 w proporcji 1:1:1:1 – **Zestaw 12;**

oraz *Lactobacillus plantarum* zdeponowany jako B/00117 z *Weisella confusa* zdeponowany jako B/00120 w proporcji 3:1 – **Zestaw 12B.**

20 Powyższe zestawy stosowano w dalej opisanych przykładach.

Liczba bakterii w mrożonych próbkach określana była ponownie poprzez wysiewanie 10-krotnych rozcieńczeń w soli fizjologicznej na podłoże stałe i określanie liczby bakterii tworzących kolonie (jtk/ml). Otrzymano preparaty o zawartości bakterii 10^{10} jtk/ml.

25 **Przykład 3**

Kulturę starterową otrzymaną w Przykładzie 2 wykorzystano do wytworzenia zakwasów z mąki razowej żytniej. Najpierw z mąki i wody z dodatkiem pojedynczego preparatu kultury starterowej wyprowadzano zaczątek, który następnie użyto do wytworzenia zakwasu według następującej receptury:

30 Receptura do przygotowania 100 kg zakwasu

- mąka żytnia typ 2000 40 kg (w tym 4 kg użyte do zaczątku)
- woda 60 kg (w tym 6 kg użyte do zaczątku), oraz
- użyta do zaczątku kultura starterowa komercyjna (kultura starterowa do ukwaszania mąki żytniej (bakteryjno-drożdżowa) LV2 firmy Lesaffre, zawierająca *Saccharomyces chevalieri*, *Lactobacillus brevis* - dane z firmy Lesaffre Bio-Corporation S.A., Łódź, na podstawie Kawka i Górecka, 2010) 20 g

[$\geq 10^8$ jtk/g produktu] – 2×10^9 jtk bakterii

[$\geq 10^8$ jtk/g produktu] – 2×10^9 jtk drożdży, lub

- użyty do zaczątku preparat kultury starterowej według wynalazku 2 ml [10^{10} jtk bakterii]

Po wymieszaniu składników (5 min), zaczątki poddawane były fermentacji 24 h w temperaturze 30 °C. Dojrzałe zaczątki mieszano z mąką i wodą w odpowiedniej proporcji do uzyskania 100 kg gotowego zakwasu i poddawano 24 h fermentacji w 30 °C. Zakwasy następnie schładzano i przechowywano w temp. 12 °C przez 5 dni.

Podczas prowadzenia fermentacji oraz w trakcie przechowywania zakwasów monitorowano proces zakwaszania przy użyciu skomputeryzowanego systemu oceny aktywności kwaszącej (iCINAC). Pomiary kwasowości czynnej dokonywane były co 10 min z wykorzystaniem aparatu iCINAC, natomiast kwasowość miareczkową zakwasów wyznaczano kilkakrotnie w trakcie prowadzenia badań przez okres 7 dni z użyciem wodorotlenku sodu w obecności fenoloftaleiny wg „Pieczywo – Metody badań”, PN- A-74108. Wyniki pomiarów przedstawiono na **Fig. 1**. W przypadku wszystkich trzech preparatów kultury starterowej, Zestawu 11, 12 i 12B opisanych w przykładzie 2, uzyskano optymalną aktywność kwaszącą zbliżoną do aktywności kwaszącej porównywanej kultury komercyjnej, a uzyskane zakwasy pozostały stabilne przez 5 dni do końca okresu monitorowania.

Przykład 4

W analogiczny sposób co w Przykładzie 3 wykorzystano kulturę starterową otrzymaną w Przykładzie 2 do wytworzenia zakwasów z mąki pełnoziarnistej orkiszowej. Receptura do przygotowania 100 kg zakwasu

- mąka orkiszowa pełnoziarnista 40 kg (w tym 4 kg użyte do zaczątku)
- woda 60 kg (w tym 6 kg użyte do zaczątku), oraz
użyta do zaczątku kultura starterowa komercyjna (kultura starterowa do ukwaszania mąki żytniej (bakteryjno-drożdżowa) LV2 firmy Lesaffre) 20 g, lub

- użyty do zaczątku preparat kultury starterowej według wynalazku 2 ml [10^{10} jtk bakterii]

Wyniki pomiarów aktywności kwaszącej dla Zestawu 12 i Zestawu 12B dla mąki orkiszowej przedstawiono na **Fig. 2**. Podobnie jak dla mąki razowej żytniej uzyskano optymalną aktywność kwaszącą, a uzyskane zakwasy pozostały stabilne przez 5 dni do końca okresu monitorowania.

Przykład 5

Zakwasy uzyskane w Przykładzie 3 posłużyły do wytworzenia pieczywa razowego żytniego bez dodatku drożdży, które porównano z pieczywem wyprodukowanym z użyciem kultury starterowej komercyjnej (kultura starterowa do ukwaszania mąki żytniej (bakteryjno-drożdżowa) LV2 firmy Lesaffre) przeznaczonej do ukwaszania mąki żytniej oraz z pieczywem wyprodukowanym na bazie zakwasów spontanicznych.

Receptura do przygotowania pieczywa (chleby o wadze 0,5 kg)

Przygotowanie surowców i ich namiary (100 kg ciasta):

- mąka żytnia typ 2000 50,6 kg

- | | |
|----------------------------------|---------|
| – zakwas z mąki żytniej typ 2000 | 17,1 kg |
| – sól | 1,17 kg |
| – woda (temp. 38°C) | 31,1 kg |

Wytwarzanie i sporządzanie ciasta właściwego

- | | | |
|---|-----------------------------------|----------|
| 5 | – czas miesienia – wolne obroty | 7 min. |
| | – czas miesienia – szybkie obroty | 3 min. |
| | – temperatura ciasta właściwego | do 35 °C |

Dzielenie, formowanie, kształtowanie ciasta właściwego

- | | | |
|----|---|-------------|
| 10 | – masa kęsa | 0,6 kg |
| | – czas dzielenia i kształtowanie ciasta na kęsy | 45 min. |
| | – czas fermentacji ciasta właściwego w kęsach | do 240 min. |

Proces wypieku

- | | | |
|----|------------------------|---------|
| | – temperatura wypieku: | 200 °C |
| 15 | – czas wypieku | 60 min. |

Nazwy próbek:

- VSZ1 – chleb razowy żytni wyłącznie na zakwasie spontanicznym – 1 powtórzenie
- VSZ2 – chleb razowy żytni wyłącznie na zakwasie spontanicznym – 2 powtórzenie
- VKZ K – chleb razowy żytni wyłącznie na zakwasie z kulturą starterową komercyjną K
- 20 • **VKZ 11** – chleb razowy żytni wyłącznie na zakwasie z kulturą starterową - Zestaw 11
- **VKZ 12** – chleb razowy żytni wyłącznie na zakwasie z kulturą starterową - Zestaw 12
- **VKZ 12B** – chleb razowy żytni wyłącznie na zakwasie z kulturą starterową - Zestaw 12B.

Otrzymane pieczywo poddano ocenie organoleptycznej wg PN-A-74108:1996, analizę przeprowadzono metodą punktową przez minimum 15-to osobowy panel o sprawdzonej

25 wrażliwości sensorycznej (**Tabela 1**). Każdy rodzaj pieczywa zakwalifikowano do odpowiedniej klasy jakości zgodnie z PN-A-74108:1996, doliczając do sumy punktów z oceny organoleptycznej każdego badanego pieczywa 8 punktów za wskaźniki biochemiczne (**Tabela 2**). Wykonano również pomiar masy zimnych bochenków, które wraz z recepturą posłużyły do obliczenia

30 wydajności ciasta oraz całkowitej straty wypiekowej (Jakubczyk i Haber [1981]). Analizowano również objętość bochenków w aparacie Volscan Profiler (Stable Micro System, Wielka Brytania) i na podstawie masy bochenków obliczono objętość 100 g pieczywa (**Tabela 2**). Wykonano również analizę wilgotności miękiszu metodą suszarkową (wg AOAC – metoda nr 925.10) oraz profilu tekstury miękiszu chlebów, analizatorem tekstury TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Wielka Brytania) (**Tabela 3**). Posługując się oprogramowaniem Exponent v. 4.0.13.0. i

35 standardowym programem makro dla testu TPA (Stable Micro Systems, Wielka Brytania), obliczono twardość (maksymalną siłę osiągniętą podczas pierwszego ściskania), sprężystość (zdolność miękiszu do odzyskania pierwotnej wysokości w czasie pomiędzy końcem pierwszego ściśnięcia, a początkiem drugiego ściśnięcia), spójność (stopień rozpadu materiału pod wpływem

oddziaływania mechanicznego na produkt, wyrażaną jako stosunek pola powierzchni pod krzywą drugiego ściskania do pola powierzchni pod krzywą pierwszego ściskania), żujność (energię potrzebną do rozdrobnienia (żucia) produktu o konsystencji stałej, do stanu nadającego się do połknięcia – jest to iloczyn twardości, spójności i sprężystości) oraz odbojność – sprężystość natychmiastowa miękiszu (zdolność powrotu do formy pierwotnej próbki poddanej deformacji wyrażona jako pochodna czasu po sile).

Tabela 1. Ocena organoleptyczna chlebów żytnich wytworzonych bez dodatku drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wygląd zewnętrzny		Barwa skórki		Grubość skórki		Pozostałe cechy skórki		Elastyczność miękiszu		Porowatość miękiszu		Pozostałe cechy miękiszu		Zapach i smak	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSZ1	4,1	1,4	2,1	0,8	3,6	1,2	3,3	1,2	3,4	0,5	2,5	0,5	1,8	1,2	5,0	1,7
VSZ2	4,8	0,4	2,5	0,5	3,6	0,5	3,6	1,0	3,4	0,5	2,6	0,5	2,6	0,5	4,6	1,9
VKZ K	4,3	0,5	2,6	0,5	3,5	0,5	3,8	0,5	3,1	0,3	2,5	0,5	2,6	0,5	5,6	0,5
VKZ 11	5,0	0,0	2,6	0,5	3,3	0,5	3,6	0,5	3,6	0,5	2,3	0,9	2,6	0,5	5,3	0,5
VKZ 12	5,0	0,0	2,5	0,5	3,8	0,4	3,9	0,3	2,9	1,0	2,3	0,5	2,4	0,5	4,5	1,5
VKZ 12B	4,6	0,5	2,4	0,5	3,7	0,5	3,9	0,4	3,9	0,4	2,7	0,5	2,7	0,5	5,7	0,5

W tabeli przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym (SD)

5

10

Tabela 2. Jakość chlebów żytnich wytworzonych bez dodatku drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Masa bochenka [g]		Objętość bochenka [cm ³]		Objętość 100 g pieczywa [cm ³]		Ocena organoleptyczna		Kwasowość miększu [°kw]	
		±5		±24		±4	Średnia suma punktów	Klasa jakości		
VSZ1	514 b	±5	897 d	±24	175 e	±4	33,8 a	±3,6	II	10
VSZ2	519 bc	±7	863 c	±21	166 d	±4	35,8 ab	±2,1	I	11
VKZ K	523 c	±5	781 a	±14	149 a	±3	35,9 ab	±1,9	I	9
VKZ 11	523 c	±5	815 b	±11	156 b	±3	36,3 b	±2,1	I	8
VKZ 12	518 bc	±4	817 b	±13	158 bc	±2	35,4 ab	±2,0	II	10
VKZ 12B	508 a	±6	814 b	±9	160 c	±2	37,6 b	±1,0	I	8

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe, a, b... – wartości średnie

5 oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Otrzymane chleby przechowywano przez 7 dni, i w celu określenia zmian zachodzących podczas starzenia się pieczywa wykonano analizę wilgotności miększu metodą suszarkową (wg AOAC – metoda nr 925.10) oraz profilu tekstury miększu chlebów, analizatorem tekstury TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Wielka Brytania). Wyniki analizy po 5 i 7 dobie przechowywania zamieszczono odpowiednio w **Tabeli 4 i 5**.

Dla wytworzonego pieczywa wyznaczono również trwałość mikrobiologiczną metodą termostatową (wg PN-A-74102:1999) (**Tabela 6**). Losowo pobraną próbkę wyrobu termostatowano w temperaturze 30°C i obserwowano ewentualne zmiany organoleptyczne wywołane przez pleśnie, równorzędnie próbkę termostatowano również w temperaturze 37°C, w celu określenia zmian organoleptycznych wywoływanych przez tlenowe bakterie przetrwalnikujące amylolyczne. Wszystkie chleby przechowywano przez minimum 7 dni, a odczyty przeprowadzano po 1, 5 i 7 dobie przechowywania, a nawet dłużej - do momentu wystąpienia pierwszych zmian wywołanych przez mikroorganizmy lub konieczności zwolnienia miejsca w cieplarni dla nowych próbek. Poza wyznaczeniem trwałości mikrobiologicznej pieczywa metodą termostatową, wykonano również posiewy mikrobiologiczne, mające na celu określenie w 1 g pieczywa: liczby tlenowych bakterii amylolycznych (zgodnie z PN-A-74134-4:1998) (OLBA), liczby tlenowych przetrwalnikujących bakterii amylolycznych (zgodnie z PN-A-74134-4:1998) (OLBAP), liczby drożdży i pleśni (zgodnie z PN-A-74134-6:1998) (OLG) (**Tabela 7**). Wszystkie analizy mikrobiologiczne wykonywano w trzech powtórzeniach w 1, 5 i 7 dobie przechowywania pieczywa.

W otrzymanym pieczywie oraz w mące oznaczono zawartość fosforanów mio-inozytolu (wg Chen i Li, 2003) (**Tabela 8**). Ponadto w chlebach oznaczono kwasowość miększu metodą miareczkową wg PN-A-74108:1996 oraz zawartość substancji kształtujących aromat pieczywa, metodą HPLC/UV, opierając się na badaniach Wiseblatt i Zoumut (1963), Johnson i Linko (1964) i

Lefebvre i wsp. (2002) (**Tabela 9**). Wśród związków aromatycznych oznaczono zawartość kwasów organicznych (kwasu mlekowego, octowego, propionowego cytrynowego, winowego, jabłkowego i cytrynowego).

5 Wszystkie analizy jakości, profili tekstury oraz składu chemicznego chlebów wykonano w minimum dwóch powtórzeniach, ostateczny wynik przedstawiono w postaci wartości średnich \pm SD (odchylenie standardowe). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) w programie Statistica 10. Istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem Duncana przy $\alpha = 0,05$.

10 Pieczywo razowe żytnie bez dodatku drożdży uzyskane na zakwasach z udziałem kultury starterowej według wynalazku dla wszystkich proponowanych w wynalazku zestawień drobnoustrojów charakteryzuje się większą objętością i wilgotnością miększu, znacząco mniejszą twardością i żujnością miększu w porównaniu do pieczywa kontrolnego wytworzonego w oparciu o kulturę komercyjną. Pieczywo na zakwasie suplementowanym opracowaną kulturą
15 starterową wykazuje taką samą trwałość mikrobiologiczną (6 dni) jak pieczywo kontrolne z kulturą komercyjną.

Najlepszą ocenę organoleptyczną, wśród razowych chlebów żytnich bez dodatku drożdży uzyskało pieczywo wytworzone z udziałem Zestawu 12B. Zestawy 11 i 12B zostały ocenione znacząco lepiej zarówno w stosunku do zakwasów spontanicznych, jak również względem kultury
20 komercyjnej.

Ze względu na uzyskane najlepsze parametry technologiczne Zestawy 11 i 12B są szczególnie polecane dla pieczywa razowego żytniego bez dodatku drożdży.

Wykorzystanie zakwasów sporządzonych z razowej mąki żytniej przy udziale kultury starterowej
25 do produkcji pieczywa, spowodowało we wszystkich chlebach żytnich bez dodatku drożdży znaczące zmniejszenie ilości fosforanów mio-inozytolu (IP), w stosunku do analizowanych surowców, czyli mąki z pełnego przemiału, użytej do wypieku, dla której sumaryczna zawartość IP w % s.m. wynosiła 1,18. Zmniejszenie zawartości tych związków wyniosło od 1,5 do 4,7 razy.

Tabela 3. Profil tekstury miększu w dniu wypieku chlebów żytnich wytworzonych bez dodatku drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSZ1	48,81 d	0,01	16,13 a	0,92	0,925 a	0,047	0,389 a	0,018	5,80 a	0,30	0,137 b	0,009
VSZ2	49,76 e	0,01	18,83 a	1,52	0,910 a	0,019	0,359 a	0,023	6,19 a	1,03	0,105 a	0,004
VKZ K	46,38 a	0,01	53,50 e	0,37	0,967 a	0,040	0,373 a	0,014	19,27 d	0,21	0,114 a	0,006
VKZ 11	47,57 b	0,02	39,92 d	0,52	0,923 a	0,030	0,365 a	0,011	13,47 c	0,65	0,113 a	0,003
VKZ 12	48,08 c	0,06	32,40 c	0,38	0,974 a	0,013	0,366 a	0,007	11,56 c	0,06	0,109 a	0,004
VKZ 12B	49,73 e	0,01	24,81 b	2,38	0,942 a	0,028	0,381 a	0,048	8,92 b	1,72	0,105 a	0,011

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniem standardowym (SD), a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 4. Profil tekstury miększu po 5 dobie przechowywania chlebów żytnich wytworzonych bez dodatku drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSZ1	49,07 d	0,11	20,74 a	0,95	0,864 a	0,043	0,295 a	0,024	5,31 a	0,94	0,086 b	0,003
VSZ2	49,20 d	0,09	18,45 a	0,94	0,901ab	0,047	0,276 a	0,007	4,60 a	0,59	0,073 a	0,005
VKZ K	45,86 a	0,14	72,46 e	1,12	0,924 abc	0,042	0,304 a	0,003	20,37 c	1,05	0,086 b	0,000
VKZ 11	46,85 b	0,09	60,31 d	5,52	0,982 bc	0,002	0,317 a	0,028	18,83 c	3,40	0,082 ab	0,003
VKZ 12	48,15 c	0,11	45,47 c	3,03	0,961 bc	0,038	0,297 a	0,005	12,94 b	0,55	0,079 ab	0,001
VKZ 12B	49,25 d	0,13	36,10 b	2,24	0,995 c	0,008	0,336 a	0,043	12,07 b	2,21	0,078 ab	0,008

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniem standardowym (SD), a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 5. Profil tekstury miększu po 7 dobie przechowywania chlebów żytnich wytworzonych bez dodatku drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSZ1	48,33 c	0,05	21,67 a	1,50	0,910 a	0,011	0,286 b	0,010	5,66 a	0,66	0,086 b	0,009
VSZ2	48,83 d	0,02	18,70 a	0,44	0,902 a	0,023	0,262 a	0,010	4,42 a	0,05	0,064 a	0,004
VKZ K	45,67 a	0,09	83,67 c	0,91	0,976 a	0,012	0,298 bc	0,002	24,33 c	0,42	0,083 b	0,004
VKZ 11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
VKZ 12	47,55 b	0,04	56,85 b	6,02	0,958 a	0,056	0,307 c	0,002	16,80 b	2,87	0,082 b	0,002
VKZ 12B	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniem standardowym (SD),, a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$, * brak danych ze względu na spleśnienie chleba

Tabela 6. Trwałość mikrobiologiczna pieczywa metodą termostatową

Nazwa próbki	Brak objawów przez	Pierwsze objawy
VSZ1	216 h (9 dni)	-
VSZ2	192 h (8 dni)	Po 11 dobach przechowywania odnotowano wzrost pleśni na miększu i skórce z rodzaju <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> i <i>Mucor</i> . Brak zmian świadczących o rozwoju bakterii amylolitycznych
VKZ K	144 h (6 dób)	Brak objawów pleśnienia przez 144h, w 7 dobie przechowywania, jedynie w próbach termostatowanych, odnotowano słaby wzrost pleśni (2 jtk na kromce). Całe bochenki bez widocznych zmian pleśniowych
VKZ 11	144 h (6 dób)	Brak objawów pleśnienia przez 144h, w 7 dobie przechowywania, zarówno w próbach termostatowanych, jak i na całych bochenkach, odnotowano wzrost pleśni (2 jtk na kromce).
VKZ 12	144 h (6 dób)	Brak objawów pleśnienia przez 144h, w 7 dobie przechowywania, w próbach termostatowanych, odnotowano wzrost pleśni (4 jtk na kromce), całe bochenki bez widocznych pleśni
VKZ 12B	120 h (5 dób)	Brak objawów pleśnienia przez 120 h. Od 6 doby widoczne gołym okiem ogniska wzrostu pleśni (na miększu i skórce) z rodzaju <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> i <i>Mucor</i> . Brak zmian świadczących o rozwoju bakterii amylolitycznych

Tabela 7. Liczba tlenowych bakterii amyloリティcznych (OLBA), tlenowych przetrwalnikujących bakterii amyloリティcznych (OLBAP) oraz liczba pleśni i drożdży (OLG) po 1, 5 i 7 dobie przechowywania chlebów żytnich wytworzonych bez dodatku drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	OLBA			OLBAP			OLG		
	1	5	7	1	5	7	1	5	7
	[jtk/g pieczywa]								
VSZ1	0	0	0	0	0	0	2,0x10 ¹	1,0x10 ¹	2,0x10 ¹
VSZ2	0	0	0	0	0	0	0	0	6,0x10 ¹
VKZ K	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VKZ 11	0	0	0	0	0	0	0	2x10 ¹	2,5x10 ³
VKZ 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VKZ 12B	0	0	0	0	0	0	0	2,9x10 ²	1,3x10 ³

Tabela 8. Zawartość fosforanów mio-inozytolu w mące oraz chlebach żytnich wytworzonych bez dodatku drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Zawartość fosforanów mio-inozytolu (% m.m.)		Zawartość fosforanów mio-inozytolu (% s.m.)	
	IP6	Suma IP	IP6	Suma IP
VSZ1	0,01a ± 0,01	0,06a ± 0,00	0,02a ± 0,01	0,10a ± 0,01
VSZ2	0,02a ± 0,00	0,07a ± 0,01	0,04a ± 0,00	0,11a ± 0,01
VKZ K	0,06c ± 0,00	0,25d ± 0,00	0,10c ± 0,00	0,44c ± 0,00
VKZ 11	0,04b ± 0,00	0,17c ± 0,00	0,07b ± 0,00	0,28b ± 0,00
VKZ 12	0,01a ± 0,00	0,13b ± 0,00	0,03a ± 0,00	0,25b ± 0,02
VKZ 12B	0,14d ± 0,00	0,41e ± 0,02	0,28d ± 0,02	0,80d ± 0,08

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe, a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 9. Zawartość kwasów organicznych w chlebach żytnich wytworzonych bez dodatku drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Kwasy karboksylowe (g/100g m.m.)								
	Winowy	Cytrynowy	Jabłkowy	Mlekowy	Octowy	Propionowy	Suma kwasów	Suma k. mlekowego i octowego	% k. mlekowego
VSZ1	0,005a ± 0,001	0,000a ± 0,000	0,030bc ± 0,003	0,616e ± 0,018	0,279e ± 0,008	0,117b ± 0,018	1,046d ± 0,011	0,894e ± 0,010	68,8ab ± 1,2
VSZ2	0,019c ± 0,000	0,002a ± 0,001	0,084d ± 0,004	0,677f ± 0,013	0,335f ± 0,006	0,215d ± 0,008	1,330e ± 0,010	1,011f ± 0,007	66,9a ± 0,9
VKZ K	0,008b ± 0,000	0,006b ± 0,000	0,025b ± 0,011	0,381a ± 0,010	0,161d ± 0,001	0,122b ± 0,004	0,703b ± 0,003	0,542b ± 0,011	70,3b ± 0,4
VKZ 11	0,006ab ± 0,003	0,000a ± 0,000	0,043c ± 0,000	0,548d ± 0,011	0,078b ± 0,003	0,154c ± 0,005	0,830c ± 0,017	0,626d ± 0,015	87,6d ± 0,2
VKZ 12	0,009b ± 0,001	0,002a ± 0,000	0,007a ± 0,005	0,430b ± 0,011	0,146c ± 0,008	0,075a ± 0,013	0,668b ± 0,019	0,576c ± 0,003	74,6c ± 1,6
VKZ 12B	0,007ab ± 0,000	0,001a ± 0,000	0,025b ± 0,003	0,466c ± 0,020	0,021a ± 0,003	0,082a ± 0,004	0,602a ± 0,024	0,487a ± 0,017	95,8e ± 0,7

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe, a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Przykład 6

Zakwasy uzyskane w Przykładzie 3 posłużyły również do wytworzenia pieczywa razowego żytniego z dodatkiem drożdży piekarskich *S. cerevisiae*, które porównano z pieczywem z dodatkiem tych samych drożdży piekarskich wyprodukowanym z użyciem kultury starterowej komercyjnej przeznaczonej do ukwaszania mąki żytniej (kultura starterowa do ukwaszania mąki żytniej (bakteryjno-drożdżowa) LV2 firmy Lesaffre) oraz z pieczywem wyprodukowanym na bazie zakwasów spontanicznych.

Receptura do przygotowania pieczywa (chleby o wadze 0,5 kg)

Przygotowanie surowców i ich namiary (100 kg ciasta):

10	– mąka żytnia typ 2000	50,3 kg
	– zakwas z mąki żytniej typ 2000	17,0 kg
	– drożdże	0,55 kg
	– sól	1,17 kg
	– woda (temp. 38°C)	31,0 kg

15 Wytwarzanie i sporządzanie ciasta właściwego

	– czas miesienia – wolne obroty	7 min.
	– czas miesienia – szybkie obroty	3 min.
	– temperatura ciasta właściwego	do 35 °C

Dzielenie, formowanie, kształtowanie ciasta właściwego

20	– masa kęsa	0,6 kg
	– czas dzielenia i kształtowanie ciasta na kęsy	45 min.
	– czas fermentacji ciasta właściwego w kęsach	do 90 min.

Proces wypieku

	– temperatura wypieku:	200 °C
25	– czas wypieku	60 min.

Nazwy próbek:

- VSZ1 – chleb razowy żytni wyłącznie na zakwasie spontanicznym – 1 powtórzenie
- VSZ2 – chleb razowy żytni wyłącznie na zakwasie spontanicznym – 2 powtórzenie
- VKDZ K– chleb razowy żytni na zakwasie z kulturą starterową komercyjną K i drożdżach
- 30 • **VKDZ 11**– chleb razowy żytni na zakwasie z kulturą starterową (**Zestaw 11**) i drożdżach
- **VKDZ 12**– chleb razowy żytni na zakwasie z kulturą starterową (**Zestaw 12**) i drożdżach
- **VKDZ 12B**– chleb razowy żytni na zakwasie z kulturą starterową (**Zestaw 12B**) i drożdżach.

Analizy jakości, profili tekstury, analizy mikrobiologiczne oraz składu chemicznego chlebów wykonano jak opisano w Przykładzie 5. Wyniki oceny wyprodukowanego chleba przedstawiono w **Tabelach 10-16**.

Tabela 10. Ocena organoleptyczna chlebów żytnich wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wygląd zewnętrzny		Barwa skórki		Grubość skórki		Pozostałe cechy skórki		Elastyczność miękiszu		Porowatość miękiszu		Pozostałe cechy miękiszu		Zapach i smak	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSZ1	4,1	1,4	2,1	0,8	3,6	1,2	3,3	1,2	3,4	0,5	2,5	0,5	1,8	1,2	5,0	1,7
VSZ2	4,8	0,4	2,5	0,5	3,6	0,5	3,6	1,0	3,4	0,5	2,6	0,5	2,6	0,5	4,6	1,9
VKDZ K	4,5	0,5	2,9	0,3	3,5	0,5	3,6	0,5	3,5	0,5	2,2	0,9	2,5	0,9	5,2	0,4
VKDZ 11	4,9	0,3	2,5	0,5	3,5	0,5	3,6	0,5	3,3	0,5	2,6	0,5	2,4	0,5	5,3	0,5
VKDZ 12	4,9	0,3	2,9	0,3	4,0	0,0	3,9	0,3	3,6	0,5	2,4	0,5	2,6	0,5	5,8	0,4
VKDZ 12B	4,3	0,5	3,0	0,0	4,0	0,0	3,8	0,4	3,7	0,5	2,7	0,5	3,0	0,0	5,3	0,5

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniem standardowym (SD)

Tabela 11. Jakość chlebów żytnich wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Masa bochenka [g]	Objętość bochenka [cm ³]	Objętość 100 g pieczywa [cm ³]	Ocena organoleptyczna		Kwasowość miększu [°kw]
				Średnia suma punktów	Klasa jakości	
VSZ1	514 b ±5	897 b ±24	175 b ±4	33,8 a ±3,6	II	10
VSZ2	519 b ±7	863 a ±21	166 a ±4	35,8 a ±2,1	I	11
VKDZ K	514 b ±5	849 a ±12	165 a ±3	35,8 a ±3,4	I	5
VKDZ 11	517 b ±7	847 a ±17	164 a ±3	36,0 ab ±2,2	I	5
VKDZ 12	514 b ±6	853 a ±11	166 a ±3	38,1 b ±1,6	I	6
VKDZ 12B	506 a ±8	886 b ±10	175 b ±2	37,8 b ±0,8	I	5

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe, a, b... – wartości średnie

5 oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Pieczywo razowe żytnie z dodatkiem drożdży uzyskane na zakwasach z udziałem kultury starterowej dla zestawu drobnoustrojów 12 i 12B charakteryzuje się większą objętością i wilgotnością miększu, znacząco mniejszą twardością i żujnością miększu w porównaniu do 10 pieczywa kontrolnego wytworzonego w oparciu o kulturę komercyjną. Pieczywo na zakwasie suplementowanym opracowaną kulturą starterową wykazuje taką samą trwałość mikrobiologiczną (3 dni) jak pieczywo kontrolne z kulturą komercyjną.

Najwyższą ocenę organoleptyczną, wśród razowych chlebów żytnich z dodatkiem drożdży uzyskało pieczywo wytworzone z udziałem Zestawu 12. Zestawy 12 oraz 12B zostały ocenione 15 znacząco lepiej zarówno w stosunku do zakwasów spontanicznych jak również względem kultury komercyjnej.

Ze względu na uzyskane najlepsze parametry technologiczne Zestawy 12 i 12B są szczególnie polecane dla pieczywa razowego żytniego z dodatkiem drożdży.

Fermentacja zakwasów sporządzonych z razowej mąki żytniej przy udziale kultury starterowej, 20 spowodowała we wszystkich chlebach żytnich z dodatkiem drożdży znaczące zmniejszenie ilości fosforanów mio-inozytolu (IP), w stosunku do analizowanych surowców, czyli mąki z pełnego przemiału, użytej do wypieku, dla której sumaryczna zawartość IP w % s.m. wynosiła 1,18. Zmniejszenie zawartości tych związków wyniosło od 1,7 do 2,4 razy.

Tabela 12. Profil tekstury miękiszu w dniu wypieku chlebów żytnich wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSZ1	48,81 b	0,01	16,13 a	0,92	0,925 ab	0,047	0,389 b	0,018	5,80 a	0,30	0,137 d	0,009
VSZ2	49,76 c	0,01	18,83 a	1,52	0,910 a	0,019	0,359 ab	0,023	6,19 a	1,03	0,105 ab	0,004
VKDZ K	49,76 c	0,01	38,31 d	1,65	0,938 ab	0,051	0,326 a	0,010	11,70 c	0,79	0,098 a	0,004
VKDZ 11	47,30 a	0,03	43,06 e	1,26	0,973 ab	0,029	0,381 b	0,026	15,96 d	1,09	0,108 ab	0,005
VKDZ 12	50,21 d	0,07	29,67 c	1,07	0,995 b	0,002	0,372 b	0,004	10,98 c	0,52	0,113 c	0,002
VKDZ 12B	51,10 e	0,04	22,35 b	1,76	0,989 ab	0,007	0,385 b	0,011	8,50 b	0,85	0,096 a	0,004

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniami standardowymi (SD), a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 13. Profil tekstury miękiszu po 5 dobie przechowywania chlebów żytnich wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSZ1	49,07 c	0,11	20,74 a	0,95	0,864 a	0,043	0,295 a	0,024	5,31 ab	0,94	0,086 c	0,003
VSZ2	49,20 c	0,09	18,45 a	0,94	0,901 a	0,047	0,276 a	0,007	4,60 a	0,59	0,073 b	0,005
VKDZ K	47,96 a	0,08	41,69 d	4,03	0,924 a	0,037	0,268 a	0,019	10,39 c	2,13	0,075 b	0,001
VKDZ 11	48,31 b	0,09	52,89 e	0,52	0,874 a	0,107	0,317 a	0,037	14,56 d	0,04	0,091 c	0,006
VKDZ 12	49,25 c	0,06	36,51 c	1,10	0,977 a	0,036	0,298 a	0,028	10,63 c	1,08	0,073 b	0,000
VKDZ 12B	50,78 d	0,05	29,92 b	0,33	0,943 a	0,016	0,269 a	0,013	7,58 b	0,34	0,064 a	0,002

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniami standardowymi (SD), a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 14. Profil tekstury miękiszu po 7 dobie przechowywania chlebów żytnich wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSZ1	48,33 a	0,05	21,67 a	1,50	0,910 a	0,011	0,286 b	0,010	5,66 a	0,66	0,086 b	0,009
VSZ2	48,83 b	0,02	18,70 a	0,44	0,902 a	0,023	0,262 a	0,010	4,42 a	0,05	0,064 a	0,004
VKDZ K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
VKDZ 11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
VKDZ 12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
VKDZ 12B	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniami standardowymi (SD), a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$, * brak danych ze względu na spleśnienie chleba

Tabela 15. Trwałość mikrobiologiczna pieczywa metodą termostatową

Nazwa próbki	Brak objawów przez	Pierwsze objawy
VSZ1	216 h (9 dni)	-
VSZ2	192 h (8 dni)	Po 11 dobach przechowywania odnotowano wzrost pleśni na miękiszu i skórce z rodzaju <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> i <i>Mucor</i> . Brak zmian świadczących o rozwoju bakterii amyloリティcznych
VKDZ K	72 h (3 doby)	W 4 dobie przechowywania termostatowego na kromkach pojedyncze ogniska rozwoju pleśni. W 7 dobie pleśnie bardzo dobrze widoczne „gołym okiem” na bochenkach.
VKDZ 11	72 h (3 doby)	W 4 dobie przechowywania termostatowego na kromkach nieliczne ogniska rozwoju pleśni widoczne „gołym okiem”. W 7 dobie silny przerost pleśniowy zarówno miękiszu jak i skórki pieczywa.
VKDZ 12	72 h (3 doby)	W 4 dobie przechowywania termostatowego na kromkach ogniska rozwoju pleśni widoczne „gołym okiem”. W 7 dobie liczne pleśnie bardzo dobrze widoczne również na bochenkach
VKDZ 12B	72 h (3 doby)	Brak objawów pleśnienia przez 72h, po 3 dobach przechowywania odnotowano bardzo intensywny wzrost pleśni (na miękiszu i skórce) z rodzaju <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> i <i>Mucor</i> . Brak zmian świadczących o rozwoju bakterii amyloリティcznych.

Tabela 16. Liczba tlenowych bakterii amyloリティcznych (OLBA), tlenowych przetrwalnikujących bakterii amyloリティcznych (OLBAP) oraz liczba pleśni i drożdży (OLG) po 1, 5 i 7 dobie przechowywania chlebów żytnich wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	OLBA			OLBAP			OLG		
	1	5	7	1	5	7	1	5	7
	[jtk/g pieczywa]								
VSZ1	0	0	0	0	0	0	2,0x10 ¹	1,0x10 ¹	2,0x10 ¹
VSZ2	0	0	0	0	0	0	0	0	6,0x10 ¹
VKDZ K	0	0	0	0	0	0	1,5x10 ¹	4,1x10 ³	1,4x10 ⁵
VKDZ 11	0	0	0	0	0	0	0	3x10 ²	1,2x10 ⁶
VKDZ 12	0	0	0	0	0	0	10	6,2x10 ³	2,2x10 ⁴
VKDZ 12B	0	0	0	0	0	0	0	1,2x10 ⁴	2,5x10 ⁵

Tabela 17. Zawartość fosforanów mio-inozytolu w mące oraz chlebach żytnich na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych z udziałem drożdży

Nazwa próbki	Zawartość fosforanów mio-inozytolu (% m.m.)		Zawartość fosforanów mio-inozytolu (% s.m.)	
	IP6	Suma IP	IP6	Suma IP
VSZ1	0,01a ± 0,01	0,06a ± 0,00	0,02a ± 0,01	0,10a ± 0,01
VSZ2	0,02a ± 0,00	0,07a ± 0,01	0,04a ± 0,00	0,11a ± 0,01
VKDZ K	0,20c ± 0,01	0,39c ± 0,00	0,37c ± 0,02	0,69c ± 0,01
VKDZ 11	0,20c ± 0,02	0,39c ± 0,02	0,33c ± 0,05	0,63c ± 0,08
VKDZ 12	0,11b ± 0,00	0,27b ± 0,00	0,20b ± 0,01	0,50b ± 0,03
VKDZ 12B	0,25d ± 0,01	0,37c ± 0,00	0,44d ± 0,01	0,64c ± 0,01

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe, a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 18. Zawartość kwasów organicznych w chlebach żytnich wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Kwasy karboksylowe (g/100g m.m.)								
	Winowy	Cytrynowy	Jabłkowy	Mlekowy	Octowy	Propionowy	Suma kwasów	Suma k. mlekowego i octowego	% k. mlekowego
VSZ1	0,005b ± 0,001	0,000a ± 0,000	0,030a ± 0,003	0,616c ± 0,018	0,279e ± 0,008	0,117b ± 0,018	1,046e ± 0,011	0,894e ± 0,010	68,8a ± 1,2
VSZ2	0,019d ± 0,000	0,002b ± 0,001	0,084c ± 0,004	0,677d ± 0,013	0,335f ± 0,006	0,215d ± 0,008	1,330f ± 0,010	1,011f ± 0,007	66,9a ± 0,9
VKDZ K	0,009c ± 0,001	0,009c ± 0,001	0,023a ± 0,005	0,241a ± 0,009	0,111d ± 0,002	0,134bc ± 0,016	0,526c ± 0,016	0,352c ± 0,007	68,5a ± 1,3
VKDZ 11	0,000a ± 0,000	0,003b ± 0,000	0,047b ± 0,007	0,355b ± 0,008	0,057b ± 0,001	0,154c ± 0,005	0,617d ± 0,004	0,412d ± 0,006	86,1c ± 0,5
VKDZ 12	0,009c ± 0,002	0,004b ± 0,000	0,021a ± 0,006	0,243a ± 0,002	0,076c ± 0,001	0,076a ± 0,011	0,429b ± 0,011	0,319b ± 0,003	76,1b ± 0,0
VKDZ 12B	0,000a ± 0,000	0,004b ± 0,000	0,022a ± 0,003	0,261a ± 0,007	0,026a ± 0,002	0,070a ± 0,001	0,383a ± 0,006	0,287a ± 0,009	91,1d ± 0,4

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe, a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Przykład 7

Zakwasy uzyskane w Przykładzie 4 posłużyły również do wytworzenia pieczywa pełnoziarnistego orkiszowego z dodatkiem drożdży, które porównano z pieczywem wyprodukowanym na bazie zakwasów spontanicznych.

Receptura do przygotowania pieczywa (chleby o wadze 0,5 kg)

Przygotowanie surowców i ich namiary (100 kg ciasta):

– mąka pełnoziarnista orkiszowa	50,7 kg
– zakwas z mąki pełnoziarnistej orkiszowej	12,7 kg
– drożdże	0,07 kg
– sól	0,97 kg
– woda (temp. 38°C)	35,5 kg

Wytwarzanie i sporządzanie ciasta właściwego

– czas miesienia – wolne obroty	6 min.
– czas miesienia – szybkie obroty	8 min.

Dzielenie, formowanie, kształtowanie ciasta właściwego

– masa kęsa	0,6 kg
– czas dzielenia i kształtowanie ciasta na kęsy	45 min.
– czas fermentacji ciasta właściwego w kęsach	do 90 min.

Proces wypieku

– temperatura wypieku:	200 °C
– czas wypieku	55-60 min.

Nazwy próbek:

- VSO1 – chleb razowy orkiszowy wyłącznie na zakwasie spontanicznym – 1 powtórzenie
- VSO2 – chleb razowy orkiszowy wyłącznie na zakwasie spontanicznym – 2 powtórzenie
- **VKDO 12** – chleb orkiszowy pełnoziarnisty na zakwasie z kulturą starterową (Zestaw 12) i drożdżach
- **VKDO 12B** – chleb orkiszowy pełnoziarnisty na zakwasie z kulturą starterową (Zestaw 12B) i drożdżach

Analizy jakości, profili tekstury, analizy mikrobiologiczne oraz składu chemicznego chlebów wykonano jak opisano w Przykładzie 5. Wyniki oceny wyprodukowanego chleba przedstawiono w **Tabelach 19-25**.

Tabela 19. Ocena organoleptyczna chlebów orkiszowych wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wygląd zewnętrzny		Barwa skórki		Grubość skórki		Pozostałe cechy skórki		Elastyczność miękiszu		Porowatość miękiszu		Pozostałe cechy miękiszu		Zapach i smak	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSO 1	4,5	0,5	2,3	1,0	3,9	0,4	3,3	0,5	3,3	0,5	2,1	0,4	2,5	0,5	5,4	0,5
VSO 2	4,8	0,4	2,8	0,4	3,8	0,4	3,5	0,5	3,5	0,5	2,2	0,8	2,2	0,8	4,6	1,4
VKDO 12	4,9	0,3	3,0	0,0	4,0	0,0	3,6	0,5	3,6	0,5	2,7	0,5	2,9	0,4	5,3	0,5
VKDO 12B	4,7	0,5	2,5	0,5	3,5	0,6	3,8	0,4	3,4	1,1	2,6	0,8	2,7	0,5	5,4	0,5

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniami standardowymi (SD)

Tabela 20. Jakość chlebów orkiszowych wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Masa bochenka [g]		Objętość bochenka [cm ³]		Objętość 100 g pieczywa [cm ³]		Ocena organoleptyczna		Kwasowość miękiszu [°kw]	
	Średnia	±	Średnia	±	Średnia	±	Średnia suma punktów	Klasa jakości		
VSO 1	526 d	±10	888 a	±33	169 a	±5	35,1 a	±2,4	II	11
VSO 2	509 c	±5	955 b	±16	187 b	±4	35,5 a	±1,8	II	9
VKDO 12	494 b	±2	1082 d	±19	219 d	±4	38,0 b	±1,2	I	4
VKDO 12B	492 b	±3	1095 d	±12	223 e	±3	36,6 ab	±2,9	I	4

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe, a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Pieczywo orkiszowe z mąki pełnoziarnistej z dodatkiem drożdży wyprodukowane na zakwasach z udziałem kultury starterowej dla zestawu drobnoustrojów 12 i 12B charakteryzuje się większą objętością, znacząco mniejszą twardością i żujnością miękiszu w porównaniu do pieczywa wytworzonego w oparciu o zakwasy spontaniczne. Pieczywo na zakwasie suplementowanym opracowaną kulturą starterową wykazuje wystarczającą trwałość mikrobiologiczną dla tego typu pieczywa wynoszącą 3 dni w przypadku Zestawu 12 i 5 dni dla Zestawu 12B.

Pieczywo wytworzone z udziałem opracowanej kultury starterowej uzyskało znacząco wyższą ocenę organoleptyczną w porównaniu do chlebów na zakwasach spontanicznych, które zakwalifikowano do II klasy jakości.

Ze względu na uzyskane najlepsze parametry technologiczne dla pieczywa orkiszowego z mąki pełnoziarnistej wytworzonego z udziałem drożdży szczególnie polecany jest Zestaw 12B.

Tabela 21. Profil tekstury mięksizu w dniu wypieku chlebów orkiszowych wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSO 1	48,40 c	0,03	40,4 b	0,7	0,948 a	0,006	0,420 a	0,013	16,06 ab	0,67	0,146 a	0,008
VSO 2	46,49 b	0,11	44,3 b	1,6	0,950 a	0,049	0,448 a	0,018	18,85 b	0,45	0,171 a	0,009
VKOD 12	44,77 a	0,11	15,67 a	0,54	0,932 a	0,063	0,469 b	0,006	6,84 a	0,14	0,178 b	0,006
VKOD 12B	46,73 c	0,12	20,96 b	1,05	0,917 a	0,020	0,428 a	0,021	8,25 ab	1,00	0,148 a	0,009

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniami standardowymi (SD), a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 22. Profil tekstury mięksizu po 4 dobie przechowywania chlebów orkiszowych wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSO1	48,44 b	0,18	56,9 b	1,7	0,894 a	0,041	0,342 a	0,012	17,37 b	0,88	0,108 ab	0,002
VSO2	46,10 a	0,07	55,9 b	1,0	0,940 a	0,030	0,338 a	0,009	17,78 b	0,73	0,117 b	0,001
VKDZ 12	43,81 a	0,10	16,97 a	0,54	0,969 a	0,012	0,293 a	0,002	4,82 a	0,18	0,092 a	0,011
VKDZ 12B	46,41 c	0,05	17,37 a	0,33	0,952 a	0,031	0,320 ab	0,009	5,28 a	0,22	0,101 a	0,004

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniami standardowymi (SD), a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$

Tabela 23. Profil tekstury miękiszu po 5 dobie przechowywania chlebów orkiszowych wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	Wilgotność		Twardość		Sprężystość		Spójność		Żujność		Odbojność	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
VSO1	48,44 b	0,18	56,9 b	1,7	0,894 a	0,041	0,342 a	0,012	17,37 b	0,88	0,108 ab	0,002
VSO2	46,10 a	0,07	55,9 b	1,0	0,940 a	0,030	0,338 a	0,009	17,78 b	0,73	0,117 b	0,001
VKDZ 12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
VKDZ 12B	46,60 b	0,05	18,03 a	1,58	0,947 a	0,016	0,326 a	0,000	5,57 a	0,58	0,094 a	0,003

W tabeli przedstawiono wartości średnie z odchyleniami standardowymi (SD), a, b... – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ * brak danych ze względu na spleśnienie chleba.

Tabela 24. Trwałość mikrobiologiczna pieczywa określona metodą termostatową

Nazwa próbki	Brak objawów przez	Pierwsze objawy
VSO 1	264 h (11 dni)	Po 14 dobach przechowywania odnotowano wzrost pleśni (2 jtk na bochenku). Prawdopodobnie <i>Penicillium</i> sp.
VSO 2	360 h (15 dni)	-
VKDO 12	72 h (3 doby)	Po 3 dobach przechowywania odnotowano wzrost pleśni (na miękiszu i skórce) z rodzaju <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> i <i>Mucor</i> . Brak zmian świadczących o rozwoju bakterii amylolitycznych.
VKDO 12B	120h (5 dób)	Brak objawów pleśnienia przez 120h, w 7 dobie przechowywania, zarówno w próbach termostatowanych, jak i na całych bochenkach, odnotowano bardzo silny wzrost pleśni

Tabela 25. Liczba tlenowych bakterii amyloリティcznych (OLBA), tlenowych przetrwalnikujących bakterii amyloリティcznych (OLBAP) oraz liczba pleśni i drożdży (OLG) po 1, 5 i 7 dobie przechowywania chlebów orkiszowych wytworzonych z dodatkiem drożdży na zakwasie fermentowanym z udziałem kultur starterowych

Nazwa próbki	OLBA			OLBAP			OLG		
	1	5	7	1	5	7	1	5	7
	[jtk/g pieczywa]								
VSO1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VSO2	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4x10 ² drożdże
VKDO 12	0	0	0	0	0	0	4,3 x10 ¹	3,2x10 ³	4,3x10 ⁴
VKDZ 12B	0	0	0	0	0	0	7,5x10 ¹	5,2x10 ³	7x10 ⁵

Przykład 8

Dla zakwasów otrzymanych na mące razowej żytniej uzyskanych w Przykładzie 3 przeprowadzono analizę mikrobiologiczną metodami zależnymi od hodowli poprzez wysiewanie na odpowiednie podłoża 10-krotnych rozcieńczeń homogenizowanych zakwasów. W próbkach zakwasów na bazie mąk razowych oznaczono liczbę drobnoustrojów, m.in.

- ogólną liczbę bakterii tlenowych i beztlenowych (na podłożu stałym PCM z aktidionem, 72 h, w temp. 30 °C w warunkach tlenowych i beztlenowych),
- termofilnych i mezofilnych bakterii kwasu mlekowego (LAB) (na podłożu MRS, pH=5,4; 72 h, w temp. 42 °C oraz 30 °C w warunkach beztlenowych),
- drożdży i pleśni (na podłożu YPG, 5 dni, w temp. 25 °C w warunkach tlenowych)
- oraz bakterii przetrwalnikujących (na podłożu LB po sterylizacji próbek żuru, 48 h, w temp. 30 °C w warunkach tlenowych. Wyniki dla zakwasów z mąki żytniej wytworzonych z udziałem kultury starterowej względem kultury starterowej komercyjnej oraz zakwasu spontanicznego po 72 h fermentacji przedstawiono na **Fig. 3**.

Przykład 9

Dla zakwasów otrzymanych na mące pełnoziarnistej orkiszowej uzyskanych w Przykładzie 4 wykonano analizę mikrobiologiczną metodami zależnymi od hodowli w sposób opisany w Przykładzie 8. Wyniki dla zakwasów z mąki pełnoziarnistej orkiszowej wytworzonych z udziałem kultury starterowej względem zakwasu spontanicznego po 72 h fermentacji przedstawiono na **Fig. 4**.

Przykład 10

Dla zakwasu otrzymanego w Przykładzie 3 na mące razowej żytniej z udziałem Zestawu 12 kultury starterowej oraz zakwasu spontanicznego żytniego po 72 h fermentacji wykonano analizę

różnorodności bakterii metodami niezależnymi od hodowli. Analizę metagenetyczną próbek zakwasów wykonano na bazie metagenomowego DNA bakterii uzyskanego metodą lizy enzymatycznej z użyciem lizozymu i mutanolizyny oraz ekstrakcji z wykorzystaniem fenolu i chloroformu. Na otrzymanych preparatach DNA przeprowadzono reakcję amplifikacji z odpowiednimi starterami dla regionów zmiennych V3 i V4 genów kodujących 16S rRNA. Uzyskane amplikony następnie zsekwencjonowano metodą NGS (platforma MiSeq Illumina). Odczyty z sekwencjonowania zostały odczyszczane i sklastrowane przy pomocy programu MOTHUR z wykorzystaniem bazy sekwencji referencyjnych SILVA. Wyniki analizy bioinformatycznej pokazują, że w obu próbkach zakwasów dominuje typ Firmicutes (rząd Lactobacillales), którego udział dla Zestawu 12 wynosi 97%, a dla zakwasu spontanicznego 98%. Strukturę taksonomiczną bakterii w badanych zakwasach została przedstawiona na poziomie rzędu Lactobacillales (**Fig. 5**). Najliczniej reprezentowany w obu zakwasach jest rodzaj *Lactobacillus* (80% i 87% zidentyfikowanych OTU, odpowiednio dla Zestawu 12 i zakwasu spontanicznego).

LITERATURA:

- Bartnikowska, E. (2009). Współczesne poglądy dotyczące spożycia pieczywa. *Prz. Piek. i Cukier.* 1, 4-11.
- Ahn, H.-J., Kim, J.-H., Jo, C., Kim, M.-J., Byun, M.-W. (2004). Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. *Food Chem.* 88, 173–178.
- Chayen, J. (1994). *The inositol phosphates: Chemical synthesis and biological significance*. D. C. Billington. VCH: Weinheim, New York, Basel and Cambridge. xiv+153 pages, 126DM (£52) (1993). *Cell Biochem. Funct.* 12, 77–78.
- Chen, Q.C. i Li, B.W. (2003). Separation of phytic acid and other related inositol phosphates by high-performance ion chromatography and its applications. *J. Chromatogr. A* 1018, 41–52.
- De Angelis, M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 259–270.
- Duliński, R., Cielecka, E.K., Pierzchalska, M., Żyła, K. (2015). Phytases improve myo-inositol bioaccessibility in rye bread: a study using an in vitro method of digestion and a caco-2 cell culture model. *Food Technol. Biotechnol.* 53, 66–72.
- Gambuś, H. i Litwinek, D. *Pieczywo – dlaczego warto jeść i jakie wybierać?*
<http://dieta.mp.pl/zasady/show.html?id=74904>.
- García-Esteva, R.M., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (1999). Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Res. Int.* 32, 217–221.
- Graf, E., i Eaton, J.W. (1990). Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 61–69.
- Johnson, J. i Linko, Y. (1964). Analysis of bread-flour components. *Qualitas Plantarum et Materia Vegetabilis* 11, 2 256.
- Jurga, R. (2011). Promocja mąki i pieczywa całościarnowego (razowego) w Polsce. *Prz. Piek. i Cukier.* 3, 10-11.
- Kasim, A.B., i Edwards, H.M. (1998). The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. *Sci Food Agric* 76, 1–9.
- Kawka, A. i Górecka, D. (2010). Porównanie składu chemicznego pieczywa pszenno-owsianego i pszenno-jęczmiennego z udziałem zakwasów fermentowanych starterem LV2, *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość* 3 (70), 44 – 55.
- Lefebvre, D., Gabriel, V., Vayssier, Y., Fontagne-Faucher, C. (2002) Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process. *Food Sci. Technol.*

- LEB 35, 407–414. Liu, B.-L., Rafiq, A., Tzeng, Y.-M., Rob, A. (1998). The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 415–424.
- Park, H.-R., Ahn, H.-J., Kim, S.-H., Lee, C.-H., Byun, M.-W., Lee, G.-W. (2006). Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods | DeepDyve. *Food Control* 17, 727–732.
- Plaami, S. (1997). Myoinositol Phosphates: Analysis, Content in Foods and Effects in Nutrition. *LWT - Food Sci. Technol.* 30, 633–647.
- Pontoppidan, K., Pettersson, D., Sandberg, A.-S. (2007). The type of thermal feed treatment influences the inositol phosphate composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 137–147.
- Sandberg, A.-S., Carlsson, N.-G., Svanberg, U. (1989). Effects of Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates on In Vitro Estimation of Iron Availability. *J. Food Sci.* 54, 159–161.
- Sandberg, A.-S., Brune, M., Carlsson, N.-G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthén, L. (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 240–246.
- Wisblatt, L. i Zoumut, H.F. (1963). Isolation, origin, and synthesis of a bread flavor constituent. *Cereal Chem* 40, 162 - 168.
- Zhou, J.R., i Erdman, J.W. (1995). Phytic acid in health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 495–508.
- Żyła, K. (2005). Produkty enzymatycznej konwersji fitynianów jako składniki żywności funkcjonalnej, w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. E. Kołakowski, W. Bednarski, S. Bielecki (red.), AR w Szczecinie: 495-510.

Lista sekwencji:

<110> IBB

<120> BAKTERYJNA KULTURA STARTEROWA, ZAKWAS JA ZAWIERAJĄCY, SPOSÓB WYTWARZANIA PIECZYWA I ZASTOSOWANIE BAKTERYJNEJ KULTURY STARTEROWEJ LUB ZAKWASU DO WYTWARZANIA PIECZYWA

<130> PK/4896/AGR

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Starter RAPD-GACA

<400> 1

gacagacaga cagaca

16

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Starter RAPD-B10

<400> 2

ctgctgggac

10