

# **INSTYTUT BIOTECHNOLOGII PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO- PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**

im. prof. Waława Dąbrowskiego  
Warszawa, ul. Rakowiecka 36

---

---

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

Raport z realizacji projektu pt:

„Innowacja technologiczna, procesowa i produktowa w zakresie wytwarzania spersonalizowanych serów twarogowych o zwiększonych właściwościach prozdrowotnych we współpracy z Instytutem Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego”

nr umowy 00060.DDD.6509.00037.2019.13 z dnia 20.10.2021 r.

grupy operacyjnej: „Spersonalizowane Sery Twarogowe”

Koordynator: dr Beata Bartodziejska, Zakład Jakości Żywności  
Wykonawcy: dr inż. Anna Szosland-Fałtyn, dr Beata Paziak-Domańska, mgr Anna Stanisławska, mgr inż. Milena Krępska, mgr inż. Andrzej Cis, mgr inż. Iwona Kasprzyk, dr nauk med. Magdalena Gajewska, mgr inż. Agnieszka Kasperska, mgr inż. Renata Rybicka, tech. Agnieszka Kaźmierczak, mgr Magdalena Malinowska, inż. Agnieszka Zwierzyńska, Tomasz Gonera, mgr Nikola Maciejewska, mgr Olga Sęczkowska, dr Patrycja Olejarz, dr inż. Piotr Szymański, mgr inż. Jakub Kern-Jedrychowski, mgr inż. Dorota Grzeszczak, mgr inż. Magdalena Skorupska, mgr inż. Urszula Siekierko, dr inż. Anna Łepecka, dr inż. Anna Okoń, mgr Agnieszka Malitka

**Konsultant naukowy: prof. dr hab. inż. Zbigniew Dolatowski**

Termin realizacji: 10.2021-10.2023

## **Spis treści:**

1. Wprowadzenie
2. Cel operacji
3. Zakres prac
4. Metodyka prac
5. Uzyskane wyniki
6. Podsumowanie i wnioski
7. Literatura

## 1. WPROWADZENIE

Mikrobiota jelitowa człowieka, nazywana również „super organizmem” drobnoustrojowym lub „dodatkowym narządem”, składa się z bilionów bakterii, archeonów, eukariontów oraz wirusów. Ten „superorganizm” pełni bardzo istotne funkcje w ciele człowieka, tj.: wspomaga trawienie i wchłanianie pokarmu, wytwarza witaminy i składniki odżywcze, metabolizuje błonnik do bioaktywnych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA z ang. short chain fatty acid), utrzymuje integralność jelit, napędza dojrzewanie układu odpornościowego w okresie niemowlęcym, wpływa na utrzymanie równowagi układu immunologicznego przez całe życie, a także bezpośrednio i pośrednio chroni przed patogenami. Dokładne zrozumienie roli drobnoustrojów jelitowych jest bardzo trudne, z uwagi na ich wysoki stopień zróżnicowania oraz zmienności. Niedawne badania ujawniły, że na skład drobnoustrojów jelitowych mają wpływ różnice: międzyosobnicze, geograficzne, rasowe, wiekowe oraz te związane ze stylem życia (dieta, przyjmowane leki). Co więcej, stany chorobowe takie jak np.: otyłość, cukrzyca oraz choroba zapalna jelit, są również skorelowane ze zmianami w składzie mikrobioty jelitowej [Ragonnaud i Biragyn, 2021, Białecka-Dębek i in. 2021].

Na prawidłową kolonizację bakteryjną przewodu pokarmowego mają wpływ już czynniki prenatalne (zdrowe nawyki matki w czasie ciąży), a także rodzaj porodu (poród naturalny), sposób karmienia (karmienie piersią) oraz przyjmowane leki (np. brak ekspozycji matki na antybiotyki). Na mikrobiotę niemowlęcia, która jest bardzo niestabilna, mają wpływ również inne aspekty, takie jak: wiek, podłoże genetyczne oraz tradycje geograficzne i kulturowe. Przez pierwszy rok życia dziecka, w jego przewodzie pokarmowym zdecydowanie dominuje rodzaj *Bifidobacterium* (typ *Actinobacteria*). W wieku około trzech lat drobnoustroje jelitowe stabilizują się i stają stopniowo zróżnicowane. Mikrobiota jelitowa dorosłego człowieka jest stabilniejsza niż dzieci i jest zdominowana przez typy *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Zmiany w składzie i zróżnicowaniu drobnoustrojów jelitowych dzieją się nieustannie od urodzenia aż do śmierci, a mikrobiota jelitowa osób starszych staje się ponownie mniej stabilna i mniej zróżnicowana, na co mogą mieć wpływ zmiany w stylu życia, metabolizmie, sposobie żywienia, stosowanie odpowiednich leków oraz wzrost zachorowań na choroby związane z wiekiem [Ma i in. 2021, Ragonnaud i Biragyn 2021].

Bifidobakterie należą do jednego z głównych rodzajów bakterii w przewodzie pokarmowym człowieka, najliczniej występującym u niemowląt i malejącym wraz z wiekiem. Bakterie te są beztlenowymi, nieruchliwymi, Gram-dodatnimi i nie tworzącymi

przetrwaliaków pałeczkami [Chen i in. 2021]. Ich obecność w przewodzie pokarmowym jest powiązana z wieloma korzyściami zdrowotnymi, np. takimi jak łagodzenie objawów u pacjentów z nietolerancją laktozy, zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków oraz wynikającej z zakażeń *Clostridium difficile*, łagodzenie objawów zespołu jelita drażliwego, czy też zmniejszanie częstości występowania egzemy. Wykazano, że drobnoustroje z rodzaju *Bifidobacterium* spp., mogą hamować rozwój patogenów, poprzez wytwarzane metabolity, takie jak kwasy organiczne, peptydy przeciwbakteryjne, inhibitory quorum-sensing oraz poprzez immunomodulacje [Hemalatha i in. 2017]. SCFA wytwarzane przez mikrobiotę jelitową na drodze fermentacji, mają istotny wpływ na zdrowie jelit, a ich nieodpowiednia ilość jest powiązana z wieloma schorzeniami. Suplementacja probiotykami z rodzaju *Bifidobacterium* spp. zwiększa ilość wydalanego octanu oraz propionianu, które są jednymi z głównych SCFA, wpływających na prawidłowe funkcjonowanie jelit [Hemalatha i in. 2017, Lee i in. 2017].

Od pewnego czasu wiadome jest, że mikrobiota jest wysoce spersonalizowana i istnieją znaczące różnice wśród osób z różnych regionów geograficznych i grup etnicznych. Przeprowadzono badania różnorodności mikrobioty jelitowej wśród różnych grup etnicznych na poziomie gatunków *Bifidobacterium* spp. Podczas tych badań, stwierdzono znaczące różnice w wielkości i rozpowszechnieniu populacji drobnoustrojów z gatunku *B. catenulatum*, pomiędzy mikrobiotą osób mieszkających w Belgii, a mikrobiotą osób pochodzących z Japonii, mimo że ogólna wielkość populacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. w obydwu tych grupach była taka sama [Ishikawa i in. 2013]. W badaniach przeprowadzonych pomiędzy różnymi populacjami europejskimi, zaobserwowano u populacji włoskiej od dwu- do trzykrotnie wyższe proporcje bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp., niż w populacjach niemieckiej, francuskiej i szwedzkiej. Przynależność geograficzna oraz różnice w diecie, między różnymi populacjami, były związane z różnicami w składzie mikrobioty jelitowej [Mueller i in. 2006].

Bakterie fermentacji mlekowej są jednymi z najczęściej występujących drobnoustrojów w żywności, szczególnie w przemyśle mleczarskim, w postaci kultur startowych. Wykorzystuje się je również w innych branżach przemysłu spożywczego: np. do produkcji kiszonek, produktów zbożowych, napojów alkoholowych, a także w przemyśle paszowym i przetwórstwie domowym [Jurkowski i Błaszczuk 2012, Gajewska i Błaszczuk 2012]. Do bakterii kwasu mlekowego należą Gram-dodatnie, katalazo-ujemne ziarniaki lub pałeczki, które nie tworzą przetrwalników i w większości nie są ruchliwe. Są mezofilami lub

termofilami, o wysokich wymaganiach odżywczych. Rosną w warunkach mikroaerofilnych lub beztlenowych na odpowiednim podłożu odżywczym. Wchodzą w skład zwierzęcej mikrobioty i dlatego obecne są w surowym mleku [Jurkowski i Błaszczuk 2012, Gajewska i Błaszczuk 2012, Ziarno 2007a, Ziarno 2007b]. Na mikrobiotę mleka składają się te, należące do gatunków takich jak: *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* [Ziarno 2007a]. Bakterie fermentacji mlekowej odpowiadają za zjawisko spontanicznej fermentacji mleka, która jest enzymatycznym procesem przemiany sacharydów do kwasu mlekowego. Ze względu na liczbę produktów powstających w procesie fermentacji możemy podzielić je na trzy grupy: bezwzględnie homofermentatywne (fermentujące heksozy do kwasu mlekowego), względnie heterofermentatywne (fermentujące heksozy do kwasu mlekowego i pentozy do kwasu mlekowego, kwasu octowego, etanolu i dwutlenku węgla) i bezwzględnie heterofermentatywne (fermentujące pentozy do kwasu mlekowego, kwasu octowego, etanolu i dwutlenku węgla). Do bakterii bezwzględnie homofermentatywnych zaliczamy bakterie z rodzaju *Lactococcus* spp. i *Streptococcus* spp. (np. *Streptococcus thermophilus*) oraz niektóre gatunki z rodzaju *Lactobacillus* sp. (np. *Lactobacillus acidophilus*). Natomiast do bakterii względnie heterofermentatywnych zaliczamy przede wszystkim bakterie z rodzaju *Lactococcus* spp. (np. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) oraz *Lacticaseibacillus casei*. Bakterie bezwzględnie heterofermentatywne reprezentowane są przez rodzaj *Leuconostoc* spp. oraz *Levilactobacillus brevis* [Kołakowski i in. 2013, Jurkowski i Błaszczuk 2012, Gajewska i Błaszczuk 2012, Ziarno 2007a, Ziarno 2007b].

Bakterie fermentacji mlekowej pełnią szereg funkcji w przemyśle spożywczym. Są one wykorzystywane m.in. do produkcji na skalę przemysłową metabolitów takich jak: kwas mlekowy (*Lacticaseibacillus casei*), dekstran (*Leuconostoc mesenteroides* spp. *dextranicus*), czy nizyna (*Lactococcus lactis*) [Jurkowski i Błaszczuk 2012, Gajewska i Błaszczuk 2012]. Ich metabolity są naturalnymi konserwantami żywności. Niektóre z nich, wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe, a należą do nich niskocząsteczkowe związki i peptydy, tj.: kwasy organiczne, nadtlenuk wodoru, bakteriocyny, diacetyl i reuteryna [Kołakowski i in. 2013, Ziarno i Godlewska 2008, Ziarno 2007b]. W przemyśle mleczarskim LAB odgrywają ogromną rolę w kreowaniu cech sensorycznych i reologicznych produktów m.in. dzięki nagromadzeniu kwaśnych końcowych produktów metabolizmu (np. kwas mlekowy), czy

bakteryjnej aktywności proteiny i peptydazy. Bakterie mlekowe są producentami związków aromatycznych takich jak aldehyd octowy, diacetyl oraz innych lotnych lub gazowych metabolitów (dwutlenek węgla, etanol), wpływając w ten sposób na walory sensoryczne serów [Johnson 2017, Kołakowski i in. 2013, Garbowska i Pluta 2014, Gajewska i Błaszczuk 2012, Ziarno i Godlewska 2008, Ziarno 2007b].

Konsumpcja sfermentowanych wyrobów mlecznych jest powiązana z wieloma korzyściami zdrowotnymi [Dimidi i in. 2019, Castellone i in. 2021]. Spośród szerokiego wachlarza korzyści prozdrowotnych związanych ze spożywaniem mlecznych produktów fermentowanych możemy wyróżnić m.in. działanie immunomodulujące, przeciwalergiczne, antydepresyjne, zapobieganie otyłości a także zmniejszanie ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych [Marco i in. 2017, Mathur i in. 2020]. Pomimo wielu zalet bakterii mlekowych tylko nieliczne mogą być uznane za probiotyki [Jurkowski i Błaszczuk 2012, Gajewska i Błaszczuk 2012].

Bakterie probiotyczne od wielu lat są powszechnie badane w celu leczenia oraz zapobiegania wystąpienia chorób autoimmunologicznych, np. atopowego zapalenia skóry [Rautava i in. 2002]. W badaniach przeprowadzonych na populacji dzieci fińskich, udowodniono działanie suplementacji *Lactobacillus* GG (LGG) na zmniejszenie częstości występowania chorób atopowych. Doświadczenia te na przestrzeni lat zostały przeprowadzone kilkakrotnie, z niewielkimi zmianami schematu badań, jednak ogólna zasada była zachowana podczas każdego z nich. Probiotyk był podawany matkom w czasie trwania ciąży oraz podczas karmienia piersią, a po narodzinach dodatkowo był aplikowany również dzieciom. Wyniki wykazały, że przyjmowanie probiotyków w okresie pre- i postnatalnym znacznie zmniejszyło częstość występowania choroby atopowej u dzieci [Kalliomäki i in. 2001, 2003, 2007, Rautava i in. 2002]. Z kolei w badaniach przeprowadzonych w Niemczech, zachowując schemat eksperymentu bardzo zbliżony do badań klinicznych fińskich, wykazano brak pozytywnego wpływu suplementacji LGG na zmniejszenie częstości występowania chorób atopowych. Co więcej, zaobserwowano statystycznie wyższe ryzyko wystąpienia zapalenia oskrzeli u grupy osób przyjmujących probiotyk, w porównaniu do grupy noworodków przyjmujących placebo. Badania te poparły hipotezę wysuniętą przez autorów, że podatność na probiotyki może się różnić między poszczególnymi osobami z powodu różnic w podłożu genetycznym [Kopp i in. 2008].

Wyraźny związek między różnorodnością genomową pałeczek kwasu mlekowego, a ich gospodarzami oraz siedliskami, sugeruje, że adaptacja do konkretnej niszy

środowiskowej intensyfikuje dywersyfikację i ewolucję wielu gatunków. Udowodniono, że szczepy bakterii probiotycznych, *Ligilactobacillus salivarius* (dawniej *Lactobacillus salivarius*) wyizolowane od różnych gospodarzy, ewoluują indywidualnie, w zależności od wielu czynników tj. genotypu gospodarza lub czynników środowiskowych takich jak dieta charakterystyczna dla konkretnego regionu [Lee i in. 2017]. Wykazano podobne profile COG - klastrów genów o wspólnym pochodzeniu ewolucyjnym (z ang. Clusters of Orthologous Genes), u szczepów z rodzaju *Lactiplantibacillus plantarum* (dawniej *Lactobacillus plantarum*) wyizolowanych od ludzi oraz z produktów mlecznych, co może wynikać z łatwej wymiany bakterii między produktami mlecznymi a ludźmi [Cen i in. 2020]. Adaptacja do konkretnej niszy odgrywa kluczową rolę w zmianach genetycznych drobnoustrojów, szczególnie tych związanych z metabolizmem, dlatego czynnik ten należy wziąć bezwzględnie pod uwagę podczas badania komercyjnych szczepów probiotycznych [Kelleher i in. 2017, Lee i in. 2017, Cen i in. 2020, Pan i in. 2021].

Podsumowując, bifidobakterie są najliczniejszym rodzajem występującym w jelitach zdrowego niemowlęcia. Wraz z wiekiem, poziom tych bakterii maleje, ale pozostaje stosunkowo stabilny, jednak gwałtowny spadek obserwuje się w podeszłym wieku. Spadkowi populacji bifidobakterii u osób starszych towarzyszy również spadek ich różnorodności gatunkowej. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* mogą stanowić pewnego rodzaju biomarker pomocniczy, z racji ich silnej korelacji ze zdrowiem. Suplementacja bifidobakteriami ma korzystny wpływ na poprawę warunków zdrowotnych człowieka, począwszy od ochrony przed infekcjami po różne pozytywne skutki poza- i wewnątrzjelitowe. Dodatkowo, bakterie te powiązane z wytwarzaniem szeregu potencjalnie promujących zdrowie metabolitów, w tym SCFA, sprzężonego kwasu linolowego i bakteriocyn. Poziom bakterii kwasu mlekowego u osób starszych utrzymuje się na podobnym poziomie, co w wieku dorosłym. LAB nie są najliczniejszą grupą drobnoustrojów przewodu pokarmowego, ale postrzega się je również jako potencjalnie korzystne bakterie jelitowe. Biorąc pod uwagę istotność suplementacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, korelację bioróżnorodności genetycznej bakterii kwasu mlekowego oraz bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* z ich miejscem występowania oraz osobniczą podatność na korzystny wpływ probiotyków, różniącą się w zależności od obszaru geograficznego, istnieje potrzeba izolacji środowiskowych LAB i bifidobakterii, w celu przyszłego wykorzystania ich w żywności. Obecne trendy żywieniowe ukierunkowane są na wzbogacenie diety w produkty regionalne, wytwarzane metodami tradycyjnymi. W

trend ten wpisują się sery twarogowe, które jako produkty fermentowane są uważane za produkty zdrowe, a wartością dodaną jest użycie do ich produkcji bakterii środowiskowych, charakteryzujących się dużą zmiennością genetyczną i fenotypową, zamiast ujednoliconej kultury komercyjnej niewiadomego pochodzenia, wykorzystywanej do przemysłowej produkcji serów w Polsce [Smid i Hugenholtz 2010, Gatti i in. 2014, Białecka-Dębek i in. 2021, Ma i in. 2021, Ragonnaud i Biragyn 2021].

Skład ilościowy i jakościowy ludzkiej mikrobioty jelitowej zależy od wielu czynników. Wśród nich, najczęściej wymieniane są determinanty genetyczne i środowiskowe. Ostatnie badania duży nacisk kładą na fakt, iż struktura populacji mikrobioty jelitowej różni się nie tylko regionalnie, ale i lokalnie. Jej prawidłowy układ warunkuje odpowiednie funkcjonowanie całego organizmu. W celu korzystnej kolonizacji jelit, można wdrożyć terapię probiotykami, które istotnie modulują skład mikrobioty jelitowej. Z uwagi na korelację różnorodności genetycznej bakterii kwasu mlekowego z ich miejscem występowania, istnieje potrzeba izolacji drobnoustrojów potencjalnie probiotycznych z otaczającego środowiska. Obecnie na rynku wyrobów serowarskich dostępne są sery produkowane z pasteryzowanego mleka, z dodatkiem komercyjnych, zagranicznych kultur bakterii kwasu mlekowego. Powoduje to, w produktach mlecznych, brak różnorodności flory bakteryjnej, niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Firmy mleczarskie stosują ciągle te same, zagranicznego pochodzenia, komercyjne kultury startowe. Kultury takie gwarantują powtarzalność procesu technologicznego i cechy sensoryczne produktu, jednak doprowadzają do tego iż hamowana jest bioróżnorodność mikrobiomu jelitowego człowieka.

Dlatego, istnieje potrzeba powrotu do rodzimych, regionalnych szczepów, które wzbogaciłyby mikrobiot ludzkiego przewodu pokarmowego. Jednym z rozwiązań jest wyizolowanie ze środowiska lokalnych szczepów, stworzenie z nich starterów, które mogłyby być użyte do różnego rodzaju produktów spożywczych. Producenci najczęściej stosują startery techniczne, wytwarzane przez zagraniczne koncerny. Tymczasem chcąc uzyskiwać produkty dobrej jakości, o właściwościach prozdrowotnych, powinni wykorzystywać kultury bakteryjne złożone z lokalnych szczepów, wyizolowanych z mleka i środowiska jego produkcji.

## **2. CEL OPERACJI**

Stosowanie do fermentowanej żywności, produkowanej w warunkach przemysłowych i nieprzemysłowych, mikroflory startowej rodzimego, a nawet środowiskowego pochodzenia,



byłoby bardzo korzystne dla zdrowia konsumentów. Dlatego też, podjęto w projekcie badania których celem była: produkcja spersonalizowanych twarogów przeznaczonych do spożycia, przede wszystkim przez osoby starsze, z wykorzystaniem innowacyjnej mieszanki startowej, zawierającej środowiskowe izolaty, nadającej pożądane cechy sensoryczne i odżywcze, spełniającej technologiczne potrzeby mleczarni i rosnące oczekiwania zwłaszcza dojrzałych konsumentów. Badania obejmowały izolację i charakterystykę szczepów z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz opracowanie technologii fermentacji mleka, prowadzonej przez wyizolowane bakterie potencjalnie prozdrowotne, z wykorzystaniem pilotażowej linii technologicznej. Wybór tego asortymentu (serów twarogowych) był uzasadniony preferencjami żywieniowymi grupy konsumentów, jakimi są osoby starsze i doskonale wpisywał się w panujące trendy żywności naturalnej. Zakres oddziaływania operacji miał charakter lokalny, z uwagi na niewielką skalę produkcji mleczarni wchodzącej w skład grupy operacyjnej. Jednakże ze względu na rosnącą grupę odbiorców tego typu produktów (globalny problem starzejącego się społeczeństwa) opracowana innowacyjna technologia może być wdrożona w innych regionach Polski.

### **3. ZAKRES PRAC**

Zakres prac obejmował:

- badania mikrobiologiczne czystości powierzchni, powietrza i wody, obejmujące higienę udoju mleka oraz ocen i dostosowanie warunków środowiskowych do wymogów higieny produkcji (GMP, GHP) innowacyjnych, spersonalizowanych serów twarogowych wytwarzanych z pasteryzowanego mleka krowiego,
- systematyczne monitorowanie surowca (mleka) przeznaczonego do wytworzenia spersonalizowanych twarogów obejmujące badania jakościowe mleka, w tym poziom tłuszczu, liczbę komórek somatycznych,
- izolację i charakterystykę szczepów bakterii należących do bakterii fermentacji mlekowej i *Bifidobacterium*,
- namnożenie zidentyfikowanych izolatów bakteryjnych oraz ich głębokie mrożenie w medium z krioprotektantami, w celu uzyskania kultury startowej do produkcji innowacyjnego sera twarogowego dedykowanego osobom starszym,
- opracowanie warunków technologicznych ukwaszania mleka na nowej pilotażowej linii produkcyjnej z dodatkiem różnych wariantów kultur startowych,

- badania jakościowe serów twarogowych (mikrobiologiczne, sensoryczne i fizykochemiczne, w tym zawartość wolnych aminokwasów),
- określenie wartości odżywczej oraz składu jakościowego produktu (zawartość białka, frakcji tłuszczowych, cukru, wody) a także liczby bakterii fermentacji mlekowej i *Bifidobacterium*,
- stworzenie etykiety zawierającej informacje o produkcie, zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia WE 1169 z dnia 25 października 2011,
- opracowanie i wydanie broszury promującej innowacyjny produkt,
- badania przechowalnicze spersonalizowanych serów twarogowych,
- przygotowanie publikacji naukowych,
- prezentacja i promocja produktu na konferencjach, regionalnych targach i festynach.

#### 4. METODYKA PRAC

- Badania mikrobiologiczne

##### Monitoring mikrobiologiczny czystości środowiska produkcji:

**Jakość mikrobiologiczna powietrza**, w pomieszczeniach serowni, 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 m<sup>3</sup> aspirowanego powietrza. Materiał badawczy stanowiły próbki powietrza pobierane w gospodarstwach, przy użyciu próbnika powietrza MAS-100 ECO™. Próbnik powietrza MAS-100 ECO™ 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] i 25°C przez 5 dni w celu analizy liczby drożdży i pleśni [PN ISO 7954].

**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,

-liczbę bakterii *E. coli* i bakterii z grupy *coli* metodą filtracji membranowej na podłożu CCA wg PN -EN ISO 9308-1,

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

**Czystość mikrobiologiczna powierzchni** urządzeń, linii technologicznych i rąk pracowników oceniano **metodą odciskową** (kontaktową) przy użyciu płytek typu RODAC o powierzchni 25 cm<sup>2</sup>. 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 przeprowadzano 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 surowego mleka oraz wyprodukowanych serów

**Oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów** zgodnie z normą PN-EN ISO 4833-1 na podłożu PCA. Płytki inkubowano przez 72 ±3 h w 30°C i zliczano wyrosłe kolonie.

**Oznaczenie liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*** zgodnie z normą PN- ISO 21528-2 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*** zgodnie z normą PN-EN ISO 16649 na podłożu TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar). TBX jest podłożem chromogennym zawierającym żółć, enzymatyczny hydrolyzaty 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, metodą płytkową w posiewie wgłębnym na podłożu MRS w 30°C, przez 72 ±3 h.

**Oznaczenie liczby przypuszczalnych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp.** zgodnie z normą PN-ISO 29981:2012, w warunkach beztlenowych (37°C, 48h) przy użyciu podłoża TOS z suplementem MUP.

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

**Oznaczenie liczby *Clostridium perfringens*** zgodnie z normą PN-EN ISO 7937:2005 prowadzono na podłożu TSC z suplementem. Płytki inkubowano w warunkach beztlenowych, w systemie Anaerobe Gas Generating Pouch (Thermo Scientific), w temperaturze 37°C przez 20 ± 2 h. Bakterie z gatunku *Clostridium perfringens* tworzyły charakterystyczne kolonie, otoczone czarną strefą precypitatu, spowodowanego redukcją siarczanów (IV) do siarczków, co powodowało zaczernienie kolonii w pożywce selektywnej TSC.

**Oznaczenie liczby przypuszczalnych *Pseudomonas* sp.** wg normy PN-ISO 13720:2010 określano na podłożu wybiórczym CFC (agar z cetrymidem, fucidyną i cefaloridyną). Płytki inkubowano w 25 °C ± 1 °C przez 44 ± 4 h. Po upłygnięciu czasu inkubacji, zliczano kolonie z płytek, zawierających mniej niż 150 kolonii.

**Oznaczenie liczby przypuszczalnych *Bacillus cereus*** zgodnie z normą PN-EN ISO 7932:2005/A1 stosując podłożę selektywno- różnicujące MYP. Płytki inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 30 °C przez 18 do 48 h. Po upłygnięciu czasu inkubacji do liczenia wybrano płytki zawierające mniej niż 150 kolonii. Przypuszczalne kolonie *Bacillus cereus* były duże, różowe i zazwyczaj otoczone strefą zmętnienia.

**Oznaczenie liczby gronkowców koagulazododatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków)** 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*** zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-1 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 podłoże ALOA i Oxford, które inkubowano w temperaturze 37°C do 48 godzin. Po upłygnięciu 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 liczby *Listeria monocytogenes*** zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-2 stosując w podłoże ALOA. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C do 48 godzin. Po upłygnięciu określonego czasu zliczano charakterystyczne kolonie barwy niebieskozielonej z charakterystyczną strefą zmętnienia.

**Oznaczenie obecność bakterii z rodzaju *Salmonella* spp.** wg PN-EN ISO 6579 inkubując próbki 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 podłoże 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.

#### **Pomiar aktywności wody**

Aktywność wody ( $a_w$ ) oznaczano przy użyciu aparatu firmy AquaLab 4TE, w temp.  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , poprzez napełnienie jednorazowych naczyń pomiarowych i umieszczenie ich w komorze aparatu. Po szczelnym zamknięciu komory pomiarowej pomiaru dokonywano po ustaleniu się stanu równowagi. Wilgotność względna powietrza w komorze w stanie równowagi termodynamicznej odpowiadała  $a_w$  próby badanej. Pomiarów dokonywano w trzech powtórzeniach.

#### **Identyfikacja gatunkowa wyizolowanych bakterii kwasu mlekowego**

Identyfikację biochemiczną drobnoustrojów wyizolowanych z serów wykonano przy pomocy testu diagnostycznego API<sup>®</sup> 50 CH oraz podłoża API<sup>®</sup> 50 CHL (bioMérieux, Francja) przeznaczonego do identyfikacji mikroorganizmów z rodzaju *Lactobacillus* oraz rodzajów pokrewnych. Test API 50 CH zawierał 50 mikroprobówek, które umożliwiały określenie zdolności fermentacji substratów o charakterze węglowodanów i ich pochodnych tj.: heterozydów, polialkoholi, kwasów uronowych. Każdą mikroprobówkę napełniono uprzednio przygotowaną zawiesiną drobnoustrojów w podłożu API 50 CHL, uwadniając tym samym

zawartość próbki. W celu zachowania warunków beztlenowych, do każdej próbki nakropiono olej mineralny. Tak przygotowany test inkubowano w  $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  przez  $48 \pm 6$  godzin. Fermentacja w próbkach uwiarydociła się poprzez zmianę koloru w próbce z purpurowej na żółtą. Zmiana koloru była wywołana poprzez beztlenowe wytworzenie kwasu i wykrycie go przez wskaźnik pH obecny w podłożu. Pierwsza mikropróbka nie zawierała wskaźnika pH, stanowiąc kontrolę ujemną. Poniżej w Tabeli 1 przedstawiono szczegółowy skład testu API<sup>®</sup> 50 CH.

Tabela 1. Skład węglowodanów w teście API<sup>®</sup> 50 CH

0	Kontrola	10	D-galaktoza	20	Metylo- $\alpha$ D-mannopiranozyd	30	D-melibioza	40	D-turanoza
1	Glicerol	11	D-glukoza	21	Metylo- $\alpha$ D-glukopiranozyd	31	D-sacharoza	41	D-liksoza
2	Erytrytol	12	D-fruktoza	22	N-acetylo-glukozamina	32	D-trehaloza	42	D-tagatoza
3	D-arabinoza	13	D-mannoza	23	Amigdalina	33	Inulina	43	D-fukoza
4	L-arabinoza	14	L-sorboza	24	Arbutyna	34	D-melezytoza	44	L-fukoza
5	D-ryboza	15	L-ramnoza	25	Eskulina Cytrynian żelaza	35	D-rafinoza	45	D-arabitol
6	D-ksyloza	16	Dulcytol	26	Salicyna	36	Skrobia	46	L-arabitol
7	L-ksyloza	17	Inozytol	27	D-celobioza	37	Glikogen	47	Glukonian potasu
8	D-adonitol	18	D-mannitol	28	D-maltoza	38	Ksylitol	48	2-ketoglukonian potasu
9	Metylo- $\beta$ D-ksylopiranozyd	19	D-sorbitol	29	D-laktoza	39	Genjobioza	49	5-ketoglukonian potasu

## Badania fizykochemiczne

**Oznaczenie zawartości kadmu i ołowiu** przeprowadzono techniką płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FAAS) według PN-EN 14082:2004 „Artykuły żywnościowe. Oznaczenie pierwiastków śladowych. Oznaczenie 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.

Odwagowaną próbkę sera (ok. 5 g) spopielono na płycie grzewczej i mineralizowano na sucho w piecu mufowym w temperaturze  $420^{\circ}\text{C}$ . 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 2. 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 <sup>3</sup> /h	400	400
Prędkość przepływu acetyleny, dm <sup>3</sup> /h	60	60
Granica oznaczalności LOQ, mg/kg	0,003	0,02
Czułość, mg/kg	0,002	0,01

**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, odważoną próbkę sera 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 3. 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 mg, suszenie 120 s; rozkład 300 s  
 Granica oznaczalności metody, mg/kg: 0,001, Czułość metody, mg/kg: 0,0005.

**Oznaczanie zawartości wapnia** 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”.

Odważoną próbkę sera (ok. 2 g) wstępnie spopieleno 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 cm<sup>3</sup>, uzupełniono wodą destylowaną i dokładnie mieszano. Do odpowiednio rozcieńczonych próbek dodano buforu z chlorku lantanu w ilości takiej, aby stężenie lantanu było jednakowe we wzorcach i badanej próbce. Zawartość wapnia w próbkach określono na podstawie krzywej wzorcowej. Do oznaczenia zastosowano spektrometr absorpcji atomowej Z-2000 firmy HITACHI.

Tabela 4. Warunki oznaczania wapnia oraz parametry metody

Warunki i parametry metody	Ca
Długość fali, nm	422,7
Prąd zasilania lampy, mA	7,5
Szerokość szczeliny, nm	1,3
Prędkość przepływu powietrza, dm <sup>3</sup> /h	400
Prędkość przepływu acetyleny, dm <sup>3</sup> /h	60
Granica oznaczalności LOQ, mg/kg	0,4
Czułość, mg/kg	0,2

**Kwasowość ogólna** w serach oznaczono za pomocą metody miareczkowej zgodnie z normą PN-73/A-86232 „Mleko i przetwory mleczarskie. Sery. Metody badań” p. 3.6.



Odważkę 5g sera roztarto dokładnie w moździerzu, dodając stopniowo małymi porcjami 50cm<sup>3</sup> wody destylowanej o temperaturze 40°C. Po otrzymaniu emulsji dodano 2cm<sup>3</sup> fenoloftaleiny i miareczkowano 0,25N roztworem wodorotlenku sodowego do otrzymania lekko różowego zabarwienia utrzymującego się przez 30s.

Kwasowość sera w stopniach Soxhlet-Henkela (X<sub>S</sub>) obliczono według wzoru

$$X_S = a * 20$$

a – objętość 0,25N roztworu wodorotlenku sodowego zużytego do miareczkowania, cm<sup>3</sup>.

**Wartość pH** w serach oznaczono potencjometrycznie zgodnie z normą PN-73/A-86232 „Mleko i przetwory mleczarskie. Sery. Metody badań” p. 3.7.

Odważkę 10 g sera przeniesiono do moździerza i rozcierano tłuczkiem dodając stopniowo małymi porcjami 10cm<sup>3</sup> wody destylowanej o temperaturze 40°C, aż do uzyskania jednolitej emulsji. Otrzymaną emulsję ostudzono do temperatury 20°C i wykonano pomiar pH.

**Zawartość wody** w serach oznaczono za pomocą metody wagowej zgodnie z normą PN-73/A-86232 „Mleko i przetwory mleczarskie. Sery. Metody badań” p. 3.3.

Naczynko z około 30g piasku wysuszono w suszarce w temperaturze 102°C ± 2°C przez około 1h, po czym ostudzono w ekcykatorze i zważono z dokładnością do 0,0001g. Odważkę 3 g sera (z dokładnością do 0,0001g) dokładnie wymieszano i roztarto pręcikiem szklanym, po czym wstawiono do suszarki o temperaturze około 60°C na 1h. W tym czasie zawartość naczynka mieszano od 3 do 4 razy, w celu uniknięcia zbrylenia suszonej masy. Następnie podniesiono temperaturę do 102°C ± 2°C i suszono w tej temperaturze przez 3h. Naczynko ostudzono w ekcykatorze i zważono z dokładnością do 0,0001. Suszenie powtarzano do momentu, aż różnica między kolejnymi ważeniami nie przekraczała 0,001g.

Zawartość wody w serze obliczono w procentach wg wzoru:

$$X = (a - b) * 100 / (a - c)$$

a – masa naczynka z piaskiem, pręcikiem szklanym i serem przed suszeniem, g,

b – masa naczynka z piaskiem, pręcikiem szklanym i serem po wysuszeniu, g,

c – masa naczynka z piaskiem i pręcikiem szklanym, g.

**Zawartość białka** w serach wykonano wg normy PN-74/A-04018+Az3:2002 „Produkty rolniczo-żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczenie na białko” metodą destylacyjno-miareczkową polegającą na przeprowadzeniu organicznych związków azotu w siarczan amonowy za pomocą stężonego kwasu siarkowego w obecności katalizatora, a następnie odmiareczkowaniu kwasem solnym amoniaku oddestylowanego z roztworu po alkalizacji i związanego w kwasie borowym.

Do kolb Kjeldahla odważono ok. 1,5 g rozdrobnionych próbek sera z dokładnością do 0,0001 g, dodano ok. 8 g katalizatora oraz 20 ml stężonego kwasu siarkowego, a następnie umieszczono w piecu do mineralizacji próbek firmy Buchi. Po zakończeniu procesu mineralizacji kolby pozostawiono do ostygnięcia i rozpoczęto destylację zmineralizowanych próbek przy użyciu aparatu do destylacji parą wodną firmy Buchi. Uzyskany destylat miareczkowano roztworem HCl o stężeniu 0,1 mol/l do barwy fioletowej przy użyciu wskaźnika Tashiro. Oznaczoną w ten sposób zawartość azotu ogólnego przeliczono na zawartość białka.

Zawartość azotu obliczono w procentach wg wzoru:

$$X_1 = (a - b) \cdot n \cdot 1,4/m$$

a – objętość mianowanego roztworu kwasu solnego zużytego do miareczkowania w próbie właściwej, cm<sup>3</sup>,

b - objętość mianowanego roztworu kwasu solnego zużytego do miareczkowania w próbie ślepej, cm<sup>3</sup>,

n – normalność użytego do miareczkowania kwasu solnego określona z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku,

m – masa badanej próbki, g.

Zawartość białka obliczono mnożąc otrzymany wynik przez współczynnik 6,38.

**Zawartość tłuszczu** w serach oznaczono metodą ekstrakcji eterem naftowym wg normy PN-85/A-82100. Do kolby stożkowej odważono ok. 5 g próbki sera z dokładnością do 0,01 g, dodano 20 cm<sup>3</sup> wody destylowanej oraz 30 cm<sup>3</sup> 25% (m/m) kwasu solnego. Następnie na szyjkę nałożono chłodnicę powietrzną i ostrożnie ogrzewano na płycie grzewczej przez 15 min, utrzymując w lekkim wrzeniu. Po zakończeniu hydrolizy chłodnicę opłukano wodą destylowaną, a zawartość kolby przesączono przez sączek. Pozostałość na sączku przemyto małymi

porcjami gorącej wody destylowanej do zaniku reakcji na chlorki. Sączek z zawartością pozostawiono na lejku przez noc w celu odparowania wody, następnie przeniesiono do gilzy ekstrakcyjnej aparatu do ekstrakcji ciągłej typu Soxhlet firmy Buchi. Naczynka ekstrakcyjne, wyprażone do stałej masy w temperaturze 103 °C, napełniono rozpuszczalnikiem – eterem naftowym i rozpoczęto proces ekstrakcji. Naczynka z wyekstrahowanym tłuszczem suszono przez 1 h w suszarce nagrzanej do temperatury 103°C, ostudzono w eksykatorze do temperatury pokojowej i zważono z dokładnością do 0,0001 g. Czynności suszenia, studzenia oraz ważenia powtarzano do momentu, aż wyniki dwóch kolejnych ważeń nie różniły się więcej niż 0,1 % masy próbki. Zawartość tłuszczu w próbce obliczono na podstawie różnicy mas naczynka z wyekstrahowanym tłuszczem i pustego naczynka, uwzględniając wielkość naważonej próbki.

Zawartość tłuszczu obliczono w procentach wg wzoru:

$$X_1 = (a - b) \cdot 100/m$$

a – masa naczynka ekstrakcyjnego z tłuszczem, g,

b – masa naczynka ekstrakcyjnego pustego, g,

m – masa badanej próbki, g.

### **Skład kwasów tłuszczowych**

Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych wykonywano metodą GC (HP 6890 II z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym) wg PN-EN ISO 12966-1:2015-01. Do rozdziału estrów stosowano wysokopolarną kolumnę kapilarną BPX 70 (60 m×0,25 mm, 25 μm). Warunki analizy: temp. kolumny programowana w zakresie 140-210 °C, temp. dozownika: 210 °C, temp. detektora 250 °C, gaz nośny: hel.

**Zawartość popiołu** w serach oznaczono za pomocą metody wagowej wg normy PN-ISO 936:2000 „Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie popiołu całkowitego” metodą polegającą na spopieleniu próbki w piecu muflowym w temperaturze 550 °C ± 25°C.

Do wyprażonych w piecu przez 1 h w temperaturze 550 °C, a następnie zważonych z dokładnością do 0,0001 g tygli kwarcowych, odważono ok. 2,5 g rozdrobnionych próbek sera z dokładnością do 0,0001 g. Tygiel wraz z zawartością umieszczono w piecu muflowym i stopniowo podnoszono temperaturę do 550 °C. Próbki spopielało w temperaturze 550 °C ± 25°C do uzyskania białoszarej barwy popiołu, po czym ostudzono w eksykatorze do temperatury pokojowej i zważono z dokładnością do 0,0001 g. Zawartość

popiołu w próbce obliczono w procentach na podstawie różnicy mas tygła ze spopieloną próbką i pustego tygła, uwzględniając wielkość naważonej próbki wg wzoru:

$$W_a = [(m_2 - m_0)/(m_1 - m_0)] * 100$$

$m_0$  – masa pustego tygła, g,

$m_1$  – masa tygła z próbką, g,

$m_2$  – masa tygła z popiołem, g.

**Zawartość błonnika** w serach wykonywano według AOAC 985.29 przy użyciu zestawu enzymatycznego firmy MEGAZYME.

Odważkę 1g sera naważono do zlewki 400ml w dwóch powtórzeniach i suszono w temperaturze 105°C lub 70° w piecu próżniowym, przez noc. Dodano 50 ml buforu fosforanowego (pH 6,0) do każdej zlewki. Dodano 50µl termostabilnego roztworu α-amylazy, przykryto zlewki folią aluminiową i inkubowano w temperaturze 98-100 °C przez 15 min. Wstrząsano delikatnie w odstępach co 5 minut. Ochłodzone próbki doprowadzano do pH 7,5±0,1 poprzez dodanie 10 ml 0,275 roztworu NaOH. Dodawano 100µl roztworu proteazy i inkubowano w temperaturze 60°C w łaźni z wytrząsaniem przez 30 min. Ochłodzone próbki doprowadzano do pH 4,5 ± 0,2 poprzez dodanie 10 ml 0,325 N roztworu HCl. Dodano 200µl amyloglukozydazy i inkubowano w temperaturze 60°C w łaźni z wytrząsaniem przez 30 min. Dodano 280 ml 95% EtOH podgrzanego do 60°C. Pozostawiano próbki w temperaturze pokojowej na 60 min i przeprowadzono proces sączenia. Zastosowano ssanie, aby rozłożyć celit na tygł (shott). Utrzymano ssanie i ilościowo przeniesiono osad z trawienia enzymatycznego do tygła (próbka po analizie). Przemyto pozostałość kolejno trzema porcjami 20 ml 78% EtOH, dwiema porcjami 10 ml 95% EtOH i dwiema porcjami 10 ml acetonu. Wysuszono tygłe przez noc w piecu próżniowym w temperaturze 70 °C lub w temperaturze 105°C. Schłodzono próbki w ekcykatorze i zważono z dokładnością do 0,1 mg. Wykonano analizę osadu po analizie z jednej próbki pod kątem zawartości białka zgodnie z metodą oznaczania azotu Kjeldahla. Zastosowano współczynnik 6,25 w celu przeliczenia oznaczonego amoniaku na białko. Spalano drugą próbkę z osadem po analizie przez 5h w 525°C. Schłodzono w ekcykatorze i zważono do 0,1 mg. Odjęto masę tygła i celitu, aby określić zawartość popiołu w próbce.

Zawartość błonnika pokarmowego obliczano według wzoru:

**Masa osadu próbki ślepej (UABR)** = pozostałości po wykonaniu analizy, w mg

**Próba ślepa białka (BPR)** = UABR x białko w ślepej próbie/100

**Próba ślepa popiołu (BAR)** = UABR x popiół w próbie ślepej/100

**Próba ślepa (CB)** = UABR – BPR – BAR

**Masa osadu próbki badanej (USAR)** = pozostałości po wykonaniu analizy, w mg

**Próbka pozostałości białka (SPR)** = USAR x białko w próbie/100

**Próba pozostałości popiołu (SAR)** = USAR x popiół w próbie /100

**Pozostałości próbki po analizie (CSR)** = USAR – SPR – SAR – CB

**% TDF (procentowa zawartość błonnika)** = 100 x CSR/masa próbki

**Zawartość węglowodanów** obliczono na podstawie oznaczenia zawartości wody, białka, tłuszczu i popiołu wg wzoru:

$$W_{og.} = 100 - (B + W + T + P)$$

W og. – zawartość węglowodanów ogółem [g/100g]

B – zawartość białka [g/100g]

W – zawartość wody [g/100g]

T – zawartość tłuszczu [g/100g]

P - zawartość popiołu [g/100g]

**Wartość odżywcza i energetyczna** wyrażoną w kcal/100 g i kJ/100 g obliczono na podstawie oznaczania zawartości wody, białka, tłuszczu, popiołu oraz węglowodanów, stosując średnie współczynniki przeliczeniowe, wg wzoru:

$$W_{energet.} [kcal/100 g] = 4xB + 9xT + 4xW_{og.}$$

$$W_{energet.} [kJ/100 g] = 17xB + 37xT + 17xW_{og.}$$

gdzie:

W energet. – wartość energetyczna

W og. – zawartość węglowodanów ogółem [g/100 g]

B – zawartość białka [g/100 g]

T – zawartość tłuszczu [g/100 g]

**Zawartość soli** obliczono na podstawie oznaczenia zawartości sodu, wg wzoru:

$$\text{Zawartość soli} = \text{Zawartość Na} \times 2,5 \text{ [mg/kg]}$$

a następnie wynik przeliczono na g/100 g.

**Oznaczenie zawartości sodu** 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”.

Odważoną próbkę sera (ok. 2 g) 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 cm<sup>3</sup>, 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 w próbkach określono na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Tabela 5. Warunki oznaczania sodu oraz parametry metody

Warunki i parametry metody	Na
Długość fali, nm	589,0
Prąd zasilania lampy, mA	10,0
Szerokość szczeliny, nm	0,4
Prędkość przepływu powietrza, dm <sup>3</sup> /h	400
Prędkość przepływu acetyleny, dm <sup>3</sup> /h	60
Granica oznaczalności LOQ, mg/kg	0,1
Czułość, mg/kg	0,05

## **Ocena sensoryczna metodą QDA i przy użyciu skali hedonicznej**

### **1. Metoda QDA**

W celu scharakteryzowania poddawanych analizie serów twarogowych, zastosowano metodę ilościowej analizy opisowej QDA (Quantitative Descriptive Analysis) nazywaną również metodą profilową, zgodnie z PN-EN ISO 13299:2016. Profil badanych produktów wyznaczany był przez dwunastoosobowy zespół oceniający. Określone wyróżniki sensoryczne wybrano podczas dyskusji panelowej. Osoby uczestniczące w badaniach posiadały odpowiednie kwalifikacje metodyczne oraz doświadczenie w realizowaniu ocen metodą QDA w odniesieniu do różnych produktów.

Na podstawie prowadzonych analiz dokonano wyboru jakościowych wyróżników zapachu, smaku, konsystencji oraz jakości ogólnej zgodnie z zasadami ww. metody. Ostatecznie w wyniku dyskusji i weryfikacji przyjęto 8 wyróżników jakościowych. Wyszczególniono następujące wyróżniki zapachu i smaku:

- twarogowy/ śmietanowy/ mleczny
- kwaśny
- obcy

Ponadto ustalono wyróżniki określające konsystencję badanego wyrobu. W grupie tej wyszczególniono:

- wilgotność (suchy/mokry)
- grudkowatość

Uwzględniając powyższe cechy oraz ich zharmonizowanie, określono także ogólną jakość sensoryczną badanych próbek. Intensywność wyróżników zaznaczono na niestrukturowanej skali graficznej [0-10 j.u. – jednostek umownych]. Każdy z deskryptorów oceniany był na oddzielnej skali (od 1 do 10) z odpowiednimi określeniami brzegowymi. Oceniający nanosili pionową kreskę na skalę, w miejscu odpowiadającemu odniesionemu wrażeniu. Uzyskane wyniki przekształcono na wielkości liczbowe, poprzez zmierzenie odległości znacznika od lewego końca skali. Dla każdego ocenianego wyróżnika przypisano oddzielną skalę ze ściśle sprecyzowanymi określeniami brzegowymi. Oceny przeprowadzono w dwóch powtórzeniach tak, aby każdy wynik średni był obliczany z 24 wyników jednostkowych. Przykładowe oceny produktów zestawiono w Tabelach.

## 2. Skala hedoniczna

Badane sery twarogowe poddano także ocenie sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej 9-punktowej. Oceniano: wygląd, barwę, konsystencję, zapach, smak oraz jakość ogólną analizowanych produktów.

Na podstawie skali zamieszczonej w tabeli przyznawano badanym serom punktację za każdy oceniany wyróżnik.

Jakość	Punktacja
Wyjątkowo pożądana	9
Bardzo pożądana	8
Pożądana	7
Nieco pożądana	6
Ani pożądana ani niepożądana	5
Nieco niepożądana	4
Niepożądana	3
Bardzo niepożądana	2
Wyjątkowo niepożądana	1

Każdy z analizowanych wyróżników oceniany był dwukrotnie, przez 12 osobowy zespół panelistów, a każdy wynik średni obliczony został z 24 wyników jednostkowych.

W tabelach przedstawiono przykładowe zestawienie ocen dla poszczególnych rodzajów produktów.

### Wyniki oceny sensorycznej

Analizie sensorycznej poddano sery twarogowe, do których produkcji wykorzystano mleko krowie pasteryzowane oraz niepasteryzowane. Do tworzenia skrzepu używano trzech rodzajów szczepionek (I, II, III), by po przeprowadzeniu prób technologicznych wyselekcjonować jedną o najbardziej pożądanym właściwościach sensorycznych.

We wstępnej fazie, do produkcji sera twarogowego wykorzystano trzy szczepionki. Analizie sensorycznej poddawane były sery kwasowe uzyskane ze świeżego mleka krowiego pasteryzowanego, jak również niepasteryzowanego. Oceniano zapach, smak i konsystencję badanych wyrobów, a także jakość ogólną. Najlepiej oceniono sery wyprodukowane z użyciem Szczepionki II, zarówno z mleka pasteryzowanego, jak również niepasteryzowanego. Produkty te charakteryzowały się mlecznym, śmietanowym smakiem i zapachem. Ocenione zostały one bardzo wysoko. Jakość ogólna kształtowała się na poziomie 7,5 - 8 pkt. przy użyciu metody QDA. W skali hedonicznej uzyskano wynik na



poziomie jakości bardzo pożądanej. Wilgotność i grudkowatość oceniane przez zespół analityków, były typowe dla tego typu produktów.

Sery wyprodukowane z użyciem Szczepionki I uzyskały niższą ocenę w stosunku do Szczepionki II. Ich jakość ogólną oceniono na poziomie 5 – 5,5 pkt. Z kolei w skali hedonicznej sery wyprodukowane z użyciem Szczepionki I oceniono na poziomie jakości „na pograniczu pożądanej/nieco pożądanej”. Sery wyprodukowane z mleka niepasteryzowanego uzyskiwały niższe wyniki w stosunku do analogicznych produktów otrzymanych z mleka poddanego procesowi pasteryzacji. Wadą zaobserwowaną w serach wyprodukowanych z użyciem Szczepionki I, była ich nadmierna kruchość, utrudniająca krojenie. Zaobserwowano także niekorzystne zmiany w smaku produktów, określane przez zespół, jako smak i zapach „przypalonego mleka”. Najgorsze wyniki podczas oceny sensorycznej uzyskały sery twarogowe wyprodukowane z użyciem Szczepionki III. Ich jakość oceniono na poziomie 4 – 5,5 pkt. Charakteryzowały się one zmienionym smakiem i zapachem, określanym przez zespół oceniający jako „przypalone mleko, drożdżowy”. Po wstępnych ocenach do dalszych badań wybrano szczepionki I i II oraz mleko poddane procesowi pasteryzacji. Wyeliminowano Szczepionkę III, która cechowała się najmniej korzystnymi parametrami w uzyskanym produkcie.

W Tabelach zaprezentowano przykładowe wyniki uzyskane we wstępnej fazie wyboru szczepionek o pożądanych właściwościach.

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka I**

<b>Twarogowy</b>								
Numer oceniającego	<b>ZAPACH</b>		<b>SMAK</b>			<b>KONSYSTENCJA</b>		<b>Jakość ogólna</b>
	<b>śmietanowy/ mleczny/twarogowy</b>	<b>obcy</b>	<b>śmietanowy/ mleczny/twarogowy</b>	<b>kwaśny</b>	<b>obcy</b>	<b>wilgotność</b>	<b>grudkowatość</b>	
Oceniający nr 1	5,3	1,1	5,8	4,3	1,3	6,7	5,2	5,7
Oceniający nr 2	5,5	1,2	6,0	4,5	1,2	6,7	4,9	5,8
Oceniający nr 3	5,3	1,2	5,9	4,6	1,2	6,6	4,8	5,8
Oceniający nr 4	5,7	1,0	6,0	4,6	1,4	6,6	4,4	5,9
Oceniający nr 5	5,2	1,1	5,8	4,5	1,2	6,7	4,4	5,8
Oceniający nr 6	5,6	1,2	5,5	4,6	1,2	6,7	5,7	5,9
Oceniający nr 7	5,5	1,1	5,6	4,4	1,2	6,7	5,7	5,9
Oceniający nr 8	5,2	1,2	5,9	4,5	1,2	6,8	4,9	5,7
Oceniający nr 9	5,6	1,0	6,0	4,3	1,4	7,0	5,5	5,8
Oceniający nr 10	5,3	1,1	5,5	4,3	1,2	7,1	4,9	5,7
Oceniający nr 11	5,4	1,2	5,5	4,3	1,2	7,1	5,4	5,9
Oceniający nr 12	5,6	1,2	5,6	4,8	1,2	6,7	5,5	5,9
<b>ŚREDNIA</b>	5,43	1,13	5,76	4,48	1,24	6,78	5,36	5,82

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krowi kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka I**

<b>Twarogowy</b>						
Numer oceniającego	<b>DESKRYPTORY (skala 1-9)</b>					
	<b>Wygląd</b>	<b>Barwa</b>	<b>Konsystencja</b>	<b>Zapach</b>	<b>Smak</b>	<b>Jakość ogólna</b>
Oceniający nr 1	7	7	5	5	5	5
Oceniający nr 2	8	8	4	5	5	6
Oceniający nr 3	8	7	5	5	5	5
Oceniający nr 4	8	7	5	5	5	5
Oceniający nr 5	8	7	4	4	4	6
Oceniający nr 6	7	7	5	5	5	5
Oceniający nr 7	8	7	5	4	4	6
Oceniający nr 8	8	6	4	5	5	5
Oceniający nr 9	9	7	4	4	4	6
Oceniający nr 10	9	8	4	4	4	6
Oceniający nr 11	8	7	5	5	5	6
Oceniający nr 12	7	7	4	4	4	6
<b>ŚREDNIA</b>	7,75	7,17	4,50	4,58	4,58	5,58
<b>MEDIANA</b>	8,00	7,00	4,50	5,00	5,00	6,00

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka niepasteryzowanego – Szczepionka I**

<b>Twarogowy</b>								
Numer oceniającego	<b>ZAPACH</b>		<b>SMAK</b>			<b>KONSYSTENCJA</b>		<b>Jakość ogólna</b>
	<b>śmietanowy/ mleczny/twarogowy</b>	<b>obcy</b>	<b>śmietanowy/ mleczny/twarogowy</b>	<b>kwaśny</b>	<b>obcy</b>	<b>wilgotność</b>	<b>grudkowatość</b>	
Oceniający nr 1	5,1	1,3	4,9	4,1	1,3	6,8	5,2	4,9
Oceniający nr 2	5,4	1,2	5,1	4,5	1,2	6,9	5,2	5,3
Oceniający nr 3	5,1	1,2	4,9	4,5	1,2	7,2	5,4	5,1
Oceniający nr 4	5,3	1,4	5,2	4,5	1,4	6,3	5,2	5,3
Oceniający nr 5	4,9	1,4	4,9	4,1	1,4	6,4	5,2	5,2
Oceniający nr 6	5,1	1,2	5,5	4,5	1,2	6,6	5,5	5,3
Oceniający nr 7	4,8	1,2	5,1	4,2	1,2	6,3	5,4	5,2
Oceniający nr 8	4,9	1,4	4,9	4,3	1,4	7,1	5,4	5,4
Oceniający nr 9	5,1	1,4	5,5	4,3	1,4	6,5	5,5	4,9
Oceniający nr 10	5,9	1,2	4,7	4,2	1,2	7,1	5,5	4,9
Oceniający nr 11	5,3	1,2	5,1	4,1	1,2	6,6	5,5	5,0
Oceniający nr 12	5,5	1,2	5,5	4,5	1,2	6,5	5,5	5,1
<b>ŚREDNIA</b>	5,20	1,28	5,07	4,32	1,28	6,69	5,38	5,13

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krowi kwasowy (twarogowy) z mleka niepasteryzowanego – Szczepionka I**

Twarogowy						
Numer oceniającego	DESKRYPTORY (skala 1-9)					
	Wygląd	Barwa	Konsystencja	Zapach	Smak	Jakość ogólna
Oceniający nr 1	7	7	4	4	5	5
Oceniający nr 2	6	7	5	5	5	5
Oceniający nr 3	7	7	4	4	4	5
Oceniający nr 4	6	8	4	4	4	5
Oceniający nr 5	7	7	5	4	4	5
Oceniający nr 6	6	7	5	5	4	5
Oceniający nr 7	7	8	4	5	5	5
Oceniający nr 8	6	8	5	5	5	5
Oceniający nr 9	7	8	5	4	5	5
Oceniający nr 10	7	8	4	5	5	5
Oceniający nr 11	7	8	5	4	4	5
Oceniający nr 12	7	8	4	5	4	5
<b>ŚREDNIA</b>	6,67	7,58	4,50	4,50	4,50	5,00
<b>MEDIANA</b>	7,00	8,00	4,50	4,50	4,50	5,00

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka II**

Twarogowy								
Numer oceniającego	ZAPACH		SMAK			KONSYSTENCJA		Jakość ogólna
	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	obcy	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	kwaśny	obcy	wilgotność	grudkowatość	
Oceniający nr 1	7,3	0,0	7,3	4,9	0,0	7,7	5,8	8,0
Oceniający nr 2	6,7	0,0	7,3	5,1	0,0	7,5	5,5	7,9
Oceniający nr 3	7,7	0,0	7,3	4,9	0,0	7,5	5,8	8,0
Oceniający nr 4	6,8	0,0	7,2	5,2	0,0	7,8	5,5	7,9
Oceniający nr 5	7,4	0,0	7,7	5,2	0,0	7,7	5,7	7,6
Oceniający nr 6	7,3	0,0	7,3	5,4	0,0	7,1	5,4	7,7
Oceniający nr 7	7,4	0,0	7,7	4,8	0,0	7,4	5,5	7,8
Oceniający nr 8	6,7	0,0	7,3	5,2	0,0	7,3	5,7	7,9
Oceniający nr 9	7,6	0,0	7,6	4,7	0,0	7,2	5,6	7,7
Oceniający nr 10	7,5	0,0	7,2	4,5	0,0	7,8	5,5	7,9
Oceniający nr 11	7,4	0,0	7,6	4,7	0,0	7,5	5,7	7,8
Oceniający nr 12	7,3	0,0	7,1	5,5	0,0	7,5	5,8	7,9
<b>ŚREDNIA</b>	7,26	0,00	7,38	5,01	0,00	7,50	5,63	7,84

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krwi kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka II**

Twarogowy						
Numer oceniającego	DESKRYPTORY (skala 1-9)					
	Wygląd	Barwa	Konsystencja	Zapach	Smak	Jakość ogólna
Oceniający nr 1	8	8	8	8	9	8

Oceniający nr 2	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 3	8	8	7	8	8	8
Oceniający nr 4	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 5	7	8	8	7	7	7
Oceniający nr 6	7	8	8	8	8	8
Oceniający nr 7	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 8	8	8	8	7	7	8
Oceniający nr 9	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 10	7	7	7	8	8	8
Oceniający nr 11	8	8	7	8	7	7
Oceniający nr 12	8	8	8	8	8	8
<b>ŚREDNIA</b>	7,75	7,92	7,75	7,83	7,75	7,83
<b>MEDIANA</b>	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka niepasteryzowanego – Szczepionka II**

<b>Twarogowy</b>								
Numer oceniającego	ZAPACH		SMAK			KONSYSTENCJA		Jakość ogólna
	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	obcy	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	kwaśny	obcy	wilgotność	grudkowatość	
Oceniający nr 1	7	0,0	7,2	4,9	0,0	7,9	6,3	7,5
Oceniający nr 2	7,2	0,0	7,1	4,4	0,0	7,9	6,7	7,8
Oceniający nr 3	7,1	0,0	7,2	4,7	0,0	7,6	6,5	7,6
Oceniający nr 4	7,1	0,0	7,3	4,3	0,0	7,8	6,3	7,7
Oceniający nr 5	7,2	0,0	7,2	4,5	0,0	7,6	6,5	7,7
Oceniający nr 6	7,1	0,0	7,2	4,2	0,0	7,8	6,7	7,8
Oceniający nr 7	7,3	0,0	7,3	4,7	0,0	7,9	6,7	7,3
Oceniający nr 8	6,9	0,0	6,9	4,5	0,0	8,0	6,2	7,7
Oceniający nr 9	7,3	0,0	7,2	4,5	0,0	8,0	6,2	7,3
Oceniający nr 10	7,1	0,0	6,8	4,5	0,0	8,0	6,5	7,6
Oceniający nr 11	7,2	0,0	7,1	4,9	0,0	7,9	6,7	7,5
Oceniający nr 12	6,9	0,0	7,2	4,8	0,0	7,8	6,5	7,5
<b>ŚREDNIA</b>	7,12	0,00	7,14	4,58	0,00	7,84	6,48	7,58

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krwi kwasowy (twarogowy) z mleka niepasteryzowanego – Szczepionka II**

<b>Twarogowy</b>						
Numer oceniającego	DESKRYPTORY (skala 1-9)					
	Wygląd	Barwa	Konsystencja	Zapach	Smak	Jakość ogólna
Oceniający nr 1	8	8	8	8	7	8
Oceniający nr 2	9	9	8	8	8	8
Oceniający nr 3	7	7	7	8	7	7
Oceniający nr 4	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 5	8	7	7	7	7	7

Oceniający nr 6	7	7	7	7	7	7
Oceniający nr 7	9	9	8	8	8	8
Oceniający nr 8	8	8	8	8	8	7
Oceniający nr 9	9	9	8	8	8	8
Oceniający nr 10	7	8	7	8	8	8
Oceniający nr 11	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 12	8	8	7	7	7	7
<b>ŚREDNIA</b>	8,00	8,00	7,58	7,75	7,58	7,58
<b>MEDIANA</b>	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka III**

Twarogowy								
Numer oceniającego	ZAPACH		SMAK			KONSYSTENCJA		Jakość ogólna
	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	obcy	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	kwaśny	obcy	wilgotność	grudkowatość	
Oceniający nr 1	3,3	2,2	4,3	4,2	2,2	4,2	6,3	5,3
Oceniający nr 2	3,6	2,1	3,9	4,2	2,5	4,3	6,7	5,5
Oceniający nr 3	3,5	2,0	4,3	4,2	2,5	4,5	6,5	5,3
Oceniający nr 4	3,2	2,0	4,3	4,1	2,5	4,5	6,3	5,5
Oceniający nr 5	3,2	2,2	4,3	4,1	2,2	4,6	6,5	5,4
Oceniający nr 6	3,3	2,2	4,5	4,2	2,2	4,7	6,7	5,6
Oceniający nr 7	3,2	2,1	4,3	4,0	2,1	4,7	6,7	5,6
Oceniający nr 8	3,4	2,1	3,9	4,1	2,1	4,6	6,2	5,4
Oceniający nr 9	3,4	2,2	4,2	4,0	2,2	4,3	6,2	5,7
Oceniający nr 10	3,6	2,0	3,9	4,2	2,5	4,8	6,5	5,8
Oceniający nr 11	3,6	2,0	4,4	4,1	2,5	4,8	6,7	5,6
Oceniający nr 12	3,6	2,0	4,3	4,1	2,5	4,8	6,5	5,7
<b>ŚREDNIA</b>	3,41	2,09	4,22	4,13	2,33	4,57	6,48	5,53

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krowi kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka III**

Twarogowy						
Numer oceniającego	DESKRYPTORY (skala 1-9)					
	Wygląd	Barwa	Konsystencja	Zapach	Smak	Jakość ogólna
Oceniający nr 1	7	8	8	4	5	5
Oceniający nr 2	8	8	7	4	4	5
Oceniający nr 3	8	7	8	4	5	5
Oceniający nr 4	7	7	7	5	5	5
Oceniający nr 5	8	7	8	4	4	5
Oceniający nr 6	7	7	7	5	5	6
Oceniający nr 7	7	7	7	5	5	6
Oceniający nr 8	7	8	7	4	4	5
Oceniający nr 9	7	7	8	5	5	5

Oceniający nr 10	7	7	7	4	4	6
Oceniający nr 11	7	8	6	5	5	6
Oceniający nr 12	7	7	7	5	5	5
<b>ŚREDNIA</b>	7,25	7,33	7,25	4,50	4,67	5,33
<b>MEDIANA</b>	7,00	7,00	7,00	4,50	5,00	5,00

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka niepasteryzowanego – Szczepionka III**

<b>Twarogowy</b>								
Numer oceniającego	<b>ZAPACH</b>		<b>SMAK</b>			<b>KONSYSTENCJA</b>		<b>Jakość ogólna</b>
	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	obcy	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	kwaśny	obcy	wilgotność	grudkowatość	
Oceniający nr 1	3,3	2,5	3,9	4,2	2,6	7,2	5,3	4,7
Oceniający nr 2	3,1	2,5	3,9	4,2	2,5	7,2	5,7	4,3
Oceniający nr 3	3,1	2,5	4,3	4,2	2,6	7,1	5,5	3,9
Oceniający nr 4	3,2	2,5	4,1	4,1	2,6	7,1	5,3	4,5
Oceniający nr 5	3,2	2,5	4,3	4,1	2,6	7,3	5,5	4,7
Oceniający nr 6	3,1	2,6	4,5	4,2	2,5	7,1	5,7	3,5
Oceniający nr 7	3,2	2,6	4,3	4,2	2,5	7,1	5,5	3,5
Oceniający nr 8	3,4	2,3	3,9	4,1	2,4	7,3	5,2	4,5
Oceniający nr 9	3,4	2,6	4,2	4,2	2,4	7,6	5,3	4,5
Oceniający nr 10	3,4	2,4	3,9	4,2	2,4	7,1	5,5	4,5
Oceniający nr 11	3,3	2,4	4,4	4,1	2,3	7,2	5,7	3,5
Oceniający nr 12	3,3	2,5	4,3	4,1	2,3	7,2	5,5	3,5
<b>ŚREDNIA</b>	3,25	2,49	4,17	4,16	2,48	7,21	5,48	4,13

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krowi kwasowy (twarogowy) z mleka niepasteryzowanego – Szczepionka III**

<b>Twarogowy</b>						
Numer oceniającego	<b>DESKRYPTORY (skala 1-9)</b>					
	Wygląd	Barwa	Konsystencja	Zapach	Smak	Jakość ogólna
Oceniający nr 1	8	8	7	5	3	4
Oceniający nr 2	8	8	6	4	4	4
Oceniający nr 3	7	7	5	5	4	4
Oceniający nr 4	8	8	7	4	4	4
Oceniający nr 5	7	7	5	4	3	4
Oceniający nr 6	7	7	6	5	4	4
Oceniający nr 7	7	8	7	5	4	4
Oceniający nr 8	8	8	6	4	3	4
Oceniający nr 9	7	7	7	4	4	4

Oceniający nr 10	7	8	5	4	4	4
Oceniający nr 11	8	8	7	5	4	4
Oceniający nr 12	8	8	7	5	3	4
<b>ŚREDNIA</b>	7,50	7,67	6,25	4,50	3,67	4,00
<b>MEDIANA</b>	7,50	8,00	6,50	4,50	4,00	4,00

W kolejnej fazie prób technologicznych, do produkcji serów twarogowych wykorzystywano mleko krowie pasteryzowane oraz dwie wcześniej wyselekcjonowane szczepionki – I i II.

Oba uzyskane produkty oceniono na bardzo wysokim poziomie powyżej 8 pkt. zarówno z wykorzystaniem skali hedonicznej, jak i metody QDA.

Sery otrzymane przy użyciu szczepionki II charakteryzowały się bardziej zharmonizowanym smakiem i zapachem, w odniesieniu do analogicznego produktu wytworzonego z udziałem Szczepionki I. W przypadku sera ocenionego na niższym poziomie, nadal wyczuwalny był nieznaczny posmak określany jako „posmak przypalonego mleka”.

W Tabelach zestawiono uzyskane dla ocenianych serów przykładowe wyniki.

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka I**

Twarogowy								
Numer oceniającego	ZAPACH		SMAK			KONSYSTENCJA		Jakość ogólna
	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	obcy	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	kwaśny	obcy	wilgotność	grudkowatość	
Oceniający nr 1	8,7	0,0	8,5	6,6	0,0	8,8	8,8	8,5
Oceniający nr 2	8,5	0,0	8,4	6,4	0,0	8,0	8,1	8,5
Oceniający nr 3	7,5	0,0	7,5	6,0	0,0	7,2	7,2	7,7
Oceniający nr 4	8,0	0,0	8,2	6,3	0,0	7,4	8,0	8,3
Oceniający nr 5	8,2	0,0	8,1	6,5	0,0	8,1	8,0	8,1
Oceniający nr 6	7,5	0,0	7,5	6,7	0,0	7,0	7,3	7,5
Oceniający nr 7	8,5	0,0	8,4	6,2	0,0	8,2	8,2	7,4
Oceniający nr 8	7,5	0,0	7,9	6,5	0,0	8,3	7,5	8,6
Oceniający nr 9	9,5	0,0	7,5	6,2	0,0	7,4	8,9	8,5
Oceniający nr 10	6,4	0,0	7,6	6,8	0,0	7,3	7,2	8,5
Oceniający nr 11	7,7	0,0	7,3	6,8	0,0	7,1	8,6	7,7
Oceniający nr 12	7,5	0,0	7,2	6,1	0,0	8,1	7,8	8,1
<b>ŚREDNIA</b>	7,96	0,00	7,84	6,43	0,00	7,74	7,97	8,12

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krowi kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka I**

Twarogowy						
Numer oceniającego	DESKRYPTORY (skala 1-9)					
	Wygląd	Barwa	Konsystencja	Zapach	Smak	Jakość ogólna
Oceniający nr 1	9	9	9	9	9	9

Oceniający nr 2	8	9	8	9	9	9
Oceniający nr 3	7	8	7	7,5	7,5	7,5
Oceniający nr 4	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 5	7	8	8	8	7	8
Oceniający nr 6	8	8	8	8	7	7,5
Oceniający nr 7	8	9	8	9	9	9
Oceniający nr 8	7	8	7	7	7	7
Oceniający nr 9	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 10	8	8	8	9	8	8
Oceniający nr 11	8	8	7	8	7,5	7,5
Oceniający nr 12	8	8	7	8	7,5	7,5
<b>ŚREDNIA</b>	8,00	8,42	7,92	8,38	8,04	8,17
<b>MEDIANA</b>	8,00	8,00	8,00	8,50	7,75	8,00

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka II**

<b>Twarogowy</b>								
Numer oceniającego	<b>ZAPACH</b>		<b>SMAK</b>			<b>KONSYSTENCJA</b>		<b>Jakość ogólna</b>
	<b>śmietanowy/ mleczny/twarogowy</b>	<b>obcy</b>	<b>śmietanowy/ mleczny/twarogowy</b>	<b>kwaśny</b>	<b>obcy</b>	<b>wilgotność</b>	<b>grudkowatość</b>	
Oceniający nr 1	9,1	0,0	8,4	6,4	0,0	6,5	7,2	9,3
Oceniający nr 2	8,8	0,0	8,5	5,2	0,0	7,0	7,0	8,6
Oceniający nr 3	7,2	0,0	7,0	5,2	0,0	6,5	7,7	7,8
Oceniający nr 4	7,4	0,0	7,3	5,6	0,0	6,6	7,3	7,1
Oceniający nr 5	7,2	0,0	7,2	5,1	0,0	6,5	7,1	7,5
Oceniający nr 6	7,2	0,0	7,2	5,5	0,0	6,7	7,5	7,2
Oceniający nr 7	7,1	0,0	7,1	6,2	0,0	7,0	6,9	8,4
Oceniający nr 8	9,0	0,0	8,6	5,5	0,0	7,5	6,6	9,0
Oceniający nr 9	9,4	0,0	8,2	5,5	0,0	6,5	7,6	9,7
Oceniający nr 10	7,9	0,0	8,0	5,8	0,0	6,5	7,5	9,3
Oceniający nr 11	7,8	0,0	7,8	5,1	0,0	7,7	6,1	8,1
Oceniający nr 12	8,5	0,0	8,0	5,5	0,0	7,5	6,2	8,5
<b>ŚREDNIA</b>	8,05	0,00	7,78	5,55	0,00	6,88	7,06	8,38

**Tabela. Przykładowe zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krowi kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka II**

<b>Twarogowy</b>						
Numer oceniającego	<b>DESKRYPTORY (skala 1-9)</b>					
	<b>Wygląd</b>	<b>Barwa</b>	<b>Konsystencja</b>	<b>Zapach</b>	<b>Smak</b>	<b>Jakość ogólna</b>
Oceniający nr 1	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 2	9	9	8	8	8,5	8,5
Oceniający nr 3	9	8	8	7	7	8
Oceniający nr 4	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 5	8	8	9	8	8	8,5



Oceniający nr 6	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 7	9	9	8	8	8,5	8,5
Oceniający nr 8	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 9	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 10	8	8	8	9	8	8,5
Oceniający nr 11	8	8	7	7	7,5	7,5
Oceniający nr 12	8	8	7	7	8	8
<b>ŚREDNIA</b>	8,50	8,42	8,17	8,08	8,21	8,38
<b>MEDIANA</b>	8,50	8,00	8,00	8,00	8,00	8,50

W ostatnim etapie ocenie poddawano ser twarogowy otrzymany przy użyciu szczepionki, dzięki której otrzymano produkt o najbardziej pożądanym cechach. Odznaczał się on białokremową barwą, śmietanowo - jogurtowym zapachem i zharmonizowanym smakiem. Posiadał odpowiednią konsystencję, która pozwalała zachować kształt i nie utrudniała krojenia.

W tabeli poniżej zestawiono oceny dla finalnego produktu.

**Tabela. Zestawienie ocen z analizy sensorycznej metodą QDA - Ser kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka ostateczna**

Twarogowy								
Numer oceniającego	ZAPACH		SMAK			KONSYSTENCJA		Jakość ogólna
	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	obcy	śmietanowy/ mleczny/twarogowy	kwaśny	obcy	wilgotność	grudkowatość	
Oceniający nr 1	8,3	0,0	8,2	5,6	0,0	8,1	6,2	9,5
Oceniający nr 2	8,2	0,0	7,7	6,4	0,0	7,9	6,3	8,3
Oceniający nr 3	7,9	0,0	8,2	6,5	0,0	7,0	6,7	8,3
Oceniający nr 4	8,4	0,0	8,5	5,9	0,0	8,0	6,8	9,2
Oceniający nr 5	8,2	0,0	8,3	5,6	0,0	8,3	6,8	9,7
Oceniający nr 6	7,8	0,0	7,8	5,1	0,0	8,0	6,8	9,0
Oceniający nr 7	8,1	0,0	8,3	6,7	0,0	7,5	7,3	8,2
Oceniający nr 8	7,8	0,0	8,2	5,1	0,0	8,3	6,4	8,1
Oceniający nr 9	8,2	0,0	9,2	5,8	0,0	8,4	6,6	9,5
Oceniający nr 10	7,9	0,0	8,1	5,8	0,0	7,7	6,3	10,0
Oceniający nr 11	7,8	0,0	7,8	5,1	0,0	8,0	6,8	9,0
Oceniający nr 12	7,9	0,0	7,9	5,5	0,0	8,1	6,5	9,0
<b>ŚREDNIA</b>	8,04	0,00	8,18	5,76	0,00	7,94	6,63	8,98

**Tabela. Zestawienie ocen z analizy sensorycznej przy użyciu skali hedonicznej - Ser krowi kwasowy (twarogowy) z mleka pasteryzowanego – Szczepionka ostateczna**

Twarogowy						
Numer oceniającego	DESKRYPTORY (skala 1-9)					
	Wygląd	Barwa	Konsystencja	Zapach	Smak	Jakość ogólna

Oceniający nr 1	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 2	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 3	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 4	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 5	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 6	8	8	8	9	9	8,5
Oceniający nr 7	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 8	8	8	8	8	8	8
Oceniający nr 9	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 10	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 11	9	9	9	9	9	9
Oceniający nr 12	9	9	9	9	9	9
<b>ŚREDNIA</b>	8,67	8,67	8,67	8,75	8,75	8,71
<b>MEDIANA</b>	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00

Wyprodukowane z wykorzystaniem ostatecznej szczepionki sery, ocenione zostały bardzo wysoko, a ich właściwości organoleptyczne były wysoce pożądane. Sery twarogowe po opracowaniu technologii produkcji uzyskiwały powtarzalne i stabilne wyniki. Jakość ogólną oceniono na poziomie około 9 pkt, a wyniki uzyskane metodą QDA, były porównywalne do rezultatów otrzymanych przy użyciu skali hedonicznej.

### **Zawartość wolnych aminokwasów**

**Hydroliza próbki sera:** Do niesterylnej probówki wirówkowej o pojemności 15 ml odważono 1,0 g dobrze rozdrobnionej próbki sera i zalano 5 ml kwasu solnego o stężeniu 6 mol/l. Przeprowadzono proces hydrolizy w czasie 5h w temperaturze 120°C do rozтворzenia matrycy próbki. Następnie pobrano 1 ml próbki i rozcieńczono wodą dejonizowaną w kolbie miarowej o objętości 100 ml. Następnie próbkę (ok. 2 ml) przefiltrowano przez filtr strzykawkowy 0,2 µm. Pobrano 100 µl próbki, dodano do fiolki HPLC i dopełniono do końcowej objętości 1000 µl wodą dejonizowaną. (Ostateczne rozcieńczenie próbki 10000x).

**Przygotowanie próbki do analizy:** wykorzystano reakcję derywatywacji przeprowadzaną bezpośrednio w igle chromatografu. Do 14 µl próbki sera dodawano 25 µl odczynnika derywatyzującego o stężeniu 1 mg/ml (aldehydu o-ftalowego) oraz 1 µl odczynnika sprzęgającego reakcję derywatywacji (chlorowodorek 2-(dimetyloamino)etanotolu) o stężeniu 10 mg/ml. Czas prowadzenia derywatywacji wynosił 3 minuty.

### **Warunki chromatograficzne:**

- kolumna chromatograficzna Acclaim PolarAdvantage (C16 5  $\mu\text{m}$  120Å 4,6 x 150 mm),
- prędkość przepływu fazy ruchomej: 1,2 ml/min,
- długość fali wzbudzenia i emisji: 340 nm i 440 nm i czułość na poziomie 6,
- temperatura autosamplera: 20°C,
- temperatura kolumny: 30°C,
- objętość nastrzyku: 40  $\mu\text{l}$ .

**Faza ruchoma składała się z:**

**A** - Acetonitrylu

**B** - Metanolu

**C** – Bufor fosforanowego o stężeniu 3g/l z dodatkiem 1 ml dietyloaminy.

**Tabela Profil zastosowanego gradientowego sposobu elucji**

No.	Time	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	Run				
2	0,000	1,200	10,0	90,0	0,0	5
3	2,000	1,200	10,0	90,0	0,0	5
4	20,000	1,200	0,0	60,0	0,0	5
5	32,000	1,200	0,0	35,0	0,0	5
6	38,000	1,200	10,0	90,0	0,0	5
7	43,000	1,200	10,0	90,0	0,0	5
8	<i>New Row</i>					
9	43,000	Stop Run				

Czas analizy jednej próbki wynosił 43 minuty.

**5. UZYSKANE WYNIKI**

**Ocena i dostosowanie warunków środowiskowych do wymogów higieny produkcji (GMP, GHP) innowacyjnych, spersonalizowanych serów twarogowych wytwarzanych z pasteryzowanego mleka krowiego.**

Oceniono warunki środowiskowe do wymogów higieny produkcji serów twarogowych z pasteryzowanego mleka. Badania czystości powierzchni, rąk pracowników, powietrza i wody

wykonywano w gospodarstwie oraz w mleczarni, a wyniki monitoringu zaprezentowano w tabelach przedstawionych poniżej (Tabela 8-12).

Tabela Monitoring czystości powierzchni w gospodarstwie

Miejsce pobrania próbki	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/cm <sup>2</sup> ]	Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> [jtk/cm <sup>2</sup> ]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm <sup>2</sup> ]
Ręce pracownik 1	1,23÷2,87	0,00	0,08÷2,87
Ręce pracownik 2	1,63÷3,74	0,00	0,08÷0,12
Dojarka 1	3,34÷5,37	0,00÷1,78	0,00
Dojarka 2	4,42÷6,34	0,25÷2,64	0,04÷0,12
Wymiona krowa 1	>10,00	0,08÷2,36	>10,00
Wymiona krowa 2	>10,00	0,12÷3,34	>10,00

Tabela Monitoring czystości powierzchni produkcyjnych w mleczarni

Miejsce pobrania próbki	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/cm <sup>2</sup> ]	Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> [jtk/cm <sup>2</sup> ]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm <sup>2</sup> ]
Ręce pracownik 1	0,94÷2,64	0,00	0,34÷3,44
Ręce pracownik 2	1,63÷3,74	0,00	0,08÷3,80
Błat w serowni	0,00÷1,14	0,00	0,54÷1,12
Schładzalnik na mleko	0,00÷4,98	0,00÷1,48	0,08÷0,54
Kocioł serowarski	3,48÷4,88	0,00	0,48÷1,22
Praska	4,32÷5,76	0,00	0,00÷1,08
Ściany w serowni	4,84÷7,08	0,00	0,00÷0,68
Podłoga w serowni	4,12÷>10,00	0,00	0,00÷0,52
Półka w serowni	1,14 ÷0,52	0,00	0,00-0,12

Tabela Monitoring czystości powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych w mleczarni

Miejsce pobrania próbki	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/m <sup>3</sup> powietrza]	Liczba drożdży i pleśni, [jtk/m <sup>3</sup> powietrza]
Serownia	$2,9 \times 10^2 \div 2,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2 \div 3,1 \times 10^3$
Chłodnia	$6,6 \times 10^1 \div 5,6 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1 \div 4,6 \times 10^2$

Tabela Jakość mikrobiologiczna wody w gospodarstwie

Ogólna liczba kolonii w 22°C [jtk/ml]	Ogólna liczba kolonii w 37°C [jtk/ml]	Liczba bakterii z grupy coli [jtk/100 ml]	Liczba <i>E. coli</i> [jtk/100 ml]	Liczba enterokoków [jtk/100 ml]
6÷16	0÷24	0	0	0

Tabela Jakość mikrobiologiczna wody w mleczarni

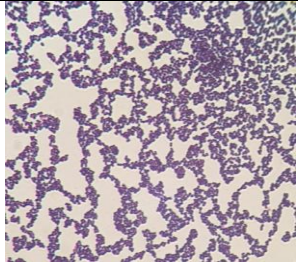
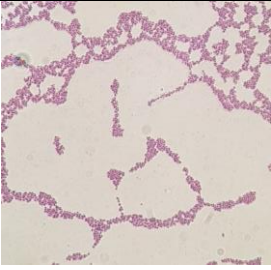
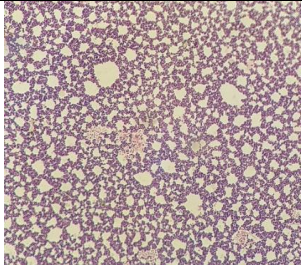
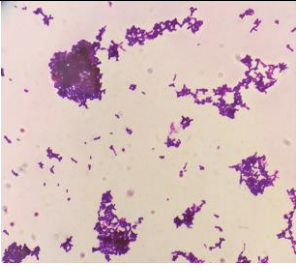
Ogólna liczba kolonii w 22°C [jtk/ml]	Ogólna liczba kolonii w 37°C [jtk/ml]	Liczba bakterii z grupy coli [jtk/100 ml]	Liczba <i>E. coli</i> [jtk/100 ml]	Liczba enterokoków [jtk/100 ml]
0	0	0	0	0

### Izolacja i identyfikacja bakterii mlekowych z lokalnego środowiska do opracowania kultury startowej

Bakterie fermentacji mlekowej oraz bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* spp. wyizolowane ze środowiska poddawano identyfikacji fenotypowej. Opisano wzrost izolatów na podłożu TSA (Fot.1). Żaden z wybranych szczepów nie wykazywał zdolności produkcji katalazy. W utrwalonych preparatach mikroskopowych, barwionych metodą Grama zaobserwowano Gram-dodatnie bakterie, które w zależności od gatunku przybierały kształt ziarniaków lub pałeczek. Wybrane izolaty bakterii kwasu mlekowego poddawano testom biochemicznym używając zestawu API 50 CH®, używając podłoża API 50 CHL, w celu określenia przynależności rodzajowej i gatunkowej. Ze wszystkich zbadanych próbek mleka, serwatki i sera wyizolowano i zidentyfikowano następujące szczepy: *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactilactobacillus curvatus*, *Leuconostoc lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. Bakterie kwasu mlekowego oraz drobnoustroje z rodzaju *Bifidobacterium* spp. przechowywano w temperaturze -80°C, używając systemu do mrożenia drobnoustrojów – Protect Microorganism Preservation System (Technical Service Consultants Ltd, Wielka Brytania).

Fot. 1. Przykładowe preparaty mikroskopowe izolatów środowiskowych bakterii fermentacji mlekowej oraz bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. barwione metodą Grama (10x100, imersja)

Gram dodatnie ziarniaki	Gram dodatnie pałeczki	Gram dodatnie ziarniaki	Gram-dodatnie pałeczki ( <i>Bifidobacterium</i> spp.)
-------------------------	------------------------	-------------------------	---

			
kolonie okrągłe, drobne, wypukłe, przejrzyste, błyszczące, o równym brzegu, o średnicy 1 mm	kolonie okrągłe, wypukłe, żółtawe, matowe, o równym brzegu, o średnicy 1-2 mm	kolonie okrągłe, duże, wypukłe, żółtawe, błyszczące, o nierównym brzegu, o średnicy 2-5 mm	kolonie okrągłe lub soczewkowate, lekko wypukłe, białawe, błyszczące, o równym brzegu, o średnicy 1-4 mm

### Jakość mikrobiologiczna próbek surowego mleka krowiego oraz produkowanych serów

W czasie trwania projektu, badano, pod względem mikrobiologicznym, pochodzące od rolnika wchodzącego w skład konsorcjum surowe mleko krowie oraz próbki serów. Wyniki mikrobiologiczne przeanalizowanych próbek uśredniano i przedstawiano w postaci logarytmu dziesiętnego ze średniej liczby jednostek koloniotwórczych [log jtk/ml lub g]. Wyniki badań mikrobiologicznych przedstawiono w tabelach poniżej.

Tabela Jakość mikrobiologiczna próbek surowego mleka krowiego w gospodarstwie

Parametr mikrobiologiczny	Liczba drobnoustrojów w surowym mleku krowim [log jtk/ml]			
	Etap I	Etap II	Etap III	Etap IV
<i>Enterobacteriaceae</i>	4,4±0,04 ÷ 4,9±0,02	4,2±0,01 ÷ 5,2±0,02	< 1,00 ÷ 4,1±0,01	< 1,00 ÷ 2,9±0,01
<i>E. coli</i>	2,1±0,04 ÷ 2,6±0,01	< 1,00 ÷ 1,6±0,03	< 1,00 ÷ 2,5±0,02	< 1,00 ÷ 1,5±0,02
GKD	< 1,00 ÷ 1,2±0,02	< 1,00 ÷ 2,7±0,03	< 1,00 ÷ 2,4±0,03	< 1,00
LAB	5,8 ±0,02 ÷ 7,1±0,03	6,0 ±0,02 ÷ 8,2±0,02	4,7±0,05 ÷ 5,9±0,05	6,2±0,03 ÷ 7,7±0,14
<i>Bifidobacterium spp.</i>	< 1,00 ÷ 2,6±0,01	< 1,00 ÷ 2,9±0,02	2,1±0,04 ÷ 3,1±0,02	1,9±0,03 ÷ 2,5±0,02
OLD	5,9±0,06 ÷ 7,4±0,04	4,2±0,01 ÷ 7,5±0,03	3,7±0,02 ÷ 7,1±0,05	3,2±0,02 ÷ 4,8±0,02
CP	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
P	5,1±0,04 ÷ 5,57±0,03	1,4±0,02 ÷ 4,8±0,02	1,6±0,03 ÷ 3,8±0,04	< 1,00 ÷ 2,3±0,06
Bc	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Pleśnie	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Drożdże	2,7±0,03 ÷ 5,0±0,07	2,3±0,01 ÷ 5,4±0,03	4,2±0,03 ÷ 6,3±0,04	2,4±0,03 ÷ 5,7±0,05

Skróty: GKD- gronkowce koagulazododatnie, *E. coli*- *Escherichia coli*, LAB – mezofilne bakterie fermentacji mlekowej, OLD- ogólna liczba drobnoustrojów, CP- *Clostridium perfringens*, P-*Pseudomonas sp.*, Bc- *Bacillus cereus*,

Tabela 14. Obecność patogenów w próbkach surowego mleka krowiego

Parametr	Obecność patogenów w 25 ml [-]
----------	--------------------------------

<b>mikrobiologiczny</b>	<b>Etap I</b>	<b>Etap II</b>	<b>Etap III</b>	<b>Etap IV</b>
<i>Campylobacter spp.</i>	nw	nw	nw	nw
<i>Salmonella spp.</i>	nw	nw	nw	nw
<i>L. monocytogenes</i>	nw	nw	nw	nw

Skróty: nw- nie wykryto, *L. monocytogenes* – *Listeria monocytogenes*, w-wykryto

Tabela Jakość mikrobiologiczna próbek twarogu z surowego mleka krowiego

<b>Parametr mikrobiologiczny</b>	<b>Liczba drobnoustrojów w twarogu [log jtk/g]</b>			
	<b>Etap I</b>	<b>Etap II</b>	<b>Etap III</b>	<b>Etap IV</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,1±0,03 ÷ 2,8±0,01	2,0±0,03÷4,2 ±0,06	< 1,00 ÷ 2,3±0,03	< 1,00
<i>E. coli</i>	< 1,00 ÷ 2,2±0,03	2,1±0,04 ÷ 3,7±0,02	<1,00 ÷ 2,0±0,08	< 1,00
GKD	< 1,00÷3,7±0,03	< 1,00÷2,4±0,03	< 1,00	< 1,00
LAB	6,1 ±0,03 ÷ 7,6±0,05	6,5±0,07 ÷ 8,8±0,03	6,9±0,02 ÷ 8,4±0,04	5,7±0,01 ÷ 8,3±0,03
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2,9 ±0,03 ÷ 4,5±0,02	1,9 ±0,03 ÷ 2,6±0,02	2,0 ±0,03 ÷ 4,8±0,08	3,9±0,02 ÷ 5,1±0,02
OLD	6,6±0,04÷8,3±0,03	7,9 ±0,05÷8,9±0,03	5,0±0,03 ÷ 7,7±0,07	7,9 ±0,03÷8,3±0,02
CP	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
P	3,3±0,04 ÷ 5,7±0,02	1,8±0,06 ÷ 3,6±0,03	1,4±0,06 ÷ 3,2±0,05	1,8±0,06÷2,3±0,04
Cl	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Bc	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Pleśnie	1,0±0,05 ÷ 3,1±0,02	< 1,00	2,9±0,02 ÷ 3,4±0,04	< 1,00
Drożdże	1,9±0,02 ÷ 3,9±0,03	5,0±0,07 ÷ 5,7 ±0,08	2,3±0,03 ÷ 3,6±0,05	2,4±0,03 ÷ 4,0±0,06

Skróty: GKD – gronkowce koagulazododatnie, *E. coli*- *Escherichia coli*, LAB – mezofilne bakterie fermentacji mlekowej, OLD – ogólna liczba drobnoustrojów, LCP- *Clostridium perfringens*, P-*Pseudomonas sp.*, Bc- *Bacillus cereus*,

Tabela Obecność patogenów w próbkach twarogu z surowego mleka krowiego

<b>Parametr mikrobiologiczny</b>	<b>Obecność patogenów w 25 g [-]</b>			
	<b>Etap I</b>	<b>Etap II</b>	<b>Etap III</b>	<b>Etap IV</b>
<i>Campylobacter spp.</i>	nw	nw	nw	nw
<i>Salmonella spp.</i>	nw	nw	nw	nw
<i>L. monocytogenes</i>	nw	nw	nw	nw

Skróty: nw- nie wykryto, *L. monocytogenes* – *Listeria monocytogenes*

W żadnej z badanych próbek surowego mleka oraz serów twarogowych z niego powstałych, nie stwierdzono obecności takich patogenów jak *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* czy

*Campylobacter* spp. Wszystkie sery wyprodukowane z niepasteryzowanego mleka oraz surowe mleko były bezpiecznie mikrobiologicznie.

Zaprojektowano i wytworzono trzy kultury środowiskowe, przy użyciu których wytworzono twarogi, które w kolejnych krokach poddano badaniom jakościowym: mikrobiologicznym, fizykochemicznym oraz sensorycznym. Zgodnie z otrzymanymi wynikami badań, wybrano szczepionkę, z dodatkiem której sery twarogowe uzyskały najlepsze wyniki sensoryczne. Szczepionka ta zawierała następujące drobnoustroje: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum* i *Levilactobacillus brevis* oraz drobnoustroje z rodzaju *Bifidobacterium* spp. W celu wytworzenia szczepionki, niskopasteryzowane mleko zaszczepiano ww. drobnoustrojami i pozostawiano aż do osiągnięcia pH 4,6. Tak przygotowaną szczepionkę używano do produkcji twarogu, lub poddawano mrożeniu w -80 °C. Przeżywalność drobnoustrojów w szczepionce po procesie mrożenia kształtowała się na bardzo wysokim poziomie, zbliżonym do liczby drobnoustrojów przed procesem mrożenia.

**Tabela Przeżywalność drobnoustrojów w szczepionce poddanej procesowi mrożenia**

Parametr mikrobiologiczny	Liczba drobnoustrojów w szczepionce [log jtk/g]	
	Przed procesem mrożeniem	Po procesie mrożenia
LAB	9,0 ± 0,01	8,9 ± 0,01
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,9 ± 0,01	6,9 ± 0,04

**Tabela Jakość mikrobiologiczna próbek twarogu z pasteryzowanego mleka wyprodukowanego z użyciem wybranej szczepionki środowiskowej**

Parametr mikrobiologiczny	Liczba drobnoustrojów w twarogu [log jtk/g]		
	Etap II	Etap III	Etap IV
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 1,00	< 1,00	< 1,00
<i>E. coli</i>	< 1,00	< 1,00	< 1,00
GKD	< 1,00	< 1,00	< 1,00
LAB	6,6±0,04 ÷ 8,8±0,05	6,0±0,02 ÷ 6,7±0,04	5,7±0,01 ÷ 8,3±0,03
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1,9 ±0,03 ÷ 4,5±0,02	3,0 ±0,03 ÷ 6,1±0,08	3,7±0,02 ÷ 5,6±0,02
OLD	7,7 ±0,05÷8,6±0,02	6,3±0,03 ÷ 7,9±0,03	8,0 ±0,02÷8,3±0,05
CP	< 1,00	< 1,00	< 1,00
P	< 1,00	< 1,00	< 1,00



Cl	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Bc	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Pleśnie	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Drożdże	< 1,00	< 1,00	< 1,00

Skróty: GKD – gronkowce koagulazododatnie, *E. coli*- Escherichia coli, LAB – mezofilne bakterie fermentacji mlekowej, OLD – ogólna liczba drobnoustrojów, LCP- *Clostridium perfringens*, P-*Pseudomonas* sp., Bc-*Bacillus cereus*,

**Tabela Obecność patogenów w próbkach twarogu z pasteryzowanego mleka wyprodukowanego z użyciem kultury środowiskowej**

Parametr mikrobiologiczny	Obecność patogenów w 25 g [-]		
	Etap II	Etap III	Etap IV
<i>Campylobacter spp.</i>	nw	nw	nw
<i>Salmonella spp.</i>	nw	nw	nw
<i>L. monocytogenes</i>	nw	nw	nw

Skróty: nw- nie wykryto, *L. monocytogenes* – *Listeria monocytogenes*

Z uwagi na to, że zastosowanie startowej kultury środowiskowej do produkcji serów z mleka surowego umożliwia utrzymanie złożonej, charakterystycznej dla danego regionu mikrobioty serów, a także poprzez obecność dużej liczby bakterii kwasu mlekowego, może zapobiegać procesowi psucia serów z niepasteryzowanego mleka i rozwojowi gatunków potencjalnie patogennych, wyprodukowano również sery z mleka niepasteryzowanego, używając do ich produkcji zaprojektowaną szczepionkę.

**Tabela Jakość mikrobiologiczna próbek twarogu z niepasteryzowanego mleka wyprodukowanego z użyciem wybranej szczepionki środowiskowej**

Parametr mikrobiologiczny	Liczba drobnoustrojów w twarogu [log jtk/g]
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 1,00
<i>E. coli</i>	< 1,00
GKD	< 1,00
LAB	5,3 ± 0,36
<i>Bifidobacterium spp.</i>	3,0 ± 1,18
OLD	6,5 ± 0,88
CP	< 1,00
P	< 1,00
Cl	< 1,00

Bc	< 1,00
Pleśnie	< 1,00
Drożdże	3,0 ± 0,35

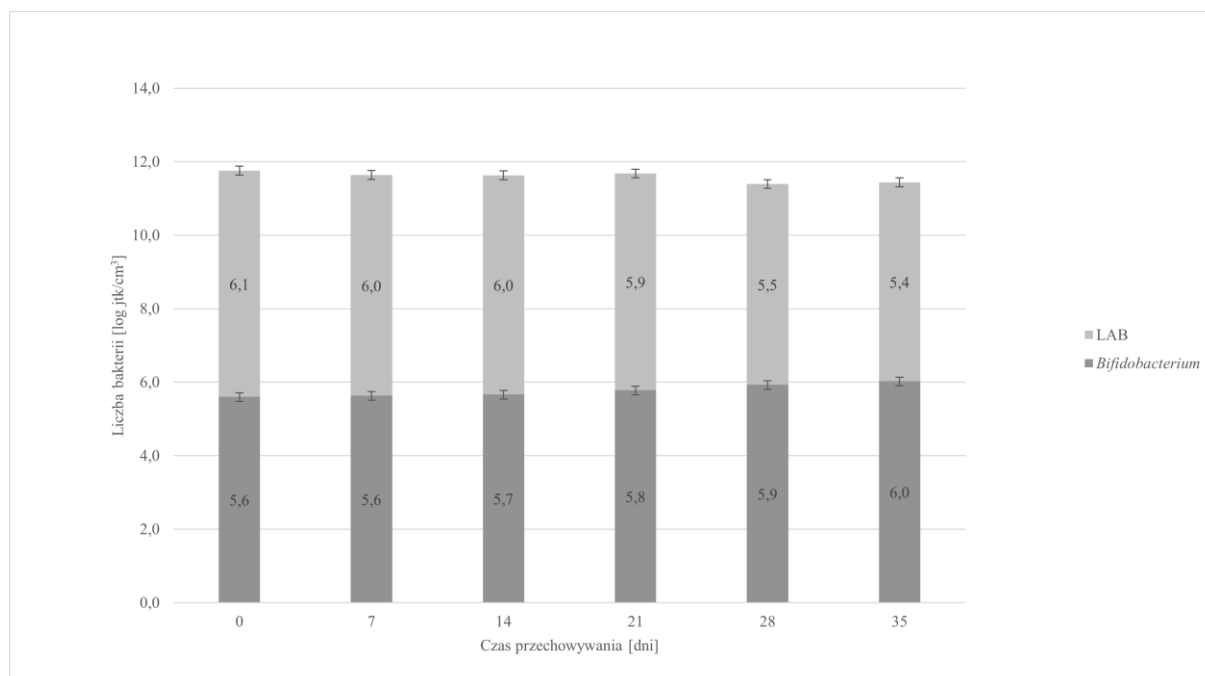
Skróty: GKD – gronkowce koagulazododatnie, *E. coli*- Escherichia coli, LAB – mezofilne bakterie fermentacji mlekowej, OLD – ogólna liczba drobnoustrojów, LCP- *Clostridium perfringens*, P-*Pseudomonas* sp., Bc-*Bacillus cereus*,

**Tabela Obecność patogenów w próbkach twarogu z niepasteryzowanego mleka wyprodukowanego z użyciem kultury środowiskowej**

Parametr mikrobiologiczny	Obecność patogenów w 25 g [-]
<i>Campylobacter</i> spp.	nw
<i>Salmonella</i> spp.	nw
<i>L. monocytogenes</i>	nw

Skróty: nw- nie wykryto, *L. monocytogenes* – *Listeria monocytogenes*

Sery wyprodukowane z niepasteryzowanego i pasteryzowanego mleka z dodatkiem kultury środowiskowej były bezpieczne mikrobiologicznie i zapewniały wysoką liczbę bakterii kwasu mlekowego. Twarogi powstałe z mleka pasteryzowanego charakteryzowały się wyższą liczbą bifidobakterii, niż twarogi powstałe z mleka pasteryzowanego.



**Rys.1. Przeżywalność środowiskowych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz bakterii kwasu mlekowego w twarogu z mleka pasteryzowanego, wyprodukowanym z wykorzystaniem lokalnych bakterii**

Środowiskowe *Bifidobacterium* spp. charakteryzowały się bardzo dobrą przeżywalnością w serach twarogowych, przewyższając po 35 dniach przechowywania swoją początkową liczbę.

### **Aktywność wody**

Aktywność wody jest głównym czynnikiem ograniczającym oraz zapobiegającym wzrostowi drobnoustrojów. W wielu przypadkach jest zasadniczym elementem wpływającym na stabilność żywności poprzez modulowanie reakcji mikroorganizmów. Wartość  $a_w$  poniżej 0,61 zapewnia stabilność produktów, ograniczając rozwój wszystkich drobnoustrojów. Wzrost kilku rodzajów pleśni możliwy jest już w produktach przekraczających wartość 0,61. Optymalny wzrost bakterii, zapewnia  $a_w$  w zakresie  $0,91 \div 1,00$ , w którym to mieszczą się wyniki prezentowanych badań. Aktywność wody w powstałych serach twarogowych kształtowała się na bardzo wysokim poziomie, umożliwiającym dobry wzrost drobnoustrojów, w tym mikroflory niepożądanego technologicznie. Dzięki jednak opracowanej kulturze startowej produkty były stabilne mikrobiologicznie w czasie całego planowanego okresu przydatności do spożycia.

**Tabela. Aktywność wody w różnego typu serach z surowego mleka**

<b>Rodzaj sera</b>	<b><math>a_w</math> [-]</b>
Twaróg z mleka krowiego	$0,998 \div 1,000$

### **Właściwości fizykochemiczne serów twarogowych**

Badaniami objęto dwa rodzaje serów twarogowych z mleka: niepasteryzowanego i pasteryzowanego. Po opracowaniu procesu technologicznego produkcji serów z niepasteryzowanego i pasteryzowanego mleka krowiego z dodatkiem opracowanej kultury startowej bakterii kwasu mlekowego, uzyskano powtarzalność parametrów fizykochemicznych gotowych produktów. Badano pH i kwasowość w przygotowanych serach z dodatkiem trzech różnych szczepionek. Wartość pH w poszczególnych serach twarogowych utrzymywała się na poziomie pomiędzy 4,58 a 4,85. Kwasowość w serach z mleka pasteryzowanego i niepasteryzowanego była na podobnym poziomie i wynosiła średnio 67,50 SH°. W Tabeli poniżej przedstawione zostały przykładowe wyniki pomiarów wartości pH i kwasowości serów pasteryzowanych i niepasteryzowanych z dodatkiem trzech różnych szczepionek.

**Tabela Właściwości fizykochemiczne przykładowych próbek serów twarogowych wyprodukowanych z mleka pasteryzowanego i niepasteryzowanego z dodatkiem szczepionek**

PRÓBKA	średnia pH	Średnia Kwasowość SH°
Twaróg szczepionka I pasteryzowane	4,85	65,0
Twaróg szczepionka I niepasteryzowane	4,79	64,0
Twaróg szczepionka II pasteryzowane	4,76	68,0
Twaróg szczepionka II niepasteryzowane	4,73	67,0
Twaróg szczepionka III pasteryzowane	4,59	58,0
Twaróg szczepionka III niepasteryzowane	4,67	57,0

Przebadane próbki serów były źródłem pożądanych ze względów żywieniowych kwasów tłuszczowych, takich jak: krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym sprzężonego kwasu linolowego. W analizowanych próbkach serów, niezależnie od zastosowanej szczepionki, głównym przedstawicielem zarówno kwasów nasyconych, jak również wszystkich kwasów tłuszczowych był kwas palmitynowy (C:16). Ponadto, w grupie nasyconych kwasów tłuszczowych, oznaczono kwas stearynowy (C18:0), mirystynowy (C14:0) i laurynowy (C12:0). Stwierdzono również obecność krótkołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych, pełniących ważne funkcje biologiczne w organizmie człowieka w tym kwasu masłowego (C 4:0) uznanego za potencjalny czynnik inhibitujący rozwój komórek nowotworowych. Na szczególną uwagę zasługuje w badanych serach obecność sprzężonego kwasu linolowego (cis9trans11 C18:2, CLA). Kwas linolowy o wiązaniach sprzężonych (cis9trans11 C18:2) jest dominującym składnikiem sprzężonych dienów tłuszczu mlekowego. Przypisuje się mu właściwości m.in. przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe. Zawartość CLA w tłuszczu mlekowym jest zależna od typu żywienia krów. Wyższe zawartości tego kwasu występują w tłuszczu mleka pochodzącym z okresu żywienia pastwiskowego, niższe w tłuszczu mleka z okresu żywienia oborowego. W analizowanych profilach kwasów tłuszczów wchodzących w skład spersonalizowanych serów twarogowych oceniano również zawartość izomerów trans nienasyconych kwasów tłuszczowych ze względu na niekorzystny ich wpływ na organizm człowieka. We wszystkich objętych badaniem twarogach stwierdzano niewielką ilość izomerów trans kwasu C18:1 trans (tabela poniżej).

**Tabela. Przykładowe wyniki składu kwasów tłuszczowych w badanych próbkach serów (średnia ± odchylenie standardowe, n=3)**

Parametr	Twaróg z mleka niepasteryzowanego			Twaróg z mleka pasteryzowane		
	Szczep. I	Szczep. II	Szczep. III	Szczep. I	Szczep. II	Szczep. III
4:0	2,0±0,05	2,1±0,01	1,9±0,01	2,1±0,05	2,0±0,05	2,1±0,05
6:0	1,5±0,02	1,5±0,00	1,5±0,01	1,5±0,05	1,4±0,05	1,5±0,05
8:0	1,0±0,01	1,0±0,02	1,0±0,02	1,0±0,05	0,9±0,05	1,0±0,05
10:0	2,6±0,02	2,3±0,01	2,6±0,01	2,4±0,05	2,0±0,05	2,4±0,05
10:1	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00	0,2±0,02	0,3±0,00
12:0	3,4±0,01	3,0±0,01	3,4±0,01	3,0±0,05	2,6±0,05	3,0±0,05
12:1	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,05	0,1±0,05	0,1±0,05
13:0	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,05	0,1±0,05	0,1±0,05
14:0	11,7±0,04	11,1±0,06	11,9±0,02	11,2±0,05	10,2±0,05	11,0±0,05
14:1	1,3±0,00	1,3±0,00	1,3±0,00	1,3±0,00	1,2±0,01	1,3±0,00
15:0 br	0,5±0,00	0,6±0,01	0,5±0,01	0,5±0,05	0,5±0,05	0,5±0,05
15:0	1,3±0,00	1,2±0,00	1,3±0,01	1,2±0,05	1,1±0,05	1,3±0,05
15:1	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,05	0,3±0,05	0,3±0,05
16:0	35,2±0,36	34,7±0,15	35,9±0,12	34,5±0,05	33,7±0,05	34,4±0,05
16:1	1,9±0,00	2,1±0,01	1,9±0,02	2,0±0,01	2,1±0,01	2,0±0,01
17:0 br	0,9±0,01	0,9±0,02	0,9±0,01	0,9±0,00	0,9±0,01	0,9±0,00
17:0	0,7±0,01	0,7±0,03	0,7±0,02	0,7±0,00	0,7±0,00	0,7±0,00
17:1	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00
18:0	9,4±0,04	9,2±0,03	9,3±0,02	9,8±0,05	10,5±0,04	9,9±0,02
18:1trans	1,5±0,01	1,8±0,02	1,5±0,01	1,6±0,03	1,7±0,03	1,5±0,02
18:1cis9	18,8±0,03	19,9±0,09	18,1±0,06	20,0±0,09	22,2±0,11	19,9±0,07
18:1cis11	0,6±0,02	0,5±0,02	0,6±0,00	0,5±0,01	0,6±0,00	0,5±0,01
18:1 c inne	1,1±0,00	1,1±0,01	1,1±0,00	1,1±0,00	1,1±0,00	1,1±0,05
18:2	1,7±0,00	1,7±0,01	1,7±0,05	1,6±0,05	1,7±0,05	1,8±0,05
18:3 n3	0,4±0,02	0,6±0,00	0,4±0,02	0,5±0,05	0,5±0,05	0,6±0,00
18:2c9t11	0,4±0,07	0,6±0,02	0,4±0,02	0,5±0,01	0,5±0,01	0,5±0,00
20:0	0,2±0,00	0,2±0,01	0,2±0,02	0,2±0,00	0,2±0,00	0,2±0,00
20:3n6	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00
20:4n6	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00
20:5 EPA	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00
22:0	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00
22:5n3	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00

W obu grupach serów przeprowadzono także badania wartości odżywczej. Wyniki zostały przedstawione w tabeli poniżej. Zawartość białka oraz węglowodanów była na porównywalnym poziomie w serach pasteryzowanych i niepasteryzowanych: białko mieściło się w granicach średnio 13,2 – 13,7%, węglowodany średnio 2,4 - 2,7%. Stwierdzono różnice w zawartości wody i tłuszczu. W serach pasteryzowanych odnotowano wyższą średnią zawartość wody na poziomie 76,0%, w serach niepasteryzowanych średnia zawartość wody wynosiła 70,5%. Zawartość tłuszczu była wyższa w przypadku serów niepasteryzowanych i wynosiła średnio 10,5%. W serach pasteryzowanych zawartość tłuszczu była istotnie niższa i wynosiła średnio 6,3%. Zawartość soli w obu grupach serów kształtowała się na poziomie poniżej 0,5%. Wyższą zawartość soli stwierdzono jedynie w serze z mleka pasteryzowanego z dodatkiem szczepionki III, która wynosiła średnio 0,8%. Zawartość wapnia kształtowała się na podobnym poziomie w serach pasteryzowanych i niepasteryzowanych i wynosiła od 1495 do 1567 mg/kg, przy czym najmniej wapnia zawierał twaróg z dodatkiem szczepionki II, natomiast najwięcej wapnia stwierdzono w twarogu z dodatkiem szczepionki I. Zawartość błonnika pokarmowego w gotowych serach twarogowych wynosiła poniżej 0,2 %.

**Tabela Wartość odżywcza przykładowych próbek serów twarogowych wyprodukowanych z mleka pasteryzowanego i niepasteryzowanego z dodatkiem szczepionek**

Twaróg	Woda [%]	Niep.	Białko [mg/kg]	Niep.	Tłuszcz [%]	Niep.	Węglowodany [%]	Niep.	NaCl [%]	Niep.	Ca [mg/kg]	
szczepionka I pasteryzowane	75,7	2,4	13,3	0,7	7,0	0,5	2,7	0,5	<0,5	-	1565	-
	76,0		13,3		7,0		2,9		<0,5		1565	
szczepionka I niepasteryzowane	71,3	2,3	14,2	0,8	10,7	0,8	2,7	0,5	<0,5		1567	-
	70,7		14,2		9,8		2,6		<0,5		1567	
szczepionka II pasteryzowane	77,6	2,6	12,5	0,7	4,8	0,5	2,8	0,5	<0,5		1496	-
	78,2		12,4		4,7		2,8		<0,5		1495	
szczepionka II niepasteryzowane	72,4	2,6	11,7	0,7	9,9	0,5	2,0	0,5	<0,5		1500	-
	72,8		11,5		9,4		2,1		<0,5		1500	
szczepionka III pasteryzowane	74,0	2,4	13,8	0,6	7,1	0,5	2,5	0,4	0,7	0,2	1545	-
	74,7		14,1		7,0		2,5		0,8		1545	
szczepionka III niepasteryzowane	67,6	2,5	15,7	0,8	12,0	0,4	2,7	0,5	<0,5		1550	-
	68,3		15,1		11,3		2,5		<0,5		1550	
Średnia	73,3	-	13,5	-	8,4	-	2,6	-	0,8	-	1537	-
SD	3,4	-	1,3	-	2,5	-	0,3	-	0,1	-	36	-

średnia pasteryzowane	76,0	-	13,2	-	6,3	-	2,7	-	-	-	1535	-
średnia niepasteryzowane	70,5	-	13,7	-	10,5	-	2,4	-	0,8	-	1539	-

Zawartość aminokwasów w próbkach serów analizowano techniką HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Rozdziału aminokwasów dokonywano po ich derywatywacji, na gradientowej kolumnie C16 o odwróconej fazie, stosując wodę, metanol, acetonitryl oraz bufor octanowo-fosforanowy zawierający dimetyloaminę. Łącznie rozdzielono i wykryto 14 aminokwasów (izoleucynę, leucynę, serynę, argininę, glicynę, treoninę, alaninę, tyrozynę, metioninę, fenyloalaninę, histydynę, walinę, kwas glutaminowy i kwas asparaginowy). Czas elucji wyniósł 43 minut przy detektorze fluorescencyjnym ustawionym na wartość 340 i 440 nm. Dla każdego aminokwasu sporządzono krzywe kalibracyjne o bardzo wysokich współczynnikach korelacji  $R^2$  wynoszących od 0,9993 do 0,9998. Przebadane próbki serów zawierały niezbędne do kształtowania tkanek oraz do produkcji enzymów, ciał odpornościowych i hormonów najważniejsze aminokwasy egzogenne, których organizm w podeszłym wieku nie jest sam w stanie wytworzyć czyli:

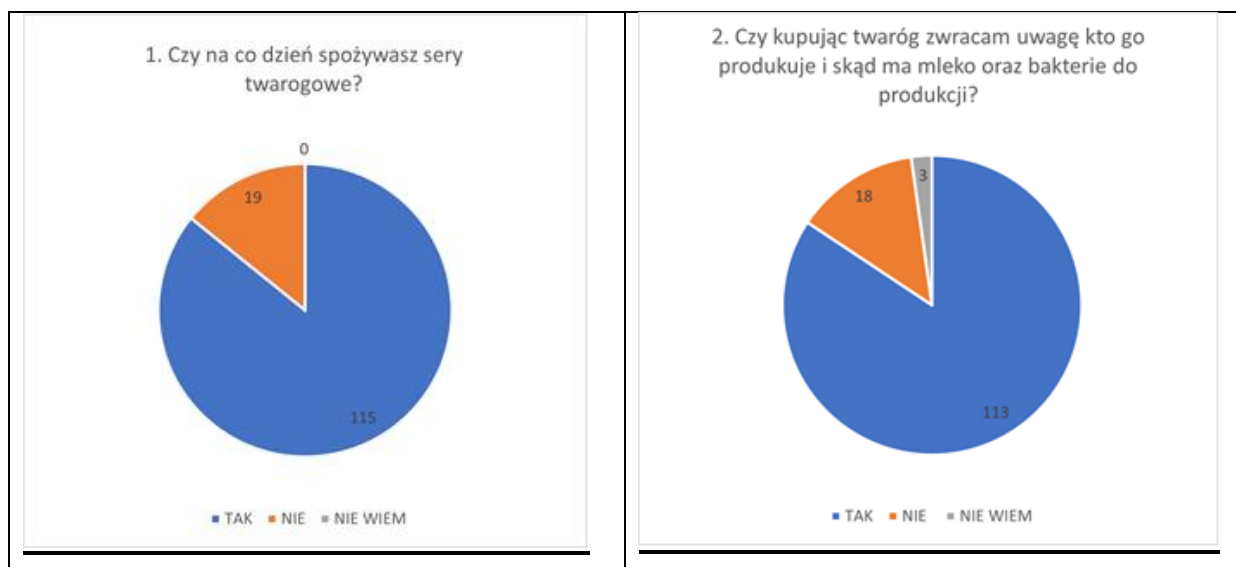
- fenyloalaninę (wspierającą układ hormonalny, poprawiającą pamięć i nastrój),
- metioninę (regulującą produkcję hormonu wzrostu, działającą ochronnie na komórki wątroby, uczestniczącą w syntezie choliny, kreatyny, biorącą udział w metabolizmie tłuszczów),
- izoleucynę (budującą tkankę mięśniową, chroniącą przed rozpadem białek mięśniowych spowodowanym aktywnością i stresem, przyspieszającą regenerację po urazach, zwiększającą siłę, podnosi poziom energii, uczestniczy w regulacji poziomu glukozy we krwi.),
- leucynę (obniżającą poziom kortyzolu i przyspieszającą wzrost masy mięśniowej, wspomagającą absorpcję wapnia, niezbędnej do wzrostu i rozwoju chrząstek i ścięgien, syntezę nukleotydów, biorącej udział w odnawianiu tkanek, wytwarzaniu hormonów, enzymów, przeciwciał, wpływającej na metabolizm tłuszczów poprzez wytwarzanie karnityny, zmniejszającej ryzyko osteoporozy),
- treoninę (wspierającą układ nerwowy, układ krążenia, wątrobę i układ odpornościowy uczestniczącą w budowie mocnych kości i szkliwa zębów oraz przyspieszającą gojenie ran),

- walinę (budującą tkankę mięśniową i redukującą tkankę tłuszczową, wspierającą prawidłowe funkcjonowanie układu nerwowego i odpornościowego).

Ponadto, stwierdzono obecność 4 aminokwasów endogennych kwasu glutaminowego (poprawiającego pamięć, wspierającego trawienie i zmniejszającego zmęczenie), seryny (wspierającej układ immunologiczny), alaniny (odpowiedzialnej za transport glukozy do mózgu i czerwonych krwinek), kwasu asparaginowego (wpływającego na koncentrację i sprawność umysłową). Zawartość poszczególnych aminokwasów wraz z krzywymi kalibracji jest przedstawiona w Załączniku 1.

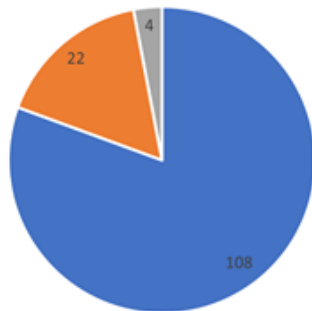
### Ankieta konsumentcka

Celem badań była ocena postrzegania ważności i akceptowalności innowacyjnych spersonalizowanych serów twarogowych zawierających kultury środowiskowe, produkowanych przez lokalną mleczarnię, w opinii dorosłych konsumentów w momencie podejmowania przez nich decyzji o zakupie. Ankietowanym zadano 9 pytań. Za pomocą wykresów kołowych zaprezentowano odpowiedzi udzielane przez 134 respondentów na zadane pytania (rys). Analizując wyniki ankiety można stwierdzić, iż dla badanej grupy innowacyjne spersonalizowane sery twarogowe są bardzo atrakcyjne sensorycznie, przez to będą chętnie kupowane oraz są postrzegane jako wyrób godny polecenia.



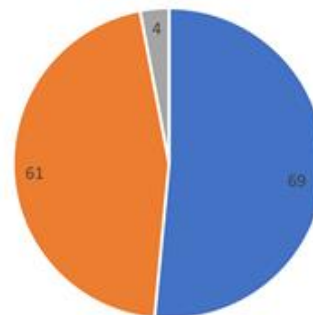


3. Czy kupuję twaróg od lokalnego producenta?



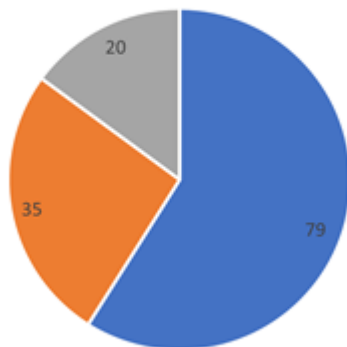
■ Tak ■ Nie ■ Nie wiem

4. Czy kupuję twaróg z Gminnej Mleczarni w Pierzchnicy?



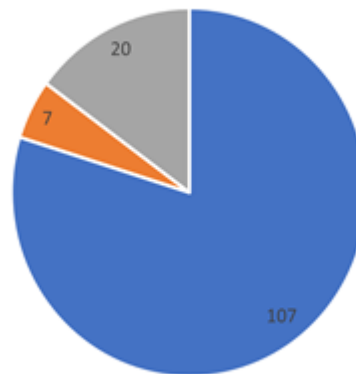
■ TAK ■ NIE ■ NIE WIEM

5. Czy wiem, że Gminna Mleczarnia w Pierzchnicy podejmuje produkcję twarogu z lokalnymi szczepami bakterii?



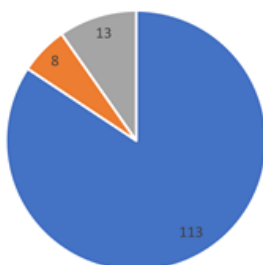
■ TAK ■ NIE ■ NIE WIEM

6. Czy wiem jak ważne dla naszego zdrowia są lokalne szczepy bakterii?



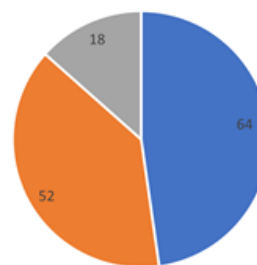
■ TAK ■ NIE ■ NIE WIEM

7. Czy chcę kupować twarogi z Gminnej Mleczarni w Pierzchnicy?

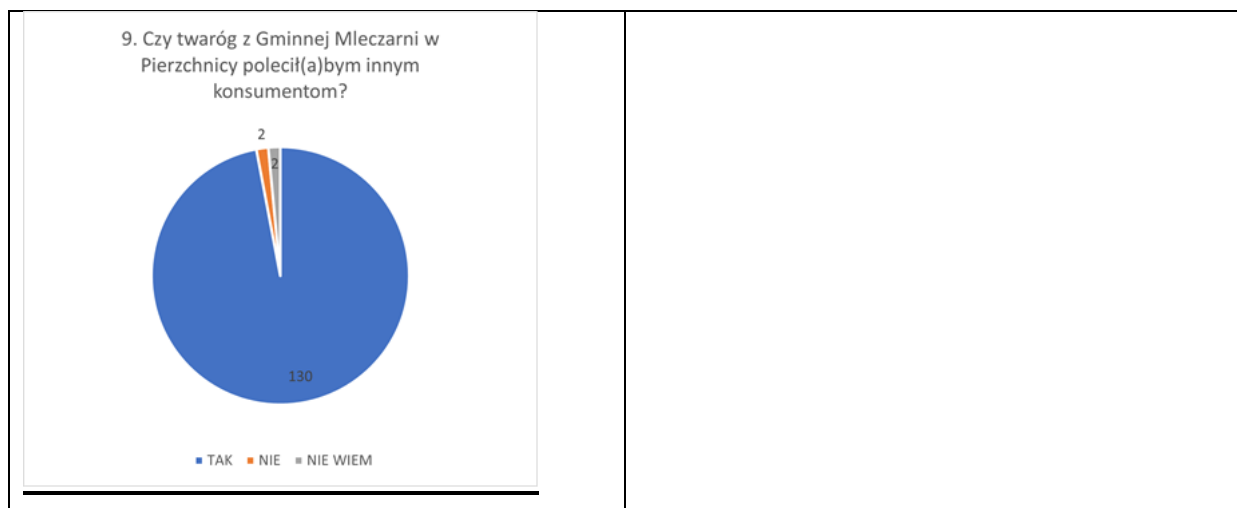


■ TAK ■ NIE ■ NIE WIEM

8. Czy mam możliwość kupowania twarogu produkowanego przez Gminną Mleczarnię w Pierzchnicy?



■ TAK ■ NIE ■ NIE WIEM



Rys. Udział ilościowy odpowiedzi w opinii respondentów

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Opracowano i wdrożono innowacyjny produkt- spersonalizowane sery twarogowe z mleka krowiego, pozytywnie wpływający na lokalną populację mieszkańców, ze szczególnym uwzględnieniem osób starszych.
2. Do ukwaszania mleka, w celu wytwarzania twarogów, wykorzystano wyselekcjonowane środowiskowe szczepy bakterii kwasu mlekowego oraz szczepy *Bifidobacterium*, przydatne technologicznie, które opisano określonym numerem i symbolem zapewniające powtarzalność cech organoleptycznych, mikrobiologicznych i fizykochemicznych wyrobów.
3. Wykonano kilka cykli badań dotyczących izolacji kultur startowych, służących do ukwaszania mleka krowiego, tak aby zapewnić najlepszą wydajność, powtarzalność procesu i jakość produktu.
4. Dostosowano warunki środowiskowe do wymogów higieny produkcji (GMP, GHP) innowacyjnych spersonalizowanych serów twarogowych, wytwarzanych z pasteryzowanego mleka krowiego w mleczarni wchodzącej w skład konsorcjum przeprowadzając analizy czystości powierzchni, powietrza i wody. Wykonano badania mikrobiologiczne obejmujące higienę udoju mleka pozyskiwanego od krów rolnika wchodzącego w skład konsorcjum oraz higienę produkcji na linii technologicznej w mleczarni, będącej członkiem grupy operacyjnej
5. Wykonywano cyklicznie badania mikrobiologicznie, fizykochemicznie i sensorycznie, wytworzonych w mleczarni serów w celu zapewnienia bezpieczeństwa serów, powtarzalności procesów i wysokiej jakości produktu.

6. Wykonano badania przechowalnicze wytworzonych serów, produkowanych z mleka krowiego, w celu ustalenia ich terminu przydatności do spożycia.
7. Dla wszystkich produktów, które mają trafić do obrotu handlowego stworzono etykiety, zawierające informacje o produkcie wynikające z Rozporządzenia WE 1169 z dnia 25 października 2011.
8. Została opracowana i wydana broszura promująca innowacyjne spersonalizowane sery twarogowe.
9. Wyniki badań były prezentowane na konferencjach naukowych oraz opublikowane w punktowanych czasopismach.
10. Innowacyjne sery były prezentowane i promowane na, regionalnych targach i festynach, podczas których przeprowadzono ankietę konsumencką.
11. Konsorcjanci, dzięki realizacji projektu mają wiedzę, jak prawidłowo produkować sery, o powtarzalnych parametrach technologicznych, bezpiecznych pod kątem zdrowotnym, o wysokich walorach odżywczych i organoleptycznych.

## 7. LITERATURA

1. Białecka-Dębek A., Granda D., Szmidt M. K., Zielińska, D.: Gut microbiota, probiotic interventions, and cognitive function in the elderly: a review of current knowledge. *Nutrients*, 2021, 13(8), 2514.
2. Castellone V., Bancalari E., Rubert J., Gatti M., Neviani E., Bottari B.: Eating Fermented: Health Benefits of LAB-Fermented Foods. *Foods*, 2021, 10(11), 2639
3. Cen S., Yin R., Mao B., Zhao J., Zhang H., Zhai Q., Chen W.: Comparative genomics shows niche-specific variations of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from human, *Drosophila melanogaster*, vegetable and dairy sources, *Food Biosci.*, 2020, 35, 100581.
4. Chen J., Wang J., Zheng H.: Characterization of *Bifidobacterium apousia* sp. nov., *Bifidobacterium choladohabitans* sp. nov., and *Bifidobacterium polysaccharolyticum* sp. nov., three novel species of the genus *Bifidobacterium* from honey bee gut. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2021, 44 (5), 126247.
5. Dimidi E., Cox S.R., Rossi M., Whelan K.: Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 2019, 11(8), 1806.
6. Gajewska J., Błaszczuk M. K. 2012. *Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB)*. *Postępy Mikrobiologii*, 51(1): 55-65.
7. Gatti M., Bottari B., Lazzi C., Neviani E., Mucchetti G. Invited review: Microbial evolution in rawmilk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *J. Dairy Sci.*, 2014, 97(2), 573-91.

8. Hemalatha R., Ouwehand A.C., Saarinen M.T., Prasad U.V., Swetha K., Bhaskar V.: Effect of probiotic supplementation on total lactobacilli, bifidobacteria and short chain fatty acids in 2–5-year-old children. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2017, 28, 1.
9. Ishikawa E., Matsuki T., Kubota H., Makino H., Sakai T., Oishi K., Kushiro A., Fujimoto J., Watanabe K., Watanuki M., Tanaka R.: Ethnic diversity of gut microbiota: species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus *Bifidobacterium* in healthy Belgian adults, and comparison with data from Japanese subjects. *J. Biosci. Bioeng.*, 2013, 116 (2), 265-70.
10. Jurkowski M., Błaszczyk M. 2012. *Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej*. *Kosmos*, 61(3): 493-504.
11. Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E.: Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2001, 357 (9262), 1076-9.
12. Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Arvilommi H., Isolauri E.: Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2003, 361 (9372), 1869-71.
13. Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Isolauri E.: Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, 119 (4), 1019-21.
14. Kelleher P., Bottacini F., Mahony J., Kilcawley K.N., van Sinderen D.: Comparative and functional genomics of the *Lactococcus lactis* taxon; insights into evolution and niche adaptation. *BMC Genomics*, 2017, 18, 267.
15. Kołakowski P., Kowalska M., Sędrowska-Ćwiek J. 2013. *Mikroflora serów dojrzewających*. *Innowacyjne Mleczarstwo*, 1(I): 6-13.
16. Kopp M.V., Hennemuth I., Heinzmann A., Urbanek R.: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus GG* supplementation. *Pediatrics*, 2008, 121, 850-856.
17. Lee J.Y., Han G.G., Kim E.B., Choi Y.J.: Comparative genomics of *Lactobacillus salivarius* strains focusing on their host adaptation. *Microbiol. Res.*, 2017, 205, 48-58.
18. Lee Y., Ba Z., Roberts R.F., Rogers C.J., Fleming J.A., Meng H., Furumoto E.J., Kris-Etherton P.M.: Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> on the lipid/lipoprotein profile and short chain fatty acids in healthy young adults: a randomized controlled trial. *Nutr. J.*, 2017, 16, 39.
19. Ma T., Yao C., Shen X. et al. The diversity and composition of the human gut lactic acid bacteria and bifidobacterial microbiota vary depending on age. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2021, 105, 8427–8440.
20. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J., Hutkins R.: Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2017, 44, 94-102.
21. Mathur H., Beresford T.P., Cotter P.D.: Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*, 2020, 12(6), 1679.
22. Mueller S., Saunier K., Hanisch C., Norin E., Alm L., Midtvedt T., Cresci A., Silvi S., Orpianesi C., Verdenelli M.C., Clavel T., Koebnick C., Zunft H.J., Doré J., Blaut M.: Differences in fecal microbiota

in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72 (2), 1027-33.

23. Pan Q., Cen S., Yu L., Tian F., Zhao J., Zhang H., Chen W., Zhai Q.: Niche-Specific Adaptive Evolution of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated From Human Feces and Paocai. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, 10, 615876.
24. Ragonnaud E., Biragyn A.: Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people. *Immun. Ageing*, 2021, 18, 2.
25. Rautava S., Kalliomäki M., Isolauri E.: Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, 109 (1), 119-21.
26. Smid E.J., Hugenholtz J. Functional genomics for food fermentation processes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2010, 1, 497-519.
27. Tapia M.S., Alzamora S.M., Chirife J.: Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. In: *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Barbosa- Cánovas G.V., Fontana A.J. Jr., Schimdt, S.J., Labuza, T.P. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2020, pp. 323–355.
28. Ziarno M. 2007a. *Charakterystyka komercyjnych kultur starterowych stosowanych w przemyśle mleczarskim*. *Medycyna Weterynaryjna*, 63(8): 909-913.
29. Ziarno M. 2007b. *Znaczenie bakterii rodzaju Leuconostoc dla przemysłu mleczarskiego*. *Medycyna Weterynaryjna*, 63(4): 403-407.

#### **Podstawowe akta prawne**

- Codex Alimentarius (1960 – WHO i FAO)
- Rozporządzenie (WE) Nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (z późn. zm.);
- Rozporządzenie (WE) Nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych (z późn. zm.);
- Rozporządzenie (WE) Nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiającym szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego;
- Rozporządzenie (WE) Nr 854/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące organizacji urzędowych kontroli w odniesieniu do produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi;
- Rozporządzenie (We) Nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt (z późn. zm.);
- Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Dz. U. z 2006r. Nr 171, poz. 1225 z późniejszymi zmianami

