

Organické kyseliny po mliečnej fermentácii zeleniny

JOLANA KAROVIČOVÁ—MILAN DRDÁK—JOZEF POLONSKÝ—
MARGITA ČANIGOVÁ

Súhrn. Kapilárnu izotachoforézu sme použili na stanovenie organických kyselín vo vzorkách hrášku, cibule a zeleru po mliečnej fermentácii za použitia rôznych baktérií. Na základe získaných výsledkov, najmä stanovenia kyseliny mliečnej a octovej a senzorického hodnotenia výrobkov, sme mohli odporučiť baktérie vhodné na ďalšie pokusy. Napríklad pri fermentácii hrášku sa najlepšie osvedčili mikroorganizmy *Pediococcus* sp. „CSL“ a *Lactobacillus* sp. „S“, keď bola produkcia kyseliny mliečnej od 11,64 do 14,56 g · l⁻¹.

Konzervovanie potravín mliečnym kvasením zaraďujeme do skupiny konzervačných metód založených na využívaní schopností mikroorganizmov produkovať látky, ktoré predlžujú prirodzenú skladovateľnosť potravín [1]. Pri mliečnom kvasení sa za rozhodujúci činiteľ konzervovania považuje produkcia kyseliny mliečnej baktériami mliečneho kvasenia. Väčšina mliečnych baktérií spracúva všetky bežné sacharidy, ktoré sú v rastlinách prítomné, a vytvorená kyselina mliečna potom chráni produkt pred ostatnými mikroorganizmami a tým pred pokazením sa [2]. Podľa kvalitatívneho a kvantitatívneho zastúpenia produktu tohto metabolizmu môžeme rozlíšiť:

- typické (čisté, homofermentatívne) mliečne kvasenie,
- zmiešané (heterofermentatívne) mliečne kvasenie a
- nečisté mliečne kvasenie [3].

Medzi vedľajšie produkty mliečneho kvasenia patrí najmä kyselina octová. Ďalej sa tvoria v malých množstvách kyselina mravčia, propiónová, valérová, jantárová a kaprónová, ktoré prispievajú k uceleniu a zaokrúhleniu chuti. Nežiadúca je kyselina maslová, ktorá pôsobí rušivo a znehodnocuje výrobok svojím osobitným zápachom. Je známe, že v mliečne kvasených výrobkoch baktérie mliečneho kvasenia prevládajú za krátky čas nad ostatnými mikroorga-

Ing. Jolana Karovičová, CSc., doc. Ing. Milan Drdák, DrSc., Katedra sacharidov a konzervácie potravín; doc. Ing. Jozef Polonský, CSc., Katedra analytickej chémie; Ing. Margita Čanigová, CSc., Katedra mikrobiológie, biochémie a biológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

nizmami a stávajú sa dominujúcou mikroflórou [4]. Vývoj mikroflóry produktu závisí od začiatkovej kontaminácie, fyzikálnochemickej vlastnosti potraviny, podmienok skladovania, spôsobu opracovania produktu a vlastností mikroorganizmov. Spomedzi vlastností mikroorganizmov je obzvlášť dôležitá schopnosť niektorých, hlavne baktérií mliečneho kvasenia, zničiť alebo inhibovať patogénne zárodky a hnilobné mikroorganizmy. Metabolity mliečnych baktérií potláčajú činnosť ostatnej mikroflóry, aj patogénov, ktoré po určitej dobe hynú.

Za normálnych podmienok sa nachádza na zelenine dostatok užitočných mliečnych mikroorganizmov. Ak sa zelenina musí dôkladne prať alebo pred spracovaním predvárať, odporúča sa ju pri nakladaní naočkovať špeciálnymi zákvasmi. Pederson a Albury [5] vo svojej práci konštatuje, že očkovanie nie je nutné, pretože mikroorganizmy potrebné na fermentáciu sa vyskytujú prirodzene v adekvátnej miere a vhodné kvasenie nastane pri požadovanej teplote a koncentrácii soli. Pederson a Albury [6] zmenili priebeh prírodného kvasenia uhorky pridaním čistých kultúr heterofermentatívnych alebo homofermentatívnych mliečnych baktérií. Zistili, že *Lactobacillus plantarum* dokončoval všetky kvasenia bez ohľadu na druh použitý na inokuláciu, čiastočne pre svoju väčšiu toleranciu ku kyselinám. Buckenhüskes a kol. [7] sledovali priebeh kvasenia naočkovaných vzoriek kapusty. Štartovacie baktérie izolované z kyslej kapusty sa naočkovali do sterilnej kapusty a kultivovali. Na základe senzorického hodnotenia kvasného produktu sa vybrali mikroorganizmy vyznačujúce sa schopnosťou vytvárať intenzívny aromatický profil a tieto sa potom nasadili ako štartovacie kultúry, pričom koncentrácia inokula bola 10^7 MO . g⁻¹.

V poslednom období sa opäť zvýšil počet výskumných prác z oblasti biokonšervácie zeleniny. Známy je aj zvýšený záujem výrobcov o kvasené (mliečne fermentované) výrobky [8]. Záujem sa orientuje na výrobu mliečne fermentovaných zeleninových štiav. Mliečnym kvasením sa získavajú mimoriadne chutné a údržné produkty s vysokou výživovo-fyziologickou hodnotou. Výroba kvasených zeleninových štiav nie je bez pôsobenia mikroorganizmov možná. Na výrobu sa využíva buď spontánne kvasenie, buď cieľené očkovanie vybranými a odskúšanými kultúrami mikroorganizmov. Výrobcovia požadujú také kvasné kultúry, ktoré zosilňujú arómu a umožňujú dosiahnuť rýchly pokles pH štiav [9, 10].

V tejto práci publikujeme výsledky fermentácie zeleného hrášku, cibule a zeleru, uvedením tvorby a množstva organických kyselín stanovených izochoforeticky a uvedením použitých mikroorganizmov na mliečnu fermentáciu vybranej zeleniny.

Materiál a metódy

Na fermentačný pokus a následne na analýzy sme použili hrášok, cibuľu a zeler. Zeler sa najprv skladoval v chladiarenských podmienkach, cibuľa pri laboratórnych podmienkach a hrášok bol zmrazený.

Úprava hrášku. Po rozmrazení a základných analýzach (stanovenie redukujúcich cukrov, titrovateľných kyselín, pH) sme pripravili nálev s požadovanou koncentráciou soli a redukujúcich cukrov. Vo vzorkách H 1, 2, 3 bol nálev 1,5 % NaCl a koncentrácia redukujúcich cukrov 2,40 % a zmiešanie hrášku a nálevu bolo v pomere 5:4. Vo vzorkách H 4 až 7 bola koncentrácia redukujúcich cukrov 3,57 % a nálev bol 1,5 % NaCl.

Úprava cibule. Cibuľu sme pred fermentáciou očistili a pokrájali na kolieska, nechali asi 1 h voľne stáť, aby z cibule vyprchala časť sírnych zlúčenín. Cibuľu sme dávkovali 2:3 (cibuľa : nálev). Nálev bol 1,5 % NaCl a koncentrácia redukujúcich cukrov bola 3,18 %. Vzorky sú označené C 1 až 4.

Úprava zeleru. Pred fermentáciou sme zeler pokrájali na kocky a zaliali nálevom v pomere 3:4 (zeler : nálev). Na vytvorenie lepších anaerobných podmienok sme niektoré vzorky prebublávali dusíkom. Vzorky Z 1 až 10 mali nálev 1,5 % NaCl, ale nálev vo vzorkách Z 1, 2 obsahoval aj 0,1 % sorbanu draselného, vzorky Z 3 až 5 obsahovali 0,1 % sorbanu draselného a použila sa fermentácia s aplikovaním prebublávania dusíkom, vzorky Z 6 až 8 obsahovali fytoncídnu látku vyššej koncentrácie a vzorky Z 9, 10 obsahovali fytoncídnu látku nižšej koncentrácie.

Fermentácia pripravených vzoriek bola 7 až 10 dní pri teplote 23 až 26 °C. Na inokuláciu fermentovanej zeleniny vo fermentačných nádobách sme použili tieto mikroorganizmy v uvedených množstvách: *Lactobacillus* sp. „S“ $3,04 \cdot 10^8$ MO ml⁻¹, *Pediococcus acidilactici* $3,52 \cdot 10^7$ MO . ml⁻¹, *Pediococcus* sp. „CSL“ $2,05 \cdot 10^7$ MO . ml⁻¹, *Lactobacillus fermentum* $7,98 \cdot 10^7$ MO . ml⁻¹, *Lactobacillus* sp. „U“ $2,60 \cdot 10^7$ MO . ml⁻¹, *Lactobacillus* spp. $5,40 \cdot 10^8$ MO . ml⁻¹.

Na kultiváciu inokula sme použili kultivačnú pôdu podľa Rogosa [11].

Vzorky zeleniny po fermentácii sme pred vlastnou analýzou prefiltrovali, príp. pretlačili cez gázu. Filtrát sme vhodne nariedili deionizovanou vodou (1 ml vzorky do 25 ml odmernej banky). Stanovenie organických kyselín sme robili izotachoforeticky na prístroji izotachoforetický analyzátor s technikou spájania kolón ZKI 01, s vodivostným detektorom a dvojkanálovým zapisovačom TZ 4200. Na identifikáciu a stanovenie organických kyselín sme použili elektrolytický systém v tomto zložení:

- vodiaci elektrolyt — HCl (mol . l⁻¹) $\cdot 10^{-2}$, protiión — kyselina β -aminokaprónová, aditívum — 0,1 % MHEC (metylhydroxyetylcelulóza), pH 4,5;
- zakončujúci elektrolyt — $5 \cdot 10^{-3}$ mol . l⁻¹ kyselina kaprónová, $5 \cdot 10^{-3}$ mol . l⁻¹

histidín, pH 4—5. Vzorky sme analyzovali pri prúde 200 μA v predseparačnej kolóne a 50 μA v analytickej kolóne.

Výsledky a diskusia

Tabuľka 1 uvádza označenie analyzovaných vzoriek hrášku, použitý mikroorganizmus a priemerný obsah stanovených organických kyselín po 10 dňoch fermentácie. Priemerné hodnoty obsahu sú vypočítané z troch meraní. V jednotlivých vzorkách sa stanovovala kyselina mliečna, octová, citrónová, fosforečná, maslová a propiónová. Ako je zrejmé z tab. 1, v sledovaných fermentovaných vzorkách boli prítomné iba kyselina mliečna a octová. Najviac kyseliny mliečnej je vo vzorke H 6, kde sa na fermentáciu použil mikroorganizmus *Pediococcus* sp. „CSL“. V pokuse s hráškom najlepšimi producentmi kyseliny mliečnej boli ešte mikroorganizmy *Lactobacillus* sp. „U“ a *Lactobacillus* sp. „S“ [11]. Ukázalo sa, že hrášok možno, napriek jeho zloženiu, konzervovať mliečnou fermentáciou, keď vyberieme vhodný kmeň mikroorganizmu, avšak pod podmienkou, aby bola dobrá dostupnosť redukujúcich cukrov už v náleve. Dosiahnutie približne 4 % redukujúcich cukrov v celom skvasovanom množstve zlepšilo produkciu kyseliny mliečnej. Za týchto podmienok sme získali hrášok, ktorý mal príjemnú kyslú chuť bez cudzieho zápachu. Smerodajná odchýlka s_x [12] pri stanovení kyseliny mliečnej bola od 0,077 do 0,246 a pri stanovení kyseliny octovej od 0,071 do 0,144.

Tabuľka 1. Organické kyseliny vo vzorkách hrášku
Table 1. Organic acids in peas samples

Vzorka ¹	Mikroorganizmus ²	Obsah organických kyselín ³ [g · l ⁻¹]	
		mliečna ⁴	octová ⁵
H 1	<i>Pediococcus</i> sp. „CSL“	9,67	2,83
H 2	<i>Lactobacillus</i> sp. „S“	7,24	1,69
H 3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	6,75	2,36
H 4	<i>Lactobacillus</i> sp. „S“	11,64	5,40
H 5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	7,77	6,85
H 6	<i>Pediococcus</i> sp. „CSL“	14,56	4,90
H 7	<i>Lactobacillus</i> sp. „U“	14,52	5,64

¹Sample, ²Microorganisms, ³Organic acids content, ⁴Lactic acid, ⁵Acetic acid.

Tabuľka 2 uvádza organické kyseliny vo vzorkách cibule. Priemerné hodnoty obsahu organických kyselín sa vypočítali z troch meraní. Izotachoforetickou analýzou vzoriek cibule sa stanovili kyselina mliečna, octová, fosforečná, citrónová, propiónová i maslová. Najviac kyseliny mliečnej obsahujú vzorky, keď sme na fermentáciu použili mikroorganizmy *Lactobacillus* sp. „S“ a *Lactobacillus* spp. Vo vzorke, keď sme na fermentáciu použili mikroorganizmus *Lactobacillus fermentum*, sme meraním zistili aj prítomnosť kyseliny maslovej. Cibuľa po týždennej fermentácii získala príjemnú chuť, mierne zmäkla a bola vhodná ako prídavok do šalátov alebo na výrobu nápojov. Smerodajná odchýlka s_x pri stanovení kyseliny mliečnej bola od 0,025 do 0,036.

Tabuľka 2. Organické kyseliny vo vzorkách cibule
Table 2. Organic acids in onion samples

Vzorka ¹	Mikroorganizmus ¹	Obsah organických kyselín ³ [g . l ⁻¹]					
		mliečna ⁴	octová ⁶	fosforečná ⁶	citrónová ⁷	propiónová ⁸	maslová ⁹
C 1	<i>Lactobacillus</i> sp. „S“	7,71	2,40	—	—	—	—
C 2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2,61	1,53	0,65	2,23	0,31	0,45
C 3	<i>Lactobacillus</i> sp. „U“	6,32	1,34	—	2,23	0,31	—
C 4	<i>Lactobacillus</i> spp.	6,81	1,34	0,30	1,20	0,27	—

For explanations 1—5 see Table 1. ⁶Phosphoric acid, ⁷Citric acid, ⁸Propionic acid, ⁹Butyric acid

Práca je zameraná na štúdium vhodnosti rôznych mikroorganizmov ako štartovacích kultúr, aplikácie rôznych koncentrácií fytoncídov i prípravku sorbanu draselného v riadenej mliečnej fermentácii zeleniny. Pri fermentácii zeleru sme použili prebublávanie dusíkom (Z 3 až 5). Zistili sme však, že výrobok bez prebublávania dusíkom mal hodnoty pH a redukujúcich cukrov nižšie a hodnoty titračnej kyslosti vyššie. Výrobok mal typickú kyslú chuť a vôňu. Pri fermentácii teda nie je potrebné využívať chemické konzervačné látky — aplikovali sme dve rôzne koncentrácie fytoncídnej látky. Fytoncídny sú predmetom nášho výskumu ako doplnujúce konzervačné látky. Zisťuje sa ich štruktúra, stálosť, spektrum antimikrobiálnej účinnosti. Pri pridaní fytoncídnych látok vo vyššej i nižšej koncentrácii výrobok získal pikantnú príchuť, plody si zachovali svoju tvrdosť a ich prítomnosť nebolo cítiť. Izotachoforetickou analýzou vzoriek zeleru sme stanovili kyselinu mliečnu, octovú, fosforečnú, citrónovú a propiónovú (tab. 3). Vo vzorkách, kde sme pridali sorban draselný, sme ho stanovili 0,98 g . l⁻¹, čo predstavuje celkové množstvo pridávané do pripravovaných vzoriek.

Tabuľka 3. Organické kyseliny vo vzorkách zeleru
Table 3. Organic acids in celery samples

Vzorka ¹	Mikroorganizmus ²	Obsah organických kyselín ³ [g · l ⁻¹]				
		mliečna ⁴	octová ⁵	fosfo- rečná ⁶	citró- nová ⁷	propió- nová ⁸
Z 1	<i>Lactobacillus</i> sp. „U“	9,23	4,84	0,65	0,99	0,34
Z 2	<i>Lactobacillus</i> sp. „S“	11,42	2,65	0,63	1,38	0,51
Z 3	<i>Lactobacillus</i> sp. „U“	6,48	3,28	0,40	0,68	0,69
Z 4	<i>Lactobacillus</i> sp. „S“	8,47	3,34	0,67	0,69	0,51
Z 5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	7,03	3,13	0,19	0,70	0,61
Z 6	<i>Lactobacillus</i> sp. „S“	13,39	7,77	0,41	0,95	—
Z 7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	11,29	6,48	1,08	0,69	—
Z 8	<i>Lactobacillus</i> sp. „U“	9,38	6,47	—	0,69	—
Z 9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	10,76	8,00	0,19	0,68	—
Z 10	<i>Lactobacillus</i> sp. „U“	8,80	7,46	1,10	0,69	—

For explanations see Table 2.

Najväčšie množstvo kyseliny mliečnej 13,39 g · l⁻¹, sme stanovili vo vzorke Z 6, v ktorej sme na fermentáciu použili mikroorganizmus *Lactobacillus* sp. „S“. Táto vzorka bola pripravená na fermentáciu aj s aplikáciou fytoncidnej látky vyššej koncentrácií.

Stručne možno zopakovať, že fytoncidy sú substancie rastlinného pôvodu, majú schopnosť inhibovať rast alebo usmrcovať niektoré mikroorganizmy, zároveň majú aj ochranné a liečivé účinky. Možno ich nazvať aj antibiotikami vyšších rastlín, hoci nevykazujú typické vlastnosti antibiotík. Fytoncidy sa používajú buď s pôvodnými pletivami, ktoré ich vyprodukovali, buď v podobe koncentrátov pripravených z týchto pletív. Pretože niektoré fytoncidy majú výrazné vôňové vlastnosti a senzoricky by mohli negatívne ovplyvňovať chuť a vôňu skúšaných výrobkov, je potrebné hľadať vhodný druh i koncentráciu týchto látok [13]. V práci neuvádzame, o ktorú konkrétnu aplikovanú fytoncidnu látku ide, ani jej presné koncentrácie, pretože to je predmetom inej etapy nášho výskumu.

Pri použití mikroorganizmu *Lactobacillus* sp. „S“ sa aj pri iných podmienkach, napr. vo vzorke označenej Z 2, zistilo najväčšie množstvo kyseliny mliečnej, a to 11,42 g · l⁻¹. Smerodajná odchýlka s_x pri stanovení kyseliny mliečnej vo vzorkách zeleru bola od 0,036 do 0,071 a pri stanovení kyseliny octovej od 0,007 do 0,036.

Využitie izotachofórey pri stanovení organických kyselín v tejto problematike bolo veľmi výhodné. Izotachoforetické stanovenie vyžadovalo len jednoduchú úpravu vzorky a poskytovalo reprodukovateľné výsledky.

Na základe získaných poznatkov bol možný rýchly výber vhodných mikroorganizmov pre ďalšie pokusy.

Literatúra

1. DRDÁK, M., Výživa a zdravie, 3, 1986, s. 81.
2. DRDÁK, M.: Technológia rastlinných neúdržných potravín. Bratislava, Alfa 1989.
3. KYZLINK, V.: Základy konzervace potravín. Praha, SNTL 1980.
4. BURGEON, C. M.: Biotechnology in the Industry. Online Publications, Pinner, UK 1986.
5. PEDERSON, C. S.—ALBURY, M. N., Food Technol., 15, 1961, s. 351.
6. PEDERSON, C. S.—ALBURY, M. N., Appl. Microbiol., 4, 1956, s. 259.
7. BUCKENHÜSKES, H.—SCHNEIDER, M.—HAMMES, W. P., Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 10, 1986, s. 42.
8. BETRÁN—EDEZA, L. M.—HERNÁNDEZ—SÁNCHEZ, H., Lebensm.-Wiss. Technol., 22, 1989, s. 65.
9. NIKETIC—ALEKSIC, G. K.—BOURNE, M. C.—STAMER, J. R., J. Food Sci., 38, 1973, s. 84.
10. RAMDAS, A. R.—KULKARNI, P. R., Indian Food Packer, 41, 1987 s. 40.
11. ČSN 56 0094: Potravinařské výrobky. Stanovení počtu bakterií rodu *Lactobacillus*. 11. 4. 1988. 8 s.
12. ECKSCHLAGER, K.—HORSÁK, L.—KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha, SNTL 1980, s. 224.
13. GRZYBOWSKI, R.—URBAN, K., Przem. Spoż., 37, 1983, s. 540.

Do redakcie došlo 7. 9. 1992

Organic acids after lactic fermentation of vegetables

Summary

Capillary isotachopheresis was used for determination of organic acids in samples of peas, onion and celery after lactic fermentation using various bacteria. In virtue of obtained results, in particular determinations of lactic acid and acetic acid and sensoric evaluation of products, we might recommend suitable bacteria for the future experiments. For example, microorganisms *Pediococcus* sp. „CSL” and *Lactobacillus* sp. „S” were proved during the peas fermentation, when the lactic acid production was from 11.64 to 14.56 g.l⁻¹.

Органические кислоты после молочной ферментации овощей

Резюме

Капиллярный изотакхоферез был использован для становления органических кислот в пробах горошка, лука и сельдерея после молочной ферментации при использовании различных микроорганизмов. На основе полученных результатов, прежде всего становления молочной и уксусной кислот и сенсорического оценивания продуктов мы могли рекомендовать подходящие микроорганизмы для следующих экспериментов. Например при ферментации горошка наилучше оправдали себя микроорганизмы *Pediococcus* sp. и *Lactobacillus* sp. „S” при которых продукция молочной кислоты была от 11,64 до 14,57 г. л⁻¹.