
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. inż. Artur Hugo Świergiel

Raport z realizacji projektu

„nr 00001.DDD.6509.00041.2018.05 w ramach działania "Współpraca" objętego PROW na lata 2014-2020 dotyczącą projektu pn. „Wytwarzanie octu owocowego w województwie łódzkim, mazowieckim i śląskim we współpracy z Instytutem Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Waclawa Dąbrowskiego jako innowacji produktowej, procesowej i technologicznej”

Koordynator: dr Beata Bartodziejska, Zakład Jakości Żywności

Wykonawcy: prof. dr hab. Zbigniew Dolatowski, dr inż. Anna Szosland-Fałtyn, dr Beata Paziak-Domańska, mgr. A. Stanisławska, mgr inż. M. Krępska, mgr inż. Andrzej Cis, mgr inż. I. Kasprzyk, dr nauk med. M. Gajewska, mgr inż. A. Kasperska, mgr inż. Łukasz Kozłowski, mgr inż. Renata Rybicka, tech. Agnieszka Kaźmierczak, mgr Magdalena Malinowska, Tomasz Gonera.

Termin realizacji: listopad 2019 r.- listopad 2020 r.

Spis treści:

1. Wprowadzenie

2. Cel
3. Zakres prac
4. Metodyka prac
5. Uzyskane wyniki
6. Podsumowanie
7. Wnioski
8. Literatura

1. WPROWADZENIE

Ocet jest jednym z najstarszych produktów fermentacyjnych, znanym od tysięcy lat. Istnieje wiele udokumentowanych informacji odnośnie faktu, iż był ulubioną przyprawą, środkiem konserwującym oraz orzeźwiająjącym napojem w starożytnej Babilonii. Od wieków znajduje również zastosowanie w medycynie ludowej do leczenia różnych infekcji. Obecnie ocet jest produktem, który bardzo często wykorzystywany jest w codziennym życiu. Służy do zakwaszania smaku potraw. Jest składnikiem sosów do sałatek, ketchupów czy musztard. Stosuje się go w kosmetyce, medycynie. W zależności od użytego do jego produkcji surowca wyróżnia się różne jego odmiany: biały, winny, ziemniaczany, spirytusowy, destylowany, balsamiczny, ryżowy, owocowy, kokosowy, kombucha, szampański, sherry itp. Ocet jest przezroczystą cieczą zawierającą zwykle od 4 do 15 % kwasu octowego. Wytwarzany może być metodą rozcieńczenia kwasu octowego, uzyskanego syntetycznie w procesie utleniania aldehydu octowego lub w suchej destylacji drewna bądź metodą fermentacji octowej z wykorzystaniem bakterii fermentacji octowej. W przemyśle spożywczym wykorzystywany jest zarówno ocet fermentacyjny jak i syntetyczny.

Proces produkcji octu owocowego

Ocety owocowe należą do produktów otrzymywanych na drodze fermentacji alkoholowej owoców przy użyciu drożdży, a następnie fermentacji octowej, którą przeprowadzają tlenowe bakterie kwasu octowego (AAB – Acetic Acid Bacteria). Są to nieprzetrwalnikujące, katalazododatnie i oksydazo-ujemne pałeczki występujące pojedynczo lub tworzące łańcuszki. Głównym metabolitem produkowanym przez AAB jest kwas octowy. Biosynteza tego związku następuje w wyniku utleniania alkoholu etylowego, a proces ten jest katalizowany przez dwa enzymy znajdujące się w błonie cytoplazmatycznej bakterii octowych. Pierwszym etapem biosyntezy kwasu octowego jest oksydacja etanolu do aldehydu octowego z udziałem enzymu dehydrogenazy alkoholowej (ADH) (E.C.1.1.1.1). Następnie aldehyd ulega utlenieniu przez dehydrogenazę aldehydową (ALDH) (E.C.1.2.1.3) do produktu końcowego. Optymalne warunki fermentacji kwasu octowego przez bakterie to pH wynoszące 3 ÷ 4 i temperatura ok. 30 °C.

Bakterie octowe, w miarę przebiegu procesu biosyntezy kwasu octowego, wykorzystują tlen rozpuszczony w fermentującej cieczy. Szybkość przenoszenia tlenu z powietrza do fermentującego środowiska wpływa na szybkość fermentacji i zależy od sposobu kontaktowania tych faz. Biorąc powyższe pod uwagę, wyróżnia się trzy metody fermentacji octowej:

- metody powierzchniowe, w których powierzchnię kontaktów międzyfazowych stanowi swobodna powierzchnia cieczy, przez którą tlen wnika z powietrza do cieczy. Bakterie kwasu octowego, w formie kożuszka, rozwijają się w strefie powierzchniowej. Wnikający tlen jest natychmiast używany i nie dochodzi do głębszych warstw cieczy. Intensywność procesu fermentacji zależy od wielkości swobodnej powierzchni cieczy. Metody te znajdują zastosowanie w produkcji octu owocowego, winnego, słodowego i innych o mocy do 8%.
- metody ociekowe, w których fermentacja prowadzona jest w zbiornikach wypełnionych (w całości lub częściowo) porowatym materiałem. Osadzone na powierzchni wypełnienia bakterie omywane są ociekającą cieczą, która jest w stałym kontakcie z powietrzem znajdującym się w porach wypełnienia. Dzięki cienkiej warstwie cieczy spływającej po porowatym wypełnieniu uzyskuje się

zwiększenie powierzchni kontaktów międzyfazowych, a tym samym możliwość znacznej intensyfikacji procesu.

- metody wgłębne, w których zbiornik fermentora napełniony jest cieczą, z zawieszonymi komórkami bakterii. Do cieczy wprowadzane jest powietrze w postaci drobnych pęcherzyków. Uzyskuje się w ten sposób dalsze zwiększenie powierzchni kontaktu między cieczą a tlenem atmosferycznym. Natomiast dzięki intensywnemu mieszaniu możliwe jest utrzymanie jednakowych warunków w całej objętości fermentowanej cieczy.

Właściwości prozdrowotne octów owocowych

W Polsce najpopularniejszym octem jest 10% ocet spirytusowy, którego sprzedaż w sezonie letnio-jesiennym rośnie nawet trzykrotnie. Ze względu na dobrą koniunkturę w segmencie octów smakowych i owocowych wiele octowni zaczyna wprowadzać je do swojej oferty. Ocet owocowy jest powszechnie stosowany jako konserwant żywności, skutecznie hamuje rozwój mikroorganizmów zanieczyszczających produkty spożywcze. Ponadto, jak wynika z danych literaturowych, uzyskany w procesach fermentacji ocet owocowy, jest bogaty w kwasy organiczne: octowy, cytrynowy, mlekowy, bursztynowy, jabłkowy, enzymy, pektyny oraz przeciwutleniające związki fenolowe (kwas galusowy, kawowy, chlorogenowy, katechiny, epikatechiny), o potwierdzonych walorach prozdrowotnych. Zawiera także niezbędne we wszystkich procesach życiowych składniki takie jak: aminokwasy, pierwiastki mineralne (żelazo, fluor, potas, wapń, miedź, magnez, sód, fosfor, siarkę, krzem) oraz witaminy: A1, B1, B2, B6, C, E, P, czy witaminę A czyli beta-karoten. Zdecydowana większość tego typu produktów komercyjnie dostępnych produkowana jest przez firmy zagraniczne, najczęściej, są to produkty z dodatkiem chemicznych środków konserwujących.

Innowacyjna metoda produkcji octu jabłkowego o właściwościach prozdrowotnych

Ze względu na tendencje utrzymujące się od dłuższego czasu w branży spożywczej, dotyczące rosnącej świadomości konsumentów odnośnie żywności, producenci prześcigają się we wprowadzaniu innowacyjnych produktów. Konsumenty, przywiązując dużą wagę do prozdrowotnego odżywiania i trybu życia, chętniej sięgają po żywność o wysokiej jakości, jak najmniej przetworzoną, bezpieczną, zawierającą substancje bioaktywne. Poszukują żywności funkcjonalnej, która poza właściwościami odżywczymi ma korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu. Konsumenty są coraz bardziej zainteresowani nabywaniem wyrobów produkowanych na małą skalę, z wykorzystaniem naturalnych surowców i zastosowaniem tradycyjnych receptur, bez dodatków środków konserwujących. Kolejnym silnym trendem jest promocja regionu, jego kulinarnego dziedzictwa, poprzez wspieranie rozwoju rodzinnych przedsiębiorstw oraz średnich i małych gospodarstw rolnych.

Mając na uwadze oba wspomniane kierunki oraz wychodząc naprzeciw potrzebom i oczekiwaniom rolników oraz małych i średnich przedsiębiorców rolnych, utworzono grupę operacyjną "Polski Ocet Ovocowy", która była podmiotem aplikującym w ramach działania "Współpraca" objętego PROW na lata 2014-2020.

Grupa operacyjna, korzystała z osobowości prawnej lidera przedsięwzięcia - Łódzkiego Ośrodka Doradztwa Rolniczego z siedzibą w Bratoszewicach. W skład konsorcjum weszli:

- Łódzki Ośrodek Doradztwa Rolniczego z siedzibą w Bratoszewicach - lider operacji,
- Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego z siedzibą w Warszawie;

- Rolnik - Monika Bankiewicz z siedzibą w Wieniawie, Komorów (gospodarstwo rolne 1);
- Przedsiębiorstwo „Strzelsok” Jarosław Strzelecki z siedzibą w Kowiesy, Paplinek 9 (gospodarstwo rolne 2);
- Przedsiębiorstwo Handlowo-Uslugowe Daniel Byster z siedzibą w Rawie Mazowieckiej, Franopol (gospodarstwo rolne 3);
- Przedsiębiorstwo „Gorgol” Ireneusz Gorgol z siedzibą w Częstochowie (gospodarstwo rolne 4).

2. CEL

Celem projektu było opracowanie i wdrożenie innowacyjnego produktu – octu owocowego oraz innowacyjnej technologii produkcji octu owocowego z wykorzystaniem lokalnych szczepów mikroorganizmów, umożliwiającej otrzymanie bioróżnorodnego produktu o potencjalnych walorach prozdrowotnych oraz wytworzenie innowacyjnego produktu pozbawionego chemicznych konserwantów, a zawierającego jedynie naturalne metabolity drobnoustrojów. Produkt końcowy miał się charakteryzować wysoką jakością i wartością żywieniową, bezpieczeństwem oraz powtarzalnością cech sensorycznych, mikrobiologicznych i fizykochemicznych.

3. ZAKRES PRAC

Zakres prac obejmował:

- Przygotowanie technologii octu owocowego
- Ocenę czystości mikrobiologicznej warunków środowiskowych miejsca przeznaczonego do produkcji octów owocowych.
- Badania jakości mikrobiologicznej wody stosowanej w produkcji.
- Ocenę jakości mikrobiologicznej i fizykochemicznej soków owocowych
- Badania mikrobiologiczne i fizykochemiczne, wytworzonego w I etapie fermentacji, wina owocowego.
- Badania mikrobiologiczne i fizykochemiczne, powstałego w II etapie fermentacji, octu owocowego.
- Ocenę sensoryczną octów owocowych.
- Badania przechowalnicze octów owocowych.
- Ocenę substancji bioaktywnych w wytworzonych octach owocowych.

4. METODYKA PRAC

- Badania mikrobiologiczne

Monitoring mikrobiologiczny czystości środowiska produkcji:

Jakość mikrobiologiczna powietrza w pomieszczeniach tłoczarni soków oceniono metodą zderzeniową poprzez występowanie w środowisku czynników biologicznych, do których należą drobnoustroje. Ocena polegała, na pobraniu drobnoustrojów, posiewie na odpowiednie podłoże wzrostowe, a następnie określeniu liczby wyrosłych drobnoustrojów w przeliczeniu na 1 m³ aspirowanego powietrza. Materiał badawczy stanowiły próbki powietrza pobierane w czterech gospodarstwach, przy użyciu próbnika powietrza MAS-100 ECOTM. Próbnik powietrza MAS-100 ECOTM jest wysokowydajnym urządzeniem typu zderzeniowego, szczelinowego, który pobiera określoną ilość powietrza, z szybkością 100 l/min, gwarantującą zebranie wszystkich cząstek o wielkości ponad 1µm. Strumień powietrza owiewa

równomiernie włożone do aparatu płytki Petriego z odpowiednim podłożem stałym. W projekcie badania prowadzono na podłożu PCA (agar z ekstraktem drożdżowym i glukozą) oraz na podłożu YGC (agar z ekstraktem drożdżowym, glukozą i chloramfenikolem), inkubując płytki odpowiednio w temperaturze 30°C przez 72 h w celu określenia ogólnej liczby drobnoustrojów [PN-EN ISO 4833-1:2013-12 + Ap1:2016-11] i 25°C przez 5 dni w celu analizy liczby drożdży i pleśni [PN ISO 7954:1999].

Jakość mikrobiologiczna wody w pomieszczeniach produkcyjnych gospodarstw oceniana była techniką hodowlaną, umożliwiającą wzrost kolonii bakterii na podłożach odżywczych, oznaczając:

-ogólną liczbę bakterii psychrofilnych i mezofilnych metodą płytkową Kocha na agarze odżywczym (PCAW) zgodnie z normą PN-EN ISO 6222: 2004,

-liczbę bakterii *E. coli* i bakterii z grupy *coli* metodą filtracji membranowej na podłożu CCA wg PN -EN ISO 9308-1:2014-12+A1:2017-04,

-liczbę enterokoków (paciorkowców kałowych) metodą filtracji membranowej na podłożu SB wg PN-EN ISO 7899-2: 2004.

Czystość mikrobiologiczna powierzchni urządzeń, linii technologicznych i rąk pracowników oceniano **metodą odciskową** (kontaktową) przy użyciu płytek typu RODAC o powierzchni 25 cm². Na powierzchni płytek były wylane podłoża z lekko wypukłym meniskiem nad krawędzią płytki. Podłoża na płytkach umożliwiało wzrost bakterii i grzybów oraz zawierało substancje inaktywujące środki do dezynfekcji powierzchni. Badania przeprowadzono w wyznaczonych miejscach, obejmujących krytyczne punkty mogące wpływać na jakość mikrobiologiczną finalnego produktu. Zbadano liczbę *Enterobacteriaceae* na powierzchni, na podłożu VRBD, liczba bakterii tlenowych mezofilnych na powierzchni, na podłożu TSA oraz liczbę drożdży i pleśni na powierzchni na podłożu z YGC zgodnie z normą PN-ISO 18593:2018-08.

Badania mikrobiologiczne surowca

Oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów

Próbki badano zgodnie z normą PN-EN ISO 4833-1:2013-12 + Ap1:2016-11 na podłożu PCA. Płytki inkubowano przez 72 ±3 h w 30°C i zliczano wyrosłe kolonie.

Oznaczenie liczby bakterii z grupy coli. Próbki badano zgodnie z normą PN- ISO 4832:2007 na selektywnym podłożu VRBL Płytki inkubowano przez 24 ±2 h w 37°C, następnie zliczano charakterystyczne kolonie. O obecności bakterii z grupy coli mogły świadczyć kolonie barwy purpurowoczerwonej. Nietypowe kolonie potwierdzano w pożywce BLB.

Oznaczenie liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*

Próbki badano zgodnie z normą PN- ISO 21528-2:2017-08 na selektywnym podłożu VRBD zawierającym fiolet krystaliczny, czerwień neutralną, żółć i glukozę. Płytki inkubowano przez 24 ±2 h w 37°C, następnie zliczano charakterystyczne kolonie. O obecności *Enterobacteriaceae* mogły świadczyć kolonie barwy purpurowej ze strefą precypitacji lub bez niej, które potwierdzano w testach na fermentację glukozy i obecność oksydazy.

Oznaczenie liczby *Escherichia coli*

Analizy prowadzono na podłożu TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar) zgodnie z normą PN-EN ISO 16649-2:2004. TBX jest podłożem chromogennym zawierającym żółć,

enzymatyczny hydrolizat kazeiny i substrat chromogeny do wykrywania charakterystycznego dla *E. coli* enzymu β -glukuronidazy. Płytki inkubowano przez 18-24 h w 44°C, następnie zliczano charakterystyczne kolonie. Wytwarzana przez *E. coli* β -glukuronidaza reaguje z substratem chromogennym z podłoża. O obecności *E. coli* świadczyły kolonie przyjmujące barwę turkusową.

Oznaczenie liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej zgodnie z normą PN-ISO 15214: 2002, metodą płytkową w posiewie wgłębnym na podłożu MRS w 30°C, przez 72 \pm 3 h.

Oznaczenie liczby drożdży i pleśni zgodnie z normą PN ISO 7954:1999 dokonując posiewów na podłożu selektywne YGC z chloramfenikolem do hodowli grzybów i drożdży. Inkubacja drobnoustrojów przebiegała w temperaturze 25°, do 5 dni.

Oznaczenie liczby bakterii redukujących siarczany (IV) rosnących w warunkach beztlenowych wg normy PN-ISO 15213:2005, które tworzą charakterystyczne kolonie otoczone czarną strefą precypitatu spowodowanego redukcją siarczanów (IV) do siarczków, co powoduje zaczernienie kolonii w pożywce selektywnej TSC. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°, przez 20 \pm 2 h.

Oznaczenie liczby gronkowców koagulazododatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków)

W celu wykrycia gronkowców koagulazododatnich próbki wysiewano zgodnie z normą PN-EN ISO 6888-2:2001 + A1:2004 na podłożu RPF zawierającym plazmę krwi i fibrynogen. Płytki inkubowano w 37°C przez 24-48 h. Po inkubacji zliczano charakterystyczne kolonie – czarne lub szare (zabarwienie powstałe na skutek redukcji zawartego w podłożu tellurynu potasu), otoczone strefą zmętnienia. Zmętnienie wokół kolonii powstawało w wyniku reakcji koagulazy wytwarzanej przez gronkowce z protrombiną zawartą w plazmie.

Oznaczenie obecności *Listeria monocytogenes*

Próbki badano zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-1:2017-07 stosując w I etapie bulion ½ Fraser zaś w II bulion Frasera. W obu etapach prowadzono inkubację przez 22 - 26 godziny w temperaturze odpowiednio 30°C i 37°C. Po inkubacji próbki posiewano na podłoża ALOA i Oxford, które inkubowano w temperaturze 37°C do 48 godzin. Po upływie określonego czasu zliczano charakterystyczne kolonie dla określonego podłoża (kolonie barwy niebieskozielonej z charakterystyczną strefą zmętnienia wokół na podłożu ALOA oraz kolonie barwy ciemnoszarej z zielonkawym odcieniem i zaczernionym podłożem Oxford).

Oznaczenie obecność bakterii z rodzaju *Salmonella* spp.

W celu wykrycia obecności *Salmonella* spp. wg PN-EN ISO 6579-1:2017-04 próbki inkubowano w zbuforowanej wodzie peptonowej (WPZ) w temperaturze 37°C przez 18 \pm 2 h. Po inkubacji próbki przesiewano do podłoży selektywno-namnażających Rappaport-Vassiliadis (RVS) i Muller Kauffmann (MKTTn) w ilości odpowiednio 0,1 ml oraz 1 ml. Inkubacje prowadzono przez 24 h (\pm 3 h) w temperaturach 41,5°C oraz 37°C, odpowiednio dla podłoża RVS i MKTTn. Po tym czasie wykonywano posiew redukcyjny na podłożu XLD

oraz podłoże Rambach. Posiewy te inkubowano 24-48 h w temperaturze 37°C. W celu potwierdzeń charakterystycznych kolonii *Salmonella* spp. prowadzono identyfikacje serologiczną oraz biochemiczną.

Badania mikrobiologiczne półproduktu

Oznaczenie liczby drożdży i pleśni zgodnie z normą PN ISO 7954:1999 na podłożu selektywnym YGC z chloramfenikolem.

Oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów

Próbki badano zgodnie z normą PN-EN ISO 4833-1:2013-12 + Ap1:2016-11 na podłożu PCA. Płytki inkubowano przez 72 ±3 h w 30°C i zliczano wyrosłe kolonie.

Badanie mikrobiologiczne octu

Oznaczenie liczby bakterii octowych metodą posiewu powierzchniowego z wykorzystaniem podłoża GYC lub podłoża octowego. Inkubację prowadzono w temperaturze 30°, przez 72 ±3 h.

Oznaczenie liczby drożdży i pleśni zgodnie z normą PN ISO 7954:1999 na podłożu selektywnym YGC z chloramfenikolem.

- Badania fizykochemiczne

Oznaczanie zawartości kadmu i ołowiu przeprowadzono techniką płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FAAS) według PN-EN 14082:2004 „Artykuły żywnościowe. Oznaczanie pierwiastków śladowych. Oznaczanie zawartości ołowiu, kadmu, cynku, miedzi, żelaza i chromu metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) po mineralizacji suchej.” (9). Próbkę do badań przygotowano i mineralizowano zgodnie z Instrukcją Własną.

Odważoną próbkę (ok. 1g) spopielono na płycie grzewczej i mineralizowano na sucho w piecu muflowym w temperaturze 420°C. Do popiołu dodawano stężonego kwasu azotowego, podgrzewano i ponownie prażono w temperaturze 420°C w piecu muflowym w celu otrzymania białej pozostałości. Biały popiół rozpuszczono w kwasie solnym rozcieńczonym w stosunku 1:1 i ogrzewano na płycie grzewczej 1-3 minuty. Roztwór przenoszono ilościowo za pomocą kwasu azotowego o stężeniu 0,1 mol/l do kolby miarowej o pojemności 10 ml, uzupełniono kwasem i dokładnie mieszano. Do oznaczenia zastosowano spektrometr absorpcji atomowej Z-2000 firmy HITACHI. Zawartość kadmu i ołowiu w próbkach określono na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Tabela 1. Warunki oznaczania kadmu i ołowiu oraz parametry metody

Warunki i parametry metody	Cd	Pb
Długość fali, nm	228,8	217,0
Prąd zasilania lampy, mA	5	7
Szerokość szczeliny, nm	0,30	0,30
Prędkość przepływu powietrza, dm ³ /h	400	400

Prędkość przepływu acetyleny, dm ³ /h	60	60
Granica oznaczalności LOQ, mg/kg	0,003	0,02
Czułość, mg/kg	0,0025	0,012

Zawartość rtęci oznaczono przy użyciu analizatora rtęci AMA 254, wykorzystując technikę wytwarzania par rtęci, według procedury własnej PS-02 edycja 3, 6 lipca 2009 r.: Badanie zawartości rtęci metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej. Metoda ta nie wymagała wcześniejszej mineralizacji próbki, próbkę soku, wina i octu podawano na podajniku bezpośrednio do aparatu. W środku, w tubie katalitycznej następowało suszenie, a następnie spalanie próbki w temperaturze około 1000°C w obecności tlenu. Uwolniona z próbki rtęć została „wyłapana” na amalgamatorze, z którego po podgrzaniu przepływała do kuwety pomiarowej. Następował pomiar absorbancji. Na podstawie krzywej wzorcowej, odczytano wynik pomiaru.

Tabela 2. Dane techniczne analizatora rtęci AMA 254 oraz parametry metody

Układ	jednowiązkowy; szeregowy układ kuwet pomiarowych
Sterowanie	z zewnętrznego komputera
Źródło światła	niskociśnieniowa lampa rtęciowa
Długość fali	253,65 nm
Filtr interferencyjny	254 nm, szerokość połówkowa 9 nm
Detektor	krzemowa dioda UV

Warunki analizy: wielkość analizowanej próbki: 100 µl, suszenie 120 s; rozkład 300 s
Granica oznaczalności metody, mg/kg: 0,0003, Czułość metody, mg/kg: 0,0001

Oznaczenie zawartości sodu i potasu przeprowadzono techniką płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FAAS) według procedury własnej PS-01 edycja 3, 6 lipca 2009 r.: „Badanie zawartości cyny, manganu, chromu, sodu, potasu, wapnia, magnezu metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej w produktach żywnościowych”.

Odmierzoną próbkę (ok. 20 cm³) spopielono na płycie grzewczej i mineralizowano na sucho w piecu muflowym w temperaturze 420°C. Do popiołu dodawano stężonego kwasu azotowego, podgrzewano i ponownie prażono w temperaturze 420°C w piecu muflowym w celu otrzymania białej pozostałości. Biały popiół rozpuszczono w kwasie solnym rozcieńczonym w stosunku 1:1 i ogrzewano na płycie grzewczej 1-3 minuty. Roztwór przenoszono ilościowo za pomocą kwasu azotowego o stężeniu 0,1 mol/l do kolby miarowej o pojemności 10 cm³, uzupełniono wodą destylowaną i dokładnie mieszano. Do odpowiednio rozcieńczonych próbek dodano buforu z chlorku cezu w ilości takiej, aby stężenie cezu było jednakowe we wzorcach i badanej próbce. Do oznaczenia zastosowano spektrometr absorpcji atomowej Z-2000 firmy HITACHI. Zawartość sodu i potasu w próbkach określono na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Zawartość witaminy C określono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz i detekcją UV według: procedury własnej PS-04 edycja 3, 6 lipca 2009 r.: „Badanie zawartości witaminy C metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w produktach spożywczych.” Zasada metody polega na oznaczeniu łącznej zawartości kwasów: L-(+) askorbinowego i L-(+) dehydroaskorbinowego w badanej próbce. Kwas dehydroaskorbinowy zredukowany jest do kwasu askorbinowego poprzez dodatek odczynnika redukującego DTT. Witamina C oznaczana jest techniką HPLC z detekcją UV przy długości fali 254 nm.

W celu oznaczenia zawartości witaminy C pobierano 1 ml próbki do kolby pomiarowej pojemności 25 ml, dodawano roztwory klarujące: po 1 ml odczynników Carrez I oraz Carrez II, uzupełniono wodą do objętości 5 ml i przesączono. W następnym etapie pobierano po 1 ml przesączu, dodawano 1 ml odczynnika redukującego DTT. Przygotowane roztwory pozostawiono na 120 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Bezpośrednio przed wykonaniem analizy chromatograficznej próbki przefiltrowano przez filtr membranowy 0,2 μm . Na pętlę dozującą nastrzykiwano 20 μl próby. Analizę chromatograficzną prowadzono w temperaturze 25°C, wykorzystując chromatograf cieczowy Performance, firmy Shimadzu wyposażony w autosampler i detektor UV. Rozdział uzyskano stosując kolumnę monolityczną Onyx Monolithic C18 3 μm o wymiarach 100x4,6 mm z prekolumną Onyx Monolithic 3 μm o wymiarach 10x4,6 mm, przy prędkości przepływu fazy ruchomej 0,5 ml/min w warunkach izokratycznych. Fazę ruchomą stanowił 0,5% bufor fosforanowy z dodatkiem DTT. Pomiaru absorbancji w UV dokonywano przy długości fali 254 nm. Zawartość witaminy C określono na podstawie krzywej wzorcowej, porównując powierzchnie pików badanych próbek z powierzchniami pików wzorców. Obróbkę danych przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie LCSolution® Version 1.24 SP1. Granica oznaczalności metody: 2,0 mg/L, Czułość metody: 1,8 mg/L

Kwasowość ogólna w sokach oznaczano zgodnie z metodyką opisaną w PN-EN 12147:2000 „Soki owocowe i warzywne. Oznaczanie kwasowości miareczkowej”. Zasada metody polega na miareczkowaniu 25 cm^3 soku standardowym roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 0,25 mol/l do wartości pH równej 8,1.

Wartość pH w sokach oznaczano potencjometrycznie wg normy PN-EN 1132:1999 „Soki owocowe i warzywne. Oznaczanie pH”.

Zawartości alkoholu oznaczano wg normy PN-A-79120-04:1990 „Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego”. Zasada metody polega na oddestylowaniu alkoholu z próbki i odczytaniu mocy z tablic na podstawie piknometrycznie oznaczonej gęstości destylatu. Odmierzono 50 cm^3 wina lub octu, przeniesiono ilościowo do kolby destylacyjnej, zobojętniono 0,1 mol/l roztworem wodorotlenku sodu wobec papierka wskaźnikowego i prowadzono destylację. Następnie oznaczono przy użyciu piknometru gęstość destylatu w temperaturze 20 °C. W tym celu na wadze analitycznej zważono z dokładnością do 0,0002 g pusty piknometr, piknometr z wodą destylowaną oraz piknometr z destylatem. Na podstawie oznaczonej gęstości względnej odczytano z tablic zawartość alkoholu w procentach objętościowych.

Zawartości cukrów ogółem oznaczano wg normy PN-A-79120-06:1990 „Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości cukrów”. Zasady metody polega bezpośrednio miareczkowaniu soli miedziowej badanym roztworem cukru wobec błękitu metylenowego jako wskaźnika. Pobrano 25 cm³ wina do kolby pomiarowej 100 cm³, dodano po 5 cm³ odczynników klarujących Carrez I i Carrez II, uzupełniono wodą destylowaną do objętości 100 cm³ i po 15 minutach przesączono. Pobrano 25 cm³ przesączu do kolby pomiarowej 250 cm³, dodano 5 cm³ stężonego kwasu solnego i przeprowadzono hydrolizę kwasową cukrów (inwersję) w temperaturze 68 - 70 °C przez 5 minut. Roztwór schłodzono do temperatury 20 °C i, zobojętniono wobec oranżu metylenowego i uzupełniono do objętości 250 cm³. Następnie do kolby stożkowej odmierzone po 5 cm³ roztworów Fehlinga I i II, dodano z biurety 15 cm³ inwertowanego roztworu cukru, ogrzano do wrzenia i łagodnie ogrzewano przez 2 minuty. Utrzymując w stanie wrzenia miareczkowano na gorąco wobec 1 % roztworu błękitu metylenowego inwertowanym roztworem cukrów do zaniku barwy niebieskiej. Na podstawie ilości badanego roztworu cukru zużytego do miareczkowania odczytano z tablicy równoważną masę cukru inwertowanego w badanym roztworze.

Moc octu oznaczano zgodnie z metodyką opisaną przez J. Czubę w „Octownictwo”. Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Warszawa 1986. Zasada metody polega na bezpośrednim miareczkowaniu 1 cm³ próbki octu mianowanym roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 mol/l wobec 1 % alkoholowego roztworu fenoloftaleiny jako wskaźnika do zmiany barwy na kolor różowy.

- **Ocena sensoryczna**

Do oceny sensorycznej wykorzystano metodę opisową, opracowaną jako własna procedura badawcza. Materiałem badawczym były soki owocowe: jabłkowy oraz winogronowy, uzyskane wina oraz otrzymane octy owocowe.

5. UZYSKANE WYNIKI

Technologia produkcji octu owocowego

IBPRS jest Instytutem Badawczym nadzorowanym przez Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Aktualnie stanowi wielobranżową jednostkę naukową, której działalność jest ściśle ukierunkowana na rozwój nauk rolniczych, takich jak: biotechnologia, technologia żywności i żywienia, mikrobiologia i inne. Proces produkcji octu owocowego został opracowany na podstawie badań pracowników Zakładu Jakości Żywności. Do przemysłowej produkcji octu jabłkowego przygotowano innowacyjną dwufazową metodę biologicznej konwersji soku jabłkowego i winogronowego do kwasu octowego, w gospodarstwach czterech rolników. Instytut posiada środowiskowe drobnoustroje do przeprowadzenia tego procesu. W technologii produkcji octu owocowego wykorzystano linie technologiczne przeznaczone do tłoczenia soków oraz przygotowano technologie i urządzenia do przeprowadzenia dwuetapowej fermentacji. Projekt modelu linii technologicznej opracowali pracownicy IBPRS, a linia technologiczna została złożona z dostępnych i specjalnie przygotowanych zbiorników u każdego rolnika. Technologia otrzymywania octu owocowego została wdrożona w czterech jednostkach produkcyjnych, które przystosowały warunki środowiskowe i odpowiednie wyposażenie do procesu produkcyjnego we współpracy z pracownikami Instytutu. Do przemysłowego wdrożenia technologii octu przygotowano

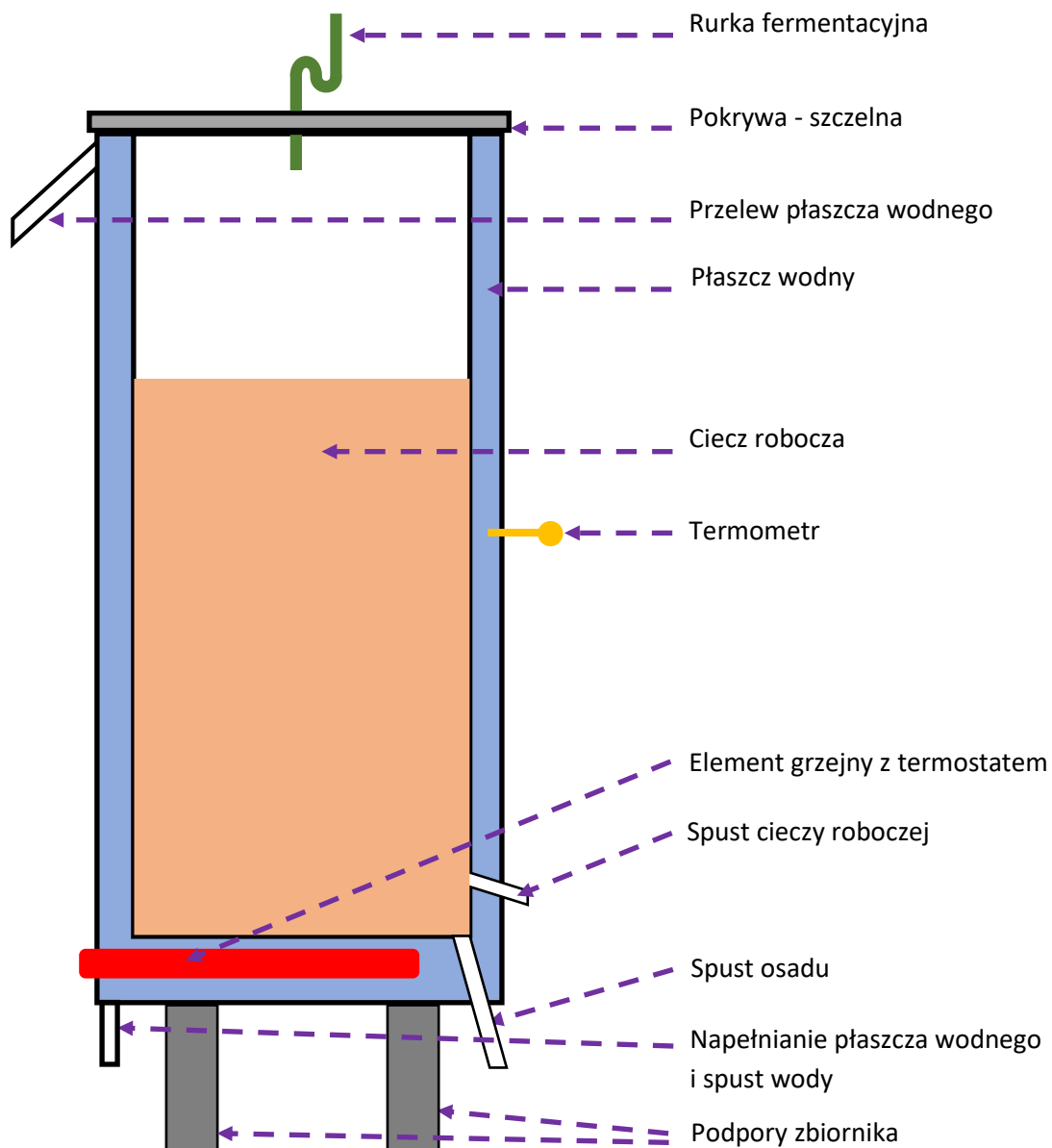
niezbędne mikroorganizmy z kolekcji IBPRS oraz wykonano odpowiedni, niezbędny zakres badań chemicznych, mikrobiologicznych i wdrożeniowych w każdej jednostce przemysłowej.



Rys. 1. Schematyczny przebieg procesu

W trakcie fermentacji alkoholowej, pod wpływem drożdży, zawarty w soku cukier metabolizowany był do alkoholu etylowego i dwutlenku węgla. Etanol, podczas fermentacji octowej z udziałem bakterii octowych, przekształcał się w ocet. W celu otrzymania octu zostały zaadaptowane pomieszczenia tłoczarni, zapewniające konieczne warunki temperaturowe i tlenowe procesu do wdrożenia technologii. Przeprowadzono ocenę i dostosowano środowisko produkcji do wymogów higieny i zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego uzyskanych produktów. Półprodukt został zaszczerpiony wyselekcjonowanymi szczepami bakterii octowych, którymi dysponuje Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego (IBPRS), o znanych, korzystnych cechach biotechnologicznych. Wybrane szczepy bakteryjne charakteryzowały się opornością na wysokie stężenia kwasu octowego, pojawiającego się w procesie technologicznym oraz wysoką aktywnością i zdolnością rozmnażania. Przeprowadzone zostały badania zmian liczby bakterii octowych podczas drugiej fazy procesu fermentacji (uzyskiwania ekologicznego octu jabłkowego) oraz badania fizykochemiczne (np. moc octu) i sensoryczne. Ze względu na fakt iż, na wydajność produkcji kwasu octowego istotnie wpływa temperatura, pH, zawartość cukru i napowietrzanie wszystkie parametry były na bieżąco kontrolowane i regulowane w czasie zaocetowania. Nadzór nad prawidłowym przebiegiem produkcji polegał na ciągłym monitorowaniu innowacyjnego procesu technologicznego, polegającego na pobieraniu próbek do badań i kontroli innych parametrów. Przeprowadzono badania trwałości przechowalniczej octu jabłkowego. W trakcie przechowywania oceniano smak, zapach, barwa, jego moc (kwasowość), a także zmieniającą się z upływem czasu, mikroflorą. Na podstawie uzyskanych wyników badań ustalono termin trwałości octu jabłkowego produkowanego z soku pasteryzowanego i niepasteryzowanego dla każdego producenta.

Rys.2 Schemat zbiornika do procesu fermentacji alkoholowej i octowej przygotowany przez IBPRS



W każdym gospodarstwie zbiorniki były dostosowane do warunków pomieszczenia i technologii. W gospodarstwie Moniki Bankiewicz z siedzibą w Wieniawie, Komorów (gospodarstwo rolne 1) do procesu produkcji octu przygotowano i dostosowane posiadane przez to gospodarstwo zbiorniki od soków owocowych. Warunki cieplne zapewniły odpowiednie maty grzewcze, którymi zostały otulone zbiorniki do fermentacji alkoholowej i octowej. Napowietrzanie realizowano przez nadmuchiwanie przy pomocy odpowiedniej pompy powietrza do zbiornika. Czasy fermentacji zostały dokonane przez ocenę zawartości wybranych składników i ocenę sensoryczną.

W gospodarstwie - przedsiębiorstwo „Strzelsok”, Jarosław Strzelecki z siedzibą w Kowiesy, Paplinek 9 (gospodarstwo rolne 2) zostały zakupione zbiorniki do fermentacji wina i zostały one odpowiednio przystosowane do fermentacji octowej w pomieszczeniach o odpowiedniej temperaturze. W tym gospodarstwie przystosowano specjalne pomieszczenie, gdzie warunki termiczne były regulowane klimatyzatorem. Napowietrzanie realizowano przez nadmuchiwanie powietrza przy pomocy odpowiedniej pompy do fermentorów.

Podobnie realizowano proces w Przedsiębiorstwie Handlowo-Usługowym Daniel Byster z siedzibą w Rawie Mazowieckiej, Franopol (gospodarstwo rolne 3). Zostały zakupione zbiorniki do fermentacji wina i zostały one odpowiednio przystosowane do fermentacji octowej w pomieszczeniu o odpowiedniej temperaturze. W tym gospodarstwie przystosowano specjalne pomieszczenie, gdzie warunki termiczne były regulowane klimatyzatorem. Napowietrzanie realizowano przez nadmuchiwanie powietrza przy pomocy odpowiedniej pompy do fermentorów.

W czwartym gospodarstwie rolnym: Przedsiębiorstwo „Gorgol” Ireneusz Gorgol z siedzibą w Częstochowie (gospodarstwo rolne 4) proces produkcji octu realizowano na przygotowanym wcześniej winie winogronowym. Zostały zakupione zbiorniki do fermentacji wina i zostały one odpowiednio przystosowane do fermentacji octowej w pomieszczeniu o odpowiedniej temperaturze. W tym gospodarstwie przystosowano specjalne pomieszczenie, gdzie warunki termiczne były regulowane klimatyzatorem. Napowietrzanie realizowano przez nadmuchiwanie powietrza przy pomocy odpowiedniej pompy do fermentorów.



Ryc. 1. Przykłady użytych fermentorów

Projekt podzielono na trzy etapy

Etap I dotyczył wdrożenia procesu technologicznego w dwóch gospodarstwach rolnych /przetwórczych:

- **Gospodarstwie sadowniczym MB Monika Bankiewicz (Komorów 4, 26-432 Wieniawa) – gospodarstwo 1**
- **„Strzelsok” Jarosław Strzelecki (Palinek 9, 96-111 Kowiesy) - gospodarstwo 2**

Oceniono warunki środowiskowe do wymogów higieny produkcji innowacyjnego produktu-octu owocowego. Wykonano badania czystości powierzchni, rąk pracowników, powietrza i wody – w gospodarstwie oznaczonym 1. Wyniki monitoringu zaprezentowano w tabelach przedstawionych poniżej (Tabela 3-5).

Tabela 3. Monitoring czystości powierzchni produkcyjnych w gospodarstwie 1 (Bankiewicz)

Miejsce pobrania próbki	Liczba bakterii tlenowych mezofilnych na powierzchni [jtk/cm ²]	Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> na powierzchni [jtk/cm ²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm ²]
Linia sortownicza	2,40	0,00	0,02
Zbiornik na sok	0,68	0,00	0,00
Zbiornik wody	1,84	0,00	0,06
Myjnia	>10,00	0,00	0,00
Prasa	0,16	0,00	0,00
Pracownik 1 bez rękawic	>10,00	0,06	0,08
Pracownik 2 bez rękawic	1,00	0,00	0,00
Pracownik 3 z rękawicami	>10,00	0,00	0,10
Pracownik 4 z rękawicami	0,04	0,00	0,00

Tabela 4. Monitoring czystości powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych w gospodarstwie 1 (Bankiewicz)

Miejsce pobrania próbki	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/m ³ powietrza]	Liczba drożdży i pleśni, [jtk/m ³ powietrza]
Hala produkcji soku (tłocznia)	2,2 x 10 ³	1,2 x 10 ²
Sortownia surowca	1,3 x 10 ³	8,9 x 10 ¹

Tabela 5. Jakość mikrobiologiczna wody w gospodarstwie 1 (Bankiewicz)

Miejsce pobrania próbki	Liczba bakterii z grupy coli [jtk/100 ml]	Liczba <i>Escherichia coli</i> [jtk/100 ml]	Liczba enterokoków [jtk/100 ml]	Ogólna liczba kolonii w 22°C [jtk/ml]
Stołówka	0	0	0	0
Hala produkcji soku	0	0	0	0
Basen do mycia jabłek	0	0	0	0

Oceniono również warunki środowiskowe do wymogów higieny produkcji innowacyjnego produktu- octu owocowego w gospodarstwie 2. Poniżej w Tabelach 6-8 przedstawiono wyniki badań czystości powierzchni, rąk pracowników, powietrza i wody.

Tabela 6. Monitoring czystości powierzchni produkcyjnych w gospodarstwie 2 (Strzelsok)

Miejsce pobrania próbki	Liczba bakterii tlenowych mezofilnych na powierzchni [jtk/cm ²]	Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> na powierzchni [jtk/cm ²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm ²]
Pracownik 1	0,56	0,00	0,00
Prasa	0,48	0,00	0,04
Zbiornik 1	0,12	0,02	0,08
Nalewak	0,16	0,00	0,20
Sitko	0,48	0,00	0,46
Zbiornik2	1,28	0,16	0,00
Ściana	0,08	0,04	0,16

Tabela 7. Monitoring czystości powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych w gospodarstwie 2 (Strzelsok)

Miejsce pobrania próbki	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/m ³ powietrza]	Liczba drożdży i pleśni, [jtk/m ³ powietrza]
Pomieszczenie do fermentacji soku	1,2 x 10 ²	1,0 x 10 ¹
Chłodnia wyrobów gotowych	1,3 x 10 ¹	1,0 x 10 ¹
Hala produkcyjna	5,0 x 10 ¹	1,6 x 10 ¹

Tabela 8. Jakość mikrobiologiczna wody w gospodarstwie 2 (Strzelsok)

Miejsce pobrania próbki	Liczba bakterii z grupy coli [jtk/100 ml]	Liczba <i>Escherichia coli</i> [jtk/100 ml]	Liczba enterokoków [jtk/100 ml]	Ogólna liczba kolonii w 22°C [jtk/ml]
-------------------------	---	---	---------------------------------	---------------------------------------

Pomieszczenie socjalne	0	0	0	0
Hala produkcyjna	0	0	0	0

Następnie przeprowadzono badania mikrobiologiczne i fizykochemiczne surowca (soku) w gospodarstwie 1, których wyniki przedstawiono w Tabeli 9-12 oraz wykonano ocenę sensoryczną (Tabela 13).

Tabela 9. Jakość mikrobiologiczna próbek soków jabłkowych z gospodarstwa 1 (Bankiewicz)

Parametr mikrobiologiczny	Cykl 1	Cykl 2
	[jtk/ml]	
Ogólna liczba drobnoustrojów	< 1	< 1
Liczba mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej	< 1	< 1
Liczba bakterii redukujących siarczany (IV) rosnących w warunkach beztlenowych	< 1	< 1
Liczba bakterii z grupy coli	< 1	< 1
Liczba <i>Escherichia coli</i>	< 1	< 1
Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> w temp. 37°C	< 1	< 1
Liczba gronkowców koagulazo-dodatnich (<i>S. aureus</i> i innych gatunków)	< 1	< 1
Liczba drożdży	< 1	< 1
Liczba pleśni	1,9 x 10 ²	< 1

Tabela 10. Obecność patogenów w próbkach soków jabłkowych z gospodarstwa 1 (Bankiewicz)

Parametr mikrobiologiczny	Cykl 1	Cykl 2
Obecność <i>Salmonella</i> spp. 25 ml soku	nie wykryto	nie wykryto
Obecność <i>Listeria monocytogens</i> 25 ml soku	nie wykryto	nie wykryto

Tabela 11. Jakość fizykochemiczna próbek soków jabłkowych z gospodarstwa 1 (Bankiewicz)

Parametr fizykochemiczny	Cykl 1	Cykl 2
Zawartość ekstraktu ogólnego %	11,4	12,1
Zawartość cukrów ogółem % (m/m)	10,1	10,9
Zawartość cukrów redukujących % (m/m)	9,7	8,7
Zawartość sacharozy % (m/m)	0,4	2,1
Kwasowość ogólna w przeliczeniu na kwas cytrynowy, g/100ml	0,39	0,36
Wartość pH	3,55	3,60
Zawartość witaminy C mg/100ml	1,66	1,84

Tabela 12. Zawartość metali ciężkich i pierwiastków w próbkach soków jabłkowych z gospodarstwa 1 (Bankiewicz)

Pierwiastek	Cykl 1	Cykl 2
	[mg/kg]	
Pb	< 0,020	< 0,020
Hg	< 0,0005	< 0,0005
Na	6	4
K	969	848
Cd	< 0,003	< 0,003

Tabela 13. Ocena sensoryczna próbek soków jabłkowych w gospodarstwie 1 (Bankiewicz)

Parametr/Cecha	Cykl 1	Cykl 2
Klarowność	Mętny, lekko zawieszisty	Mętny, lekko zawieszisty
Barwa	mleczno-żółta, kremowa, jasna	mleczno-żółta, kremowa, jasna
Zapach	Świeży, jabłkowy, kwaskowy, lekko słodki, orzeźwiający	Świeży, jabłkowy, kwaskowy, lekko słodki, orzeźwiający
Smak	jabłkowy, świeży, orzeźwiający, słodki, kwaśny, słodko- kwaśny	jabłkowy, świeży, orzeźwiający, słodki, kwaśny, słodko- kwaśny

Ponadto, wykonano badania mikrobiologiczne (Tabele 14-15) , fizykochemiczne (Tabele 16-17) surowca (soku) oraz ocenę sensoryczną (Tabela 18) w gospodarstwie 2.

Tabela 14. Jakość mikrobiologiczna próbek soków jabłkowych z gospodarstwa 2 (Strzelsok)

Parametr mikrobiologiczny	Cykl 1	Cykl 2
	[jtk/ml]	
Ogólna liczba drobnoustrojów	< 1	< 1
Liczba mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej	< 1	< 1
Liczba bakterii redukujących siarczany (IV) rosnących w warunkach beztlenowych	< 1	< 1
Liczba bakterii z grupy coli	< 1	< 1
Liczba <i>Escherichia coli</i>	< 1	< 1
Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> w temp. 37°C	< 1	< 1
Liczba gronkowców koagulazo-dodatnich (<i>S. aureus</i> i innych gatunków)	< 1	< 1
Liczba drożdży	< 1	< 1
Liczba pleśni	< 1	< 1

Tabela 15. Obecność patogenów w próbkach soków jabłkowych z gospodarstwa 2 (Strzelsok)

Parametr mikrobiologiczny	Cykl 1	Cykl 2
Obecność <i>Salmonella</i> spp. 25 ml soku	nie wykryto	nie wykryto
Obecność <i>Listeria monocytogens</i> 25 ml soku	nie wykryto	nie wykryto

Tabela 16. Jakość fizykochemiczna próbek soków jabłkowych z gospodarstwa 2 (Strzelsok)

Parametr fizykochemiczny	Cykl 1	Cykl 2
Zawartość ekstraktu ogólnego %	14,3	14,1
Zawartość cukrów ogółem % (m/m)	12,7	12,6
Zawartość cukrów redukujących % (m/m)	8,20	8,40
Zawartość sacharozy % (m/m)	4,20	4,10
Kwasowość ogólna w przeliczeniu na kwas cytrynowy, g/100ml	0,56	0,58
Wartość pH	3,74	3,83
Zawartość witaminy C mg/100ml	1,72	1,56

Tabela 17. Zawartość metali ciężkich i pierwiastków w próbkach soków jabłkowych z gospodarstwa 2 (Strzelsok)

Pierwiastek	Cykl 1	Cykl 2
	[mg/kg]	
Pb	< 0,020	< 0,020
Hg	< 0,0005	< 0,0005
Na	4	6
K	1227	1340
Cd	< 0,003	< 0,003

Tabela 18. Ocena sensoryczna próbek soków jabłkowych z gospodarstwa 2 (Strzelsok)

Parametr/Cecha	Cykl 1	Cykl 2
Klarowność	mętny, zawieszony	mętny, zawieszony
Barwa	mleczno-słomkowy, kremowa, jasna	mleczno-żółta, jasna
Zapach	świeży, jabłkowy, słodko-kwaśny, orzeźwiający	świeży, jabłkowy, lekko kwaśny, lekko słodki, orzeźwiający
Smak	jabłkowy, świeży, orzeźwiający, słodko- kwaśny	jabłkowy, świeży, orzeźwiający, słodki, lekko słodki, lekko kwaśny

Ożywiono i przebadano pod względem biochemicznym i fizjologicznym drożdże, pochodzące z własnej kolekcji szczepów IBPRS, które zastosowano do pierwszego etapu fermentacji. Są to drożdże należące do gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, rasa Tokaj, a rodzaj fermentacji to

fermentacja alkoholowa. Nastaw fermentacyjny, czyli sok, wlewano do zbiornika w takiej ilości, aby wypełnił 3/4 jego pojemności. Po wlaniu przygotowanej „matki drożdżowej” oraz wymieszaniu zawartości, po 2 dniach burzliwej fermentacji zamknięto zbiornik z wyprowadzoną rurką fermentacyjną. Temperatura nastawu, do którego dodano drożdże, wynosiła 18-22°C, a wyprowadzoną rurkę umieszczono w małym naczyniu z wodą. Po 2-3 dniach nastąpiło zafermentowanie charakteryzujące się szybkim rozwojem komórek drożdży (zmętnieniem zawartości zbiornika, wzrostem temperatury do 25°C). Fermentacja trwała 2-3 tygodnie. Pod koniec tego okresu, powstały w fermentorze półprodukt stał się bardziej klarowny, a na dnie utworzyła się warstwa osadu (z obumierających drożdży i zawieszonych w nastawie części owoców). Był to najważniejszy etap fermentacji alkoholowej, który odbywał się bez dostępu powietrza (tlenu). Po przefermentowaniu głównej masy cukru, zawartego w soku, ustała intensywność procesów fermentacyjnych i powstały półprodukt wszedł w etap dojrzewania -tzw. trzeci okres fermentacji. Trzeci okres, zwany fermentacją cichą lub dofermentowaniem, charakteryzował się bardzo małym wydzielaniem dwutlenku węgla. W tym czasie w winie zachodziły procesy powstawania substancji biologicznie aktywnych (witaminy, kwasy organiczne i inne) i związków smakowych.

Monitorowano parametry fizykochemiczne w półprodukcie oraz badano zmiany liczby drożdży w trakcie fermentacji w gospodarstwie 1.

Tabela 19. Zmiany parametrów fizykochemicznych półproduktu z gospodarstwa 1 (Bankiewicz)

Parametr fizykochemiczny	Czas fermentacji [tygodnie]					
	1	2	3	1	2	3
	Cykl 1			Cykl 2		
Zawartość alkoholu	2,3	5,5	8,0	1,9	4,8	7,9
pH	3,55	3,60	3,67	3,49	3,51	3,62
Zawartość cukrów ogółem, % (m/m)	8,24	4,53	1,40	8,91	4,21	0,80

Tabela 20 a. Monitoring mikrobiologiczny półproduktu z gospodarstwa 1 (Bankiewicz) w cyklu 1

Parametr mikrobiologiczny	Czas fermentacji [tygodnie]			
	0	1	2	3
	[jtk/ml]			
Ogólna liczba drobnoustrojów	$3,7 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
Liczba drożdży	$4,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
Liczba pleśni	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabela 20 b. Monitoring mikrobiologiczny półproduktu z gospodarstwa 1 (Bankiewicz) w cyklu 2

Parametr mikrobiologiczny	Czas fermentacji			
	0	1	2	3
	[jtk/ml]			
Ogólna liczba drobnoustrojów	$2,9 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$
Liczba drożdży	$5,5 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
Liczba pleśni	< 1	< 1	< 1	< 1

Zbadano cechy sensoryczne powstałego wina w gospodarstwie 1 (Bankiewicz) (Tabela 21).

Tabela 21. Ocena sensoryczna próbek wina z gospodarstwa 1 (Bankiewicz)

Parametr/Cecha	Cykl 1
Klarowność	Mętny, lekko zawiesisty,
Barwa	mleczno- beżowa
Zapach	lekko alkoholowy, lekko jabłkowy, kwaskowy
Smak	umiarkowanie alkoholowy, kwaśny, mało słodki, wytrawny
Parametr/Cecha	Cykl 2
Klarowność	Mętny, lekko zawiesisty,
Barwa	mleczno- beżowa, z odcieniem kremowym
Zapach	lekko alkoholowy, lekko miodowy, lekko jabłkowy, kwaskowy
Smak	lekko miodowy, lekko jabłkowy, umiarkowanie alkoholowy, kwaśny, mało słodki, wytrawny, wyczuwalny bukiet aromatyczny

Monitorowano parametry fizykochemiczne półproduktu oraz badano zmiany liczby drożdży w trakcie fermentacji w gospodarstwie 2.

Tabela 22. Zmiany parametrów fizykochemicznych półproduktu z gospodarstwa 2 (Strzelsok)

Parametr fizykochemiczny	Czas fermentacji [tygodnie]					
	1	2	3	1	2	3
	Cykl 1			Cykl 2		
Zawartość alkoholu	1,9	4,7	7,2	2,6	4,9	7,5
pH	3,73	3,84	3,94	3,78	3,87	3,99
Zawartość cukrów ogółem, % (m/m)	10,14	6,66	1,47	10,9	6,79	1,33

Tabela 23 a. Monitoring mikrobiologiczny półproduktu z gospodarstwa 2 (Strzelsok) cykl 1

Parametr mikrobiologiczny	Czas fermentacji [tygodnie]			
	0	1	2	3
	[jtk/ml]			
Ogólna liczba drobnoustrojów	$8,8 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$
Liczba drożdży	$6,7 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$
Liczba pleśni	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabela 23 b. Monitoring mikrobiologiczny półproduktu z gospodarstwa 2 (Strzelsok) cykl 2

Parametr mikrobiologiczny	Czas fermentacji			
	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
	[jtk/ml]			
Ogólna liczba drobnoustrojów	$5,9 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$
Liczba drożdży	$5,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$
Liczba pleśni	< 1	< 1	< 1	< 1

Zbadano cechy sensoryczne powstałego wina w gospodarstwie 2 (Tabela 25).

Tabela 24. Ocena sensoryczna próbek wina z gospodarstwa 2 (Strzelsok)

Parametr/Cecha	Cykl 1
Klarowność	Mętny, lekko zawieszisty
Barwa	kremowo- beżowa
Zapach	lekko alkoholowy, jabłkowy, kwaskowy
Smak	Umiarkowanie alkoholowy, kwaśny, mało słodki, wytrawny
Parametr/Cecha	Cykl 2
Klarowność	Mętny, lekko zawieszisty,
Barwa	mleczno- beżowa, z odcieniem kremowym
Zapach	lekko alkoholowy, lekko miodowy, lekko jabłkowy, kwaskowy
Smak	lekko miodowy, lekko jabłkowy, umiarkowanie alkoholowy, kwaśny, mało słodki, wytrawny, wyczuwalny bukiet aromatyczny

Po zakończeniu pierwszego etapu fermentacji (fermentacja alkoholowa), odfiltrowano masę drożdżową i przeniesiono powstałe, u każdego z rolników wino, do kolejnego fermentora.

Zaszczepiono je wyselekcjonowanymi szczepami bakterii octowych, którymi dysponuje Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego (IBPRS), o znanych, korzystnych cechach biotechnologicznych, charakteryzujących się opornością na wysokie stężenia kwasu octowego występującego w procesie technologicznym oraz wysoką aktywnością i zdolnością namnażania. Była to mieszanina szczepów należących do gatunku: *Acetobacter pasteurianus*.

Bakterie kwasu octowego namnażano na dwóch odpowiednich dla wzrostu bakterii octowych pożywkach: podłożu octowym w skład którego wchodził Wort agar, kwas octowy lodowaty i 96% etanol oraz na pożywce GYC również z dodatkiem 96% etanolu. Po otrzymaniu odpowiedniej gęstości zawiesiny bakterii kwasu octowego, dodawano ją do uzyskanego wina. Optymalne warunki syntezy kwasu octowego przez bakterie to pH o zakresie 3 ÷ 4 i temperatura ok. 28 - 30°C. Podczas procesu fermentacji octowej konieczne było napowietrzanie fermentu przez 2-3 tygodnie w celu nagromadzenia odpowiedniej liczby bakterii octowych. Następnie ferment pozostawiony został w spoczynku (bez mieszania) po to by doprowadzić do reakcji zamiany alkoholu w ocet. Pod wpływem enzymów wytwarzanych przez bakterie octowe etanol utlenia się, z wykorzystaniem tlenu z powietrza, do kwasu octowego z wydzieleniem wody. Z fermentacji octowej został pobrany około jeden litr fermentu i przeniesiony do warunków 2-4°C, w celu przetrzymania „matki octowej” i użycia jej do kolejnego cyklu fermentacji. Fermentacja octowa powinna być prowadzona do wyczerpania alkoholu z wina - ok 2-4 miesiące.

W powstałych octach badano liczbę bakterii octowych oraz prowadzono badania fizykochemiczne. Ze względu na fakt, iż na wydajność produkcji kwasu octowego istotnie wpływa temperatura, pH, zawartość cukru i napowietrzanie, wszystkie parametry były kontrolowane i regulowane w czasie fermentacji. Nadzór nad prawidłowym przebiegiem produkcji polegał na ciągłym monitorowaniu innowacyjnego procesu technologicznego, polegającego na pobieraniu próbek do badań.

Tabela 25. Jakość mikrobiologiczna próbek octu z gospodarstwa 1 w czasie jego dojrzewania (Bankiewicz)

Parametr mikrobiologiczny	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
	Cykl 1		
[jtk/ml]			
liczba bakterii octowych	1,9 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶
Liczba drożdży	1,6 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴	1,3 x 10 ³
Liczba pleśni	<1	< 1	< 1
Cykl 2			
[jtk/ml]			
liczba bakterii octowych	2,1 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶
liczba drożdży	9,6 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	2,2 x 10 ³
liczba pleśni	<1	< 1	< 1

Tabela 26. Parametry fizykochemiczne próbek octu z gospodarstwa 1 w czasie jego dojrzewania (Bankiewicz)

Parametr fizykochemiczny	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
	Cykl 1		
Moc octu	0,8	2,7	4,44
alkohol	6,1	3,21	1,2
pH	3,30	3,10	2,90
Cykl 2			

Moc octu	0,7	2,51	4,20
alkohol	6,4	3,47	1,5
pH	3,42	3,33	2,61

Tabela 27a. Ocena sensoryczna próbek octu z gospodarstwa 1 w czasie jego dojrzewania (Bankiewicz) w cyklu 1

Parametr/Cecha	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
Klarowność	naturalnie mętny, z widocznym osadem		
Barwa	mleczno-beżowa		
Zapach	umiarkowanie octowy, kwaskowy, lekko owocowy, lekko winny, jabłkowy, bez zapachów obcych	jabłkowy, winno-drożdżowy, ostry, lekko octowy, bez zapachów obcych	owocowy jabłkowy, kwaskowy, zharmonizowany, bez zapachów obcych
Smak	typowy dla słabego, młodego octu jabłkowego, kwaśny, alkoholowy, wytrawny, lekko owocowy, winno-alkoholowy, bez posmaków obcych	kwaśny, owocowy, aromatyczny	owocowy jabłkowy, kwaskowy bez zapachów obcych

Tabela 27b. Ocena sensoryczna próbek octu z gospodarstwa 1 w czasie jego dojrzewania (Bankiewicz) cyklu 2

Parametr/Cecha	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
Klarowność	naturalnie mętny, z widocznym osadem		
Barwa	mleczno-kremowa		
Zapach	umiarkowanie octowy, kwaskowy, lekko owocowy, lekko winny, lekko jabłkowy, bez zapachów obcych	jabłkowy, winno-drożdżowy, ostry, lekko octowy, bez zapachów obcych	owocowy jabłkowy, lekko kwiatowy, kwaskowy bez zapachów obcych
Smak	typowy dla słabego, młodego octu jabłkowego, kwaśny, alkoholowy, wytrawny, lekko owocowy, winno-	kwaśny, owocowo-kwiatowy, aromatyczny	owocowy kwiatowo-jabłkowy, kwaskowy, zharmonizowany, bez zapachów obcych

	alkoholowy, bez posmaków obcych		
--	---------------------------------	--	--

Tabela 28. Jakość mikrobiologiczna próbek octu z gospodarstwa 2 w czasie jego dojrzewania (Strzelsok)

Parametr mikrobiologiczny	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
	Cykl 1		
[jtk/ml]			
liczba bakterii octowych	$4,7 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
Liczba drożdży	$1,4 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
Liczba pleśni	< 1	< 1	< 1
Cykl 2			
[jtk/ml]			
liczba bakterii octowych	$3,1 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
liczba drożdży	$1,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$
liczba pleśni	<1	< 1	< 1

Tabela 29. Parametry fizykochemiczne próbek octu z gospodarstwa 2 w czasie jego dojrzewania (Strzelsok)

Parametr fizykochemiczny	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
	Cykl 1		
Moc octu	0,6	1,6	3,2
alkohol	7,6	4,1	1,0
pH	3,34	3,10	2,90
Cykl 2			
Moc octu	0,7	2,5	4,20
alkohol	6,2	4,1	1,1
pH	3,42	3,11	2,43

Tabela 30 a. Ocena sensoryczna próbek octu z gospodarstwa 2 w czasie jego dojrzewania (Strzelsok) cykl 1

Parametr/Cecha	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
Klarowność	naturalnie mętny, z widocznym osadem		
Barwa	mleczno-żółta		
Zapach	umiarkowanie octowy, kwaskowy, lekko owocowy, lekko winny, lekko jabłkowy,	jabłkowy, winno-drożdżowy, ostry, lekko octowy, bez zapachów obcych	owocowy jabłkowy, lekko kwaskowy, zharmonizowany, bez zapachów

	bez zapachów obcych		obcych
Smak	typowy dla słabego, młodego octu jabłkowego, kwaśny, alkoholowy, wytrawny, lekko owocowy, winno-alkoholowy, bez posmaków obcych	kwaśny, owocowy, aromatyczny	owocowy jabłkowy, lekko kwaskowy bez zapachów obcych

Tabela 30 b. Ocena sensoryczna próbek octu z gospodarstwa 2 w czasie jego dojrzewania (Strzelsok) cykl 2

Parametr/Cecha	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
Klarowność	naturalnie mętny, z widocznym osadem		
Barwa	mleczno-żółta		
Zapach	umiarkowanie octowy, kwaskowy, lekko owocowy, lekko winny, lekko jabłkowy, bez zapachów obcych	jabłkowy, winno-drożdżowy, ostry, lekko octowy, bez zapachów obcych	owocowy jabłkowy, lekko kwaskowy, lekko miodowy, zharmonizowany, bez zapachów obcych
Smak	typowy dla słabego, młodego octu jabłkowego, kwaśny, alkoholowy, wytrawny, lekko owocowy, winno-alkoholowy, bez posmaków obcych	kwaśny, owocowy, aromatyczny	owocowy jabłkowy, lekko kwaskowy, lekko miodowy bez zapachów obcych

Uzyskane wyniki przyczyniły się do weryfikacji warunków technologicznych i umożliwiły opracowanie procesu o najwyższej wydajności. Przeprowadzono badanie jakościowe octu owocowego pod kątem zawartości substancji odżywczych i prozdrowotnych pasteryzowanego i niepasteryzowanego produktu.

Etap II Prowadzono badania przechowalnicze octu owocowego pasteryzowanego i niepasteryzowanego uzyskanego w pierwszym i drugim gospodarstwie rolnym/przetwórczym oraz monitorowano warunki w kolejnych cyklach produkcyjnych octu owocowego. Jednocześnie wdrażano innowacyjną technologię w trzecim i czwartym gospodarstwie poprzedzonym badaniami środowiskowymi.

- Przedsiębiorstwo Handlowo-Usługowe Daniel Byster z siedzibą w Rawie Mazowieckiej, Franopol (gospodarstwo rolne 3);

- Przedsiębiorstwo „Gorgol” Ireneusz Gorgol z siedzibą w Częstochowie (gospodarstwo rolne 4).

Oceniono warunki środowiskowe do wymogów higieny produkcji innowacyjnego produktu octu owocowego. Wykonano badania czystości powierzchni, rąk pracowników, powietrza i wody – w gospodarstwie oznaczonym jako 3 i 4.

Tabela 31. Monitoring czystości powierzchni produkcyjnych w gospodarstwie 3 (Byster)

Miejsce pobrania próbki	Liczba bakterii tlenowych mezofilnych na powierzchni [jtk/cm ²]	Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> na powierzchni [jtk/cm ²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm ²]
Fermentor na wino	0,26	0,06	0,00
Fermentor na ocet	0,14	0,00	0,08
Pracownik	0,10	0,00	0,04
Ściana w pomieszczeniu do fermentacji	0,04	0,00	0,04
Stół na hali produkcyjnej	0,12	0,00	0,00

Tabela 32. Monitoring czystości powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych w gospodarstwie 3 (Byster)

Miejsce pobrania próbki	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/m ³ powietrza]	Liczba drożdży i pleśni, [jtk/m ³ powietrza]
Pomieszczenie do fermentacji soku	4,2 x 10 ²	1,9 x 10 ¹
Hala produkcyjna	3,0 x 10 ¹	2,3 x 10 ¹

Tabela 33. Jakość mikrobiologiczna wody w gospodarstwie 3 (Byster)

Miejsce pobrania próbki	Liczba bakterii z grupy coli [jtk/100 ml]	Liczba <i>Escherichia coli</i> [jtk/100 ml]	Liczba enterokoków [jtk/100 ml]	Ogólna liczba kolonii w 22°C [jtk/ml]
Hala produkcyjna	0	0	0	0

Tabela 34. Monitoring czystości powierzchni produkcyjnych w gospodarstwie 4 (Gorgol)

Miejsce pobrania próbki	Liczba bakterii tlenowych mezofilnych na powierzchni [jtk/cm ²]	Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> na powierzchni [jtk/cm ²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm ²]
-------------------------	---	--	--

Fermentor na wino	0,36	0,04	0,00
Fermentor na ocet	0,28	0,00	0,28
Pracownik	0,20	0,00	0,24
Ściana w pomieszczeniu do fermentacji	0,08	0,00	0,06

Tabela 35. Monitoring czystości powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych w gospodarstwie 4 (Gorgol)

Miejsce pobrania próbki	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/m ³ powietrza]	Liczba drożdży i pleśni, [jtk/m ³ powietrza]
Pomieszczenie do fermentacji	5,6 x 10 ³	2,3 x 10 ¹

Tabela 36. Jakość mikrobiologiczna wody w gospodarstwie 4 (Gorgol)

Miejsce pobrania próbki	Liczba bakterii z grupy coli [jtk/100 ml]	Liczba <i>Escherichia coli</i> [jtk/100 ml]	Liczba enterokoków [jtk/100 ml]	Ogólna liczba kolonii w 22°C [jtk/ml]
Hala produkcyjna	0	0	0	0

Ponadto, prowadzono badania przechowalnicze w dwóch pierwszych gospodarstwach w odpowiednich odstępach czasowych. Wyniki badań jakości mikrobiologicznej, fizykochemicznej i organoleptycznej produktów finalnych były na stabilnym poziomie i nie zmieniały się w czasie przechowywania. Na podstawie wyników badań przechowalniczych ustalono warunki przechowywania octów rozlewanych do szklanych butelek (temperatura przechowywania 3±2°C, czas przechowywania niepasteryzowanych octów ok. 6 miesięcy). Równocześnie prowadzone było wdrażanie procesu technologicznego w drugim i trzecim gospodarstwie, zgodnie z opisaną wyżej innowacyjną technologią. Ze względu na fakt iż, gospodarstwo 4 zajmuje się produkcją win, przy udziale ras drożdży pochodzących z kolekcji IBPRS badania rozpoczęto od określenia parametrów jakościowych wina.

Tabela 37. Jakość mikrobiologiczna próbek soków jabłkowych z gospodarstwa 3 (Byster)

Parametr mikrobiologiczny	Cykl 1	Cykl 2
	[jtk/ml]	
Ogólna liczba drobnoustrojów	< 1	< 1
Liczba mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej	< 1	< 1
Liczba bakterii redukujących siarczany (IV) rosnących w warunkach beztlenowych	< 1	< 1

Liczba bakterii z grupy coli	< 1	< 1
Liczba <i>Escherichia coli</i>	< 1	< 1
Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> w temp. 37°C	< 1	< 1
Liczba gronkowców koagulazo-dodatnich (<i>S. aureus</i> i innych gatunków)	< 1	< 1
Liczba drożdży	< 1	< 1
Liczba pleśni	< 1	< 1

Tabela 38. Obecność patogenów w próbkach soków jabłkowych z gospodarstwa 3 (Byster)

Parametr mikrobiologiczny	Cykl 1	Cykl 2
Obecność <i>Salmonella</i> spp. 25 ml soku	nie wykryto	nie wykryto
Obecność <i>Listeria monocytogens</i> 25 ml soku	nie wykryto	nie wykryto

Tabela 39. Jakość fizykochemiczna próbek soków jabłkowych z gospodarstwa 3 (Byster)

Parametr fizykochemiczny	Cykl 1	Cykl 2
Zawartość ekstraktu ogólnego %	15,1	14,6
Zawartość cukrów ogółem % (m/m)	14,7	14,0
Zawartość cukrów redukujących % (m/m)	13,5	13,0
Zawartość sacharozy % (m/m)	1,2	1,1
Kwasowość ogólna w przeliczeniu na kwas cytrynowy, g/100ml	0,22	0,19
Wartość pH	3,93	3,84
Zawartość witaminy C mg/100 ml	1,18	1,21

Podobnie jak w gospodarstwie 1 i 2 monitorowano parametry fizykochemiczne i mikrobiologiczne w półprodukcie w trakcie fermentacji alkoholowej w gospodarstwie 3 i 4.

Tabela 40 a. Monitoring mikrobiologiczny półproduktu z gospodarstwa 3 (Byster) cykl 1

Parametr mikrobiologiczny	Czas fermentacji [tygodnie]			
	0	1	2	3
	[jtk/ml]			
Ogólna liczba drobnoustrojów	$8,7 \times 10^6$	$9,5 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
Liczba drożdży	$9,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
Liczba pleśni	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabela 40 b. Monitoring mikrobiologiczny półproduktu z gospodarstwa 3 (Byster) cykl 2

Parametr mikrobiologiczny	Czas fermentacji [tygodnie]			
	0	1	2	3
	[jtk/ml]			

Ogólna liczba drobnoustrojów	$6,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$
Liczba drożdży	$7,1 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
Liczba pleśni	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabela 41. Jakość mikrobiologiczna półproduktu z gospodarstwa 4 (Gorgol)

Parametr mikrobiologiczny	[jtk/ml]
Ogólna liczba drobnoustrojów	$1,1 \times 10^3$
Liczba drożdży	$1,3 \times 10^3$
Liczba pleśni	< 1

Tabela 42. Zmiany parametrów fizykochemicznych półproduktu z gospodarstwa 3 (Byster)

Parametr fizykochemiczny	Czas fermentacji [tygodnie]					
	1	2	3	1	2	3
	Cykl 1			Cykl 2		
Zawartość alkoholu	2,6	6,8	9,3	2,7	5,9	8,8
pH	3,53	3,91	3,77	3,58	3,97	3,72
Zawartość cukrów ogółem, % (m/m)	7,94	5,4	0,1	8,91	5,1	0,02

Tabela 43. Parametry fizykochemiczne półproduktu z gospodarstwa 4 (Gorgol)

Parametr fizykochemiczny	
Zawartość alkoholu	9,8
pH	3,84
Zawartość cukrów ogółem, % (m/m)	0,3

Tabela 43. Ocena sensoryczna próbek wina z gospodarstwa 3 (Byster)

Parametr/Cecha	Cykl 1
Klarowność	Mętny, lekko zawieszisty
Barwa	kremowo- słomkowa

Zapach	lekko alkoholowy, jabłkowy, kwaskowy
Smak	wyrazisty, owocowy, jabłkowy, alkoholowy, kwaśny, mało słodki, wytrawny
Parametr/Cecha	Cykl 2
Klarowność	Mętny, lekko zawiesisty,
Barwa	słomkowo- beżowa,
Zapach	lekko alkoholowy, jabłkowy, kwaskowy, świeży
Smak	świeży, jabłkowy, umiarkowanie alkoholowy, kwaśny, mało słodki, wytrawny, wyczuwalny bukiet aromatyczny

Tabela 44. Ocena sensoryczna próbek wina z gospodarstwa 4 (Gorgol)

Parametr/Cecha	Cykl 1
Klarowność	Mętny, lekko zawiesisty
Barwa	Ciemno czerwona z odcieniem fioletu
Zapach	lekko alkoholowy, kwaskowy, winny
Smak	wyrazisty, owocowy, winogronowy, alkoholowy, kwaśny, mało słodki, wytrawny

Tabela 45. Jakość mikrobiologiczna próbek octu z gospodarstwa 3 w czasie jego dojrzewania (Byster)

Parametr mikrobiologiczny	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
		Cykl 1	
	[jtk/ml]		
liczba bakterii octowych	$5,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$
Liczba drożdży	$1,2 \times 10^4$	$6,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$
Liczba pleśni	< 1	< 1	< 1
	Cykl 2		
	[jtk/ml]		
liczba bakterii octowych	$7,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$
liczba drożdży	$2,9 \times 10^4$	$9,9 \times 10^3$	$7,9 \times 10^3$
liczba pleśni	<1	< 1	< 1

Tabela 46. Parametry fizykochemiczne próbek octu z gospodarstwa 3 w czasie jego dojrzewania (Byster)

Parametr fizykochemiczny	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
		Cykl 1	

Moc octu	0,4	1,2	4,4
alkohol	6,15	3,9	1,2
pH	3,72	3,40	2,7
Cykl 2			
Moc octu	0,6	1,5	4,5
alkohol	6,22	3,5	1,0
pH	3,74	3,27	2,6

Tabela 47 a. Ocena sensoryczna próbek octu z gospodarstwa 3 w czasie jego dojrzewania (Byster) cykl 1

Parametr/Cecha	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
Klarowność	naturalnie mętny, z widocznym osadem		
Barwa	mleczno-żółta		
Zapach	umiarkowanie octowy, kwaskowy, lekko owocowy, lekko winny, lekko jabłkowy, miodowy bez zapachów obcych	jabłkowy, winno-drożdżowy, ostry, lekko octowy, miodowy, bez zapachów obcych	owocowy jabłkowy, lekko kwaskowy, miodowo-orzechowy, zharmonizowany, bez zapachów obcych
Smak	typowy dla słabego, młodego octu jabłkowego, kwaśny, alkoholowy, wytrawny, lekko owocowy, winno-alkoholowy, bez posmaków obcych	kwaśny, owocowy, aromatyczny, miodowy, bez posmaków obcych	owocowy jabłkowy, lekko kwaskowy, miodowo-orzechowy bez posmaków obcych

Tabela 47 b. Ocena sensoryczna próbek octu z gospodarstwa 3 w czasie jego dojrzewania (Byster) cykl 2

Parametr/Cecha	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
Klarowność	naturalnie mętny, z widocznym osadem		
Barwa	mleczno-żółta		
Zapach	umiarkowanie octowy, kwaskowy, lekko owocowy,	jabłkowy, winno-drożdżowy, ostry, lekko octowy,	owocowy jabłkowy, lekko kwaskowy,

	lekko winny, lekko jabłkowy, miodowy bez zapachów obcych	miodowy, bez zapachów obcych	miodowo-orzechowy, zharmonizowany, bez zapachów obcych
Smak	typowy dla słabego, młodego octu jabłkowego, kwaśny, alkoholowy, wytrawny, lekko owocowy, winno-alkoholowy, bez posmaków obcych	kwaśny, owocowy, aromatyczny, miodowy, bez posmaków obcych	owocowy jabłkowy, lekko kwaskowy, miodowo-orzechowy bez posmaków obcych

Tabela 48. Parametry fizykochemiczne próbek octu z gospodarstwa 4 w czasie jego dojrzewania (Gorgol)

Parametr fizykochemiczny	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
Moc octu	0,8	2,3	4,7
pH	3,79	3,5	2,6
Zawartość alkoholu	6,74	4,3	0,9

Tabela 49. Ocena sensoryczna próbek octu z gospodarstwa 4 w czasie jego dojrzewania (Gorgol)

Parametr/Cecha	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach
Klarowność	naturalnie mętny, z widocznym osadem		
Barwa	czerwona		
Zapach	umiarkowanie octowy, kwaskowy, lekko owocowy, lekko winny, bez zapachów obcych	winno-drożdżowy, ostry, lekko octowy, bez zapachów obcych	owocowy lekko kwaskowy, ostry, zharmonizowany, bez zapachów obcych
Smak	typowy dla słabego, młodego octu winnego, kwaśny, alkoholowy, wytrawny, lekko owocowy, winno-	kwaśny, owocowy, aromatyczny	owocowy lekko kwaskowy, ostry, bez zapachów obcych

	alkoholowy, bez posmaków obcych		
--	------------------------------------	--	--

Etap III Badania przechowalnicze octu owocowego pasteryzowanego i niepasteryzowanego uzyskanego w pierwszych trzech gospodarstwach oraz pomoc i kontrola przy kolejnych cyklach produkcyjnych octu owocowego z jednoczesnym wdrażaniem innowacyjnej technologii w gospodarstwie oznaczonym jako gospodarstwo 4.

Badania przechowalnicze wykonywane były w odpowiednich odstępach czasowych. Czas prowadzonych badań przechowalniczych uzależniony był od stanu mikrobiologicznego, cech fizykochemicznych i organoleptycznych pasteryzowanego i niepasteryzowanego produktu finalnego.

W dalszej części etapu III prowadzono nadzór i kontrole przy kolejnych cyklach produkcyjnych octu owocowego w ww. czterech gospodarstwach rolnych/przetwórczych.

Kompleksowe badania octów owocowych, po zakończonych badaniach przechowalniczych, potwierdziły niepowtarzalną jakość, funkcjonalność oraz różnorodność w zależności od regionu, zastosowanych odmian owoców oraz sposobu nawożenia i stosowanego oprysku.

Octy jabłkowe zawierały wiele minerałów i witamin takich jak potas, sód, magnez, fluor, chlor, żelazo, miedź, fosfor, krzem, witaminę A, witaminy z grupy B, C, E, P i beta-karoten, kwas octowy, kwas mlekowy, cytrynowy, katechinę.

Ocet z czerwonych winogron był bogaty w kwasy organiczne (kwas octowy, kwas mlekowy, cytrynowy, winowy), witaminy (A, C, B1, B2, PP, E i K), pektyny, mikrośladowki (cynk, fluor, fosfor, jod, magnez, mangan, miedź, potas, selen, sód, wapń i żelazo), oraz związki polifenolowe - a wśród nich cenne antyoksydanty: procyanidyny i resweratrol.

*** Wszystkie powyżej zamieszczone wyniki są średnią badań, wykonanych w pięciu powtórzeniach.**

6. PODSUMOWANIE

Podjęty temat badawczo- wdrożeniowy, dotyczący przetworzenia soku owocowego w ocet owocowy, jako innowacyjna technologia, został zrealizowany zgodnie z założeniami projektu i wdrożony w czterech jednostkach produkcyjnych:

- Gospodarstwo sadownicze MB Monika Bankiewicz (Komorów 4, 26-432 Wieniawa)
- „Strzelsok” Jarosław Strzelecki (Palinek 9, 96-111 Kowiesy)
- Przedsiębiorstwo Handlowo-Usługowe Daniel Byster (Franopol 3, 96-200 Rawa Mazowiecka)

- Ireneusz Gorgol Firma "GORGOL" (ul. Kmicica 37, 42-202 Częstochowa).

Monitoring mikrobiologiczny czystości wykazał, iż we wszystkich gospodarstwach konsorcjantów stan sanitarno-higienicznego środowiska produkcji był bardzo dobry. Badania ukierunkowane na wykrywanie i oznaczanie liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, stosowane do oceny stanu sanitarno-higienicznego oraz stopnia zanieczyszczenia kałowego powierzchni urządzeń, linii technologicznych, rąk pracowników oraz surowca, którymi były soki nie wykazały obecności tej rodziny bakterii. W żadnej z analizowanych w zakresie wykrywania i oznaczania liczby *E. coli*- wskaźnika poziomu higieny w produkcji żywności próbek soków nie wykazano obecności tego patogenu. Również pobrane z gospodarstw próbki wody, spełniały wymagania rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. z 2017 r. poz. 2294).

Ważną grupę drobnoustrojów w higienie żywności stanowią tzw. beztlenowe laseczki przetrwalnikujące rodzaju *Clostridium*. W obrębie tego rodzaju znajduje się między innymi gatunek: *Clostridium botulinum* odpowiedzialny za produkcję toksyn botulinowych oraz *Clostridium perfringens* ważny z punktu widzenia toksykoinfekcji zwierząt i zatruc pokarmowych człowieka. Wszystkie przeanalizowane próbki soków były również wolne od tych patogenów.

Przebadano soki, użyte do pierwszego etapu fermentacji (alkoholowej). Różniły się one zawartością cukrów oraz innych składników odżywczych.

Pozyskane półprodukty do produkcji octów, różniły się zawartością alkoholu jego zawartość dochodziła do 9,8.

Otrzymane octy owocowe: jabłkowy i winogronowy, różniły się mocą octu, walorami sensorycznymi oraz ilością bakterii kwasu octowego. Zawartość witaminy C kształtowała się na poziomie od 0,72 mg/100 ml do 0,95 mg/100 ml.

Zdecydowanie więcej substancji odżywczych zawierały tzw. „żywe” octy owocowe, niepasteryzowane, w których w trakcie dojrzewania octu, wykrywano żywe bakterie kwasu octowego.

Otrzymane wyniki badań wykazały, że jest możliwe wdrożenie innowacyjnej technologii wytwarzania octu owocowego metodą dwufazową w każdym z wymienionych gospodarstw, wykorzystując mikroorganizmy z kolekcji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-spożywczego i technologię przygotowaną przez pracowników naukowych IBPRS. W badaniach wykorzystano specjalne rasy drożdży do produkcji wina i bakterie octowe, do przetworzenia wina w ocet owocowy. Ocet produkowano z soku jabłkowego i winogronowego, przy wykorzystaniu linii do tłoczenia soków, opracowanej przez pracowników IBPRS.

W prowadzonych badaniach przedsiębiorcy-rolnicy ściśle współpracowali z pracownikami naukowymi IBPRS, którzy pomagali w przygotowaniach pomieszczeń technologicznych, doborze niezbędnych urządzeń zarówno do fermentacji alkoholowej jak i fermentacji octowej

oraz monitorowali ściśle przestrzeganie założonych warunków technologicznych procesu podczas dwufazowej fermentacji, ze szczególnym uwzględnieniem kwestii bezpieczeństwa i higieny produkcji.

U każdego rolnika/przedsiębiorcy, sposób wdrażania technologii był potraktowany bardzo indywidualnie. Wynikało to ze specyfiki użytego surowca czy warunków dla prowadzenia procesu. Wdrażanie technologii produkcji octu dostosowano do możliwości każdego zakładu. Wymagało to odpowiedzialności i zaangażowania wszystkich biorących udział w realizacji przedsięwzięcia. Każdy rolnik realizował swój zamierzony cel pod nadzorem technologicznym pracowników IBPRS, co wymagało nie tylko kontaktu on line ale również systematycznej, bezpośredniej kontroli procesu przez wdrażających. Duże zróżnicowanie właściwościami jakościowych soków (jakość mikrobiologiczna, zawartość cukrów, pH i innych składników odżywczych) u każdego z wdrażających, wymagało dostosowania warunków procesu fermentacji, a nawet odpowiednich szczepów mikroorganizmów.

Gospodarstwo sadownicze MB Monika Bankiewicz – proces produkcji prowadzono w przystosowanych zbiornikach do magazynowania soku. Wykonano niezbędne oprzyrządowanie we wszystkie potrzebne elementy do prowadzenia dwu fermentacji. Podczas tych procesów kontrolowano wiele wskaźników technologicznych i otrzymano ocet jabłkowy o bardzo złożonym bukacie smakowym i aromacie. Po otrzymaniu gotowego produktu został on poddany ocenie organoleptycznej i został bardzo pozytywnie oceniony. W gospodarstwie poddano procesom fermentacji większe ilości soku (ok. 5000 l), a uzyskany ocet jabłkowy uzyskał akceptację konsumentów.

„Strzelsok” Jarosław Strzelecki -u drugiego producenta, produkcję octu, realizowano w zbiornikach, które w pierwszym etapie produkcji, były wykorzystane do produkcji wina. Zostało wydzielone odpowiednie pomieszczenie z klimatyzacją, gdzie realizowano wdrożenie technologii. Podobnie, jak u rolnika pierwszego, również w tym przypadku, wytworzony ocet miał duże zainteresowanie konsumentów i producent już rozpoczął zwiększenie produkcji octu owocowego z wykorzystaniem innych soków owocowych.

Przedsiębiorstwo Handlowo-Usługowe Daniel Byster - u kolejnego producenta produkcję octu realizowano, które w pierwszym etapie produkcji, były wykorzystane do produkcji wina. Zostało wydzielone odpowiednie pomieszczenie z klimatyzacją, gdzie realizowano wdrożenie technologii. Również, w tym przypadku wytworzony ocet był bardzo pożądanym przez konsumentów i producent już rozpoczął zwiększenie produkcji. Ocet charakteryzował się bardzo ciekawym bukietem smakowym i aromatem co wynikało, z zastosowania do produkcji octu, odpowiedniej odmiany jabłek.

Ireneusz Gorgol Firma "GORGOL" – u kolejnego producenta dokonano produkcji octu z produkowanych win gronowych. Początkowo, obserwowano trudności w uaktywnieniu bakterii octowych, ponieważ producent konserwował wino składnikami chemicznymi, o czym nie poinformował pracowników IBPRS. Po przeprowadzeniu odpowiednich badań, dopracowano technologię fermentacji. Uzyskany ocet winogronowy, charakteryzował się

brunatno-czerwoną barwą oraz bardzo wysoką smakowitością i wyjątkowym bukietem zapachowym

7. WNIOSKI

1. Opracowano i wdrożono do produkcji, u każdego z rolników, innowacyjny produkt– ocet owocowy, przy wykorzystaniu innowacyjnej technologii produkcji octu owocowego z zastosowaniem lokalnych szczepów mikroorganizmów, umożliwiającej otrzymanie bioróżnorodnego produktu o potencjalnych walorach prozdrowotnych. Wytworzone octy owocowe są innowacyjnym produktem, pozbawionym chemicznych konserwantów, a zawierają jedynie naturalne metabolity drobnoustrojów. Produkt końcowy charakteryzuje się wysoką jakością i wartością żywieniową, bezpieczeństwem oraz powtarzalnością cech sensorycznych, mikrobiologicznych i fizykochemicznych.

2. Wykorzystanie opracowanej w IBPRS dwufazowej technologii fermentacji do produkcji octu w gospodarstwach rolniczych, jest właściwym rozwiązaniem zagospodarowania nadwyżek soku owocowego. Jest to technologia o niskim zapotrzebowaniu energetycznym, pozwalająca na wytwarzanie octu z soku surowego i pasteryzowanego o różnym poziomie cukru.

3. Zastosowanie drożdży i bakterii octowych z kolekcji IBPRS, pozwoliło otrzymać gotowy produkt o odpowiednich właściwościach sensorycznych i biologicznych. Trwałość przechowalnicza jest wysoka i wynosi, dla octu niepasteryzowanego, średnio ok. 6-8 miesięcy i zależy od uzyskanej mocy octu, a ten parametr zależy od poziomu cukru w użytym soku i wytworzonego w etapie pierwszej fazy fermentacji, alkoholu.

4. Do powtarzalności procesu pozyskanie innowacyjnego produktu jakim jest ocet owocowy, należy wykorzystać odpowiednie rasy drożdży i odpowiednie szczepy bakterii octowych.

5. Z dostępnych wyników badań, opisywanych w literaturze oraz uzyskanych wyników własnych, możemy wnioskować o wysokiej wartości biologicznej octu owocowego, pozyskanego w wyniku wdrożenia innowacyjnej technologii. Kwasy: octowy, cytrynowy, mlekowy, bursztynowy, jabłkowy, enzymy, pektyny oraz przeciwutleniające związki fenolowe (kwas galusowy, kawowy, chlorogenowy, katechiny, epikatechiny) są substancjami o potwierdzonych walorach prozdrowotnych. Ponadto octy owocowe zawierają niezbędne we wszystkich procesach życiowych składniki, takie jak: aminokwasy, pierwiastki mineralne (żelazo, fluor, potas, wapń, miedź, magnez, sód, fosfor, siarkę, krzem) oraz witaminy: z grupy B, C, E, P czy prowitaminę beta-karoten. Uzyskane produkty można charakteryzować jako żywność minimalnie przetworzoną, funkcjonalną o bogatych właściwościach prozdrowotnych.

6. Opracowana innowacyjna technologia przyczyni się do zwiększenia stopnia wykorzystania lokalnych soków owocowych, wpłynie na dywersyfikację w gospodarstwach rolnych oraz wzrost dochodowości. Technologia i jej wdrożenie nie wymaga wysokich nakładów, może

być zrealizowana w gospodarstwach indywidualnych rolników i mikro- lub małych przetwórcach, także ekologicznych.

7. Innowacyjny produkt nie zawiera chemicznych konserwantów, a jedynie naturalne metabolity drobnoustrojów. Charakteryzuje się wysoką jakością i wartością żywieniową, bezpieczeństwem oraz powtarzalnością cech sensorycznych, mikrobiologicznych i fizykochemicznych.

8. Ocet owocowy, którego technologia została opisana w sprawozdaniu, jest produktem o powtarzalnych cechach odżywczych i sensorycznych. Na podstawie analizy rynku nie udało się znaleźć producentów octu owocowego, korzystających ze scharakteryzowanych pod względem cech biochemicznych i właściwości prozdrowotnych kultur mikroorganizmów rodzimego pochodzenia. Dlatego też, zastosowanie takich drobnoustrojów wprowadziło technologiczną innowacyjność w produkcji octu owocowego.

9. Uzyskane wyniki pozwalają ocenić octy owocowe jako napoje o wysokiej jakości prozdrowotnej. Niska kwasowość umożliwia spożywanie octów bez uprzedniego ich rozтворzenia w wodzie. Dzięki temu, cenne składniki są dostarczane do organizmu konsumenta, w postaci nie rozcieńczonej i w sposób naturalny obniżane jest pH soku żołądkowego. Naturalna mętność octów, z widocznym osadem świadczy o obecności pektyn, które wpływają na regulację cukru we krwi oraz wchłanianie cholesterolu i metali ciężkich. Wysoka liczba bakterii octowych wskazuje na występowanie żywej aktywnej „matki octowej”.

Konsorcjanci, dzięki realizacji projektu mają wiedzę, że chcąc wyprodukować dobry ocet nie należy nadużywać środków chemicznych w ochronie soku czy nawet owoców w końcowej fazie dojrzewania.

8. LITERATURA

1. Antolak H., Kręgiel D.: Bakterie kwasu octowego – istotne zagrożenie w przemyśle spożywczym. *Przemysł Spoż.*, 2014, **68**, 12-16.
2. Antolak H., Kręgiel D.: Bakterie kwasu octowego- taksonomia, ekologia oraz wykorzystanie przemysłowe. *ŻYW. Nauka. Technol. Jakość*, 2015, 4 (101), 21-35.
3. Antolak H.: Kwas octowy składnik żywności funkcjonalnej. *Przemysł Spoż.*, 2015, 69(9), 41-44.
4. Czuba J.: Octownictwo. Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Warszawa 1986; 101-103.
5. Jeszka M., Flaczyk E., Kobus-Cisowska J., Dziedzic K.: Związki fenolowe- charakterystyka i znaczenie w technologii żywności. *Nauka Przyr. Technol.*, 2010, 4(2), 2-13.
6. Neffe-Skocińska K., Dybka-Stępień K., Hubert Antolak H. Izolacja i identyfikacja szczepów bakterii kwasu octowego o potencjalnych właściwościach prozdrowotnych. *ŻYW. Nauka. Technol. Jakość*, 2019, 26, 3 (120), 183-195.
7. Kowalska H., Lenart A., Marzec A., Kowalska J., Samborska K., Żebrowska M.A.: Wykorzystanie produktów prozdrowotnych i suplementów diety w insulino-oporności. *Post. Tech. Przetw. Spoż.*, 2017, **2**, 46-55.