



Julia Szutowska

Projektowanie innowacyjnego produktu na
przykładzie fermentowanego soku z jarmużu

Design of an innovative fermented product using
kale juice as an example

Praca doktorska

Promotor: dr hab. inż. Daniela Gwiazdowska, prof. UEP

Promotor Pomocniczy: dr Iga Rybicka

Pracę przyjęto dnia:

Podpisy Promotorów

Poznań 2022

*Serdecznie dziękuję mojej **Promotorce dr hab. inż. Danieli Gwiazdowskiej**, Promotorce pomocniczej **dr Idze Rybickiej** oraz całemu **zespółowi badawczemu** za nieocenione wsparcie, które otrzymałam. Wasze naukowe rady, mądre wskazówki, merytoryczne dyskusje a zwłaszcza przyjaźń, pozwoliły mi stawiać pewne kroki w tej naukowej podróży.*

Pracę dedykuję **mojemu Mężowi**, który zainspirował mnie do wkroczenia na ścieżkę naukową,
mojemu Synkowi, którego uśmiech wspierał mnie w chwilach zwątpienia,
oraz **mojej Mamie**, która zawsze była przy mnie.

Spis treści

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW	5
WSTĘP	6
1. TRENDY NA RYNKU NIEMLECZNEJ ŻYWNOŚCI FERMENTOWANEJ	16
1.1. CHARAKTERYSTYKA BRANŻY SPOŻYWCZEJ	16
1.2. NIEMLECZNE PRODUKTY FERMENTOWANE JAKO ŻYWNOŚĆ FUNKCJONALNA	21
1.3. INNOWACJE PRODUKTOWE NA RYNKU ŻYWNOŚCI FERMENTOWANEJ	29
2. ROZWÓJ NOWEGO PRODUKTU W BRANŻY ŻYWNOŚCIOWEJ – WYMAGANIA I ETAPY POSTĘPOWANIA	38
2.1. WYMAGANIA DOTYCZĄCE PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH	38
2.2. KONCEPCJE ROZWOJU NOWEGO PRODUKTU	44
2.3. MODEL ROZWOJU NOWEGO PRODUKTU SPOŻYWCZEGO	49
2.4. ZARZĄDZANIE PROJEKTEM A ROZWÓJ NOWEGO PRODUKTU SPOŻYWCZEGO	61
3. METODYKA BADAWCZA	65
3.1. CELE, HIPOTEZY BADAWCZE I ZAKRES BADAŃ	65
3.2. MATERIAŁ BADAWCZY, ODCZYNNIKI, MIKROORGANIZMY WSKAŹNIKOWE	69
3.3. METODYKA BADAWCZA	71
3.3.1. BADANIA ANKIETOWE	71
3.3.2. BADANIA LABORATORYJNE - OZNACZENIA WYBRANYCH WYRÓŻNIKÓW JAKOŚCIOWYCH FERMENTOWANEGO SOKU	74
3.3.2.1. OCENA WYBRANYCH WYRÓŻNIKÓW MIKROBIOLOGICZNYCH	74
3.3.2.2. OCENA WYBRANYCH WYRÓŻNIKÓW FIZYKOCHEMICZNYCH ORAZ POMIAR BARWY	78
3.3.2.3. OZNACZENIE WARTOŚCI ODŻYWCZEJ, SKŁADNIKÓW MINERALNYCH I WITAMIN	79
3.3.2.4. OZNACZENIE ZAWARTOŚCI SKŁADNIKÓW BIOAKTYWNYCH I WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWIUTLENIAJĄCYCH	80
3.3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA DANYCH	82
4. WYNIKI I DISKUSJA	84
4.1. GENEROWANIE I SELEKCJA POMYSŁU	84
4.1.1. PROCEDURA POSTĘPOWANIA W GENEROWANIU I SELEKCJI POMYSŁU	84
4.1.2. ZACHOWANIA KONSUMENTÓW NA RYNKU NIEMLECZNYCH PRODUKTÓW FERMENTOWANYCH	90
4.2. BADANIA PODSTAWOWE I STOSOWANE	109
4.2.1. BADANIA PODSTAWOWE: WYRÓŻNIKI JAKOŚCIOWE SPONTANICZNIE FERMENTOWANEGO SOKU Z JARMUŻU	109
4.2.2. BADANIA STOSOWANE: WŁAŚCIWOŚCI PROBIOTYCZNE BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ	122
4.3. ROZWÓJ PROTOTYPÓW PRODUKTÓW	147
4.3.1. OPRACOWANIE PROTOTYPÓW FERMENTOWANYCH SOKÓW Z JARMUŻU	147
4.3.2. SKŁADNIKI ODŻYWCZE I WŁAŚCIWOŚCI PROZDROWOTNE SOKÓW Z JARMUŻU PODDANYCH KONTROLOWANEJ FERMENTACJI	154
PODSUMOWANIE	175
LITERATURA	186
SPIS TABEL	203
SPIS RYSUNKÓW	206
SPIS ZDJĘĆ	207
ZAŁĄCZNIKI	208
ZAŁĄCZNIK 1. KWESTIONARIUSZ ANKIETY	208
ZAŁĄCZNIK 2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA IZOLATÓW BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ	211
ZAŁĄCZNIK 3. WRAŻLIWOŚĆ IZOLATÓW BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ WOBEC ANTYBIOTYKÓW	214
ZAŁĄCZNIK 4. WYNIKI IDENTYFIKACJI PROTEOMICZNEJ IZOLATÓW BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ	217
ZAŁĄCZNIK 5. SEKWENCJE GENETYCZNE WYBRANYCH IZOLATÓW BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ	219

Wykaz najważniejszych skrótów

CLSI	Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. <i>European Food Safety Authority</i>)
FAO	Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FSA	Agencja Norm Żywności (ang. <i>Food Standards Agency</i>)
FUFOSE	Program badawczy Komisji Europejskiej: Żywność Funkcjonalna w Europie (ang. <i>Functional Food Science in Europe</i>)
FOSHU	Oznaczenie Żywność Specjalnego Przeznaczenia Zdrowotnego (ang. <i>Food For Specific Health Uses</i>)
GRAS	Ogólnie uznany za bezpieczny (ang. <i>Generally Recognized As Safe</i>)
ISAPP	Międzynarodowe Stowarzyszenie Naukowe Probiotyków i Prebiotyków (ang. <i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>)
NCBI	Krajowe Centrum Informacji Biotechnologicznej (ang. <i>The National Center for Biotechnology Information</i>)
OECD	Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>)
PAN	Polska Akademia Nauk
QPS	Kwalifikowane domniemanie bezpieczeństwa (ang. <i>Qualified Presumption of Safety</i>)
SALSA	Metoda systematycznego przeglądu literatury (ang. <i>Search, Appraisal, Synthesis, Analysis</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

Wstęp

Rozwój nowych produktów spożywczych, w szczególności żywności o charakterze prozdrowotnym, jest coraz częściej przedmiotem dociekań naukowych, a podejmowane w tym zakresie działania w wymiarze praktycznym przyjmują niespotykaną dotychczas skalę (Horvat i in., 2019). Proces projektowania i rozwoju produktu spożywczego, z uwagi na swoją wieloaspektowość, jest przedsięwzięciem kosztownym, czasochłonnym, jak również charakteryzującym się wysokim ryzykiem niepowodzenia. Niemniej jednak, przedsiębiorstwa spożywcze mogą minimalizować koszty, czas oraz ryzyko niepowodzenia poprzez wdrożenie działań związanych ze skutecznym i efektywnym zarządzaniem procesem rozwoju nowego produktu spożywczego (Boroń, 2010; Pinna i in., 2018).

Branża spożywcza, poczynając od rolnictwa, a kończąc na usługach gastronomicznych, jest jedną z największych gałęzi przemysłu na świecie, odgrywając kluczową rolę w wielu krajach (Meiselman, 2007). W Unii Europejskiej jest uważana za jedną z najbardziej znaczących w obecnej gospodarce, dlatego przyciąga uwagę różnych podmiotów m.in. władz krajowych oraz organizacji krajowych i międzynarodowych (FoodDrinkEurope, 2020; Pinna i in., 2018). Dane wskazują, że branża ta ma istotne znaczenie dla gospodarki europejskiej, stanowiąc aż 15,2% przemysłu wytwórczego (FoodDrinkEurope, 2020). Branża spożywcza jest branżą dojrzałą, która w wyniku licznych przeobrażeń została zdominowana przez wąską grupę nielicznych, największych podmiotów (Bigliardi i Galati, 2013). Pośrednio wpływ na to mają liczne zmiany w technologiach wytwórczych, wzorcach rynkowych i wymaganiach konsumentów zorientowanych na zdrowie, które obserwuje się na przestrzeni ostatnich lat.

Sytuacja panująca w branży determinuje konieczność podejmowania przez przedsiębiorstwa spożywcze działań w zakresie rozwoju nowych produktów. Klasyczna koncepcja konkurencji (Porter, 1980; Porter, 2008) wskazuje, iż w sytuacji występowania silnej koncentracji sektora, mniejsze przedsiębiorstwa nierzadko zmuszane są do przyjmowania strategii bazującej na konkurencji pozacenowej. Konkurencja taka może przybierać różne formy i wymaga od przedsiębiorstw podejmowania stosownych działań z obszaru zarządzania (Widuri i Sutanto, 2019). Jednym ze skutecznych podejść jest strategia dyferencjacji (różnicowania oferty produktowej), której realizacja w przedsiębiorstwie może stanowić odpowiedź na konieczność konkurencji pozacenowej (Jurek-Stępień i Wysocki, 2007). Z kolei podstawą różnicowania oferty może być właśnie rozwój nowych produktów spożywczych. Dlatego też, przedsiębiorstwa działające w branży spożywczej zostają niejako zmuszone do koncentracji swoich zasobów na innowacjach i rozwoju nowych produktów w celu utrzymania bądź zdobycia przewagi konkurencyjnej (Bigliardi i Galati, 2013; Pinna i in., 2018).

Mając na uwadze, że osiągnięcie sukcesu rynkowego przez nowy produkt wymaga jego zaakceptowania przez konsumentów, należy usytuować konsumentów w samym centrum procesu rozwoju nowych produktów (Anwar, 2016). Głównym filarem takiego podejścia jest założenie,

że potrzeby konsumentów powinny być punktem wyjścia dla procesów rozwoju nowych produktów, a celem prac badawczo-rozwojowych powinno być zaspokojenie potrzeb konsumentów, a nie opracowywanie produktów jako takich (Costa i Jongen, 2006). W takim wypadku miarą sukcesu procesu rozwoju nowego produktu jest stopień dopasowania produktu finalnego do potrzeb konsumentów. Podejście to jest szczególnie istotne dla producentów dóbr konsumpcyjnych, ponieważ koncentruje się na wykorzystaniu w procesie rozwojowym wiedzy o użytkownikach końcowych (O'Sullivan, 2017).

Dostosowanie produktów do preferencji konsumentów wymaga od przedsiębiorstw posiadania i wykorzystania wiedzy o panujących na rynku trendach konsumenckich. Prowadzone w tym obszarze badania naukowe wskazują, iż jednym z dominujących obecnie trendów żywieniowych jest trend związany ze zdrowym odżywianiem (Horvat i in., 2019). Literatura naukowa wskazuje, że żywność o dodatkowej wartości prozdrowotnej oferuje istotne możliwości rozwoju dla przedsiębiorstw spożywczych (Kleef i in., 2005). W związku z tym można przypuszczać, że duże szanse na akceptację ze strony konsumentów, a tym samym sukces rynkowy, posiadają produkty o właściwościach funkcjonalnych. Żywność funkcjonalna to taka, która korzystnie wpływa na jedną lub więcej docelowych funkcji w organizmie poza odpowiednim działaniem odżywczym, a przy tym nie jest pigułką, kapsułką ani żadną formą suplementu diety (FUFOSE, 1999). W przypadku produktów funkcjonalnych wymaga się, aby poszczególne składniki były bezpośrednio łączone z konkretnymi, dobrze zdefiniowanymi efektami zdrowotnymi, a efekty te z konkretnym produktem (Lahteenmaki, 2003). Wymaga to naukowego udowodnienia wpływu danego produktu na zdrowie za pośrednictwem badań laboratoryjnych (Tsimiklis i in., 2015).

Co istotne, konsumenci nie postrzegają żywności funkcjonalnej jako jednorodnej kategorii produktowej (Urala i Liisa, 2004). Akceptacja tego rodzaju żywności przez konsumentów zależy od charakterystyki produktu bazowego, który służy jako nośnik składnika funkcjonalnego lub przekonującego przekazu komunikującego korzyści zdrowotne. Badania dowodzą, że konsumenci są szczególnie zainteresowani żywnością funkcjonalną rozwijaną na bazie produktów, które postrzegają jako zdrowe, np. produktów warzywnych i owocowych (Balasubramanian i Cole, 2002).

Obecnie na rynku dostępna jest szeroka gama produktów funkcjonalnych. Przedsiębiorstwa stosujące strategię dyferencjacji aktywnie poszukują więc nisz rynkowych możliwych do zagospodarowania. Na bazie analizy rynku można wysnuć wniosek, iż pewną niszą na rynku spożywczym są produkty fermentowane. Dotyczy to w szczególności napojów fermentowanych, które, pomimo dostępności dla konsumentów, posiadają marginalny udział w rynku (Komisja Europejska, 2016). Obecnie rynek wydaje się być zdominowany przez fermentowane produkty mleczne, choć niemleczne produkty fermentowane na bazie owoców i warzyw przyciągają coraz większą uwagę różnych grup – naukowców, producentów żywności i konsumentów. Trend ten związany jest w szczególności z rosnącą świadomością konsumentów w zakresie korzyści zdrowotnych płynących ze spożycia kiszonych produktów. Dodatkowo, wiele osób zmienia swoje nawyki żywieniowe,

m.in. przechodzi na dietę wegańską lub wegetariańską, unika spożywania mleka krowiego lub laktozy, a także ogranicza spożycie produktów mlecznych o wysokiej zawartości cholesterolu (Granato i in., 2020; Granato, Branco, Nazzaro, Faria, i in., 2010; Min i in., 2019; Panghal i in., 2018).

Zidentyfikowanie tej niszy rynkowej jest przy tym spójne z dotychczasowymi obserwacjami dotyczącymi produktów funkcjonalnych, ponieważ według aktualnego stanu wiedzy, ze względu na zmiany zachodzące podczas fermentacji mlekowej, można zaobserwować dodatkowe właściwości prozdrowotne, wykraczające poza efekt odżywczy. Jak wskazują badania naukowe, spożywanie fermentowanych soków owocowych i warzywnych (zazwyczaj zawierających mikroorganizmy probiotyczne), może przyczynić się do poprawy zdrowia konsumentów m.in. poprzez: modulowanie glikemii (Gao i in., 2019), regulację tkanki tłuszczowej (Verón i in., 2019), aktywność przeciwnowotworową (Ye i in., 2019) i przeciwzapalną (Filannino i in., 2013). Istotnym aspektem jest również dobór kultur starterowych, w tym ich potencjalne właściwości probiotyczne, decydujące o cechach funkcjonalnych fermentowanego produktu. Synergistyczne działanie mikroorganizmów probiotycznych i materiału roślinnego może przyczyniać się do zachowania zdrowej i zrównoważonej mikrobioty jelitowej oraz wpływać na mechanizmy obronne układu odpornościowego (Marco i in., 2021).

Podjęwając próbę selekcji materiału roślinnego, na bazie którego nowy produkt mógłby zostać rozwinięty, przeprowadzono analizę rynku obejmującą ofertę soków fermentowanych oraz charakterystykę właściwości materiału badawczego. W niniejszej pracy zaproponowano jarmuż zielony jako bazę do stworzenia fermentowanego soku z wykorzystaniem autochtonicznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej o potencjale probiotycznym. W ostatnich latach warzywo to zyskało ogromną popularność jako tzw. "*superfood*" ze względu na wysoką zawartość związków bioaktywnych. Właściwości jarmużu zostały dobrze udokumentowane w literaturze, w szczególności jego potencjalne właściwości zapobiegające cukrzycy, chorobom układu krążenia czy też nowotworom (Becerra-Moreno i in., 2014; Biegańska-Marecik i in., 2017; Olsen i in., 2009; Šamec i in., 2018). Prozdrowotne działanie jarmużu jest ściśle związane z jego wysoką zawartością witamin: C, K i A, a także niacyny (B₃), pirydoksyny (B₆), ryboflawiny (B₂) i kwasu foliowego (B₉). Warzywo to charakteryzuje się również znaczną zawartością glukozydów (m.in. glukoiberyny, sinigriny), związków fenolowych (m.in. kwasu kofeinowego, kwercetyny, kemferolu) oraz karotenoidów (m.in. β-karotenu, luteiny). Ponadto jarmuż jest dobrym źródłem makro- i mikroelementów, takich jak potas, wapń, magnez, żelazo, miedź i mangan (Šamec i in., 2018; Szutowska i in., 2020; Thavarajah i in., 2016).

W związku z powyższym stwierdzono, że **rozwój nowych produktów** jest istotnym elementem działalności dla przedsiębiorstw działających na rynku spożywczym, a potencjalnie ważnym kierunkiem rozwoju jest **żywność funkcjonalna** (wpisująca się w preferencje konsumentów związane ze zdrowym odżywianiem), **tworzona na bazie warzyw i owoców** (materiał, który postrzegany jest jako zdrowy) i **poddana procesowi fermentacji mlekowej** (żywność fermentowana posiada relatywnie niewielki udział w rynku). Jako przykład posłużyć może fermentowany sok z jarmużu zielonego.

Należy podkreślić jednak, że badania naukowe poświęcone rozwojowi nowych produktów w branży spożywczej z ukierunkowaniem na produkty fermentowane są ograniczone. Zidentyfikowane w literaturze luki badawcze dotyczą w pierwszej kolejności samego procesu rozwoju nowych produktów zdefiniowanego jako proces przekształcania nowej szansy rynkowej w produkt komercyjny poprzez określoną sekwencję działań (Azanedo i in., 2020; Krishnan i Ulrich, 2001; Rudder i in., 2001). W literaturze naukowej można zidentyfikować liczne modele rozwoju nowych, innowacyjnych produktów (Bernstein i Singh, 2006; Cooper, 2008; Hallstedt i in., 2013; Louw i in., 2018; Rogers, 2003), brak jest jednak jednomyślności dotyczącej modelu rozwoju nowych produktów dedykowanego dla przedsiębiorstw spożywczych i uwzględniającego cechy charakterystyczne branży. Ten niedostatek wiedzy stanowi ważne i aktualne ograniczenie na drodze do poprawy jakości zarządzania procesami rozwojowymi w branży spożywczej. Ponadto, zarządzanie rozwojem nowych produktów wymaga znajomości zachowań konsumentów. Literatura z tego zakresu wykazuje lukę dotyczącą zależności pomiędzy czynnikami demograficzno-społecznymi takimi jak: płeć, wiek, status materialny i miejsce zamieszkania, a częstotliwością konsumpcji (Antonio i Gonzalez, 2009; Büyükkaragöz i in., 2014; Karelakis i in., 2020; Kraus i in., 2017; Rivas-Rojas i Cuffia, 2020), a także lukę odnoszącą się do zachowań polskich konsumentów dotyczących niemlecznych produktów fermentowanych. Stanowi to ograniczenie na początkowych etapach procesu rozwoju nowych produktów, na których następuje ukierunkowanie całego procesu projektowania nowego produktu. Prócz tego, rozwój nowych produktów funkcjonalnych wymaga prowadzenia zaawansowanych badań laboratoryjnych. W tym zakresie zidentyfikowano istotne niedostatki badań dotyczących kompleksowej charakterystyki fermentowanego soku z jarmużu zielonego. W literaturze naukowej podjęto nieliczne próby zbadania potencjału jarmużu zielonego, np. w postaci liofilizowanej jako dodatku do soku jabłkowego w celu zwiększenia właściwości prozdrowotnych produktu (Biegańska-Marecik i in., 2017), w postaci sfermentowanego soku używanego do produkcji sera typu feta (Michalak, Skrzypczak, i in., 2020) lub jako źródło kwasów gentyzynowego i salicylowego o właściwościach przeciwnowotworowych (Michalak, Szwajgier, i in., 2020). Jednakże, pozostało jeszcze wiele obszarów, które mogą uzupełnić dotychczasowe rozważania, m.in. analizy mikrobiologiczne (ukierunkowane na jakość materiału badawczego, właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz możliwość izolacji i selekcji bakterii fermentacji mlekowej o potencjalnych właściwościach probiotycznych), oraz analizy instrumentalne opierające się na identyfikacji związków biologicznie czynnych (np. zawartość witamin, związków fenolowych, glukozydów).

W związku z tym, żeby ukierunkować prowadzone prace, w rozprawie sformułowano następujący problem badawczy: **W jaki sposób fermentacja mlekowa kształtuje wybrane właściwości prozdrowotne soku z jarmużu zielonego?**

W nawiązaniu do określonego problemu badawczego w pracy sformułowano cel główny badań: **Zaprojektowanie i rozwój prototypu nowego produktu spożywczego poprzez fermentację soku z jarmużu przy użyciu wyselekcjonowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej.**

W uzupełnieniu powyższego celu głównego sformułowano 7 celów szczegółowych (CS):

- CS1.** Wypracowanie modelowego podejścia do rozwoju nowych produktów spożywczych.
- CS2.** Ustalenie zachowań polskich konsumentów dotyczących niemlecznych produktów fermentowanych.
- CS3.** Określenie wybranych właściwości prozdrowotnych soku z jarmużu zielonego poddanego fermentacji spontanicznej.
- CS4.** Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z mikrobioty jarmużu zielonego podczas kolejnych etapów fermentacji spontanicznej.
- CS5.** Charakterystyka potencjału probiotycznego oraz molekularna identyfikacja wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej.
- CS6.** Opracowanie prototypów fermentowanych soków z jarmużu zielonego.
- CS7.** Określenie wpływu fermentacji z wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów bakterii na wybrane parametry fizykochemiczne, właściwości odżywcze i prozdrowotne kiszzonego soku wytworzonego na bazie jarmużu zielonego.

Założone cele posłużyły do weryfikacji hipotez, sformułowanych w oparciu o analizę danych literaturowych i badania wstępne. Hipotezy zostały postawione w zakresie celów poznawczych i technologicznych. W przypadku celu o charakterze koncepcyjnym stawianie hipotez nie było zasadne. Hipotezy sformułowano w następujący sposób:

- H1.** Czynniki demograficzne determinują wybory konsumentów w zakresie konsumpcji kiszonych produktów warzywnych (*hipoteza postawiona na bazie m.in.: Antonio i Gonzalez, 2009; Büyükkaragöz i in., 2014; Kraus i in., 2017; Rivas-Rojas i Cuffia, 2020*).
- H2.** Spontanicznie fermentowany sok z jarmużu charakteryzuje się wyższą zawartością związków bioaktywnych niż świeży sok (*hipoteza postawiona na bazie m.in.: Di Cagno i in., 2013; Filannino i in., 2018; Muñoz i in., 2017; Septembre-Malaterre i in., 2018*).
- H3.** Wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane podczas spontanicznej fermentacji jarmużu zielonego charakteryzują się potencjalnymi właściwościami probiotycznymi (*hipoteza postawiona na bazie m.in.: Binda i in., 2020; Bourdichon i in., 2018; EFSA 2007, 2020; FAO i WHO, 2006; FDA 2021; Marco i in., 2021*).
- H4.** Mikrobiota jarmużu stanowi źródło bakterii fermentacji mlekowej przydatnych jako kultury starterowe do modelowania wybranych właściwości prozdrowotnych fermentowanego soku z jarmużu zielonego (*hipoteza postawiona na bazie m.in.: Marco i in., 2021; Septembre-Malaterre i in., 2018; Torres i in., 2020*).
- H5.** Kontrolowana fermentacja soku z jarmużu pozwala na uzyskanie wyższej zawartości wybranych składników bioaktywnych w porównaniu ze świeżym sokiem i sokiem poddanym spontanicznej fermentacji (*hipoteza postawiona na bazie m.in.: Di Cagno i in., 2013; Filannino i in., 2018; Gobetti i in., 2010; Hutkins, 2019; Muñoz i in., 2017; Septembre-Malaterre i in., 2018*).

Aby osiągnąć pierwszy cel szczegółowy wypracowano autorski model rozwoju nowych produktów spożywczych z wykorzystaniem systematycznych studiów literaturowych (procedura SALSA) (Booth, A., Papaioannou, D., i Sutton, 2012). W efekcie wyselekcjonowano najistotniejsze prace badawcze, które zostały poddane szczegółowej analizie treści. Syntezę przeprowadzono ze względu na przedmiot badań oraz typ modelu, które zostały przedstawione w wyselekcjonowanych publikacjach. Publikacje przeanalizowano wykorzystując elementy metody metaetnografii (ang. *metaetnography*) (Siau i Long, 2005).

Aby osiągnąć drugi cel szczegółowy oraz zweryfikować hipotezę pierwszą przeprowadzono badanie empiryczne. Przedmiot badania stanowiły zachowania polskich konsumentów na rynku spożywczym, w tym w szczególności zachowania konsumentów dotyczące niemlecznych produktów fermentowanych. Do zbierania informacji wykorzystano autorski kwestionariusz. Instrument pomiarowy został podzielony na trzy części dotyczące kolejno: wyborów konsumentów w zakresie konsumpcji owoców, warzyw i ich przetworów, wyborów konsumentów w zakresie konsumpcji kiszonych produktów warzywnych oraz oferty rynkowej kiszonych soków warzywnych. Narzędzia statystycznej analizy danych zostały wykorzystane w celu zweryfikowania postawionej hipotezy. Ze względu na charakter zmiennych, wykorzystano regresję porządkową (IBM, 2022). Opracowano dwa modele: (1) dla kiszonych soków warzywnych oraz (2) dla kiszonych produktów warzywnych.

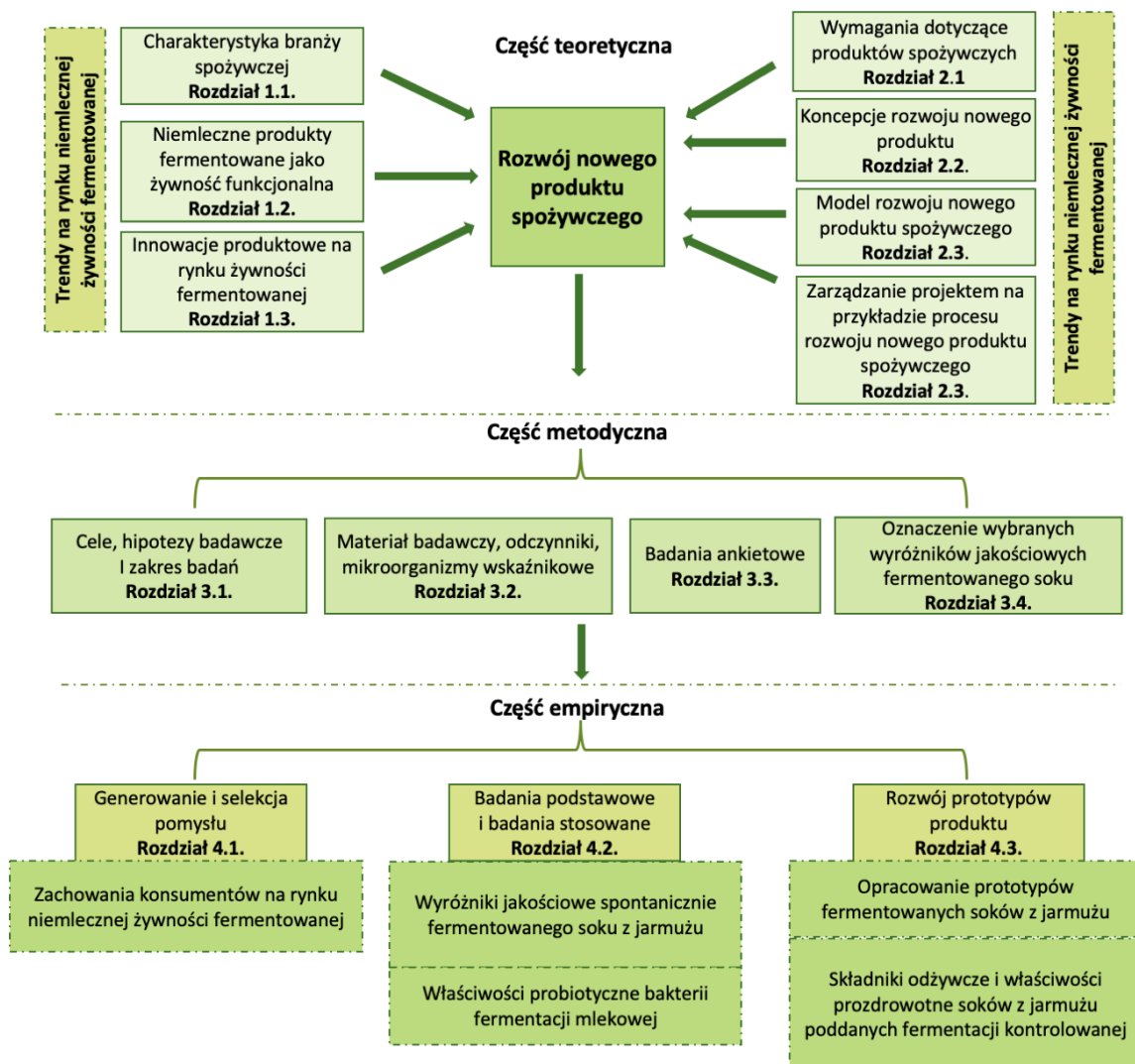
Osiągnięcie celów szczegółowych (od CS3 do CS7) oraz zweryfikowanie postawionych hipotez badawczych (od H2 do H5) zostało przeprowadzone na bazie licznych badań laboratoryjnych obejmujących szeroki zakres analiz mikrobiologicznych, fizykochemicznych oraz instrumentalnych. Badania te koncentrowały się na charakterystyce soku z jarmużu zielonego poddanego zarówno fermentacji spontanicznej jak i kontrolowanej oraz na określeniu potencjalnych właściwości probiotycznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Badania w tym zakresie obejmowały:

- a) **Ocenę wyróżników mikrobiologicznych** (ocenę jakości mikrobiologicznej przeprowadzono z wykorzystaniem klasycznej metody płytkowej, właściwości przeciwdrobnoustrojowe oznaczono metodą dwukrotnych rozcieńczeń na mikroplatkach, przeprowadzono izolację i charakterystykę bakterii fermentacji mlekowej, aktywność przeciwdrobnoustrojową izolatów bakterii określono z pomocą metody dyfuzji studzienkowej, wrażliwość izolatów bakterii na antybiotyki przeprowadzono metodą krążkową, tolerancję izolatów względem NaCl, soli żółciowych i niskiego pH określono metodą mikroplatkową, identyfikację izolatów przeprowadzono metodą proteomiczną z wykorzystaniem MALDI-TOF oraz metodą genetyczną z wykorzystaniem genu 16S RNA).
- a) **Ocenę wyróżników fizykochemicznych** (wykonano pomiar pH, całkowitą zawartość rozpuszczalnych substancji stałych określono z użyciem refraktometru, oznaczono kwasowość miareczkową, przeprowadzono spektrofotometryczny pomiar barwy).

- b) **Oznaczenie wartości odżywczej, składników mineralnych i witamin** (określono wartość odżywczą, zawartość fruktozy i glukozy oznaczono metodą HPLC, zawartość składników mineralnych i kadmu przeprowadzono przy użyciu atomowej spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie mikrofalowej, zawartość witaminy C i witamin z grupy B oznaczono metodą HPLC).
- c) **Oznaczenie zawartości składników bioaktywnych i właściwości przeciwutleniających** (oznaczono ogólną zawartość związków fenolowych z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu, zawartość związków fenolowych, karotenoidów i glukozynolanów oznaczono metodą HPLC, właściwości przeciwutleniające określono z wykorzystaniem metody TEAC).

W pracy wykorzystano literaturę polskojęzyczną i anglojęzyczną z zakresu: rozwoju nowych produktów, zarządzania projektami, innowacji, a także specyfiki rynku spożywczego i przedsiębiorstw na nim działających. Prócz tego bazowano na literaturze koncentrującej się na możliwościach biokonwersji związków biologicznie czynnych przez bakterie fermentacji mlekowej w różnych matrycach roślinnych oraz właściwościach probiotycznych mikroorganizmów. Na bazie rozważań i analizy wyników badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie starano się wzbogacić stan wiedzy w dyscyplinie nauk o zarządzaniu i jakości. W związku z tym, opracowano model rozwoju nowych produktów spożywczych, który dzięki prezentacji specyfiki branży wzbogaca wiedzę z zakresu zarządzania projektem rozwojowym na rynku spożywczym. W wyniku badań konsumenckich ustalono, jakie są aktualne zachowania polskich konsumentów dotyczące niemlecznych produktów fermentowanych. Z perspektywy zarządzania procesem rozwoju nowych produktów w ujęciu projektowym ten zasób wiedzy jest szczególnie istotny, gdyż pozwala na ukierunkowanie całego procesu. W rozprawie wypracowano również nową wiedzę dotyczącą możliwości przeprowadzania fermentacji soku z jarmużu zielonego z wykorzystaniem autochtonicznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej o potencjale probiotycznym. Wskazano, że fermentowany sok z jarmużu może być postrzegany jako produkt funkcjonalny z uwagi na zawartość różnych związków biologicznie czynnych oraz określono wpływ poszczególnych kultur starterowych na ich profil. Ponadto, zaobserwowano, że wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej mogą charakteryzować się potencjalnymi właściwościami probiotycznymi. Badania te wpisują się w nauki o zarządzaniu i jakości, ponieważ z jednej strony koncentrują się na aspektach zarządczych dotyczących całego projektu rozwoju nowego produktu, a z drugiej strony obejmują szereg analiz mających na celu zapewnienie jakości, bezpieczeństwa oraz właściwości prozdrowotnych produktu.

Praca składa się ze wstępu, czterech rozdziałów oraz podsumowania. Powiązania pomiędzy poszczególnymi częściami oraz logika wyvodu rozprawy zostały przedstawione na rysunku 1.



Rysunek 1. Układ rozprawy doktorskiej

Źródło: opracowanie własne

W rozdziale pierwszym przedstawiono trendy panujące na rynku żywności, w tym w szczególności na rynku żywności fermentowanej. W poszczególnych podrozdziałach zaprezentowano rozważania dotyczące nasilenia walki konkurencyjnej w branży spożywczej, a także podstawy dla prowadzenia przez przedsiębiorstwa konkurencji na bazie strategii dyferencjacji. Odniesiono się do wagi skutecznego zarządzania rozwojem nowych produktów, a także wstępnie zasygnalizowano istotną rolę konsumentów w procesie. Na bazie analiz rynku wskazano i scharakteryzowano dominujący obecnie na rynku trend żywieniowy związany ze zdrowym odżywianiem. W kolejnym podrozdziale zdefiniowano żywność funkcjonalną oraz omówiono charakterystykę żywności fermentowanej. Wskazano przede wszystkim na ich właściwości prozdrowotne, wynikające głównie z obecności związków biologicznie czynnych i dobroczynnych mikroorganizmów. Finalnie, w rozdziale pierwszym zidentyfikowano i omówiono występującą na rynku spożywczym niszę, którą stanowią produkty fermentowane, w tym

przede wszystkim napoje fermentowane. Scharakteryzowano innowacje na rynku żywności i innowacje na rynku żywności fermentowanej oraz przedstawiono uzasadnienie dla konieczności aktywnego zarządzania rozwojem nowych produktów na rynku spożywczym.

W rozdziale drugim skoncentrowano się na rozwoju nowych produktów w branży spożywczej. W pierwszym podrozdziale zaprezentowano wymagania dotyczące niemlecznych produktów fermentowanych, w tym przede wszystkim przedstawiono uregulowania europejskie i polskie panujące na rynku spożywczym. W dalszej części omówiono naukowe podstawy koncepcji rozwoju nowych produktów wskazując, iż głównym filarem koncepcji jest to, że potrzeby konsumentów powinny być punktem wyjścia dla procesów rozwoju nowych produktów. W podrozdziale trzecim wypracowano autorski model rozwoju nowych produktów spożywczych. Zaprezentowano metodykę prowadzenia systematycznych studiów literaturowych, a następnie autorski model rozwoju nowego produktu. Model ten obejmuje siedem wyróżniających się etapów: generowanie pomysłu, wybór pomysłu, badania, rozwój, testowanie, wprowadzenie na rynek, monitorowanie. W ostatnim podrozdziale rozważania koncentrowały się na zarządzaniu procesem rozwoju nowego produktu w ujęciu projektowym. Na bazie metodyki zaproponowanej przez Project Management Institute (PMI) przedstawiono przykłady zarządzania na bazie rozwoju fermentowanego soku z jarmużu zielonego.

W rozdziale trzecim zaprezentowano cele i hipotezy badawcze oraz przedstawiono metodykę prowadzenia badań. Badania empiryczne obejmowały zarówno badania konsumenckie jak i laboratoryjne. W odniesieniu do badań konsumenckich przedstawiono metodykę prowadzenia badań ankietowych. Z kolei w nawiązaniu do badań laboratoryjnych omówiono materiał badawczy, odczynniki i mikroorganizmy wskaźnikowe. Następnie, szczegółowo zaprezentowano metody wykorzystane do prowadzenia badań mikrobiologicznych, fizykochemicznych oraz instrumentalnych. Na końcu przedstawiono metody wykorzystywane w statystycznej analizie danych.

W rozdziale czwartym przedstawiono wyniki badań własnych i dyskusję. Rozdział ten posiada precyzyjnie zaplanowaną strukturę. Struktura ta została opracowana tak, aby zachować spójność z wypracowanym modelem rozwoju nowych produktów spożywczych. Kolejne podrozdziały odpowiadają więc wybranym kolejnym etapom wyróżnionym w modelu. Rozdział podzielony jest na trzy podrozdziały: generowanie i selekcja pomysłów, badania oraz rozwój. W pierwszym podrozdziale zaprezentowano wyniki prac koncepcyjnych oraz badań empirycznych mających na celu wypracowanie koncepcji nowego produktu spożywczego oraz ustalenie zachowań polskich konsumentów dotyczących niemlecznych produktów fermentowanych. W drugim podrozdziale zaprezentowano wyniki dotyczące właściwości prozdrowotnych i wyróżników jakościowych spontanicznie fermentowanego soku z jarmużu, a także potencjalnych właściwości probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej. W ostatnim podrozdziale zaprezentowano wyniki dotyczące opracowania prototypów fermentowanego soku oraz przedstawiono badania obejmujące określenie zawartości składników odżywczych oraz właściwości prozdrowotnych soków poddanych fermentacji kontrolowanej.

Pracę kończy podsumowanie, w którym udzielono odpowiedzi na pytanie badawcze oraz omówiono wyniki testowania hipotez. Przedstawiono również ograniczenia dotyczące uzyskanych wyników, możliwe kierunki dalszych badań oraz implikacje menedżerskie dla przedsiębiorstw spożywczych.

1. Trendy na rynku niemlecznej żywności fermentowanej

Poniższy rozdział przedstawia charakterystykę branży spożywczej zarówno z perspektywy Unii Europejskiej (UE) jak i z polskiej z uwzględnieniem trendów konsumenckich dotyczących żywności o charakterze prozdrowotnym. Przedstawione zagadnienia dotyczą definicji żywności funkcjonalnej oraz właściwości funkcjonalnych produktów fermentowanych tj. obecności mikroorganizmów probiotycznych bądź biokonwersji związków o walorach prozdrowotnych. W dalszym etapie pracy skoncentrowano się na zagadnieniu innowacji produktowych z uwzględnieniem nowych kiszonych produktów na bazie surowców roślinnych.

1.1. Charakterystyka branży spożywczej

Przemysł spożywczy, począwszy od rolnictwa aż do usług gastronomicznych, jest jednym z największych przemysłów na świecie (Meiselman, 2007). W konsekwencji, zarówno w świecie nauki jak i praktyki biznesowej przedsiębiorstw, podejmuje się znaczące wysiłki mające na celu zarówno zrozumienie mechaniki działania całego rynku spożywczego, jak i określenie skutecznych podejść do zarządzania podmiotami działającymi na tym rynku. W ostatnich latach częste zmiany w technologiach wytwórczych, wzorcach rynkowych i wymaganiach konsumentów zorientowanych na zdrowie zmusiły firmy spożywcze do skupienia się na innowacjach w celu utrzymania lub zdobycia przewagi konkurencyjnej. Dlatego też, aby przedsiębiorstwa mogły odnieść sukces i być wysoce konkurencyjne na rynku, konieczne jest zrozumienie tych wyzwań i znalezienie sposobów radzenia sobie z nimi **za pomocą skutecznego zarządzania skoncentrowanego na innowacjach i rozwoju nowych produktów** (Bigliardi i Galati, 2013; Pinna i in., 2018).

Podaż na rynku spożywczym tworzona jest przez skomplikowaną sieć podmiotów o silnie różnicowanych obszarach podstawowej działalności gospodarczej, rozciągających się od producentów płodów rolnych, hodowców zwierząt, przedsiębiorstw zajmujących się rybołówstwem i rybactwem, przez producentów artykułów spożywczych, aż po dystrybutorów żywności (Gołaś, 2010). W ramach całego przemysłu spożywczego wyodrębnieniu podlegać może sektor produkcji żywności, który uznany został za szczególnie istotny naukowo. Sektor ten obejmuje podmioty zajmujące się przetwórstwem produktów zwierzęcych i roślinnych, a także przetwórstwem wtórnym bądź też produkcją używek. W ramach branży spożywczej zgrupowani są więc producenci artykułów spożywczych oraz producenci napojów. Efektem pracy podmiotów działających w tej branży mogą być produkty zarówno niskoprzetworzone, jak i stanowiące efekt zaawansowanych procesów technologicznych (Polska Agencja Informacji i Inwestycji Zagranicznych, 2013).

Na poziomie Unii Europejskiej branża spożywcza jest uważana za jedną z najbardziej znaczących w obecnej gospodarce i dlatego przyciąga uwagę różnych organizacji oraz władz krajowych i organizacji międzynarodowych (FoodDrinkEurope, 2020; Pinna i in., 2018). Według raportu Food Drink Europe,

branża ta ma duży wpływ na gospodarkę europejską, stanowiąc 15,2% przemysłu wytwórczego (FoodDrinkEurope, 2020). Wartość ta znajduje pośrednie potwierdzenie w analizach Eurostatu, według których branża spożywcza stanowi największy sektor produkcyjny w UE pod względem zarówno miejsc pracy jak i generowanej wartości dodanej (Eurostat, 2022). Branża spożywcza stanowi też istotny element handlu z krajami spoza Unii. UE posiada znaczną nadwyżkę handlową w handlu żywnością, a unijne produkty żywnościowe znajdują szerokie uznanie wśród klientów poza granicami Wspólnoty. W ciągu ostatnich 10 lat eksport żywności i napojów z UE podwoił się, osiągając wartość ponad 90 mld euro i przyczyniając się do dodatniego salda obrotów handlowych w tym zakresie, wynoszącego prawie 30 mld euro (Eurostat, 2022).

W ramach UE w sektorze produkcji żywności działa ponad 300 tysięcy przedsiębiorstw, z czego około 290 tysięcy produkuje żywność, a pozostałe 20 tysięcy napoje (Eurostat, 2009). Pomimo tak wysokiej liczby przedsiębiorstw, sektor wykazuje silną koncentrację, z dominującą pozycją największych przedsiębiorstw (np. Nestlé, Unilever, Danone) (Eurostat, 2009). W świetle badań naukowych, pozycja podmiotów posiadających niewielki udział w branży spożywczej jest bardzo wymagająca, a nasilenie walki konkurencyjnej pomiędzy nimi – duże (O’Sullivan, 2017). Do sytuacji tej można odnieść się na bazie klasycznej już koncepcji analizy otoczenia konkurencyjnego przedsiębiorstwa (Porter, 1980; Porter, 2008). Zakłada ona, iż rywalizacja pomiędzy istniejącymi konkurentami może przybierać wiele różnych form, w tym obniżki ceny, wprowadzanie nowych produktów, intensywne kampanie reklamowe, czy ulepszenia usług towarzyszących (Porter, 2008). Zgodnie z tym podejściem, sposób i intensywność walki konkurencyjnej w branży uzależniona jest w dużej mierze właśnie od stopnia koncentracji branży i zmian zachodzących w tym zakresie. Występowanie ograniczonej liczby liderów rynkowych (podmiotów o dominującym udziale w rynku) może nieść ze sobą ryzyko kontroli cen w branży i rodzi potrzebę wzrostu konkurencji pozacenowej, której podstawą jest różnicowanie oferty produktowej (Jurek-Stępień i Wysocki, 2007). Strategia ta jest szczególnie wskazana, kiedy występuje istotne zróżnicowanie produktów dostępnych na rynku, a produkty nie muszą być produktami masowymi, żeby ich produkcja była opłacalna (Porter, 2008). Strategia różnicowania stanowi więc alternatywę dla strategii przywództwa cenowego i jest typem strategii biznesowej, która koncentruje się na tworzeniu unikalnych i wysokich jakościowo usług i produktów, co pozwala na odróżnienie się od konkurencji. W najprostszym ujęciu celem strategii dyferencjacji jest więc wygenerowanie usługi bądź produktu, który z punktu widzenia klienta będzie niepowtarzalny (Anwar, 2016). **Podstawą strategii dyferencjacji jest tworzenie dodatkowych korzyści dla klientów, a nieodłączną cechą podmiotów ją stosujących są ponadprzeciętne nakłady na działalność badawczo-rozwojową** (Widuri i Sutanto, 2019). Przedsiębiorstwa, które stosują strategię różnicowania, wykorzystują zaawansowaną technologię, specjalistyczne aktywa i korzystają z usług pracowników o wysokich kompetencjach, co pozwala rozwijać innowacyjne produkty odróżniające się od produktów konkurencji. **Nieodłączną cechą wykorzystania strategii dyferencjacji w przedsiębiorstwach spożywczych są zaawansowane badania laboratoryjne**

z wykorzystaniem najnowszej technologii, które mogą obejmować szereg analiz koncentrujących się na jakości produktu bądź na jego walorach prozdrowotnych. Analizy takie obejmują szereg interdyscyplinarnych badań od podstawowych do zaawansowanych - wyróżnia się m.in. analizę parametrów fizykochemicznych, badania mikrobiologiczne dotyczące bezpieczeństwa produktu i jego jakości mikrobiologicznej oraz analizy instrumentalne, skupiające się na ocenie potencjalnych właściwości produktu (np. zawartość witamin, właściwości przeciwutleniające, profil związków fenolowych). Strategia ta jest tym bardziej skuteczna, że jak pokazują dotychczasowe badania naukowe, pomimo aktywnego zaangażowania podmiotów w działalność badawczo-rozwojową, w sektorze produkcji żywności dominują innowacje inkrementalne – stanowiące wyłącznie ulepszenie produktów już istniejących (Tsimiklis i in., 2015). **Dlatego też, możliwość przetrwania w długim okresie oraz zapewnienie możliwości realizacji swoich podstawowych celów przez firmy działające w branży spożywczej, wymaga wzmocnionych działań w zakresie zarządzania i różnicowania oferty produktowej, w tym przede wszystkim zarządzania procesem rozwoju nowych produktów.**

W związku z powyższymi rozważaniami, wskazuje się na istotną wagę różnicowania oferty produktowej również w polskiej branży spożywczej. W Polsce branża ta podlega dynamicznemu rozwojowi. W 2021 r. wartość eksportu żywności produkowanej w Polsce za granicę wyniosła 170,8 mld PLN (37,4 mld EUR), przy czym ponad 70% tego eksportu trafiło na rynki unijne (Polska Agencja Inwestycji i Handlu, 2021). Prowadzone w latach ubiegłych badania naukowe, dotyczące polskich przedsiębiorstw działających w branży spożywczej wskazują, iż przed wstąpieniem Polski do UE wydajność pracy była przeciętnie dwukrotnie niższa w Polsce niż w krajach członkowskich UE. Sytuacja ta w okresie późniejszym uległa poprawie, a wydajność pracy w polskich przedsiębiorstwach branży spożywczej znacząco wzrosła. W tym kontekście istotne są również analizy branżowe, które wykazały ograniczoną innowacyjność polskich przedsiębiorstw spożywczych oraz podkreśliły zapotrzebowanie na systematyczne wspieranie innowacyjności (Wasilewski i Gospodarowicz, 2016). **Łącząc zagadnienia konkurencji, zarządzania oraz innowacyjności, literatura przedmiotu wskazuje na konieczność aktywnego zarządzania rozwojem innowacji.** Jest to szczególnie zasadne w przypadku branż o wysokim nasileniu walki konkurencyjnej (Valmohammadi, 2012). Poprzez zarządzanie innowacjami rozumieć należy wprowadzanie praktyk, procesów i struktur, które mają służyć realizacji celów organizacji (Volberda i in., 2013). Zarządzanie innowacjami obejmuje przy tym m.in. takie obszary jak: rozwój nowych produktów/usług, promocja nowych produktów/usług, wykorzystanie najnowszych technologii w realizowanych procesach i w rozwoju nowych produktów, zagospodarowanie nowych rynków, analiza oraz usprawnienie obecnych produktów, rozszerzenie funkcjonalności obecnych produktów, czy tworzenie nowych linii produktów (Valmohammadi, 2012).

Podsumowując dotychczasowe rozważania należy wskazać, iż zarówno europejski jak i polski sektor produkcji żywności charakteryzują się wysokim nasileniem walki konkurencyjnej i dominującą pozycją nielicznych, największych przedsiębiorstw, co stymuluje konkurencję pozacenową. **W związku**

z tym, rozwój nowych produktów jest kluczowym aspektem działalności przedsiębiorstw w branży spożywczej. Literatura przedmiotu jest przy tym zgodna z dotychczasowymi wynikami badań rynku, które wskazują na wysokie nakłady na badania i rozwój oraz wprowadzanie licznych nowych produktów (Komisja Europejska, 2016).

Ze względu na nasilenie walki konkurencyjnej oraz konieczność rozwoju nowych produktów, sektor produkcji żywności podlega dynamicznym przemianom. Producenci podejmują starania zarówno w zakresie obserwacji trendów rynkowych, jak i – w miarę możliwości – aktywnego ich kreowania. Kształtowanie oferty produktowej przez producentów żywności powinno więc uwzględniać aktualne trendy rynkowe oraz wyniki analizy otoczenia. Działania takie pozwalają dostosować ofertę do rynku docelowego. Koncepcja zarządzania rozwojem nowego produktu z uwzględnieniem informacji płynącej z otoczenia, w tym o aktualnych trendach rynkowych, jest bardzo dobrze ugruntowana w naukach o zarządzaniu i jakości (Davis, 1993). **Koncepcja łącząca badania konsumenckie z rozwojem nowego produktu wskazuje, iż lepsze dopasowanie charakterystyki nowego produktu do potrzeb klientów zwiększa jego szanse na sukces rynkowy** (Costa i Jongen, 2006). Tym samym, dopasowanie nowego produktu do aktualnych trendów rynkowych zwiększa szanse na ich uznanie przez szeroką grupę odbiorców, a dla przedsiębiorstwa skutkuje to zwiększeniem szans na przetrwanie w długim okresie oraz realizację podstawowych celów działalności.

Jednym z najważniejszych trendów, które obserwuje się obecnie na rynku spożywczym jest trend związany ze zdrową żywnością, stąd też rośnie zainteresowanie przedsiębiorstw wytwarzaniem żywności o odpowiednich parametrach tj. wysokiej zawartości witamin czy też związków przeciwutleniających. Ten prozdrowotny trend wynika z takich czynników, jak: zwiększona świadomość konsumentów dotycząca kwestii zdrowotnych, liczne badania naukowe dotyczące wpływu diety na zdrowie konsumenta, promocja zaleceń dotyczących zbilansowanej diety oraz zwiększone koszty opieki zdrowotnej dla rządów (Bogue i Sorenson, 2007).

Dopasowanie oferty produktowej przedsiębiorstwa jest jednym z istotnych kryteriów sukcesu nowych produktów. Jak wskazuje się w literaturze przedmiotu – jedną z najpopularniejszych kategorii produktowych ostatnich lat jest właśnie kategoria produktów obejmująca zdrową żywność m.in. żywność o obniżonej kaloryczności, żywność funkcjonalną czy żywność o niskiej zawartości tłuszczu (Meiselman, 2007). Zdrowie i dobre samopoczucie reprezentują dwa istotne trendy żywieniowe, które napędzają działalność rozwojową w zakresie nowych produktów na globalnym rynku żywności i napojów (MacFie, 2007). Co więcej, wyniki badań wskazują, iż rozwój nowych produktów spożywczych najczęściej bazuje właśnie na trendzie związanym ze zdrową żywnością (74%), następnie zaś na koncepcji żywności wygodnej (61%) i zrównoważonej (50%) (Horvat, Granato, i in., 2019).

Przedsiębiorstwa coraz częściej bazują na preferencjach konsumentów w kontekście wytwarzania nowych, innowacyjnych produktów o cechach prozdrowotnych. Podstawy teoretyczne, pozwalające na wyjaśnienie preferencji konsumentów w zakresie zdrowego odżywiania są zróżnicowane.

Jedną z uznanych w literaturze przedmiotu teorii, które mogą tu zostać wykorzystane, jest teoria planowanego zachowania (ang. *theory of planned behaviour*) (Ajzen, 1991). Teoria ta opisuje związek pomiędzy intencją (np. chęć bycia zdrowym), a zachowaniem (np. zakup zdrowych produktów spożywczych). Przedstawia ona analizę związku pomiędzy postawami (ang. *attitudes*), subiektywnymi normami (ang. *subjective norms*), poczuciem sprawowania kontroli (ang. *perceived behavioural control*), intencjami (ang. *intentions*) i zachowaniem (ang. *behaviour*). W świetle teorii, postawy wynikają z przekonań jednostki o oczekiwanych efektach danego zachowania (im wyższa wartość oczekiwanych efektów, tym bardziej pozytywna postawa względem zachowania i tym większa intencja jego realizacji).

Na rynku spożywczym postawy dotyczą np. oczekiwania poprawy stanu zdrowia w wyniku spożywania zdrowej żywności. Subiektywne normy są ściśle związane z presją otoczenia na realizację lub zaniechanie realizacji danego zachowania (wynikają z przekonania, iż pewne zachowanie będzie lub nie będzie popierane przez otoczenie). Zachowanie konsumentów na rynku spożywczym koncentruje się na subiektywnych normach, które dotyczą np. oddziaływania rodziny, przyjaciół i idoli, a także inicjatyw wspierających zachowania prozdrowotne. Z kolei poczucie sprawowania kontroli dotyczy postrzegania przez jednostkę zasobów i możliwości jakimi dysponuje, które są niezbędne do realizacji danego zachowania (ocena zasobów i możliwości jest subiektywna). Na rynku spożywczym dotyczy np. czasu i zasobów materialnych niezbędnych do wypracowania zdrowej diety.

Pojęcie intencji jest kluczowe dla tej teorii. W tym ujęciu, intencje zawierają w sobie wszystkie motywacyjne komponenty ludzkiego zachowania i są: „*wskaźnikiem tego, jak bardzo ludzie są skłonni realizować dane zachowanie*” (Ajzen, 1991, s. 181). Innymi słowy, intencje stanowią zmienną moderującą zależność między postawami względem zdrowej żywności, normami subiektywnymi nakazującymi jej spożycie oraz poczuciem sprawowania kontroli nad możliwością ich spożywania, a zachowaniem jednostki (Grønhoj i in., 2013).

Kolejnym istotnym elementem teorii jest pojęcie przekonań (Grønhoj i in., 2013). Teoria wskazuje, iż postawy, subiektywne normy i poczucie sprawowania kontroli nie są konstruktami niezależnymi, ale są same w sobie kształtowane przez przekonania. Przekonania z kolei mogą być kształtowane przez liczne zmienne „zewnątrzne” względem podstawowych zmiennych modelu, np. cechy społeczno-demograficzne i osobowościowe, wcześniejsze doświadczenia jednostki, wiedza itp. (Mynarska, 2012). **Jest to zagadnienie kluczowe dla rozważań dotyczących rynku spożywczego ze względu na oddziaływanie społeczne wywierane przez inicjatywy promujące prozdrowotne zachowania żywieniowe.** Inicjatywy takie są liczne i są podejmowane w całej Europie, czego efektem jest zmiana w zakresie postaw, subiektywnych norm oraz poczucia sprawowania kontroli nad możliwością stosowania zbilansowanej diety przez konsumentów. W konsekwencji prowadzi to również do dostosowania podaży przez przedsiębiorstwa produkujące produkty spożywcze. Przykładem inicjatyw dotyczących zdrowego żywienia mogą być np. Europejska Inicjatywa Zdrowego Serca (ang. *European Heart Health Initiative*), Europejski Program Kształcenia Uniwersyteckiego w Zakresie Żywienia i Zdrowia

Publicznego (ang. *European Master Program In Public Health Nutrition*), program Żywność i Dieta dla Zdrowego Stylu Życia w Europie (ang. *Nutrition And Diet For Healthy Lifestyles In Europe*) (Komisja Europejska, 2022b). W Polsce, spośród wielu inicjatyw, na uwagę zasługuje np. funkcjonowanie Narodowego Centrum Edukacji Żywieniowej (Narodowe Centrum Edukacji Żywieniowej, 2022) prowadzące programy edukacyjne takie jak "5 porcji warzyw, owoców lub soków!", "Soki i musy - witaminy w SMART formie" czy "Niezwykłe właściwości zwykłych owoców".

Teoria ta wskazuje, iż w sytuacji, gdy konsument ma pozytywny stosunek do danego zachowania (postrzega, że otoczenie chce, by je wykonał oraz czuje się zdolny do jego wykonania), będzie przejawiał intencję wykonania tego zachowania. W obszarze zdrowego żywienia, wyniki badań bazujących na teorii planowanego zachowania wskazują główne psychologiczne przyczyny zachowań prozdrowotnych. Wiedza ta może być wykorzystana zarówno do przewidywania jak i wpływania na zachowania konsumentów, np. w zakresie wpływania na postawy względem nowych produktów (Grønhoj i in., 2013). W toku badań stwierdzono, iż długotrwałe promowanie pozytywnych postaw względem zdrowego żywienia i zbudowanie wspierających je norm społecznych związanych ze zdrowym odżywianiem pozwalają kreować zarówno intencje, jak i zachowania prozdrowotne (Bassett-Gunter i in., 2013). **Konkluzja ta pozwala – przynajmniej częściowo i u części konsumentów – wytłumaczyć obecny trend związany ze zdrowym żywnością jako efekt promowania w długim okresie prozdrowotnych postaw i budowania norm społecznych wspierających zdrowe odżywianie. W konsekwencji doprowadziły one do rozwijania się u konsumentów intencji zakupu zdrowej żywności, co przekłada się następnie na ich wybory żywieniowe.**

1.2. Niemleczne produkty fermentowane jako żywność funkcjonalna

Rynek żywności funkcjonalnej intensywnie rozwija się już od 2000 roku (Gray i in., 2003), a perspektywy rozwoju tego rynku są obiecujące. Żywność o dodatkowej wartości prozdrowotnej oferuje istotne możliwości rozwoju dla branży spożywczej (Bogue i in., 2017; Kleef i in., 2005). Spożycie żywności funkcjonalnej wzrasta w prawie wszystkich krajach uprzemysłowionych. Choć przyczyny tego zjawiska są zróżnicowane, to w pierwszej kolejności wskazuje się z jednej strony starzenie się populacji, a z drugiej bardziej intensywny styl życia, które utrudniają spełnienie podstawowych wymagań żywieniowych (Komisja Europejska, 2016). W odniesieniu do starzenia się ludności podkreślić należy większe ryzyko osób starszych do zapadania na choroby niezakaźne, takie jak cukrzyca, choroby układu krążenia, osteoporoza i otyłość. Stwarza to zapotrzebowanie na nowe podejścia do żywienia, takie jak spersonalizowane odżywianie czy rozwój nowych produktów wzbogaconych pod względem właściwości prozdrowotnych. W efekcie obserwuje się, iż zapotrzebowanie na żywność funkcjonalną gwałtownie wzrasta na rynkach UE, USA i BRICS w ciągu ostatnich kilku lat (Komisja Europejska, 2016).

Produkty funkcjonalne to kategoria produktów spożywczych, które ukierunkowane są na poprawę funkcjonowania organizmu. W porównaniu do żywności konwencjonalnej żywność

funkcjonalna posiada dwa istotne wyróżniki. Po pierwsze, produkcja żywności funkcjonalnej często wymaga wykorzystania nowoczesnej technologii, ponieważ wyselekcjonowane składniki muszą zostać dodane, usunięte lub zmodyfikowane (Frewer i in., 2003). Po drugie, konwencjonalna „zdrowa” żywność jest zwykle przedstawiana ogólnie jako rodzaj żywności przyczyniającej się do zachowania zdrowia, bez podkreślania roli pojedynczych składników. W przypadku żywności funkcjonalnej sytuacja jest odmienna – poszczególne składniki są bezpośrednio łączone z konkretnymi, dobrze zdefiniowanymi efektami zdrowotnymi, a efekty te z konkretnym produktem (Lahteenmaki, 2003). **Gdy producenci rozwijają produkty funkcjonalne, wymagane jest, aby udowodnili naukowo wpływ danego produktu na zdrowie. Jest to jeden z powodów, dla których opracowywanie i wprowadzanie do obrotu żywności funkcjonalnej jest drogie i wyjątkowo ryzykowne.**

Żywność funkcjonalna nie jest postrzegana jako konkretna, jednorodna grupa produktów. Wyniki badań wskazują, że kiedy konsumenci dokonują wyboru między produktami, przyczyny wyboru żywności funkcjonalnej są różne w różnych kategoriach produktów (Urala i Lahteenmaki, 2003). Dlatego też żywność funkcjonalna powinna być analizowana z uwagi na konkretny produkt, a nie jako całość kategorii produktowej.

Rozwój produktów stanowiących żywność funkcjonalną stał się możliwy dzięki ogromnemu postępowi w naukach przyrodniczych (Kleef i in., 2005). Niestety, wiele funkcjonalnych produktów żywnościowych opracowanych z naukowego punktu widzenia spotyka się z brakiem akceptacji ze strony konsumentów (Wennstrom, 2000). Jednym z powodów wskazywanych w literaturze jest to, że rozwój i marketing żywności funkcjonalnej zasadniczo różni się od rozwoju i marketingu żywności tradycyjnej (Heasman i Melletín, 2001). Samo występowanie dowodów naukowych potwierdzających, iż dany produkt ma korzystny wpływ na funkcjonowanie organizmu, wykraczający poza dostarczanie podstawowych składników odżywczych, nie jest wystarczającym czynnikiem sukcesu rynkowego. Niezbędnym elementem jest skuteczna komunikacja z klientami (Kleef i in., 2005). Wnioski te potwierdzają badania rynku, według których konsumenci zachowują ostrożność w stosunku do informacji (zdrowotnych) umieszczanych na produktach spożywczych i napojach, i wskazujących, że sukces rynkowy żywności funkcjonalnej w coraz większym stopniu zależy od nawiązania relacji z konsumentem, opartej na zaufaniu (Komisja Europejska, 2016).

Konsumenci nie przejawiają zbliżonych intencji oraz porównywalnych zachowań zakupowych względem wszystkich produktów funkcjonalnych. Badania w tym obszarze sugerują, że akceptacja żywności funkcjonalnej przez konsumentów zależy od charakterystyki podstawowego produktu – który służy jako nośnik składnika funkcjonalnego lub komunikujący korzyści zdrowotne. Balasubramanian i Cole (2002) stwierdzili, że poszukiwanie przez konsumentów informacji o produktach spożywczych w danej kategorii żywności zależy od tego, jak postrzegają tę kategorię. Konsumenci mogą więc ignorować informacje np. o składzie produktu w przypadku niektórych produktów spożywczych, takich jak np. cukierki, ponieważ te produkty spożywcze spełniają hedonistyczne potrzeby. Konsumenci

postrzegają produkty z natury zdrowe — takie jak warzywa i owoce — jako wiarygodne „nośniki” funkcjonalnych cech produktu. Ponadto, żywność funkcjonalna posiadająca korzystny, prozdrowotny wizerunek (np. jogurt) jest bardziej atrakcyjna niż żywność funkcjonalna, która takiego wizerunku nie posiada (np. guma do żucia) (Kleef i in., 2005). Wydaje się, że wcześniejsze przekonania konsumentów na temat prozdrowotnej charakterystyki produktu mają istotny wpływ na postrzeganie żywności funkcjonalnej (Kleef i in., 2005). Zagadnienie to jest istotne z punktu widzenia wcześniejszych rozważań dotyczących oferty produktowej przedsiębiorstw działających na rynku spożywczym. Istotnym elementem sukcesu w rozwoju nowego produktu jest dopasowanie go do wymagań konsumentów. **Tym samym żywność funkcjonalna ma największe szanse na sukces rynkowy, jeżeli tworzona jest na bazie produktów, które postrzegane są przez konsumentów jako prozdrowotne.** Stąd, uzasadniona wydaje się koncepcja rozwoju nowego produktu spożywczego, który wpisuje się w trend związany z żywnością prozdrowotną i bazuje na materiale postrzeganym przez konsumentów jako zdrowy (np. jarmuż, który z uwagi na skład jest określany mianem *superfood*).

Fermentowana żywność i napoje, w tym szeroka gama produktów na bazie owoców, warzyw, zbóż, mięsa i produktów mlecznych, są przygotowywane i spożywane przez ludzi od tysięcy lat, ze względu na ich właściwości prozdrowotne, wynikające głównie z obecności związków biologicznie czynnych i dobroczynnych mikroorganizmów (Tamang i in., 2020). Mimo, że rynek jest zdominowany przez fermentowane produkty mleczne, niemleczne produkty fermentowane na bazie owoców i warzyw przyciągają coraz większą uwagę różnych grup - naukowców, producentów żywności i konsumentów (Granato i in., 2010, 2020; Min i in., 2019; Panghal i in., 2018). Rosnące zainteresowanie niemlecznymi produktami fermentowanymi ma zarówno przyczyny ekonomiczne, jak i zdrowotne. Żywność pochodzenia roślinnego generuje znacznie niższe koszty w porównaniu z produktami mlecznymi, przede wszystkim z uwagi na niższe koszty pozyskania surowców roślinnych (Granato i in., 2010; Kandyliś i in., 2016; Min i in., 2019; Vijaya Kumar i in., 2015). Ponadto produkcja rolna emituje dwa razy mniej dwutlenku węgla niż produkcja mięsa, dlatego stanowi ważny element zrównoważonego rozwoju, a więc jest istotnym aspektem dla konsumentów dbających o środowisko (Economist, 2021). Z drugiej strony, wzrost rynku niemlecznej żywności fermentowanej jest również napędzany przez rosnącą świadomość konsumentów dotyczącą znaczenia zdrowych nawyków żywieniowych, które mogą pomóc w zapobieganiu chorobom przewlekłym, przedłużając życie i poprawiając samopoczucie. Dodatkowo konsumenci coraz częściej przechodzą na dietę wegańską lub wegetariańską, unikają spożywania mleka krowiego lub laktozy, jak również ograniczają spożycie produktów mlecznych o wysokiej zawartości cholesterolu (Granato i in., 2010; Kandyliś i in., 2016; Min i in., 2019; Panghal i in., 2018; Vijaya Kumar, i in., 2015). W związku z powyższym, konsumenci coraz częściej poszukują produktów, które charakteryzują się działaniem prozdrowotnym wykraczającym poza zwykłe działanie odżywcze, takich jak żywność wzbogacona witaminami, błonnikiem bądź mikroorganizmami probiotycznymi (Granato, i in., 2010; Min i in., 2019; Panghal i in., 2018).

Podczas gdy etapy opracowywania produktów funkcjonalnych są w pewnym stopniu spójne na całym świecie, znaczenie terminu "żywność funkcjonalna" nie jest jednolite. Japonia, Stany Zjednoczone i Europa są uważane za światowych liderów w dziedzinie żywności funkcjonalnej, a ich podejście do przepisów dotyczących żywności i oświadczeń znacznie się różni (Domínguez Díaz i in., 2020). W związku z tym, brak jednolitej definicji prawnej dotyczącej żywności funkcjonalnej, prowadzi do licznych konsekwencji w skali globalnej. Rozbieżności w terminologii w różnych krajach doprowadziły do nieuregulowanego publikowania oświadczeń zdrowotnych w niektórych krajach, ograniczania produkcji żywności funkcjonalnej w innych oraz ogólnego braku zaufania lub niejasnego rozumienia pojęcia "żywność funkcjonalna" zarówno przez władze państwowe, pracowników służby zdrowia jak i konsumentów (Iwatani i Yamamoto, 2019; Martirosyan i Singh, 2015).

Termin „żywność funkcjonalna” pojawił się pierwszy raz w Japonii w roku 1984 i uzyskał formalną, legislacyjną kategorię żywności o nazwie FOSHU (ang. *Food For Specific Health Uses*), której przytaczana definicja jest krótka i prosta: „*produkty żywnościowe wzbogacone o specjalne składniki, które mają korzystne działanie fizjologiczne na organizm człowieka*” (Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, 2022). Aby zakwalifikować produkt jako funkcjonalny FOSHU, żywność musi spełniać następujące wymogi (Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, 2022):

- udowodniona skuteczność działania na organizm ludzki;
- brak jakichkolwiek problemów związanych z bezpieczeństwem produktu (np. testy toksyczności na zwierzętach, potwierdzenie efektów w przypadku nadmiernego spożycia itp.);
- stosowanie składników odpowiednich pod względem żywieniowym (np. brak nadmiernego użycia soli itp.);
- gwarancja zgodności ze specyfikacją produktu do czasu spożycia;
- ustalone metody kontroli jakości, takie jak specyfikacje produktów i składników, procesy i metody analizy.

Pomimo powszechnego funkcjonowania na rynku produktów z cechami żywności funkcjonalnej, w prawie legislacyjnym Stanów Zjednoczonych termin „żywności funkcjonalnej” nie jest szczegółowo zdefiniowany przez ustawodawstwo. Jednakże, same produkty funkcjonalne są regulowane przez Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration - FDA*) na mocy ustawy federalnej o Żywności, Lekach i Kosmetykach (ang. *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act*) (FDA, 2022). Oświadczenie zdrowotne potwierdzające właściwości funkcjonalne produktów spożywczych są zatwierdzane wyłącznie po dokonaniu szczegółowego przeglądu aktualnej literatury naukowej. Randomizowane i kontrolowane badania kliniczne są uważane za najbardziej wiarygodne dowody (zwane również "złotym standardem") potwierdzające związek między określonym składnikiem zawartym w produkcie spożywczym a stanem zdrowia potencjalnego konsumenta żywności (Domínguez Díaz i in., 2020).

W realiach funkcjonowania rynku spożywczego w Europie żywność funkcjonalna nie posiada ani specjalnych ram prawnych, ani definicji ustawowej. Jednak wymagania prawne stosowane w odniesieniu do tych produktów funkcjonalnych zależą od charakteru każdego z nich, ponieważ mogą one zawierać składniki odżywcze, związki bioaktywne lub inne substancje, które są wyraźnie uregulowane na rynku europejskim. Dlatego żywność funkcjonalna, która na etykiecie lub w reklamie zawiera oświadczenie żywieniowe i zdrowotne dotyczące zawartości witamin, składników mineralnych lub innych substancji, musi spełniać szczegółowe wymagania określone w rozporządzeniu unijnym (EC) nr 1924/2006 (Commission Regulation (EU), 2006; Domínguez Díaz i in., 2020).

W związku z powyższym, jedną z najczęściej przytaczanych definicji żywności funkcjonalnej w krajach europejskich i w konsekwencji najbardziej odpowiednią w świetle niniejszej dysertacji doktorskiej, jest ta, przedstawiona w programie badawczym Komisji Europejskiej: Żywność Funkcjonalna w Europie (ang. *Functional Food Science in Europe - FUFPOSE*), zgodnie z którą żywność funkcjonalna to: „żywność, która korzystnie wpływa na jedną lub więcej docelowych funkcji w organizmie poza odpowiednim działaniem odżywczym w sposób, który ma znaczenie dla poprawy stanu zdrowia i samopoczucia i/lub zmniejszenia ryzyka choroby. Jest on spożywany jako część normalnego schematu żywieniowego. Nie jest pigułką, kapsułką ani żadną formą suplementu diety” (FUFPOSE, 1999, s. 7).

Liczne doniesienia naukowe (Gao, Wen, Hu, Nie, Chen, Xiong, i in., 2019; Nayak i in., 2011; Verón i in., 2019) wskazują, że fermentowane owoce i warzywa mogą być zaliczane do produktów funkcjonalnych, w szczególności ze względu na obecność mikroorganizmów probiotycznych o udokumentowanych właściwościach. Dodatkowo, z uwagi na zmiany zachodzące podczas fermentacji mlekowej można zaobserwować dodatkowe właściwości prozdrowotne, wykraczające poza efekt odżywczy. Modyfikacje te mogą być konsekwencją zmian w zawartości i strukturze licznych związków bioaktywnych, a także obecności mikroorganizmów probiotycznych i ich metabolitów. Dlatego regularne spożywanie fermentowanych soków owocowych i warzywnych może przyczynić się do poprawy zdrowia konsumentów. Zastosowanie technologii fermentacji w przetwórstwie owoców i warzyw oraz opracowanie serii probiotycznych fermentowanych produktów owocowo-warzywnych nie tylko zwiększa wartość prozdrowotną owoców i warzyw, ale także w sposób organiczny łączy probiotyki i ich aktywne metabolity z prebiotykami (np. błonnikiem pokarmowym), wspierając w ten sposób zdrowie mikrobioty jelitowej, a także zapobiegając chorobom przewlekłym i łagodząc ich przebieg (Guan i in., 2021).

Badania naukowe wskazują na potencjalne właściwości funkcjonalne fermentowanych soków na bazie surowców roślinnych. Przykładowo, badania Gao i in., (2019) dowodzą, że fermentowany sok z przepękli ogórkowatej z użyciem szczepu *L. plantarum* NCU116 charakteryzował się silniejszym działaniem przeciwcukrzycowym w porównaniu z sokiem niefermentowanym. Co istotne, kiszony sok wywierał korzystniejszy wpływ na kontrolę masy ciała, poziom insuliny, lipidów i stresu oksydacyjnego u szczurów z cukrzycą w porównaniu ze świeżym sokiem. Ogólnie rzecz biorąc, wyniki te wskazują,

że kiszony sok łagodni cukrzycę typu 2 skuteczniej niż sok niefermentowany, co prawdopodobnie jest związane głównie z wpływem na mikrobiotę jelitową, jak również na jej metabolity. Natomiast, fermentacja soku z opuncji figowej pozwoliła zachować jego właściwości prozdrowotne i wyraźnie wzmocniła jego właściwości antyoksydacyjne (Verón i in., 2019). Podawanie sfermentowanego soku myszom z otyłością spowodowało znaczne zmniejszenie przyrostu masy ciała i złagodziło charakterystyczne dla otyłości oznaki tj.: insulinooporność, hiperglikemię i hiperlipemię. Wyniki te, wskazują na duży potencjał soku z opuncji figowej fermentowanego przy użyciu *L. plantarum* S-811 jako napoju funkcjonalnego w zapobieganiu otyłości i związanym z nią patologiom. Badania nad fermentowanym sokiem z owoców noni wyraźnie wykazały jego właściwości hipoglikemizujące i hepatoprotekcyjne u szczurów chorych na cukrzycę. Autorzy doszli nawet do wniosku, że sfermentowany sok może być doskonałym odpowiednikiem hipoglikemizującego leku glibenklamidu. Jak donoszą autorzy właściwości te są prawdopodobnie ściśle związane z aktywnością przeciwutleniającą, wysoką zawartością flawonoidów oraz obecnością triterpenów i saponin w fermentowanym soku z owoców noni (Nayak i in., 2011). Badacze Li i in., (2014) uzyskali podobne wyniki, ale z zastosowaniem probiotycznego szczepu *L. plantarum* i fermentowanego soku marchwiowego. Wykazali, że szczep ten zasadniczo promował produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (*ang. short fatty chain acids SCFA*) w fermentowanym soku, co skutkowało wyższym poziomem SCFA w jelicie grubym szczurów z cukrzycą typu 2. SCFAs mają zasadnicze znaczenie w promowaniu wzrostu bakterii kwasu mlekowego i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a także mogą obniżać poziom glukozy we krwi. Co więcej, zarówno aktywność metaboliczna *L. plantarum* (przejawiająca się wzrostem poziomu SCFA), jak i związki biologicznie aktywne występujące w soku z marchwi (takie jak β -karoten) są w stanie regulować poziom glukozy i hormonów we krwi, takich jak insulina, glukagon, GLP-1 i PYY, obniżać poziom lipidów w surowicy krwi oraz zmniejszać stres oksydacyjny.

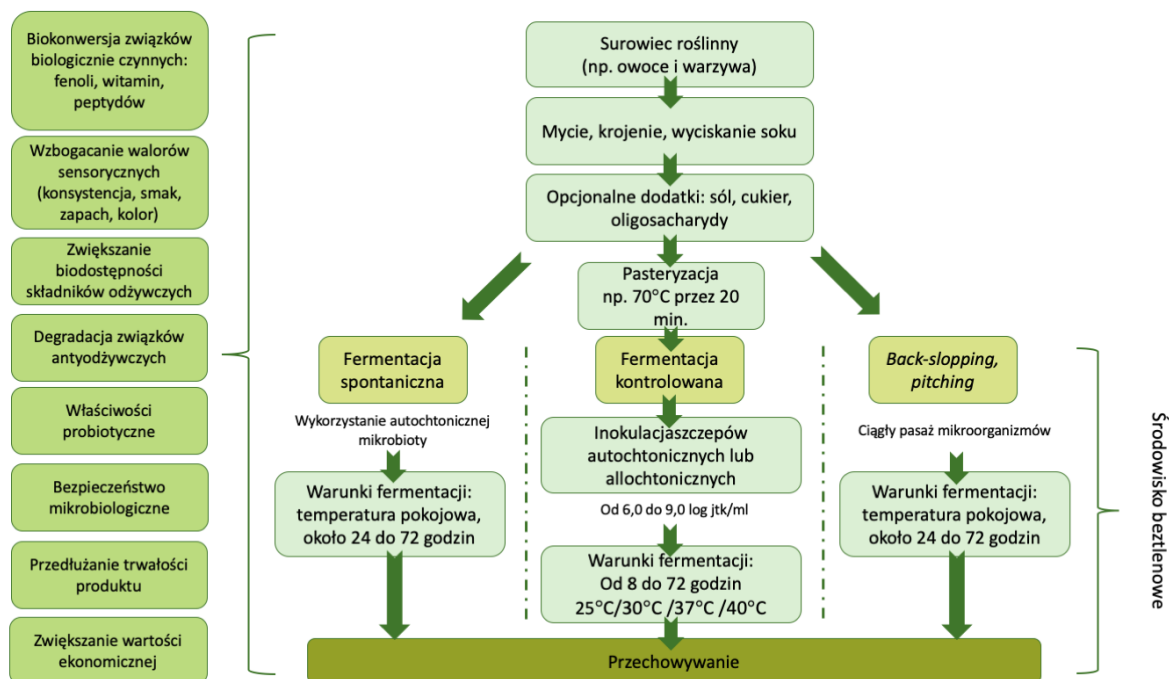
Ponadto fermentacja mlekowa jest procesem, który pomaga przedłużyć okres przydatności żywności do spożycia, poprawia jej wartość odżywczą i walory sensoryczne, a także zapewnia dodatkowe właściwości prozdrowotne dzięki obecności pożytecznych mikroorganizmów i związków biologicznie czynnych powstających w wyniku tego procesu (Tamang i in., 2020). Co istotne, podczas fermentacji zachodzi szereg zmian w profilu i zawartości różnych związków (takich jak: witaminy, związki fenolowe, karotenoidy, aminokwasy itp.). Właściwości profilu metabolicznego bakterii fermentacji mlekowej, wraz z aktywnością enzymów roślinnych, mogą zwiększać biodostępność i bioaktywność związków pochodzenia roślinnego, co w konsekwencji prowadzi do korzystnego oddziaływania na zdrowie konsumenta (Filannino i in., 2018; Settembre-Malaterre i in., 2018). Na modyfikacje zachodzące podczas fermentacji z udziałem bakterii fermentacji mlekowej wpływają takie czynniki jak: jakość surowca roślinnego, warunki procesu oraz zależne od szczepu właściwości użytej kultury starterowej (Filannino i in., 2018; Muñoz i in., 2017). W zależności od zastosowanego szczepu bakterii, ich indywidualne

właściwości mogą przyczyniać się do: syntezy witamin, np. z grupy B, biokonwersji związków fenolowych do bardziej aktywnych lub degradacji związków antyodżywczych. Z drugiej strony, fermentacja może sprzyjać degradacji określonych witamin, takich jak kwas askorbinowy lub zmniejszać aktywność przeciwutleniającą (Filannino i in., 2018; Muñoz i in., 2017; Settembre-Malaterre i in., 2018).

Przedsiębiorstwo spożywcze może prowadzić proces fermentacji za pomocą trzech różnych procedur (Hutkins, 2019):

- fermentacji spontanicznej z udziałem naturalnie występującej mikrobioty;
- fermentacji wstecznej (ang. *back-slopping*), opartej na ciągłym pasażu mikroorganizmów;
- fermentacji kontrolowanej z wykorzystaniem wyselekcjonowanych, przebadanych kultur starterowych.

Procedura fermentacji spontanicznej i wstecznej jest charakterystyczna głównie dla gospodarstw domowych i niektórych przedsiębiorstw. Jednakże, jeżeli intencją firmy spożywczej jest wprowadzenie na rynek produktu o cechach funkcjonalnych, najlepszą metodą będzie prowadzenie fermentacji kontrolowanej z wykorzystaniem mikroorganizmów probiotycznych o udokumentowanych właściwościach. Schemat procedur fermentacji wraz z jego głównymi składowymi przedstawiono na rysunku 2. Dlatego też, produkcja żywności fermentowanej na skalę przemysłową wymaga jednak stosowania zidentyfikowanych i przebadanych kultur starterowych. Wykorzystanie starannie wyselekcjonowanych rodzimych kultur starterowych w procesie fermentacji zapewnia szereg korzyści, takich jak mikrobiologiczne bezpieczeństwo produktu i powtarzalność procesu (Di Cagno i in., 2013; Hutkins, 2019; Vera-Pingitore i in., 2016). Ponadto mikroorganizmy autochtoniczne, ze względu na ich indywidualne zdolności adaptacyjne do określonego materiału roślinnego, mogą być bardziej wydajne w procesie fermentacji i przyczyniać się do znaczących zmian w zawartości i profilu związków biologicznie czynnych, w porównaniu z komercyjnymi kulturami starterowymi dostępnymi na rynku (Di Cagno i in., 2013; Filannino i in., 2018; Gobbetti i in., 2010; Torres i in., 2020; Vera-Pingitore i in., 2016).



Rysunek 2. Schemat fermentacji mlekowej

Źródło: opracowanie własne na podstawie (Hutkins, 2019; Szutowaska, 2020)

Kultury starterowe powinny spełniać kryteria dotyczące zarówno procesu technologicznego, jak i ich potencjału probiotycznego (de Melo Pereira i in., 2018; FAO i WHO, 2006). Z technologicznego i ekonomicznego punktu widzenia, powinny mieć zdolność szybkiego wzrostu w matrycach roślinnych, najlepiej w temperaturze pokojowej. Ponadto izolaty bakterii powinny być zdolne do zmiany zawartości lub biodostępności pożądaných związków biologicznie czynnych, takich jak witaminy, związki fenolowe, aminokwasy i składniki mineralne. Jednocześnie, w celu określenia właściwości probiotycznych, badania powinny obejmować analizę wrażliwości szczepów na powszechnie stosowane antybiotyki, aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec mikroorganizmów patogennych oraz identyfikację genetyczną. Zgodnie z wytycznymi FAO/WHO (2006), oznaczenia te stanowią podstawowe i fundamentalne kryteria oceny bezpieczeństwa i potencjalnych właściwości probiotycznych izolatów, które w konsekwencji mogą pełnić rolę wartościowych kultur starterowych w kontrolowanej fermentacji. Dalsze badania powinny koncentrować się na zdolności szczepów do przeżycia w przewodzie pokarmowym człowieka w odpowiedniej liczbie (około 10^6 - 10^7 jtk/ml), jak również na możliwości skutecznego przylegania do nabłonka jelitowego (FAO/WHO, 2006). Co istotne, izolacja autochtonicznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, określenie ich potencjalnych właściwości probiotycznych i wpływu na zawartość związków bioaktywnych w produkcie, a tym samym możliwość wykorzystania tych szczepów w przemyśle spożywczym, **stanowi ważny krok w projektowaniu i opracowywaniu prozdrowotnych produktów spożywczych**. Warto zauważyć, że zarówno nowe (np. jarmuż, opuncja figowa, czerwony smoczy owoc, wiśnia), jak i tradycyjne fermentowane produkty spożywcze (np. kiszona kapusta w kuchni polskiej czy kimchi w koreańskiej) są obiecującym źródłem unikalnych kultur starterowych

o właściwościach probiotycznych (Beganović i in., 2014; Filannino i in., 2015; Michalak i in., 2018; Verón i in., 2017; Yien Ong i in., 2012). Zasadniczo, mikroorganizmy mogą być izolowane ze świeżych, niesfermentowanych roślin, jak również mogą być pozyskiwane podczas różnych etapów spontanicznej fermentacji. Należy tu wspomnieć, że spontanicznie fermentowane rośliny pozwalają na izolację i selekcję bardziej zróżnicowanej grupy mikroorganizmów, co daje większe możliwości znalezienia szczepów o pożądanymi właściwościami, w porównaniu z materiałem niesfermentowanym (Torres i in., 2020).

1.3. Innowacje produktowe na rynku żywności fermentowanej

Przedsiębiorstwa działające na rynku spożywczym rozwijają zróżnicowane nowe produkty. Ze względu na panujący obecnie na rynku trend związany z żywnością prozdrowotną, największe szanse na sukces rynkowy posiadają te nowe produkty, które bazują na surowcu postrzeganym przez konsumentów jako zdrowy. Ponadto, bazując na koncepcji różnicowania, aby skutecznie się wyróżnić, przedsiębiorstwa powinny rozwijać nowe produkty funkcjonalne na bazie produktów, które były już w jakimś stopniu obecne na rynku. **Na bazie analizy rynku można stwierdzić, iż pewną niszą na rynku spożywczym są produkty fermentowane, w tym przede wszystkim napoje fermentowane, które, choć są generalnie dostępne dla konsumentów, to posiadają marginalny udział w rynku** (Komisja Europejska, 2016). W związku z tym, obiecującym kierunkiem rozwoju nowych produktów funkcjonalnych mogą być fermentowane produkty. Żywność funkcjonalna może być tworzona na bazie różnego materiału, np. owoców i warzyw, nabiału czy produktów zbożowych. Pomimo faktu, że rynek produktów fermentowanych jest zdominowany przez produkty mleczne, produkty fermentowane, zwłaszcza te oparte na owocach i warzywach, cieszą się rosnącym zainteresowaniem wśród konsumentów nastawionych na zdrowy styl życia (Min i in., 2019). W związku z tym, ze względu na obecne żywieniowe, prozdrowotne preferencje konsumentów, kwestia kształtowania pożądanymi właściwościami jest nieunikniona w projektowaniu i opracowywaniu nowych fermentowanych produktów spożywczych na bazie warzyw i owoców (Granato i in., 2010; Kandyliis i in., 2016; Min i in., 2019; Panghal i in., 2018; Vijaya Kumar, i in., 2015).

Innowacja to bardzo szerokie pojęcie, które można rozumieć na wiele sposobów (Trott, 2017). Jedną z bardziej wyczerpujących, klasycznych definicji podają Myers i Marquis (1969), którzy przyjmują perspektywę procesową. Według autorów innowacja nie jest efektem pojedynczego działania, ale efektem realizacji procesu składającego się z powiązanych ze sobą etapów. Innowacja to nie tylko stworzenie nowej koncepcji, opracowanie wynalazku lub rozwój nowego rynku, ale efekt, który łączy wszystkie te elementy. W tym rozumieniu poprzez innowację należy rozumieć nową koncepcję zmaterializowaną w formie wynalazku, który może zostać sprzedany na rynku. Co ważne, zgodnie z klasycznym rozumieniem innowacji, należy odróżnić innowację (ang. *innovation*) od wynalazku (ang. *invention*) w ten sposób, że innowacja stanowi komercyjne i praktyczne zastosowanie wynalazku.

Wynalazek jest więc pewnym oryginalnym rozwiązaniem technicznym lub organizacyjnym, natomiast innowacja to późniejsze zastosowanie wynalazku w działalności gospodarczej (Schumpeter, 1939).

Nowsza definicja stwierdza, iż poprzez innowację należy rozumieć efekt zarządzania wszystkimi działaniami dotyczącymi procesu generowania pomysłów, rozwoju technologii, wytwarzania i marketingu nowego (lub ulepszanego) produktu lub procesu (Trott, 2017). Należy tu również przywołać Podręcznik Oslo, ze względu na jego szerokie wykorzystanie zarówno w nauce, jak i praktyce gospodarczej. Zgodnie z zawartą tam definicją, innowacja to nowy lub znacząco udoskonalony produkt lub proces (bądź ich kombinacja), który znacząco różni się od poprzednich produktów lub procesów jednostki oraz który został udostępniony potencjalnym użytkownikom (produkt) lub wykorzystany w danej jednostce (proces) (OECD i Eurostat, 2018).

W badaniach poświęconych żywności nie wypracowano odrębnej definicji innowacji. W pracy poświęconej innowacjom na rynku spożywczym Traill i Meulenberga (2002) wskazują dwa podstawowe podejścia do innowacji. **Pierwsze z nich dotyczy innowacji technologicznych będących efektem prac badawczo-rozwojowych, a drugie przyjmuje szerszą perspektywę i definiuje innowacje jako proces wykrywania i spełniania potrzeb klientów.** W innych pracach poświęconych innowacjom w sektorze spożywczym wskazywano, iż innowacje obejmują efekt całokształtu działań, które przedsiębiorstwo zajmujące się rozwojem produktu musi wykonać, aby skonceptualizować, rozwinąć, skomercjalizować, a następnie wprowadzić produkt na rynek (Meiselman, 2007). Przyjmowano ponadto, iż poprzez innowacje rozumie się nowe produkty, procesy czy usługi, spośród których każde stanowi ważny instrument wyróżniania firm na tle konkurencji i zaspokojenia oczekiwań konsumentów (Bigliardi i Galati, 2013), co jest zgodne z rozważaniami dotyczącymi konkurencji, zaprezentowanymi w niniejszym rozdziale. Finalnie, w badaniach nad rolą konsumentów w rozwoju innowacji odwoływano się do koncepcji innowacji otwartych (Chesbrough i Bogers, 2014), według której innowacja powstaje jako efekt celowego wykorzystania wiedzy, istniejącej zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz każdej organizacji (Tsimiklis i in., 2015).

Zgodnie z powyższymi definicjami, występują różne typy innowacji. Dla rozważań prowadzonych w niniejszej rozprawie istotne są innowacje produktowe. Innowacje te definiowane są w sposób prosty, jako opracowanie nowego lub ulepszanego produktu (Trott, 2017). W Podręczniku Oslo, innowacja produktowa została zdefiniowana jako nowy lub znacząco udoskonalony produkt lub usługa, który istotnie różni się od poprzednich produktów lub usług przedsiębiorstwa oraz który może zostać wprowadzony na rynek.

W kontekście niniejszej rozprawy jako podstawę rozumienia pojęcia innowacji przyjęto więc kombinację najważniejszych zawartych w nich elementów. W efekcie przyjęto, iż **innowacja produktowa stanowi nowy lub udoskonalony produkt, który powstał jako efekt celowego wykorzystania wiedzy istniejącej zarówno wewnątrz, jak i w otoczeniu jednostki.** Przedmiotem badań w rozprawie doktorskiej są więc tylko te nowe produkty na rynku żywności fermentowanej, które spełniają powyższe kryteria.

Należy również zwrócić uwagę na powiązanie pomiędzy nowymi produktami i innowacjami produktowymi. Pojęcia te nie są tożsame, ale są zbliżone. Jest tak dlatego, iż nie każdy nowy produkt musi stanowić innowację produktową. Wynika to z samej definicji nowego produktu, według której produkty stanowią ekonomiczny efekt działalności produkcyjnej. Mogą być wymieniane lub wykorzystywane jako elementy składowe w produkcji bardziej zaawansowanych produktów, mogą być przeznaczone do konsumpcji przez gospodarstwa domowe lub władze, lub mogą stanowić inwestycje, jak w przypadku produktów finansowych (OECD i Eurostat, 2018). W definicji tej pomija się więc najważniejszą charakterystykę innowacji, którą jest element nowości lub udoskonalenia, stanowiącą wyróżnik na tle poprzednich produktów. W niniejszej rozprawie nacisk położony jest na rolę konsumentów w rozwoju nowych produktów. **Jednakże, poprzez nowe produkty rozumie się tylko te, które spełniają kryteria definicyjne innowacji produktowej, określone powyżej.**

Branża spożywcza jest dojrzała i zazwyczaj bardzo konserwatywna, jeśli chodzi o poziom inwestycji w nowe, innowacyjne produkty (Bigliardi i Galati, 2013). W szczególności europejska branża spożywcza inwestuje znacznie mniej w badania i rozwój w porównaniu z innymi sektorami, a nowe produkty o wysokim poziomie innowacyjności są rzadkie (Costa i Jongen, 2006). Stanowią one zaledwie 2,2% wszystkich wprowadzanych na rynek nowych produktów, przy czym w ich przypadku ryzyko braku akceptacji ze strony konsumentów jest wysokie (Bigliardi i Galati, 2013). Przemysł spożywczy tradycyjnie koncentrował się na minimalizacji kosztów produkcji, przez co przedsiębiorstwa w nim działające w niewielkim stopniu koncentrowały się na potrzebach klientów i opracowywaniu nowych produktów zgodnych z ich preferencjami (Lienhardt, 2004). Ponadto w większości firm spożywczych proces rozwoju nowych produktów nadal opiera się na informacjach płynących z wnętrza przedsiębiorstwa. Choć liczba przedsiębiorstw, które rozwijają nowe produkty uwzględniając sygnały płynące z otoczenia, jest ograniczona, to cały czas systematycznie rośnie (Pascucci i in., 2015). Klasyczne podejście do rozwoju nowych produktów pokazuje, że firmy, które modyfikują stare i wprowadzają nowe procesy rozwoju produktów, mają większe szanse na sukces rynkowy, w porównaniu z firmami, które stosują niezmienione procesy od dłuższego czasu (Cooper i Kleinschmidt, 1995). Od roku 2000 stopniowej popularyzacji podlega otwarty model rozwoju innowacji (ang. *open innovation*) (Chesbrough i Bogers, 2014). Model ten znajduje zastosowanie przy wszystkich typach innowacji, w tym innowacjach produktowych. W oparciu o ten typ innowacji podmiot może wykorzystać zarówno idee płynące z wnętrza, jak i z otoczenia do rozwoju nowego, innowacyjnego produktu. W branży spożywczej podejście to – choć coraz częściej wykorzystywane – nie znajduje jeszcze w wystarczającym stopniu zastosowania w przedsiębiorstwach. Duża część podmiotów opiera swoje działania rozwojowe przede wszystkim na informacjach wewnętrznych (Tsimiklis i Makatsoris, 2015). Sytuacja ta jest o tyle istotna, iż uwzględnienie preferencji konsumentów jest jednym z podstawowych czynników sukcesu na tym rynku. Rozważania dotyczące innowacji otwartych są przy tym zgodne z tymi dotyczącymi preferencji konsumentów. Jak wskazuje się w literaturze, klient na rynku spożywczym staje się coraz bardziej

wymagający w odniesieniu do niestandardowych produktów i usług (Bigliardi i Galati, 2013). Z tego powodu przedsiębiorstwa (w szczególności duże) szukają poza swoimi granicami organizacyjnymi możliwości współpracy z partnerami w łańcuchu dostaw, a także możliwości wykorzystania zasobów i wiedzy zarówno swoich dostawców, jak i konsumentów (Pascucci i in., 2015; Saguy i Sirotinskaya, 2014). W świetle tych badań, konsumenci są więc jednym z najistotniejszych elementów otoczenia przedsiębiorstw i jednym z najistotniejszych źródeł pomysłów na nowe produkty.

Nowe produkty na rynku spożywczym są silnie zróżnicowane. Jak wskazano wcześniej, największą szansę na akceptację ze strony konsumentów posiada żywność funkcjonalna, która bazuje na surowcu postrzeganym jako zdrowy. Zgodnie z koncepcją różnicowania, przedsiębiorstwa poszukują możliwości wyróżnienia się. Stąd skutecznym podejściem może być eksploracja nisz rynkowych. Prowadzi to do wniosku, iż przedsiębiorstwa spożywcze mają szansę na sukces rynkowy dzięki rozwojowi nowych produktów funkcjonalnych na bazie materiałów, które nie tylko postrzegane są przez konsumentów jako zdrowe, ale również były w niewielkim stopniu obecne na rynku w przeszłości. Istotną niszą są tutaj produkty fermentowane, w tym przede wszystkim napoje fermentowane (ang. *fermented drinks*), które posiadają marginalny udział w rynku (Komisja Europejska, 2016). Podmioty działające w sektorze spożywczym, w tym zarówno przedsiębiorstwa, jak i jednostki badawcze i uniwersytety, w przeszłości badały możliwości rozwoju nowych produktów kiszonych na bazie surowców, które nie są tradycyjnie fermentowane. W tabeli 1 zaprezentowano przykłady nowych produktów na bazie surowców roślinnych wraz z ich krótką charakterystyką w zakresie właściwości prozdrowotnych, w tym probiotycznych, jak i zawartości składników bioaktywnych.

Tabela 1. Innowacyjne produkty fermentowane na bazie surowców roślinnych

L.p.	Produkt fermentowany	Charakterystyka	Literatura
1.	Sok z głożyny pospolitej (<i>Zuziphus jujuba</i>)	Fermentacja zwiększyła całkowitą zawartość fenoli, natomiast zmniejszyła całkowitą zawartość flawonoidów. Również zdolności przeciwutleniające uległy znacznej poprawie w wyniku fermentacji i były dodatnio skorelowane z zawartością kwasu kofeinowego i rutyny. Zidentyfikowano 74 związki lotne, których łączna zawartość wzrosła w wyniku fermentacji, co spowodowało powstanie 22 i 19 nowych lotnych związków smakowych.	(Li i in., 2021; Xu i in., 2019; Zhao i in., 2019)
2.	Sok z pitaji (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	Fermentacja istotnie wpłynęła na wzrost betalainowych (betanina, izobetanina) i niebetalainowych związków fenolowych. Fermentacja mlekowa znacznie zwiększyła aktywność przeciwbakteryjną soku. Z kolei aktywność przeciwutleniająca była nieznacznie wyższa w soku fermentowanym w porównaniu z sokiem świeżym.	(Choo i in., 2018; Muhialdin i in., 2020; Yien Ong i in., 2012)
3.	Sok z opuncji figowej (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	Podawanie sfermentowanego soku otyłym myszom spowodowało znaczne zmniejszenie przyrostu masy ciała i złagodziło charakterystyczne dla otyłości: insulinooporność, hiperglikemię i hiperlipemię. Wyniki te	(Verón i in., 2019)

		wskazują na potencjał jako napoju funkcjonalnego w zapobieganiu otyłości i związanym z nią patologiom.	
4.	Sok z morwy (<i>Morus nigra</i>)	Zastosowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej wpłynęły na zawartość składników fenolowych. Proces fermentacji wpłynął istotnie na poprawę stężenia antocyjanów ogółem, fenoli i flawonoidów.	(Kwaw i in., 2018)
5.	Sok z przepękli ogórkowatej (<i>Momordica charantia</i>)	Sok fermentowany wykazywał silniejsze działanie przeciwcukrzycowe w porównaniu z sokiem niefermentowanym. Kiszony sok wywierał korzystniejszy wpływ na kontrolę masy ciała, poziom insuliny, lipidów i stresu oksydacyjnego u szczurów z cukrzycą w porównaniu ze świeżym sokiem.	(Gao, Wen, Hu, Nie, Chen, Nie, i in., 2019; Gao, Wen, Hu, Nie, Chen, Xiong, i in., 2019)
6.	Sok ze słonecznika bulwiastego (<i>Helianthus tuberosus</i>), ananasa (<i>Ananas comosus</i>), dyni (<i>Cucurbita pepo</i>), szpinaku (<i>Spinacia oleracea</i>) i ogórka (<i>Cucumis sativus</i>)	Proponowana mieszanina soków stanowi odpowiednie podłoże dla wzrostu i żywotności bakterii kwasu mlekowego i <i>Bifidobacterium</i> , osiągając wartości powyżej 7 log jtk/ml pod koniec przechowywania w warunkach chłodniczych.	(Güney i Güngörmüşler, 2021)
7.	Sok z aronii (<i>Aronia melanocarpa</i>)	Stwierdzono wyższą zawartość fenoli ogółem i aktywność przeciwutleniającą w fermentowanym soku w porównaniu z sokiem niesfermentowanym oraz pożądanymi substancjami aromatycznymi.	(Bontsidis i in., 2021)
8.	Sok z portulaki pospolitej (<i>Portulaca oleracea</i>)	Fermentacja znacznie zwiększyła całkowitą zdolność przeciwutleniającą soku, zachowała poziom witamin C, A i E oraz zwiększyła biodostępność witaminy B2 i fenoli. Fermentowany sok silnie obniżył poziom mediatorów prozapalnych i reaktywnych form tlenu. Przeciwdziałał również zaburzeniu monowarstw komórek Caco-2 poddanych działaniu bodźca zapalnego.	(Di Cagno i in., 2019)
9.	Sok z flaszowca peruwiańskiego (<i>Annona cherimola</i>)	Pomimo obniżenia ogólnej zawartości związków fenolowych, zdolność przeciwutleniająca została zachowana w wyniku fermentacji. Ponadto, sok posiada potencjalną aktywność przeciwplytkową.	(Sofía i in., 2020)
10.	Sok z borówki bagiennnej (<i>Vaccinium uliginosum</i>)	Wyniki wykazały, że zawartość związków fenolowych była istotnie obniżona. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej zwiększyły skład i stężenie związków aromatycznych oraz poprawiły aromat na kwiatowy i owocowy.	(Wei i in., 2018)
11.	Sok z kiwi (<i>Actinidia</i>)	Wyniki sugerowały, że sok fermentowany przy użyciu <i>B. bifidum</i> 6169 i <i>L. plantarum</i> 21805 był bardziej skuteczny w degradacji cholesterolu, a stopień degradacji cholesterolu wynosił odpowiednio 67,57% i 64,22%.	(Wang i in., 2022)
12.	Sok z miłorzębu chińskiego (<i>Ginkgo biloba</i>)	Niektóre fenole (np. kwas floretinowy) zostały znacząco wzbogacone, a całkowita zawartość fenoli wzrosła o około 9% w wyniku fermentacji. Ponadto, proces ten znacznie zwiększył aktywność przeciwutleniającą i przeciwbakteryjną soku.	(Wang i in., 2019)

13.	Sok z melona (<i>Cucumis melo</i>)	Fermentowany sok wykazywał silne działanie przeciwbakteryjne wobec <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>A. flavus</i> i <i>Penicillium</i> spp. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa soku wynikała z obecności kilku bioaktywnych metabolitów, w tym kwasu mlekowego, GABA, acetoiny i kwasu fenylopropanowego.	(Muhialdin i in., 2021)
14.	Sok z markuii (<i>Passiflora edulis</i>)	<i>L. plantarum</i> CCMA 0743 wykazał wysoką żywotność (6,18 log jtk/ml) po przejściu przez symulowany przewód pokarmowy.	(Fonseca i in., 2022)
15.	Sok z owoców śliwca mombin (<i>Spondias mombin</i>)	Fermentacja soku wykazała wysokie właściwości przeciwutleniające oraz wysoką zawartość związków fenolowych ogółem. Zaobserwowano również aktywność przeciwbakteryjną wobec <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> i <i>K. pneumoniae</i> . Nie stwierdzono istotnych zmian w żywotności po pasażu w symulowanych warunków przewodu pokarmowego.	(Ribeiro i in., 2020)

Źródło: opracowanie własne

Powyższe przykłady jednoznacznie wskazują na wzrastającą tendencję dotyczącą projektowania i rozwoju innowacyjnych fermentowanych produktów o właściwościach prozdrowotnych w ciągu ostatnich lat. Zasadniczo, w większości przedstawionych badań naukowych nacisk położony jest na właściwości przeciwutleniające, zawartość związków biologicznie czynnych m.in. związków fenolowych, właściwości przeciwdrobnoustrojowe, jak i na żywotność i liczebność bakterii o potencjale probiotycznym. Część z przedstawionych przykładów, uwzględnia również badania konsumenckie bazujące na analizie sensorycznej produktów (Fonseca i in., 2022; Güney i Güngörmüşler, 2021; Muhialdin i in., 2020, 2021; Ribeiro i in., 2020). Badania sensoryczne prowadzone w odniesieniu do soku ze słonecznika bulwiastego, ananasa, dyni, szpinaku i ogórka, wskazały, że był średnio akceptowany przez panel badawczy (Güney i Güngörmüşler, 2021). Jednakże, dodatek 30% soku z jabłek istotnie wpłynął na wyższą akceptowalność przez potencjalnych konsumentów. Badania przedstawione przez Muhialdin i in., (2021) dowodzą, że dodanie sfermentowanego soku z kantalupy w proporcji 20:80 do świeżego soku z melona wykazało stabilną trwałość produktu i wysoką akceptację konsumentów. Innowacyjne soki fermentowane nie zawsze są wysoko akceptowane przez potencjalnych konsumentów, przede wszystkim z uwagi na ich smak. Takim przykładem jest sok z owoców śliwcowca mombin (Ribeiro i in., 2020). Analiza sensoryczna wykazała, że sok ten nie został dobrze przyjęty przez konsumentów. Jednakże test w idealnej skali Just-About-Right (JAR) umożliwił identyfikację konkretnych atrybutów, które należy poprawić z punktu widzenia panelistów, tak aby możliwe było zwiększenie akceptacji produktu.

Jak dowodzą powyższe przykłady, projektowanie innowacyjnego fermentowanego produktu w oparciu o nowe surowce roślinne jest zadaniem wymagającym nieustannych badań laboratoryjnych prowadzących do udoskonalenia produktu. Ponadto, w kontekście rozwoju nowego produktu wydaje się istotne, aby przed procesem tworzenia produktu przeprowadzić badania dotyczące oczekiwań i preferencji potencjalnych konsumentów, zamiast jedynie koncentrować się na analizie sensorycznej

finalnego produktu. Zaprezentowane powyżej przykłady stanowią dowód na podejmowanie prób rozwoju nowych kiszonych produktów o cechach funkcjonalnych. Pomimo wdrażania tych prób, możliwości rozwoju nowych produktów nadal są duże. Świadczy o tym relatywnie niewielki udział w rynku produktów fermentowanych, w tym przede wszystkim soków (Komisja Europejska, 2016), a także fakt, iż występują liczne produkty, które postrzegane są przez konsumentów jako zdrowe, ale na ich bazie nie opracowano jeszcze funkcjonalnych produktów fermentowanych. Takim produktem jest np. jarmuż zielony.

Projektowanie i rozwój innowacyjnego produktu spożywczego, w uzupełnieniu do badań laboratoryjnych, jak już wspomniano, wymaga również badań dotyczących charakterystyki potencjalnego konsumenta zainteresowanego niemlecznym fermentowanym produktem. W związku z tym, podstawowe i wstępne badania obejmują najczęściej charakterystykę cech społeczno-demograficznych konsumentów. Badania nad profilem konsumentów zdrowych produktów spożywczych, w tym produktów fermentowanych, prowadzone są od lat 80. XX wieku (Davies i in., 1995). Zagadnienie to jest niezwykle istotne z punktu widzenia rozwoju nowych produktów, gdyż poznanie profilu konsumentów, a następnie dostosowanie produktu do preferencji konkretnej grupy odbiorców daje największe szanse na sukces rynkowy nowego produktu. Stąd, w tym miejscu zaprezentowano badania poświęcone określaniu profilu konsumenta na rynku spożywczym.

Historycznie, w badaniach tych, istotną rolę odgrywały czynniki demograficzne (Davies i in., 1995). Wskazywano, iż zdrową żywność preferują kobiety, osoby w wieku 30-49 lat, bezdietne oraz o stosunkowo wysokich dochodach (Davies i in., 1995). W późniejszych badaniach rola czynników społeczno-demograficznych również podlegała uwypukleniu. W badaniach nad zdrowymi produktami spożywczymi wykazano, że konsumenci w największym stopniu zainteresowani ich zakupem mają relatywnie wysokie dochody oraz mają mniejsze niż przeciętnie rodziny (Antonio i Gonzalez, 2009). Badania te wykazały ponadto, iż miejsce zamieszkania ma istotne znaczenie – osoby zainteresowane zakupem żywności zdrowej są zwykle mieszkańcami przedmieść, a w mniejszym stopniu dużych miast. Ponadto, nierzadko są to osoby posiadające problemy zdrowotne (Antonio i Gonzalez, 2009).

Kompleksowe badania jakościowe i ilościowe dotyczące zachowań i postaw Greckich konsumentów, przeprowadzone przez Karelakis i in., (2020) dowiodły, że czynniki społeczne takie jak płeć, wiek, wykształcenie, dochody oraz stan cywilny istotnie wpływają na decyzje nabywcze konsumentów na lokalnym rynku żywności funkcjonalnej. Jak wskazują przywołani autorzy, dla kobiet w wieku od 18 do 25 lat z wykształceniem licealnym i ze średnimi zarobkami, najistotniejszym powodem zakupu żywności funkcjonalnej było „poradnictwo lekarsko-dietetyczne w zakresie problemów zdrowotnych”, jak również „dobrze zbilansowana dieta dla dobrego zdrowia”, z kolei „dobry smak” był czynnikiem obojętnym. Odmienne postawy kształtowały się w grupie zamężnych mężczyzn, dla których „dobry smak” był najważniejszym czynnikiem skłaniającym do zakupu żywności prozdrowotnej. Ponadto, badania dowiodły, że konsumenci są gotowi zapłacić wyższą cenę za produkty prozdrowotne (Karelakis

i in., 2020). Również badania prowadzone wśród tureckich konsumentów sugerują, że płeć (tutaj: kobiety), lepsze wykształcenie oraz wyższe dochody w gospodarstwie domowym, przyczyniają się do większej świadomości znaczenia żywności funkcjonalnej, jak i zwiększonej konsumpcji produktów prozdrowotnych w porównaniu z innymi grupami referencyjnymi (Büyükkaragöz i in., 2014). Poziom wykształcenia sprzyja spożywaniu konkretnych grup produktów funkcjonalnych. W przedstawionym badaniu (Büyükkaragöz i in., 2014) konsumenci charakteryzujący się wyższym wykształceniem zdecydowanie częściej spożywali produktu zawierające mikroorganizmy probiotyczne i żywność obniżającą poziom cholesterolu. Podobne wyniki obejmujące wpływ czynników socjo-demograficznych na spożycie produktów prozdrowotnych uzyskali autorzy Kraus i in., (2017) podczas analizy polskiego rynku produktów funkcjonalnych. Wyniki badań wskazują, że przede wszystkim kobiety, osoby starsze oraz konsumenci z wyższym wykształceniem podejmują decyzje o zakupie produktów funkcjonalnych.

Z kolei badania prowadzone w 2020 roku nad tradycyjnym napojem fermentowanym pulque wskazują, iż częstotliwość jego spożycia uzależniona jest również od charakterystyki konsumentów (Rivas-Rojas i Cuffia, 2020). Autorzy badania wyodrębnili dwie grupy konsumentów – często i rzadko spożywających pulque i wyznaczyli profil obu grup. Pierwsza grupa wykazywała bardziej tradycyjne i konserwatywne wzorce zachowań. W tej grupie był wyższy odsetek konsumentów starszych, a także konsumentów wyrażających preferencje względem naturalnego (przetworzonego w jak najmniejszym stopniu) pulque. Drugą grupę konsumentów stanowiły głównie kobiety, w tym studentki o wysokim poziomie wykształcenia, preferujące produkt o wysokim stopniu przetworzenia.

Powyższe badania prowadzą do wniosków, iż występuje grupa czynników demograficzno-społecznych, która determinuje preferencje konsumentów na rynku żywności prozdrowotnej. Do kluczowych czynników należą przy tym: płeć, wiek, status materialny, wykształcenie i miejsce zamieszkania. Ponadto, badania poświęcone żywności fermentowanej, w tym napojom fermentowanym są stosunkowo nieliczne.

Podsumowanie

Powyższy rozdział wskazuje, że zarówno w Polsce jak i w Europie sektor spożywczy charakteryzuje się silną konkurencją. Bazując na porterowskiej (1980, 2008) koncepcji analizy otoczenia konkurencyjnego przedsiębiorstw pokazano, że wzmacnia to konkurencję pozacenową na rynku. Dlatego też kluczowe znaczenie przypisuje się rozwojowi nowych produktów, przy tworzeniu których uwzględnia się potrzeby i preferencje konsumentów. W związku z tym przedstawiono również dominujący trend żywieniowy obejmujący produkty prozdrowotne, który został wyjaśniony na bazie teorii planowanego zachowania pokazującej związek trendu zdrowego odżywiania z zachowaniem konsumentów. Wykazano, że wzmagający trend prozdrowotny sprzyja rozwojowi innowacyjnych produktów o właściwościach funkcjonalnych. Szczegółowo wyjaśniono koncepcję żywności funkcjonalnej oraz wskazano, że produkty fermentowane mogą przynależeć do tej kategorii produktowej. W toku analizy skoncentrowano się

na wyjaśnieniu pojęć dotyczących żywności fermentowanej wraz z ich dogłębną charakterystyką ich cech prozdrowotnych tj. obecność mikroorganizmów probiotycznych oraz zawartość związków biologicznie czynnych. Przedstawiono również definicję innowacji produktowej, wraz z licznymi przykładami niemlecznych produktów fermentowanych bazujących na surowcach roślinnych. Wskazano, iż możliwości rozwoju nowych produktów fermentowanych są duże, o czym świadczy stosunkowo niski udział tych produktów w rynku europejskim. Podkreślono, że badania konsumenckie dotyczące fermentowanych produktów koncentrują się głównie na analizie sensorycznej, pomijając jednak analizę profilu konsumenta w oparciu o jego podstawowe charakterystyki socjo-demograficzne. W związku z tym, przytoczono również przykłady badań obejmujące profil socjo-demograficzny głównie wobec żywności funkcjonalnej. W nawiązaniu do powyższych rozważań uznano, że niezbędne są dalsze badania dotyczące rozwoju innowacyjnych produktów spożywczych bazujących na niemlecznych fermentowanych produktach.

2. Rozwój nowego produktu w branży żywnościowej – wymagania i etapy postępowania

Na podstawie wcześniejszej analizy danych literaturowych stwierdzono, że największe szanse na sukces rynkowy posiadają nowe produkty prozdrowotne wpisujące się w preferencje konsumentów związane ze zdrowym odżywianiem oraz stanowiące nowość rynkową pozwalającą na wyróżnienie się na tle konkurentów. Wskazano, iż potencjalnie ważnym kierunkiem rozwoju nowych produktów spożywczych może być żywność funkcjonalna rozwijana na bazie produktów fermentowanych, w tym przede wszystkim warzyw i owoców. W niniejszym rozdziale rozważania te zostały uzupełnione o wymagania wstępne stawiane produktom spożywczym z uwzględnieniem definicji żywności fermentowanej i probiotycznej oraz wymagań stawianych mikroorganizmom probiotycznym. Ponadto, przedstawiono istniejące w literaturze przedmiotu koncepcje rozwoju nowych produktów mając na uwadze wpływ konsumentów na ich tworzenie. Następnie, zaprezentowano autorski model rozwoju nowego produktu spożywczego wypracowany w oparciu o przeprowadzone systematyczne studia literaturowe. Przedstawiono również możliwość efektywnego zarządzania procesem rozwoju nowego produktu spożywczego na bazie podejścia projektowego.

2.1. Wymagania dotyczące produktów spożywczych

Nowoprojektowane, rozwijane i wprowadzane na rynek produkty, w tym żywność funkcjonalna bazująca na niemlecznych produktach fermentowanych, muszą spełniać szereg wymagań.

W Europie potrzebę wprowadzenia już na szczeblu unijnym dokładnych zasad i wymogów dotyczących prawa żywnościowego i paszowego uzasadniono szeregiem incydentów związanych z żywnością. Dotyczyły to m.in. zakażenia produktów spożywczych bakteriami z rodzaju *Salmonella*, obecnością dioksyn oraz występowaniem choroby „szalonych krów”, które miały miejsce pod koniec lat 90. (Komisja Europejska, 2022a). Incydenty te podważyły zaufanie konsumentów do systemu produkcji i dystrybucji żywności oraz wykazały braki w istniejącym wówczas systemie legislacyjnym. Komisja Europejska opracowała zintegrowane podejście do bezpieczeństwa żywności, określone przede wszystkim w Białej Księdze w sprawie bezpieczeństwa żywności (ang. *White Paper on Food Safety*). Zakres rozporządzeń w Białej Księdze obejmuje wszystkie etapy łańcucha żywnościowego na rynku spożywczym, w tym produkcję pasz, produkcję podstawową, przetwarzanie żywności, przechowywanie, transport i sprzedaż detaliczną (Commission Of The European Communities, 2000). Warto podkreślić, że jednym z głównych priorytetów UE jest zapewnienie bezpieczeństwa i jakości żywności. Jak wskazuje Komisja Europejska, polityka żywnościowa Unii musi opierać się na wysokich standardach bezpieczeństwa żywności, które służą ochronie i promocji zdrowia konsumentów. Produkcja i konsumpcja żywności mają kluczowe znaczenie dla państw Wspólnoty wpływając na: 1. rozwój gospodarczy krajów (sektor rolno-spożywczy ma duże znaczenie dla całej gospodarki europejskiej),

2. społeczeństwo (konsumenci powinni mieć dostęp do szerokiej gamy bezpiecznych produktów wysokiej jakości), a w wielu przypadkach także 3. środowisko (stan i jakość środowiska, w szczególności systemów ekologicznych)(Commission Of The European Communities, 2000). Szczegółowe wymagania zawarte są w Rozporządzeniu (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 roku ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (Rozporządzenie (WE) NR 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 Stycznia 2002 r.). Ponadto, ogólne zasady dotyczące dodatków do żywności, które zostały pozytywnie ocenione przez Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (ang. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) oraz Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organisation*) zawarte są w Kodeksie Żywności (*Codex Alimentarius*), czyli zbiorze międzynarodowych standardów i wytycznych postępowania mających na celu ochronę zdrowia konsumentów i zapewnienie uczciwych praktyk w handlu żywnością (FAO, 2022).

Powyższe regulacje mają charakter generalny, ale obejmują swoim zakresem również żywność funkcjonalną. Jak wspomniano w poprzednim rozdziale rozprawy, w Unii Europejskiej i w Polsce nie ma obecnie przepisów dotyczących jedynie tej kategorii żywności. Rozwój nowych spożywczych produktów funkcjonalnych powinien więc uwzględniać zapisy przepisów najbardziej zbliżonych, w tym przede wszystkim Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 r. w sprawie nowej żywności, zmieniające Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 oraz uchylające Rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie Komisji (WE) nr 1852/2001 (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z Dnia 25 Listopada 2015 r.). Rozporządzenie to ustanawia „przepisy dotyczące wprowadzania nowej żywności na rynek w Unii” (art. 1, pkt. 1). Zapis ten jest istotny w kontekście rozwoju nowych produktów, w tym tych na bazie żywności fermentowanej. W Rozporządzeniu określono, iż: „Komisja wydaje zezwolenie na nową żywność i wpisuje ją do unijnego wykazu tylko wtedy, gdy żywność ta spełnia następujące warunki: 1. żywność nie stwarza, w oparciu o dostępne dowody naukowe, ryzyka dla zdrowia ludzkiego; 2. przeznaczenie żywności nie wprowadza konsumenta w błąd, w szczególności, jeżeli dana żywność przeznaczona jest do zastąpienia innej żywności, a nastąpiła znacząca zmiana wartości odżywczej; 3. w przypadku, gdy żywność przeznaczona jest do zastąpienia innej żywności, nie różni się od tej żywności w taki sposób, by jej zwykłe spożycie było niekorzystne pod względem żywieniowym dla konsumenta (art. 7).” W tym celu na etapie składania wniosku do Komisji, wymaga się przedstawienia m.in.: „opisu procesu lub procesów produkcji; szczegółowego składu nowej żywności; dowodów naukowych, które wykazują, że nowa żywność nie stanowi zagrożenia dla zdrowia człowieka oraz w stosownych przypadkach, opis metody lub metod analizy” (art. 10, pkt. 2).

Zapisy zawarte w rozporządzeniu z jednej strony są więc dość ogólne, **z drugiej jednak wskazują na konieczność prowadzenia badań laboratoryjnych potwierdzających wymagania jakościowe stawiane**

względem nowych produktów. Zapisy te są istotne z punktu widzenia niniejszej rozprawy, której istotny element stanowią właśnie badania laboratoryjne.

W rozwoju nowych funkcjonalnych produktów spożywczych posiłkować się można Dokumentem roboczym regulacji Parlamentu Europejskiego oraz Rady ds. Informacji Żywieniowych, Funkcjonalnych i Zdrowotnych na Żywności (ang. *Draft on Regulation of the European Parliament and of the Council on Nutrition, Functional and Health Claims Made on Foods*) (Komisja Europejska, 2002). W propozycji tej zawarto m.in. rekomendacje dotyczące informowania o właściwościach produktów, które korzystnie wpływają na jedną lub więcej docelowych funkcji w organizmie. Ponadto, w raporcie Komisji Europejskiej o żywności funkcjonalnej przedstawiono sposób rozumienia żywności funkcjonalnej (zgodny z definicją FUFOSSE przytaczając uprzednio w niniejszej pracy), benefity z jej stosowania oraz rekomendacje w zakresie sposobu oceny „dowodów naukowych dotyczących żywności funkcjonalnej”, **które po raz kolejny wyraźnie podkreślają konieczność i istotność prowadzenia badań laboratoryjnych** (Komisja Europejska, 2010).

W Polsce na mocy obowiązujących przepisów prawa istnieje szereg regulacji dotyczących bezpieczeństwa żywności i żywienia, które stanowią również podstawę przy rozwoju żywności funkcjonalnej. Wśród szeregu aktów prawnych znajdują się przede wszystkim Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz. U. z 2020 r. Poz. 2021, z 2022 r. Poz. 24, 138) oraz Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010 r. w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności (Dz. U. Poz. 1184). Nie występują osobne uregulowania dotyczące żywności funkcjonalnej, warto jednak nadmienić, że jej zwyczajowe definiowanie w Polsce jest zbieżne z tym przyjętym w Unii Europejskiej (Centralna Biblioteka Rolnicza, 2022; Centrum Doradztwa Rolniczego, 2017). Warto podkreślić, iż ani na poziomie europejskim, ani w Polsce nie występują żadne dodatkowe, specyficzne uregulowania prawne dotyczące rozwoju żywności fermentowanej¹.

Zgodnie z literaturą przedmiotu, w trakcie rozwoju nowych produktów jednym z wymogów jest to, aby działalność badawczo-rozwojowa była uzupełniona analizą obowiązujących regulacji. Wynika to z konieczności zapewnienia pełnej zgodności produktu z prawem obowiązującym na rynku, na którym produkt będzie ostatecznie sprzedawany (O’Sullivan, 2017). W zależności od organizacji procesu rozwojowego, analiza obowiązujących regulacji może być prowadzona wewnątrz przez przedsiębiorstwo bądź jej prowadzenie może być powierzone wyspecjalizowanym podmiotom posiadającym kompetencje w zakresie analiz prawnych. Wydaje się jednak, że najczęstszym przypadkiem jest zobowiązanie pracowników zespołu badawczo-rozwojowego do zachowania „należytej staranności” w zakresie analizy regulacji, co może wiązać się z uzyskaniem odpowiednich informacji bezpośrednio od organów regulacyjnych (ze stron internetowych, baz danych, archiwów itp.) (O’Sullivan, 2017).

¹ W przeszłości wyjątkiem były napoje winiarskie do których odnosiło się Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 maja 2013 r. w sprawie rodzajów fermentowanych napojów winiarskich oraz szczegółowych wymagań organoleptycznych, fizycznych i chemicznych, jakie powinny spełniać te napoje. Rozporządzenie zostało uchylone 07.03.2022.

Należy również podkreślić rolę kontrolną samych konsumentów. Jak podaje się w literaturze – konsumenci, szczególnie w gospodarkach zachodnich, wymagają podania coraz dokładniejszych informacji na temat spożywanej przez nich żywności i sposobu jej wytwarzania (Costa i Jongen, 2006). Konsumenci mają obecnie świadomość współzależności między produkcją żywności, konsumpcją żywności, własnym zdrowiem oraz stanem środowiska naturalnego. Ta świadomość, w połączeniu ze zróżnicowaną podażą produktów spożywczych sprawiła, że konsumenci są nastawieni bardzo krytycznie do żywności, która nie gwarantuje standardów jakościowych i wymagają gwarancji jakości i bezpieczeństwa produktów spożywczych (Costa i Jongen, 2006). W takiej sytuacji wymagania dotyczące niemlecznych produktów fermentowanych są podwójnie istotne, gdyż z jednej strony podlegają ścisłej kontroli przez regulacje prawne, a z drugiej strony sami konsumenci wymagają, aby oferowana im żywność bezwzględnie spełniała kryteria zdrowotne i jakościowe.

W odniesieniu do żywności funkcjonalnej, do której można zaliczyć produkty fermentowane, w tym zawierające mikroorganizmy probiotyczne, można odnieść się do uznawanych aktualnie definicji i wytycznych dotyczących żywności fermentowanej i probiotycznej oraz mikroorganizmów probiotycznych. Zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Stowarzyszenia Naukowego Probiotyków i Prebiotyków (ang. *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics – ISAPP*) definicja żywności i napojów fermentowanych stanowi, że jest to: *żywność wytworzona w wyniku pożądanego wzrostu mikroorganizmów i enzymatycznej konwersji składników żywności* (Marco i in., 2021, s. 197). Co jednak istotne, w oświadczeniu ISAPP wyraźnie rozróżnia się definicje żywności fermentowanej od żywności probiotycznej (która wpisuje się w kryteria produktów funkcjonalnych). Pojęcie żywności fermentowanej nie wymaga dowodów na działanie prozdrowotne i nie wymaga identyfikacji mikrobioty bytującej w produkcie. Z drugiej strony, produkty fermentowane powinny być klasyfikowane jako "żywność probiotyczna" lub "zawierająca probiotyki" tylko wtedy, gdy istnieją dowody na korzyści zdrowotne wynikające z obecności mikroorganizmów fermentujących. Różnica między „żywnością probiotyczną” a „żywnością zawierającą probiotyki” polega na tym, że w pierwszym przypadku żywność fermentowana powinna być oparta na dowodach na obecność konkretnego szczepu oraz definicja ta powinna być tożsama z definicją probiotyków. W drugim przypadku nie ma takiego wymogu (Marco i in., 2021). Szczegółowe informacje dotyczące różnic pomiędzy żywnością fermentowaną, probiotykami a fermentowaną żywnością probiotyczną przytoczono w tabeli 2. Należy zauważyć, że zarówno fermentowana żywność jak i probiotyczna żywność fermentowana mogą mieć korzystny wpływ na zdrowie człowieka poprzez zmianę wartości odżywczej składników, zawartości związków biokatywnych (np. witamin, związków fenolowych, egzopolisacharydów, kwasów gamma-aminomasłowych), modulację układu odpornościowego lub modulację składu mikrobioty jelitowej i jej funkcji (Marco i in., 2021).

Tabela 2. Różnice pomiędzy probiotykami, żywnością fermentowaną i probiotyczną żywnością fermentowaną

Produkt	Definicja	Forma podaży	Potwierdzenie korzyści zdrowotnych	Oświadczenie	Skład mikrobiologiczny		
					Żywe i obecne w ilościach zapewniających korzyści	Identyfikacja taksonomiczna do poziomu szczepu	Dostępna sekwencja genomu
Probiotyki	Żywe mikroorganizmy które, gdy podawany w odpowiednich ilościach, zapewnia zdrowie korzyści dla gospodarza	Brak określonej formy	Wymagane	Nazwa "probiotyk" może być umieszczona na etykiecie wraz z oświadczeniem o korzyściach zdrowotnych, takim jak "pomaga wzmocnić naturalne mechanizmy obronne organizmu", jeżeli oświadczenie jest poparte dowodami	Wymagane	Wymagane	Wymagane
Żywność fermentowana	Żywność wytwarzana poprzez pożądaną wzrost mikroorganizmów i enzymatyczne przekształcanie składników żywności	Żywność	Niewymagane	Jeśli żywe mikroorganizmy nie są obecne: "Żywność wyprodukowana w drodze fermentacji"; jeśli żywe mikroorganizmy są obecne: "Zawiera żywe i aktywne kultury bakterii".	Niewymagane	Niewymagane	Niewymagane
Probiotyczna żywność fermentowana	Żywność fermentowana przy użyciu probiotyków lub zawierająca probiotyki, z dowodami dotyczącymi konkretnych szczepów	Żywność	Wymagane	Taka sama jak dla probiotyków	Wymagane dla mikroorganizmów probiotycznych, ale nie dla mikroorganizmów fermentacyjnych		
	Żywność fermentowana zawierająca probiotyki lub zawierająca probiotyki, bez dowodów dotyczących konkretnego szczepu	Żywność	Wymagane	„Zawiera probiotyki”	Wymagane dla mikroorganizmów probiotycznych, ale nie dla mikroorganizmów fermentacyjnych		

Źródło: (Marco i in., 2021)

Warto w tym miejscu zaznaczyć, że fakt przynależności danego szczepu do grupy bakterii fermentacji mlekowej nie świadczy o jego właściwościach probiotycznych. Według FAO i WHO (2006) probiotyki definiuje się jako niepatogenne, żywe mikroorganizmy, które spożywane w odpowiednich ilościach wywierają efekt zdrowotny na gospodarza. Wymagania stawiane przez FAO i WHO (2006) dotyczące określenia właściwości probiotycznych mikroorganizmów są kompleksowe oraz obejmują wiele aspektów:

- **Identyfikację genetyczną do poziomu szczepu** – ponieważ właściwości probiotyków są szczepozależne, sugeruje się, aby najpierw przeprowadzić badania fenotypowe, a następnie identyfikację genetyczną z zastosowaniem takich metod, jak hybrydyzacja DNA/DNA, sekwencjonowanie 16S RNA lub innych uznanych metod międzynarodowych. Sekwencjonowanie rybosomalnego 16S RNA jest dobrze znanym i niezawodnym sposobem identyfikacji gatunków, pod warunkiem, że stosuje się wiarygodne sekwencje referencyjne. Uzyskaną sekwencję można dopasować do dużych referencyjnych baz danych (np. NCBI), które obejmują prawie całą znaną różnorodność bakterii (Binda i in., 2020).
- **Określenie i ocena korzyści zdrowotnych** – właściwe badania *in vitro* powinny określić potencjalne korzyści zdrowotne probiotyków przed rozpoczęciem badań *in vivo*.
 - Badania *in vitro* takie jak tolerancja kwasów i soli żółciowych, wytwarzanie substancji przeciwdrobnoustrojowych, w szczególności wobec mikroorganizmów patogennych, zdolność adhezji do ludzkich komórek jelitowych oraz możliwość kolonizacji nabłonka powinny być wykonywane w zależności od proponowanych korzyści zdrowotnych probiotyku.
 - Badania *in vivo* należy przeprowadzić w sposób randomizowany, z podwójnie ślepą próbą z udziałem ludzi wraz z grupą kontrolną stosującą placebo w celu ustalenia skuteczności produktu probiotycznego. Co istotne, danych uzyskanych na podstawie jednej konkretnej żywności probiotycznej nie można odnosić do innej żywności zawierającej ten sam konkretny szczep probiotyczny ani do innych mikroorganizmów probiotycznych.
- **Określenie wrażliwości mikroorganizmów na antybiotyki** – zaleca się, aby bakterie probiotyczne nie były nosicielami genów oporności na antybiotyki. Dlatego też konieczne są badania dotyczące antybiotykoodporności szczepów oraz możliwości przeniesienia materiału genetycznego na inne mikroorganizmy jelitowe lub patogeny przenoszone drogą pokarmową.
- **Brak właściwości chorobotwórczych** – zgodnie z obecnym stanem wiedzy nie stwierdza się chorobotwórczości oraz wirulencji wśród grupy bakterii fermentacji mlekowej. Pomimo to, zaleca się, aby przeprowadzić co najmniej kilka badań z udziałem ludzi, które powinny

uwzględniać aspekty proponowanego końcowego zastosowania szczepu probiotycznego, i tym samym wykluczyć ryzyko wywoływania chorób.

Do probiotyków zaliczane są różne mikroorganizmy, w tym bakterie fermentacji mlekowej oraz bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* SF68, *Saccharomyces boulardii*. Dominującą grupę stanowią te pierwsze (Jach i in., 2013). Co istotne, wiele gatunków bakterii fermentacji mlekowej jest powszechnie uznawanych za bezpieczne do stosowania w żywności i suplementach ze względu na ich dobrze udokumentowaną historię bezpiecznego stosowania jako probiotyki lub kultury starterowe (Binda i in., 2020; Bourdichon i in., 2018; EFSA, 2007, 2020). Potwierdzają to nadawane poszczególnych gatunkom statusy GRAS i QPS. Od 2007 r. EFSA prowadzi listę gatunków uznanych za bezpieczne do spożycia przez ludzi pod statusem "kwalifikowanego domniemania bezpieczeństwa" (ang. *Qualified Presumption of Safety* - QPS). Lista ta stanowi odpowiednią podstawę do określania bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Jednak nawet gatunek sklasyfikowany jako QPS wymaga badań oraz analiz opartych na czterech obszarach – identyfikacji taksonomicznej, weryfikacji dotychczasowego stanu wiedzy, bezpieczeństwa szczepu oraz uzasadnienia i badań względem zastosowania końcowego szczepu (EFSA, 2007; Herman i in., 2019). Status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) - "ogólnie uznany za bezpieczny", przyznawany przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA), jest koncepcyjnie podobny do QPS i poświadcza bezpieczne stosowanie mikroorganizmów. Również w tym przypadku liczne gatunki bakterii fermentacji mlekowej uzyskały status GRAS i zostały dopuszczone do stosowania jako dodatki do żywności (Binda i in., 2020; FDA, 2021).

Przedstawione powyżej uregulowania obowiązujące na rynku spożywczym mogą stanowić ograniczenia, ale również wytyczne dla rozwoju nowych produktów, w tym żywności funkcjonalnej rozwijanej na bazie niemlecznych produktów fermentowanych. Uwzględnienie obowiązujących regulacji jest koniecznością w procesie rozwoju nowych produktów, gdyż opracowanie produktu, który byłby z nimi niezgodny, przekreśla szanse na jego wprowadzenie na rynek.

2.2. Koncepcje rozwoju nowego produktu

Pojawiające się na rynku spożywczym trendy wymuszają, aby przedsiębiorstwa dostosowywały podaż do aktualnych wymagań konsumentów. Spełnienie tych warunków wymaga z kolei, aby przedsiębiorstwa aktywnie rozwijały nowe produkty, a tym samym zapewniały konsumentom pożądaną przez nich gamę produktów o określonych właściwościach zdrowotnych, odżywczych i sensorycznych (Urala i Lahteenmaki, 2003). Innowacyjność jest na rynku spożywczym napędzana przez wysokie nasilenie walki konkurencyjnej pomiędzy sklepami detalicznymi, w których zaopatrują się konsumenci, co z kolei przekłada się na producentów zaopatrujących te sklepy w produkty finalne (Tsimiklis i Makatsoris, 2015). **Konieczność rozwoju nowych produktów jest więc naturalną konsekwencją organizacji rynku spożywczego, w którym silna konkurencja wymusza dostosowanie podaży do popytu rynkowego.**

Na współczesnym rynku spożywczym, rozwój nowych produktów jest często zalecany jako odpowiednie działanie sprzyjające budowaniu przewagi konkurencyjnej i długoterminowego sukcesu rynkowego. **Wskazuje się, że innowacje produktowe pomagają utrzymać wzrost przedsiębiorstwa, zwiększyć jego wartość, rozłożyć ryzyko rynkowe i podnieść konkurencyjność** (Costa i Jongen, 2006). Koncepcja kierowanego przez konsumentów rozwoju nowych produktów jest w literaturze przedmiotu przedstawiana jako element zorientowanej na rynek strategii zarządzania innowacjami, która jest istotna szczególnie dla producentów dóbr konsumpcyjnych, ponieważ koncentruje się na wykorzystaniu w procesie rozwojowym wiedzy o użytkownikach końcowych (O'Sullivan, 2017). Jest to koncepcja bazująca na wykorzystaniu analizy obecnych i przyszłych potrzeb konsumentów oraz wiedzy o determinantach tych potrzeb w celu rozwoju innowacyjnych produktów (Adams i in., 2006). Główne założenia tej koncepcji są następujące (Costa i Jongen, 2006):

- potrzeby konsumentów powinny być punktem wyjścia dla procesów rozwoju nowych produktów;
- celem prac badawczo-rozwojowych powinno być zaspokojenie potrzeb konsumentów, a nie opracowywanie produktów jako takich;
- biorąc pod uwagę, że wzrost sprzedaży i zadowalający zwrot z inwestycji można osiągnąć tylko wtedy, gdy potrzeby konsumentów zostaną skutecznie zidentyfikowane i zaspokojone, miarą sukcesu procesu nowego produktu powinien być stopień jego dopasowania do potrzeb konsumentów.

Rozwój nowego produktu jest najczęściej prezentowany z perspektywy procesowej (Cooper, 2008), **co oznacza, że należy go rozumieć jako sekwencję zdarzeń, których zaistnienie jest niezbędne do tego, żeby nowy produkt został rozwinięty i wprowadzony na rynek.** Proces rozwoju nowych produktów obejmuje więc zarówno aspekty technologiczne (np. badania laboratoryjne), jak i ekonomiczne (np. badania konsumenckie). Definitywnie, poprzez rozwój nowego produktu należy rozumieć proces przekształcania nowego pomysłu w produkt komercyjny poprzez sekwencję działań (Trott, 2017), lub proces projektowania nowego produktu, wytwarzania go i wprowadzenie go na rynek (Azanedo i in., 2020), bądź przekształcenie szansy rynkowej w produkt dostępny do sprzedaży (Krishnan i Ulrich, 2001a). **Podkreśla się przy tym, iż dla rynku spożywczego istotną częścią sekwencji działań są działania o charakterze technologicznym** (Chaochotechuang i Mariano, 2016).

Aktualne badania dotyczące rozwoju nowych produktów dotyczą głównie opisów samego procesu. Niewielka część literatury badawczej poświęcona jest wyłącznie przemysłowi spożywczemu (Jreissat i Makatsoris, 2022; Saguy i Sirotinskaya, 2014; Tsimiklis i in., 2015), **co wskazuje na występowanie istotnej luki badawczej.** Część autorów argumentuje, iż najbardziej podstawowe praktyki rozwojowe są wspólne dla większości sektorów (Rudder i in., 2001), tym niemniej podejście nieuwzględniające specyfiki sektora wydaje się być zbyt uogólnieniem – szczególnie w obliczu różnic pomiędzy branżami, przykładowo pomiędzy branżą spożywczą a motoryzacyjną. Dla przedsiębiorstw

działających na rynku spożywczym, rozwój nowych produktów jest więc często koniecznością, warunkującą możliwość przetrwania w długim okresie (Costa i Jongen, 2006). **Stąd, skuteczne zarządzanie tym procesem, którego efektem jest wprowadzanie na rynek produktów odpowiadających potrzebom konsumentów, jest dla przedsiębiorstw spożywczych kluczowe.** Badania naukowe wskazują, iż w przypadku większości nowych produktów spożywczych, zwłaszcza wytwarzanych przez małe i średnie przedsiębiorstwa, opracowywanie nowych produktów odbywa się w oparciu o procedury wewnętrzne – specyficzne dla danego przedsiębiorstwa, lub ewentualnie o modele zaadaptowane z innych sektorów (Pinna i in., 2018). W rezultacie, na rynku spożywczym nie wypracowano jednolitego procesu rozwoju nowego produktu uwzględniającego cechy szczególne dla tego rynku. Stanowi to istotne wyzwanie naukowe, ponieważ w produkcji żywności należy wziąć pod uwagę takie specyficzne czynniki, jak zdrowie konsumenta, dostępność i dostęp do składników, trwałość składników, właściwości zdrowotne oraz sensoryczne czy też cykl życia produktu spożywczego.

Rozwijanie nowych produktów jest działaniem ryzykownym oraz złożonym, które wymaga uwzględnienia specyfiki sektora. W literaturze wymieniana są kluczowe czynniki decydujące o sukcesie nowego produktu (Ryynanen i Hakatie, 2014). Podejmuje się również próby kategoryzacji najważniejszych czynników sukcesu. Aby proces rozwojowy był skuteczny, musi integrować wiedzę z trzech obszarów (Acur i in., 2012). Pierwszy dotyczy zrozumienia wewnętrznych mocnych i słabych stron przedsiębiorstwa. Drugi obszar dotyczy znajomości technologii potrzebnych do wytworzenia produktu. Trzeci obszar obejmuje znajomość aktualnych potrzeb konsumentów i sposobów, w jakie przedsiębiorstwa mogą reagować na pojawiające się trendy społeczne, a także zrozumienie ukrytych potrzeb konsumentów, tj. takich, których nie zaspokajają jeszcze obecne na rynku produkty (Azanedo i in., 2020). Skuteczny proces rozwojowy musi zatem łączyć zagadnienia technologiczne i ekonomiczne. Ponadto, powszechnie przyjmuje się, że skuteczne zarządzanie procesem opracowywania produktów powinno być elastyczne i podlegać ciągłej ewolucji ze względu na zmiany zachodzące zarówno wewnątrz jak i w otoczeniu przedsiębiorstwa (Ryynanen i Hakatie, 2014).

Koncentrując się na roli konsumentów należy podkreślić, iż koncepcja kierowanego przez konsumentów rozwoju nowych produktów została wprowadzona już na początku lat 90-tych XX wieku (Costa i Jongen, 2006). Jej podstawę stanowił rozwój innowacji uwzględniających potrzeby zgłaszane na rynku, co polegało na wykorzystaniu analizy obecnych i przyszłych potrzeb konsumentów do opracowywania nowych produktów o rzeczywistej wartości dodanej (Urban i Hauser, 1993). Koncepcja ta adaptowana jest w przedsiębiorstwach zorientowanych na rynek, które podejmują próbę ciągłego zdobywania i wewnętrznego rozpowszechniania informacji o rynku, istotnych z punktu widzenia możliwości zaspokojenia obecnych i przyszłych potrzeb klientów, a także doskonałą zdolności do reagowania na te potrzeby (Kohli i Jaworski, 1990). **Koncepcja ta znalazła szerokie uznanie wśród badaczy zarówno z obszaru marketingu, zarządzania oraz technologii żywności** (Busse i Siebert, 2017;

Filieri, 2013; Horvat, Granato, i in., 2019), a także w badaniach poświęconych konkretnie żywności funkcjonalnej (Bogue i in., 2017).

W nurcie badań nad zarządzaniem innowacjami podjęto próbę określenia związku pomiędzy orientacją rynkową przedsiębiorstwa a rozwojem nowych produktów. Wyniki badań sugerują występowanie pozytywnej zależności (Jreissat i Makatsoris, 2022; Tsimiklis i in., 2015). Z jednej strony wskazują, iż orientacja rynkowa jest czynnikiem krytycznym dla udanego rozwoju produktu i procesów innowacyjnych (Bogue i Sorenson, 2007). Z drugiej strony, część badań wskazuje, iż prowadzenie procesu rozwoju nowych produktów sprzyja orientacji rynkowej przedsiębiorstwa. Podkreśla się, że wdrożenie orientacji rynkowej w procesach rozwoju nowych produktów może być kluczowym krokiem przy podejmowaniu działań bardziej zorientowanych na rynek (Kok i in., 2002). Zagadnienia zorientowania przedsiębiorstwa na rynek oraz rozwoju nowych produktów wzajemnie się przeplatają i uzupełniają, a wykorzystanie koncepcji kierowanego przez konsumentów rozwoju nowych produktów wymaga od przedsiębiorstw aby (Costa i Jongen, 2006):

- zarówno wiedza technologiczna, jak i informacje rynkowe zostały uznane za niezbędne do prowadzenia efektywnych procesów rozwoju produktów;
- wypracowano sposób gromadzenia, rozpowszechniania i łączenia informacji rynkowych z wiedzą technologiczną tak, aby możliwe było efektywne opracowanie nowych produkt

W odniesieniu do sytuacji na europejskim rynku spożywczym można zauważyć, iż badania wskazują, że pozyskiwanie informacji o konsumentach przez przedsiębiorstwa działające na rynku spożywczym, jest nadal stosunkowo rzadkie i w części przypadków – przypadkowe (Costa i Jongen, 2006). W praktyce, większość przedsiębiorstw spożywczych, z wyjątkiem nielicznych, dużych, międzynarodowych koncernów, polega na informacji płynącej ze sklepów prowadzących sprzedaż detaliczną w celu poznania preferencji użytkowników końcowych. Jeśli przyjmie się, że europejski przemysł spożywczy posiada stosunkowo niski stopień orientacji rynkowej, korzyści płynące z wprowadzenia kierowanego przez konsumentów rozwoju nowych produktów mogą stanowić istotną przewagę konkurencyjną.

W tym miejscu należy też odwołać się do specyfiki samego produktu. W literaturze wskazuje się bowiem na występowanie różnic pomiędzy rozwojem nowych produktów spożywczych i rozwojem nowych produktów funkcjonalnych (Khan i in., 2013). Kluczowe czynniki sukcesu w rozwoju nowych produktów spożywczych obejmują: zorientowanie na innowacje, generowanie wiedzy, rozwój zasobów, sieci współpracy oraz strategię komercjalizacji (Khan i in., 2013). Porównując każdy z tych czynników pomiędzy standardowymi produktami spożywczymi i produktami funkcjonalnymi można wskazać różnice:

- **Zorientowanie na innowacje.** W przypadku tradycyjnych produktów spożywczych przedsiębiorstwa koncentrują się na walce konkurencyjnej w ramach istniejących rynków poprzez ulepszanie produktów już istniejących (Hardy, 2010). **W przypadku produktów**

funkcjonalnych ważnym aspektem jest jednak również samo tworzenie nowych rynków poprzez tworzenie innowacji przełomowych (Gehlhar i in., 2009).

- **Generowanie wiedzy.** Dla tradycyjnych produktów spożywczych jednym z podstawowych czynników konkurencyjnych jest cena. Pochodną tego jest fakt, iż działania rozwojowe koncentrują się często na możliwej obniżce kosztów, a badania i rozwój bazują na wykorzystaniu podstawowych technologii i dobrze ugruntowanej wiedzy (Winger, 2009). **Rozwój produktów funkcjonalnych jest często bardziej wymagający z technologicznego punktu widzenia. Wykorzystuje się zaawansowaną technologię, a sam proces skutkuje często powstaniem nowej wiedzy** (Bogue i in., 2017; Mark-Herbert, 2002).
- **Rozwój zasobów.** Rozwijając produkty tradycyjne przedsiębiorstwa spożywcze bazują zwykle na wewnętrznie posiadanych zasobach (Sarkar i Costa, 2008). **W przypadku produktów funkcjonalnych przedsiębiorstwa dużo częściej uzupełniają wewnętrzne zasoby, zasobami (również niematerialnymi) obecnymi w otoczeniu przedsiębiorstwa** (Bröring, 2008).
- **Sieci współpracy.** Ze względu na charakter produktów tradycyjnych rozbudowana sieć współpracy nie jest zwykle potrzebna przy ich rozwoju. W tym przypadku sieć współpracy obejmuje zwykle pojedyncze podmioty (np. dostawcę), a sama współpraca jest zwykle ograniczona w czasie (Khan i in., 2013). **Istotnym aspektem przy rozwoju produktów funkcjonalnych może być podejmowana współpraca. Występuje ona częściej niż w przypadku produktów tradycyjnych, obejmuje szerszą grupę interesariuszy przedsiębiorstwa (dostawców, odbiorców, organizacje naukowe, instytuty badawcze itd.) oraz ma nierzadko charakter długotrwały** (Mortara i Minshall, 2011).
- **Strategia komercjalizacji.** Skuteczna komercjalizacja produktów tradycyjnych może bazować na aktualnych rozwiązaniach panujących w przedsiębiorstwie np. wykorzystaniu wypracowanej marki (Traill i Meulenberg, 2002). **W przypadku produktów funkcjonalnych, proces komercjalizacji wymaga większego zaangażowania przedsiębiorstwa** (Sarkar i Costa, 2008). Przypadek ten jest szczególnie widoczny w sytuacji wprowadzania produktu na nowy rynek, kiedy działania marketingowe i sprzedażowe muszą zostać w dużej mierze zaplanowane od nowa.

Ze względu na ich charakterystykę, zarządzanie rozwojem nowych produktów funkcjonalnych jest zadaniem wyjątkowo wymagającym. Rozwój tych produktów wymaga szczególnego zaangażowania wiedzy, kompetencji i zasobów przedsiębiorstwa. W przypadku produktów funkcjonalnych tym większego znaczenia nabiera więc systematyczne podejście do rozwoju nowych produktów (Bogue i in., 2017).

2.3. Model rozwoju nowego produktu spożywczego

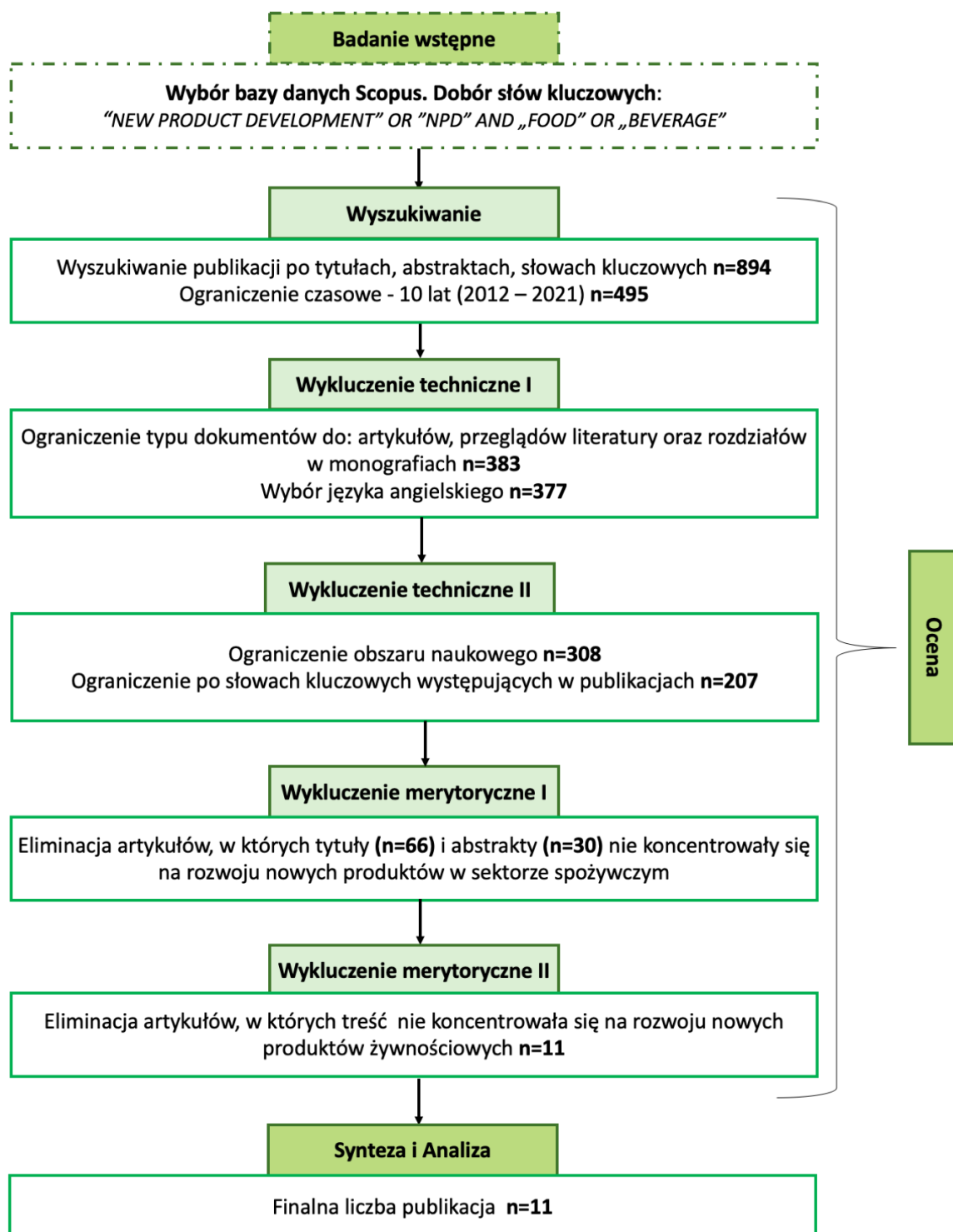
Ponieważ wymagania konsumentów zmieniają się, producenci żywności starają się opracowywać nowe, oryginalne produkty spożywcze (często o właściwościach prozdrowotnych), których wprowadzenie na rynek może prowadzić do poprawy pozycji konkurencyjnej przedsiębiorstwa (Rudder i in., 2001). Rozwój nowych produktów można opisać jako proces przekształcania nowej szansy rynkowej w produkt komercyjny poprzez sekwencję operacji (Azanedo i in., 2020; Krishnan i Ulrich, 2001b; Rudder i in., 2001). W literaturze naukowej można przytoczyć liczne modele rozwoju nowych, innowacyjnych produktów, które w zależności od podejścia danego autora składają się z różnych etapów (Bernstein i Singh, 2006; Cooper, 2008; Hallstedt i in., 2013; Louw i in., 2018; Rogers, 2003). Na bazie literatury przedmiotu stwierdzono, iż jednym z najpowszechniej stosowanych w analizach naukowych modeli jest ten opracowany przez Kotlera i Armstronga (1991), który wyróżnia osiem głównych etapów: 1. generowanie pomysłów, 2. przegląd pomysłów, 3. opracowanie i testowanie koncepcji, 4a. rozwój strategii marketingowej i 4b. rozwój produktu, 5a. analiza biznesowa i 5b. testy marketingowe, i wreszcie 6. komercjalizacja. Model ten (i jemu podobne) ma jednak charakter generalny i nie uwzględnia specyfiki branży spożywczej. Ze względu na to, oprócz modeli o charakterze generalnym, można również wyróżnić modele branżowe.

Wyniki badań wskazują, że rozwój nowego produktu spożywczego jest złożonym procesem, w którym zachodzą międzyetapowe sprzężenia zwrotne. Uwzględnienie specyfiki sektora jest tym bardziej istotne, że na proces rozwoju produktów spożywczych wpływa wiele różnych funkcji, **takich jak technologia, marketing i badania konsumenckie** (Horvat, Behdani, i in., 2019), a produkty spożywcze posiadają określoną specyfikę (Horvat, Behdani, i in., 2019; Kotler i Armstrong, 1991; Rudder i in., 2001; Sharif i in., 2018). **W literaturze zwraca się również uwagę, że w przypadku produktów spożywczych niemal wszystkie etapy procesu wymagają dogłębnego zrozumienia technologii żywności – zwłaszcza podczas prac badawczo-rozwojowych** (Sharif i in., 2018).

Przykładem modelu dedykowanego branży spożywczej może być model opracowany przez Rudder i in. (2001). Autorzy przedstawili na początku lat 2000. przegląd najważniejszych prac badawczych dotyczących procesu rozwoju nowych produktów spożywczych. W tamtym czasie proces ten przedstawiany był jako sekwencja zdarzeń składająca się z pięciu do ośmiu etapów. Model ten wydaje się jednak wymagać aktualizacji. W niniejszym podrozdziale przeanalizowano modele rozwoju nowych produktów spożywczych, które opracowane zostały w trakcie dziesięciu lat poprzedzających opracowanie niniejszej rozprawy. Podejście takie pozwoliło na stworzenie modelu aktualnego, uwzględniającego najnowsze dokonania naukowe. Szczegółowa strategia prowadzenia studiów literaturowych została zaprezentowana poniżej.

Systematyczny przegląd literatury oparty na metodzie SALSA (ang. *Search, Appraisal, Synthesis, Analysis*) (Booth, A., Papaioannou, D., i Sutton, 2012) pozwolił na zebranie artykułów badawczych dotyczących rozwoju nowych produktów na rynku spożywczym. Kompleksowy przegląd literatury

przeprowadzono z wykorzystaniem bazy danych Scopus (Elsevier). Użyto następującej kombinacji słów kluczowych: „*new product development*” or “*npd*” and „*food*” or „*beverage*” w wyszukiwaniu po tytułach, abstraktach oraz słowach kluczowych. Na wstępie zidentyfikowano 894 publikacje naukowe. Kolejno ograniczono wyszukiwanie publikacji do 10 lat (2012 -2021), co pozwoliło zredukować liczbę publikacji do 495. Następnie liczbę publikacji zmniejszono do 383 poprzez ograniczenie typu dokumentów do: artykułów, przeglądów literatury oraz rozdziałów w monografiach. Wybór języka angielskiego ograniczył liczbę publikacji do 377. Kolejny etap przeglądu literatury uwzględniał redukcję liczby publikacji z uwagi na obszar tematyczny spójny z obszarem badań przedstawionym w niniejszej rozprawie. Listę publikacji zawężono do następujących obszarów: 1. nauki rolnicze i biologiczne, 2. biznes, zarządzanie i rachunkowość, 3. biochemia, genetyka i biologia molekularna, 4. chemia, 5. nauki społeczne, 6. ekonomia, ekonometria i finanse, 7. immunologia i mikrobiologia, 8. nauk o zdrowiu, 9. nauki multidyscyplinarne. Pozwoliło to na redukcję liczby publikacji do 308. Następnie zawężono listę publikacji z uwagi na przedmiot badań. W pierwszej kolejności przeanalizowano słowa kluczowe występujące w publikacjach. Ze zbioru publikacji wyselekcjonowane te, które posiadają niżej wymienione słowa kluczowe: „*new product development*”, „*product development*”, “*new product development (NPD)*”, „*food products*”, “*food product*”, „*food industry*”, “*food industries*”, “*procedures*”, “*nutrition*”, “*innovation*”, “*open innovation*”, “*product innovation*”, “*product design*”, “*beverages*”, “*beverage*”, “*food quality*”, “*food*”, “*fermentation*”, “*food technology*”, “*functional food*”, “*functional foods*”, “*functional properties*”, “*functional ingredient*”, “*microbiology*”. Umożliwiło to ograniczenie listy publikacji do 207 pozycji. W kolejnym etapie wyeliminowano artykuły, których tytuły nie uwzględniały rozwoju nowego produktu spożywczego tj. 66 publikacji. Następnie przeprowadzono analizę abstraktów pozostałych publikacji, która umożliwiła wybór 30 najistotniejszych prac badawczych, poddanych szczegółowej analizie treści. W wyniku szczegółowej analizy pełnych tekstów publikacji pozostało 11 artykułów, które stanowiły następnie podstawę dla opracowania modelu rozwoju nowych produktów spożywczych. Schemat systematycznego przeglądu literatury przedstawiono na rysunku 3.



Rysunek 3. Schemat systematycznego przeglądu literatury - rozwój nowego produktu na rynku spożywczym

Źródło: opracowanie własne

Wszystkie analizowane w ramach niniejszych studiów literaturowych pozycje literaturowe zostały zawarte w tabeli 3. Każdorazowo oprócz autorów danego modelu zaprezentowano słowa kluczowe użyte w publikacji, przedmiot badań, na potrzeby których model został opracowany oraz określenie typu modelu. Zestawienie samych modeli zaprezentowano w dalszej części rozdziału.

Tabela 3. Systematyczny przegląd literatury - rozwój nowego produktu w branży spożywczej

L.p.	Literatura	Słowa kluczowe	Przedmiot badań	Typ modelu
1.	(Fogt i in., 2014)	-	Komunikacja wewnętrzna w trakcie realizacji funkcji technologicznych i marketingowych w procesie rozwoju nowych produktów spożywczych	Graficzny/opisowy
2.	(Chaochotechuang i Mariano, 2016)	food and beverage; globalisation; innovation strategies; new product development; new product innovation; sme	Współzależność rozwoju nowego produktu oraz strategii rozwoju innowacji produktowych	Opisowy
3.	(Bogue i in., 2017)	-	Rozwój koncepcji nowych spożywczych produktów funkcjonalnych	Opisowy
4.	(Busse i Siebert, 2017)	crowdsourcing, open innovation, consumer acceptance, co-design of innovation, consumer-involvement methods, consumer-led npd	Rola konsumentów w rozwoju innowacji na rynku spożywczym	Graficzny/opisowy
5.	(Horvat, Granato, i in., 2019)	new product development product life cycle consumer research consumer involvement consumer-oriented approach food trends	Wykorzystanie informacji o konsumentach w rozwoju nowych produktów przez Europejskie przedsiębiorstwa spożywcze	Graficzny/opisowy
6.	(Jagtap i in., 2020)	sustainability, food supply chain, big data analytics	Poprawa procesu rozwoju nowego produktów przedsiębiorstwie spożywczym przy wykorzystaniu big data	Graficzny/opisowy
7.	(Franzò i in., 2021)	business model design, case study, circular business model, circular economy, circular product, new product development	Rozwój nowych produktów na rynku napojów, w gospodarce o obiegu zamkniętym	Opisowy
8.	(Oliveira i Cardoso, 2021)	academic entrepreneurship; new product development; innovation; new food; traditional foods	Wspieranie innowacji na rynku tradycyjnych produktów spożywczych poprzez przedsiębiorczość akademicką	Graficzny/opisowy
9.	(Fileri, 2013)	open innovation, customer co-creation, new product development, idea generation, idea screening, case study analysis, innovation, product development, marketing intelligence	Współtworzenie przez konsumentów nowych produktów rozwijanych przez przedsiębiorstwa spożywcze	Opisowy
10.	(Manfio i Lacerda, 2016)	product development; project scope; product scope; food industry; project management; method for product development	Zakres projektów rozwoju nowych produktów w sektorze spożywczym	Graficzny/opisowy
11.	(Durst i in., 2018)	innovation, emerging economies, turkey, new product development, exploitation stage, new product commercialization	Charakterystyka późniejszych etapów rozwoju nowego produktu	Opisowy

Źródło: opracowanie własne

Wymienione w tabeli 3 artykuły naukowe przeanalizowano wykorzystując elementy metody meta-etnografii (ang. *meta-ethnography*), której celem jest integracja wyników badań prezentowanych w różnych opracowaniach naukowych. Podejście to jest powszechnie wykorzystywane w podobnych studiach literaturowych. Przeprowadzona w niniejszej rozprawie analiza bazowała na dwóch etapach podejścia meta-etnograficznego (Siau i Long, 2005) koncentrujących się na (1) określeniu w jaki sposób wyniki badań są powiązane oraz (2) porównaniu podobieństw i różnic pomiędzy nimi.

Jak stwierdzono w toku analizy, powiązanie pomiędzy wynikami badań wynika ze stosowanych w nich zakresów: podmiotowego (podmioty działające w branży spożywczej), przedmiotowego (rozwój nowych produktów) i czasowego (zbliżony zakres czasowy obejmujący lata 2014 - 2021). Po ustaleniu, iż badane opracowania są spójne we wskazanych zakresach, zaprezentowane w nich modele zostały porównane pomiędzy sobą. Oznacza to, iż przeprowadzona analiza sprowadziła się do przeanalizowania każdego z modeli rozwoju nowych produktów żywnościowych wraz z analizą wyodrębnionych etapów, a następnie wskazania, jak w kolejnych modelach scharakteryzowano poszczególne etapy.

Proces budowy modelu rozwoju nowych produktów spożywczych przebiegał następująco. Najpierw z porównania przeanalizowanych artykułów wyodrębniono siedem etapów, których realizacja jest uzasadniona podczas rozwoju nowego produktu spożywczego. Następnie każdy etap scharakteryzowano na podstawie analizy treści badanych artykułów. Po trzecie, dokonano syntezy rozważań w ten sposób, że stworzono model rozwoju nowego produktu spożywczego. Szczegółową analizę publikacji zaprezentowano w tabeli 4.

W wyniku przeprowadzonej analizy stworzono oryginalny, autorski model rozwoju nowych produktów spożywczych. Model ten obejmuje siedem wyróżniających się etapów: generowanie pomysłu, selekcję pomysłu, badania, rozwój, testowanie, wprowadzenie na rynek oraz monitorowanie. Jak pokazano w tabeli 4, żaden z analizowanych modeli nie obejmował wszystkich elementów. Ponadto, na podstawie przeprowadzonego porównania, obejmującego nie tylko wyróżnione etapy, ale także ich charakterystykę zaprezentowaną w poszczególnych artykułach ustalono, iż zakres czynności, których wykonanie przedstawione jest w poszczególnych etapach jest często inaczej rozumiane przez różnych autorów publikacji. Ze względu na to, dokonano porównania poszczególnych opisów, przeanalizowano ich elementy wspólne oraz różnice pomiędzy nimi, a następnie scharakteryzowano każdy z wyodrębnionych etapów. Skróceniwo charakterystykę etapów zaprezentowano w ostatnim wierszu tabeli 4.

Część wyodrębnionych etapów ma charakter generalny – występuje w znaczącej większości przedstawionych procesów rozwoju nowego produktu, a część – unikalny, tj. pojawia się tylko w wybranych modelach. W stworzonym modelu rozwoju nowych produktów spożywczych nie bazowano jednak na częstotliwości występowania poszczególnych etapów, ale na ich merytorycznej analizie prowadzonej z punktu widzenia spójności finalnej wersji modelu.

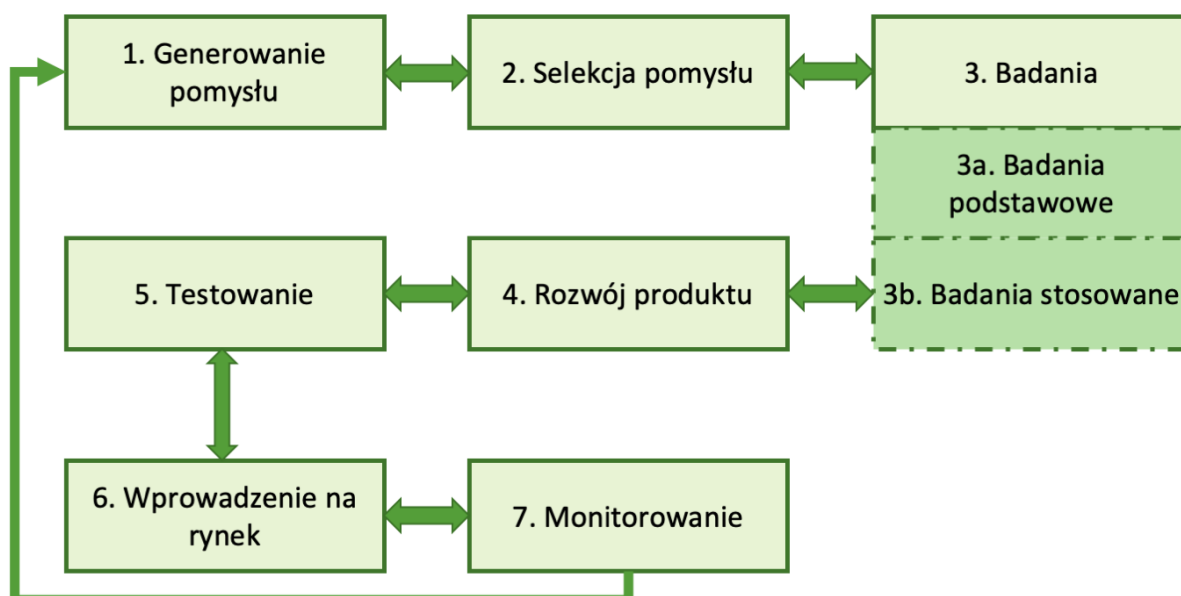
Tabela 4. Podsumowanie modeli rozwoju nowego produktu spożywczego

L.p.	Autorzy	Etapły rozwoju nowego produktu spożywczego						
		Generowanie pomysłu	Wybór pomysłu	Badania	Rozwój	Testowanie	Wprowadzenie na rynek	Monitorowanie
1.	(Fogt i in., 2014)	Idea	Odsiew	Rozwój			Rynek	
2.	(Chaochotechuang i Mariano, 2016)	Pomysł i rozwój koncepcji		Design produktu		Testowanie produktu	Wprowadzenie na rynek	
3.	(Bogue i in., 2017)	Identyfikacji możliwości		Design i rozwój produktu		Testowanie produktu	Wprowadzenie na rynek	
4.	(Busse i Siebert, 2017)	Identyfikacji możliwości /generowanie pomysłów		Rozwój koncepcji	Tworzenie prototypów/ Testowanie produktu		Wprowadzenie na rynek /adaptacja/dyfuzja	
5.	(Horvat, Granato, i in., 2019)	Identyfikacji możliwości		Design produktu		Testowanie produktu	Wprowadzenie na rynek	
6.	(Jagtap i in., 2020)	Generowanie koncepcji		Opracowanie koncepcji produktu	Prototyp	Zatwierdzenie produktu	Produkcja	Wprowadzenie na rynek
7.	(Franzò i in., 2021)	Idea	Wstępna ocena	Koncepcja	Rozwój	Testowanie i próby	Wprowadzenie na rynek	
8.	(Oliveira i Cardoso, 2021)	Pomysł	Selekcja pomysłów	Rozwój koncepcji	Analiza biznesowa obejmująca produkt i marketing	Testy marketingowe	Wprowadzenie na rynek	
Charakterystyka etapów		Wykorzystanie wszystkich dostępnych wewnętrznych i zewnętrznych źródeł pomysłów na nowe produkty.	Selekcja pomysłów w oparciu o ustalone kryteria oceny obejmujące analizę otoczenia i strategię firmy.	Prowadzenie zarówno badań podstawowych (skoncentrowanych na zdobywaniu nowej wiedzy) oraz badań stosowanych (skoncentrowane na konkretnych i z góry określonych zastosowaniach docelowych).	Wykorzystanie istniejącej wiedzy zdobytej podczas badań w celu wytworzenia testowalnej wersji produktu.	Przeprowadzenie obowiązkowych testów jakościowych oraz określenie pozycji nowego produktu na rynku.	Produkcja nowych produktów i możliwe dostosowanie obecnego procesu produkcyjnego, a także wprowadzenie ich na rynek.	Zdobywanie doświadczenia, rejestrowanie danych jakościowych i ilościowych oraz wykonywanie analiz w celu poszerzenia bazy wiedzy firmy.

Źródło: opracowanie własne

W wyniku analizy tekstów stwierdzono, iż publikacje (Durst in., 2018; Filieri, 2013; Manfio i Lacerda, 2016) nie koncentrują się na prezentacji całych modeli rozwoju nowych produktów, ale na dokładnej charakterystyce wybranych etapów. Dlatego też nie były przedmiotem analizy podczas części badania poświęconej wskazaniu etapów, których realizacja jest niezbędna podczas rozwoju nowego produktu spożywczego.

Na podstawie niniejszych studiów literaturowych stworzono model rozwoju nowych produktów spożywczych. Model przyjmuje perspektywę procesową, w której kolejne etapy następując po sobie tworzą spójny ciąg. U podstaw modelu leży założenie, że w celu rozwoju nowego produktu spożywczego należy zrealizować sekwencję czynności, które można logicznie wyodrębnić. Model jest efektem syntezy i analizy wszystkich pozycji literaturowych zaprezentowanych w tabeli 4. Na rysunku 4 przedstawiono wypracowany model rozwoju nowego produktu spożywczego.



Rysunek 4. Model rozwoju nowego produktu spożywczego

Źródło: opracowanie własne

Model rozwoju nowych produktów spożywczych łączy siedem następujących po sobie etapów. Następnostwo kolejnych etapów zaprezentowane jest graficznie za pomocą dwustronnych strzałek łączących poszczególne etapy. Jest tak dlatego, że wszystkie działania są ze sobą powiązane, a proces może przebiegać zarówno od wcześniejszych do późniejszych etapów, jak i może zostać cofnięty z późniejszych etapów do etapów wcześniejszych (np. nieudane testowanie może sprawić, że produkt trafi z powrotem do etapu rozwoju). Poniżej scharakteryzowano wszystkie wyróżnione etapy w modelu rozwoju nowych produktów spożywczych w oparciu o dane literaturowe obejmujące specyfikę sektora spożywczego. W przypadku niektórych etapów, w których badania prowadzone na rynku spożywczym

powielają rozwiązania przyjęte dla ogółu przedsiębiorstw (np. rozróżnienie badań podstawowych i stosowanych), literaturę tę uzupełniano uznanymi źródłami literaturowymi o charakterze generalnym.

Dwa początkowe etapy modelowego podejścia do rozwoju nowych produktów spożywczych obejmują generowanie i selekcję pomysłu. Generowanie pomysłu jest etapem wstępnym, który daje początek całemu procesowi. Zgodnie z charakterystyką wypracowaną w ramach niniejszego modelu, etap ten sprowadza się do wykorzystania wszystkich dostępnych wewnętrznych i zewnętrznych źródeł pomysłów na nowe produkty. Stwierdzenie to jest zgodne z literaturą przedmiotu i wskazuje na kluczową rolę konsumentów w procesie rozwoju nowych produktów (Busse i Siebert, 2017; Manfio i Lacerda, 2016). Uwzględniając specyfikę rynku spożywczego należy zwrócić uwagę, iż na tym etapie należy dokonać integracji zarówno wiedzy o rynku, na którym działa przedsiębiorstwo, jak i informacji o charakterze technologicznym (Fogt i in., 2014). **Rozwój produktu spożywczego wymaga często zaawansowanej wiedzy z zakresu technologii żywności oraz wymaga możliwości prowadzenia badań laboratoryjnych** (Franzò i in., 2021). **Jak wskazuje się w literaturze, tworząc pomysły na nowe produkty spożywcze, należy integrować wiedzę o rynku z informacją o dostępnych możliwościach technologicznych.** Filieri (2013, s. 43) określa to następująco: *„na etapie generowania pomysłów pracownicy działu marketingu przeprowadzają badania rynkowe w celu analizy potrzeb klientów, podczas gdy personel R&D analizuje nowe rozwiązania technologiczne i określa zbiór pomysłów, które uznać można za wykonalne.”*.

W literaturze wskazuje się, że większość pomysłów w naturalny sposób wspiera obecną linię biznesową, a generowanie nowych pomysłów na przełomowe produkty może wymagać specjalnego wsparcia (Paasi i in., 2007). Zagadnienie wspierania pomysłów przełomowych jest kluczowe dla branży spożywczej, gdzie większość nowych produktów stanowi wyłącznie ulepszenie produktów już istniejących (Tsimiklis i in., 2015). **Ze względu na to, iż proces generowania pomysłu jest często procesem kreatywnym, etap ten może być chaotyczny, co wymaga odpowiedniego podejścia do zarządzania – schematyzującego i organizującego cały proces.**

Drugim wyodrębnionym w modelu etapem jest selekcja pomysłu. Zgodnie z wypracowaną charakterystyką etapu, głównym zadaniem, które musi zostać zrealizowane jest wybór pomysłów w oparciu o ustalone kryteria oceny obejmujące analizę otoczenia i strategię firmy. **Na bazie literatury z obszaru zarządzania procesem rozwoju nowych produktów wskazać należy, iż do głównych zadań należy tutaj ocena względnych wad i zalet konkurencyjnych pomysłów, z uwzględnieniem ograniczeń technologicznych** (Bowers i Khorakian, 2014) i strategii organizacji (Manfio i Lacerda, 2016), określenie wykonalności konkretnych pomysłów i odfiltrowywanie nowych pomysłów, które nie pasują do strategii organizacji (Louw i in., 2018). W odniesieniu do przedsiębiorstw spożywczych należy wskazać, iż przełomowe nowe produkty wybierane są do rozwoju rzadko. Jest to uzasadniane tym, iż sklepy detaliczne zwykle lepiej pozycjonują produkty uznane, co utrudnia dotarcie do odbiorcy produktom przełomowym (Fogt i in., 2014). Rozwój produktów stanowiących innowacje inkrementalne niesie

ze sobą również niższe ryzyko oraz niższe wymagane nakłady inwestycyjne. Na tym etapie zasadnym dla przedsiębiorstw spożywczych jest więc przede wszystkim wykorzystanie kryteriów wyboru nie ograniczających możliwości wyboru przełomowych nowych pomysłów. Kryteria takie powinny bazować na połączeniu informacji o wykonalności i atrakcyjności potencjalnego produktu dla konsumentów (Franzò i in., 2021) oraz uwzględniać perspektywę zarówno działu marketingu, działu sprzedaży, działu badań i rozwoju, działu produkcji, jak i działu finansowego (Fileri, 2013). Etap ten nie ma charakteru tak kreatywnego jak generowanie pomysłów. Jest to etap analityczny, który bazuje na ocenie racjonalności ekonomicznej podejmowanych działań rozwojowych. W niniejszym modelu rozdzielono etapy generowania pomysłów oraz selekcji pomysłów. Należy jednak zwrócić uwagę, iż w niektórych opracowaniach etapy te bywają łączone, ponieważ uzupełniają się nawzajem. Dlatego też, w niniejszej pracy zostały przedstawione razem. Dla przykładu, Fogt i autorzy (2014) wyróżniają co prawda etapy „idea” oraz „odsiew”, ale opisują je miejscami wspólnie używając pojęcia fazy potencjalnych możliwości (ang. *opportunity phase*). Podejście to zostało jednak uznane za mniej precyzyjne niż rozróżnienie etapów.

Charakterystyka trzeciego etapu – badań nad produktem – opracowana w ramach niniejszego modelu, wprowadza rozróżnienie na badania podstawowe (skoncentrowane na zdobywaniu nowej wiedzy) i stosowane (skoncentrowane na konkretnych i z góry określonych zastosowaniach docelowych). Rozróżnienie to jest przywoływane w opracowaniach naukowych dotyczących sektora spożywczego (Bigliardi i Galati, 2013; Saguy i Sirotinskaya, 2014) i jest dobrze rozpoznane w literaturze z zakresu zarządzania (Havlíček i in., 2013; OECD, 2015; Rogers, 2003). Uszczegóławiając, badania podstawowe można zdefiniować jako badania, których celem może być wzbogacenie istniejącego zasobu wiedzy, ale które nie są przeznaczone do zastosowania w praktyce. Z kolei badania stosowane są ukierunkowane na konkretny cel i konkretne zastosowanie. Badania podstawowe można zdefiniować jako: *„prace eksperymentalne lub teoretyczne podejmowane przede wszystkim w celu zdobycia nowej wiedzy o podstawach zjawisk i obserwowalnych faktów, bez nastawienia na konkretne zastosowanie lub wykorzystanie.”* (OECD, 2015, s. 365).

Natomiast definicja badań stosowanych jest następująca: *„Badania stosowane to oryginalne badania podejmowane w celu zdobycia nowej wiedzy. Są one ukierunkowane przede wszystkim na konkretny, praktyczny cel lub zadanie.”* (OECD, 2015, s. 365). Ze względu na dobre ugruntowanie powyższych definicji, w niniejszym modelu zostały one przyjęte jako podstawa rozróżnienia pomiędzy badaniami podstawowymi i stosowanymi. W przypadku produktów spożywczych, badania podstawowe mogą być ukierunkowane na uzyskanie nowej wiedzy dotyczącej produktu (np. możliwości spontanicznej fermentacji materiału roślinnego, określenie właściwości prozdrowotnych produktu, czy określenie jego jakości mikrobiologicznej), a także procesu (np. możliwości pozyskania potencjalnie probiotycznych mikroorganizmów). Następnie, badania stosowane mogą mieć na celu osiągnięcie konkretnych, praktycznych efektów. Jako przykład można podać wyselekcjonowanie izolatów bakterii fermentacji

mlekowej o potencjalnie probiotycznych właściwościach w celu stworzenia testowalnych wersji produktów z ich udziałem.

W literaturze przedmiotu wskazuje się, że w odniesieniu do fazy badań na rynku spożywczym za kluczowe zadanie należy uznać np. ocenę ryzyka nowego surowca oraz opracowanie receptury (Jagtap i in., 2020). W fazie tej ryzyko technologiczne zwykle wzrasta wraz ze stopniem nowatorstwa nowego produktu – im bardziej zaawansowany produkt, tym ryzyko technologiczne zwykle jest wyższe (Fogt i in., 2014). **Dlatego też, zaawansowane badania laboratoryjne są często nieodłącznym elementem etapu badań nad produktem.**

Etap badań jest silnie powiązany z kolejnym etapem - rozwojem produktu. Zgodnie z charakterystyką wypracowaną na potrzeby przyjętego modelu, etap ten sprowadza się do wykorzystania istniejącej wiedzy zdobytej podczas etapu badań w celu wytworzenia testowalnej wersji produktu spożywczego. **Na etapie tym, przy opracowywaniu prototypu produktu, przedsiębiorstwa spożywcze wykorzystują aktywa technologiczne, inżynierię produktu i zaawansowane badania laboratoryjne** (Franzò i in., 2021). Na tym etapie istotne może być również zaangażowanie konsumentów w celu dopracowania produktu pod kątem ich preferencji (Horvat, Granato, i in., 2019), co zwiększa szanse na osiągnięcie sukcesu w fazie testowania.

Pomiędzy etapami badań i rozwoju występuje wiele współzależności. Modele teoretyczne dedykowane dla rynku spożywczego nie wykazują tutaj zgodności. Część modeli traktuje oba etapy jako całość (Bogue i in., 2017; Chaochotechuanang i Mariano, 2016; Horvat, Granato, i in., 2019), podczas gdy inne opisują je jako etapy rozłączne lub sekwencyjne (Busse i Siebert, 2017; Franzò i in., 2021; Jagtap i in., 2020; Oliveira i Cardoso, 2021). Bazując na literaturze z obszaru zarządzania rozwojem innowacji produktowych należy przychylić się do stanowiska, iż badania i rozwój powinny być postrzegane jako rozłączne etapy procesu rozwojowego ze względu na zróżnicowane cele ich prowadzenia (Rogers, 2003). Według Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. *Organization for Economic Co-operation and Development* - OECD) (OECD, 2015, s. 369) fazę rozwoju produktu można zdefiniować jako: „*prace rozwojowe to systematyczne prace wykorzystujące wiedzę zdobytą podczas badań i doświadczeń praktycznych oraz tworzące dodatkową wiedzę, która jest ukierunkowana na wytwarzanie nowych produktów lub procesów albo na ulepszanie istniejących produktów lub procesów.*”

W literaturze podkreśla się, że na etapie rozwoju najważniejsze cele obejmują opracowanie prototypów lub próbek produktów, co z kolei umożliwia ocenę wykonalności i dopracowanie koncepcji produktu spożywczego. W praktyce często stosowane jest podejście iteracyjne, polegające na inżynierii i testowaniu na różnych etapach rozwoju testowalnej wersji produktu (Louw i in., 2018).

Mając na uwadze modelowe podejście do procesu rozwoju nowego produktu spożywczego, kolejny etap to testowanie. Podstawą tego etapu jest przeprowadzenie obowiązkowych testów jakościowych oraz określenie pozycji nowego produktu na rynku. Na rynku spożywczym etap ten jest wewnętrznie podzielony na dwie części. Pierwsza z nich obejmuje testy obowiązkowe, wymagane przez

poszczególnych regulatorów rynku, natomiast druga - testy opcjonalne. Zagadnienie testów obowiązkowych zostało omówione w podrozdziale poświęconym wymaganiom dotyczącym niemlecznych produktów fermentowanych. Testy nieobowiązkowe to testy marketingowe koncentrujące się na pozycji nowego produktu na rynku. Prowadzenie tych testów jest charakterystyczne zarówno dla procesów rozwojowych prowadzonych na rynku spożywczym (Oliveira i Cardoso, 2021) jak i poza nim (Havlíček i in., 2013). Zgodnie z literaturą przedmiotu, na rynku spożywczym, etap testowania polega na testowaniu próbek produktów mającym na celu potwierdzenie ich fizycznych właściwości (Chaochotechuang i Mariano, 2016), a także zweryfikowanie, czy produkt odpowiada preferencjom konsumentów (Fogt i in., 2014; Horvat, Granato, i in., 2019). Etap ten łączy więc testy laboratoryjne z testami marketingowymi (Franzò i in., 2021).

W niniejszym modelu etap testowania został wyraźnie wyodrębniony. Podejście takie jest dominujące w literaturze poświęconej rozwojowi nowych produktów na rynku spożywczym (Bogue i in., 2017; Chaochotechuang i Mariano, 2016; Oliveira i Cardoso, 2021), choć nie jest jedynym spotykanym. Część modeli postuluje łączenie etapów rozwoju i testowania (Busse i Siebert, 2017) lub badań, rozwoju i testowania (Fogt i in., 2014). Jednakże, zgodnie z wypracowanymi w niniejszym modelu charakterystykami etapów badań, rozwoju i testowania, każdy z nich posiada rozłączne cele.

Kolejny etap, scharakteryzowany w ramach modelu to etap wprowadzenia na rynek. Jego podstawą jest wytworzenie nowych produktów i możliwe dostosowanie obecnego procesu produkcyjnego, a także wprowadzenie ich na rynek. W niniejszym modelu poprzez wprowadzenie produktów spożywczych na rynek rozumie się efekt ciągu realizacji powiązanych działań, w tym przygotowanie planu wprowadzenia na rynek, a następnie produkcję, pakowanie, marketing i dystrybucję nowego produktu (Chaochotechuang i Mariano, 2016; Franzò i in., 2021). Jak wskazuje się w literaturze, wprowadzenie produktu spożywczego na rynek wymaga, aby produkt uzyskał ostateczną formę, opracowany został kompletny plan produkcyjny i marketingowy, a także przeprowadzone zostały działania sprzedażowe (Bogue i in., 2017; Franzò i in., 2021; Oliveira i Cardoso, 2021). **Na rynku spożywczym nierzadko konieczne może być dostosowanie technologii produkcji, do wymagań nowego produktu** (Busse i Siebert, 2017). Na bazie literatury z zakresu rozwoju innowacji produktowych należy wskazać, że etap ten wymaga zaangażowania wysokich nakładów, co jest pochodną konieczności stworzenia zdolności produkcyjnych (jeżeli wymagana jest inna technologia wytwarzania niż w przypadku obecnych produktów), organizacji produkcji prowadzonej na dużą skalę, organizacji zaopatrzenia na dużą skalę, wypracowania/dostosowania stosowanych narzędzi marketingowych oraz kanałów dystrybucji (Bernstein i Singh, 2006; Verloop, 2004). Na tym etapie występuje też realna konfrontacja z rynkiem, podczas której weryfikowana jest akceptacja produktu wśród konsumentów (Franzò i in., 2021). Część modeli dedykowanych dla rynku spożywczego postuluje przy tym łączenie etapu testowania z etapem wprowadzenia na rynek (Durst i in., 2018). Pomimo tego, charakterystyka poszczególnych etapów opracowana w ramach niniejszego modelu wskazuje, iż każdy z nich posiada

oddzielne cele, a tym samym ich rozdzielenie zapewnia możliwość dokładniejszej prezentacji procesu rozwoju nowego produktu spożywczego.

Ostatnim etapem, który stanowi element składowy modelu rozwoju nowych produktów spożywczych jest etap monitorowania. Podstawą tego etapu jest zdobywanie doświadczenia, rejestrowanie danych jakościowych i ilościowych oraz wykonywanie analiz w celu poszerzenia bazy wiedzy firmy. Etap ten następuje po wprowadzeniu produktu na rynek i w praktyce oznacza monitorowanie pozycji produktu na rynku oraz czerpanie z tej obserwacji wiedzy, która może być podstawą dalszych modyfikacji produktu, bądź rozwoju zupełnie nowych produktów (Jagtap i in., 2020). Na bazie literatury z zakresu zarządzania rozwojem innowacji można stwierdzić wprost, iż celem monitorowania jest promowanie uczenia się na bazie własnych doświadczeń (Vitezić i Vitezić, 2015). Jednocześnie etap ten stanowi ostatni element modelu, gdyż zamyka cały cykl następujących po sobie części w ten sposób, że zasila poprzednie etapy doświadczeniami zebranymi po wprowadzeniu produktu na rynek. Dzięki wiedzy zebranej w trakcie monitorowania zasila się etap generowania pomysłu, a także udoskonala się etapy selekcji pomysłu, badań, rozwoju, testowania oraz samego wprowadzenia na rynek. Co więcej, etap wprowadzenia na rynek nie powinien zamykać procesu (Durst i in., 2018), gdyż nawet po wprowadzeniu produktu do obrotu może on ulegać dalszym modyfikacjom np. na bazie informacji zwrotnej płynącej od konsumentów. W takiej sytuacji, nawet po wprowadzeniu produktu na rynek, istnieje możliwość powrotu do wcześniejszych etapów procesu, np. do rozwoju, a następnie testowania. Do najważniejszych zadań, jakie w praktyce realizuje się na tym etapie, należy porównanie z planem wprowadzenia produktu na rynek, identyfikacja określonych odchyleń od planu i ich przyczyn, a także ocena zgodności efektów wprowadzenia na rynek z celami strategicznymi przedsiębiorstwa (Vitezić i Vitezić, 2015; Zizlavsky, 2013).

Wyodrębnienie osobnego etapu, który następuje po wprowadzeniu produktu na rynek jest podejściem stosunkowo rzadko spotykanym w opracowaniach poświęconych rozwojowi nowych produktów na rynku spożywczym (Durst i in., 2018; Jagtap i in., 2020). Aczkolwiek, jak wskazano uprzednio, o kształcie niniejszego modelu decydowały przesłanki merytoryczne, a nie częstotliwość powtórzeń danych etapów w poszczególnych analizowanych artykułach. W niniejszym modelu, ze względu na odrębny sposób określenia celów tego etapu został on wyraźnie wyodrębniony.

Podsumowując, opracowany model rozwoju nowych produktów spożywczych przyjmuje perspektywę procesową opartą na logice sekwencyjnej, co oznacza, iż w celu rozwoju nowego produktu spożywczego należy zrealizować sekwencję czynności, które można wyodrębnić. W związku z tym, niniejszy model wyodrębnia siedem wyróżniających się etapów: generowanie pomysłów, selekcję pomysłów, badania (podstawowe i stosowane), rozwój, testowanie, wprowadzenie na rynek oraz monitorowanie.

2.4. Zarządzanie projektem a rozwój nowego produktu spożywczego

Rozwój nowych produktów spożywczych, w szczególności produktów funkcjonalnych bazujących na zaawansowanej technologii wytwórczej, jest przedsięwzięciem zarówno kosztownym, czasochłonnym, jak również charakteryzującym się wysokim ryzykiem niepowodzenia. Czynniki te są nierozdzielnie związane z procesem rozwoju nowych produktów. Jednakże, przedsiębiorstwa mogą minimalizować ryzyko niepowodzenia poprzez wdrożenie działań związanych z właściwym i efektywnym zarządzaniem procesem rozwoju nowego produktu spożywczego (Boroń, 2010; Pinna i in., 2018).

Zarządzanie powinno stworzyć optymalne warunki umożliwiające efektywną integrację wiedzy z różnych obszarów działalności przedsiębiorstwa. Niemniej jednak rozwój innowacji produktowych nie jest domeną wyłącznie zarządzania. Wiedza na temat technologii wytwarzanych produktów spożywczych powinna obejmować znajomość nauk o żywności, która w takim przypadku jest kluczowa dla powodzenia całego procesu. Zasadniczo, kompleksowa strategia zarządzania koncentrująca się na rozwoju nowego produktu spożywczego powinna obejmować następujące kwestie (Moskowitz i in., 2009):

- strategię firmy uwzględniającą z jakimi typami produktów i rynków jest ona związana,
- cele w zakresie innowacji uwzględniające rozwój produktów i procesów oraz portfolio rozwiązań technologicznych i technicznych przedsiębiorstwa,
- zarządzanie organizacyjne obejmujące bieżące prowadzenie procesu produkcyjnego.

W przypadku rozwoju nowego produktu prawidłowe działania zarządcze są skoncentrowane na kierowaniu procesem – niejednokrotnie traktując całe postępowanie jako spójny projekt, określając jednocześnie cele, tworząc odpowiednią strukturę organizacyjną, zapewniając zasoby oraz podejmując kluczowe decyzje (Earle i in., 2001). Z uwagi na fakt, że w niniejszej rozprawie zaprezentowano sekwencyjne podejście do rozwoju nowego produktu spożywczego, warto zwrócić uwagę, że cały ten proces może być efektywnie prowadzony poprzez wykorzystanie zarządzania projektem. Należy podkreślić, że pod pojęciem projektu, rozumie się proces rozwoju nowego produktu spożywczego (np. fermentowanego soku z jarmużu zielonego). Jest to przedsięwzięcie zamknięte w określonych ramach czasowych (posiada określony początek i koniec), którego nadrzędnym celem jest stworzenie unikatowego produktu.

Teoria i praktyka zarządzania projektami dostarczyła wielu praktycznie stosowanych metodologii służących efektywnemu zarządzaniu projektem. Podejście to stanowi zbiór metod, technik, procedur bądź też najlepszych praktyk itp. stosowanych w projekcie. Jest on zwykle oparty na określonym podejściu do zarządzania projektem, które definiuje zbiór zasad i wytycznych określających sposób zarządzania projektem (Spundak, 2014). Poniższe metodyki są głównie proponowane przez krajowe lub międzynarodowe stowarzyszenia zarządzania projektami, a także przez niektóre organizacje i instytucje. Niektóre z najbardziej znanych metodyk są następujące: PMBOK (ang. *Project Management Body of Knowledge*), IPMA (ang. *The International Project Management Association*), PRINCE2 (ang. *PRojects*

IN Controlled Environments), YUPMA (ang. *The Serbian Project Management Association – YUPMA*), APM (ang. *Association of Project Management*) oraz HBS (ang. *Harvard Business School*) (Jovanovic i Beric, 2018). Jednakże, jednym z najczęściej przywoływanych w literaturze i stosowanych w praktyce podejść do zarządzania projektem jest to zaprezentowane w podręczniku PMBOK opracowane przez specjalistów z Project Management Institute. W związku z tym w niniejszym podrozdziale rozważania będą koncentrować się właśnie na tym podejściu. Standardy przedłożone w tym podręczniku charakteryzuje uniwersalny charakter oraz możliwość ich zastosowania w wielu procesach z różnych sektorów gospodarczych, np. w procesie rozwoju nowego produktu spożywczego (Project Management Institute, 2008).

Zarządzanie projektem jest przedstawione jako zastosowanie wiedzy, umiejętności, narzędzi i technik w działaniach projektowych w celu spełnienia wymagań projektu. Podejście to opiera się w szczególności na (Project Management Institute, 2008):

- określeniu wymagań projektu;
- uwzględnianiu różnych potrzeb, problemów i oczekiwań interesariuszy w trakcie planowania i realizacji projektu;
- równoważeniu konkurujących ze sobą ograniczeń projektu, w tym między innymi: zakresów planowanych prac, kwestii jakości, organizacji harmonogramu, określeniu budżetu, zasobów oraz ryzyka.

W podręczniku PMBOK, zarządzanie projektem jest realizowane poprzez odpowiednie zastosowanie i integrację 42 logicznie pogrupowanych procesów zarządzania projektem, które wchodzą w skład 5 głównych grup: 1. Inicjowania, 2. Planowania, 3. Wykonywania, 4. Monitorowania i kontrolingu oraz 5. Zamknięcia. Ponadto, metodyka ta, proponuje zarządzanie projektem w oparciu o dziesięć istotnych obszarów wiedzy (Jovanovic i Beric, 2018; Project Management Institute, 2008):

3. **zarządzanie integracją projektu**, które obejmuje procesy i działania mające na celu identyfikację, łączenie, ujednolicanie i koordynowanie różnych procesów i działań związanych z zarządzaniem projektem w ramach grup procesów zarządzania projektem;
4. **zarządzanie zakresem projektu**, które obejmuje procesy wymagane w celu zapewnienia, że projekt uwzględnia wszystkie prace niezbędne do pomyślnego zakończenia projektu;
5. **zarządzanie czasem**, które obejmuje procesy związane z określaniem aspektów czasowych projektów oraz procesy wymagane do zarządzania terminowym ukończeniem projektu;
6. **zarządzanie kosztami** dotyczy procesów związanych z planowaniem kosztów projektu, budżetowaniem, finansowaniem i kontrolą w celu ukończenia projektu w ramach zatwierdzonego budżetu;
7. **zarządzanie jakością**, które obejmuje procesy, umożliwiające ukończenie projektu zgodnie z wymaganą jakością i zaspokojenie potrzeb, dla których został podjęty;

8. **zarządzanie zasobami ludzkimi**, obejmujące procesy, które organizują, zarządzają i kierują zespołem projektowym;
9. **zarządzanie komunikacją** dotyczy gromadzenia i wykorzystywania wszystkich informacji związanych z realizacją projektu;
10. **negocjacje w zarządzaniu zaopatrzeniem**, które obejmuje procesy związane z zaopatrzeniem i zakupem materiałów i produktów niezbędnych do realizacji projektu;
11. **zarządzanie ryzykiem**, które obejmuje procesy związane z planowaniem zarządzania ryzykiem, identyfikacją, analizą, planowaniem reakcji na ryzyko oraz kontrolą ryzyka w projekcie;
12. **zarządzanie interesariuszami projektu** obejmuje procesy wymagane do identyfikacji i analizy interesariuszy, ich oczekiwań, a także do opracowania odpowiednich strategii zarządzania w celu efektywnego zaangażowania interesariuszy w podejmowanie decyzji i realizację projektu.

W niniejszej pracy dotyczącej rozwoju nowego produktu spożywczego w oparciu o fermentowany sok z jarmużu powyższe obszary wiedzy mogłyby zostać wykorzystane w efektywnym zarządzaniu projektem, który umożliwiłby sukces rynkowy prezentowanego produktu. W tabeli 5 zaprezentowano przykłady wykorzystania obszarów wiedzy zarządzania w rozwoju nowego produktu ze szczególnym uwzględnieniem aspektów laboratoryjnych.

Tabela 5. Zarządzanie projektem na przykładzie nowego produktu spożywczego (fermentowanego soku z jarmużu)

L.p.	Obszar wiedzy	Przykłady wykorzystania w rozwoju nowego produktu spożywczego
1.	Zarządzanie integracją projektu	Integracja procesów oraz różnych grup zaangażowanych w tworzenie nowego produktu spożywczego (naukowców, menadżerów) na różnych etapach i płaszczyznach (generowanie pomysłów, badania, rozwój, monitorowanie).
2.	Zarządzanie zakresem projektu	Ustalenie zakresu badań laboratoryjnych niezbędnych do potwierdzenia właściwości prozdrowotnych fermentowanego soku z jarmużu, np. określenie właściwości probiotycznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej, określenie zawartości składników bioaktywnych tj. związki fenolowe, witaminy, glukozytolany.
3.	Zarządzanie czasem	Terminowość prowadzonych badań laboratoryjnych. Ustalenie buforu czasowego dla tychże badań, z uwagi na ryzyko niepowodzeń bądź niezbędnych powtórek badań
4.	Zarządzanie kosztami	Zarządzanie kosztami dotyczącymi: zakupu odczynników, drobnego sprzętu laboratoryjnego (np. eppendorfów, płytek Petriego, probówek typu Falcon), zlecenie badań/analiz instytucjom zewnętrznym.
5.	Zarządzanie jakością	Wdrożenie procedur i systemów zarządzania jakością i bezpieczeństwem żywności np. Dobra Praktyka Wytwarzania (ang. <i>Good Manufacturing Practice - GMP</i>), Dobra Praktyka Higieniczna (ang. <i>Good Higenic Practice – GHP</i>), system HACCP (ang. <i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>), norma ISO 9001).
6.	Zarządzanie zasobami ludzkimi	Kierowanie i zarządzanie pracą zespołu badawczego.

7.	Zarządzanie komunikacją	Odpowiednie archiwizowanie, interpretacja danych związanych z prowadzonymi analizami. Przekazywanie istotnych informacji dotyczących produktu pomiędzy różnymi zaangażowanymi grupami (np. od naukowców do menadżerów).
8.	Negocjacje w zarządzaniu zaopatrzeniem	Wyszukiwanie i porównywanie ofert różnych dostawców. Poszukiwanie m.in. odczynników, sprzętu o porównywalnej jakości jednakże w niższej cenie.
9.	Zarządzanie ryzykiem	Ocena ryzyka związana z narażeniem zespołu badawczego na szkodliwe odczynniki chemiczne (np. metanol, kwas solny), mikroorganizmy chorobotwórcze (np. <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. aureus</i>) oraz możliwość wystąpienia wypadku.
10.	Zarządzanie interesariuszami projektu	Identyfikacja wszystkimi osobami, które są zaangażowane w tworzeniu projektu.

Źródło: opracowanie własne

Zarządzanie projektem jest podejściem wnikliwym, złożonym oraz wieloetapowym, które angażuje różne grupy (np. naukowców, menadżerów, zarząd) na wielu płaszczyznach rozwoju nowego produktu (np. generowanie pomysłu, badania, rozwój lub wprowadzenie na rynek). Wszystkie te starania są niezbędne, aby produkt mógł zostać wprowadzony na rynek w konkretnych ramach czasowych oraz za sprecyzowanymi nakładami finansowymi.

Podsumowanie

W niniejszym rozdziale rozprawy doktorskiej zaprezentowano wymagania wstępne dotyczące wprowadzania nowych produktów na rynek spożywczy w realiach polskich oraz europejskich. Skoncentrowano się również na wyjaśnieniu istotnych różnic w nomenklaturze pomiędzy mikroorganizmami probiotycznymi, żywnością fermentowaną a probiotyczną żywnością fermentowaną i przedstawiono wymagania dotyczące określania właściwości probiotycznych mikroorganizmów. Następnie, w sposób syntetyczny omówiono koncepcje rozwoju nowych produktów z uwzględnieniem roli płynącej od potencjalnych konsumentów. W oparciu o systematyczne studia literaturowe przedstawiono autorski model rozwoju nowego produktu spożywczego. Jego elementy posłużyły w niniejszej rozprawie doktorskiej do przeprowadzenia analiz empirycznych fermentowanego soku z jarmużu zielonego z wykorzystaniem autochtonicznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. W ostatnim podrozdziale zaprezentowano możliwość efektywnego zarządzania procesem rozwoju nowego produktu na bazie podejścia projektowego.

3. Metodyka badawcza

Niniejszy rozdział posłużył zaprezentowaniu metod i źródeł wykorzystanych w badaniach empirycznych. W pierwszej kolejności zaprezentowano cele, hipotezy badawcze oraz zakres badań. Następnie zaprezentowano materiał badawczy, odczynniki, podłoża mikrobiologiczne i mikroorganizmy wskaźnikowe, które stanowiły podstawę dla badań laboratoryjnych. Kolejno zaprezentowano metody badawcze (zarówno konsumenckie, laboratoryjne oraz statystyczną analizę danych) wykorzystane w pracy.

3.1. Cele, hipotezy badawcze i zakres badań

Proces rozwoju nowego produktu spożywczego, jak już wspomniano, jest złożony i wieloetapowy. Uwzględnia oczekiwania rynku, preferencje konsumentów, aktualne trendy, a z drugiej strony wykorzystuje możliwości przedsiębiorstwa oraz liczne badania laboratoryjne. Tworząc nowy produkt fermentowany charakteryzujący się właściwościami funkcjonalnymi, należy wziąć pod uwagę wiele aspektów, między innymi możliwość kształtowania jakości produktu (np. zawartości różnych związków bioaktywnych) za pomocą różnych mikroorganizmów o potencjale probiotycznym oraz badań konsumenckich nakreślających charakter produktu.

W związku z tym, żeby ukierunkować prowadzone prace, w rozprawie sformułowano następujący problem badawczy: **W jaki sposób fermentacja mlekowa kształtuje wybrane właściwości prozdrowotne soku z jarmużu zielonego?** W nawiązaniu do określonego problemu badawczego w pracy sformułowano cel główny badań: **Zaprojektowanie i rozwój prototypu nowego produktu spożywczego poprzez fermentację soku z jarmużu przy użyciu wyselekcjonowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej.** W uzupełnieniu do celu głównego sformułowano następujące cele szczegółowe (CS), które przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej

L.p.	Cel szczegółowy (CS)	Odniesienie w rozprawie
CS 1	Wypracowanie modelowego podejścia do rozwoju nowych produktów spożywczych.	Rozdział 2, podrozdział 2.3.
CS 2	Ustalenie zachowań polskich konsumentów dotyczących niemlecznych produktów fermentowanych.	Rozdział 4, podrozdział 4.1.1.
CS 3	Określenie wybranych właściwości prozdrowotnych soku z jarmużu zielonego poddanego fermentacji spontanicznej.	Rozdział 4, podrozdział 4.2.1
CS 4	Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z mikrobioty jarmużu zielonego podczas kolejnych etapów fermentacji spontanicznej.	Rozdział 4, podrozdział 4.2.2
CS 5	Charakterystyka potencjału probiotycznego oraz molekularna identyfikacja wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej.	Rozdział 4, podrozdział 4.2.2
CS 6	Opracowanie prototypów fermentowanych soków z jarmużu zielonego.	Rozdział 4, podrozdział 4.3.1
CS 7	Określenie wpływu fermentacji z wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów bakterii na wybrane parametry fizykochemiczne, właściwości odżywcze i prozdrowotne kiszzonego soku wytworzonego na bazie jarmużu zielonego.	Rozdział 4, podrozdział 4.3.2

Źródło: opracowanie własne

W oparciu o analizę danych literaturowych sformułowano hipotezy badawcze, które przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Hipotezy główne oraz cząstkowe pracy doktorskiej

L.p.	Hipotezy główne (H)	Odniesienie w rozprawie
H1	Czynniki demograficzne determinują wybory konsumentów w zakresie konsumpcji kiszonych produktów warzywnych.	Rozdział 4, podrozdział 4.1.1.
H2	Spontanicznie fermentowany sok z jarmużu charakteryzuje się wyższą zawartością związków bioaktywnych niż świeży sok.	Rozdział 4, podrozdział 4.2.1
H3	Wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane podczas spontanicznej fermentacji jarmużu zielonego charakteryzują się potencjalnymi właściwościami probiotycznymi.	Rozdział 4, podrozdział 4.2.2
H4	Mikrobiota jarmużu stanowi źródło bakterii fermentacji mlekowej przydatnych jako kultury starterowe do modelowania wybranych właściwości prozdrowotnych fermentowanego soku z jarmużu zielonego.	Rozdział 4, podrozdział 4.3.2
H5	Kontrolowana fermentacja soku z jarmużu pozwala na uzyskanie wyższej zawartości wybranych składników bioaktywnych w porównaniu ze świeżym sokiem i sokiem poddanym spontanicznej fermentacji.	Rozdział 4, podrozdział 4.3.2

Źródło: opracowanie własne

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy zostały podzielone na cztery główne fazy, które odpowiadają modelowej prezentacji etapów rozwoju nowego produktu: 1. Generowanie pomysłu, 2. Selekcja pomysłu, 3. Badania podstawowe i badania stosowane oraz 4. Rozwój produktu. Szczegółowy plan badań przedstawiono na schemacie 5.

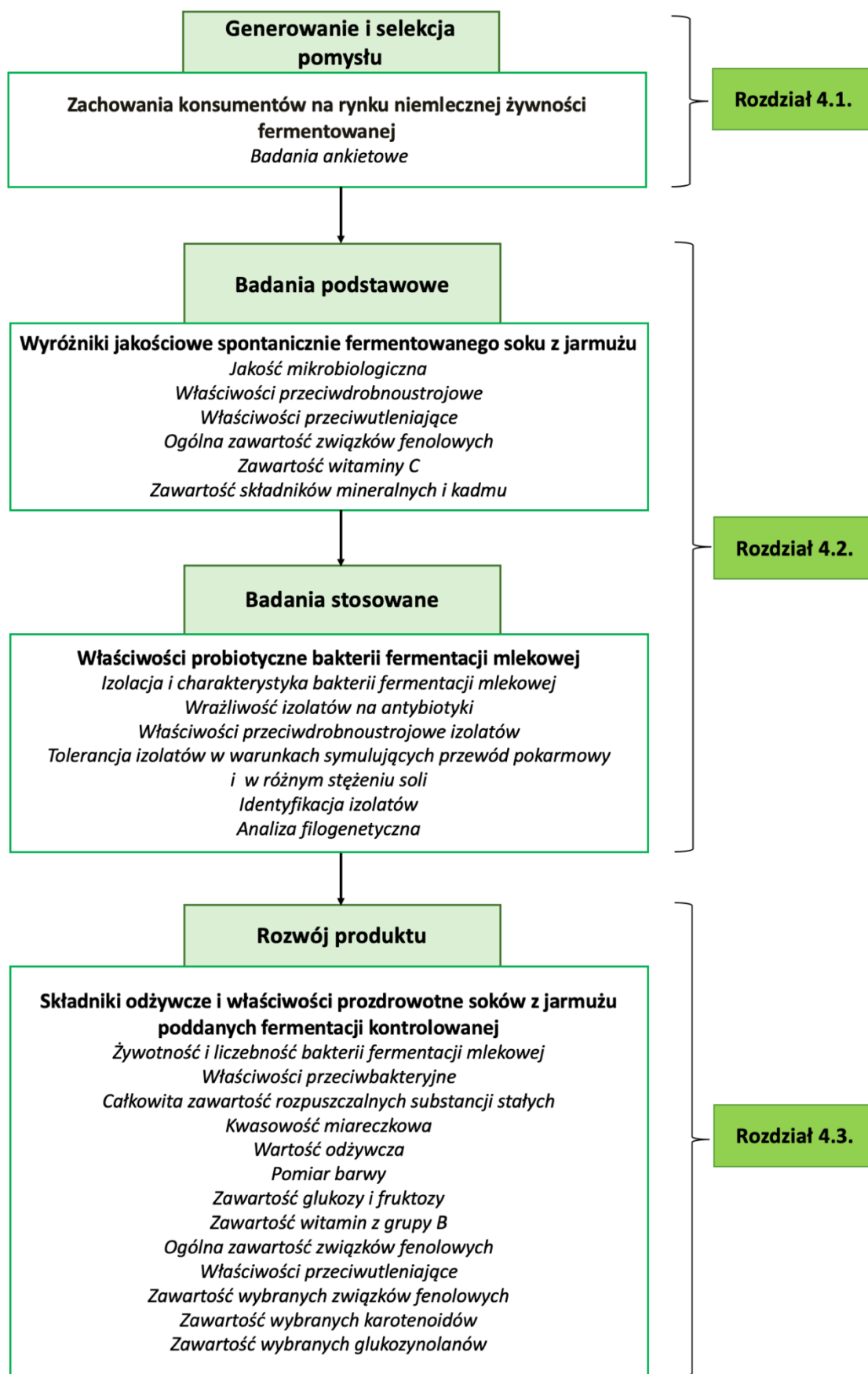
W pierwszej kolejności zbadano wybory żywieniowe konsumentów dotyczące warzywnych produktów fermentowanych. Na wstępie poproszono respondentów o przedstawienie ich wstępnych opinii na temat kiszonych produktów. W dalszej kolejności pytania badawcze obejmowały: częstotliwość zakupu i spożycia, miejsca zakupu, kryteria wyboru oraz identyfikację czynników wpływających na wybory żywieniowe, a także wskazanie przez konsumentów zalet produktów fermentowanych. Kolejno przeprowadzono systematyczny przegląd literatury dotyczącej wpływu bakterii fermentacji mlekowej na właściwości prozdrowotne fermentowanych soków warzywnych i owocowych.

Następnie, przeprowadzono spontaniczną fermentację soku z zielonego jarmużu. Określono jakość mikrobiologiczną oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe badanego materiału przed fermentacją spontaniczną, jak również w trakcie procesu. Ponadto w badaniach skupiono się na oznaczeniu właściwości przeciwutleniających, ogólnej zawartości związków fenolowych, zawartości witaminy C oraz zawartości składników mineralnych i kadmu.

W trzecim etapie badań wyizolowano 80 szczepów bakterii fermentacji mlekowej z soku poddanego fermentacji spontanicznej na różnych etapach procesu. Po wstępnej charakterystyce wyizolowanej mikrobioty, tj. barwieniu metodą Grama, zdolności do produkcji katalazy, przeprowadzono

testy przesiewowe w oparciu o właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec szerokiego spektrum mikroorganizmów wskaźnikowych oraz określono wrażliwość izolatów na 11 wybranych antybiotyków. Z kolei wybrane izolaty badano pod kątem przeżywalności w warunkach symulujących przewód pokarmowy, tj. przy niskim pH 2 i 3, w obecności soli żółciowych oraz w obecności różnych stężeń soli. Równocześnie przeprowadzono izolację genomowego DNA wybranych szczepów i amplifikację genu 16S rRNA (m.in. PCR, elektroforeza), a sekwencjonowanie produktów PCR umożliwiło identyfikację genetyczną izolatów oraz analizę filogenetyczną. Ponadto identyfikacja izolatów przy użyciu spektrometru MALDI-TOF pozwoliła na prześledzenie zmian zachodzących w populacji bakterii fermentacji mlekowej podczas procesu fermentacji spontanicznej oraz potwierdzenie poprawności badań genetycznych.

Konsekwentnie w etapie rozwoju produktu przeprowadzono kontrolowaną fermentację soku z jarmużu z wykorzystaniem wybranych szczepów bakteryjnych (etap 4). Badania obejmowały: oznaczenie wartości odżywczej; zawartość witamin z grupy B (witaminy B2 i B6); żywotność i liczebność bakterii fermentacji mlekowej; właściwości przeciwdrobnoustrojowe, wybrane parametry fizykochemiczne (m.in. kwasowość miareczkową, całkowitą zawartość rozpuszczalnych substancji stałych, pH oraz analizę zmian barwy). Zbadano również właściwości przeciwutleniające oraz ogólną zawartość związków fenolowych. Ponadto przeanalizowano zmiany w zawartości i profilu wybranych związków fenolowych, karotenoidów i glukozyolanów.



Rysunek 5. Schemat procesu badawczego

Źródło: opracowanie własne

3.2. Materiał badawczy, odczynniki, mikroorganizmy wskaźnikowe

3.2.1. Materiał badawczy

Świeży, pakowany, poszatkowany jarmuż zielony (12 kg) (*Brassica oleracea L. var. acephala L.*) zakupiono w różnych sklepach na terenie Poznania. Przed eksperymentem, jarmuż umyto wodą demineralizowaną (Hydrolab System, Wiślina, Polska) i pozostawiono do wyschnięcia na 3 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie uzyskano sok z jarmużu przy użyciu wyciskarki wolnoobrotowej (Hurom, Korea Południowa).

3.2.2. Odczynniki do analiz instrumentalnych

- Do oznaczenia TPC użyto odczynnika Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Niemcy) i 20% węgla sodu (POCH, Polska), a kwas galusowy (Sigma Aldrich, Niemcy) stanowił odniesienie.
- Do oznaczania TEAC użyto kation rodnikowy ABTS*+ wytworzony przy użyciu soli dwuamonowej ABTS (kwas 2,2'-azino-bis[3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy]) (Roche, Niemcy) i nadsiarczanu potasu (Fluka, Szwajcaria). Trolox (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksyłowy) (Sigma Aldrich, Niemcy) zastosowano jako wzorzec.
- Do oznaczenia zawartości witaminy C użyto treo-1,4-dimerkapto-2,3-butanodiolu (DDT) i kwasu askorbinowego firmy Merck (Niemcy).
- Do oznaczenia zawartości witamin z grupy B użyto chlorowodoru pirydoksyny (witamina B₆) (Fluka, Szwajcaria) oraz ryboflawiny (witamina B₂) (Sigma, Stany Zjednoczone).
- Do analizy zawartości składników mineralnych i kadmu użyto 65% kwasu azotowego Suprapur® firmy Merck (Niemcy).
- Do analizy zawartości karotenoidów użyto metanol klasy HPLC (Chempur, Polska); KOH w metanolu (Merck, Niemcy); acetonu i eteru naftowego (POCH, Polska); acetonitrylu i octanu etylu do HPLC (gradient grade) (Sigma Aldrich, Niemcy).
- Do analizy zawartości związków fenolowych użyto acetonitrylu i kwasu octowego (Sigma Aldrich, Niemcy) oraz octanu sodu (Chempur, Polska).
- Do analizy zawartości GLS użyto acetonitrylu (Sigma Aldrich, Niemcy) i glukotropianolu (Roth, Niemcy).

3.2.3. Odczynniki do analiz mikrobiologicznych

- Do izolacji DNA genomowego z komórek bakterii fermentacji mlekowej wykorzystano gotowy zestaw do izolacji DNA z komórek bakterii - Genomic Mini AX Bacteria+ (Spin) (A&A Biotechnology, Polska).
- Do przeprowadzenia PCR użyto gotowego zestawu: 2xPCR Master Mix Plus (Składniki: Taq DNA polimeraza 0,1U/μl; MgCl₂ 4mM; dNTPs: dATP 0,5 mM, dCTP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM, dTTP 0,5 mM;

stabilizatory, czerwony barwnik, bufor obciążający) (A&A Biotechnology, Polska) oraz starterów 1492r i S-D-Bact-0008 (Future Synthesis, Polska).

- Do wykonania rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach agarozowych i do przygotowania żeli użyto agarozę, Tris, EDTA (Bioshop, Kanada); kwas borowy (POCH, Polska); wzorzec długości fragmentów DNA Nova 100bp DNA lader (Novazym, Polska) oraz barwnik MIDORI GREEN (ABO, Polska).

3.2.4. Mikroorganizmy wskaźnikowe

Przed wykonywaniem badań przeciwdrobnoustrojowych mikroorganizmy wskaźnikowe były przechowywane w fiolkach kriogenicznych Microbank® (ProLab, Kanada) w temperaturze -22°C. Szczepy pochodziły z kolekcji ATCC (ang. *American Type Culture Collection*) oraz PCM (ang. *Polish Collection of Microorganisms*, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN). Przed wykonaniem badań dotyczących właściwości przeciwdrobnoustrojowych izolatów bakterii fermentacji mlekowej oraz soków z jarmużu (świeżego i kiszzonego), mikroorganizmy namnażano na dedykowanym podłożu i inkubowano przez 24 godziny w odpowiednich warunkach. Szczegółowe informacje dotyczące mikroorganizmów wskaźnikowych przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wykaz mikroorganizmów wskaźnikowych wraz z warunkami inkubacji i zastosowanym podłożem agarowym

L.p.	Mikroorganizm	Warunki inkubacji (temperatura/atmosfera)	Podłoże mikrobiologiczne
Bakterie Gram-dodatnie			
1.	<i>Bacillus subtilis</i> PCM 2027	37°C/tlenowa	Standards Methods (Plate Count Agar) (Biomaxima, Polska)
3.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33862™	37°C/tlenowa	
2.	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 1911™	37°C/tlenowa	Brain Heart Infusion (Biomaxima, Polska)
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	37°C/tlenowa	
5.	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 4698™	30°C/tlenowa	Trypticasein Soy Agar (Biomaxima, Polska)
6.	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC® 13124™	37°C/beztlenowa	
Bakterie Gram-ujemne			
7.	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218™	37°C/tlenowa	Standards Methods (Plate Count Agar) (Biomaxima, Polska)
11.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027™	37°C/tlenowa	
12.	<i>Proteus vulgaris</i> PCM 542	37°C/tlenowa	
8.	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC® 33291™	37°C/względnie beztlenowa	Brain Heart Infusion (Biomaxima, Polska)
9.	<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis ATCC® 13076™	37°C/tlenowa	
10.	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC® 9610™	30°C/tlenowa	
Drożdże			
13.	<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	37°C/tlenowa	Sabouraud Dextrose with chloramphenicol Agar (Oxoid, Kanada)

Źródło: opracowanie własne

3.2.5. Podłoża mikrobiologiczne

Pożywki stosowane w doświadczeniach obejmowały gotowe podłoża suche pochodzące z firm Biomaxima² (Polska) i Oxoid (Kanada). Wszystkie pożywki przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta i w zależności od zaleceń sterylizowano w autoklawie w 121°C lub doprowadzono do wrzenia (tabela 9).

Tabela 9. Charakterystyka podłoży mikrobiologicznych

L.p.	Podłoże mikrobiologiczne	Charakterystyka
1.	Standards Methods (Plate Count Agar) (Biomaxima, Polska)	Pożywka do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów w próbkach żywności i innych zgodnie z normą ISO 4833-2.
2.	Sabouraud Dextrose with chloramphenicol Agar (Oxoid, Kanada)	Pożywka do namnażania i izolacji drożdży i pleśni.
3.	Slanetz and Bartley Agar (Biomaxima, Polska)	Pożywka do oznaczania liczby enterokoków w próbkach żywności. Skład zgodny z normą ISO 7899-2.
4.	Mannitol Salt acc.to Chapman (Biomaxima, Polska)	Selektywna pożywka do izolacji gronkowców z produktów kosmetycznych i innych.
5.	Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid, Kanada)	Selektywna pożywka do wykrywania i oznaczania liczby bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> w próbkach żywności i innych. Skład zgodny z normami ISO 21528.
6.	TBX Tryptone Bile X-glucuronide (Biomaxima, Polska)	Agar TBX do oznaczania liczby β-glukuronidazo-dodatnich <i>Escherichia coli</i> w próbkach żywności i innych. Skład zgodny z normą ISO 16649.
7.	Brilliance Salmonella Agar Base (Oxoid, Kanada)	Selektywne podłoże do wstępnej identyfikacji i różnicowania gatunków <i>Salmonella</i> .
8.	MRS Agar (Biomaxima, Polska)	Selektywna pożywka agarowa do izolacji bakterii kwasu mlekowego.
9.	MRS Broth (Biomaxima, Polska)	Selektywna pożywka bulionowa do izolacji bakterii kwasu mlekowego.
10.	Brain Heart Infusion (Biomaxima, Polska)	Wysoce odżywczy agar do izolacji drobnoustrojów patogennych o różnych wymaganiach odżywczych
11.	Trypticasein Soy Agar (Biomaxima, Polska)	Agar tryptozowo-sojowy do hodowli drobnoustrojów o szczególnych wymaganiach wzrostowych.
12.	Trypticasein Soy Broth (Biomaxima, Polska)	Bulion tryptozowo-sojowy do hodowli drobnoustrojów o szczególnych wymaganiach wzrostowych.
13.	Mueller Hinton Broth (Biomaxima, Polska)	Pożywka do oznaczania wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki i sulfonamidy metodą mikrorozcieńczeń w bulionie.

Źródło: opracowanie własne na podstawie informacji od producenta Biomaxima i Oxoid

3.3. Metodyka badawcza

3.3.1. Badania ankietowe

Przedmiot badań stanowiły zachowania konsumentów na rynku spożywczym, w tym w szczególności ustalenie zachowań polskich konsumentów dotyczących niemlecznych produktów fermentowanych. Pomiaru dokonano w okresie od kwietnia do maja 2019 r. wśród osób dorosłych. W procesie zbierania danych ze źródeł pierwotnych zastosowano metodę badań ankietowych. Dane zbierano przy

² Producent zmienił nazwę z Biocorp na Biomaxima

wykorzystaniu nowoczesnych technologii, tj. za pośrednictwem specjalnego oprogramowania dedykowanego prowadzeniu badań ankietowych w Internecie oraz wywiadów bezpośrednich.

Do zbierania informacji wykorzystano specjalnie w tym celu skonstruowany kwestionariusz (załącznik 1). Instrument pomiarowy został podzielony na trzy części. Każda z nich zawierała zarówno pytania zamknięte jak i otwarte. Pierwsza część kwestionariusza stanowiła wprowadzenie i koncentrowała się na ogólnych informacjach dotyczących konsumpcji owoców, warzyw i przetworów, tj.:

- Częstotliwości spożycia owoców, warzywa lub ich przetworów;
- Miejsca zakupu owoców, warzywa lub ich przetworów;
- Częstotliwości spożycia konkretnych owoców, warzywa lub ich przetworów.

Druga część narzędzia pomiarowego zawierała przede wszystkim pytania dotyczące fermentowanych produktów warzywnych, z rozróżnieniem na fermentowane soki warzywne i fermentowane przetwory. Pytania w tej części obejmowały następujące zagadnienia:

- Pierwsze skojarzenie dotyczące "warzywnych produktów fermentowanych";
- Postrzegane zalety warzywnych produktów fermentowanych;
- Częstotliwość zakupu fermentowanych soków warzywnych;
- Miejsce zakupu fermentowanych soków warzywnych;
- Miejsce zakupu innych fermentowanych produktów warzywnych;
- Częstotliwość spożycia konkretnych fermentowanych przetworów warzywnych;
- Częstotliwość spożycia konkretnych fermentowanych soków warzywnych;
- Kryteria wyboru fermentowanych soków warzywnych;
- Kryteria wyboru innych fermentowanych produktów warzywnych;
- Faktu, jakie kiszzone produkty warzywne zostały zakupione przez respondenta w ciągu ostatniego miesiąca.

Z kolei w trzeciej części zawarto pytania dotyczące konkretnie soków fermentowanych. Pytania zawarte w tej części odnosiły się do takich zagadnień jak:

- Określenie czy oferta dostępnych na rynku kiszonych soków warzywnych jest satysfakcjonująca;
- Wady i zalety warzywnych soków fermentowanych;
- Źródła, z którego respondent czerpie wiedzę na temat kiszonych soków warzywnych;
- Faktu, czy respondent zapoznaje się z informacją zamieszczoną na opakowaniu kiszonych soków warzywnych;
- Faktu, na jakie informacje na opakowaniu kiszonych soków warzywnych respondent zwraca uwagę.

W uzupełnieniu dla pytań merytorycznych, kwestionariusz zawierał metrykę. W skład metryki weszły cztery pytania dotyczące: płci, wieku, statusu materialnego oraz miejsca zamieszkania respondenta. Pełen kwestionariusz zawarto w załączniku do niniejszej rozprawy.

Przed realizacją badania, kwestionariusz został przetestowany w badaniu pilotażowym. Badanie to objęło swoim zasięgiem ośmioro respondentów, w tym pracowników Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. W wyniku badań pilotażowych dopracowano brzmienie i zakres wybranych pytań.

Minimalną wielkość próby wyznaczono na dwóch podstawach, po pierwsze skorzystano z wzoru na wielkość próby w populacji nieskończonej. Próbę tę wyznaczono na poziomie 96 obserwacji (poziom ufności 95%, dopuszczalny błąd szacunku 5%). Po drugie, w analizie danych wykorzystano regresję porządkową. Możliwość wykorzystania tego narzędzia zapewnia w przypadku niniejszych badań próba na poziomie minimum 150 obserwacji (do zagadnienia tego odniesiono się szerzej w dalszej części rozdziału). W badaniu wzięło udział 205 dorosłych uczestników, co oznacza, że wymagania względem zakładanej minimalnej wielkości próby została spełniona.

Wśród ankietowanych przeważały kobiety, osoby w przedziale wiekowym 21-30 lat, których status materialny odpowiada średniej krajowej oraz osoby zamieszkujące miasta powyżej 500 tysięcy mieszkańców. Podstawowe dane prezentujące charakterystykę respondentów zawarto w tabeli 10.

Tabela 10. Charakterystyki socjo-demograficzne respondentów (n=205)

	Charakterystyka	Procent respondentów
Płeć	Kobieta	72%
	Mężczyzna	28%
Wiek	od 21 do 30	43%
	od 31 do 40	25%
	od 41 do 50	18%
	od 51 do 60	11%
	powyżej 60	3%
Status materialny	Zdecydowanie poniżej średniej krajowej	10%
	Poniżej średniej krajowej	28%
	Średnia krajowa	30%
	Powyżej średniej krajowej	24%
	Zdecydowanie powyżej średniej krajowej	8%
Miejsce zamieszkania	Tradycyjna wieś	5%
	Wieś przy mieście	11%
	Miasto poniżej 20 tysięcy mieszkańców	9%
	Miasto od 20 do 99 tysięcy mieszkańców	5%
	Miasto od 100 do 199 tysięcy mieszkańców	3%
	Miasto od 200 do 499 tysięcy mieszkańców	10%
	Miasto powyżej 500 tysięcy mieszkańców	57%

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, i Sojkin, 2021)

3.3.2. Badania laboratoryjne - Oznaczenia wybranych wyróżników jakościowych fermentowanego soku

3.3.2.1. Ocena wybranych wyróżników mikrobiologicznych

Ocena jakości mikrobiologicznej surowca i soku

Jakość mikrobiologiczną surowca i soku poddanego spontanicznej fermentacji badano klasyczną metodą płytkową. 10 g jarmużu umieszczano w sterylnych torebkach filtracyjnych typu stomacher (Bag Light 400) z 90 ml buforu fosforanowego soli fizjologicznej i homogenizowano w stomacherze (BagMixer® 400, Interscience, Francja) przez 5 minut. Próbkę soków pobierano w trakcie procesu fermentacji po 2, 4, 6 i 8 dniach, a także po 2 tygodniach przechowywania w temperaturze 4°C. Analizy mikrobiologiczne, podłoża wzrostowe i warunki inkubacji przedstawiono w tabeli 11. Wyniki przedstawiono jako średnią z trzech powtórzeń i wyrażono jako logarytm liczby drobnoustrojów.

Tabela 11. Specyfikacja analiz mikrobiologicznych

Analiza mikrobiologiczna	Podłoża mikrobiologiczne	Warunki inkubacji
Całkowita liczba drobnoustrojów	Standards Methods (Plate Count Agar) (Biomaxima, Polska)	30°C/24 h
Ogólna liczba drożdży i pleśni	Sabouraud Dextrose with chloramphenicol Agar (Oxoid, Kanada)	23°C/7 dni
Enterokoki	Slanetz and Bartley Agar (Biomaxima, Polska)	37°C/24 h
Gronkowce	Mannitol Salt acc.to Chapman (Biomaxima, Polska)	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid, Kanada)	
<i>Escherichia coli</i>	TBX Tryptone Bile X-glucuronide (Biomaxima, Polska)	
<i>Salmonella</i> spp.	Brilliance Salmonella Agar Base (Oxoid, Kanada)	
Bakterie fermentacji mlekowej	MRS Agar (Biomaxima, Polska)	30°C/48 h

Źródło: (Szutowska i in., 2020)

Spontaniczna fermentacja soku z jarmużu

Fermentowany sok z jarmużu przygotowano na drodze spontanicznej fermentacji mlekowej z dodatkiem 1,5% NaCl. Fermentację prowadzono w sterylnych probówkach typu Falcon. Sok fermentowano przez 8 dni w temperaturze pokojowej (21-23°C), a następnie przechowywano przez 2 tygodnie w temperaturze 4°C. Próbkę pobierano w sposób aseptyczny po 2, 4, 6 i 8 dniach fermentacji oraz po 2 tygodniach przechowywania (Szutowska i in., 2020; Szutowska i Gwiazdowska, 2021).

Fermentacja kontrolowana soku z jarmużu

Do przeprowadzenia fermentacji kontrolowanej wykorzystano trzy szczepy bakterii fermentacji mlekowej - *L. plantarum* JS052 (GenBank ID: MT434011), *L. sakei* JS032 (GenBank ID: MT434340) i *L. mesenteroides* JS027 (GenBank ID: MT434342), uzyskane podczas spontanicznej fermentacji soku z jarmużu (Szutowska i Gwiazdowska, 2021). Przed eksperymentem namnażano hodowle bakteryjne w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Hodowle odwirowano (14 000 obr./min, 10 min, 24°C) (Eppendorf 5804R, Niemcy), po czym usunięto supernatant, a biomasę komórkową dodano do pasteryzowanego soku z jarmużu tak, aby uzyskać ostateczną gęstość komórek $8,35 \pm 0,05 \log \text{ jtk/ml}$.

Przed procesem fermentacji próbki soku pasteryzowano w temperaturze 70°C przez 25 minut w łaźni wodnej. Do pasteryzowanego soku (10% v/v) z dodatkiem 2% glukozy, dodawano monokultury lub mieszane kultury bakteryjne:

- *L. plantarum* JS052;
- *L. sakei* JS032;
- wersja A - *L. mesenteroides* JS027, *L. plantarum* JS052 i *L. sakei* JS032 w proporcjach 1:2:2;
- wersja B - *L. plantarum* JS052 i *L. sakei* JS032 w proporcjach 1:1.

Proces fermentacji prowadzono w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Wszystkie fermentacje prowadzono niezależnie w trzech powtórzeniach (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka, i in., 2021).

Określenie żywotności i liczebności bakterii fermentacji mlekowej po przeprowadzeniu kontrolowanej fermentacji soku

Żywotność i liczebności bakterii fermentacji mlekowej po 24 godzinach fermentacji oznaczano metodą seryjnych rozcieńczeń na płytkach Petriego z agarem MRS (Biomaxima, Polska). Płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godzin w warunkach beztlenowych. Wyniki przedstawiono jako średnią z trzech powtórzeń i wyrażono jako logarytm liczby drobnoustrojów.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa soków

Aktywność przeciwdrobnoustrojową świeżego i fermentowanego soku z jarmużu przeprowadzono wobec wybranych mikroorganizmów wskaźnikowych metodą dwukrotnych rozcieńczeń na 96-dołkowych mikroplytkach według Niemczak i in., (2019) z nieznacznymi modyfikacjami. Próbkę soków odwirowywano przy 11 000 obr./min przez 20 minut, a zebrany supernatant użyto do oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Ponadto, ze względu na obecność autochtonicznej mikrobioty w świeżym i dwudniowym soku fermentowanym, próbki przesączono przez sterylny moduł filtracyjny sterowany strzykawką (MILLEX GP, 33 mm, 0,22 μm , Merck Millipore Ltd.). Na 96-dołkowych płytkach titracyjnych przygotowano dwukrotne rozcieńczenia próbek soku. Zakres stężeń na płytce wynosił od

3,13% do 50% w przypadku soków poddanych fermentacji spontanicznej oraz 6,25% do 50% w przypadku soków poddanych fermentacji kontrolowanej. Z 24-godzinnych hodowli przygotowano zawiesiny drobnoustrojów w podłożu o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda. Dla *C. perfringens* zastosowano TSB (Biocorp, Polska); dla *E. coli*, *C. jejuni*, *S. enterica* ser. Enteritidis, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *M. luteus* i *S. aureus* - Mueller Hinton Broth (Biocorp, Polska), a dla *C. albicans* - Sabouraud Dextrose Liquid Medium (Oxoid, Kanada). Do studzienek wprowadzano po 100 µl zawiesiny szczepów, aby uzyskać końcową gęstość hodowli na poziomie 5×10^5 jtk/ml. Kontrolę ujemną stanowiła sterylna pożywka, a kontrolę dodatnią - hodowla bakterii lub drożdży bez substancji hamujących. Mikro płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Dla *C. jejuni* i *C. perfringens* zapewniono beztlenowe warunki inkubacji. Następnie zmierzono gęstość optyczną mikroorganizmów przy długości fali 600 nm, używając spektrofotometru mikro płytkowego BioTek Epoch 2 (Wielka Brytania). Uzyskane wyniki wyrażono jako procent wzrostu względem pozytywnej kontroli (100%). Oznaczono również wartości MIC (minimalne stężenie hamujące), MBC (minimalne stężenie bakteriobójcze) MFC (minimalne stężenie grzybobójcze) dla obu fermentacji.

Izolacja i charakterystyka bakterii fermentacji mlekowej

Izolację bakterii fermentacji mlekowej ze świeżego i fermentowanego soku z jarmużu (w 2, 4, 6 i 8 dniu fermentacji oraz po 2 tygodniach przechowywania) przeprowadzono klasyczną metodą płytkową. Seryjnie rozcieńczone próbki soku posiewano na płytki agarowe MRS i inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godzin w warunkach beztlenowych. Wybierano tylko te kolonie, które wykazywały różnorodną morfologię, przenoszono je na bulion MRS a następnie przeprowadzano posiewy redukcyjne na podłożu agarowym MRS, w celu uzyskania czystych kultur. Wszystkie wybrane izolaty zostały wstępnie scharakteryzowane pod kątem zdolności do wytwarzania katalazy (z użyciem 3% H₂O₂) i barwienia metodą Grama (obserwację preparatów prowadzono w jasnym polu w mikroskopie Leica DM 1000 LED, w powiększeniu 1500x). Osiemdziesiąt izolatów przechowywano w bulionie MRS z dodatkiem 20% glicerolu w temperaturze -22°C (Szutowska i Gwiazdowska, 2021).

Określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych izolatów bakterii

Wyizolowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej przebadano pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i drożdży. Całonocne hodowle bakteryjne badano pod kątem aktywności hamującej metodą dyfuzji studzienkowej. Do studzienek (o średnicy 10 mm) wprowadzono inokulum bakteryjne w ilości około 1×10^8 jtk/ml (100 µl). Płytki inkubowano w odpowiednich warunkach w zależności od wymagań wzrostowych mikroorganizmów wskaźnikowych. Wyniki przedstawiono jako średnią z trzech powtórzeń (Szutowska i Gwiazdowska, 2021).

Określenie wrażliwości izolatów na wybrane antybiotyki

Oznaczenia wrażliwości na antybiotyki wyizolowanych szczepów wykonano metodą dyfuzyjno-krążkową w agarze. Zawiesiny przygotowywano z 24-godzinnych hodowli szczepów bakteryjnych. Gęstość optyczną ustalono na 1,0 w skali McFarlanda. Następnie 1 ml każdego izolatu наносono na płytki agarowe MRS. Próbki inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Wyniki przedstawiano jako średnią z trzech powtórzeń i klasyfikowano jako odporne - R (14 mm), średniowrażliwe - I (15-19 mm) i wrażliwe - S (20 mm) wobec antybiotyków. Interpretację wrażliwości badanych izolatów przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2019).

Do określenia wrażliwości izolatów bakterii fermentacji mlekowej na antybiotyki wykorzystano 11 różnych antybiotyków w postaci gotowych krążków (Oxoid, Wielka Brytania): kanamycyna (30 µg), streptomycyna (300 µg), gentamycyna (10 µg), neomycyna (30 µg), chloramfenikol (30 µg), erytromycyna (15 µg), klindamycyna (2 µg), tetracyklina (30 µg), tetracyklina (30 µg), penicylina G (1.5 IU) oraz wankomycyna (30 µg).

Określenie tolerancji izolatów bakterii w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego (niskie pH i sole żółciowe) i w różnym stężeniu soli

Dwanaście wybranych izolatów bakterii hodowano przez 24 godziny w warunkach beztlenowych (10^8 jtk/ml) na podłożu MRS. Po 2 ml każdej hodowli odwirowano (8 000 obr./min przez 5 min) i dwukrotnie przepłukano w buforze fosforanowym, a następnie zawieszano w świeżym bulionie MRS. Tak przygotowane zawiesiny bakterii wykorzystano do oceny tolerancji wybranych izolatów na NaCl, niski poziom pH i sole żółciowe przy użyciu mikropłytek. Odpowiednie wartości pH podłoża MRS ustalono na poziomie pH 2 i 3 przy użyciu HCl (Sigma Aldrich, Niemcy), a kontrolę ustalono na poziomie pH 6,5. Tolerancję na NaCl badano w obecności 2, 4, 6 i 8% chlorku sodu. Z kolei poziom soli żółciowych (Ox-Bile, Oxoid) ustalono na 1%, 0,5% i 0,25%. A następnie dodawano 100 µl zawiesiny bakteryjnej. Mikropłytki inkubowano przez 24 godziny w 30°C. Pomiary spektrometryczne przeprowadzono przy długości fali 600 nm za pomocą urządzenia BioTek Epoch (Wielka Brytania).

Identyfikacja wybranych izolatów bakterii

80 wyizolowanych szczepów zidentyfikowano metodą spektrometrii mas MALDI-TOF Microflex (Bruker, Niemcy). Widma bakterii porównano z biblioteką referencyjną widm masowych MALDI-TOF BioTyper i NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Wartości indeksu identyfikacyjnego $\geq 2,00$ uznawano za identyfikację o wysokiej wiarygodności, od 1,70 do 1,99 - za identyfikację o niskiej wiarygodności, a od 0,00 do 1,69 - za brak identyfikacji na poziomie gatunku. Badanie zostało przeprowadzone przez Jagiellońskie Centrum Innowacji (Kraków).

Identyfikację molekularną wybranych szczepów bakteryjnych (12 izolatów) przeprowadzono poprzez amplifikację genu 16S rRNA. W pierwszej kolejności wyekstrahowano całkowite DNA genomowe izolatów przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Bacteria+ Spin (A&A Biotechnologia, Polska), zgodnie z protokołem producenta. Następnie przeprowadzono amplifikację genu 16S rRNA metodą PCR z użyciem dwóch uniwersalnych, zdegenerowanych starterów: S-D-BACT-0008 (27F) (5'-AGAGTTGATCCTGCTCAG-3') i 1492r (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') (Leite i in., 2015). Etapy PCR obejmowały: 1. wstępną denaturację w 94°C przez 120 s; 2. 40 cykli składających się z: denaturacji w 94°C przez 30 s, wiązanie primerów w temperaturze 45°C przez 30 s i elongacją w 72°C przez 120 s; oraz 3. cykl końcowy obejmujący denaturację w 95°C przez 30 s, wiązanie primerów w 45°C przez 30 s i elongację w 72°C przez 120 s. Amplikony rozdzielano na 1% (w/v) żelu agarozowym z dodatkiem MIDORI Green (3µl) metodą rozdziału elektroforetycznego. Amplifikowane fragmenty DNA obserwowano w świetle UV (Aplegen Omega Lum G). Sekwencjonowanie nukleotydów wykonała firma Genomed S. A. (Polska). Sekwencje o długości około 1500 pz zostały zredagowane, połączone i wygenerowane w programie GeneDoc 2.700. Następnie przeprowadzono wyszukiwanie sekwencji homologicznych za pomocą algorytmu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Kolejno, nieukorzenione drzewo filogenetyczne zostało skonstruowane w celu określenia najbliższych gatunków bakterii metodą łączenia najbliższych sąsiadów (Saitou i Imanishi, 1989) przy użyciu oprogramowania MEGA X (Kumar i in., 2018).

3.3.2.2. Ocena wybranych wyróżników fizykochemicznych oraz pomiar barwy

Pomiar pH

Do monitorowania zmian wartości pH podczas fermentacji spontanicznej oraz kontrolowanej użyto cyfrowego pH-metru (ThermoScientific™ ORION™ STAR A111 pH Benchtop Meter). Przed odczytami pH-metr kalibrowano przy użyciu roztworów buforowych (pH=4,00, pH=7,00 w temperaturze 23°C).

Oznaczenie całkowitej zawartości rozpuszczalnych substancji stałych

Pomiary zawartości całkowitych rozpuszczalnych substancji stałych (TSS) (°Brix) przeprowadzono za pomocą cyfrowego refraktometru Abbego DR-A1 (Atago, Japonia).

Oznaczenie kwasowości miareczkowej

Kwasowość miareczkową oznaczono miareczkując próbki 0,1 M NaOH do końcowego punktu pH 8,1 zgodnie z normą PN-EN 12147:2000 (Polish Committee of Standardization, 2013) za pomocą automatycznego titratora (TitroLine® 7000, Si Analytics, Niemcy). Wyniki wyrażono w gramach kwasu mlekowego na 100 ml soku (g LA/100 ml).

Spektrofotometryczny pomiar barwy

Parametry barwy soków określono w systemie barw *CIE L*a*b**. Widma transmitancji otrzymano za pomocą spektrofotometru UV-VIS (Jasco V-770, Japonia) wyposażonego w oprogramowanie Spectra Manager™.

3.3.2.3. Oznaczenie wartości odżywczej, składników mineralnych i witamin

Oznaczenie wartości odżywczej

Wszystkie próbki zamrożono w temperaturze -85°C i liofilizowano przy użyciu liofilizatora (Alpha 1-2D). Azot całkowity oznaczono metodą Kjeldahla zgodnie z normą ISO 20483 (ISO, 2013), następnie obliczono zawartość białka (B) przez pomnożenie wyniku przez współczynnik przeliczeniowy 6,25. Zawartość popiołu oznaczono zgodnie z normą ISO 2171 (ISO, 2007) a zawartość tłuszczu całkowitego (T) oznaczono zgodnie z normą AACC 30-25.012. (AACC, 2009). Zawartość węglowodanów (W) obliczono poprzez odjęcie całkowitej zawartości popiołu, tłuszczu, białka i wilgoci od 100%. Wartość energetyczną (E) obliczono według następującego wzoru:

$$E [\text{kcal}/100 \text{ g}] = 4 \times (\text{B} + \text{W}) + 9 \times \text{T}$$

Oznaczenie zawartości fruktozy i glukozy

Zawartość cukrów (fruktozy i glukozy) oznaczono za pomocą HPLC wyposażonego w detektor ELSD (Waters Alliance e2695 Separation Module i Waters 2424 ELS Detector, Waters, Stany Zjednoczone). Świeże i fermentowane soki odwirowywano przy 10 000 obr./min. przez 10 min (MiniSpin plus, Eppendorf, Niemcy). 100 µl supernatantu mieszano z 900 µl wody demineralizowanej i wstrzykiwano na kolumnę. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w temperaturze 35°C, stosując kolumnę Pinnacle II™ Amino (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) (Restek, USA) (Rybicka i Gliszczyńska-Świątło, 2021; Shanmugavelan i in., 2013). Oznaczenia ilościowe przeprowadzono metodą wzorca zewnętrznego, stosując krzywe kalibracyjne w ich zakresie liniowym.

Oznaczenie zawartości składników mineralnych i kadmu

Proces mineralizacji przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Abid i in. (2014). Do 1 ml soku z jarmużu dodano 7 ml 65% HNO₃ i 1 ml H₂O₂. Próbki mineralizowano w piecu mikrofalowym (Mars 6, CEM Corporation, USA) zgodnie z procedurą producenta. Zmineralizowany sok uzupełniano wodą demineralizowaną do 50 ml. Makroelementy: Ca, K, Mg, Na, oraz mikroelementy: Fe, Mn, Zn, Cu oznaczono przy użyciu atomowej spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie mikrofalowej (4210

MP-AES Agilent Technologies, Australia) (Ozbek i Akman 2016). Dzielne zapotrzebowanie na składniki mineralne zostało ustalone na poziomie Referencyjnych Wartości Odżywczych (NRV) dla Ca (800 mg), Fe (14 mg), K (4700mg), Mg (375 mg), Mn (2 mg), Na (1500 mg) i Zn (10 mg) (Parlament Europejskiego i Rady (2011). Zawartość Cd oznaczono metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej w piecu grafitowym (280Z AA Agilent Technologies, Australia) (Anastácio i in., 2018).

Oznaczenie zawartości witaminy C i witamin z grupy B

Ekstrakcję witaminy C ze świeżego i fermentowanego soku z jarmużu przeprowadzono metodą opisaną przez Kurilich i in. (1999). 0,5 ml soku i 0,5 ml 5% kwasu metafosforowego mieszano przez 5 min za pomocą wortexu, a następnie wirowano przy 14 000 obr./min. przez 20 min. Kolejno 0,2 ml supernatantu i 0,2 ml 5% dichlorodifenylotrichloroetanu (DDT) mieszano i rozcieńczano wodą demineralizowaną do 2 ml. Oznaczanie witaminy C przeprowadzono zgodnie z wcześniejszymi badaniami (Gliszczyńska-Świągło i Tyrakowska, 2003) przy użyciu HPLC Waters 600 (Waters, Millford, USA) wyposażonego w kolumnę LiChrospher C₁₈ (3,9 X 250 mm, 5 µm, Merck). Witaminę C w sokach identyfikowano porównując jej widmo absorpcji i czas retencji ze wzorcem. Oznaczenia zawartości witaminy C przeprowadzono stosując metodę wzorca zewnętrznego.

Zawartość witaminy B₂ (ryboflawiny) i B₆ (pirydoksyny) w sokach z jarmużu oznaczono metodą HPLC (HPLC Waters 600, Waters, Stany Zjednoczone) wyposażonego w kolumnę Nova-Pak C18 (150 mm×3,9 mm, 5 µm) i detektor fluorescencyjny 2475 (Waters, Stany Zjednoczone) (Gliszczyńska-Świągło i Rybicka, 2015). Próbkę soków odwirowano przed analizą (10 000 obr./min, 5 min; MiniSpin plus, Eppendorf, Niemcy) i bezpośrednio nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną.

3.3.2.4. Oznaczenie zawartości składników bioaktywnych i właściwości przeciwutleniających

Oznaczenie ogólnej zawartości związków fenolowych

Ogólną zawartość związków fenolowych w sokach oznaczono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu zgodnie z wytycznymi Singleton i Rossi, (1965) z modyfikacjami do pomiarów na 48-dołkowych mikroplótkach wg. Włodarska, Pawlak-Lemańska, Górecki, i Sikorska, (2017). Przed oznaczeniem próbki soków odwirowywano (10 000 obr./min., 5 min; MiniSpin plus, Eppendorf Niemcy), do oznaczeń pobierano ciecz z nad osadu. Oznaczenie to oparto na pomiarze absorbancji przy długości fali 765 nm przy użyciu spektrofotometru mikroplótkowego Biotek EpochTH (Stany Zjednoczone). Całkowitą zawartość związków fenolowych wyrażono w mg kwasu galusowego (GAE) na 100 ml soku.

Oznaczenie zawartości związków fenolowych

Ekstrakcję polifenoli przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Vallejo, Toms-Barbern, i Garca-Viguera (2002). Profil fenolowy oznaczono metodą HPLC w systemie LC Agilent Technologies 1200 Rapid Resolution wyposażonym w detektor UV-Vis (DAD 1260) (Agilent Technologies 1200 Rapid Resolution, Niemcy) oraz kolumnę Zorbax SB-C18 (5 μm , 4,6 x 150 mm) (Agilent Technology Inc, USA)(Tsao i Yang, 2003). Na podstawie maksimum absorpcji w zakresie UV-Vis związki fenolowe podzielono na dwie grupy, tj. pochodne kwasu hydroksycynamonowego ($\lambda = 320 \text{ nm}$) badane jako odpowiedniki kwasu chlorogenowego) oraz flawanole badane przy długości fali 360 nm jako odpowiedniki kwercetyny lub kaempferolu. Oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla dwóch równoległych prób ($n = 6$).

Oznaczenie zawartości karotenoidów

Oznaczanie karotenoidów wykonano metodą HPLC (de Sá i Rodriguez-Amaya 2004). W celu ekstrakcji karotenoidów z soku z jarmużu, próbki poddawano trzykrotnej ekstrakcji acetonem, homogenizując i wytrząsając próbki w ciemności za pomocą wytrząsarki mechanicznej. Po każdej ekstrakcji próbki odwirowywano (5 200 obr./min., 15 min, MPW-351RW, Polska), a supernatanty łączono. Otrzymane ekstrakty zmydlano przez dodanie 10% KOH w metanolu i eterze naftowym z dodatkiem BHT (12 godzin, temperatura pokojowa). Zmydlony ekstrakt rozdzielano za pomocą rozdzielacza, a zebraną fazę zawierającą karotenoidy odparowywano w wyparce próżniowej do sucha i rozpuszczano w 2,5 cm^3 acetonu. Zawartość karotenoidów oznaczano przy użyciu tego samego sprzętu, który był używany do oznaczania zawartości fenoli. Detekcję przeprowadzono w zakresie od 400 do 600 nm, odczyt przy długości fali 445 nm. Wyniki obliczono na podstawie zewnętrznego wzorca luteiny i β -karotenu. Wyniki podano w $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ próbki. Oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla dwóch równoległych testów ($n = 6$).

Oznaczenie zawartości glukozyolanów

Glukozyolany oznaczano w liofilizowanym materiale poddanym uprzednio ekstrakcji zgodnie z metodą EN ISO 9167:2019, (2019). Przed ekstrakcją do wszystkich próbek dodano glukotropeolinę o znanym stężeniu jako wzorzec wewnętrzny. Rozdzielanie GLS przeprowadzono przy użyciu tego samego sprzętu HPLC, który był używany do oznaczania zawartości fenoli i karotenoidów. Rozdzielanie przeprowadzono w układzie faz odwróconych z zastosowaniem elucji gradientowej. Fazę ruchomą stanowiła ultraczysta woda (rozpuszczalnik A) i acetonitryl/woda (20/80 v.v., rozpuszczalnik B) w następującym gradiencie: 1 - 23 min. 0-100% B w A, 23-28 min. izokratycznie 100% B, 28-30 min. 100% - 0% B w A. Czas rozdzielania wynosił 30 min. przy szybkości przepływu 1 ml/min. Użyto długości fali 229 nm. Piki zidentyfikowano przez porównanie z danymi literaturowymi. Ilość desulfoglukozyolanów oznaczano w oparciu o wzorzec

wewnętrzny glukotropanolinę i wyrażano w mg/100 ml próbki. Oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla dwóch równoległych prób ($n = 6$).

Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą TEAC

Do oceny aktywności przeciwutleniającej świeżego i fermentowanego soku z jarmużu zastosowano metodę TEAC (ang. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) wg. Re i in. (1999). Przed badaniem próbki odwirowano (10 000 obr./min, 5 min; MiniSpin plus, Eppendorf Niemcy). Pomiary przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Milton Roy Spectronic Genesys 2 (Stany Zjednoczone), zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Gliszczyńska-Świgło i in., (2006). Wartości TEAC wyrażono w mmol ekwiwalentu Troloksu w 100 ml soku z jarmużu.

3.3.3. Analiza statystyczna danych

Badania ankietowe

Do analizy danych uzyskanych na drodze badania ankietowego wykorzystano regresję porządkową. Kluczowy dla wyboru regresji porządkowej był więc charakter zmiennych użytych do testowania hipotezy. W procesie jej testowania opracowano dwa modele: (1) dla kiszonych soków warzywnych oraz (2) dla kiszonych produktów warzywnych. Oznacza to, iż jako zmienne zależne przyjęto kolejno: częstotliwości spożycia kiszonych soków warzywnych (model 1) oraz częstotliwości spożycia kiszonych produktów warzywnych (model 2). Obie te zmienne mierzone były przy wykorzystaniu 5-stopniowej skali rozciągającej się od wartości 1 (nie spożywam w ogóle), aż do 5 (spożywam regularnie). Zmienne niezależne użyte w procesie testowania hipotezy były takie same w obu modelach i obejmowały: płeć (kobieta, mężczyzna), wiek (do 20 lat, 21-30 lat, 31-40 lat, 41-50 lat, 51-60 lat, powyżej 60 lat), status materialny (zdecydowanie powyżej średniej krajowej, powyżej średniej krajowej, średnia krajowa, poniżej średniej krajowej, zdecydowanie poniżej średniej krajowej) oraz miejsce zamieszkania (wieś, miasto poniżej 20 tys., miasto 20-99 tys., miasto 100-199 tys., miasto 200-499 tys., miasto powyżej 500 tys.). W dalszym etapie, dla obu modeli określono stopień dopasowania (ang. *goodness-of-fit*). W tym celu. Wybrano test Pearsona (ang. *Pearson test*) i test odchyłeń (ang. *Deviance test*). W przypadku regresji porządkowej nie oblicza się klasycznej miary R^2 , dlatego w uzupełnieniu dla powyższych testów obliczono więc pseudo- R^2 , Coxa i Snella oraz Nagelkerkea, co jest standardową procedurą w takim wypadku (IBM, 2022). Do testowania statystycznej istotności różnic pomiędzy wynikami poszczególnych kategorii i wynikami kategorii referencyjnej wykorzystano test Walda. Poziom istotności przyjęty w badaniu wynosił $p < 0,05$. Wszystkie obliczenia wykonano przy użyciu programów MS Excel i SPSS Statistics 27 (SPSS for Mac IOS: IBM SPSS Inc., USA). Metoda analizy danych została tak opracowana, aby umożliwić weryfikację postawionej hipotezy.

Badania laboratoryjne

Wszystkie analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a wyniki wyrażono jako średnie± odchylenie standardowe. Jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) i test Tukeya przeprowadzono przy użyciu oprogramowania SPSS Statistics 25 (SPSS for Mac IOS: IBM SPSS Inc., USA) w celu określenia różnic między próbkami przy $p < 0,05$.

4. Wyniki i dyskusja

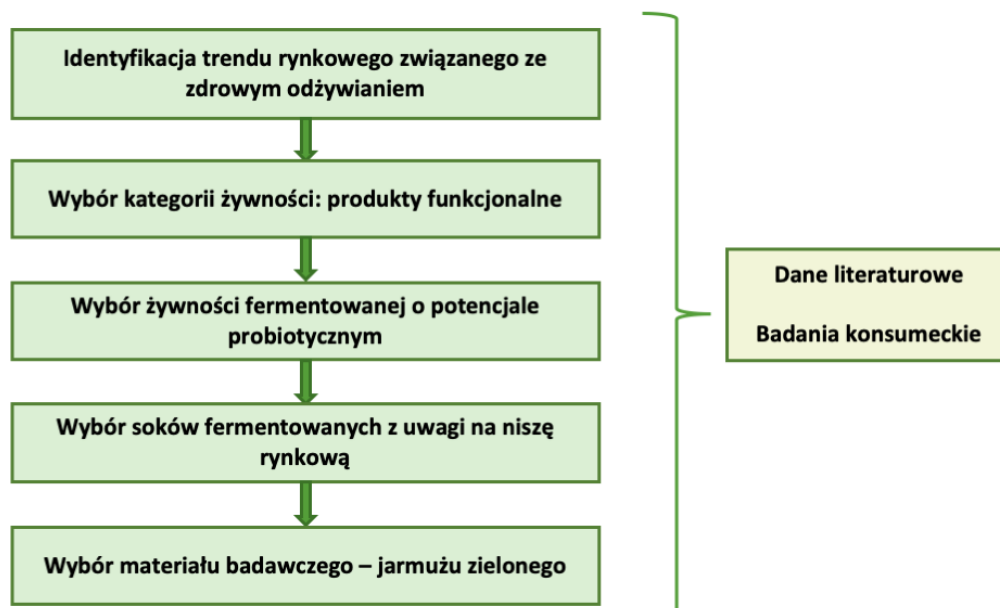
W niniejszym rozdziale opisano wyniki badań empirycznych i wybranych prac koncepcyjnych oraz przedstawiono dyskusję na temat badań przeprowadzonych w oparciu o wypracowany model rozwoju nowego produktu spożywczego. Badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie koncentrują się na czterech etapach rozwoju nowego produktu – generowaniu pomysłu, selekcji pomysłu, badaniach podstawowych i stosowanych oraz na rozwoju prototypów produktu.

4.1. Generowanie i selekcja pomysłu

Generowanie i selekcja pomysłu są etapami wstępnymi, dającymi początek całemu procesowi rozwoju nowego produktu spożywczego. Zgodnie z charakterystyką wypracowaną w ramach autorskiego modelu, etap generowania pomysłu sprowadza się do wykorzystania dostępnych, wewnętrznych i zewnętrznych, źródeł pomysłów na nowe produkty. Z kolei etap selekcji pomysłu bazuje na ustalonych kryteriach oceny obejmujących analizę otoczenia i strategię firmy. W niniejszym podrozdziale zaprezentowano wyniki prac koncepcyjnych oraz badań empirycznych. Podstawą dla prac koncepcyjnych była krytyczna analiza i wnioskowanie na bazie literatury przedmiotu zaprezentowanej w pierwszym i drugim rozdziale rozprawy, z kolei badania empiryczne koncentrowały się na analizie konsumenckiej.

4.1.1. Procedura postępowania w generowaniu i selekcji pomysłu

W pierwszej kolejności, generując pomysły na nowe produkty spożywcze, przebadano aktualnie panujące na rynku trendy konsumenckie. Schemat generowania i selekcji pomysłu przedstawiono na rysunku 6.



Rysunek 6. Schemat generowania i selekcji pomysłu w procesie rozwoju nowego produktu spożywczego

Źródło: opracowanie własne

Ustalono, że jednym z najistotniejszych obecnie trendów rynkowych jest trend związany ze zdrowym odżywianiem. Dowody naukowe wskazują, iż jest on dobrze ugruntowany i ma solidne podstawy w postaci: zwiększonej świadomości konsumentów dotyczącej kwestii zdrowotnych, identyfikacji naukowych powiązań między dietą a zdrowiem, promocją zaleceń dotyczących zbilansowanej diety oraz zmniejszonymi kosztami opieki zdrowotnej (Bogue i Sorenson, 2007). Przesłanki te wskazują na prawdopodobne utrzymywanie się trendu w przyszłości, w tym przede wszystkim dalsze promowanie zdrowego odżywiania przez zarówno organy europejskie, jak i władze polskie i lokalne. Jest to o tyle istotne, że dotychczasowe badania wskazują, iż programy interwencyjne bazujące na założeniach teorii planowanego zachowania wykazują wysoką skuteczność w promowaniu prozdrowotnych zachowań żywieniowych, takich jak np. spożywanie owoców i warzyw (Kothe i in., 2012). Ponadto, wyniki badań prowadzonych w obszarze przedsiębiorstw pozwoliły na ustalenie, iż zarządzając rozwojem nowych produktów, większość z nich nawiązuje do preferencji konsumentów w zakresie zdrowego odżywiania (Bogue i Sorenson, 2007). Na bazie przeprowadzonych analiz wywnioskowano, iż koncepcja nowego produktu spożywczego powinna bazować na trendzie związanym ze zdrowym odżywianiem (Horvat, Granato, i in., 2019).

W toku generowania koncepcji produktu, uszczegółowiono ją analizując zagadnienie zdrowej żywności i wskazując na istotne rozróżnienie pomiędzy konwencjonalną zdrową żywnością a żywnością funkcjonalną. W przypadku żywności funkcjonalnej poszczególne składniki są bezpośrednio łączone z konkretnymi, dobrze zdefiniowanymi efektami zdrowotnymi, a efekty te z konkretnym produktem (Lahteenmaki, 2003). Jednocześnie zaobserwowano, że żywność o dodatkowej wartości prozdrowotnej oferuje istotne możliwości rozwoju dla przedsiębiorstw rozwijających nowe produkty spożywcze (Kleef i in., 2005). Jak wskazuje się w literaturze, konsumenci coraz częściej poszukują produktów, które charakteryzują się działaniem prozdrowotnym wykraczającym poza zwykłe działanie odżywcze, takich jak żywność wzbogacona witaminami, błonnikiem bądź mikroorganizmami probiotycznymi (Granato i in., 2010; Min i in., 2019; Panghal i in., 2018). W związku z tym ustalono, że koncepcja nowego produktu spożywczego powinna bazować na trendzie związanym ze zdrowym odżywianiem i dotyczyć produktów funkcjonalnych.

Na podstawie analizy badań prowadzonych w obszarze żywności funkcjonalnej określono, że konsumenci nie postrzegają żywności funkcjonalnej jako jednorodnej kategorii produktowej (Urala i Liisa, 2004), a postrzeganie to uzależnione jest od rodzaju żywności (np. soki probiotyczne, napoje energetyzujące). Ponadto, dane literaturowe wskazują na możliwość kształtowania właściwości prozdrowotnych przez różne gatunki i szczepy bakterii zachodzące podczas fermentacji mlekowej produktów z owoców i warzyw, co może być bardzo istotne z punktu widzenia producentów w procesie zarządzania rozwojem produktów (Di Cagno i in., 2013; Filannino i in., 2013, 2015; Hashemi i in., 2017; Mantzourani i in., 2018; Panda i in., 2017). Dodatkową wartością związaną z cechami funkcjonalnymi produktu są właściwości probiotyczne mikroorganizmów wykorzystanych do wytworzenia produktu.

Dlatego też ustalono, że koncepcja musi zawierać konkretne wskazanie rodzaju produktu funkcjonalnego oraz może bazować na fermentacji mlekowej produktów z owoców i warzyw.

Kolejny etap generowania i selekcji pomysłu koncentrował się na rozwoju nowych funkcjonalnych produktów spożywczych na bazie produktów fermentowanych. W toku prac ustalono, że produkty fermentowane stanowią pewną niszę na rynku spożywczym. Nisza ta dotyczy przede wszystkim napojów fermentowanych, które pomimo, iż są generalnie dostępne dla konsumentów, to posiadają marginalny udział w rynku (Komisja Europejska, 2016). Konkluzja ta jest istotna i w dużej mierze zdeterminowała dalsze prace nad koncepcją produktu, bowiem w toku studiów literaturowych (zaprezentowanych w rozdziale pierwszym) wskazano na kluczową rolę zarządzania rozwojem nowych produktów przy wykorzystaniu strategii dyferencjacji dla przedsiębiorstw działających na rynku spożywczym. Identyfikacja niszy (soki fermentowane) koresponduje więc z podstawami teoretycznymi tej strategii, a zagospodarowanie niszy pozwala przedsiębiorstwu na wyróżnienie się na tle konkurentów rynkowych. Wydaje się zatem, że rozwój koncepcji produktu na bazie soku fermentowanego pozwoli na realizację tego celu.

Podczas generowania i selekcji koncepcji produktu istotne było także wskazanie materiału, na bazie którego produkt może być rozwinięty. Wcześniejsze badania empiryczne w obszarze żywności funkcjonalnej wskazują, że akceptacja żywności funkcjonalnej przez konsumentów zależy od charakterystyki produktu, który służy jako nośnik składnika funkcjonalnego (Balasubramanian i Cole, 2002). Konsumenti postrzegają produkty z natury zdrowe — takie jak warzywa i owoce — jako wiarygodne „nośniki” funkcjonalnych cech produktu. Z punktu widzenia zarządzania rozwojem nowego produktu, kluczowe jest przekonanie, że żywność funkcjonalna posiadająca korzystny, prozdrowotny wizerunek jest bardziej atrakcyjna niż żywność funkcjonalna, która takiego wizerunku nie posiada (Kleef i in., 2005). Warto zwrócić uwagę również na fakt, że chociaż rynek produktów fermentowanych jest zdominowany obecnie przez produkty mleczne, to jednak produkty niemleczne na bazie owoców i warzyw przyciągają coraz większą uwagę różnych grup — naukowców, producentów żywności i konsumentów (Granato i in., 2010; 2020; Min i in., 2019; Panghal i in., 2018). Uznano zatem za zasadne opracowanie nowego produktu spożywczego wykorzystując jako składnik bazowy owoce lub warzywa.

Powyższe ustalenia są o tyle spójne, że w literaturze naukowej występują liczne doniesienia wskazujące na właściwości funkcjonalne fermentowanych soków owocowych i warzywnych (Szutowska, 2020). Ich regularne spożywanie może przyczynić się do poprawy zdrowia konsumentów m.in. poprzez: modulowanie glikemii, wpływ na równowagę mikrobioty jelitowej (Gao i in., 2019), regulację ilości tkanki tłuszczowej (Verón i in., 2019), aktywność przeciwnowotworową (Ye i in., 2019) i przeciwzapalną (Filannino i in., 2013).

Kolejnym etapem prac był wybór materiału badawczego, który zostanie poddany fermentacji mlekowej. Przy określaniu materiału badawczego bazowano na ofercie soków kiszonych dostępnych na rynku, literaturze przedmiotu oraz doświadczeniach własnych autorki. Bazując na systematycznym

przeglądzie literatury dotyczącym właściwości funkcjonalnych bakterii fermentacji mlekowej w sokach owocowych i warzywnych (Szutowska, 2020) zaobserwowano, że dominującą grupą badanych produktów są soki na bazie owoców (n=29), natomiast soki warzywne (n=8) oraz warzywno-owocowe (n=5) stanowią mniejszy odsetek przedstawionych badań. Uznano zatem, że badania nad rozwojem soków warzywnych, z uwagi na ich marginalny udział w pracach naukowych, wypełnią zaobserwowaną lukę badawczą.

Finalnie, prowadząc selekcję materiału, na bazie którego produkt może być rozwinięty, stwierdzono, że najczęściej na rynku pojawiają się soki kiszzone na bazie kapusty, buraka, ogórka, selera, marchwi, kalafiora, pietruszki czy też brokołu. W oparciu o analizę literatury przedmiotu oraz doświadczenie badawcze autorki niniejszej rozprawy wskazano, że innowacyjnym materiałem, który zostanie poddany fermentacji mlekowej, może być jarmuż zielony. Selekcji dokonano na bazie doniesień naukowych koncentrujących się przede wszystkim na właściwościach prozdrowotnych jarmużu i potencjalnych możliwościach jego zastosowania.

Jarmuż zielony (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* L) jest rośliną dwuletnią, która nie tworzy główki ani jadalnego pąka jak kapusta czy brokuły, a zamiast tego charakteryzuje się długimi, pomarszczonymi liśćmi. W ostatnich latach warzywo to zyskało ogromną popularność jako tzw. "superfood" ze względu na wysoką zawartość związków bioaktywnych, które mają pozytywny wpływ na zdrowie człowieka. Właściwości prozdrowotne zielonego jarmużu zostały dobrze udokumentowane w wielu badaniach naukowych, w szczególności jego potencjalne właściwości zapobiegające przewlekłym chorobom, takim jak cukrzyca, choroby układu krążenia i nowotwory (Becerra-Moreno i in., 2014; Biegańska-Marecik i in., 2017; Olsen i in., 2009; Šamec i in., 2018). W tabeli 12 przedstawiono zbiorcze informacje dotyczące wartości odżywczej jarmużu oraz poszczególnych składników (USDA, 2022).

Tabela 12. Zawartość składników odżywczych, składników mineralnych, witamin i innych związków w surowym jarmużu

Surowy jarmuż (100 g)			
Składniki odżywcze		Składniki mineralne cd.	
Woda	89,6 g	Sód	53 mg
Wartość energetyczna	43 kcal	Cynk	0,39 mg
Azot	0,47 g	Miedź	0,053 mg
Białko	2,92 g	Mangan	0,92 mg
Tłuszcze ogółem	1,49 g	Witaminy i inne	
Popiół	1,54 g	Kwas askorbinowy	93,4 mg
Węglowodany		Tiamina	0,113 mg
Węglowodany	4,42 g	Ryboflawina	0,347 mg
Błonnik pokarmowy	4,1 g	Niacyna	1,18 mg
Cukry ogółem	0,8 g	Kwas pantotenowy	0,37 mg
Glukoza	0,4 g	Witamina B ₆	0,147 mg
Fruktoza	0,4 g	Witamina K	390 µg

Składniki mineralne		Foliiany	62 µg
Wapń	β-karoten	β-karoten	2870 µg
Żelazo	1,6 mg	β-kryptoksantyna	27 µg
Magnez	32,7 mg	Luteina i zeaksantyna	6260 µg
Fosfor	55 mg	α-tokoferol	0,66 mg
Potas	348 mg	γ-tokoferol	0,14 mg

Źródło: opracowanie własne na podstawie bazy danych składu żywności USDA (ang. *U. S. Department of Agriculture*) (<https://fdc.nal.usda.gov/ndb/>)

Prozdrowotne działanie jarmużu jest ściśle związane z wysoką zawartością witamin, glukozyzolanów, związków fenolowych oraz karotenoidów. Warzywa krzyżowe z grupy *acephala* (jarmuż i brukselka) charakteryzują się wyższą zawartością kwasu foliowego, ryboflawiny i witaminy K niż inne warzywa z tej grupy. Natomiast zawartość witaminy C jest znacznie wyższa w jarmużu niż w innych warzywach krzyżowych (Šamec i in., 2018). Według Becerra-Moreno i in. (2014) jedna porcja jarmużu dostarcza ponad 100% zalecanego dziennego spożycia witaminy A i ponad 40% witaminy C. Również inni autorzy uznali jarmuż za najlepsze wśród roślin krzyżowych źródło witamin (A, B₁, B₂, B₆, B₉, C i E), kwasów tłuszczowych oraz składników mineralnych (zwłaszcza K, Ca, Mg, Fe i Cu) (Ayaz i in., 2006; Jahangir i in., 2009; Thavarajah i in., 2016).

W jarmużu obecne są również glukozyzolany (zarówno glukozyzolany indolowe, jak i alifatyczne), w tym głównie glukoiberyna, glukobrassylicyna, glukorafanina oraz sinigrina. Zgodnie z danymi literaturowymi produkty hydrolizy glukozyzolanów mogą być stosowane jako środki chemoprotekcyjne oraz mogą potencjalnie zmniejszać ryzyko różnych rodzajów nowotworów, cukrzycy, miażdżycy, chorób układu oddechowego, zaburzeń neurodegeneracyjnych, chorób oczu i chorób sercowo-naczyniowych (Šamec i in., 2018).

Związki fenolowe występujące w jarmużu, m.in. kwercetyna, kemferol, kwas kawowy oraz kwas ferulowy również mają korzystny wpływ na zdrowie. Mogą zostać wykorzystane w postępowaniu leczniczym w cukrzycy typu 2, zespole metabolicznym, chorobach neurodegeneracyjnych, miażdżycy i nowotworach (Šamec i in., 2018). Warzywa krzyżowe, w szczególności jarmuż, są dobrym źródłem β-karotenu (prowitaminy A) i luteiny, które wraz z zeaksantyną, ze względu na silne działanie przeciwutleniające, odgrywają ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu zmysłu wzroku (Manikandan i in., 2016). Główne karotenoidy obecne w jarmużu to luteina, β-karoten, wiolaksantyna i neoksantyna, ale odnotowano również obecność 13-cis-β-karotenu, α-karotenu, 9-cis-β-karotenu i likopenu.

Związki przedstawione wyżej takie jak polifenole, karotenoidy, produkty hydrolizy glukozyzolanów, witaminy C i E, wykazują aktywność przeciwutleniającą. Powszechnie uważa się, że żywność bogata w związki o działaniu przeciwutleniającym chroni przed wolnymi rodnikami i reaktywnymi formami tlenu, a tym samym może pomóc w zapobieganiu chorobom przewlekłym (Šamec i in., 2018). Przykładowo, badając właściwości jarmużu Fahey i in., (2013) stwierdzili, że produkt hydrolizy glukoiberyn, sulforafan, hamuje wzrost opornych na antybiotyki szczepów *Helicobacter pylori*,

które są czynnikiem etiologicznym wrzodów żołądka. Z kolei ekstrakty pozyskane z jarmużu wykazują również działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec innych gatunków mikroorganizmów tj.: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* i *Moraxella catarrhalis* (Ayaz i in., 2008). W związku z tym, regularne spożywanie jarmużu może w pewnym stopniu prowadzić do równowagi w mikrobiocie jelitowej.

Jarmuż zielony występuje na polskim rynku głównie jako rozdrobniony, gotowy do spożycia produkt, czasami z dodatkiem innych rodzajów sałat lub szpinaku. Jest również dostępny w postaci świeżego soku. W literaturze naukowej podjęto nieliczne próby zbadania potencjału zielonego jarmużu, np. w postaci liofilizowanej jako dodatku do soku jabłkowego w celu zwiększenia właściwości prozdrowotnych produktu (Biegańska-Marecik i in., 2017), w postaci sfermentowanego soku używanego do produkcji sera typu feta (Michalak, Skrzypczak, i in., 2020) lub jako źródło kwasów gentyzynowego i salicylowego o właściwościach przeciwnowotworowych (Michalak, Sz wajgier, i in., 2020).

Podsumowując, etap generowania pomysłu umożliwił dokonanie wyboru projektowanego w ramach dysertacji produktu. Ustalono, że nowym produktem, podlegającym w dalszych etapach pracy badaniom i rozwojowi, będzie fermentowany sok z jarmużu zielonego. Jest to produkt funkcjonalny, otrzymywany na drodze fermentacji, wpisujący się w trend związany ze zdrowym żywieniem, rozwinięty na bazie materiału postrzeganego przez konsumentów jako zdrowy oraz wypełniający zidentyfikowaną niszę rynkową.

4.1.2. Zachowania konsumentów na rynku niemlecznych produktów fermentowanych

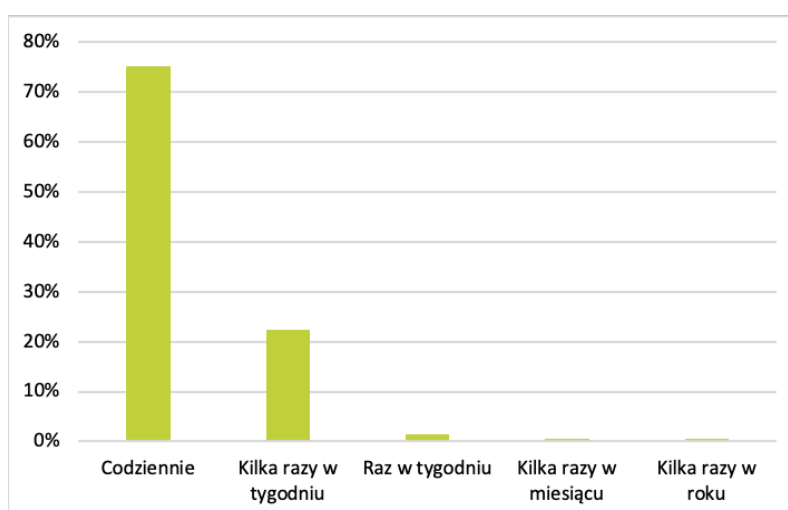
Dalszy etap prac wiązał się z ustaleniem zachowań polskich konsumentów dotyczących niemlecznych produktów fermentowanych. Jest to niezbędne uzupełnienie powyższych rozważań w zakresie generowania i selekcji pomysłu na nowy produkt spożywczy, gdyż to konsumenci zdecydują, czy nowy produkt jest zgodny z ich preferencjami. W związku z tym nieodłącznym elementem rozwoju nowych produktów jest badanie zachowań konsumentów. Przedstawiona w pracy koncepcja kierowanego przez konsumentów rozwoju nowych produktów jest ważna szczególnie dla producentów produktów spożywczych, ponieważ koncentruje się na wykorzystaniu w procesie rozwojowym wiedzy o rynku tworzonym przez użytkowników końcowych (O'Sullivan, 2017). Koncepcja ta bazuje na przeprowadzeniu i wykorzystaniu wyników analizy obecnych i przyszłych potrzeb konsumentów oraz wiedzy o determinantach tych potrzeb w celu rozwoju innowacyjnych produktów (Adams i in., 2006). Zakłada ponadto, że potrzeby konsumentów powinny być analizowane podczas procesów rozwoju nowych produktów (Costa i Jongen, 2006). W procesie dostosowania podaży do aktualnych wymagań konsumentów, przedsiębiorstwa aktywnie zarządzają rozwojem nowych produktów, a tym samym zapewniają konsumentom pożądaną przez nich gamę produktów o określonych właściwościach (Urala i Lahteenmaki, 2003).

W tym kontekście kluczowe dla niniejszej pracy było uzyskanie informacji o zachowaniach konsumentów na rynku żywności ze szczególnym uwzględnieniem przetworów fermentowanych oraz fermentowanych soków warzywnych. W badaniu skoncentrowano się na obecnej sytuacji rynkowej, w tym przede wszystkim na ofercie dostępnych na rynku fermentowanych produktów spożywczych oraz fermentowanych soków warzywnych. Pytania zawarte w kwestionariuszu nie odnoszą się więc stricte do jarmużu, gdyż wypracowany w niniejszej rozprawie pomysł na nowy produkt – fermentowany soku z jarmużu zielonego, jest na tyle nowatorski, że nie znajduje się w gamie dostępnych na rynku produktów. W efekcie tego, że produkt taki nie występuje na rynku – zachowania dotyczące takiego produktu nie mogą być mierzone. Z punktu widzenia generowania i selekcji pomysłu nie jest to jednak ograniczenie, gdyż dokładne badanie zachowań konsumentów w obszarze fermentowanych soków warzywnych pozwala na wnioskowanie o stopniu zadowolenia z oferty dostępnej na rynku, częstotliwości spożycia, kryteriach wyboru i praktykach zakupowych dotyczących fermentowanych soków warzywnych, a także postrzeganych zaletach i wadach tych soków, źródłach wiedzy o nich oraz opakowaniach. Ponadto, uwzględnienie w badaniu pytań dotyczących ogółu owoców, warzyw lub ich przetworów, a także ogółu fermentowanych produktów warzywnych pozwala scharakteryzować sytuację panującą na rynku żywności i umiejscowić na nim fermentowane soki warzywne.

Prezentacja wyników odpowiada konstrukcji kwestionariusza (załącznik 1) oraz zawiera wyniki analizy odpowiedzi udzielonych na 17 pytań pogrupowanych w trzy części dotyczące: wyborów konsumentów w zakresie konsumpcji owoców, warzyw i ich przetworów, wyborów konsumentów

w zakresie konsumpcji kiszonych produktów warzywnych oraz oferty rynkowej kiszonych soków warzywnych.

Na wykresie 1 zaprezentowano wyniki uzyskane w najbardziej ogólnej części badania dotyczącej wyborów konsumentów w zakresie konsumpcji owoców, warzyw i ich przetworów. Pierwszym istotnym zagadnieniem była ocena częstotliwości spożycia owoców, warzyw lub ich przetworów, co pozwoliło na ustalenie, na ile żywność postrzegana jako zdrowa znajduje uznanie wśród konsumentów. Zarówno świeże owoce i warzywa, jak również różne produkty na ich bazie (np. soki lub przetwory), są niezbędnymi składnikami zdrowej i zbilansowanej diety. Produkty te są źródłem korzystnych związków, tj. witaminy, związki fenolowe, glukozytolany, składniki mineralne oraz błonnika pokarmowego (Agarwal, Fulgoni, i Welland, 2019; Septembre-Malaterre i in., 2018). Biorąc pod uwagę ich wpływ na zdrowie człowieka, produkty te są zalecane na całym świecie jako podstawa zdrowej i zbilansowanej diety. Według Światowej Organizacji Zdrowia (FAO/WHO, 2004) dzienne zalecane spożycie owoców i warzyw powinno wynosić ponad 400 g, aby przyczynić się do ogólnej poprawy zdrowia i zmniejszyć ryzyko występowania niektórych chorób przewlekłych.



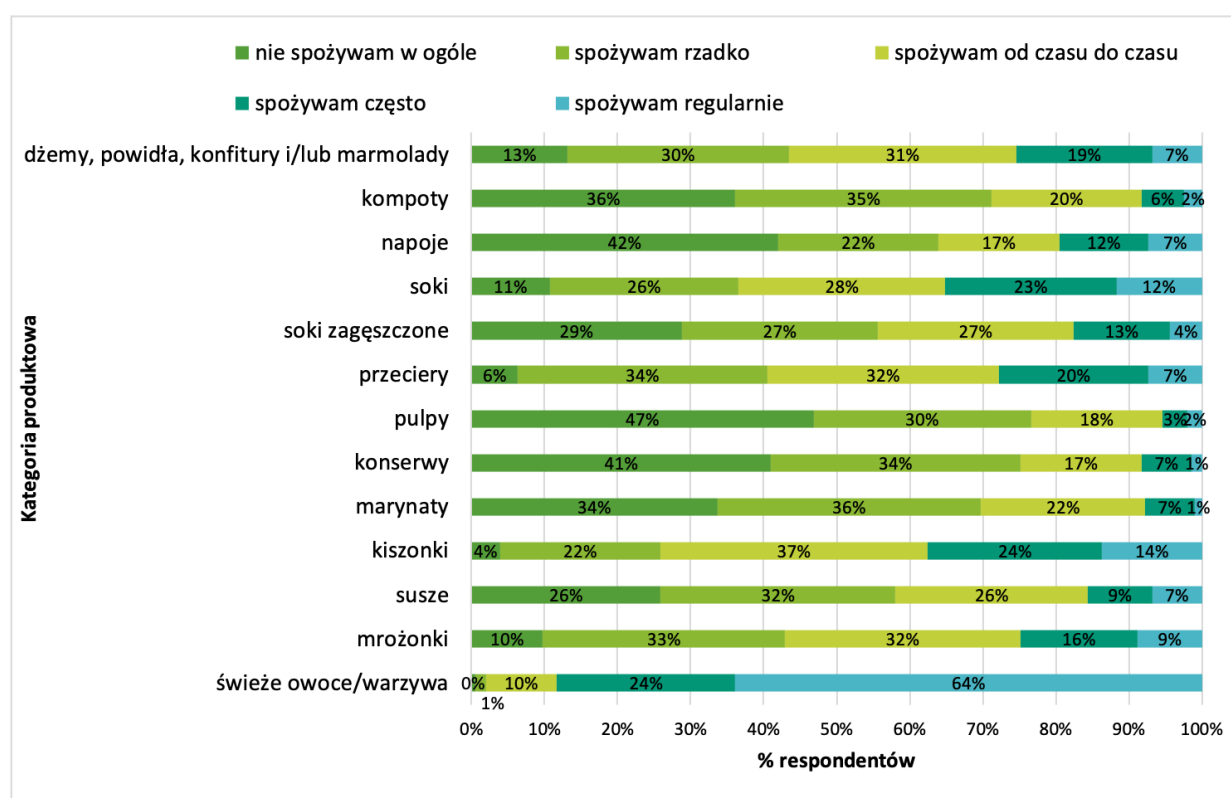
Wykres 1. Częstotliwość spożycia owoców, warzyw lub ich przetworów

Źródło: opracowanie własne

Wyniki badań wykazały, że znacząca większość respondentów (75%) konsumuje owoce, warzywa lub ich przetwory codziennie, a pozostała ich część (22%) konsumuje je kilka razy w tygodniu. Około 1% respondentów spożywa te produkty raz w tygodniu, a osoby spożywające je raz w miesiącu i kilka razy w roku stanowią odpowiednio około 0,5% i 0,5% ogółu respondentów. Rozważania dotyczące wpływu trendu konsumenckiego związanego ze zdrowym odżywianiem na zarządzanie rozwojem nowych produktów spożywczych zdają się więc uzyskiwać poparcie w wynikach niniejszego badania empirycznego. Stanowi to pierwsze potwierdzenie dla wniosków płynących z analizy literatury

przedmiotu, które dotyczą coraz częstszego wyboru zdrowych produktów przez konsumentów (Horvat i in., 2019; Meiselman, 2007).

W dalszej kolejności powyższe uszczegółowiono określając częstotliwość spożycia wybranych produktów owocowych i warzywnych, a także miejsc dokonywania zakupów tych produktów przez respondentów. Pierwsze zagadnienie uznano za istotne wobec wskazań literaturowych, iż różne produkty spożywcze mogą wykazywać zróżnicowany poziom akceptacji wśród konsumentów. Drugie zagadnienie było ważne w kontekście rozważań w obszarze zarządzania dystrybucją i sprzedażą produktów owocowych i warzywnych. Wyniki zaprezentowano na wykresie 2.



Wykres 2. Częstotliwość spożycia wybranych produktów owocowych i warzywnych

Źródło: opracowanie własne

Uzyskane wyniki zdają się potwierdzać wnioski wysnute na bazie literatury przedmiotu w zakresie zdrowego odżywiania (Horvat i in., 2019; Urala i Liisa, 2004). Trzy kategorie produktowe, w odniesieniu do których respondenci zadeklarowali „regularne” spożycie to: świeże owoce/warzywa (64%), kiszonki (14%) i soki (12%). Wyniki te, w odniesieniu do produktów kiszonych, wskazują, iż popyt na te produkty jest widoczny na rynku. Jest to ważne z uwagi na wypracowaną w pracy koncepcję nowego produktu spożywczego. Najmniejszy odsetek wskazań „regularnego” spożycia dotyczył marynat (1%), konserw (1%), pulp (2%) oraz kompotów (2%). Respondenci zadeklarowali „częste” spożycie dokładnie tych samych kategorii produktowych co w przypadku spożycia „regularnego”, tj. świeżych owoców/warzyw (24%), kiszonek (24%) i soków (23%). Przy czym najniższy odsetek wskazań „częstego”

spożycia posiadały pulpy (3%), kompoty (6%) oraz susze (9%). Respondenci zadeklarowali spożycie „od czasu do czasu” w przypadku kiszzonek (37%), mrożonek (32%) i przecierów (32%), spożycie „rzadkie” dla marynat (36%), kompotów (35%), konserw (34%) i przecierów (34%), a brak spożycia dla pulp (47%), napojów (42%) i konserw (41%). Co istotne, w perspektywie rozwoju nowych produktów, powyższe wyniki prowadzą do konkluzji, że zróżnicowane produkty spożywcze wykazują się zróżnicowanym poziomem akceptacji konsumentów. Ponadto, istnieje aktywny rynek dla produktów fermentowanych, które są spożywane „regularnie” lub „często” w przypadku niemal 40% respondentów.

Natomiast, w badaniach przeprowadzonych przez Jąder, (2019) (w okresie od 2008 do 2017 roku) dotyczących rynku warzyw w Polsce, zaobserwowano, spadek konsumpcji świeżych warzyw (takich jak kapusta, buraki czy marchew). Jednakże spadek ten był wyższy niż sam spadek produkcji. W związku z tym, sytuacja ta istotnie wiąże się z większym udziałem przemysłu przetwórczego w eksporcie warzyw (Jąder, 2019). Co ciekawe, w innych badaniach wykazano, że zasadniczo w strukturze spożycia warzyw i przetworów warzywnych, która charakteryzuje się ogólnym spadkiem, udział przetworów warzywnych i grzybowych od kilku lat systematycznie wzrasta (z 7,8 kg/osobę w 2014 r. do 8,52 kg/osobę w 2018 r.) (Makosz, 2019).

W kolejnym pytaniu ustalono, gdzie konsumenci dokonują zakupów owoców, warzyw lub ich przetworów. Dane przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Miejsce dokonywania zakupów owoców, warzyw lub ich przetworów przez respondentów

Miejsce zakupu	Odsetek respondentów
Dyskont	58,5%
Supermarket	57,6%
Targ	48,3%
Sklep osiedlowy	41,5%
Sklep ze zdrową żywnością	13,2%
Inne	3,9%
Internet	1,5%

Źródło: opracowanie własne

Uzyskane wyniki wskazują, iż respondenci dokonują zakupów przede wszystkim w dyskontach (58,5%) i supermarketach (57,6%), a rzadko korzystają z Internetu (1,5%) i ewentualnych innych źródeł (3,9%). Dzięki temu, z punktu widzenia koncepcji rozwoju nowego produktu spożywczego, uzupełniają dyskusję dotyczącą zarządzania dystrybucją i sprzedażą i pozwalają na wskazanie konkretnych miejsc, w których respondenci dokonują zakupów.

W drugiej części kwestionariusza zawarto pytania dotyczące wyborów konsumentów w zakresie konsumpcji kiszonych produktów warzywnych. Część ta obejmowała zarówno pytania otwarte, jak i zamknięte. Odpowiedzi udzielone na kolejne pytanie pozwoliły ustalić, jakie są pierwsze skojarzenia respondentów z „kiszonymi produktami warzywnymi”. Pytanie to było otwarte, co dawało

respondentom dużą dowolność udzielania odpowiedzi. Krytyczna analiza odpowiedzi pozwoliła na wyodrębnienie czterech kluczowych grup skojarzeń dotyczących: konkretnych produktów, właściwości zdrowotnych, smaku oraz procesów. Skojarzenia respondentów przedstawiono w tabeli 14.

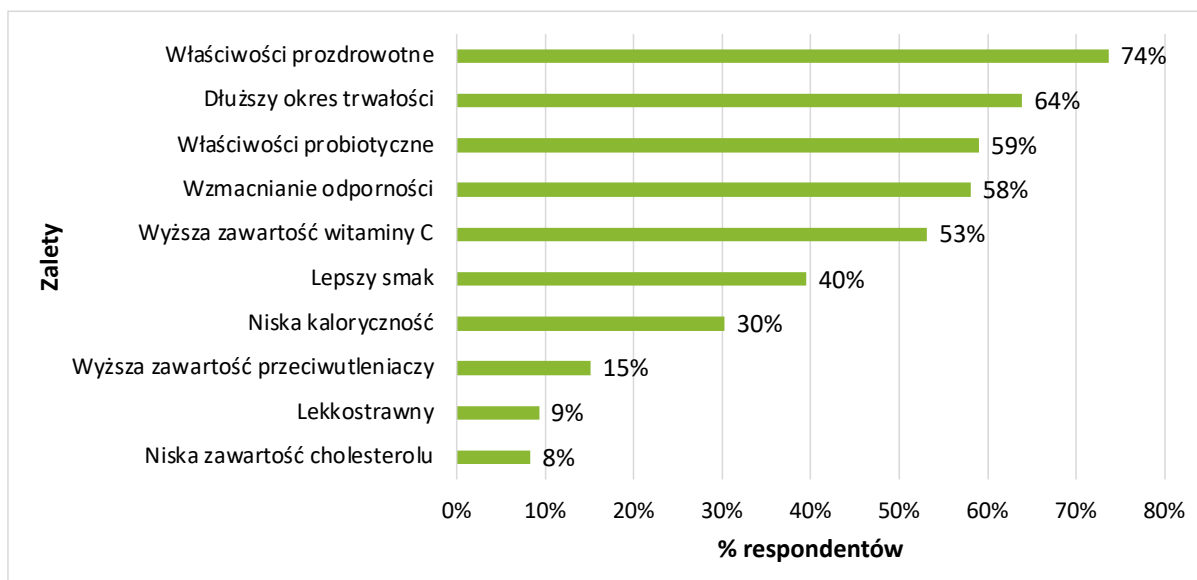
Tabela 14. Skojarzenia respondentów z fermentowanymi produktami warzywnymi

	Odczucia sensoryczne	Właściwości	Kategorie produktowe	Procesy
Pierwsze skojarzenia respondentów	smaczny, pyszny, charakterystyczny, kwaśny, chrupiący, słony	zdrowe, prozdrowotne, zwiększenie odporności, witamina C, probiotyki, bakterie, niskie wartości kaloryczne, wpływ na mikrobiotę jelitową	kapusta kiszona, ogórki kiszane, kiszane buraki, zakwas buraczany, kimchi, rzodkiewki, patisony, grzyby	naturalna fermentacja, przetwory, konserwacja żywności, eksperymenty w kuchni, słoiki

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska i Sojkin, 2021)

Pierwszym i dominującym skojarzeniem u większości respondentów było wskazanie konkretnego produktu, tj. kapusty kiszanej (n=56) lub ogórków kiszonych (n=53). Ze zdecydowanie mniejszą częstotliwością wskazywano na inne produkty (np. kiszane burki, zakwas buraczany, kimchi). Wynik ten jest bardzo istotny wobec przedmiotu niniejszej pracy. Wskazuje, iż w oczach respondentów – na poziomie pierwszego skojarzenia – katalog produktów fermentowanych jest bardzo ograniczony i zawężony do dwóch produktów – kapusty i ogórków. Rozwijana koncepcja fermentowanego soku z jarmużu zielonego stanowi alternatywę, która może stanowić podstawę do wyróżnienia się przedsiębiorstwa na rynku. Ponadto, druga grupa skojarzeń wskazywała właściwości zdrowotne produktów fermentowanych. Najczęstsze skojarzenia dotyczyły ogólnie „zdrowia” (n=38), wysokiej zawartości witamin (n=6) oraz właściwości probiotycznych (n=5), a także braku konserwantów (n=3), wspomagania pracy jelit (n=2), czy niskiej kaloryczności (n=1). Wyniki te są spójne z rezultatami prac innych autorów, na podstawie których ustalono, iż żywność fermentowana może wykazywać właściwości prozdrowotne (Gao i in., 2019; Verón i in., 2019; Ye i in., 2019). Trzecia grupa skojarzeń dotyczyła smaku. Najczęściej pierwsze skojarzenia dotyczyły smaku kwaśnego (n=13), charakterystycznego smaku (n=5), czy smaku „przyjemnego” (n=2). Czwarta grupa dotyczyła różnego rodzaju procesów: naturalna fermentacja (n=12), konserwacja żywności (n=8) oraz eksperymenty w kuchni (n=1).

Kolejne wyniki, przedstawione na wykresie 3, pozwoliły określić, z jakimi zaletami kojarzą się respondentom kiszane produkty warzywne.



Wykres 3. Zalety, z którymi kojarzą się respondentom kiszone produkty warzywne

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska i Sojkin, 2021)

Uzyskane rezultaty wydają się korespondować z wynikami prac koncepcyjnych zaprezentowanych w niniejszej rozprawie, w tym zakresie, że istotnym elementem rozwoju nowych produktów funkcjonalnych jest bazowanie na produktach, które postrzegane są przez konsumentów jako zdrowe (Balasubramanian i Cole, 2002). Wyniki wskazują, iż zalety, z którymi kojarzą się respondentom kiszone produkty warzywne dotyczą przede wszystkim właściwości prozdrowotnych i probiotycznych, wzmacniania odporność i obecności witaminy C. W uzupełnieniu dla tych wyników badanie pozwoliło jednak określić również inne postrzegane zalety, w tym przede wszystkim dłuższy okres trwałości. Wyniki te generują nową wiedzę dotyczącą postrzeganych zalet kiszonych produktów warzywnych. Z punktu widzenia koncepcji rozwoju nowego produktu spożywczego, mogą one stanowić podstawę dyskusji w zakresie zarządzania komunikacją z konsumentami. Na podstawie uzyskanych rezultatów można wskazać, że taka komunikacja ma większe szanse powodzenia, jeżeli będzie oparta na przekazie spójnym z postrzeganiem produktów przez konsumentów, czyli dla produktów kiszonych będzie uwypuklała przede wszystkim właściwości prozdrowotne.

Kolejnym zbadanym zagadnieniem była częstotliwość zakupu kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych. Uzyskane wyniki zaprezentowano w poniższej tabeli. Wyniki podzielone są na kiszone soki warzywne i inne kiszone produkty warzywne.

Tabela 15. Częstotliwość zakupu kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych

Częstotliwość zakupu	Kiszone soki warzywne	Inne kiszone produkty warzywne
Codziennie	0,5%	0%
Kilka razy w tygodniu	6%	13%
Raz w tygodniu	8%	21%
Kilka razy w miesiącu	12%	38%
Kilka razy w roku	24%	25%
Nie kupuje w ogóle	49%	3%

Źródło: opracowanie własne

Uzyskane wyniki wskazują, że kiszone soki warzywne cieszą się umiarkowaną, mniejszą niż pozostałe kiszone produkty warzywne, popularnością wśród respondentów. Około 15% respondentów nie rzadziej niż raz w tygodniu kupuje kiszone soki warzywne (0,5% codziennie, 6% kilka razy w tygodniu oraz 8% raz w tygodniu). Do tego około 12% respondentów kupuje je kilka razy w miesiącu. Pozostałe osoby kupują takie soki sporadycznie (24%) lub nie kupują ich w ogóle (49%). W przypadku kiszonych produktów warzywnych częstotliwość zakupów jest większa. Ponad jedna trzecia respondentów kupuje je nie rzadziej niż raz w tygodniu. Jedynie 3% respondentów nie kupuje ich w ogóle. Wnioski te potwierdzają więc przypuszczenia wysnute na bazie analizy literatury, iż pewną niszą na rynku spożywczym są napoje fermentowane, które obecnie posiadają marginalny udział w rynku (Komisja Europejska, 2016). Powyższe wyniki wskazują, iż koncepcja fermentowanego soku z jarmużu zielonego wpisuje się w zidentyfikowaną niszę rynkową.

W kolejnym pytaniu ustalono miejsca zakupów kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych przez respondentów. Prezentację wyników podzielono na dwie części – kiszone soki warzywne i inne kiszone produkty warzywne. Wyniki zaprezentowano w poniższej tabeli (tabela 16).

Tabela 16. Miejsce dokonywania zakupów kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych

Miejsce zakupu	Kiszone soki warzywne	Kiszone produkty warzywne
Dyskont	21,5%	44,4%
Supermarket	24,9%	40,0%
Targ	17,6%	39,5%
Sklep osiedlowy	18,5%	34,6%
Sklep ze zdrową żywnością	0,0%	15,6%
Internet	1,0%	1,5%
Inne	0,0%	0,0%

Źródło: opracowanie własne

Wnioski uzyskane dla kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych są w dużej części zbieżne z tymi uzyskanymi dla owoców, warzyw lub ich przetworów. Niezależnie od kupowanego produktu, respondenci najczęściej dokonują zakupów w supermarketach i dyskontach, a w dalszej kolejności na targach i w sklepach osiedlowych. Udział Internetu i innych źródeł jest

marginalny. Wniosek ten jest istotny przede wszystkim o tyle, że pokazuje brak zróżnicowania miejsca zakupu kiszonych soków warzywnych względem innych badanych produktów. Uzyskane rezultaty przyczyniają się do definiowania miejsc dokonywania zakupów kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych. Z punktu widzenia koncepcji rozwoju nowych produktów spożywczych, wyniki uzupełniają dyskusję dotyczącą dystrybucji i sprzedaży kiszonych soków warzywnych poprzez wskazanie preferowanych miejsc zakupu produktu finalnego.

Wnioski płynące z analizy odpowiedzi udzielanych na dwa kolejne pytania pozwoliły wskazać częstotliwość spożycia kiszonych produktów warzywnych oraz częstotliwość spożycia kiszonych soków warzywnych. W pierwszej kolejności zaprezentowano wyniki ogólne – dla ogółu kiszonych produktów warzywnych oraz ogółu kiszonych soków warzywnych (tabela 17), a następnie zaprezentowano wyniki szczegółowe – w rozbiciu na poszczególne produkty (wykresy 4 i 5).

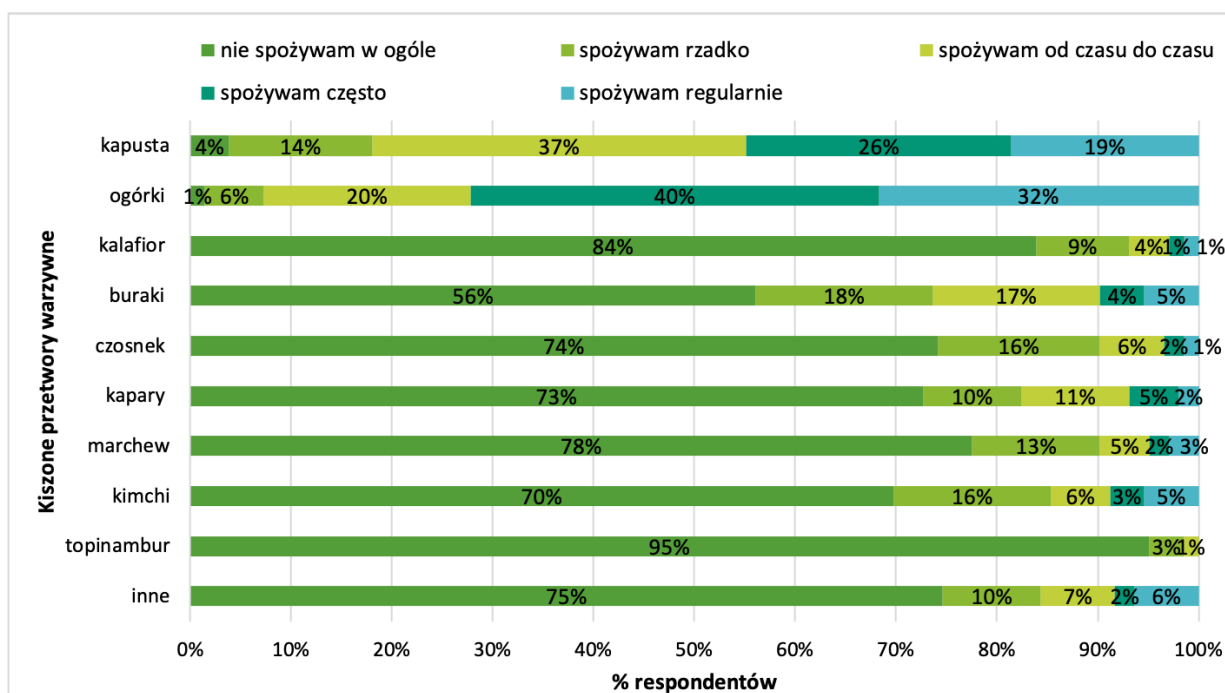
Tabela 17. Częstotliwość spożycia kiszonych soków warzywnych oraz kiszonych produktów warzywnych

Częstotliwość spożycia	Kiszone soki warzywne	Kiszone produkty warzywne
Spożywam regularnie	12,2%	38,5%
Spożywam często	16,1%	39,5%
Spożywam od czasu do czasu	19,0%	18,0%
Spożywam rzadko	17,6%	3,9%
Nie spożywam w ogóle	35,1%	0,0%

Źródło: opracowanie własne

Uzyskane wyniki dotyczące częstotliwości spożycia tych produktów są zbliżone do wyników dotyczących ich zakupów. W przypadku kiszonych soków warzywnych regularne spożycie deklaruje około 12% respondentów. Przez ponad połowę respondentów soki takie są spożywane „rzadko” lub nie są spożywane w ogóle. Wynik ten jest zbieżny z poprzednimi konkluzjami dotyczącymi występowania pewnej niszy na rynku spożywczym, którą stanowią opisywane napoje (Komisja Europejska, 2016). Kiszone produkty warzywne są spożywane „regularnie” lub „często” przez niemal 80% respondentów. W gronie respondentów nie znalazły się osoby, które nie spożywały kiszonych produktów warzywnych w ogóle.

W ujęciu szczegółowym, częstotliwość spożycia kiszonych produktów warzywnych wykazywała się istotną zmiennością. Wyniki, w rozbiciu na poszczególne produkty, zaprezentowano na wykresie 4. Odwołując się do produktów dostępnych na rynku, wyróżniono kiszone produkty warzywne na bazie: kapusty kiszonej, ogórków kiszonych, kalafiora kiszonego, buraków kiszonych, czosnku kiszonego, kaparów kiszonych, marchwi kiszonej, kimchi, topinamburu kiszonego, innych warzyw.



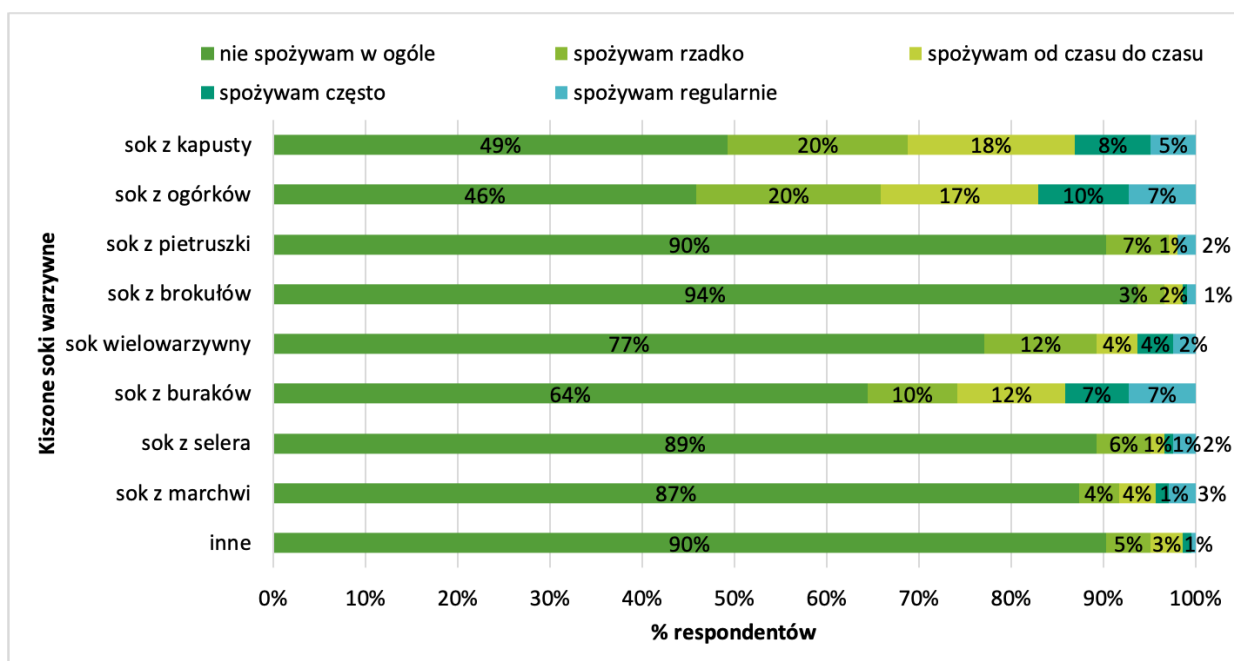
Wykres 4. Częstość spożycia wybranych kiszonych produktów warzywnych

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska i Sojkin, 2021)

Wyniki te potwierdzają przypuszczenia wysnute na bazie analizy pierwszych skojarzeń respondentów z „kiszonymi produktami warzywnymi”. Respondenci deklarują spożycie przede wszystkim kiszonej kapusty i kiszonych ogórków (ewentualnie kiszonych buraków). Pozostałe produkty spożywane są dużo rzadziej. Wskazuje to, iż w tym zakresie występuje możliwość wyróżnienia się przez przedsiębiorstwa dzięki rozwojowi nowych produktów fermentowanych, gdyż katalog spożywanych produktów jest faktycznie często zawężony wyłącznie do dwóch – kapusty i ogórków.

W następnym kroku przeprowadzono szczegółową analizę dla kiszonych soków warzywnych. Na bazie analizy dostępnych na rynku produktów wyróżniono następujące soki: sok kiszony z kapusty, sok kiszony z ogórków, sok kiszony z pietruszki, sok kiszony z brokułów, sok kiszony wielowarzywny, sok kiszony z buraków, sok kiszony z selera, sok kiszony z marchwi oraz inny sok kiszony.

Szczegółowe wyniki dla kiszonych soków warzywnych wykazują wysoką zgodność ze wszystkimi wcześniej przytoczonymi wnioskami. Konsumenci zadeklarowali najwyższą częstość spożycia kiszonych soków z kapusty i ogórków (na trzecim miejscu znalazł się kiszony sok z buraków). Oznacza to, iż fermentowany soku z jarmużu zielonego pozwoliłby na wyróżnienie się nie tylko na poziomie kiszonych produktów warzywnych, ale nawet na poziomie konkretnie kiszonych soków warzywnych, spośród których również zaobserwowano silną koncentrację. Katalog spożywanych soków fermentowanych znów ogranicza się głównie do zaledwie dwóch produktów – kiszonych soków z kapusty i ogórków. Konkluzje te są ważne wobec wniosków zaprezentowanych w rozdziałach koncepcyjnych pracy i wskazujących na wagę bazowania na strategii dyferencjacji (Widuri i Sutanto, 2019) w rozwoju nowego produktu spożywczego.



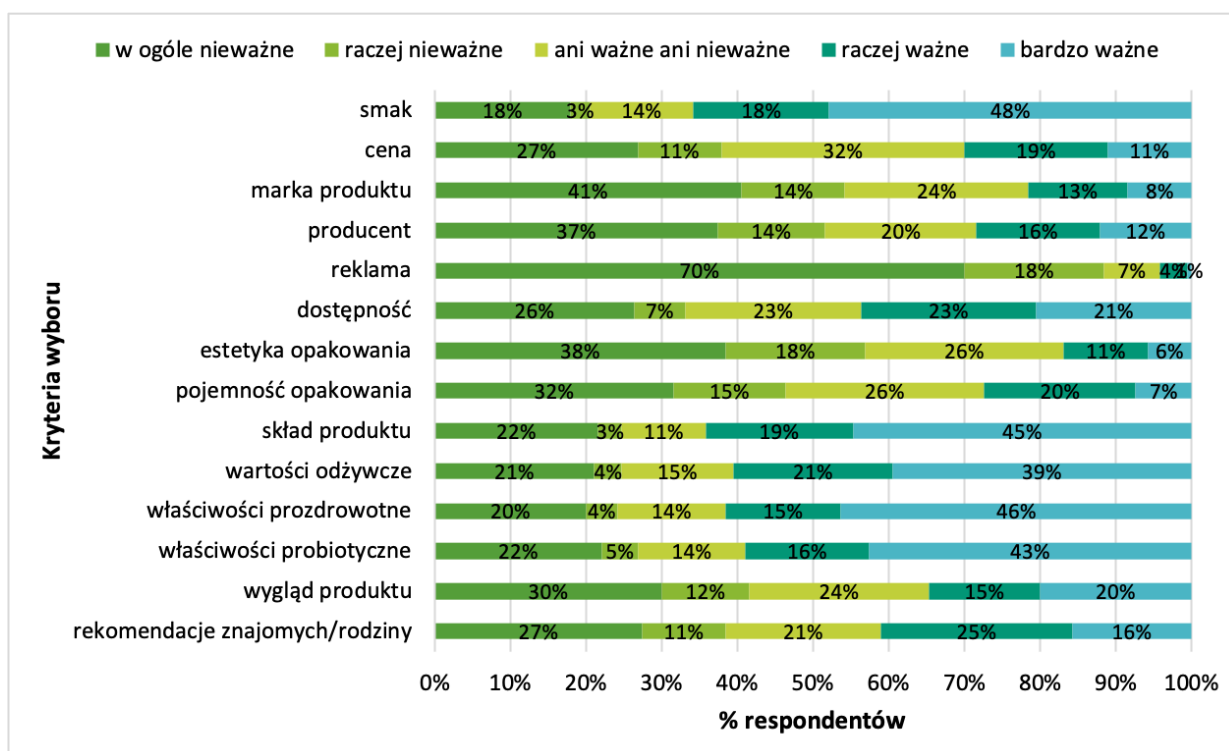
Wykres 5. Częstość spożycia wybranych kiszonych soków warzywnych

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska i Sojkin, 2021)

Biorąc pod uwagę specyfikę polskiego rynku spożywczego, wydaje się, że zainteresowanie konsumpcją fermentowanych produktów roślinnych wpisuje się w trendy obejmujące zdrową żywność. Należy podkreślić, że częste i regularne spożywanie produktów takich jak kapusta kiszona, ogórki kiszone czy buraki wynika głównie z polskiej tradycji i jest silnie zakorzenione w polskim społeczeństwie. Natomiast spożycie innych produktów, takich jak kimchi, jest najprawdopodobniej spowodowane zmieniającymi się trendami żywieniowymi, łatwym dostępem do produktów zagranicznych, a także większą świadomością wśród konsumentów dotyczącą właściwości prozdrowotnych tych produktów. W badaniach prowadzonych przez Wilczak (2019), autorka doszła do podobnych konkluzji, wykazując, że respondenci z Polski, Niemiec i Chorwacji znacznie częściej spożywają warzywa fermentowane w porównaniu z innymi krajami europejskimi, takimi jak Hiszpania czy też Wielka Brytania. Jest to, jak wskazała autorka, bezpośrednio związane z charakterystyką tradycyjnych przetworów oraz zwyczajami żywieniowymi tych narodów. Ponadto badania wykazały, podobnie jak w niniejszej pracy, że około połowa respondentów z badanych krajów deklarowała częstotliwość spożycia warzyw fermentowanych kilka razy w miesiącu (Wilczak, 2019).

W ostatnim pytaniu zawartym w części kwestionariusza dotyczącej wyborów konsumentów w zakresie konsumpcji kiszonych produktów warzywnych ustalono, jakie są dla respondentów najważniejsze kryteria wyboru kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych. Ustalenia te były istotne ze względu na samą podstawę koncepcji rozwoju nowych produktów, która wskazuje, że największe szanse na powodzenie rynkowe posiadają produkty posiadające charakterystyki istotne dla konsumentów (Adams i in., 2006; Costa i Jongen, 2006; O'Sullivan, 2017). W pierwszej

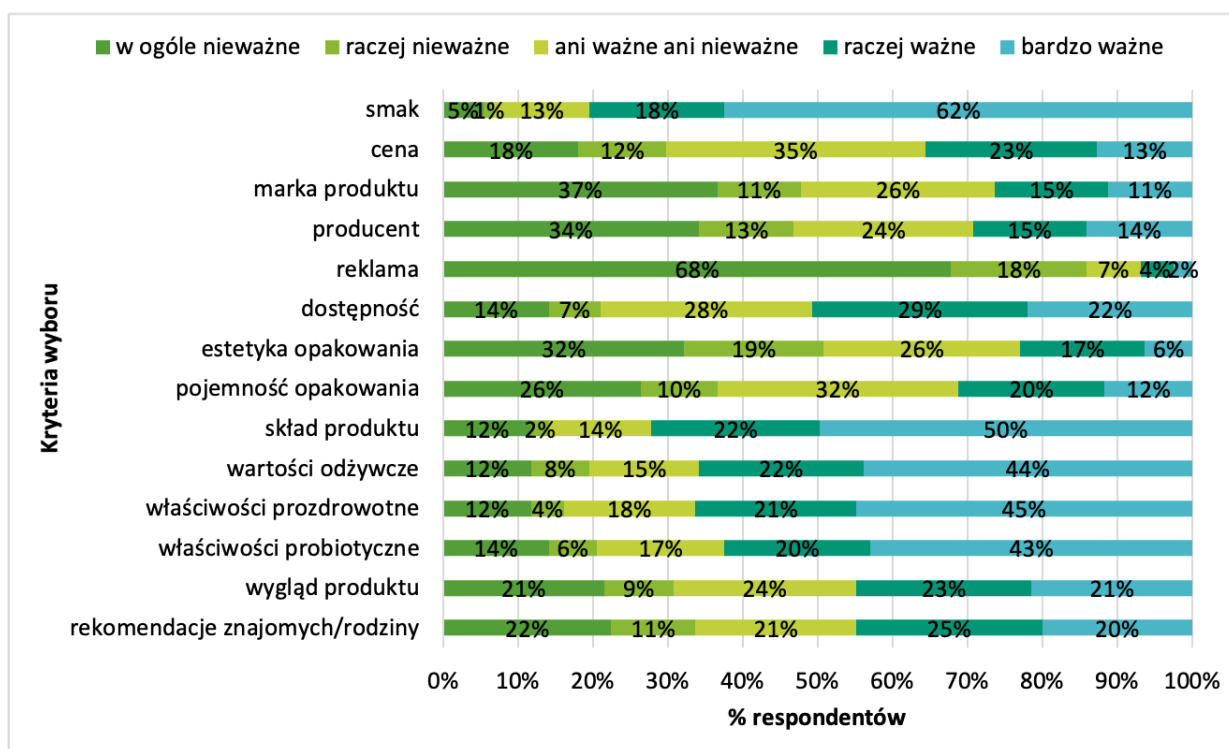
kolejności zaprezentowano poniżej kryteria wyboru kiszonek soków warzywnych. Dane zaprezentowano na wykresie 6.



Wykres 6. Najważniejsze kryteria wyboru kiszonek soków warzywnych

Źródło: opracowanie własne

Jako najważniejsze kryterium wyboru respondenci wskazali smak (bardzo ważny dla 48% respondentów). Ponadto, kolejne wskazywane kryteria obejmowały: właściwości prozdrowotne (bardzo ważne dla 46% respondentów), skład produktu (bardzo ważny dla 45% respondentów), właściwości probiotyczne (bardzo ważne dla 43% respondentów) i wartości odżywcze (bardzo ważne dla 39% respondentów). Tak jak w przypadku kiszonek produktów warzywnych respondenci zadeklarowali wysoką odporność na przekaz reklamowy (nieważny dla 70% respondentów). Na bazie powyższego można stwierdzić, iż fermentowany soku z jarmużu zielonego będzie miał największe szanse na sukces rynkowy, jeżeli w opinii konsumentów będzie smaczny oraz będzie posiadał właściwości prozdrowotne, probiotyczne i odżywcze. Z kolei inwestycja w reklamę, estetykę opakowania czy zarządzanie marką produktu wydają się nie nieść ze sobą korzyści w postaci zwiększonej akceptacji ze strony konsumentów. Poniżej zaprezentowano wyniki dotyczące kryteriów wyboru kiszonek produktów warzywnych (wykres 7).



Wykres 7. Najważniejsze kryteria wyboru kiszonych produktów warzywnych

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska i Sojkin, 2021)

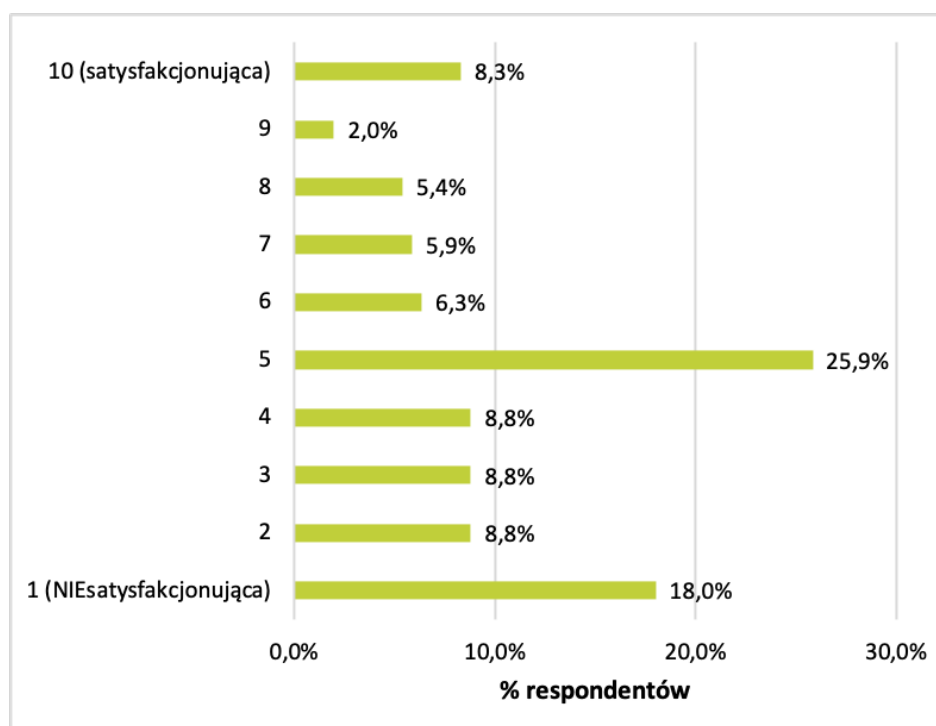
Zaprezentowane na wykresie wyniki wskazują na wysoką zgodność wskazań dla kiszonych soków warzywnych i produktów warzywnych. Uzyskane wyniki wskazują, iż najważniejszym kryterium jest dla konsumentów smak (bardzo ważny dla 62% respondentów). Kolejne wskazywane kryteria to kolejno: skład produktu (50% respondentów), właściwości prozdrowotne (45% respondentów), wartości odżywcze (44% respondentów) i właściwości probiotyczne (43% respondentów). Ponownie, respondenci deklarowali niezainteresowanie przekazem reklamowym. Aż 68% respondentów wskazało, iż reklamy w ogóle nie są ważne. Powyższe wyniki potwierdzają, iż najważniejszą wartością dla konsumentów jest 'zdrowie', które w niniejszej pracy stanowią ważny element rozważań i budowania koncepcji produktu (Bogue i Sorenson, 2007; Kothe i in., 2012).

Podobnie jak w niniejszej rozprawie, badania przeprowadzone przez Wadołowska i in., (2008) dotyczące wyborów żywieniowych Polaków wykazały, że najbardziej wpływowymi czynnikami były cechy sensoryczne, zwłaszcza smak. Jednakże, w przeciwieństwie do zaprezentowanych badań, autorzy przedstawili, że aspekty zdrowotne w umiarkowanym stopniu wpływały na wybory żywnościowe konsumentów. Najprawdopodobniej różnice w znaczeniu czynników wpływających na wybór żywności mogą wynikać z mniejszej grupy produktów żywnościowych przedstawionych w rozprawie. Badania przywołanych autorów dotyczyły znacznie szerszej gamy produktów, w tym owoców, warzyw, mięsa, ryb, słodczy, nabiału i produktów zbożowych. Co istotne, w trakcie badań obejmujących konsumpcję fermentowanych warzyw (Wilczak, 2019) wykazano, że najważniejszymi czynnikami wpływającymi na spożycie warzyw fermentowanych były walory smakowe, a w drugiej kolejności właściwości

prozdrowotne. Wyniki te są spójne z wynikami niniejszej pracy zarówno w zakresie kiszonych soków jak i przetworów.

Natomiast, Urala i Liisa (2004) zrealizowali badania poświęcone postawom konsumentów wobec żywności prozdrowotnej. Wyniki analizy czynnikowej wykazały, że siedem czynników odpowiada za stosunek konsumentów do niej: 1. Pojmowanie korzyści związanych ze spożyciem żywności funkcjonalnej. 2. Zaufanie do żywności funkcjonalnej. 3. Przekonanie o konieczności spożywania żywności funkcjonalnej. 4. Przekonanie o możliwości wykorzystania żywności funkcjonalnej jako lekarstwa. 5. Przekonanie, iż żywność funkcjonalna jest nieodłącznym elementem zdrowej diety. 6. Przekonanie o braku ryzyka związanego ze spożyciem żywności funkcjonalnej. 7. Smak żywności funkcjonalnej. **W związku z tym, przekonanie o występowaniu korzyści związanych ze spożyciem żywności funkcjonalnej było najistotniejszym czynnikiem determinującym stosunek konsumentów do niej oraz chęć jej zakupu i spożycia.** Powyższe badania również są również spójne z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy, ponieważ konsumenci wyraźnie utożsamiali kiszone produkty z cechami prozdrowotnymi. Należy nadmienić, że zgodnie z literaturą przedmiotu fermentowane produkty mogą charakteryzować się właściwościami funkcjonalnymi głównie z uwagi na obecność dobroczynnych mikroorganizmów i ich metabolitów (Marco i in., 2021).

W ostatniej części kwestionariusza skoncentrowano się na ofercie rynkowej kiszonych soków warzywnych. W odniesieniu do tego zagadnienia w pierwszej kolejności ustalono, czy oferta dostępnych na rynku kiszonych soków warzywnych jest dla respondentów satysfakcjonująca. Wyniki zaprezentowano na wykresie 8.



Wykres 8. Satysfakcja z oferty dostępnych na rynku kiszonych soków warzywnych

Źródło: opracowanie własne

Co istotne, wyniki sugerują, iż w opinii respondentów oferta mogłaby podlegać dalszemu rozszerzeniu. Dla niemal co piątego respondenta (18,1%) oferta jest wysoce niesatysfakcjonująca (odpowiedź „1”). Ponadto, ponad 70% respondentów wybrało odpowiedzi znajdujące się w przedziale od 1 do 5. Jedynie około 8% respondentów jest bardzo zadowolonych z obecnej oferty, przy czym pogłębiona analiza wskazała, że co trzeci respondent w tej grupie po prostu nie spożywa w ogóle kiszonych soków warzywnych. Wyniki wskazują, iż w obszarze fermentowanych soków warzywnych podaż nie jest w pełni dostosowana do popytu. Ograniczona satysfakcja klientów z oferty dostępnej na rynku sugeruje, że rozwój fermentowanego soku z jarmużu zielonego znajduje uzasadnienie.

Na podstawie odpowiedzi udzielonych w kolejnym pytaniu ustalono jakie są w opinii respondentów najważniejsze zalety i wady kiszonych soków warzywnych. Respondenci wśród zalet zdecydowanie najczęściej wskazywali ich prozdrowotny (n=70) i probiotyczny (n=20) charakter oraz wysoką zawartość witamin, w szczególności witaminy C (n=7), a także niską kaloryczność (n=5). Druga grupa zalet dotyczyła smaku produktów, który określany był m.in. jako niepowtarzalny i przyjemny (n=13). Trzecia, najczęściej wskazywana zaleta kiszonych soków warzywnych to ich trwałość rozumiana jako długi termin przydatności do spożycia (n=6). Najczęściej wskazywane wady dotyczyły dostępności (n=22), smaku (n=15), zapachu (n=9) i ceny (n=9). Pierwsza wskazywana przez respondentów wada nie dotyczyła więc stricte produktu, ale jego dostępności na rynku, która określana była m.in. jako słaba, mała lub niska. Wskazując smak jako wadę, respondenci używali takich określeń jak specyficzny, charakterystyczny czy osobliwy. Wynik ten pokazuje, iż jest to kwestia wysoce indywidualna i smak w przypadku kiszonych soków warzywnych jest postrzegany niemal równie często jako wada, jak i jako zaleta. Ponadto, respondenci podkreślali, iż wadą tych soków jest m.in. nieprzyjemny czy osobliwy zapach, a także wysoka cena. Wyniki te są zgodne z tymi dla ogółu kiszonych produktów warzywnych. Najważniejszą postrzeganą przez konsumentów zaletą są właśnie właściwości prozdrowotne, co wskazuje, iż wypracowana koncepcja nowego produktu spożywczego wpisuje się w trend związany ze zdrowym odżywianiem (Bogue i Sorenson, 2007; Horvat i in., 2019; Kothe i in., 2012). Największym ograniczeniem jest słaba dostępność produktów, co sugeruje, iż poprawa efektywności zarządzania w obszarze dystrybucji i sprzedaży z dużym prawdopodobieństwem mogłaby przełożyć się na zachowania zakupowe konsumentów.

Odpowiedzi udzielone na kolejne pytanie pozwoliły ustalić, skąd respondenci czerpią wiedzę na temat kiszonych soków warzywnych. Uzyskane wyniki zaprezentowano w tabeli 18.

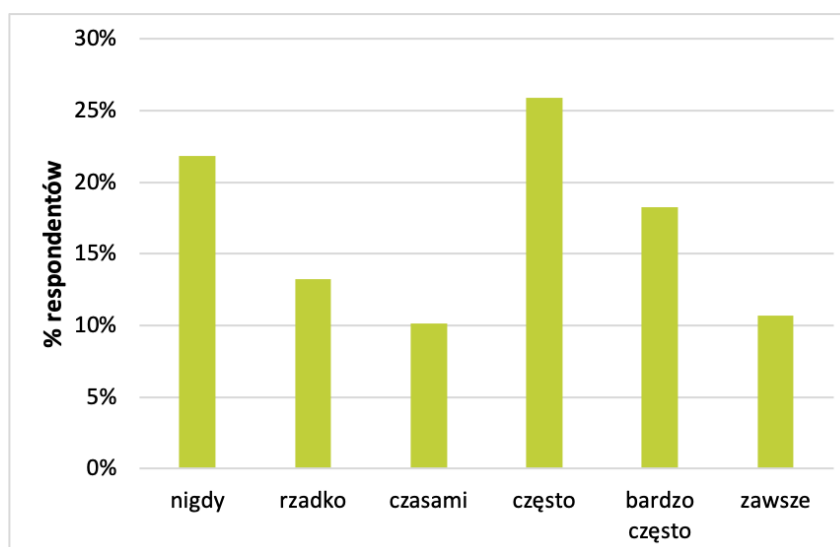
Tabela 18. Źródła wiedzy na temat kiszonych soków warzywnych

Źródło danych	Odsetek respondentów
Internet	70,4%
Znajomi/rodzina	57,0%
Telewizja np. programy specjalistyczne	19,6%
Prasa np. gazety, czasopisma	17,9%
Gazetki sklepowe (ulotki)	11,7%
Targi konsumpcyjne	9,5%
Reklama	2,2%

Źródło: opracowanie własne

Respondenci wskazali, iż dwa źródła informacji mają podstawowy charakter – Internet (70,4%) oraz znajomi/rodzina (57,0%). Wskazania te potwierdziły odpowiedzi uzyskane w pytaniu o najważniejsze kryteria wyboru kiszonych soków warzywnych, w którym respondenci zadeklarowali wysoką odporność na przekaz reklamowy. Jako najrzadziej wykorzystywane źródło danych respondenci wskazali właśnie reklamy (2,2%). Powyższe pozwala wnioskować, iż jednym z kryteriów sukcesu rynkowego fermentowanego soku z jarmużu zielonego jest skuteczne zarządzanie przekazem informacyjnym budowanym w Internecie. W nawiązaniu do zaprezentowanych wcześniej wyników dla fermentowanych soków warzywnych przekaz taki powinien bazować na cechach prozdrowotnych. Zapewnia to spójność przekazu z postrzeganiem tej kategorii produktowej przez konsumentów.

Kolejne analizowane zagadnienie dotyczyło częstotliwości zapoznawania się przez respondentów z informacją zamieszczoną na opakowaniu kiszonych soków warzywnych. Uzyskane wyniki zaprezentowano na wykresie 9.



Wykres 9. Częstotliwość zapoznawania się z informacją zamieszczoną na opakowaniu kiszonych soków warzywnych

Źródło: opracowanie własne

Ponad jedna czwarta konsumentów często zapoznaje się z informacją umieszczoną na opakowaniu, przy czym odpowiedzi „często”, „bardzo często” i „zawsze” zostały wybrane łącznie przez 55% respondentów. Z drugiej strony prawie jedna czwarta konsumentów nie zapoznaje się z takimi informacjami nigdy, a łącznie 45% pytanych wskazało jedną z odpowiedzi: „nigdy”, „rzadko”, „czasami”. W tym obszarze istotne było następnie ustalenie, z jakimi informacjami respondenci się zapoznają.

Ostatnim zagadnieniem badanym w tej części kwestionariusza były informacje na opakowaniu kiszonych soków warzywnych, na które respondent zwraca uwagę. Wyniki zaprezentowano w tabeli 19.

Tabela 19. Informacje na opakowaniu kiszonych soków warzywnych, na które respondenci zwracają uwagę

Informacje na opakowaniu	Odsetek respondentów
Lista składników	65,3%
Termin przydatności do spożycia	58,4%
Kraj pochodzenia	46,8%
Zawartość składników odżywczych w 100g/ml produktu	42,1%
Warunki przechowywania	32,6%
Certyfikaty np. ekologiczne; ISO; Dobre, Bo Polskie!	29,0%
Nazwa produktu	27,4%
Obecność dozwolonych substancji dodatkowych lub innych dodatków	27,4%
Oświadczenie żywieniowe np. źródło witaminy C	22,1%
Masa netto produktu	16,8%
Nazwa i adres producenta	16,3%
Oświadczenie zdrowotne np. dany składnik obniża ryzyko wystąpienia określonej choroby	15,3%
Marka produktu	12,6%
Stopień realizacji zalecanego dziennego zapotrzebowania na dany składnik	12,1%

Źródło: opracowanie własne

Większość respondentów, którzy zapoznają się z informacją na opakowaniu, zwraca uwagę na listę składników (65,3%) i termin przydatności do spożycia (58,4%). Trzecią najczęściej sprawdzaną na opakowaniu informacją jest kraj pochodzenia. Najmniejszy odsetek wskazań uzyskały oświadczenia zdrowotne (15,3%), marka produktu (12,6%) oraz stopień pokrycia zalecanego dziennego zapotrzebowania na dany składnik (12,1%).

Ostatnim elementem, na temat którego zbierano dane w kwestionariuszu była metryka respondentów obejmująca płeć (kobieta, mężczyzna), wiek (do 20 lat, 21-30 lat, 31-40 lat, 41-50 lat, 51-60 lat, powyżej 60 lat), status materialny (zdecydowanie powyżej średniej krajowej, powyżej średniej krajowej, średnia krajowa, poniżej średniej krajowej, zdecydowanie poniżej średniej krajowej) oraz miejsce zamieszkania (wieś, miasto poniżej 20 tys., miasto 20-99 tys., miasto 100-199 tys., miasto 200-499 tys., miasto powyżej 500 tys.). Dane te, w połączeniu z danymi zaprezentowanymi powyżej posłużyły weryfikacji pierwszej hipotezy badawczej. W tym celu, ze względu na charakter użytych zmiennych,

wykorzystano regresję porządkową. Procedurę przeprowadzono dwukrotnie – dla częstotliwości spożycia kiszonych soków warzywnych oraz częstotliwości spożycia kiszonych produktów warzywnych. W obu przypadkach zmienne zależne dotyczyły częstotliwości spożycia: kiszonych soków warzywnych oraz kiszonych produktów warzywnych, a zmienne niezależne obejmowały płeć, wiek, status materialny oraz miejsce zamieszkania. Skonstruowano więc dwa modele: (1) dla kiszonych soków warzywnych oraz (2) dla kiszonych produktów warzywnych. Dla obu skonstruowanych w ten sposób modeli w pierwszej kolejności określono stopień dopasowania (ang. *goodness-of-fit*) na bazie testów Pearsona (ang. *Pearson test*) i odchyłeń (ang. *deviance test*). Wartości istotności wyników testów na poziomie powyżej 0,05 wskazują dobre dopasowanie modeli. W uzupełnieniu dla powyższych testów obliczono pseudo-R² (Cox i Snell oraz Nagelkerke). Uzyskane wartości pseudo-R² wskazują, na ile dodanie określonej zmiennej niezależnej poprawia dopasowanie modelu. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Stopień dopasowania (ang. *goodness-of-fit*) modeli

Wyszczególnienie	Model 1 (kiszony sok warzywny)	Model 2 (kiszony produkt warzywny)
Wynik testu Pearsona	$\chi^2(338)=370,694; p=0,107$	$\chi^2(338)=226,574; p=0,854$
Wynik testu odchyłeń	$\chi^2(338)=282,411; p=0,988$	$\chi^2(338)=204,535; p=0,984$
pseudo-R ² (Cox i Snell)	0,233	0,059
pseudo-R ² (Nagelkerke)	0,244	0,065

Źródło: opracowanie własne

Uzyskane wyniki wskazują, iż zmienne niezależne pozwalają na lepsze objaśnienie zmiennej zależnej w przypadku kiszonych soków warzywnych. Wskazują na to wyższe wyniki pseudo-R². Pomimo tego, testy Pearsona i odchyłeń nie pozwalają na odrzucenie hipotezy o dobrym dopasowaniu modelu w żadnym z tych dwóch modeli.

W kolejnym kroku należało więc przeanalizować uzyskane wyniki dla zmiennych niezależnych zawartych w obu modelach. Zgodnie z charakterem zmiennych użytych w badaniu, w przypadku każdej ze zmiennych niezależnych przyjęto kategorię referencyjną. Wyniki interpretowano więc w ten sposób, że kategorie zaprezentowane w tabeli (np. płeć (kobieta)) porównywano do kategorii referencyjnych (np. płeć (mężczyzna)). Uzyskane współczynniki regresji dla obu przypadków zaprezentowano w tabeli 21.

Tabela 21. Wyniki analizy regresji

Wyszczególnienie	Model 1 (kiszone soki warzywne)	Model 2 (kiszone produkty warzywne)
Płeć (kobieta)	0,856**	0,364
Wiek (21-30 lat)	-2,305**	-0,323
Wiek (31-40 lat)	-1,231	0,024
Wiek (41-50 lat)	-0,428	0,411
Wiek (51-60 lat)	-0,679	-0,361
Status materialny (zdecydowanie poniżej średniej krajowej)	-0,417	-0,700
Status materialny (poniżej średniej krajowej)	-0,178	-0,803
Status materialny (średnia krajowa)	-0,248	-0,699
Status materialny (powyżej średniej krajowej)	-0,571	-0,840
Miejsce zamieszkania (wieś)	0,222	0,094
Miejsce zamieszkania (miasto poniżej 20 tys.)	1,483	0,406
Miejsce zamieszkania (miasto 20-99 tys.)	0,849**	1,331
Miejsce zamieszkania (miasto 100-199 tys.)	0,473	0,012 ⁺
Miejsce zamieszkania (miasto 200-499 tys.)	0,622	0,148

** oznacza $p < 0,01$; ⁺ oznacza $p < 0,1$

Źródło: opracowanie własne

Uzyskane wyniki pozwalają zweryfikować pozytywnie pozostawioną hipotezę w przypadku kiszonych soków warzywnych oraz negatywnie w przypadku kiszonych przetworów warzywnych. Analizy przeprowadzone dla kiszonych soków warzywnych wskazują, iż szansa, że kobiety wykażą się wyższą częstotliwością spożycia kiszonych soków warzywnych jest 0,856 razy większa niż w przypadku mężczyzn (przedział ufności 95%). Efekt był statystycznie istotny, co wykazał test Walda (Wald=7,046; $p < 0,01$). Ponadto, uzyskane wyniki sygnalizują, iż szansa, że osoby młode (w wieku 21-30 lat) wykażą się częstszym spożyciem kiszonych soków warzywnych jest ponad dwukrotnie niższa (-2,305) niż w przypadku osób w wieku powyżej 60 lat. Różnica była statystycznie istotna (Wald=8,686; $p < 0,01$). Prócz tego, wyniki wskazują, iż szansa, że osoby zamieszkujące miasta o liczbie mieszkańców mieszczącej się w przedziale 20-99 tys. wykażą się wyższą częstotliwością spożycia kiszonych soków warzywnych jest 0,849 razy większa niż w przypadku osób zamieszkujących największe ośrodki miejskie (powyżej 500 tys.). Statystycznie istotny efekt potwierdził test Walda (Wald=9,687; $p < 0,01$). W tym wypadku, uzyskane wyniki pozwalają na potwierdzenie hipotezy w zakresie płci, wieku i miejsca zamieszkania.

W przypadku kiszonych produktów warzywnych nie uzyskano statystycznie istotnych różnic pomiędzy kategoriami referencyjnymi i kategoriami zawartymi w tabeli. Badanie sugeruje jedynie (na poziomie istotności $p < 0,1$), iż szansa, że osoby zamieszkujące miasta o liczbie mieszkańców mieszczącej się w przedziale 100-199 tys. wykażą się wyższą częstotliwością spożycia kiszonych soków warzywnych jest 0,012 razy większa niż w przypadku osób zamieszkujących największe ośrodki miejskie (powyżej 500 tys.). Test Walda zwraca wartość 3,599 ($p = 0,058$). W tym wypadku uzyskane wyniki prowadzą

do negatywnej weryfikacji hipotezy ze względu na brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi kategoriami.

Podsumowując, większa szansa na wysoką częstotliwość spożycia kiszonek warzywnych występuje wśród kobiet niż wśród mężczyzn. Szansa ta jest wyższa w przypadku osób zamieszkujących miasta o liczbie mieszkańców 20-99 tys. niż w przypadku osób zamieszkujących największe ośrodki miejskie oraz niższa w przypadku osób w wieku 21-30 lat niż w przypadku osób w wieku powyżej 60 lat. Konkluzje te są istotne z punktu widzenia grup docelowych mogących przejawiać zainteresowanie spożyciem fermentowanego soku z jarmużu zielonego.

Podsumowanie

W niniejszym podrozdziale zaprezentowano wyniki prac koncepcyjnych oraz badań empirycznych prowadzące do wypracowania koncepcji nowego produktu spożywczego – fermentowanego soku z jarmużu zielonego – oraz ustalenia zachowań polskich konsumentów dotyczących niemlecznych produktów fermentowanych. W pierwszej kolejności zidentyfikowano trend rynkowy związany ze zdrowym odżywianiem, następnie skoncentrowano się na produktach oferujących dodatkowe korzyści zdrowotne. Z uwagi na potencjalne właściwości funkcjonalne produktów fermentowanych oraz niszę rynkową wybrano żywność fermentowaną bazującą na surowcach roślinnych – kiszone soki warzywne lub owocowe. Następnie, dokonano selekcji materiału badawczego, który tradycyjnie nie jest fermentowany a ponadto jest określany mianem „*superfood*” z uwagi na występujące w nim liczne związki o charakterze prozdrowotnym.

W kontekście badania wyborów konsumentów na rynku niemlecznych produktów fermentowanych określono ich charakterystyczne zachowania. W pierwszej kolejności wskazano, że wśród ankietowanych konsumpcja owoców, warzyw i innych przetworów plasuje się na stosunkowo wysokim poziomie. Ponadto, powyższe badania wskazały, że ¾ respondentów kojarzy kiszone warzywa z właściwościami prozdrowotnymi, w tym z właściwościami probiotycznymi, większą zawartością witaminy C i możliwością zwiększenia odporności. Kolejno wykazano, że częste spożywanie przetworów fermentowanych obejmuje głównie kapustę kiszoną, ogórki kiszone i buraki. Z kolei kiszone soki warzywne są rzadziej wybierane przez respondentów. Zidentyfikowano również najważniejsze czynniki wpływające na wybór produktów fermentowanych. Zdaniem respondentów wyróżniono następujące aspekty: smak, właściwości prozdrowotne, wartości odżywcze, właściwości probiotyczne oraz skład produktu. Przeprowadzono analiza regresji porządkowej pozwoliła zweryfikować **pozytywnie H1** w przypadku kiszonek warzywnych oraz **negatywnie** w przypadku kiszonek przetworów warzywnych.

4.2. Badania podstawowe i stosowane

Biorąc pod uwagę koncepcję rozwoju nowego produktu zaadaptowaną w niniejszej rozprawie doktorskiej, w fazie trzeciej – badawczej wyróżnia się dwa rodzaje badań: podstawowe i stosowane. Badania podstawowe koncentrowały się na określeniu właściwości prozdrowotnych i wybranych wyróżników jakościowych spontanicznie fermentowanego soku z jarmużu zielonego. Z kolei badania stosowane obejmowały analizy mające na celu określenie potencjalnie probiotycznych właściwości izolatów bakterii fermentacji mlekowej, wykorzystanych następnie do stworzenia prototypów produktu.

4.2.1. Badania podstawowe: wyróżniki jakościowe spontanicznie fermentowanego soku z jarmużu

Na etapie **badania podstawowych** nad rozwojem nowego produktu spożywczego przeprowadzono spontaniczną fermentację soku z zielonego jarmużu. Badania te miały na celu zdobycie nowej wiedzy na temat fermentowanego soku z jarmużu zielonego z uwzględnieniem wybranych cech determinujących jego jakość. Charakterystyka obejmowała: ocenę jakości mikrobiologicznej, właściwości przeciwdrobnoustrojowych, aktywności przeciwutleniającej, ogólnej zawartości związków fenolowych, zawartości witaminy C i składników mineralnych. Przeprowadzenie spontanicznej fermentacji soku z jarmużu stanowiło podstawę do dalszych badań, które koncentrowały się na rozwoju innowacyjnego produktu.

4.2.1.1. Jakość mikrobiologiczna

Świeże warzywa mogą zostać zanieczyszczone mikroorganizmami podczas uprawy, zbiorów i dystrybucji (Fröder i in., 2007). Wysokie wskaźniki zanieczyszczenia mikroorganizmami mogą w znacznym stopniu przyczynić się do niskiej jakości produktów i prawdopodobieństwa szybszego zepsucia żywności (Quansah, Kunadu, Saalia, Díaz-Pérez, i Chen, 2018). Jak podkreśla wielu autorów, jakość gotowych do spożycia, pakowanych warzyw jest często niezadowalająca. Co więcej, świeże i minimalnie przetworzone warzywa zostały uznane za potencjalne nośniki chorób przenoszonych drogą pokarmową ze względu na występowanie patogenów. Wśród mikroorganizmów chorobotwórczych występujących w gotowych do spożycia warzywach najczęściej wykrywane są bakterie *E. coli*, w tym szczepy wytwarzające toksyny Shiga (STEC) oraz *Salmonella* spp. (Mir i in., 2018). *E. coli* jest szczególnie ważna w ocenie jakości produktów, ponieważ została ona zdefiniowana w kryteriach mikrobiologicznych UE jako mikroorganizm wskaźnikowy higieny procesu dla minimalnie przetworzonych, gotowych do spożycia owoców i warzyw (Commission Regulation (EU), 2005). Zanieczyszczenie świeżych warzyw, w tym jarmużu, bakteriami z grupy *coli*, a w szczególności *E. coli* zostało opisane przez wielu autorów (Faour-Klingbeil, Murtada, Kuri, i Todd, 2016; Khalil, 2016; Oliveira i in., 2011). Z kolei obecność innych mikroorganizmów, takich jak enterokoki i gronkowce, może wskazywać na niewłaściwą higienę produkcji. Z drugiej strony, enterokoki

mogą stanowić również ważną część mikrobioty fermentującej i przyczyniać się do poprawy właściwości odżywczych, sensorycznych i trwałości produktów fermentowanych (M'hir i in., 2012).

Uwzględniając dane dotyczące mikrobiologicznego zanieczyszczenia warzyw i produktów warzywnych oraz obowiązujące kryteria ocena jakości mikrobiologicznej w niniejszej pracy obejmowała badania dotyczące ogólnej liczby drobnoustrojów, ogólnej liczby drożdży oraz pleśni, liczebności bakterii fermentacji mlekowej, enterokoków, gronkowców, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, jak również występowanie *E. coli* i bakterii z rodzaju *Salmonella*. Wyniki przedstawiono w tabeli 22 oraz na fotografiach 1 (A-D).

Tabela 22. Jakość mikrobiologiczna surowca i fermentowanego soku z jarmużu zielonego

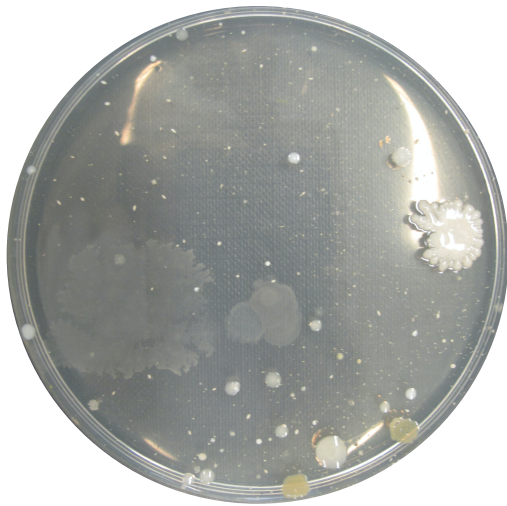
Kierunek badania (jtk/g/ml)	Świeży jarmuż	2 dzień fermentacji	4 dzień fermentacji	6 dzień fermentacji	8 dzień fermentacji	2 tygodnie przechowywania
Ogólna liczba drobnoustrojów	1,26x10 ⁷ b	6,4x10 ⁷ c	9,03x10 ⁷ cd	2,84x10 ⁸ e	1,32x10 ⁸ d	2,2x10 ⁶ a
Ogólna liczba drożdży i pleśni	5,7x10 ⁴ a	1,6x10 ⁷ d	5,9x10 ⁷ e	9,7x10 ⁶ cd	7,4x10 ⁶ c	2,3x10 ⁶ b
Bakterie fermentacji mlekowej	7,7x10 ² a	4,0x10 ⁷ c	9,9x10 ⁷ d	2,82x10 ⁸ e	1,22x10 ⁸ d	3,9x10 ⁶ b
Enterokoki	3,5x10 ² b	8,0x10 ¹ a	1,1x10 ⁶ d	1,00x10 ⁶ d	1,08x10 ⁶ d	7,6x10 ⁴ c
Gronkowce	2,9x10 ³ c	3,9x10 ³ c	3,1x10 ³ c	5,0x10 ¹ b	3,0x10 ¹ b	1,0x10 ¹ a
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,6x10 ⁴ d	1,92x10 ⁵ f	8,2x10 ⁴ e	7,0x10 ² c	3,8x10 ² b	<10 ¹
<i>Salmonella</i> spp.	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
<i>E. coli</i>	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹

Wyniki przedstawiono jako średnią z trzech powtórzeń i wyrażono jako logarytm liczby drobnoustrojów

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w obrębie badanej grupy drobnoustrojów nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne

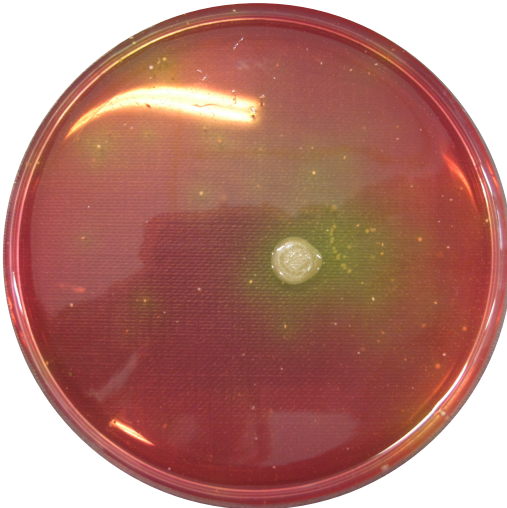
Uzyskane wyniki (tabela 22) wykazały, że w świeżym jarmużu ogólny poziom drobnoustrojów kształtował się na poziomie 1,26x10⁷ jtk/g, a drożdży i pleśni na poziomie 5,7x10⁴ jtk/g. Liczba bakterii mezofilnych i drożdży wzrastała do 4-6 dnia fermentacji, a następnie zmniejszała się w trakcie trwania procesu. Należy podkreślić, że pleśnie występowały jedynie w świeżym, nieprzetworzonym produkcie, natomiast podczas fermentacji soku nie odnotowano ich obecności, obserwowano jedynie obecność drożdży. Warto podkreślić, że jakość mikrobiologiczna świeżego jarmużu była podobna do tej zaobserwowanej w innych badaniach dotyczących gotowych do spożycia produktów na bazie sałat, szpinaku i jarmużu (Abadias i in., 2008; Bencardino i in., 2018; Campos i in., 2013; Oliveira i in., 2011).



**Wzrost bakterii na podłożu Standards Methods
(Plate Count Agar) (Biomaxima, Polska)**



**Wzrost enterokoków na podłożu Slanetz and
Bartley Agar (Biomaxima, Polska)**



**Wzrost gronkowców na podłożu Mannitol Salt
acc. to Chapman (Biomaxima, Polska)**



**Wzrost bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*
na podłożu Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid,
Kanada)**

Zdjęcie 1 (A-D). Przykładowe płytki Petriego przedstawiające jakość mikrobiologiczną świeżego jarmużu i fermentowanego soku z jarmużu

Źródło: opracowanie własne

Abadias i in., (2008) wykazali porównywalny poziom bakterii mezofilnych ($7,1 \log$ jtk/g) oraz drożdży i pleśni ($5,4 \log$ jtk/g) w gotowych do spożycia sałatach mieszanych. Podobnie Campos i in. (2013) zaobserwowali liczebność bakterii mezofilnych powyżej 10^7 jtk/g w różnych rodzajach sałat gotowych do spożycia. Z kolei w badaniach Oliveira i in. (2011) ogólny poziom mikroorganizmów przekroczył $7 \log$ jtk/g w minimalnie przetworzonych warzywach liściastych, takich jak jarmuż, sałata, szpinak i innych pozyskanych z portugalskich supermarketów. Jakość gotowej do spożycia lodowej sałaty (Bencardino i in., 2018) również była porównywalna do tej uzyskanej w przeprowadzonych badaniach. Autorzy nie wykryli obecności mikroorganizmów patogennych tj. *E. coli*, *L. monocytogenes* oraz bakterii z rodzaju

Salmonella spp. Ponadto, zaobserwowali, że średnia liczebność mikroorganizmów mezofilnych na początku, w środku i po upływie terminu przydatności do spożycia wynosiła odpowiednio: 6,88, 8,51 i 8,72 log jtk g⁻¹. Co ciekawe, w przytoczonym badaniu (Bencardino i in., 2018), uzyskane wyniki porównano z liczebnością mikroorganizmów występujących na próbkach świeżej, nieposzatkowanej sałaty lodowej, i liczebność mikroorganizmów mezofilnych była zdecydowanie niższa - 5,73 log jtk g⁻¹.

Istotnym wyróżnikiem jakości mikrobiologicznej fermentowanego soku z jarmużu była ocena liczebności bakterii fermentacji mlekowej. W zakresie mikrobioty fermentującej uwzględniono również enterokoki, które, jak wspomniano, z jednej strony są wskaźnikiem zanieczyszczenia, z drugiej natomiast mogą wspomagać proces fermentacji. Wykazano, że w świeżym jarmużu bakterie fermentacji mlekowej i enterokoki występowały na poziomie $7,7 \times 10^2$ i $3,5 \times 10^2$ jtk/g (tabela 22). Po 48 godzinach fermentacji soku zaobserwowano znaczący wzrost bakterii fermentacji mlekowej. Z kolei liczebność enterokoków wzrastała do 4 dnia procesu. Populacje obu grup utrzymywały się na porównywalnym poziomie do końca procesu fermentacji, jednak podczas etapu przechowywania zaobserwowano spadek liczebności obu grup bakterii. Podobną tendencję odnotowali inni autorzy podczas fermentacji soków owocowych lub warzywnych – zarówno podczas spontanicznej, jak i kontrolowanej fermentacji. Badacze (Wuyts i in., 2018) wykazali, że podczas spontanicznej fermentacji soku z marchwi liczebność bakterii fermentacji mlekowej znacząco wzrosła od 3 dnia procesu i wynosiła od $2,67 \times 10^5$ do $3,37 \times 10^9$ jtk/ml w zależności od wariantu próbki. Z kolei Hashemi i in. (2017) zaobserwowali wzrost populacji *L. plantarum* do poziomu 8,52 log jtk/ml podczas kontrolowanej fermentacji soku cytrynowego. Również Rakin, Vukasinovic, Siler-Marinkovic, i Maksimovic (2007) zauważyli, że po 8 godzinach fermentacji liczba *L. acidophilus* osiągnęła $7,0 \times 10^8$ jtk/ml w soku z buraków, $9,2 \times 10^7$ jtk/ml w soku z marchwi oraz $2,95 \times 10^7$ jtk/ml w mieszanym soku z buraków i marchwi.

W badanych próbkach występowały również bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* i gronkowce, a ich liczebność w świeżym jarmużu wynosiła kolejno: $3,6 \times 10^4$ oraz $2,9 \times 10^3$ jtk/g. Ich liczba istotnie zmniejszyła się po 6 dniu fermentacji – $3,08 \times 10^2$ jtk/ml dla bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i $3,0 \times 10^1$ jtk/ml dla gronkowców. Badania naukowe (Wuyts i in., 2018), potwierdzają możliwość występowania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w spontanicznie fermentowanych produktach warzywnych. Wuyts i in. (2018) zaobserwowali, że dopiero kilkudniowy proces fermentacji soku z marchwi istotnie wpływał na spadek liczebności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Również obserwacje innych badaczy (Yang i in., 2020) potwierdzają, że w warzywach krzyżowych, w tym przypadku w spontanicznie kiszonych kapuście, występują bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Liczebność tej grupy mikroorganizmów od pierwszego dnia procesu wynosiła 2,72 log jtk/ml, a w 30 dniu 1,09 log jtk/ml (w próbkach kiszonych z dodatkiem 1,5% NaCl). **Co istotne, w toku niniejszego badania nie wykryto obecności pałeczek *E. coli*, ani *Salmonella* spp. zarówno w świeżym soku, jak i podczas procesu jego fermentacji.** Jak wspomniano wcześniej, w niniejszej pracy zaobserwowano również występowanie gronkowców, których liczebność istotnie zmalała w trakcie trwania procesu fermentacji. Zgodnie z literaturą przedmiotu (Lee i in., 2022),

ocena ryzyka mikrobiologicznego wskazuje, że możliwość zachorowania na choroby przenoszone drogą pokarmową związane z występowaniem *S. aureus* jest stosunkowo niska. Niemniej jednak, stosunek i ilość spożywanych sałat oraz częste występowanie tego patogenu może być realnym zagrożeniem dla zdrowia konsumenta. Jak wspomniano wcześniej, w niniejszych badaniach wykryto obecność gronkowców, jednakże nie określono ich przynależności gatunkowej. Badania prowadzone przez Saifullah i in., (2018), dowiodły, że spośród 100 przebadanych próbek świeżych warzyw i owoców, w 54 stwierdzono obecność *S. aureus*. Z kolei spośród 54 izolatów *S. aureus*, 32 (59%) było koagulazododatnich, natomiast 22 (40%) było koagulazoujemnych.

4.2.1.2. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

W kolejnym etapie badań podstawowych określono działanie przeciwdrobnoustrojowe świeżego i fermentowanego soku z jarmużu wobec szerokiego zakresu mikroorganizmów, w tym bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także drożdży *C. albicans*. W tabeli 23 zaprezentowano wartości MBC/MFC oraz MIC dla soku podczas poszczególnych etapów fermentacji. Dla zahamowania wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych <95% nie określono podanych wartości.

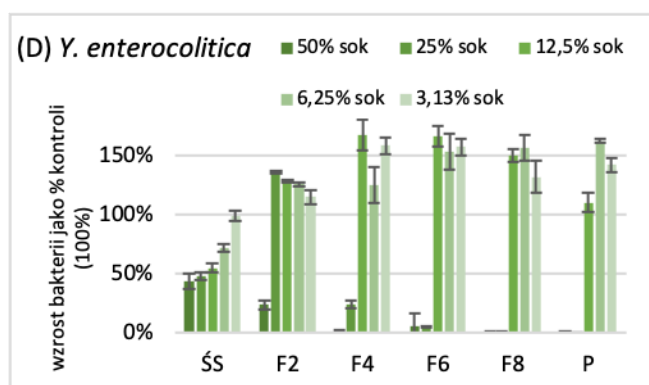
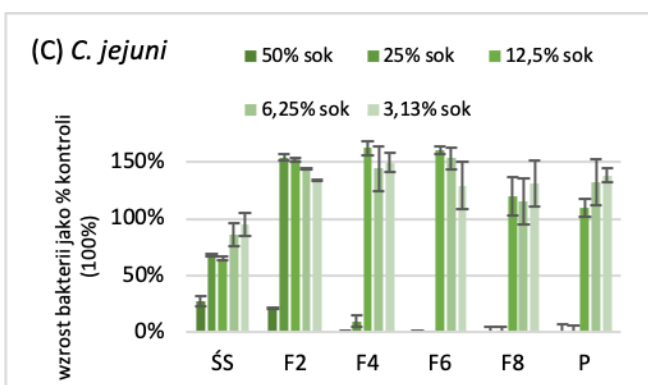
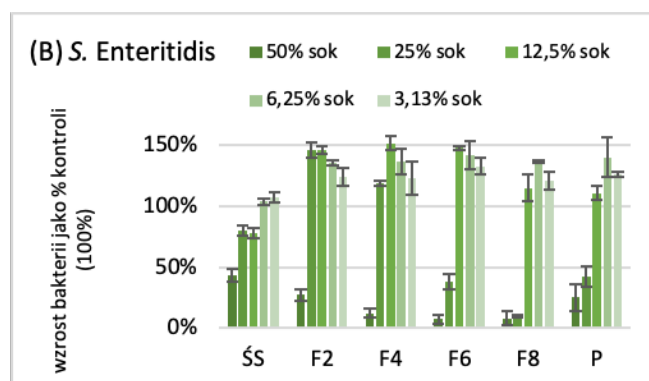
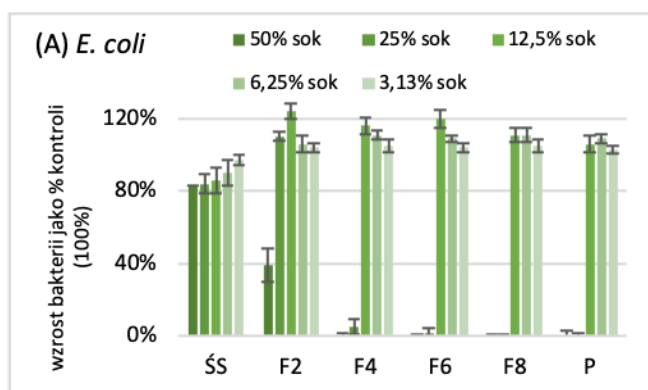
Tabela 23. Wartości MBC/MFC i MIC dla świeżego i spontanicznie fermentowanego soku z jarmużu zielonego

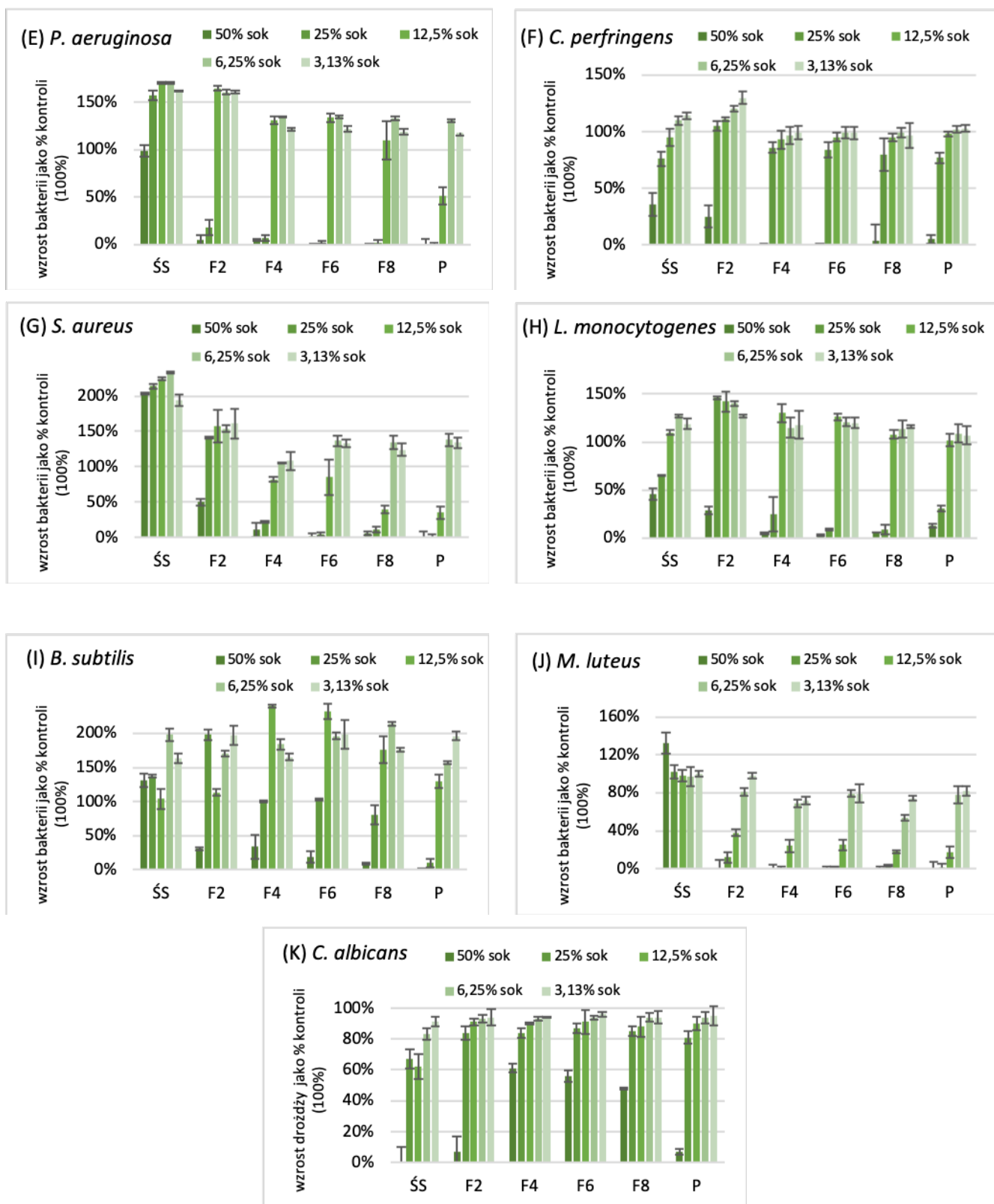
Mikroorganizm wskaźnikowy	MBC/MFC /MIC	Świeży sok	2 dzień fermentacji	4 dzień fermentacji	6 dzień fermentacji	8 dzień fermentacji	2 tygodnie przechowywania		
			Stężenie soku						
Bakterie Gram-ujemne	<i>E. coli</i>	MBC	n/o	50%	50%	50%	50%	25%	
		MIC	n/o	50%	50%	25%	25%	25%	
	<i>S. Enteritidis</i>	MBC	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	
		MIC	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	
	<i>C. jejuni</i>	MBC	n/o	n/o	50%	25%	50%	25%	
		MIC	n/o	n/o	50%	25%	25%	25%	
	<i>Y. enterocolitica</i>	MBC	n/o	n/o	n/o	n/o	25%	25%	
		MIC	n/o	n/o	50%	50%	25%	25%	
	<i>P. aeruginosa</i>	MBC	n/o	n/o	n/o	50%	50%	25%	
		MIC	n/o	50%	50%	25%	25%	25%	
	Bakterie Gram-dodatnie	<i>C. perfringens</i>	MBC	n/o	n/o	50%	50%	n/w	n/w
			MIC	n/o	n/o	50%	50%	50%	50%
<i>S. aureus</i>		MBC	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	25%	
		MIC	n/o	n/o	n/o	25%	25%	25%	
<i>L. monocytogenes</i>		MBC	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/w	
		MIC	n/o	n/o	50%	50%	50%	50%	
<i>B. subtilis</i>		MBC	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	50%	
		MIC	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	50%	
<i>M. luteus</i>		MBC	n/o	50%	25%	50%	50%	50%	
		MIC	n/o	50%	25%	25%	25%	25%	
Drożdże		<i>C. albicans</i>	MFC	50%	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
			MIC	50%	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o

MBC – ang. *minimum bactericidal concentration* – 100% zahamowania wzrostu, MFC – ang. *minimum fungicidal concentration* - 100% zahamowania wzrostu, MIC – ang. *minimum inhibitory concentration* – 95% zahamowania wzrostu, n/o – nie określono <95% zahamowania wzrostu

Źródło: opracowanie własne

Jak wskazuje powyższa tabela 23 właściwości przeciwdrobnoustrojowe spontanicznie kiszonego soku z jarmużu wzrastały w trakcie trwania procesu. Świeży sok nie wykazywał właściwości antagonistycznych w stosunku do większości badanych mikroorganizmów wskaźnikowych, oprócz *C. albicans*. W tym przypadku, 50% stężenie soku efektywnie hamowało wzrost drożdży. Najefektywniejszy wpływ hamowania wzrostu mikroorganizmów (zarówno na poziomie 100% jak i 95%) zaobserwowano dla soku fermentowanego 8 dnia i dla soku przechowywanego przez 2 tygodnie. Najbardziej wrażliwymi mikroorganizmami okazały się *M. luteus* oraz *E. coli*. Natomiast, mikroorganizmy takie jak: *B. subtilis*, *S. Enteritidis*, *S. aureus* oraz *C. albicans* były stosunkowo mało wrażliwe na oddziaływanie fermentowanego soku. Wyznaczenie wartości MBC, MFC oraz MIC demonstruje jedynie ogólną tendencję we właściwościach przeciwdrobnoustrojowych fermentowanego soku. W celu uszczegółowienia, na wykresie 10, zaprezentowano pogłębioną analizę uzyskanych wyników. Wyniki zostały przedstawione jako wzrost mikroorganizmów wskaźnikowych w stosunku do wzrostu w próbce kontrolnej, którą określono na poziomie 100%.





Wykres 10 (A-K). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe świeżego i fermentowanego soku z jarmużu zielonego względem bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnych i drożdży

Legenda: ŚS – świeży sok, F2 - drugi dzień fermentacji, F4 – czwarty dzień fermentacji, F6 – 6 dzień fermentacji, F8 – 8 dzień fermentacji, P – 2 tygodnie przechowywania

Źródło: opracowanie własne

Świeży sok wykazywał zróżnicowany wpływ na wzrost drobnoustrojów zależny od mikroorganizmu wskaźnikowego i stężenia soku. Wzrost bakterii: *C. jejuni*, *Y. enterocolitica*, *C. perfringens*, *S. Enteritidis* i *L. monocytogenes*, a także drożdży *C. albicans*, był hamowany, w szczególności przy 50% stężeniu soku. Słabą inhibicję zaobserwowano również w stosunku do bakterii *E. coli*, chociaż stopień redukcji wzrostu nie przekraczał 20% przy najwyższym badanym stężeniu soku. Bakterie Gram-dodatnie: *S. aureus* i *B. subtilis*, a także bakterie Gram-ujemne *P. aeruginosa* były niewrażliwe na działanie świeżego sok z jarmużu. Wręcz przeciwnie, dodatek świeżego soku powodował stymulację ich wzrostu. Efekt stymulujący wzrost po zastosowaniu niższych stężeń soku z jarmużu (poniżej 12,5%) stwierdzono również w stosunku do *C. perfringens*, *L. monocytogenes* i *C. albicans*. Jak wynika z danych literaturowych, świeży jarmuż może wykazywać działanie przeciwdrobnoustrojowe dzięki obecności związków polifenolowych. Ayaz i in. (2008) dowiedli, że frakcje fenolowe ekstrahowane z liści jarmużu skutecznie hamowały wzrost *S. aureus*, *B. subtilis* i *M. catarrhalis*. Nie hamowały natomiast wzrostu bakterii Gram-ujemnych, takich jak *P. aeruginosa* i *E. cloacae*. Z kolei badania prowadzone przez Fahey, Stephenson, Wade, i Talalay (2013) sugerują, że glukorafanina (prekursor sulforafanu będącego silnym przeciwutleniaczem) obecna w jarmużu ma właściwości antybakteryjne w stosunku do antybiotykoopornych szczepów *H. pylori*.

Silne zahamowanie wzrostu wszystkich badanych mikroorganizmów wykazywał sok po dwóch dniach fermentacji. Najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową obserwowano w przypadku 50% stężenia soku fermentowanego. Niższe stężenia soku (od 12,5% do 3,13%) nie wykazywały aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec większości mikroorganizmów, a nawet stymulowały wzrost badanych mikroorganizmów. Wyjątek stanowił *M. luteus*, który okazał się wyjątkowo wrażliwy na oddziaływanie fermentowanego soku z jarmużu. Wzrost *M. luteus* był silnie hamowany w całym zakresie stężeń fermentowanego soku, a najskuteczniej przez 50%, 25% i 6,25%. Zasadniczo, efekt hamujący wzrost mikroorganizmów wzrastał podczas procesu fermentacji, jednak najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do wszystkich badanych mikroorganizmów obserwowano w przypadku najwyższego stężenia soku. Warto zauważyć, że sok fermentowany utrzymał swoją aktywność przeciwdrobnoustrojową po 2 tygodniach przechowywania, zarówno w stężeniu 50%, jak i 25%. Wzrastająca aktywność przeciwdrobnoustrojowa soku podczas procesu fermentacji, jest zgodna z danymi literaturowymi (Hashemi i in., 2017; Liu i in., 2018; Michalak, Kubik-Komar, i in., 2020). Hashemi i in. (2017) opisali silniejszą aktywność przeciwbakteryjną wobec *E. coli* O157: H7 i *S. Typhimurium* w fermentowanym soku cytrynowym w porównaniu z sokiem świeżym. Również Michalak, Kubik-Komar, i in. (2020) zaobserwowali zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową soku z jarmużu poddanego fermentacji kontrolowanej względem *S. aureus*, *E. coli* i *S. enterica*. Z kolei Liu i in. (2019) także wykazali wzrost właściwości przeciwdrobnoustrojowych fermentowanego soku z pomidorów wobec bakterii *E. coli*.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa fermentowanych produktów wynika głównie z obecności bakterii kwasu mlekowego, które wytwarzają szereg metabolitów mogących wykazywać właściwości przeciwdrobnoustrojowe, takich jak kwasy organiczne (mlekowy, octowy i propionowy), bakteriocyny, dwutlenek węgla czy biosurfaktanty (Reis i in., 2012). Ponadto niskie pH produktu skutecznie przyczynia się do ograniczenia wzrostu większości mikroorganizmów, w tym patogenów przenoszonych drogą pokarmową (Arqués i in., 2015). W niniejszych badaniach wykazano, że proces spontanicznej fermentacji przyczynił się do obniżenia wartości pH z 6,25 w świeżym soku do 4,08 w 8 dniu fermentacji, która utrzymywała się na stałym poziomie po 2 tygodniach przechowywania (tabela 24).

4.2.1.3. Ogólna zawartość związków fenolowych, właściwości przeciwutleniające i zawartość witaminy C

Proces fermentacji mlekowej wpływa na zawartość związków biologicznie czynnych, tj. witamin, związków fenolowych, steroli lub aminokwasów (Filannino i in., 2018; Septembre-Malaterre i in., 2018). Metabolizm związków fenolowych podczas fermentacji jest zależny zarówno od składu i właściwości surowca roślinnego, jak również od mikrobioty fermentującej (Filannino i in., 2018; Septembre-Malaterre i in., 2018). W związku z tym, mikrobiologiczna biokonwersja związków fenolowych może przyczynić się do zwiększenia ich potencjału antyoksydacyjnego w żywności fermentowanej. Z kolei różnice w stopniu aktywności przeciwutleniającej podczas fermentacji można tłumaczyć uwalnianiem związków bioaktywnych ze sprzężonych związków fitochemicznych (Septembre-Malaterre i in., 2018).

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji wykazały, że spontaniczna fermentacja soku z jarmużu przyczyniła się do znacznego wzrostu całkowitej zawartości związków fenolowych (TPC) i aktywności przeciwutleniającej w ciągu 8 dni procesu, które następnie utrzymywały się na stałym poziomie po 2 tygodniach przechowywania (tabela 24).

Tabela 24. Ogólna zawartość związków fenolowych, właściwości antyoksydacyjne, zawartość witaminy C w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego

Próbka	Świeży sok	2 dzień fermentacji	4 dzień fermentacji	6 dzień fermentacji	8 dzień fermentacji	2 tygodnie przechowywania
TPC ¹ (mg GAE/100 ml)	48±1,2 ^{a*}	101±1,8 ^b	107±4,6 ^c	110±4,2 ^c	116±1,0 ^d	105±1,9 ^{bc}
TEAC ² (mM/100 ml)	4,5±0,1 ^a	7,2±0,3 ^d	6,3±0,2 ^{bc}	6,4±0 ^{bc}	5,9±0 ^b	6,8±0,3 ^{cd}
Witamina C (mg/100 ml)	9,7±0,8	n/w	n/w	n/w	n/w	n/w
pH	6,25±0,06	5,08±0,05	4,65±0,08	4,23±0,1	4,08±0,07	4,08±0,08

¹Całkowita zawartość związków fenolowych jest wyrażona w mg ekwiwalentu kwasu galusowego (GAE) na 100 ml soku

²Właściwości antyoksydacyjne - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) jest wyrażony w mmol ekwiwalentu Troloxu w 100 ml świeżego soku

*Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy p<0,05;

** poniżej granicy oznaczalności

Źródło: (Szutowska i in., 2020)

Oba badane parametry wzrosły dwukrotnie od 2 dnia fermentacji. Wartość TPC wzrosła z 48 do 101 mg GAE/100 ml, a aktywność antyoksydacyjna z 4,5 do 7,2 mM/100 ml. Wysoka zawartość badanych parametrów w fermentowanym soku z jarmużu jest ważną cechą jakościową tego produktu z uwagi na ich korzystne oddziaływanie prozdrowotne. Należy podkreślić, że wysoka zawartość związków fenolowych obecnych w produktach spożywczych niesie ze sobą wiele korzyści dla zdrowia człowieka, w tym właściwości antyoksydacyjne, antykancerogenne czy neuroprotektoryjne, a także potencjał w profilaktyce chorób układu sercowo-naczyniowego i naczyniowo-mózgowego (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Uzyskane wyniki były zgodne z wynikami innych badaczy (Kwaw i in., 2018), którzy również odnotowali wzrost zawartości związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej w kontrolowanym procesie fermentacji soku z morwy. Badacze sugerowali, że różnice w zawartości związków bioaktywnych mogą być spowodowane indywidualną ścieżką metaboliczną zastosowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Ponadto, Hashemi i in. (2017) wykazali, że aktywność przeciwutleniająca soku cytrynowego po fermentacji uległa znacznej poprawie, podczas gdy całkowita zawartość fenoli zmniejszyła się w wyniku metabolizmu *L. plantarum*. Z drugiej strony Jaiswal i Abu-Ghannam (2013) wykazali, że w zależności od zastosowanego szczepu bakterii fermentacji mlekowej, fermentacja soku z kapusty miała negatywny wpływ na zawartość polifenoli, co wpłynęło również na obniżenie właściwości przeciwutleniających badanego soku.

W świeżym i fermentowanym soku oznaczono również zawartość kwasu askorbinowego. Witamina C, która jest obecna w świeżych owocach i warzywach, charakteryzuje się licznymi korzyściami zdrowotnymi, m.in. działa jako silny przeciwutleniacz, bierze udział w biosyntezie kolagenu, hormonów czy przekaźników (Janda i in., 2015). Zawartość kwasu askorbinowego oznaczona w świeżym soku (9,7 mg/100 ml) była istotnie niższa niż zawartość witaminy C w świeżych liściach jarmużu podawana w żywieniowej bazie danych (93-120 mg/100 ml) (USDA, 2019). Pomimo tego faktu, świeży sok z jarmużu można uznać za ważne źródło kwasu askorbinowego. Jedna szklanka (250 ml) pokrywa ponad 30% Zalecanego Dziennego Spożycia (RDA) tej witaminy dla kobiet (70 mg) (Jarosz, 2012). Jednakże, spontaniczna fermentacja soku z jarmużu spowodowała spadek zawartości witaminy C, która znalazła się poniżej granicy identyfikacji i oznaczalności. Również inni autorzy (Kapasob i in., 2017) stwierdzili zmniejszenie zawartości kwasu askorbinowego po 12 godzinach fermentacji soku z nerkowców. Natomiast fermentacja soku ze słodkich cytryn, buraków, marchwi lub mieszaniny soku z marchwi i buraków nie przyczyniła się do zmian w zawartości witaminy C (Hashemi i in., 2017; Rakin i in., 2007). Najprawdopodobniej, spadek zawartości witaminy C w soku fermentowanym może być spowodowany konwersją kwasu askorbinowego do kwasu dehydroaskorbinowego przez enzym oksydazę askorbinianową wytwarzaną przez mikrobiotę fermentującą w produkcie (Adetuyi, Osagie i Adekunle, 2008).

4.2.1.4. Zawartość składników mineralnych i metali ciężkich (kadmu)

Dane literaturowe wskazują, że jarmuż jest bogatym źródłem składników mineralnych, takich jak Ca, Mg, K, Na, Fe i Cu (Jahangir i in., 2009; Thavarajah i in., 2016), dlatego też zawartość składników oznaczono w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu. Wyniki przedstawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Zawartość składników mineralnych w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego

Makro- i mikroelementy		Świeży sok	2 dzień fermentacji	4 dzień fermentacji	6 dzień fermentacji	8 dzień fermentacji	2 tygodnie przechowywania
Makroelementy (mg/100 ml)	Ca	197±7 ^a	211±11 ^a	200±3 ^a	195±3 ^a	201±11 ^a	208±5 ^a
	K	407±15 ^a	420±19 ^a	402±8 ^a	396±5 ^a	412±26 ^a	410±7 ^a
	Mg	57±2 ^a	58±2 ^a	56±0 ^a	57±1 ^a	57±2 ^a	57±0 ^a
	Na	106±1 ^a	105±5 ^a	100±1 ^a	103±4 ^a	108±4 ^a	110±3 ^a
Mikroelementy (mg/100 ml)	Fe	0,52±0,04 ^a	0,54±0,06 ^a	0,54±0,03 ^a	0,55±0,04 ^a	0,52±0,06 ^a	0,52±0,01 ^a
	Mn	0,70±0,02 ^a	0,71±0,04 ^a	0,70±0,01 ^a	0,70±0,01 ^a	0,72±0,01 ^a	0,72±0,04 ^a
	Zn	0,25±0,02 ^a	0,23±0,02 ^a	0,25±0,03 ^a	0,23±0,01 ^a	0,23±0,02 ^a	0,24±0,04 ^a
	Cu	n/w	n/w	n/w	n/w	n/w	n/w
Metale ciężkie (µg/l)	Cd	5,86±0,33 ^a	6,09±0,53 ^a	6,26±0,34 ^a	6,31±0,47 ^a	6,42±0,31 ^a	6,25±0,46 ^a

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$;

n/w – nie wykryto - poniżej granicy oznaczalności

Źródło: (Szutowska i in., 2020)

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości składników mineralnych na poszczególnych etapach fermentacji, co potwierdzają dane literaturowe. Badania przeprowadzone przez Rakin i in., (2007) również wykazały, że soki fermentowane z buraka ćwikłowego, marchwi lub mieszaniny buraka ćwikłowego i marchwi charakteryzowały się taką samą zawartością składników mineralnych (Ca, Mg, Na, K, Fe i P) jak ich surowce.

Wyniki analizy przeprowadzonej w niniejszej dysertacji wskazują, że w porcji (250 ml) soku z jarmużu w znacznych ilościach obecne są makroelementy: Ca (493 mg), K (1017 mg), Mg (143 mg) oraz Na (265 mg). Z kolei wśród mikroelementów zaobserwowano występowanie pierwiastków Fe (1,30 mg), Mn (1,75 mg) oraz Zn (0,63 mg). Nie wykazano obecności Cu, który był poniżej granicy oznaczalności. Thavarajah i in. (2016) uzyskali podobne wyniki dla próbek świeżego jarmużu – średnia zawartość K, Ca i Mn w badanym jarmużu uprawianym w USA wynosiła odpowiednio 488, 106 i 0,8 mg/100 g. W niniejszych badaniach stwierdzono nieco wyższą zawartość Mg (57 mg/100 ml) oraz niższą zawartość Fe (0,52 mg/100 ml) i Zn (0,25 mg/100 ml) w świeżym soku w porównaniu z jarmużem uprawianym w USA (Mg=44 mg/100 g, Fe=1,1 mg/100 g i Zn=0,7 mg/100g). Wartości te różniły się jednak w zależności

od badanego gatunku jarmużu. Ponadto, na zawartość składników mineralnych w jarmużu zielonym wpływają liczne czynniki, do których zalicza się m.in. rodzaj uprawy (np. konwencjonalna lub ekologiczna) czas zbioru, lokalizację, pogodę czy też odmianę rośliny. Przykładowo, badania przedstawione przez Thavarajah i in., (2019) dowodzą, że system organicznej uprawy okrywowej istotnie przyczynia się do wzrostu biomasy jarmużu i w konsekwencji ma wpływ na zawartość składników mineralnych, białka oraz węglowodanów.

Warto podkreślić, że pomimo stałego poziomu składników mineralnych, proces spontanicznej fermentacji może przyczyniać się do ich większej biodostępności. Składniki mineralne obecne w produktach roślinnych mają niską biodostępność ze względu na tworzenie przez nie kompleksów z substancjami niestrawnymi. Są one są związane i „uwięzione” w złożonych matrycach, co jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za ich niższą biodostępność. Fermentacja jest jedną z metod, która może prowadzić do degradacji tych kompleksów, dzięki czemu składniki mineralne stają się łatwiej dostępne oraz przyswajalne (Samtiya i in., 2021).

W celu oszacowania bezpieczeństwa badanego materiału oznaczono również zawartość kadmu – pierwiastka ciężkiego. Zawartość Cd wynosiła około 6 µg/l, co nie przekracza dopuszczalnych poziomów metali ciężkich w warzywach (0,20 mg/kg dla świeżego jarmużu) (Commission Regulation (EU), 2014). Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, świeży lub fermentowany sok z jarmużu można uznać zarówno za bezpieczny do spożycia, jak i za bogate źródło niezbędnych składników mineralnych.

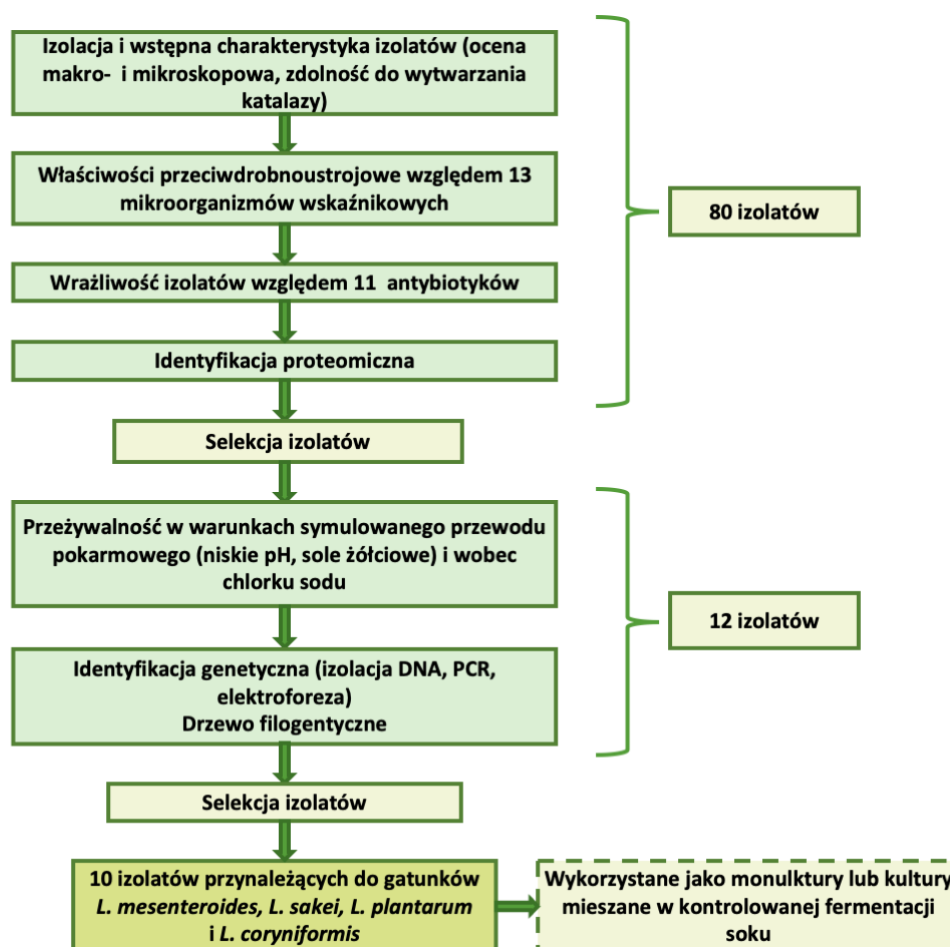
Podsumowanie

Przedstawiony etap badań podstawowych w procesie rozwoju nowego produktu koncentrował się na zdobyciu nowej wiedzy na temat możliwości wytwarzania fermentowanego soku z jarmużu zielonego oraz oceny jego potencjalnych wyróżników jakościowych jak i prozdrowotnych. Na wstępie zbadano jakość mikrobiologiczną surowca i fermentowanego soku, co pozwoliło na analizę zmian liczebności populacji mikroorganizmów. Jak wykazały przeprowadzone badania, po 48 godzinach procesu liczba bakterii fermentacji mlekowej znacznie wzrosła w porównaniu ze świeżym jarmużem. Jest to istotna informacja w kontekście całego procesu rozwoju nowego produktu, ponieważ spontanicznie fermentowany sok z jarmużu w kolejnym etapie badań posłużył jako źródło potencjalnych kultur starterowych do przeprowadzenia kontrolowanej fermentacji soku. Im wyższa liczebność bakterii fermentacji mlekowej, tym większe prawdopodobieństwo różnorodności gatunkowej izolatów oraz możliwość wyselekcjonowania wartościowych szczepów bakterii. Wykazano ponadto, że spontaniczna fermentacja soku przyczynia się do uzyskania potencjalnych właściwości prozdrowotnych poprzez poprawę właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Efekt hamujący wzrost mikroorganizmów otrzymanego soku wzrastał podczas fermentacji, ale w całym procesie aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec wszystkich badanych mikroorganizmów była najsilniejsza przy najwyższym stężeniu soku (50%). Ponadto badania wykazały, że spontaniczna fermentacja soku

z jarmużu przyczyniła się do znacznego wzrostu zawartości związków fenolowych ogółem i aktywności przeciwutleniającej. Z drugiej strony, proces ten przyczynił się do zmniejszenia zawartości witaminy C. Natomiast poziom składników mineralnych pozostał bez zmian. Przeprowadzenie spontanicznej fermentacji soku z jarmużu oraz wstępna analiza jego potencjalnych właściwości prozdrowotnych, była podstawą do określenia przyszłych kierunków badań obejmujących izolację bakterii fermentacji mlekowej oraz możliwości przeprowadzenia kontrolowanej fermentacji soku z wykorzystaniem autochtonicznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Również, wyniki powyższych badań pozwoliły zweryfikować hipotezę drugą. **Pozytywna weryfikacja hipotezy** obejmowała właściwości przeciwutleniające oraz wyższą zawartość związków fenolowych. Natomiast **negatywna weryfikacja** dotyczyła spadku zawartości witaminy C.

4.2.2. Badania stosowane: właściwości probiotyczne bakterii fermentacji mlekowej

W ramach rozwoju nowego produktu faza badawcza koncentrowała się również na **badaniach stosowanych**, które były ukierunkowane na konkretny cel i zastosowanie. Etap ten obejmował selekcję najbardziej wartościowych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na podstawie ich potencjalnych właściwości probiotycznych z uwzględnieniem również różnorodności gatunkowej. Procedura selekcji izolatów bakterii fermentacji mlekowej została przedstawiona na rysunku 7. Badania zawarte w niniejszej fazie dotyczyły: izolacji bakterii fermentacji mlekowej i ich wstępnej charakterystyki, aktywności przeciwdrobnoustrojowej, wrażliwości na antybiotyki, przeżywalności szczepów w warunkach symulujących przewód pokarmowy i w obecności NaCl, stworzenia drzewa filogenetycznego oraz identyfikacji proteomicznej i genetycznej.



Rysunek 7. Procedura selekcji izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Źródło: opracowanie własne na podstawie FAO/WHO (2006)

Istotnym zagadnieniem badawczym wydaje się być szczegółowa analiza szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z różnych fermentowanych produktów spożywczych pod kątem ich potencjału probiotycznego (Hill i in., 2014; Hutkins, 2019; Marco i in., 2021). Ważnym aspektem jest aby w badaniach skupić się na szczepach bakterii fermentacji mlekowej ze względu na ich domniemanie bezpieczeństwa, właściwości probiotyczne, możliwość produkcji cennych metabolitów, zdolność do

przekształcania różnych związków, adaptację do określonej niszy oraz szerokie zastosowanie w różnych procesach fermentacji jarmużu zielonego (EFSA, 2007; FDA, 2021; Filannino i in., 2018; Hill i in., 2014; Marco i in., 2021).

4.2.2.1. Izolacja i charakterystyka bakterii fermentacji mlekowej

Bakterie fermentacji mlekowej mogą być izolowane ze świeżych, niesfermentowanych roślin, jak również podczas różnych etapów spontanicznej fermentacji. Zazwyczaj, spontaniczna fermentacja rośliny umożliwia izolację i selekcję bardziej zróżnicowanej grupy mikroorganizmów, w obrębie której można dokonać wyboru izolatów o pożądanych właściwościach, szczególnie charakteryzujących się właściwościami probiotycznymi (Torres i in., 2020). Źródłem nowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej mogą być zarówno nowe, nietradycyjnie fermentowane produkty, np. jarmuż, opuncja figowa, flaszowiec peruwiańskim czy też smoczy owoc, jak i tradycyjne kiszane produkty, np. kiszona kapusta lub kiszane ogórki (Beganović i in., 2014; Polak-Berecka i in., 2018; Sofia i in., 2020; Verón i in., 2019).

Bakterie fermentacji mlekowej należą do dużej, heterogennej grupy Gram-dodatnich, katalazoujemnych, niewytwarzających form przetrwalnych, bakterii. Ponadto, charakteryzują się zdolnością do produkcji kwasu mlekowego jako głównego produktu końcowego, otrzymywanego w procesie fermentacji węglowodanów (Zheng i in., 2020). Mikroorganizmy te posiadają unikalny profil enzymatyczny, który umożliwia im metabolizowanie różnych związków występujących w matrycach roślinnych. Bakterie fermentacji mlekowej są niezwykle zróżnicowane na poziomie fenotypowym, ekologicznym oraz genotypowym. W związku z tym, naukowcy podjęli próbę reklasyfikacji taksonomicznej *Lactobacillaceae* i *Leuconostocaceae* na podstawie sekwencji całych genomów. W oparciu o przeprowadzone analizy autorzy zaproponowali ponowną klasyfikację rodzaju *Lactobacillus* na 25 rodzajów w tym zmieniony rodzaj *Lactobacillus*, obejmujący organizmy przystosowane do żywiciela, określane dotąd jako grupa *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus* oraz 23 nowe rodzaje, dla których przyjęto nazwy: *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agriolactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* i *Lentilactobacillus*. Ta zmiana klasyfikacji odzwierciedla pozycję filogenetyczną mikroorganizmów i grupuje bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w kłady o wspólnych właściwościach ekologicznych i metabolicznych (Zheng i in., 2020).

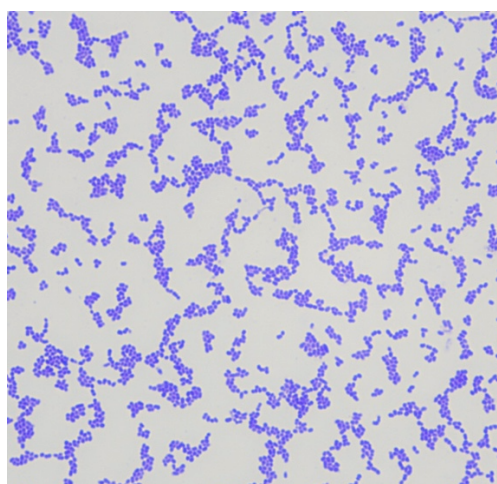
W niniejszej rozprawie wyizolowano 80 szczepów bakterii fermentacji mlekowej ze świeżego soku i z soku poddanego spontanicznej fermentacji na różnych etapach tego procesu. Przykłady płytek Petriego z koloniami bakterii fermentacji mlekowej przedstawiono na zdjęciu 1 (A i B). Wyizolowane szczepy bakteryjne poddano ocenie makroskopowej kolonii, ocenie mikroskopowej na podstawie barwienia metodą Grama (zdjęcie 2 (A-D)) oraz zdolności do wytwarzania katalazy. Wszystkie badane

izolaty bakterii należały do bakterii Gram-dodatnich (wyróżniono następujące formy morfologiczne: ziarniaki oraz pałeczki) oraz były katalazoujemne, co jest typowe dla bakterii fermentacji mlekowej.

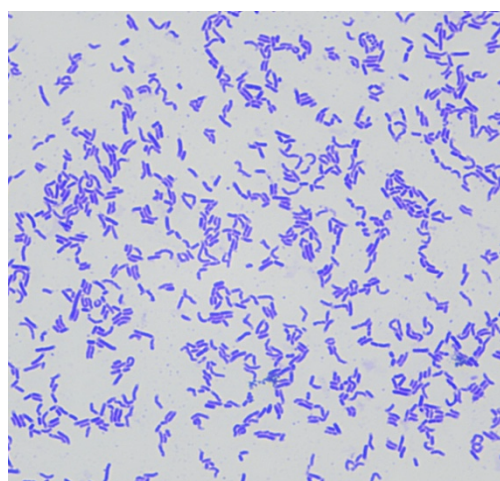


Zdjęcie 2 (A i B). Przykładowe płytki Petriego z podłożem MRS, z których wyizolowano bakterie fermentacji mlekowej

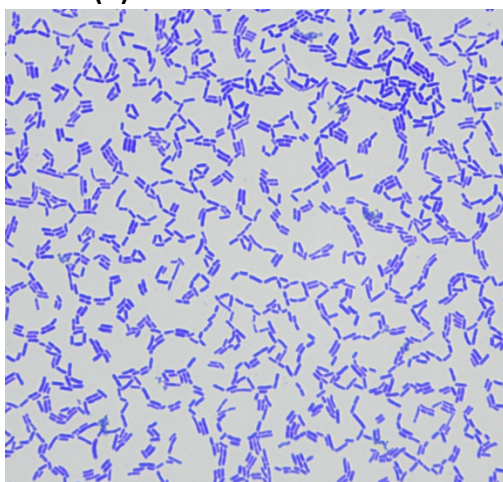
Źródło: opracowanie własne



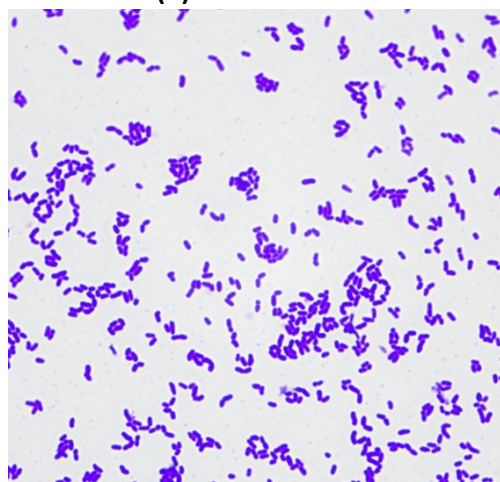
(A) *L. mesenteroides* JS027



(B) *L. sakei* JS032



(C) *L. plantarum* JS052



(D) *L. coryniformis* JS058

Zdjęcie 3 (A-D). Zdjęcia mikroskopowe izolatów bakterii fermentacji mlekowej

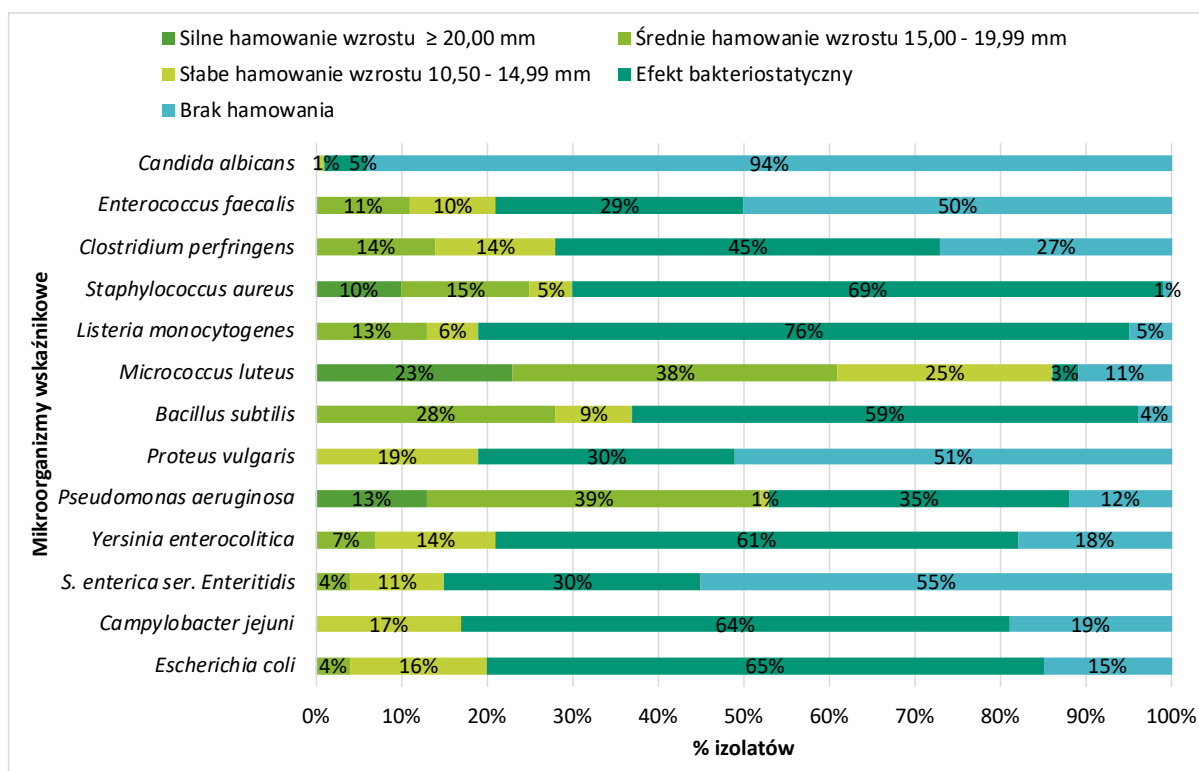
Źródło: opracowanie własne

4.2.2.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Dobre właściwości przeciwdrobnoustrojowe szczepów probiotycznych, szczególnie wobec mikroorganizmów chorobotwórczych, to cechy bardzo pożądane. Zgodnie z wytycznymi FAO/WHO (2006) oraz danymi literaturowymi (Šušković i in., 2010) aktywność przeciwdrobnoustrojowa kultur starterowych stosowanych w żywności fermentowanej jest jednym z podstawowych i ważniejszych parametrów określających potencjalne właściwości prozdrowotne produktów. Przykładowo, działanie szczepów probiotycznych w jelitach może przejawiać się poprzez wysoki poziom konkurencji wobec mikroorganizmów patogennych, wpływając na równowagę mikrobioty jelitowej (Reis i in., 2012).

W związku z tym, w celu określenia potencjalnych właściwości probiotycznych, wszystkie 80 izolatów bakterii fermentacji mlekowej przebadano pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec mikroorganizmów Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i drożdży. Szczegółowe dane dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej 80 izolatów zostały zawarte w załączniku 2.

Na wykresie 11 przedstawiono procent izolatów wykazujących określone działanie przeciwdrobnoustrojowe. Badane izolaty wykazywały silne i umiarkowane właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii Gram-dodatnich, natomiast w stosunku do patogenów Gram-ujemnych, obserwowano głównie słabsze właściwości inhibicyjne lub nawet aktywność bakteriostatyczną. Spośród bakterii Gram-dodatnich szczególnie wrażliwe na działanie wyizolowanych bakterii okazały się gatunki *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Micrococcus luteus*. Wśród bakterii Gram-ujemnych tylko bakterie z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* okazały się stosunkowo wrażliwe na oddziaływanie badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Z kolei najmniejszą wrażliwość wykazywały bakterie *Proteus vulgaris* i drożdże *Candida albicans*.



Wykres 11. Odsetek izolatów wykazujących określone działanie przeciwdrobnoustrojowe

Źródło: (Szutowska i Gwiazdowska, 2021)

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe kultur starterowych są jedną z istotniejszych cech funkcjonalnych niezbędnych do określenia właściwości probiotycznych wyizolowanych szczepów. Na podstawie badań przesiewowych (załącznik 2 oraz wykres 11) wyselekcjonowano 12 szczepów charakteryzujących się najwyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Szczegółowe informacje dotyczące strefy zahamowania wzrostu dla 12 izolatów zostały przedstawione w tabeli 26. Natomiast, na zdjęciach 4 (A-D) przedstawiono przykładowe płytki Petriego z właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi.

Izolaty bakterii fermentacji mlekowej, w szczególności JS034, JS052, JS053, JS058 i JS075 wykazały znaczącą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec większości drobnoustrojów wskaźnikowych. Natomiast, izolaty pochodzące z pierwszych dni procesu JS001, JS017, JS024, JS027 oraz JS031 wykazywały ogólnie nieco niższy potencjał przeciwdrobnoustrojowy, z wyjątkiem szczepów wskaźnikowych *E. faecalis*, *S. Enteritidis* i *P. vulgaris*, w stosunku do których nie wykazywały aktywności antagonistycznej. Tamang, Tamang, Schillinger, Guigas, i Holzapfel (2009) dowiedli, że szczepy z rodzaju *Lactobacillus* (które to pojawiają się zazwyczaj w późniejszych etapach fermentacji) posiadały silniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu z bakteriami z rodzaju *Leuconostoc* (które to, zazwyczaj najliczniej występują w początkowym etapie fermentacji). Ponadto wykazali, że izolaty pochodzące z rodzimych fermentowanych warzyw i pędów bambusa wykazywały zadowalającą aktywność antagonistyczną wobec szerokiego spektrum patogenów, w tym *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. mutans* i *P. aeruginosa*.

Tabela 26. Zahamowanie wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych przez wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej

Mikroorganizm wskaźnikowy/numer izolatu	Strefa zahamowania wzrostu (średnica w mm)											
	JS001	JS017	JS024	JS027	JS031	JS032	JS034	JS052	JS053	JS058	JS070	JS075
<i>B. subtilis</i>	13,3±0,6	11,7±0,6	14,7±0,6	16±0,0	15,33±0,6	18±0,0	17±0,0	19±0,0	18±0,0	17,3±0,6	14±0,0	17,6±0,6
<i>L. monocytogenes</i>	15±0,0	18,5±0,5	16,3±0,6	20,6±0,6	17±0,0	18,3±0,6	15,5±0,5	15,5±0,5	18,6±0,6	15±0,0	0	19±0,0
<i>S. aureus</i>	15,3±0,6	14±0,0	13±0,0	14,6±0,6	12,5±0,5	15,5±0,5	19,6±0,6	19,6±0,6	19,5±0,5	18±0,0	22,5±0,5	15,5±0,5
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	13,5±0,5	0	17,3±0,6	16,3±0,6	13,6±0,6	11,3±0,6	0	0
<i>M. luteus</i>	14,5±0,5	13,5±0,5	11±0,0	13±0,0	14,6±0,6	15,6±0,6	23,3±0,6	21±0,0	21±0,0	21,5±0,5	20,3±0,6	21,3±0,6
<i>C. perfringens</i>	11,6±0,6	11±0,0	0	13,3±0,6	13,5±0,5	14±0,0	15,5±0,5	13,6±0,6	14,6±0,6	13,3±0,6	0	13,5±0,5
<i>E. coli</i>	12±0,0	12±0,0	0	12,3±0,6	13,6±0,6	13,3±0,6	15,6±0,6	14±0,0	13,6±0,6	18,5±0,5	11±0,0	14,5±0,5
<i>C. jejuni</i>	14,3±0,6	18,3±0,6	15±0,0	16,5±0,5	15,3±0,6	15,6±0,6	11,5±0,5	14,5±0,5	13,5±0,5	13±0,0	0	15±0,0
<i>S. Enteritidis</i>	13±0,0	0	0	0	0	0	14±0,0	15,6±0,6	13,6±0,6	14,5±0,5	0	15,6±0,6
<i>Y. enterocolitica</i>	0	0	15±0,0	16,5±0,5	15,5±0,5	15,5±0,5	14,3±0,6	13,3±0,6	14±0,0	15,6±0,6	0	15,3±0,6
<i>P. aeruginosa</i>	0	11,6±0,6	14,6±0,6	17±0,0	15,5±0,5	15,6±0,6	17,5±0,5	16,6±0,6	17,6±0,6	16±0,0	21±0,0	17,3±0,6
<i>P. vulgaris</i>	0	0	0	0	13±0,0	0	13,3±0,6	12,6±0,6	13,5±0,5	11,5±0,5	15,3±0,6	16,5±0,5
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,3±0,6	11±0,0

Średnica przedstawiona jako średnia (mm) z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym

Źródło: (Szutowska i Gwiazdowska, 2021)



(A) *B. subtilis* PCM 2027



(B) *S. aureus* ATCC 33862



(C) *E. coli* ATCC 35218



(D) *P. aeruginosa* ATCC 9027

Zdjęcie 4 (A - D). Przykładowe płytki Petriego przedstawiające właściwości przeciwdrobnoustrojowe izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Źródło: opracowanie własne

Mechanizmy leżące u podstaw działania izolatów bakterii fermentacji mlekowej przeciwko mikroorganizmom patogennym wydają się być wieloczynnikowe i obejmują wytwarzanie licznych metabolitów tj. nadtlenu wodoru, dwutlenek węgla, kwasy organiczne (np. kwas mlekowy, octowy), biosurfaktanty, bakteriocyny jak również stymulację układu odpornościowego oraz modulację mikrobioty jelitowej. Bakterie fermentacji mlekowej mogą posiadać również zdolność do zapobiegania

adhezji patogenów poprzez konkutowanie o miejsca wiązania na komórkach nabłonka jelitowego, co w konsekwencji zmniejsza możliwości kolonizacyjne patogenów i tym samym zapobiega infekcjom (Campana i in., 2012, 2017; Reis i in., 2012; Šušković i in., 2010). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nadtlenu wodoru jest związana z jej silnym utleniającym działaniem na komórkę bakteryjną i niszczeniem podstawowych struktur molekularnych białek komórkowych. Natomiast działanie dwutlenku węgla jest dwukierunkowe, bowiem poza właściwą sobie aktywnością przeciwdrobnoustrojową, tworzy on środowisko beztlenowe, często szkodliwe dla drobnoustrojów chorobotwórczych. Metabolity takie jak biosurfaktanty posiadają zarówno właściwości przeciwdrobnoustrojowe jak i antyadhezyjne. W literaturze mechanizm ich działania jest przedstawiany na wiele sposobów i jest zależny od rodzaju cząsteczki. Zasadniczo, biosurfaktanty mają zdolność do uszkodzania i przenikania przez błony komórkowe (Naughton i in., 2019; Reis i in., 2012; Šušković i in., 2010).

Wytwarzanie kwasu mlekowego i octowego, a tym samym obniżanie pH, przyczynia się głównie do skutecznego hamowania wzrostu patogenów przenoszonych przez żywność lub mikroorganizmów psujących żywność (Reis i in., 2012; Šušković i in., 2010). Przeciwdrobnoustrojowe działanie kwasów organicznych jest spowodowane głównie przez niezdysonowaną formę cząsteczki, która przenika przez błonę komórkową mikroorganizmów patogennych w kierunku bardziej zasadowego cytozolu i zaburza podstawowe funkcje metaboliczne komórki (Šušković i in., 2010). Dane literaturowe wskazują, że izolaty bakteryjne pochodzące z późniejszych etapów fermentacji często charakteryzują się zwiększoną syntezą kwasów organicznych (Hutkins, 2019). Podobne wyniki uzyskano w niniejszej rozprawie. Przeprowadzone badania wykazały, że szczepy pochodzące z bardziej zaawansowanych etapów procesu spontanicznej fermentacji wykazują silniejszą aktywność antagonistyczną. Prawdopodobnie ich zdolność do znacznego zakwaszenia soku z jarmużu wpłynęła na ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Z kolei szczepy bakterii, wyizolowane ze świeżego soku oraz w pierwszych dniach procesu charakteryzowały się stosunkowo niskim antagonizmem wobec badanych mikroorganizmów wskaźnikowych. Większość badanych szczepów z tych okresów nie wykazywała aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec *E. faecalis*, *S. Enteritidis*, *P. vulgaris* czy też wobec *C. albicans*. Jak wykazano, szczepy wyizolowane w 4, 6 i 8 dniu fermentacji w mniejszym lub większym stopniu przyczyniały się do zahamowania wzrostu wszystkich mikroorganizmów wskaźnikowych (z wyjątkiem *C. albicans*). Jedynie izolaty JS070 oraz JS075 wykazywały niewielkie działanie przeciwwgrzybicze w stosunku do *C. albicans*. W badaniu przeprowadzonym przez Patel i in., (2014) nad szczepami bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanymi ze świeżych warzyw i tradycyjnie fermentowanej żywności indyjskiej, autorzy zauważyli odmienne właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec *E. coli* i *S. aureus* w zależności od użytego szczepu. Badania w przedstawionej pracy doktorskiej wykazały, że antagonistyczne oddziaływanie izolatów bakterii

może być szczepozależne. Ponadto cytowani badacze zaobserwowali, że szczepy *L. plantarum* posiadały lepsze właściwości inhibicyjne w porównaniu z innymi badanymi izolatami. Wyszuli oni hipotezę, że jest to związane ze zdolnością tych szczepów do produkcji bakteriocyn. Mechanizm specyficznej aktywności bakteriocyn może opierać się na hamowaniu syntezy DNA lub RNA, zaburzeniu potencjału błonowego oraz wycieku anionów lub kationów z komórki bakteryjnej (Gwiazdowska i Trojanowska, 2005). Na podstawie licznych doniesień naukowych (Biswas i in., 2017; Ponce i in., 2008; Yi i in., 2020) można przypuszczać, że również właściwości przeciwdrobnoustrojowe izolatów bakterii pochodzących ze świeżego i fermentowanego soku z jarmużu mogą być skorelowane z wytwarzaniem przez nie bakteriocyn.

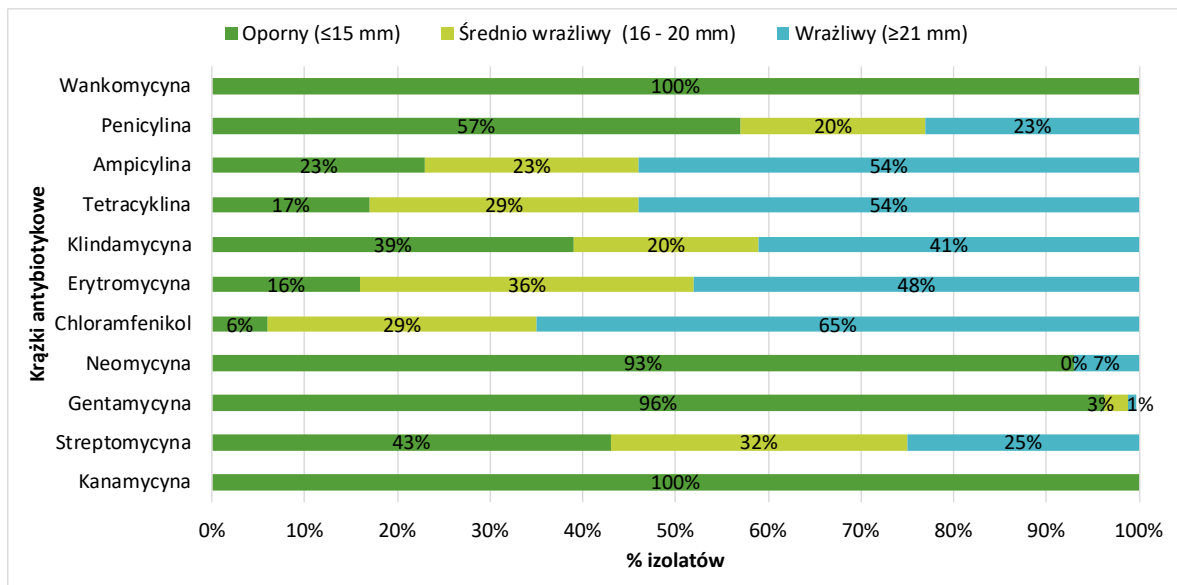
4.2.2.3. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej na antybiotyki

Według EFSA oporność wewnętrzna bakterii stanowi minimalne ryzyko rozprzestrzeniania się horyzontalnego antybiotykooporności, natomiast oporność nabyta jest uważana za poważne zagrożenie (EFSA, 2012). Ekspozycja na antybiotyki pozwala bakteriom rozwijać nowe mechanizmy przewyższania skutków działania środków przeciwdrobnoustrojowych. Jeden szczep bakterii może posiadać kilka rodzajów mechanizmów oporności. To, który z tych mechanizmów przeważa w komórkach danego szczepu bakteryjnego, zależy od rodzaju antybiotyku, jego miejsca docelowego, samego gatunku bakterii oraz od tego, czy jest on związany z mutacją plazmidową czy chromosomalną. W grupie bakterii fermentacji mlekowej obserwuje się trzy rodzaje oporności: wrodzoną, nabytą i mutacyjną (Mathur i Singh, 2005; Sharma i in., 2014).

Wrodzona oporność bakterii oznacza zdolność przetrwania mikroorganizmu w obecności środka przeciwdrobnoustrojowego, co wynika z jego cech osobniczych. Oporność ta ma minimalny potencjał do rozprzestrzeniania się horyzontalnego i zasadniczo nie stanowi zagrożenia. Wyróżnia się cztery podstawowe mechanizmy, dzięki którym bakterie stają się samoistnie odporne na dany antybiotyk: enzymatyczną inaktywację lub modyfikację, zwiększone usuwanie antybiotyków poprzez pompy odpływowe i zmiany przepuszczalności błony zewnętrznej, zmiana miejsc docelowych dla bakterii (białek wiążących) oraz wewnątrzkomórkową reorganizację metabolizmu komórki (Mathur i Singh, 2005; Sharma i in., 2014). Oprócz oporności wrodzonej, wyróżnia się również oporność nabytą. Bakterie mogą swoiście nabywać oporność na antybiotyki poprzez horyzontalny transfer genów (ang. *horizontal gene transfer* - HGT). Jest to proces, w którym materiał genetyczny może być przenoszony między bakteriami tego samego gatunku lub nawet różnych gatunków. Nabyta oporność np. na antybiotyki może wynikać z powstałej mutacji w genomie bakterii lub z nabycia dodatkowych genów kodujących mechanizm oporności (Mathur i Singh, 2005; Sharma i in., 2014).

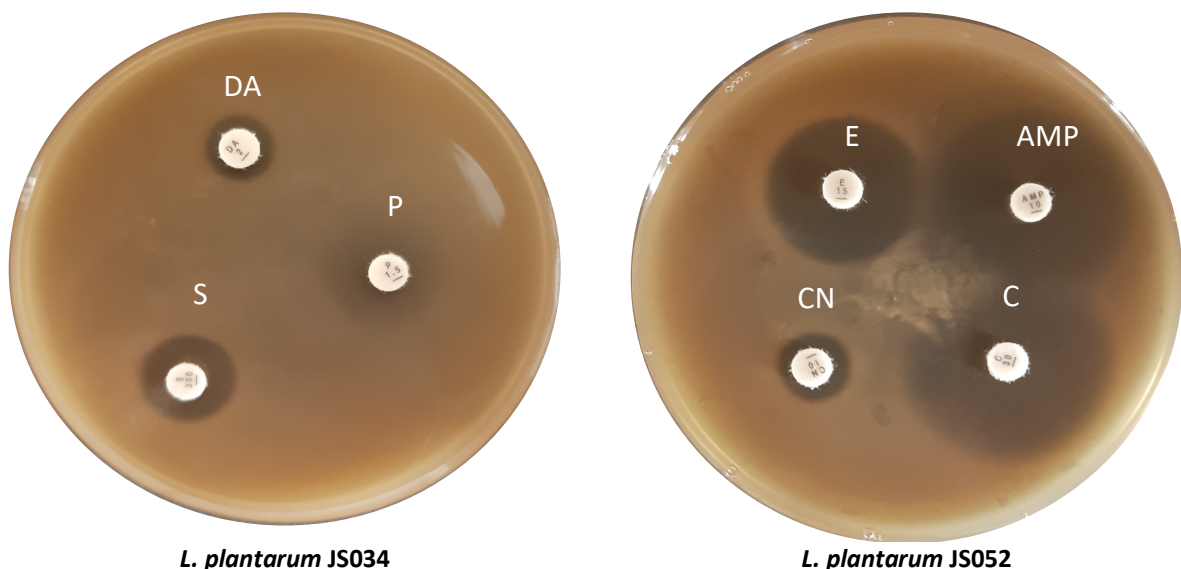
Z uwagi na możliwość przeniesienia oporności na antybiotyki z mikroorganizmów spożywczych, takich jak bakterie fermentacji mlekowej, na inne mikroorganizmy, przeprowadzono

badania mające na celu określenie oporności wyizolowanych szczepów na powszechnie stosowane antybiotyki. W związku z tym, wszystkie 80 izolatów bakterii poddano badaniom przesiewowym wobec szerokiego spektrum antybiotyków działających jako inhibitory syntezy białek lub ściany komórkowej. Szczegółowe wyniki dotyczące wrażliwości wszystkich badanych izolatów zostały przedstawione w załączniku 3. Z kolei procent izolatów wykazujących wrażliwość na określone antybiotyki został przedstawiony na wykresie 12. Na zdjęciu 5 (A i B) zaprezentowano przykładowe płytki Petriego przedstawiające wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej (JS034 i JS052).



Wykres 12. Odsetek izolatów wykazujących wrażliwość na antybiotyki

Źródło: (Szutowska i Gwiazdowska, 2021)



Zdjęcie 5 (A i B). Przykłady płytek Petriego przedstawiających wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej na antybiotyki

S – streptomycyna, DA – klindamycyna, P – penicylina, E – erytromycyna, AMP – ampicylina, C – chloramfenikol, CN – gentamycyna

Źródło: opracowanie własne

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że największy odsetek izolatów bakterii był wrażliwy na chloramfenikol (65% izolatów), tetracyklinę (54% izolatów), ampicylinę (54% izolatów) i erytromycynę (48% izolatów). Natomiast antybiotyki takie jak streptomycyna, klindamycyna oraz penicylina w mniejszym stopniu hamowały wzrost szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Stwierdzono również, że wszystkie izolaty były odporne na wankomycynę i kanamycynę, a odpowiednio 93% i 96% szczepów bakterii było opornych na neomycynę i gentamycynę. Wyniki te są zgodne z wynikami innych badaczy (Argyri i in., 2013; Colombo i in., 2020; Michalak i in., 2018; Nawaz i in., 2011), które również wykazały, że bakterie fermentacji mlekowej wyizolowane z różnych środowisk, takich jak sfermentowane oliwki, jarmuż czy produkty mleczne, były odporne na wankomycynę, kanamycynę i inne antybiotyki. Zgodnie z danymi literaturowymi (Mathur i Singh, 2005; Nawaz i in., 2011) oporność bakterii fermentacji mlekowej na wankomycynę, kanamycynę, gentamycynę lub neomycynę może być cechą właściwą dla danego gatunku lub nawet rodzaju bakterii. Dlatego też, taka oporność wrodzona nie może być przenoszona horyzontalnie między mikroorganizmami. Zgodnie z danymi literaturowymi, bakterie z rodzajów *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc* często wykazywały silną naturalną oporność na wyżej wymienione antybiotyki (Argyri i in., 2013; Colombo i in., 2020; Michalak i in., 2018; Nawaz i in., 2011). Z tego powodu taka zdolność jest również postrzegana jako cecha diagnostyczna i charakterystyczna dla tej grupy bakterii.

Szczegółowe wyniki pokazujące strefę zahamowania wzrostu dla 12 wyselekcjonowanych szczepów przedstawiano w tabeli 27. Przykładowo, izolaty pochodzące z pierwszych dni fermentacji - JS001, JS024 i JS027 wykazywały zróżnicowaną wrażliwość na streptomycynę. Izolaty JS001 i JS027 okazały się wysoko wrażliwe na ten antybiotyk w przeciwieństwie do izolatu JS024, który jest odporny na jego działanie. Również izolaty JS052 i JS053 wykazywały zróżnicowaną wrażliwość na chloramfenikol, erytromycynę, klindamycynę i ampicylinę. Izolat JS052 był wrażliwy wobec chloramfenikolu i erytromycyny, średnią wrażliwość wykazywał na działanie ampicyliny oraz okazał się odporny na działanie klindamycyny. Z kolei izolat JS053 był wysoce wrażliwy wobec działania klindamycyny i ampicyliny, wykazywał natomiast średnią wrażliwość wobec chloramfenikolu i erytromycyny. Wśród izolatów JS058, JS070 oraz JS075 także odnotowano zróżnicowaną wrażliwość wobec zastosowanych antybiotyków – gentamycyny, neomycyny, tetracykliny oraz penicyliny. Szczep JS058 wykazywał średnią wrażliwość wobec gentamycyny, tetracykliny i penicyliny oraz był odporny względem neomycyny. Z kolei izolat JS070 był wrażliwy na działanie neomycyny, tetracykliny oraz penicyliny i odporny na gentamycynę. Szczep JS075 wykazywał się brakiem wrażliwości wobec gentamycyny i neomycyny, jednakże był wrażliwy na działanie tetracykliny oraz penicyliny.

Tabela 27. Wrażliwość na antybiotyki wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej

Numer izolatu	Grupa antybiotyków										
	Inhibitory syntezy białek								Inhibitory syntezy ściany komórkowej		
	K (30 µg)	S (300 µg)	G (10 µg)	N (30 µg)	C (30 µg)	E (15 µg)	DA (2 µg)	T (30 µg)	AMP (10 µg)	P (1,5 IU)	VA (30 µg)
JS001	R (12,6±0,6)	S (21±0)	I (15,6±0,6)	I (15,5±0,6)	S (23,3±0,6)	S (23±0)	S (22±0)	S (25,5±0)	S (25,6±0,6)	I (18,3±0,6)	R (n/w)
JS017	R (n/w)	I (15,6±0,6)	R (9,5±0)	R (11,5±0,6)	S (22,6±0,6)	S (24,6±0,6)	S (18,6±0,6)	S (21±0)	S (25,6±0,6)	I (18,6±0,6)	R (n/w)
JS024	R (n/w)	R (13,6±0,6)	R (10,3±0,6)	R (n/w)	S (21±0)	I (17,3±1,1)	I (14,6±0,6)	I (17,6±0,6)	I (15,6±0,6)	R (12±0)	R (n/w)
JS027	R (11,6±0,6)	S (21±0)	R (14±0)	I (16±0)	S (20,6±0,6)	S (20,3±0,6)	S (25±0)	S (28,3±1,1)	S (22,6±1,1)	S (21,3±0,6)	R (n/w)
JS031	R (n/w)	I (16,3±0,6)	R (12±1)	R (12,3±0,6)	S (26,3±0,6)	S (23±1,7)	I (19,3±0,6)	S (25,6±1,1)	S (23±1)	I (17,6±1,5)	R (n/w)
JS032	R (10±0)	I (15±0)	R (10,3±0,6)	R (n/w)	I (17,3±0,6)	I (15,33±0,6)	I (16,3±1,1)	S (22±0)	S (25±0)	R (11,3±0,6)	R (n/w)
JS034	R (n/w)	I (16,3±0,6)	R (13±0)	R (9,6±0,6)	S (26,6±0,6)	S (23,3±0,6)	R (12,3±0,6)	I (16±1)	S (25±0)	R (10,3±0,6)	R (n/w)
JS052	R (n/w)	I (15,6±0,6)	R (14,3±0,6)	R (13±0)	S (25,6±0,6)	S (22,3±0,6)	R (10,3±0,6)	I (18,3±0,6)	I (16,6±0,6)	R (13,6±0,6)	R (n/w)
JS053	R (n/w)	I (17±0)	R (14,3±0,6)	R (12,3±0,6)	I (19,3±0,6)	I (16±0)	S (21,3±0,6)	S (23,3±0,6)	S (25,3±0,6)	R (10±0)	R (n/w)
JS058	R (n/w)	S (35,3±0,6)	I (20,3±0,6)	R (11,3±1,1)	S (37,3±3,0)	S (34,6±0,6)	S (28,6±1,1)	I (19,3±0,6)	S (32,6±2,5)	I (18,6±1,1)	R (n/w)
JS070	R (n/w)	S (35,3±0,6)	R (14,3±1,1)	S (20,6±0,6)	S (40,3±1,5)	S (40±0)	S (40±0)	S (42,3±2,5)	S (41±1,7)	S (32,6±1,1)	R (n/w)
JS075	R (n/w)	S (25,3±0,6)	R (9,6±0,6)	R (13,3±0,6)	S (32±1)	S (30±1,7)	S (31,6±0,6)	S (30,6±0,6)	S (31,3±2,3)	S (23,6±2,3)	R (n/w)

K – kanamycyna, S – streptomycyna, G – gentamycyna, N – neomycyna, C – chloramfenikol, E – erytromycyna, DA – klindamycyna, T – tetracyklina, AMP – ampicylina, P – penicylina, VA – wankomycyna

R – oporny (ang. *resistance*), I – średniowrażliwy (ang. *intermediate susceptibility*), S – wrażliwy (ang. *susceptibility*), n/w – brak zahamowania wzrostu

Średnica przedstawiona jako średnia (mm) z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym

Źródło: opracowanie własne

4.2.2.4. Tolerancja izolatów bakterii fermentacji mlekowej względem NaCl, niskiego pH i soli żółciowych

Kolejny etap badań w niniejszej rozprawie nad właściwościami funkcjonalnymi wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej obejmował ocenę ich wzrostu/tolerancji przy niskich wartościach pH (odpowiadających środowisku kwasowemu w żołądku), różnych stężeniach soli żółciowych oraz NaCl. Parametry te są niezwykle istotne z punktu widzenia technologicznego wykorzystania szczepów bakteryjnych na skalę przemysłową oraz określenia ich potencjalnych właściwości probiotycznych - powinny one przetrwać warunki panujące w przewodzie pokarmowym człowieka w takiej ilości, aby były korzystne dla zdrowia gospodarza. Szczegółowe wyniki obejmujące procent wzrostu wyselekcjonowanych 12 izolatów w stosunku do kontroli w badanych parametrach przedstawiono w tabeli 28.

Wobec różnego stopnia zasolenia, najlepszymi parametrami wzrostu (w stosunku do kontroli) charakteryzowały się izolaty JS001, JS032, JS034, JS052 oraz JS053. Natomiast izolaty JS024, JS027, JS058, JS070 i JS075 cechował nieco słabszy wzrost. Znikomy wzrost względem NaCl odnotowana dla izolatu JS017. Co istotne, zaobserwowano, że zdolności wzrostowe izolatów malały wraz ze wzrostem stężenia NaCl. Biorąc pod uwagę wpływ środowiska kwasowego (niskiego pH=2 i 3) wśród badanych izolatów najlepszy wzrost wykazywały izolaty JS001, JS034, JS052, JS053, JS058, JS070 oraz JS075. Pozostałe szczepy charakteryzowały się niższym potencjałem wzrostu, wobec tego parametru. Kolejno, zbadano wpływ stężenia soli żółciowych na zdolności wzrostowe izolatów bakterii fermentacji mlekowej. W toku analiz, udowodniono, że wobec 0,25% stężenia soli żółciowych, izolaty tj. JS001, JS017, JS027, JS052, JS053, JS058, JS070 i JS075 wykazywały się dobrym wzrostem. W miarę wzrostu zawartości soli żółciowych, większość izolatów charakteryzowały się słabym wzrostem lub jego brakiem. Jedynymi wyjątkami były izolaty JS027, JS052 i JS053, które nawet w tak niesprzyjającym środowisku wyróżniały się zadowalającym wzrostem.

Tabela 28. Tolerancja izolatów wobec NaCl, niskiego pH i soli żólciovych

Tolerancja izolatów wobec NaCl, niskiego pH i soli żólciovych	Czas inkubacji (h)	Procent wzrostu izolatów w stosunku do kontroli											
		JS001	JS017	JS024	JS027	JS031	JS032	JS034	JS052	JS053	JS058	JS070	JS075
2% NaCl	4	95%	39%	73%	85%	119%	104%	96%	96%	102%	86%	76%	91%
	8	101%	51%	83%	88%	96%	108%	102%	97%	100%	77%	67%	75%
	12	107%	52%	87%	90%	83%	100%	102%	99%	98%	74%	66%	73%
	16	114%	51%	89%	92%	79%	95%	108%	99%	98%	76%	69%	74%
	20	116%	50%	89%	94%	77%	93%	110%	99%	97%	78%	71%	76%
	24	116%	53%	90%	96%	76%	94%	111%	99%	94%	76%	72%	77%
4% NaCl	4	86%	37%	73%	78%	115%	101%	87%	85%	94%	75%	72%	85%
	8	91%	48%	83%	82%	86%	108%	92%	87%	95%	72%	65%	73%
	12	98%	48%	87%	85%	77%	99%	95%	90%	94%	69%	66%	70%
	16	107%	48%	90%	92%	74%	88%	100%	90%	96%	71%	67%	71%
	20	109%	49%	91%	95%	76%	83%	101%	91%	96%	72%	69%	71%
	24	107%	50%	92%	95%	74%	82%	102%	92%	95%	71%	70%	72%
6% NaCl	4	79%	41%	59%	70%	123%	98%	81%	77%	88%	70%	74%	82%
	8	83%	54%	72%	76%	91%	108%	88%	79%	87%	68%	64%	72%
	12	91%	68%	75%	81%	81%	101%	90%	82%	88%	69%	62%	69%
	16	98%	71%	77%	88%	77%	89%	96%	83%	90%	69%	63%	70%
	20	103%	73%	79%	92%	74%	80%	97%	85%	91%	70%	65%	72%
	24	103%	73%	79%	93%	73%	78%	97%	86%	90%	69%	66%	74%
8% NaCl	4	71%	34%	34%	63%	127%	83%	74%	76%	83%	67%	70%	79%

	8	75%	56%	57%	70%	90%	91%	74%	75%	81%	63%	65%	75%
	12	81%	65%	64%	75%	78%	85%	77%	76%	80%	65%	63%	70%
	16	86%	69%	66%	80%	73%	76%	83%	77%	82%	68%	63%	69%
	20	88%	72%	67%	82%	69%	68%	85%	78%	82%	68%	65%	69%
	24	87%	72%	68%	84%	66%	64%	87%	79%	82%	66%	66%	70%
pH 2,0	4	50%	0%	0%	29%	14%	2%	72%	53%	62%	77%	59%	65%
	8	58%	21%	0%	38%	33%	0%	74%	57%	59%	69%	59%	64%
	12	65%	26%	0%	42%	28%	0%	74%	57%	56%	67%	59%	63%
	16	71%	29%	1%	44%	23%	0%	77%	56%	55%	66%	59%	62%
	20	73%	29%	1%	46%	19%	0%	77%	56%	54%	66%	60%	62%
	24	72%	29%	1%	47%	17%	0%	75%	56%	54%	62%	60%	62%
pH 3,0	4	77%	9%	12%	59%	72%	15%	68%	64%	80%	75%	61%	59%
	8	81%	42%	15%	62%	55%	19%	58%	68%	76%	73%	67%	70%
	12	90%	51%	17%	66%	50%	21%	64%	67%	73%	76%	70%	74%
	16	98%	54%	19%	70%	49%	21%	71%	67%	74%	81%	73%	78%
	20	102%	54%	19%	73%	49%	22%	74%	68%	74%	83%	76%	81%
	24	101%	57%	20%	75%	49%	22%	77%	69%	73%	83%	79%	84%
0,25% soli żółciowych	4	54%	44%	0%	45%	20%	0%	34%	74%	84%	62%	58%	56%
	8	63%	54%	31%	57%	16%	0%	31%	70%	79%	54%	54%	54%
	12	70%	57%	39%	63%	15%	0%	33%	70%	76%	54%	53%	54%
	16	74%	58%	42%	68%	14%	0%	42%	76%	81%	54%	52%	55%
	20	75%	56%	42%	70%	14%	0%	47%	80%	87%	55%	53%	55%

	24	74%	54%	43%	72%	14%	0%	46%	83%	89%	53%	55%	56%
0,5% soli żółciowych	4	0%	0%	0%	17%	0%	0%	15%	52%	78%	10%	30%	35%
	8	8%	12%	13%	31%	0%	0%	21%	66%	87%	12%	32%	37%
	12	16%	23%	24%	37%	0%	0%	24%	73%	93%	12%	32%	37%
	16	21%	29%	29%	41%	0%	0%	29%	75%	93%	13%	33%	37%
	20	22%	33%	32%	44%	0%	0%	32%	76%	88%	13%	34%	38%
	24	24%	35%	34%	46%	0%	0%	34%	75%	83%	12%	33%	38%
1% soli żółciowych	4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	43%	60%	0%	13%	9%
	8	1%	0%	5%	15%	0%	0%	14%	54%	71%	0%	17%	14%
	12	3%	0%	15%	22%	0%	0%	20%	61%	74%	1%	18%	16%
	16	2%	0%	20%	27%	0%	0%	25%	65%	82%	4%	20%	18%
	20	0%	2%	23%	30%	0%	0%	29%	69%	84%	6%	21%	20%
	24	0%	5%	26%	33%	0%	0%	31%	71%	83%	8%	23%	23%

Źródło: opracowanie własne

W badaniach dotyczących bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z jarmużu (Michalak i in., 2018) dowiedziono, że różne izolaty wykazywały odmienną tolerancję na niskie wartości pH oraz różne stężenia NaCl i soli żółciowych. W przeciwieństwie do niniejszych badań, w przypadku wykorzystania dodatku 8% NaCl wspomniani autorzy zaobserwowali, że jedynie dwa badane izolaty (*L. paraplantarum* oraz *L. plantarum*) wykazywały się wzrostem w obecności wysokiego zasolenia. Z kolei w przypadku niskiego pH szczepy z gatunków *W. hellenica*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* i *P. acidilactici* rosły dobrze przy początkowym pH 4, podczas gdy *L. paraplantarum* i *L. brevis* wykazywały niewielki wzrost. Lepsze parametry wzrostu powyższych szczepów bakterii w stosunku do izolatów przedstawionych w niniejszej pracy były spowodowane wyższym poziomem pH zastosowanym przez badaczy (Michalak i in., 2018). Natomiast, podobnie jak w przedstawionej rozprawie, autorzy (Michalak i in., 2018) wykazali, że nie wszystkie szczepy charakteryzują się dobrym wzrostem w obecności soli żółciowych. Przykładowo, wzrost szczepu *L. brevis* był zdecydowanie lepszy z dodatkiem 1% soli żółciowych, aniżeli w czystej pożywce MRS. Autorzy sugerują, że przeżywalność tego szczepu może być związana z występowaniem białek warstwy S, które zwiększają przeżywalność drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym (Michalak i in., 2018). Również inni autorzy badający izolaty bakterii fermentacji mlekowej pochodzące z fermentowanych oliwek wykazali, że mikroorganizmy te są w stanie tolerować działanie soli żółciowych a nawet je neutralizować (Argyri i in., 2013). W swoich badaniach udowodnili, że większość badanych szczepów była oporna na działanie soli żółciowych nawet po 4 godzinach ekspozycji, natomiast 5 szczepów *L. plantarum* i 7 szczepów *L. pentosus* wykazywało częściową aktywność hydrolazy soli żółciowych (Argyri i in., 2013). Wyniki te były zbieżne z wynikami niniejszej pracy, ponieważ 3 badane izolaty (JS027, JS052 i JS053) z uwagi na swój dobry wzrost w obecności 1% soli żółciowych, mogą charakteryzować się wytwarzaniem wewnątrzkomórkowego enzymu hydrolazy soli żółciowych (BSH). Jednakże obecność enzymu BSH jest stwierdzana głównie w mikrobiocie jelitowej (Begley i in., 2006) dla której sole żółciowe są naturalnym składnikiem środowiska. Znacznie rzadziej obserwuje się go w szczepach pochodzących z próbek środowiskowych, takich jak nabiał czy żywność fermentowana (np. *Boza*, *Zabady* czy *Rayeb*). (Horackova i in., 2020; Shehata in , 2016). Jednakże, spekuluje się również, że geny *bsh*, odpowiedzialne za syntezę enzymów BSH, mogą być horyzontalnie przenoszone między mikroorganizmami (Begley i in., 2006; Ru i in., 2019).

4.2.2.5. Identyfikacja izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Dokonanie racjonalnego wyboru mikroorganizmów do kolejnych etapów pracy nad projektowaniem produktu wymagało, oprócz oceny ich właściwości, określenia przynależności gatunkowej wyizolowanych bakterii. Badanie te przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie wszystkie 80

izolatów zidentyfikowano na podstawie analizy proteomicznej (MALDI-TOF MS). Tym samym podjęto próbę zbadania zmian w dynamice populacji bakterii fermentacji mlekowej podczas procesu spontanicznej fermentacji soku z zielonego jarmużu. Zestawienie wyników identyfikacji przedstawiono w tabeli 29 (wyniki poglądowe dla 3 niezidentyfikowanych izolatów przedstawiono w załączniku 4). Badania wykazały, że świeży i 2-dniowy fermentowany sok z jarmużu charakteryzował się obecnością głównie gatunków przynależących do *Leuconostoc mesenteroides*. Obecność tych mikroorganizmów jest istotna, ponieważ metabolizm gatunków *Leuconostoc* i *Weisella* podczas spontanicznej fermentacji warzyw krzyżowych ma decydujące znaczenie dla powodzenia całego procesu. Na początkowym etapie fermentacji (często nazywanym fazą heterolaktyczną lub fazą gazową) bakterie te są w stanie znacznie obniżyć poziom pH produktu, produkować CO₂ w odpowiednich ilościach, a tym samym hamować wzrost mikroflory aerobowej lub psującej żywność (Hutkins, 2019).

Tabela 29. Identyfikacja proteomiczna izolatów bakterii fermentacji mlekowej

	L.p.	Nr izolatu	Identyfikacja	Wartość wskaźnika identyfikacji	NCBI	
Świeży sok	1.	JS001	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (nr identyfikacyjny: 33967)	
	2.	JS002		2,19		
	3.	JS003		2,31		
	4.	JS004		2,18		
	5.	JS007		2,32		
	6.	JS008		2,15		
	7.	JS010		2,20		
	8.	JS011		2,15		
	9.	JS012		2,24		
	10.	JS013		2,29		
	11.	JS014		2,31		
	12.	JS015		2,40		
	13.	JS016		2,41		
	14.	JS017		Brak identyfikacji – wynik poglądowy (załącznik 4)		
	15.	JS018	Brak identyfikacji – wynik poglądowy (załącznik 4)			
2 dzień fermentacji	16.	JS019	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (nr identyfikacyjny: 33967)	
	17.	JS020		2,23		
	18.	JS021		2,34		
	19.	JS022		2,30		
	20.	JS023		2,27		
	21.	JS024		2,42		
	22.	JS025		2,27		
	23.	JS026		2,07		
	24.	JS027		2,11		
	25.	JS028		2,07		
	26.	JM002		2,02		
	27.	JM010		2,31		
	28.	JS031	Brak identyfikacji – wynik poglądowy (załącznik 4)			
4 dzień fermentacji	29.	JS032	<i>Latilactobacillus sakei</i>	2,32	<i>Latilactobacillus sakei</i> (nr identyfikacyjny: 1599)	
	30.	JS033	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,07	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> (nr identyfikacyjny: 115541)	
	31.	JS034	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,42	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (nr identyfikacyjny: 1590)	

	32.	JS035	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (nr identyfikacyjny: 33967)
	33.	JS036	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,22	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> (nr identyfikacyjny: 115541)
	34.	JS037	Brak wzrostu na płytce		
	35.	JS038	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,06	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (nr identyfikacyjny: 33967)
	36.	JS039	Brak wzrostu na płytce		
	37.	JS040	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,13	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> (nr identyfikacyjny: 115541)
	38.	JS041	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,23	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (nr identyfikacyjny: 1590)
	39.	JS042		2,42	
	40.	JS043		2,12	
	41.	JS044		2,31	
	6 dzień fermentacji	42.	JS045	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,26
43.		JS047	2,29		
44.		JS048	2,32		
45.		JM048	2,25		
46.		JS050	2,24		
47.		JS051	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,21	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (nr identyfikacyjny: 1590)
48.		JS052		2,30	
49.		JS053		2,20	
50.		JS054		2,21	
51.		JS055		2,16	
52.		JS056		2,21	
53.	JS057	2,23			
54.	JM041	2,18			
8 dzień fermentacji	55.	JM042	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,07	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> (nr identyfikacyjny: 115541)
	56.	JM043		2,21	
	57.	JM044		2,06	
	58.	JS058		2,15	
	59.	JM059	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,16	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (nr identyfikacyjny: 1590)
	60.	JM060		2,37	
	61.	JS060	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,29	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> (nr identyfikacyjny: 115541)
	62.	JS062		2,27	
	63.	JS064		2,19	
	64.	JS067		2,18	
	65.	JS068		2,25	
66.	JS069	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,35	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (nr identyfikacyjny: 1590)	
67.	JS070	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,24	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> (nr identyfikacyjny: 115541)	
2 tygodnie przechowywania	68.	JS071	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,11	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (nr identyfikacyjny: 1590)
	69.	JS072		2,17	
	70.	JS073	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,03	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> (nr identyfikacyjny: 115541)
	71.	JS074		2,30	
	72.	JS075		2,07	
	73.	JS076	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,31	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (nr identyfikacyjny: 1590)
	74.	JS077		2,21	
	75.	JS078		2,22	
	76.	JS079		2,17	
	77.	JS080		2,14	
	78.	JM062		1,99	

79.	JM063	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,12	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> (nr identyfikacyjny: 115541)
80.	JM067		2,04	

Interpretacja wartości wskaźnika identyfikacji wg system MALDI Biotyper firmy Bruker:

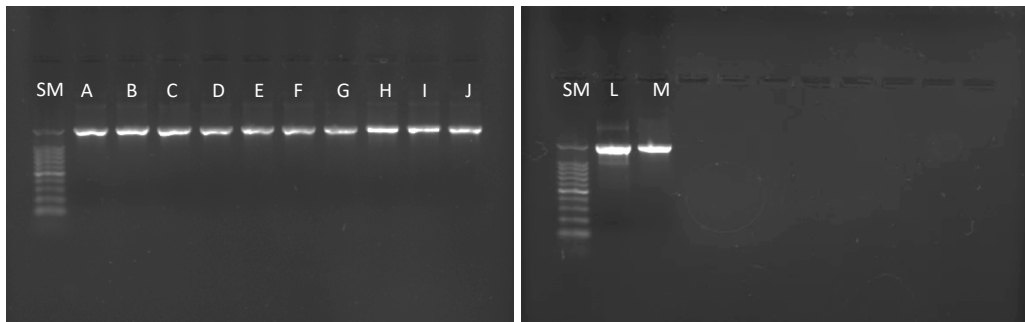
>2,00 – interpretacja z wysoką pewnością; 1,70 – 1,99 – identyfikacja z niską pewnością; 0,00 – 1,69 – brak możliwości identyfikacji

Źródło: opracowanie własne na podstawie raportów Jagiellońskiego Centrum Innowacji

Podczas fermentacji soku z jarmużu, początkowa aktywność mikrobioty spowodowała stworzenie optymalnego środowiska dla innych mikroorganizmów, odpowiedzialnych za silniejsze zakwaszenie produktu i pomyślne zakończenie procesu fermentacji. W kolejnych etapach fermentacji i przechowywania, spadek liczebności populacji *Leuconostoc* korespondował z sukcesją gatunków *Lactiplantibacillus plantarum*, *Loigolactobacillus coryniformis* oraz *Latilactobacillus sakei*. Bakterie te działały jako silni producenci kwasów, co przejawiało się spadkiem wartości pH z 5,08 w 2 dniu do 4,08 w ostatnim dniu fermentacji. Zmiany w dynamice populacji podczas spontanicznej fermentacji jarmużu zielonego znajdują swoje potwierdzenie w innych publikacjach naukowych (Michalak i in., 2018; Zhang i in., 2021; Xiong i in., 2012). Michalak i in. (2018) zaobserwowali podobne zmiany w dynamice populacji bakterii fermentacji mlekowej w trakcie procesu spontanicznej fermentacji jarmużu. Oprócz gatunków *Leuconostoc* i *Lactobacillus*, badacze zidentyfikowali bakterie z rodzajów *Weissella*, *Pediococcus* i *Lactococcus* na różnych etapach fermentacji. Ponadto, cytowani autorzy oprócz bakterii z gatunku *L. plantarum* wyizolowali również: *L. curvatus*, *L. paraplantarum* i *L. brevis*. Co istotne, wyniki uzyskane w przedstawionej rozprawie były też zgodne z ustaleniami innych autorów (Xiong i in., 2012) którzy badali spontaniczną fermentację chińskiej kapusty kiszzonej i stwierdzili, że proces ten był inicjowany przez *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, które w miarę postępu fermentacji były kolejno zastępowane przez *E. faecalis*, *L. lactis*, *L. zaeae*, *L. plantarum* i *L. casei*. Natomiast, badania obejmujące analizę zmian populacji drobnoustrojów w tradycyjnie fermentowanej bulwie gorczycy (Zhacai) dowiodły, że po 30 dniach procesu dominującą grupą mikroorganizmów były bakterie fermentacji mlekowej (Zhang i in, 2021). W toku badań, autorzy zaobserwowali, że na poziomie gatunkowym dominowały następujące bakterie: *L. sakei*, *L. curvatus*, *C. alimentarius*, *L. brevis*, *L. plantarum* i *W. hellenica*.

Drugi etap identyfikacji dotyczył izolatów wybranych na podstawie ich właściwości potencjalnie probiotycznych. Zgodnie z zaleceniami FAO/WHO (2006) i ISAPP (Marco i in., 2021) mikroorganizmy potencjalnie probiotyczne powinny być identyfikowane do poziomu gatunku. Dlatego też ostatnim krokiem w prezentowanym podrozdziale była identyfikacja genetyczna wybranych mikroorganizmów genetyczną z wykorzystaniem genu 16S rRNA oraz porównanie uzyskanego wyniku do wyników analizy proteomicznej.

W celu przeprowadzenia identyfikacji bakterii przeprowadzono izolację genomowego DNA wybranych izolatów i amplifikację fragmentu genu 16S rRNA o długości 1500 pz. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR przedstawiono na zdjęciu 6 (A i B). Produkty PCR zostały poddane sekwencjonowaniu (wykonane przez Genomed S.A.), co umożliwiło identyfikację genetyczną izolatów, a także analizę filogenetyczną.



Zdjęcie 6 (A i B). Rozdział elektroforetyczny produktów PCR - widoczne fragmenty 1500 bp (zdjęcia wykonane w lampie UV Omega Lum G, Aplegen)

SM - Marker wielkości fragmentu DNA; od A do M - DNA wybranych szczepów bakterii (odpowiednio: JS001, JS017, JS024, JS027, JS031, JS032, JS034, JS052, JS053, JS058, JS070, JS075)

Źródło: opracowanie własne

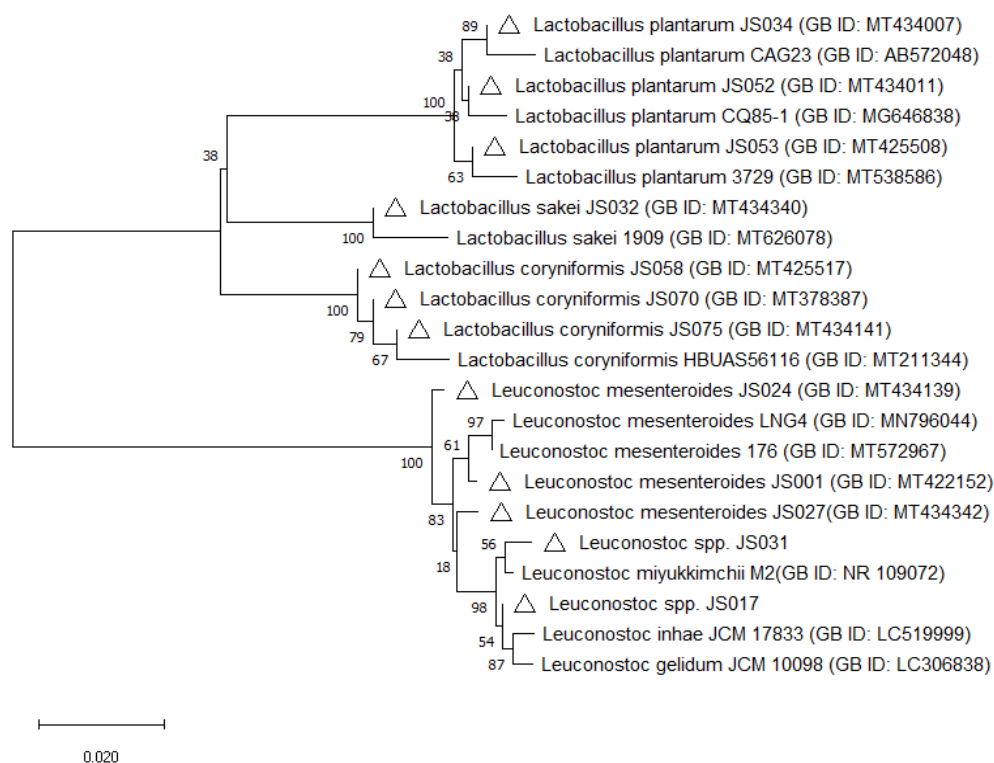
Przeprowadzona identyfikacja genetyczna 12 wybranych izolatów była wysoce porównywalna z analizą proteomiczną. Porównawcze wyniki obu badań przedstawiono w tabeli 30. Prawie wszystkie mikroorganizmy zostały zidentyfikowane z dokładnością do $\approx 99\%$ do poziomu gatunku. W przypadku szczepu JS070 identyfikacja genetyczna wskazała, jedynie na gatunek izolatu, bez jego podgatunku. W tym przypadku identyfikacja proteomiczna wskazała również na podgatunek tego szczepu (*L. coryniformis* subsp. *torquens*). Należy zauważyć, że zarówno metoda MALDI-TOF, jak i identyfikacja genetyczna z wykorzystaniem 16S rRNA miały pewne ograniczenia. Dwa szczepy (JS017 i JS031) pochodzące ze świeżego i sfermentowanego soku nie zostały zidentyfikowane ze względu na ograniczenia danych w obu bazach danych. Sekwencje wszystkich izolatów, z wyjątkiem dwóch wymienionych tutaj, zostały zdeponowane w bazie danych NCBI. Dodatkowo, w załączniku 5 zaprezentowano sekwencje genetyczne zidentyfikowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej.

Tabela 30. Porównanie metod identyfikacji 12 wybranych izolatów za pomocą sekwencji genów 16S rRNA i MALDI-TOF MS

Etap fermentacji	Nr izolatu	Identyfikacja MALDI-TOF		Sekwencjonowanie genu 16S rRNA	
		Wynik	Wartość logarytmiczna	Wynik	Wartość identyfikacyjna (%)/szczep odniesienia
Świeży sok	JS001	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (GenBank ID: MT422152)	98,93% - <i>L. mesenteroides</i> ^T (GenBank ID: MN796044)
	JS017	Brak identyfikacji	1,23	Brak identyfikacji	99,58% - <i>L. miyukkimchi</i> ^T (GenBank ID: NR_109072) 99,58% - <i>L. inhae</i> ^T (GenBank ID: LC519999) 99,58% - <i>L. gelidum</i> ^T (GenBank ID: LC306838)
2 dzień fermentacji	JS024	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,42	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (GenBank ID: MT434139)	99,09% - <i>L. mesenteroides</i> ^T (GenBank ID: MN796044)
	JS027	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (GenBank ID: MT434342)	99,59% - <i>L. mesenteroides</i> ^T (GenBank ID: MT572967)
4 dzień fermentacji	JS031	Brak identyfikacji	1,19	Brak identyfikacji	98,84% - <i>L. miyukkimchi</i> ^T (GenBank ID: NR_109072) 98,36% - <i>L. gelidum</i> ^T (GenBank ID: LC306838)
	JS032	<i>Lactilactobacillus sakei</i>	2,32	<i>Lactilactobacillus sakei</i> (GenBank ID: MT434340)	99,26% - <i>L. sakei</i> ^T (GenBank ID: MT626078)
	JS034	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,42	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (GenBank ID: MT434007)	98,72% - <i>L. plantarum</i> ^T (GenBank ID: AB572048)
6 dzień fermentacji	JS052	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,30	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (GenBank ID: MT434011)	99,47% - <i>L. plantarum</i> ^T (GenBank ID: MG646838)
	JS053	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,20	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (GenBank ID: MT425508)	99,50% - <i>L. plantarum</i> ^T (GenBank ID: MT538586)
8 dzień fermentacji	JS058	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,15	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> (GenBank ID: MT425517)	99,26% - <i>L. coryniformis</i> ^T (GenBank ID: MT211344)
	JS070	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	2,35	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> (GenBank ID: MT378387)	99,60% - <i>L. coryniformis</i> ^T (GenBank ID: MT211344)
Przechowywanie	JS075	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	2,07	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> (GenBank ID: MT434141)	99,26% - <i>L. coryniformis</i> ^T (GenBank ID: MT211344)

Źródło: (Szutowska i Gwiazdowska, 2021)

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono również analizę filogenezy molekularnej i skonstruowano drzewo filogenetyczne w oparciu o sekwencje 16S rRNA metodą najbliższego sąsiedztwa (ang. *neighbour-joining method*) (Saitou i Imanishi, 1989) w celu potwierdzenia ich przynależności do określonych gatunków. Drzewo filogenetyczne przedstawiono na rysunku 8. Po przeprowadzeniu analizy filogenetycznej szczepy JS032, JS034, JS052, JS053, JS058, JS070 i JS075 umieszczono w klastrze tworzącym rodzaj *Lactobacillus*³. W obrębie tej grupy wyodrębniono trzy podgrupy dla gatunków *L. plantarum*, *L. coryniformis* i *L. sakei*. Szczepy JS001, JS017, JS024, JS027 i JS031 umieszczono w klastrze rodzaju *Leuconostoc*, który podzielono na dwie główne podgrupy, obejmujące takie gatunki, jak *L. mesenteroides* i *Leuconostoc* spp. Przeprowadzona analiza filogenetyczna potwierdziła również poprawność wyników badań identyfikacyjnych wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej.



Rysunek 8. Drzewo filogenetyczne oparte na sekwencjach genów 16S rRNA pokazujące pozycję 12 izolatów

* Drzewo zostało skonstruowane metodą łączenia sąsiadów z testem bootstrapowym (2000 powtórzeń) (Felsenstein, 1985; Kumar i in., 2018; Saitou i Imanishi, 1989; Tamura i in., 2004).

Δ - odnosi się do szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych w tym badaniu

Źródło: (Szutowska i Gwiazdowska, 2021)

³ Nomenklatura dla bakterii fermentacji mlekowej uległa zmianie (Zheng i in., 2020). Obecnie wyróżniamy: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactilactobacillus sakei* oraz *Loigolactobacillus coryniformis*.

Podsumowanie

Przedstawione w tym podrozdziale badania stosowane ukierunkowane były na konkretny cel - **określenie potencjalnych właściwości probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych na różnych etapach spontanicznej fermentacji soku z jarmużu oraz ich identyfikację.** Cały proces badawczy pozwolił na metodyczną selekcję wartościowych mikroorganizmów autochtonicznych o potencjalnych właściwościach probiotycznych, które w kolejnym etapie procesu - fazie rozwojowej - posłużyły jako monokultury lub kultury mieszane w kontrolowanej fermentacji soku z zielonego jarmużu.

W rezultacie, niniejsze badania umożliwiły wyselekcjonowanie 12 wartościowych i różnorodnych gatunkowo szczepów bakterii fermentacji mlekowej spośród 80 izolatów. 10 szczepów bakterii fermentacji mlekowej zostało zidentyfikowanych do poziomu gatunku. Mikroorganizmy te przynależały do gatunków *L. mesenteroides*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. coryniformis*, a dwa niezidentyfikowane izolaty najprawdopodobniej przynależały do rodzaju *Leuconostoc*. Mając na uwadze zalecenia FAO/WHO (2006), do wstępnych badań dotyczących rozwoju prototypu nowego produktu spożywczego wybrano jedynie te szczepy, które zostały zidentyfikowane do poziomu gatunku. Wybrane szczepy charakteryzowały się najlepszymi cechami pod względem wysokich właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Szczególnie silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe zaobserwowano w przypadku szczepów z gatunku *L. plantarum* JS052 i JS053, a słabszą aktywność odnotowano dla szczepów z gatunku *L. mesenteroides* JS001, JS024 i JS027. Dodatkowo, wyselekcjonowane izolaty cechowała odpowiednia wrażliwością na powszechnie stosowane antybiotyki, dobra przeżywalnością w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego (niskie pH oraz sole żółciowe) oraz w obecności chlorku sodu. Również, w tym przypadku szczepy *L. plantarum* JS052 i JS053 charakteryzowały się najlepszymi właściwościami spośród innych badanych izolatów. **Ponadto, całością badań przeprowadzonych w niniejszym rozdziale badań stosowanych pozwolił pozytywnie zweryfikować hipotezę trzecią.**

Wybór tychże izolatów był również podyktowany właściwościami szczepów powiązanych z ich charakterystyką gatunkową, która może istotnie wpłynąć na finalne wyróżniki fermentowanego soku z jarmużu zielonego (m.in. zawartość witamin, związków fenolowych, karotenoidów). Bakterie z gatunku *L. mesenteroides* są istotne z uwagi na ich zdolność do produkcji egzopolisacharydów oraz wytwarzania pożądaných związków smakowych i zapachowych (Hutkins, 2019; Li i in., 2020). Z kolei szczepy *L. plantarum* charakteryzują się szybką adaptacją do różnych nisz roślinnych a tym samym powodują bardzo efektywną fermentację (Filannino i in., 2016; Seddik i in., 2017). Szczepy *L. sakei* odgrywają kluczową rolę w syntezie witamin z grupy B, takich jak tiamina czy kwas foliowy, oraz w niezdolności do wytwarzania niepożądanych związków tj. aminy biogenne (Kim i in., 2020). Natomiast izolaty przynależące do gatunku *L. coryniformis* mogą posiadać obiecujące i atrakcyjne

cechy, oparte na szerokim spektrum wytwarzanych przez nie związków przeciwdrobnoustrojowych, takich jak białkowe związki przeciwgrzybicze czy bakteriocyny, a także ich zdolność do eliminacji rakotwórczych substancji pokarmowych (np. azotynów) (Fang i in., 2016; Magnusson i Schnürer, 2001; Martín i in., 2005).

4.3. Rozwój prototypów produktów

Kolejnym etapem w rozwoju nowego produktu było zaprojektowanie prototypów produktów w oparciu o kontrolowaną fermentację soku z jarmużu zielonego z wykorzystaniem autochtonicznych izolatów bakterii o potencjale probiotycznym. Podstawą tego etapu były rezultaty otrzymane na etapie badań podstawowych i stosowanych. W pierwszym podrozdziale przeprowadzono badania pilotażowe dla siedmiu wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej oceniając ich technologiczną przydatność w prowadzeniu kontrolowanej fermentacji soku. W oparciu o badania pilotażowe w kolejnym podrozdziale stworzono cztery prototypy produktów na bazie monokultur oraz kultur mieszanych. Badania w tym podrozdziale obejmowały kompleksową charakterystykę soków w oparciu o wpływ różnych kultur starterowych na wartość odżywczą, parametry fizykochemiczne, jakość mikrobiologiczną, aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz właściwości prozdrowotne wynikające z obecności związków biologicznie czynnych.

4.3.1. Opracowanie prototypów fermentowanych soków z jarmużu

Etap opracowywania prototypów soku z jarmużu poddanego fermentacji kontrolowanej był etapem badań o charakterze pilotażowym i poglądowym, który miał na celu selekcję najbardziej wartościowych szczepów (spośród 10 izolatów wybranych na etapie badań stosowanych) pod względem określonych już właściwości probiotycznych, jak również technologicznych (tj. dobry wzrost w matrycy soku oraz efektywne zakwaszanie produktu).

Dlatego też, na początek 10 wyselekcjonowanych izolatów ponownie zostało ocenionych pod kątem ich potencjalnych właściwości probiotycznych. Biorąc pod uwagę jako kryterium dobre właściwości przeciwdrobnoustrojowe względem szerokiego spektrum mikroorganizmów wskaźnikowych, zawężono liczbę izolatów do 7, które charakteryzowały się bardzo dobrymi właściwościami antagonistycznymi. Na wstępie odrzucono szczep *L. mesenteroides* JS024 z uwagi na jego najłabsze właściwości pod względem aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Również z uwagi na niskie właściwości przeciwdrobnoustrojowe, zostały wyeliminowane: izolat *L. mesenteroides* JS001 oraz izolat *L. coryniformis* JS070. Zestawienie najważniejszych wyników dla 7 wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej dotyczącej ich generalnej charakterystyki oraz właściwości probiotycznych przedstawiono w tabeli 31.

Tolerancja NaCl							
2% NaCl	96%	94%	111%	99%	94%	76%	77%
4% NaCl	95%	82%	102%	92%	95%	71%	72%
6% NaCl	79%	78%	97%	86%	90%	69%	74%
8% NaCl	68%	64%	87%	79%	82%	66%	70%
Tolerancja niskiego pH							
pH 2,0	47%	0%	75%	56%	54%	62%	62%
pH 3,0	75%	22%	77%	69%	73%	83%	84%
Tolerancja soli żółciowych							
0,25% soli żółciowych	72%	0%	46%	83%	89%	53%	56%
0,5% soli żółciowych	46%	0%	34%	75%	83%	12%	38%
1% soli żółciowych	33%	0%	31%	71%	83%	8%	23%

n/w – nie wykryto

Źródło: opracowanie własne

Siedem wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej (tj. JS027, JS032, JS034, JS052, JS053, JS058 oraz JS075) zastosowano jako pojedyncze kultury starterowe w kontrolowanej fermentacji soku. Izolaty namnażano do poziomu 6,5 log jtk/ml, a następnie dodawano 10% tak przygotowanego inokulum bakteryjnego do pasteryzowanego soku. Proces fermentacji trwał 24 godziny. Jednakże, w uzasadnionych przypadkach (*L. mesenteroides* JS027 oraz *L. coryniformis* JS058 i JS075) wydłużono proces fermentacji do 72 godzin. Wyniki badań wstępnych dla 7 izolatów, bazujące na liczebności komórek w matrycy soku oraz zdolności do obniżania pH zostały przedstawione w tabeli 32.

Tabela 32. Badania wstępne izolatów bakterii w kontrolowanej fermentacji soku z jarmużu zielonego

Szczep	Liczebność komórek [log jtk/ml]	pH
<i>L. mesenteroides</i> JS027	7,02	5,80
<i>L. sakei</i> JS032	9,19	4,19
<i>L. plantarum</i> JS034	8,87	4,01
<i>L. plantarum</i> JS052	9,60	3,95
<i>L. plantarum</i> JS053	8,12	3,99
<i>L. coryniformis</i> JS058	9,47	6,26
<i>L. coryniformis</i> JS075	9,36	5,78

Źródło: opracowanie własne

Poczynione obserwacje doprowadziły do konkluzji, które pozwoliły wytypować mikroorganizmy przeznaczone następnie jako kultury starterowe. Szczep *L. mesenteroides* JS027 nie był zdolny do samodzielnej fermentacji soku z jarmużu zielonego. Izolat ten charakteryzował się słabym wzrostem (7,02 log jtk/ml) oraz nie spowodował istotnego spadku poziomu pH (6,34), nawet po przedłużeniu procesu fermentacji. Uznano jednak, że szczep JS027 może być wykorzystany jako jeden ze szczepów w konsorcjum bakteryjnym w badaniu zasadniczym dotyczącym rozwoju prototypów produktu.

Izolaty przynależące do gatunku *L. coryniformis* (JS058 oraz JS075) charakteryzowały się dobrym wzrostem w matrycy soku - odpowiednio 9,47 log jtk/ml i 9,36 log jtk/ml po 24 godzinach fermentacji, jednak były niezdolne do skutecznego zakwaszania soku. Wartości pH w przypadku tych dwóch mikroorganizmów nie uległy statystycznie istotnej różnicy nawet po 72 godzinach fermentacji w porównaniu ze świeżym sokiem. Podjęto również próbę fermentacji soku razem z innymi izolatami w konsorcjum bakteryjnym (razem z: *L. plantarum* JS052, *L. mesenteroides* JS027 oraz *L. sakei* JS032), ale również w tym przypadku nawet 72 godzinny proces nie przyczynił się do spadku wartości pH. Wydaje się, że pomimo naturalnego występowania w spontanicznie fermentowanym soku z jarmużu, izolaty przynależące do gatunku *L. coryniformis* pełnią rolę mikrobioty towarzyszącej, a nie inicjującej

proces fermentacji. W związku z tym, dwa szczepy JS058 i JS075, nie zostały wzięte pod uwagę przy badaniu zasadniczym obejmującym projektowanie i rozwój prototypów produktu.

W kolejnym kroku porównano izolaty przynależące do gatunku *L. plantarum* (JS034, JS052 oraz JS053). Fermentacja soków z użyciem tych szczepów efektywnie przyczyniła się do obniżenia wartości pH. Wyniki dla wszystkich próbek były porównywalne i wynosiły $\approx 3,98$. Jednakże, zaobserwowano odmienną liczebność komórek bakteryjnych po 24 godzinach fermentacji. Najlepszymi parametrami wzrostu charakteryzował się szczep JS052, którego liczebność komórek wynosiła 9,60 log jtk/ml. Natomiast liczebność dwóch pozostałych szczepów wynosiła 8,87 log jtk/ml dla izolatu JS034 oraz 8,12 log jtk/ml dla izolatu JS053. W związku z tym, spośród trzech szczepów przynależących do tego samego gatunku postanowiono wybrać ten szczep, który charakteryzował się najlepszym wzrostem – izolat JS052.

Z kolei szczep *L. sakei* JS032 charakteryzował się bardzo dobrym wzrostem w matrycy, jaką był sok z jarmużu – 9,19 log jtk/ml oraz efektywnym obniżaniem pH produktu – 4,14 log jtk/ml. Oczywiście, fakt braku wzrostu w obecności kwaśnego pH oraz soli żółciowych (tabela 31) może być pewnym ograniczeniem, niemniej jednak w toku badań nie zaobserwowano spadku liczebności bakterii podczas inkubacji w wymienionych warunkach. Pomimo tych ograniczeń stwierdzono, że wartość tego szczepu może manifestować się głównie poprzez biosyntezę wartościowych witamin z grupy B oraz niezdolność tego gatunku do tworzenia szkodliwych amin biogennych (Kim i in., 2020).

Proces badań pilotażowych umożliwił wyselekcjonowanie izolatów - *L. mesenteroides* JS027, *L. plantarum* JS052 oraz *L. sakei* JS032 - charakteryzujących się zarówno dobrymi parametrami pod względem właściwości probiotycznych, jak również z uwagi na dobre parametry technologiczne umożliwiające efektywną fermentację soku z jarmużu (tj. wysoka liczebność komórek bakteryjnych oraz skuteczne obniżanie pH produktu). Są to bardzo istotne parametry w projektowaniu i rozwoju innowacyjnego produktu fermentowanego. Wysoka liczebność komórek potencjalnie probiotycznych bakterii może przyczynić się do działania prozdrowotnego produktu poprzez oddziaływanie w mikrobiocie jelitowej konsumenta. Co więcej, wybór ten poparty był dodatkowo danymi literaturowymi wskazującymi na wpływ zarówno gatunków jak i samych szczepów na metabolizm różnych związków tj. witaminy, związki fenolowe, karotenoidy. W związku z tym, spodziewano się różnorodnego wpływu na biokonwersję związków biologicznie czynnych, które mogłyby się okazać wartościowe pod względem ich właściwości prozdrowotnych (Filannino i in., 2018; Muñoz i in., 2017; Septembre-Malaterre i in., 2018; Torres i in., 2020).

W uzupełnieniu do powyższych badań, przeanalizowano również literaturę naukową obejmującą charakterystykę gatunkową wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Gatunki *L. mesenteroides*, *L. plantarum* i *L. sakei* wyizolowane w tym badaniu należą do typowej mikrobioty

spontanicznie fermentowanych warzyw. Na podstawie licznych badań stwierdzono, że wybrane gatunki mogą nieść ze sobą liczne korzyści zdrowotne dla potencjalnego konsumenta.

Przykładowo, przedstawiciele rodzaju *Leuconostoc*, głównie gatunek *L. mesenteroides*, są szeroko stosowane w przemyśle żywności fermentowanej jako pojedyncze kultury lub jako element kultur starterowych, zwłaszcza w komercyjnej produkcji kimchi (Park i in., 2019). Częstotliwość stosowania tego gatunku bakterii jest związana z określonymi cechami, takimi jak zdolność do produkcji egzopolisacharydów lub wytwarzanie pożądaných związków smakowych i zapachowych. Egzopolisacharydy występujące w produktach fermentowanych wpływają na poprawienie walorów sensorycznych, stabilności konsystencji produktu oraz są czynnikiem teksturotwórczym (Hutkins, 2019; Li i in., 2020). Dodatkowo, egzopolisacharydy posiadają również szereg właściwości prozdrowotnych. Zgodnie z literaturą przedmiotu związki te mogą wykazywać działanie prebiotyczne, aktywność przeciwwrzdodową, przeciwwirusową oraz skutecznie obniżać poziom cholesterolu we krwi, (Yildiz i Karatas, 2018).

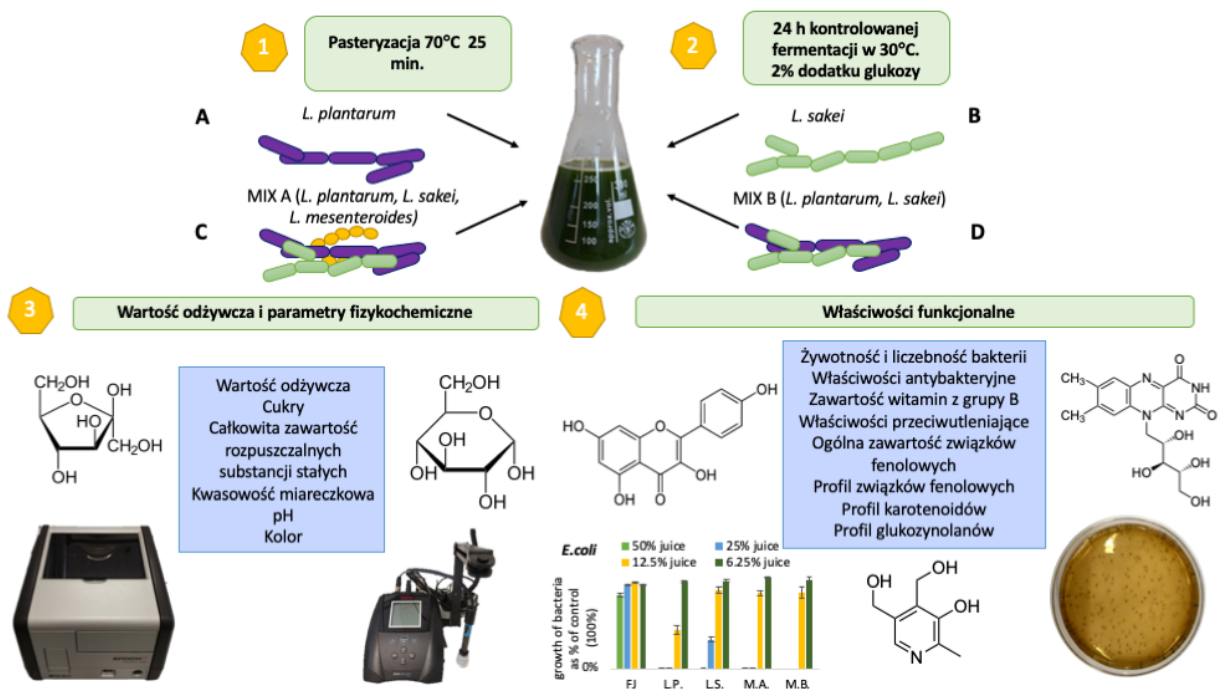
Z kolei szczepy przynależące do gatunku *L. plantarum* są jednymi z najczęściej identyfikowanych i izolowanych gatunków bakterii fermentacji mlekowej z różnych rodzajów żywności fermentowanej (jak kimchi, kapusta kiszona, ogórki kiszane czy kiszane oliwki) (Beganović i in., 2014; Di Cagno i in., 2009; Hutkins, 2019; Xiong i in., 2012). Ze względu na niezwykłą zdolność adaptacji do różnych warunków środowiskowych, szczepy *L. plantarum* mogą charakteryzować się licznymi właściwościami probiotycznymi, takimi jak działanie obniżające poziom cholesterolu, zapobieganie biegunkom czy leczenie zaburzeń żołądkowo-jelitowych (Filannino i in., 2016; Seddik i in., 2017). Co ciekawe, szczepy *L. plantarum* mogą być potencjalnym czynnikiem terapeutycznym, poprzez biosyntezę kwasu gamma-aminomasłowego, który wykazuje działanie antyproliferacyjne, antymigracyjne i antyinwazyjne wobec komórek nowotworowych HT-29 opornych na działanie tradycyjnych leków przeciwnowotworowych (An i in., 2021). Dlatego też szczepy *L. plantarum* są często wykorzystywane jako kultury starterowe do prowadzenia kontrolowanej fermentacji zarówno tradycyjnych, jak i nowych produktów (Szutowska, 2020; Torres i in., 2020).

Dane literaturowe wskazują, że szczepy *L. sakei* są w stanie zdominować zróżnicowane środowiska spontanicznie fermentowanej żywności, od kiszonej kapusty czy kimchi po produkty mięsne i sake (Champomier-Vergès i in., 2002; Eisenbach i in., 2019). Bakterie z gatunku *L. sakei* odgrywają kluczową rolę w przygotowaniu kimchi, zwłaszcza w syntezie witamin z grupy B, takich jak tiamina czy kwas foliowy. Są przy tym niezdolne do wytwarzania niepożądanych związków takich jak aminy biogenne (Kim i in., 2020). Ponadto, w procesie fermentacji węglowodanów poszczególne szczepy *L. sakei* produkują krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (tj. kwas octowy, propionowy lub masłowy), które mogą pełnić krytyczne funkcje immunoregulacyjne dla konsumenta, np. we wspomaganiu przewlekłych chorób układu pokarmowego (Li i in., 2022).

W związku z powyższymi doniesieniami, wyizolowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej *L. mesenteroides* JS027, *L. sakei* JS032 oraz *L. plantarum* JS052 stanowią ważną część populacji drobnoustrojów kiszzonego jarmużu i mogą być z sukcesem wykorzystane jako wartościowe kultury starterowe o potencjalnych właściwościach prozdrowotnych w kontrolowanej fermentacji soku z jarmużu zielonego.

4.3.2. Składniki odżywcze i właściwości prozdrowotne soków z jarmużu poddanych kontrolowanej fermentacji

W zaprezentowanym podrozdziale badania koncentrowały się wokół stworzenia czterech wersji produktu – soku z jarmużu zielonego poddanego fermentacji kontrolowanej. Przygotowano cztery warianty soku z wykorzystaniem monokultur bakteryjnych: *L. plantarum* JS052 i *L. sakei* JS032 oraz kultur mieszanych: MIX A (*L. mesenteroides* JS027, *L. plantarum* JS052, *L. sakei* JS032 w proporcjach 1:2:2), MIX B (*L. plantarum* JS052 i *L. sakei* JS032 w proporcjach 1:1). Niniejsze badania obejmowały zagadnienia wartości odżywczej oraz właściwości prozdrowotnych fermentowanych soków. Podsumowanie procesu badawczego przedstawiono w formie graficznego streszczenia na rysunku 9.



Rysunek 9. Proces badawczy kontrolowanej fermentacji soku z jarmużu zielonego

Źródło: opracowanie własne

4.3.2.1. Składniki odżywcze, witaminy z grupy B, parametry fizykochemiczne oraz pomiar barwy

W pierwszym etapie rozwoju fermentowanego soku z jarmużu zielonego przeprowadzono badania obejmujące określenie zawartości składników odżywczych, witamin z grupy B oraz wybranych parametrów fizykochemicznych. Szczegółowe wyniki dotyczące składników odżywczych oraz witamin zamieszczono w tabeli 33.

Tabela 33. Składniki odżywcze i witaminy świeżego i fermentowanego soku z jarmużu zielonego

Składniki odżywcze/witaminy	Świeży sok	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	MIX A	MIX B
Woda [g/100 g]	94,9±0,7 ^a	93,0±0,1 ^b	92,9±0,1 ^b	92,9±0,1 ^b	93,09±0,2 ^b
Popiół [g/100 g]	1,48±0,06 ^a	1,21±0,02 ^b	1,23±0,03 ^b	1,24±0,03 ^b	1,21±0,02 ^b
Białko [g/100 g]	1,91±0,04 ^a	1,92±0,04 ^a	1,92±0,04 ^a	1,92±0,03 ^a	1,91±0,04 ^a
Tłuszcz [g/100 g]	0,86±0,02 ^a	0,88±0,02 ^a	0,87±0,02 ^a	0,88±0,02 ^a	0,86±0,01 ^a
Węglowodany, według różnicy [g/100 g]	0,90	2,95	3,13	3,10	2,00
W tym: fruktoza	0,82±0,07	n/w	n/w	n/w	n/w
glukoza	0,19±0,01 ^d	0,64±0,06 ^c	1,13±0,03 ^a	0,90±0,07 ^b	0,88±0,04 ^b
Wartość energetyczna [kcal/100 g]	19	27	28	28	27
Ryboflawina (B ₂) [mg/100 ml]	0,052±0,0003 ^b	0,025±0,003 ^c	0,094±0,004 ^a	0,073±0,005 ^a	0,050±0,004 ^b
Pirydoksyna (B ₆) [mg/100 ml]	0,091±0,005 ^c	0,175±0,009 ^a	0,150±0,010 ^a	0,146±0,003 ^a	0,134±0,001 ^b

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$
n/w – nie wykryto

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka, i in., 2021)

Określenie zawartości składników odżywczych występujących w prototypach fermentowanych soków jest jedną z podstawowych analiz, głównie dlatego, że wartość odżywcza jest obligatoryjną informacją, która musi pojawić się na etykiecie produktu wprowadzanego do obrotu. Przeprowadzone analizy wykazały, że świeży sok z jarmużu zielonego charakteryzował się większą zawartością wody oraz popiołu w porównaniu z próbkami soków fermentowanych. Z kolei zawartość białka oraz tłuszczu była porównywalna we wszystkich badanych próbkach i wynosiła ok. 1,92 g/100 g dla białka oraz ok. 0,87 g/100 g dla tłuszczu. Zawartość powyższych parametrów była podobna do wyników innych badań, zarówno dla jarmużu pochodzącego z tradycyjnego systemu uprawy jak również ekologicznego (Thavarajah i in., 2019; USDA, 2021). Kolejno, przeanalizowano zmiany w zawartości węglowodanów tj. fruktoza oraz glukoza w trakcie fermentacji. Ich zawartość w świeżym soku wynosiła odpowiednio 0,82 g/100 g oraz 0,19 g/100g. Wyniki te również były porównywalne z danymi literaturowymi (Thavarajah i in., 2019; USDA, 2021). Zaobserwowano, że proces fermentacji przyczynił się do istotnych

zmian w zawartości badanych cukrów. Bakterie fermentacji mlekowej charakteryzują się zdolnością do produkcji kwasu mlekowego otrzymywanego w procesie fermentacji węglowodanów (Zheng i in., 2020). W toku analiz, nie wykryto fruktozy w kiszonych sokach niezależnie od zastosowanej kultury starterowej, natomiast wyższa zawartość glukozy była związana z 2% dodatkiem tego cukru przed procesem fermentacji. W świetle wcześniejszych obserwacji dotyczących trudności z szybką fermentacją soku z jarmużu, konieczne wydawało się dodanie 2% glukozy, aby zapewnić doskonały wzrost izolatów w stosunkowo krótkim czasie. Zaobserwowano, że zawartość glukozy w poszczególnych próbkach różniła się istotnie i była wynikiem osobniczych zdolności metabolicznych szczepów bakterii. Jak można zauważyć, szczep *L. plantarum* JS052 wykorzystywał glukozę do wzrostu podczas procesu, podczas gdy metabolizm glukozy przez *L. sakei* JS032 i konsorcja mikroorganizmów (MIX A i MIX B) był mniej efektywny. Należy nadmienić, że zmiana zawartości węglowodanów w trakcie procesu fermentacji jest ważnym parametrem efektywności fermentacji mlekowej. Podobne wyniki uzyskali autorzy Valero-Cases i Frutos, (2017), którzy dodali inulinę do fermentowanego soku warzywnego z wykorzystaniem szczepu *L. plantarum*. Badacze zaobserwowali obniżenie zarówno poziomu glukozy jak i fruktozy. W toku badań autorzy wywnioskowali, że dla zastosowanego szczepu fruktoza i glukoza, występujące naturalnie w soku były głównym źródłem energii, natomiast inulina była wykorzystywana jako składnik odżywczy tylko wtedy, gdy naturalnie występujące cukry zostały już zmetabolizowane. W związku z powyższym, obecne badania doprowadziły do podobnych wniosków, sugerując, że szczepy bakterii fermentacji mlekowej najpierw metabolizowały naturalnie występujące cukry w soku z jarmużu tj. fruktozę, a dopiero potem wykorzystywały dodaną glukozę. Z kolei w przeciwieństwie do niniejszych badań, autorzy (Cirlini i in., 2020) studiując fermentowany sok z owoców czarnego bzu, dowiedli, że różne szczepy bakterii fermentacji mlekowej nie metabolizowały występujących cukrów. Było to najprawdopodobniej spowodowane wysoką kwasowością produktu. Takie warunki mogą być niesprzyjające dla wzrostu bakterii, dlatego też szczepy te metabolizowały kwasy organiczne (np. kwas jabłkowy) zamiast cukrów (Cirlini i in., 2020).

W dalszej kolejności przebadano wpływ różnych kultur starterowych na zawartość witamin z grupy B – pirydoksyny oraz ryboflawiny (tabela 33). Z uwagi na fakt, że ludzie nie są zdolni do syntezy witamin z grupy B, muszą je pozyskiwać z pokarmu, jak również z metabolizmu mikrobioty jelitowej (Yoshii i in., 2019). Witaminy z grupy B odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu ze względu na ich funkcje w procesach metabolicznych, takich jak metabolizm komórkowy oraz bycie prekursorem różnych koenzymów (Leblanc i in., 2011; Yoshii i in., 2019). Witamina B₂ (ryboflawina) i jej aktywne formy są kofaktorami reakcji enzymatycznych w cyklu Krebsa i utlenianiu kwasów tłuszczowych. Rola tej witaminy w organizmie człowieka jest ważna, ponieważ jej niedobór hamuje aktywność dehydrogenaz acylokoenzymu A biorącego udział w utlenianiu kwasów tłuszczowych w celu wytworzenia acetylokoenzymu A, który jest z kolei wykorzystywany przez mitochondria do produkcji

ATP w cyklu Krebsa (Yoshii i in., 2019). Natomiast, witamina B₆ (pirydoksyna) jest prekursorem koenzymów: fosforanu pirydoksalu i fosforanu pirydoksaminy, które biorą udział w wielu procesach metabolicznych komórki, w tym w metabolizmie aminokwasów, lipidów oraz węglowodanów (Parra i in., 2018). Niedobór pirydoksyny związany jest z rozwojem chorób o podłożu zapalnym, takich jak alergie, zapalenie stawów, a także z dysfunkcją neuronów (Yoshii i in., 2019).

Co ciekawe, niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej są zdolne do przekształcania związków pokarmowych w witaminy z grupy B, co stanowi dodatkową zaletę ze względu na zwiększenie właściwości funkcjonalnych produktu. W toku badań nad fermentowanym sokiem z jarmużu udowodniono, że wykorzystane kultury starterowe posiadają zdolność do biosyntezy witamin z grupy B (tabela 33). Wykazano, że szczep *L. sakei* JS032 posiada zdolność do syntezy zarówno ryboflawiny, jak i pirydoksyny – zawartość witamin wynosiła odpowiednio 0,094 mg/100 ml oraz 0,150 mg/100 ml. Natomiast, fermentacja z wykorzystaniem szczepu *L. plantarum* JS052 przyczyniła się do znacznego wzrostu zawartości pirydoksyny (0,175 mg/100 ml) przy jednoczesnym spadku ryboflawiny (0,025 mg/100 ml), która została najprawdopodobniej wykorzystana w procesach metabolicznych tego szczepu. Użycie kultur mieszanych w procesie sprzyjało znacznemu wzrostowi witaminy B₆ – dla MIX A zawartość wzrosła do 0,146 mg/100 ml, a dla MIX B do 0,134 mg/100 ml. W przypadku ryboflawiny, zawartość tej witaminy wzrosła podczas metabolizmu kultury MIX A (0,073 mg/100 ml) oraz pozostała na porównywalnym poziomie względem świeżego soku (0,050 mg/100 ml) dla MIX B. Powyższe wyniki są zbieżne z literaturą przedmiotu. Kaprasob, Kerdchoechuen, Laohakunjit i Somboonpanyakul (2018) zaobserwowali spadek zawartości ryboflawiny po 24-godzinnej fermentacji soku z nerkowca przez 5 różnych gatunków bakterii fermentacji mlekowej. Zauważyli oni jednak, że wydłużony proces fermentacji (48 godzin) sprzyjał wzrostowi zawartości witaminy B₂. Ponadto, autorzy wykazali również (Kapasob i in., 2018), że ze względu na zastosowanie różnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej zawartość pirydoksyny również była zróżnicowana. Metabolizm *L. casei* i *B. longum* przyczynił się do wzrostu zawartości pirydoksyny, w przeciwieństwie do metabolizmu szczepów *L. acidophilus* i *L. mesenteroides*. Co ciekawe, dane literaturowe (Capozzi i in., 2012) wskazują, że analiza porównawcza genomu dotycząca operonu rib, odpowiedzialnego za syntezę ryboflawiny, jest wspólna dla różnych gatunków bakterii fermentacji mlekowej (m.in. *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus*). Co więcej, brak informacji genetycznej odpowiada niezdolności do produkcji witamin z grupy B. Z dotychczasowych badań wynika zatem że odmienne wyniki dotyczące syntezy witamin z grupy B przez bakterie fermentacji mlekowej w produktach fermentowanych to zdolność specyficzna dla danego gatunku bądź szczepu (Capozzi i in., 2012; Kaprasob i in., 2018).

Kolejny aspekt badań obejmował określenie wybranych parametrów fizykochemicznych prototypów produktu. Parametry te pełnią funkcję pomocniczą, szczególnie w ocenie prawidłowego przebiegu kontrolowanej fermentacji mlekowej. Pozwalają wstępnie ocenić podstawowe wyróżniki

towaroznawcze produktu m.in. pH czy kwasowość, co z uwagi na charakter badanego produktu jest istotne. Szczegółowe wyniki badań fizykochemicznych zostały przedstawione w tabeli 34.

Tabela 34. Parametry fizykochemiczne oraz pomiar barwy świeżego i fermentowanego soku z jarmużu zielonego

Parametry fizykochemiczne	Świeży sok	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	MIX A	MIX B
pH	5,89±0,04 ^a	3,91±0,05 ^d	4,16±0,01 ^b	4,04±0,01 ^c	3,95±0,01 ^d
Rozpuszczalne substancje stałe [°Brix]	4,43±0,06 ^d	5,63±0,03 ^c	6,18±0,06 ^a	5,89±0,02 ^b	5,86±0,06 ^b
Kwasowość miareczkowa [g LA/100 ml]	0,18±0,02 ^d	1,44±0,05 ^a	0,96±0,02 ^c	1,21±0,02 ^b	1,29±0,05 ^b
Parametry barwy					
<i>L</i> *	94,71±0,26 ^b	97,09±0,74 ^a	96,42±0,48 ^a	97,51±1,09 ^a	98,11±0,61 ^a
<i>a</i> *	-4,35±0,02 ^a	-3,39±0,05 ^b	-3,49±0,16 ^b	-3,71±0,23 ^a	-3,51±0,05 ^b
<i>b</i> *	20,19±0,22 ^a	11,57±0,16 ^b	11,64±0,46 ^b	12,21±0,31 ^b	11,59±0,06 ^b
<i>H</i> ^o	-1,36±0,00 ^a	-1,29±0,00 ^b	-1,29±0,00 ^b	-1,28±0,01 ^b	-1,28±0,01 ^b
<i>C</i> *	20,65±0,21 ^a	12,06±0,16 ^b	12,15±0,49 ^b	12,76±0,35 ^b	12,11±0,05 ^b
ΔE	x	8,99±0,22 ^a	8,76±0,62 ^a	8,48±0,21 ^a	9,28±0,49 ^a

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$;

LA – kwas mlekowy (ang. lactic acid)

*L** - jasność, *a** - czerwoność, *b** - żółtość, *H*^o - kąt barwy, *C** - chroma, ΔE – różnica kolorów

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka i in., 2021)

Wartości pH soku z jarmużu zostały znacząco obniżone w procesie fermentacji, zwłaszcza przy użyciu szczepu *L. plantarum* JS052 i wariantu MIX B, odpowiednio z 5,89 do 3,91 i 3,95. Z kolei kwasowość miareczkowa wszystkich prototypów produktu wyraźnie wzrosła w porównaniu do próbek świeżego soku. Największy wzrost kwasowości odnotowano w przypadku soków fermentowanych z *L. plantarum* JS052, MIX B i MIX A, wzrosty te wynosiły odpowiednio 1,44, 1,29 i 1,21 g LA/100 ml. Podobne wyniki uzyskali badacze (Yoon i in., 2006), którzy wykazali, że zastosowanie szczepów *L. plantarum* lub *L. delbureckii* podczas fermentacji soku z kapusty istotnie zwiększyło parametry kwasowości miareczkowej w porównaniu z kulturą *L. sakei*. Metabolizm szczepów bakterii fermentacji mlekowej przyczynił się do produkcji kwasów organicznych, głównie kwasu mlekowego, co miało wpływ na parametry pH oraz kwasowości miareczkowej. Z kolei pomiary całkowitej zawartości rozpuszczalnych substancji stałych potwierdziły również wyniki dotyczące metabolizmu cukrów (tabela 33). Badania wykazały, że najwyższe wykorzystanie glukozy nastąpiło w przypadku *L. plantarum* JS052 (5,63° Brix), a najniższe w przypadku *L. sakei* JS032 (6,18° Brix). Określono również statystycznie istotny współczynnik korelacji ($r = 0,976$) pomiędzy zawartością rozpuszczalnych substancji stałych a zawartością glukozy w badanych próbkach. Powyższe parametry fizykochemiczne potwierdziły prawidłowy przebieg procesu kontrolowanej fermentacji mlekowej.

Następnie, przebadano próbki kiszzonego soku pod względem zmiany barwy. Wyniki również zostały zaprezentowane w tabeli 34. Barwa fermentowanego soku z jarmużu jest jedną z pierwszych cech dostrzegalnych przez potencjalnego konsumenta. Zgodnie z literaturą przedmiotu kolory mogą tworzyć więzi emocjonalne skutkujące zróżnicowaniem produktów, uzyskaniem przewagi konkurencyjnej, wzmocnieniem lojalności czy też zwiększeniem liczby intencji ponownego udania się na zakupy (Sliburyte i Skeryte, 2014). Barwa jarmużu związana jest głównie z wysoką zawartością chlorofilu (Akdaş i Bakkalbaşı, 2017). W związku z tym różne rodzaje obróbki, m.in. gotowanie na parze, gotowanie, smażenie lub fermentacja, mogą prowadzić do degradacji chlorofilu, a tym samym do zmiany barwy. Fermentacja mlekowa przyczyniła się do zauważalnej zmiany barwy – ze świeżo zielonego koloru do koloru żółto-zielonego. Przeprowadzona analiza wykazała wzrost jasności (L^*) oraz spadek parametrów a^* i b^* dla wszystkich fermentowanych próbek w porównaniu z kontrolą. Natomiast, niższe wartości chromatyczności (C^*) soków fermentowanych w porównaniu z próbkami świeżymi wskazują na spadek nasycenia barwy soków podczas procesu fermentacji. Zaobserwowano również, że wszystkie postrzegalne barwy próbek (ΔE) zostały sklasyfikowane jako bardzo wyraźne - $6,5 < \Delta E < 9,5$. Jednakże, nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w zakresie zmian barwy pomiędzy szczepami. Uzyskane wyniki częściowo pokrywają się z wynikami badań dotyczących fermentowanego soku warzywnego, przygotowanego z jicam, melona wodnego i marchwi pomarańczowej (Do i Fan, 2019). Podobnie, jak w prezentowanych badaniach, autorzy wykazali wzrost parametrów jasności. Z drugiej strony zaobserwowali również (Do i Fan, 2019) wzrost parametrów żółtości i czerwoności, co najprawdopodobniej było związane z biotransformacją karotenoidów podczas fermentacji.

4.3.2.2. Właściwości probiotyczne fermentowanych soków

W celu określenia potencjalnie probiotycznych właściwości fermentowanych soków przeprowadzono analizy obejmujące żywotność i liczebność bakterii fermentacji mlekowej oraz określono właściwości przeciwdrobnoustrojowe soków. W pierwszej kolejności, przebadano żywotność oraz liczebność bakterii w soku z jarmużu zielonego po 24 godzinach fermentacji. Jest to jedna z kluczowych kwestii determinująca jakość kiszzonego soku z jarmużu. Dostarczenie odpowiedniej liczby żywych bakterii o potencjale probiotycznym ma decydujące znaczenie w określaniu właściwości funkcjonalnych produktu. Żywność wzbogacona w mikroorganizmy probiotyczne powinna zawierać wystarczającą ilość żywych mikroorganizmów (co najmniej $9 \log_{10}$ jtk/porcję), zdolnych do wywołania zmian w mikrobiocie jelitowej, które to w konsekwencji prowadzą do poprawy zdrowia konsumenta (Meybodi i in., 2020). Wyniki obejmujące liczebność żywych komórek izolatów bakterii fermentacji mlekowej przedstawiono w tabeli 35.

Tabela 35. Liczebność żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej

	Świeży sok	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	MIX A	MIX B
Liczba żywych komórek [log ₁₀ jtk/ml]	x	10,44±0,11 ^a	9,96±0,04 ^b	10,09±0,19 ^b	9,62±0,14 ^c

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$;

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka i in., 2021)

Najwyższą liczbę bakterii zdolnych do przeżycia zaobserwowano w przypadku szczepu *L. plantarum* JS052 - 10,44 log jtk/ml. Liczebność bakterii była natomiast porównywalna pomiędzy dwoma wariantami produktu - MIX A, która wynosiła 10,09 log jtk/ml oraz w przypadku szczepu *L. sakei* JS032 - 9,96 log jtk/ml. Natomiast najniższe parametry wzrostu uzyskano w przypadku konsorcjum mikroorganizmów MIX B - ok. 9,62 log jtk/ml. Podczas poprzedniego etapu rozwoju nowego produktu spożywczego (badań podstawowych dotyczących spontanicznej fermentacji soku z jarmużu) najwyższy poziom bakterii fermentacji mlekowej osiągnięto w 6 dniu procesu i wynosił on 8,45 log jtk/ml. Różnice w liczebności mikroorganizmów wynikają z prowadzenia dwóch odmiennych procesów – fermentacji spontanicznej oraz kontrolowanej. Powyższe wyniki są zgodne z danymi literaturowymi bazującymi na kontrolowanej fermentacji soków warzywnych lub owocowych. W badaniach prowadzonych przez Do i Fan (2019) zaobserwowano, że zarówno *L. plantarum* jak i *L. acidophilus* są zdolne do szybkiego wzrostu w soku warzywnym - na bazie jicamy, melona wodnego i marchwi pomarańczowej. Liczebność bakterii po 24 godzinach procesu dla *L. plantarum* wynosiła 8,98 log jtk/ml, a dla *L. acidophilus* - 7,98 log jtk/ml. Autorzy stwierdzili, że przygotowany sok był lepszą matrycą dla wzrostu szczepu *L. plantarum*. Wyniki te (Do i Fan, 2019), jak również badania przeprowadzone w niniejszej dysertacji, są zbieżne z informacjami dotyczącymi wysokich zdolności adaptacyjnych bakterii z gatunku *L. plantarum* do różnych niszy roślinnych. Z kolei podczas badań koncentrujących się na kontrolowanej fermentacji soku z owoców śliwowca mombin (Ribeiro i in., 2020) wykazano, że po inokulacji szczepem *L. acidophilus* wystąpiła faza adaptacji (tzw. lag faza). Następnie, szczep *L. acidophilus* wzrastał wykładniczo po 12 godzinach fermentacji, osiągając najwyższą żywotność komórek po 16 godzinach, wynoszącą 12,9±0,4 log jtk/ml. Jednakże, w tych badaniach autorzy wykorzystali tylko jedną kulturę starterową. Natomiast, Jaiswal i Abu-Ghannam, (2013) zaobserwowali, że w zależności od zastosowania różnych gatunków bakterii fermentacji mlekowej podczas fermentacji soku z kapusty parametry wzrostu bakterii były zróżnicowane. W badaniach tych szczep przynależący do gatunku *L. rhamnosus* osiągał najbardziej pożądaną liczebność komórek w przeciwieństwie do szczepów *L. plantarum* i *L. brevis*.

Należy nadmienić, że na liczebność i żywotność bakterii fermentacji mlekowej w żywności fermentowanej wpływają różne czynniki. Wzrost mikroorganizmów może być zarówno stymulowany jak i hamowany przez różne składniki żywności np. cukry, witaminy, składniki mineralne, związki

fenolowe lub aminokwasy. Warunki procesu fermentacji np. temperatura oraz czas również wpływają na wzrost bakterii. Istotna jest także indywidualna charakterystyka danego szczepu bakterii tj. zdolność adaptacji do różnych środowisk czy też poziom inokulum początkowego (Meybodi i in., 2020). Przykładowo, wysoka zawartość związków fenolowych może prowadzić do działania przeciwdrobnoustrojowego w stosunku do kultury starterowej, a tym samym wpływać na jakość produktu końcowego, co może objawiać się niższą liczebnością i żywotnością komórek. Z drugiej strony, niskie stężenie tych związków może być wartościowe, a tym samym nawet stymulować wzrost bakterii fermentacji mlekowej (Filannino i in., 2018; Reverón i in., 2012; Sánchez-Maldonado i in., 2011).

Kolejnym aspektem decydującym o funkcjonalności fermentowanego soku z jarmużu zielonego było określenie jego właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Według danych literaturowych (FAO/WHO, 2006; Šušković i in., 2010; Szutowska, 2020), aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakterii fermentacji mlekowej jest jednym z podstawowych i kluczowych parametrów wskazujących na ich potencjalne właściwości probiotyczne. Jest to istotna cecha zważywszy zarówno na korzyści zdrowotne powiązane z prawidłowym funkcjonowaniem mikrobioty jelitowej konsumenta jak również z uwagi na zachowanie bezpieczeństwa produktu przed mikroorganizmami psującymi żywność. Mikroorganizmy o potencjale probiotycznym wykazują kilka możliwych mechanizmów w zwalczaniu patogenów jelitowych. Wyróżnić tutaj można: 1. wytwarzanie substancji przeciwdrobnoustrojowych (m.in. bakteriocyn bądź biosurfaktantów); 2. konkurencyjne wykluczanie patogenów, 3. konkurencję o składniki odżywcze oraz 4. modulowanie układu odpornościowego gospodarza (FAO/WHO, 2006). Co więcej, antagonizm bakterii fermentacji mlekowej jest istotny z uwagi na zachowanie bezpieczeństwa i jakości produktu. Bakterie te oraz ich metabolity mogą skutecznie ograniczyć występowanie mikroorganizmów powodujących psucie się żywności m.in. bakterii przetrwalnikujących (Reis i in., 2012).

Niniejsze badania miały więc na celu przeanalizowanie fermentowanego soku pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec szerokiego spektrum bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W tabeli 36 zaprezentowano wartości MBC oraz MIC dla poszczególnych próbek. Podobnie, jak w badaniach dotyczących spontanicznie fermentowanego soku z jarmużu zielonego, dowiedziono, że właściwości przeciwdrobnoustrojowe wzrosły po przeprowadzeniu kontrolowanej fermentacji. Mikroorganizmy: *P. aeruginosa*, *S. aureus* oraz *L. monocytogenes* były w największym stopniu wrażliwe na oddziaływanie kiszonych soków, w szczególności na sok fermentowany z udziałem szczepu *L. plantarum* JS052. Natomiast sok fermentowany z wykorzystaniem szczepu *L. sakei* JS032 charakteryzował się słabszym działaniem antagonistycznym wobec mikroorganizmów wskaźnikowych.

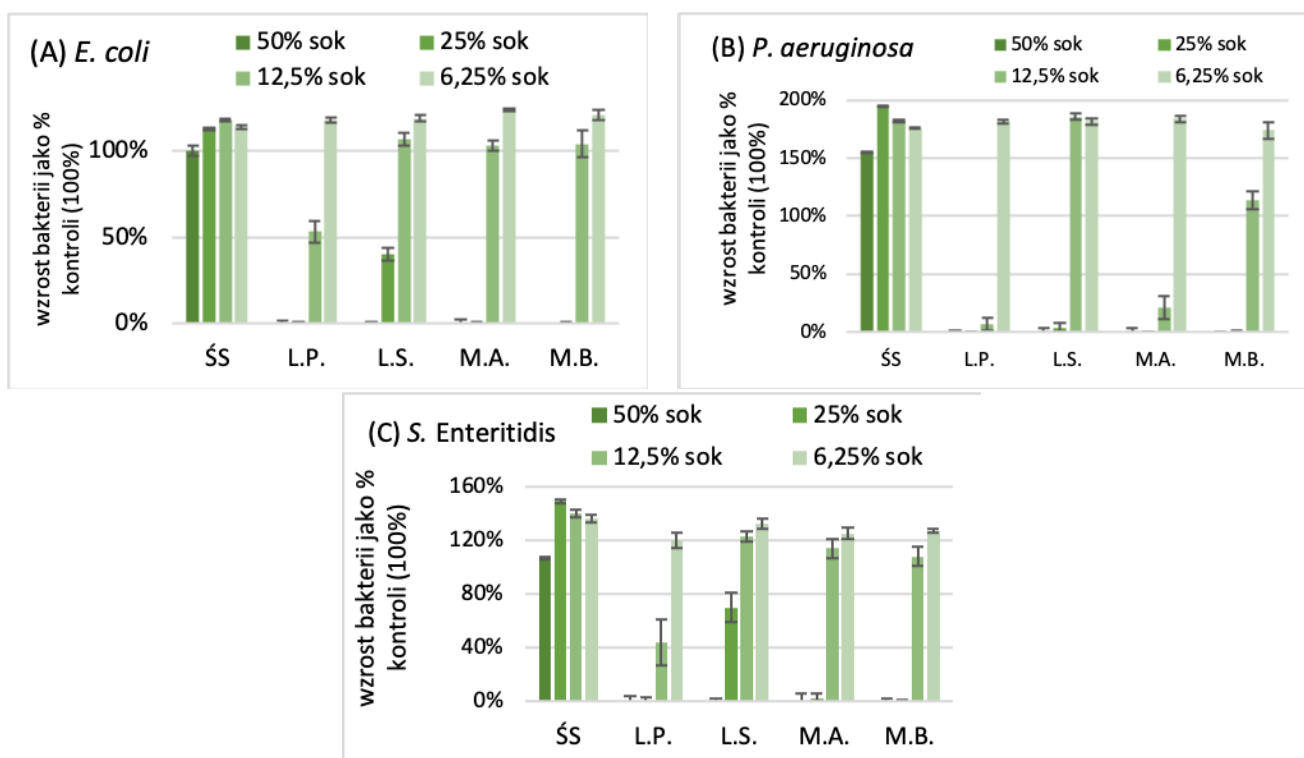
Tabela 36. Wartości MIC i MBC dla kontrolowanej fermentacji soku z jarmużu

	Mikroorganizm wskaźnikowy	MBC/MIC (%)	Świeży sok	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	MIX A	MIX B
Bakterie Gram-ujemne	<i>E. coli</i>	MBC	n/o	25%	50%	25%	25%
		MIC	n/o	25%	50%	25%	25%
	<i>P. aeruginosa</i>	MBC	n/o	25%	50%	25%	25%
		MIC	n/o	12,5%	25%	25%	25%
	<i>S. Enteritidis</i>	MBC	n/o	25%	50%	50%	25%
		MIC	n/o	25%	50%	25%	25%
Bakterie Gram-dodatnie	<i>S. aureus</i>	MBC	n/o	25%	50%	25%	25%
		MIC	n/o	12,5%	50%	25%	25%
	<i>L. monocytogenes</i>	MBC	n/o	50%	50%	50%	50%
		MIC	n/o	6,25%	25%	25%	6,25%
	<i>B. subtilis</i>	MBC	n/o	50%	50%	50%	50%
		MIC	n/o	25%	50%	50%	50%

MBC – ang. *minimum bactericidal concentration* – 100% zahamowania wzrostu, MIC – ang. *minimum inhibitory concentration* – 95% zahamowania wzrostu, n/o > nie określono

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka i in., 2021)

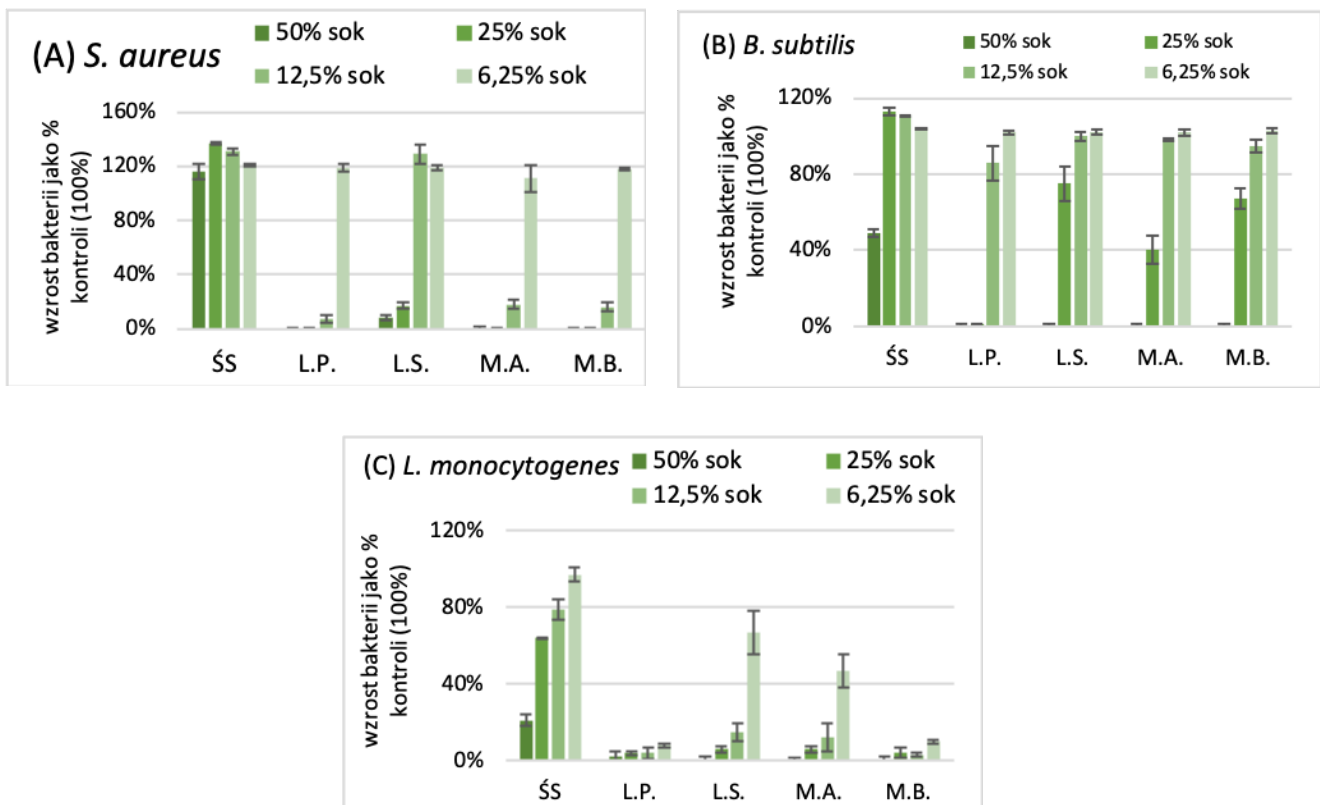
Dla uszczegółowienia powyższych danych, wyniki przedstawiono również na dwóch wykresach 13 i 14 (dla bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich) jako procent wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych w stosunku do kontroli.



Wykres 13 (A-C). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe świeżego i fermentowanego soku z jarmużu wobec bakterii Gram-ujemnych

ŚŚ – świeży sok, L.P. – sok fermentowany przez *L. plantarum*, L.S. – sok fermentowany przez *L. sakei*, M.A. – MIX A (sok fermentowany przez *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, i *L. sakei*), M.B. – MIX B (sok fermentowany przez *L. plantarum* i *L. sakei*)

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka i in., 2021)



Wykres 14 (A-C). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe świeżego i fermentowanego soku z jarmuzu wobec bakterii Gram-dodatnich

ŚŚ – świeży sok, L.P. – sok fermentowany przez *L. plantarum*, L.S. – sok fermentowany przez *L. sakei*, M.A. – MIX A (sok fermentowany przez *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, i *L. sakei*), M.B. – MIX B (sok fermentowany przez *L. plantarum* i *L. sakei*)

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka i in., 2021)

Jak wspomniano wcześniej, proces fermentacji przyczynił się do poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowych w porównaniu ze świeżym sokiem w stosunku do wszystkich badanych mikroorganizmów, jednak efekt ten był zależny od stężenia soku. Soki o stężeniu 50% i 25% całkowicie hamowały wzrost wszystkich mikroorganizmów wskaźnikowych. Natomiast, sok świeży w większości badanych mikroorganizmów stymulował ich wzrost (w szczególności *P. aeruginosa* oraz *E. coli*). Z drugiej strony, największe zahamowanie wzrostu odnotowano dla *L. monocytogenes* (we wszystkich badanych stężeniach świeżego soku) oraz dla *B. subtilis* (dla 50% stężenia soku).

Wśród bakterii Gram-ujemnych (wykres 13) najbardziej wrażliwe na oddziaływanie kiszzonego soku były bakterie *P. aeruginosa*. Sok fermentowany z użyciem szczepu *L. plantarum* JS052 i konsorcjum bakteryjnego MIX A efektywnie hamował wzrost tego mikroorganizmu nawet przy stężeniu 12,5% soku. Z kolei wzrost zarówno *E. coli* jak i *S. Enteritidis* był skutecznie hamowany przy 25% stężeniu soku przez warianty fermentowane z udziałem *L. plantarum* JS052, MIX A i MIX B. Zaobserwowano ponadto, że fermentacja soku z *L. plantarum* JS052 w największym stopniu hamowała

wzrost bakterii Gram-ujemnych. Natomiast, wariant produktu z użyciem szczepu *L. sakei* JS032 charakteryzował się słabszymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Jedynie 50% stężenie tego wariantu było w stanie całkowicie zahamować wzrost badanych drobnoustrojów.

Właściwości antagonistyczne fermentowanych soków w stosunku do bakterii Gram-dodatnich były stosunkowo lepsze niż wobec bakterii Gram-ujemnych. Bakterie *L. monocytogenes* wykazywały się największą wrażliwością wobec wszystkich fermentowanych próbek soku. Sok kiszony z użyciem *L. plantarum* JS052 oraz MIX B w największym zakresie stężeń hamował wzrost tego mikroorganizmu. Również bakterie *S. aureus* były podatne na oddziaływanie kiszonych soków w różnym zakresie stężeń. Zasadniczo, nawet 12,5% stężenie fermentowanych soków (niezależnie od wariantu) przyczyniało się do silnego ograniczenia wzrostu gronkowca złocistego. Natomiast, *B. subtilis* był najmniej wrażliwy spośród bakterii Gram-dodatnich. Jego wzrost był efektywnie hamowany przez wszystkie warianty soku w stężeniu 50%. Wyjątkiem był wariant soku otrzymany z udziałem *L. plantarum* JS052, który wykazywał działanie przeciwdrobnoustrojowe w 25% stężeniu. Podobnie, jak w przypadku bakterii Gram-ujemnych, najlepszymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi charakteryzował się sok fermentowany z użyciem szczepu *L. plantarum* JS052. Z kolei wariant soku z *L. sakei* JS032 był mniej skuteczny.

Literatura przedmiotu potwierdza niniejsze wyniki badań wskazujące, że proces kontrolowanej fermentacji mlekowej istotnie wpływa na właściwości antagonistyczne soków wobec różnych patogenów. Podobnie jak w przedstawionej pracy, badania przeprowadzone przez Michalak, Kubik-Komar, Waśko i Polak-Berecka, (2020) wykazały dobre właściwości przeciwdrobnoustrojowe fermentowanego soku z jarmużu z zastosowaniem autochtonicznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Autorzy wykazali, że właściwości przeciwdrobnoustrojowe były szczepozależne. Izolat *W. cibaria* wykazywał lepsze właściwości przeciwbakteryjne w porównaniu z innymi badanymi szczepami, takimi jak *L. plantarum* czy *L. paraplantarum*. Ponadto, podczas badań dotyczących fermentowanego soku pomidorowego (Liu i in., 2018) z udziałem *L. plantarum* i *L. casei* wykazano, że próbki soków charakteryzowały się znacznie lepszą aktywnością antagonistyczną wobec patogenów jelitowych, takich jak *E. coli*, w porównaniu z sokiem niesfermentowanym. Również sfermentowany sok z owoców mombinu (Ribeiro i in., 2020) z wykorzystaniem szczepu *L. acidophilus*, wykazywał dobre właściwości przeciwbakteryjne, zwłaszcza wobec *S. aureus* i *E. coli*, natomiast wobec *E. faecalis* nie stwierdzono żadnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Warto podkreślić, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa fermentowanych soków warzywnych oraz owocowych jest również powiązana z obecnością różnych związków bioaktywnych występujących naturalnie w roślinach lub pojawiających się w wyniku mikrobiologicznej biokonwersji. Możliwe zatem, że zarówno bakterie fermentacji mlekowej, jak również różnego rodzaju związki wykazują działanie synergistyczne hamując wzrost mikroorganizmów wskaźnikowych. Jednym z takich

przykładów mogą być związki fenolowe. Zgodnie z literaturą przedmiotu, zdolność ta jest najczęściej skorelowana z liczbą i położeniem grup hydroksylowych w związkach fenolowych (Lima i in., 2019). Zaobserwowano znaczne różnice w potencjale przeciwbakteryjnym związków fenolowych w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Przypuszcza się, że aktywność związków fenolowych w stosunku do bakterii Gram-ujemnych może być mniej efektywna ze względu na silną elektroujemność błony zewnętrznej w ścianie komórkowej (Li i in., 2014; Lima i in., 2019; Wafa i in., 2017).

Ponadto, w literaturze wskazuje się również, że glukozynolany i produkty ich hydrolizy wpływają na hamowanie wzrostu różnych mikroorganizmów (Favela-González i in., 2020). Stwierdzono, że produkty rozpadu glukozynolanów, takie jak izotiocyjaniiny, wykazują działanie hamujące wobec wielu mikroorganizmów, w tym grzybów i bakterii chorobotwórczych, z takich rodzajów jak *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Serratia*, *Staphylococcus* i *Listeria* (Alvarez, Moreira, Roura, Ayala-Zavala i González-Aguilar, 2015).

4.3.2.3. Właściwości przeciwutleniające i składniki bioaktywne

Kompleksowe projektowanie nowego produktu fermentowanego o właściwościach funkcjonalnych wymaga również wykonania analiz obejmujących jego właściwości przeciwutleniające oraz zmiany w zawartości różnych składników bioaktywnych o potencjale prozdrowotnym. W związku z tym, kiszone soki przebadano pod względem ich właściwości antyoksydacyjnych oraz ogólnej zawartości związków fenolowych z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu, a następnie zbadano zmiany w zawartości wybranych związków przynależących do fenoli, karotenoidów oraz glukozynolanów.

Związki przeciwutleniające występujące powszechnie w produktach roślinnych mają zdolność do neutralizacji wolnych rodników (ich niesparowane elektrony mogą uszkadzać kwasy nukleinowe, białka, węglowodany lub lipidy), a tym samym zapobiegają uszkodzeniom komórek poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego, co jednocześnie wywiera korzystny wpływ na zdrowie człowieka (Chandra i in., 2020). Do przeciwutleniaczy zaliczają się liczne związki, m.in. kwasy fenolowe, karotenoidy czy też witaminy A i C (Szajdek i Borowska, 2004). Zgodnie z literaturą przedmiotu, w większości badanych fermentowanych produktów owocowych lub warzywnych zaobserwowano istotne zmiany w aktywności przeciwutleniającej, jak również w ogólnej zawartości związków fenolowych (TPC) (Szutowska, 2020). Szczegółowe wyniki dotyczące właściwości antyoksydacyjnych oraz ogólnej zawartości związków fenolowych w różnych wariantach prototypów produktu zostały przedstawione w tabeli 37.

Tabela 37. Ogólna zawartość związków fenolowych oraz właściwości przeciwutleniające w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu

	Świeży sok	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	MIX A	MIX B
TPC ¹ [mg GAE/100 ml]	117,70±2,23 ^c	133,01±1,85 ^a	129,22±2,33 ^b	128,45±1,51 ^b	133,53±1,83 ^a
TEAC ² [mmol/100 ml]	2,88±0,15 ^a	2,99±0,23 ^a	2,76±0,22 ^a	2,58±0,10 ^a	2,61±0,22 ^a

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$;

¹Całkowita zawartość związków fenolowych jest wyrażona w mg ekwiwalentu kwasu galusowego (GAE) na 100 ml soku

²Właściwości antyoksydacyjne - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) jest wyrażony w mmol ekwiwalentu Troloxu w 100 ml świeżego soku

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka i in., 2021)

W toku analizy wykazano, że 24 godzinny proces kontrolowanej fermentacji mlekowej nie przyczynił się do istotnych zmian w aktywności przeciwutleniającej soków niezależnie od zastosowanej kultury starterowej. Co ciekawe, wcześniejsze badania dotyczące spontanicznej fermentacji soku dowiodły, że aktywność przeciwutleniająca wzrosła podczas tego procesu. Różnice te wynikały prawdopodobnie ze zróżnicowanego składu materiału roślinnego oraz z samego procesu spontanicznej fermentacji mlekowej, w którym - w przeciwieństwie do fermentacji kontrolowanej - uczestniczyło szerokie spektrum mikroorganizmów. Dodatkowo, na różnice te mogła wpłynąć również długość procesu fermentacji. Jak już wspomniano, literatura naukowa wskazuje, że proces fermentacji mlekowej może zarówno zwiększyć właściwości przeciwutleniające, jak i je obniżyć. Uzależnione jest to przede wszystkim od charakterystyki surowca roślinnego, jak również od szczepozależnych właściwości kultur starterowych. W przeciwieństwie do niniejszych badań, Michalak i in., (2020) zauważyli, że podczas kontrolowanej fermentacji soku z jarmużu zastosowanie różnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej spowodowało uzyskanie różnych właściwości przeciwutleniających. Na przykład, użycie *W. hellenica*, *L. curvatus*, *L. lactis* i *P. acidilactici* spowodowało uzyskanie najniższych badanych wartości, podczas gdy metabolizm *W. cibaria*, *L. plantarum* i *L. mesenteroides* przyczynił się do zwiększenia aktywności przeciwutleniającej. Również podczas kontrolowanej fermentacji soku z aronii (Bontsidis i in., 2021) z użyciem szczepu *L. paracasei*, autorzy wykazali, że aktywność przeciwutleniająca znacząco wzrosła głównie w pierwszym tygodniu fermentacji w temperaturze 4°C, a następnie utrzymywała się na stałym poziomie do końca okresu przechowalniczego. Natomiast Sofia i in., (2020), podobnie jak w niniejszym badaniu, udowodnili, że fermentacja soku z flaszowca peruwiańskiego nie przyczyniła się do zmian we właściwościach antyoksydacyjnych, pomimo zastosowania różnych gatunków bakterii fermentacji mlekowej (*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* oraz *F. tropaeoli*).

Kolejnym analizowanym zagadnieniem było określenie ogólnej zawartości związków fenolowych (TPC) (tabela 37). Związki fenolowe powszechnie występują w żywności pochodzenia

roślinnego i stanowią istotny element zbilansowanej diety. Regularne spożywanie produktów bogatych w związki fenolowe ma kluczowy wpływ na zdrowie człowieka, szczególnie ze względu na ich właściwości przeciwutleniające (Rodríguez i in., 2009). Metabolizm szczepu *L. plantarum* JS052 i konsorcjum bakteryjnego MIX B wpłynął na wzrost TPC odpowiednio z 117,70 do 133,01 i 133,53 mg GAE/100 ml soku. Również *L. sakei* JS032 i MIX A przyczyniły się do wzrostu TPC, jednak w mniejszym stopniu niż dwa poprzednio wymienione warianty. Wcześniejsze badania dotyczące spontanicznej fermentacji soku z jarmużu (zaprezentowane na etapie badań podstawowych) również wskazywały na podwyższone parametry TPC, jednak w zdecydowanie większym stopniu. Powyższe wyniki znajdują potwierdzenie w innych publikacjach naukowych dotyczących fermentowanych soków. Proces fermentacji mlekowej soku z głożyny pospolitej przyczynił się do zwiększenia ogólnej zawartości związków fenolowych przy jednoczesnym spadku zawartości flawonoidów (Li i in., 2021; Xu i in., 2019; Zhao i in., 2019). Podobnie, podczas kontrolowanej fermentacji soku z morwy (Kwaw i in., 2018) wszystkie zastosowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej (*L. plantarum*, *L. paracasei* oraz *L. acidophilus*) przyczyniły się do wzrostu TPC. Poziom wzrostu był zróżnicowany w zależności od użytej kultury starterowej. Natomiast, w przeciwieństwie do niniejszych badań, fermentacja soku z flaszowca peruwiańskiego istotnie przyczyniła się do spadku zawartości związków fenolowych w wyniku metabolizmu szczepu *L. paracasei* (Sofía i in., 2020).

Zgodnie z danymi literaturowymi, związki fenolowe mogą być przekształcane w procesie fermentacji mlekowej, co z kolei może prowadzić do powstania nowych, potencjalnie wartościowych pochodnych. Biokonwersja związków fenolowych przez bakterie fermentacji mlekowej jest skutecznym mechanizmem umożliwiającym detoksykację niepożądanych związków o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym (Filannino i in., 2018; Reverón i in., 2012; Sánchez-Maldonado i in., 2011). Szczepy bakterii fermentacji mlekowej mogą wytwarzać enzymy hydrolityczne, które przyczyniają się do hydrolizy związków fenolowych do prostszych form (Li i in., 2021; Vivek i in., 2019).

Konsekwentnie, w kolejnym kroku obejmującym określenie właściwości prozdrowotnych innowacyjnego produktu – fermentowanego soku z jarmużu zielonego przeanalizowano zmiany w profilu związków fenolowych metodą HPLC. Związki fenolowe są głównymi substancjami powstającymi w wyniku wtórnego metabolizmu roślin. Są one odpowiedzialne za pigmentację i cierpkość, a także działają jako czynniki ochronne przed promieniowaniem UV oraz dodatkowo chronią rośliny przed pasożytami i owadami. Związki te można znaleźć w ogromnej różnorodności matryc roślinnych m.in. w kapuście, szpinaku, jarmużu, jagodach, owocach cytrusowych czy też w grzybach. Związki fenolowe mogą wykazywać liczne cechy wpływające na zdrowie człowieka, takie jak: właściwości antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne oraz neuroprotektoryjne (Albuquerque i in., 2021). Warzywa krzyżowe są zróżnicowane pod względem profilu i zawartości związków fenolowych. Zielony jarmuż jest ich bogatym źródłem,

z największym udziałem flawonoidów i kwasów fenolowych. Z kolei zdolność antyoksydacyjna poszczególnych związków fenolowych zależy od ich stabilności w różnych układach i strukturach, zwłaszcza od liczby i położenia grup hydroksylowych (Olsen i in., 2009). Wyniki zawartości związków fenolowych zostały zaprezentowane w tabeli 38.

Tabela 38. Zawartość związków fenolowych (mg/100 ml) w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego

	Świeży sok	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	MIX A	MIX B
Kwas kofeilochinowy	12,1±0,5 ^b	10,8±0,8 ^{ab}	9,5±0,8 ^c	10,9±0,4 ^{ab}	10,1±0,7 ^{ac}
Kwas ferulowy	3,7±0,2 ^a	3,4±0,3 ^a	3,4±0,9 ^a	3,4±0,3 ^a	3,4±0,3 ^a
Kwas kawowy	4,6±0,1 ^b	3,5±0,5 ^a	3,1±0,4 ^a	3,6±0,1 ^a	3,1±0,5 ^a
Kwas synapowy	15,0±0,1 ^c	12,7±1,3 ^a	10,7±1,4 ^b	13,1±0,6 ^{ac}	12,4±0,8 ^{ab}
Inne kwasy hydroksycynamonowe	1,1±0 ^a	1,2±0,2 ^a	1,0±0,2 ^a	1,2±0,1 ^a	1,1±0,2 ^a
Kwercetyna	31,7±0,3 ^d	28,6±1 ^{cd}	21,4±2,7 ^a	23,9±2,1 ^{ab}	25,3±2,4 ^{bc}
Kemferol	82,7±0,6 ^b	77,8±2,3 ^{ab}	70,0±9,2 ^a	75,7±1,1 ^{ab}	69,7±6,1 ^a
Związki fenolowe ogółem	150,9±1,3^c	138,1±4,4^{bc}	119,1±14,4^a	131,8±3,1^{ab}	125,2±10,7^{ab}

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka, i in., 2021)

Proces kontrolowanej fermentacji mlekowej soku z jarmużu zielonego przyczynił się do licznych zmian w profilu związków fenolowych. Zasadniczo zmiany w zawartości tych związków były uzależnione od zastosowanej kultury starterowej. Dla większości wykorzystanych kultur bakteryjnych odnotowano ogólny spadek zawartości związków fenolowych. Jedynie sok fermentowany z użyciem szczepu *L. plantarum* JS052 przyczynił się do utrzymania zawartości związków fenolowych na takim samym poziomie jak w świeżym soku. Jednakże, metabolizm tego szczepu przyczynił się do obniżenia zawartości kwasu kawowego i synapowego. Natomiast, do największego obniżenia zawartości związków fenolowych przyczynił się sok fermentowany z wykorzystaniem szczepu *L. sakei* JS032. Dla tej kultury zaobserwowano znaczące spadki kwasu kofeilochinowego, kawowego, synapowego, kwercetyny oraz kemferolu, przy jednoczesnym utrzymaniu poziomu kwasu ferulowego oraz innych kwasów hydroksycynamonowych. Natomiast, w przypadku zastosowania konsorcjów bakteryjnych MIX A oraz MIX B, zmiany w zawartości związków fenolowych były porównywalne. Metabolizm kultury MIX A spowodował spadek zawartości kwasu kawowego oraz kwercetyny, przy utrzymaniu zawartości pozostałych związków fenolowych. Z kolei fermentacja soku z udziałem kultury MIX B przyczyniła się do obniżenia poziomu kwasu kofeilochinowego, kawowego, synapowego, kwercetyny oraz kemferolu, a zawartość pozostałych związków była porównywalna do świeżego soku z jarmużu.

Wyniki powyższych analiz znajdują potwierdzenie w literaturze przedmiotu, która wskazuje na liczne zmiany w zawartości związków fenolowych związanych z mikrobiologiczną biokonwersją surowca roślinnego (Filannino i in., 2018; Rodríguez i in., 2009). Fermentacja soku z owoców śliwowca

mombin z wykorzystaniem szczepu *L. acidophilus* (Ribeiro i in., 2020) przyczyniła się do zmian w zawartości poszczególnych związków fenolowych. Autorzy zaobserwowali, że proces fermentacji spowodował obniżenie zawartości kwasu galusowego, katechiny, kwasu elagowego, eugenolu, przy jednoczesnym zwiększeniu zawartości kwercetyny (Ribeiro i in., 2020). Podobnie, jak w niniejszych badaniach, analizy przeprowadzone przez Jaiswal i Abu-Ghannam, (2013) wykazały różne straty związków fenolowych w probiotycznym soku z kapusty po procesie fermentacji, w zależności od zastosowanego szczepu bakterii fermentacji mlekowej, 15% dla *L. plantarum* i *L. brevis* oraz 24% dla *L. rhamnosus*. Ponadto, Filannino, Bai, Di Cagno, Gobbetti, i Ganzle, (2015) wskazali, że metabolizm związków fenolowych jest silnie uzależniony od charakterystyki materiału roślinnego. Autorzy zaobserwowali różne szlaki biokonwersji fenoli w soku wiśniowym i przecierze brokułowym przy użyciu tych samych szczepów bakterii. Z kolei badania prowadzone nad kiszonym sokiem z morwy (Kwaw i in., 2018) z użyciem różnych izolatów bakterii fermentacji mlekowej wykazały zróżnicowany wpływ badanych gatunków bakterii na zawartość poszczególnych fenoli. Wszystkie badane szczepy przyczyniły się do wzrostu zawartości kwasu kawowego, kwas ferulowego oraz wzrostu flawanoli tj. kwercetyna oraz kemferol, jednakże w różnym zakresie. Szczep *L. plantarum* w największym stopniu spowodował wzrost kwasów kawowego oraz ferulowego, natomiast szczep *L. paracasei* wpłynął istotnie na wysoki wzrost kwercetyny oraz kemferolu w badanych sokach.

W następnym etapie badań koncentrujących się na określeniu właściwości prozdrowotnych kiszonych soków z jarmużu przeprowadzono analizy mające na celu ustalenie zawartości wybranych karotenoidów metodą HPLC. Karotenoidy są szeroko rozpowszechnionymi, naturalnymi i wszechstronnymi związkami, które są stale obecne w naszej diecie. Związki te dzieli się zazwyczaj na dwie grupy według ich budowy chemicznej: ksantofile, które zawierają co najmniej jedną grupę funkcyjną z tlenem, oraz karoteny, które zawierają tylko szkielet węglowodorowy (Mapelli-Brahm i in., 2020). Spożywanie karotenoidów ma korzystny wpływ na zdrowie poprzez zmniejszanie ryzyka wystąpienia m.in. niektórych form nowotworów, chorób układu krążenia i zwyrodnienia plamki żółtej. Mechanizm działania karotenoidów nie został jednoznacznie określony; wiąże się on jednak z ich zdolnością antyoksydacyjną, która działa przeciwko reaktywnym formom tlenu i unieszkodliwia wolne rodniki, choć wykazano również, że karotenoidy mogą modulować ekspresję genów (Elvira-Torales i in., 2019). Jarmuż zielony jest doskonałym źródłem karotenoidów w diecie; zgodnie z danymi literaturowymi ma najwyższe stężenie luteiny i β -karotenu spośród wszystkich warzyw (Holden i in., 1999; Kurilich i in., 1999). Warto podkreślić, że ilość karotenoidów w warzywach zależy od wielu zmiennych, takich jak odmiana, warunki uprawy, dojrzałość, pora roku i część rośliny (Lefsrud i in., 2007). Szczegółowe wyniki dotyczące zawartości karotenoidów w poszczególnych prototypach fermentowanych soków zostały przedstawione w tabeli 39.

Tabela 39. Zawartość karotenoidów ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego

	Świeży sok	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	MIX A	MIX B
Neoksantyna	85,2 \pm 3,0 ^c	14,8 \pm 0,5 ^a	20,2 \pm 1,6 ^b	14,6 \pm 1,1 ^a	13,8 \pm 1,8 ^a
Wiolaksantyna	181,3 \pm 0,7 ^d	13,2 \pm 0,6 ^a	3,6 \pm 1,4 ^b	12,5 \pm 1,1 ^a	6,8 \pm 1,6 ^c
13-cis luteina	17,2 \pm 2,0 ^c	13,2 \pm 0,3 ^a	5,7 \pm 3,2 ^b	10,5 \pm 0,4 ^a	10,3 \pm 1,6 ^a
All-trans luteina	775,7 \pm 15,4 ^a	641,4 \pm 6,3 ^{bc}	734,9 \pm 51,2 ^a	715,1 \pm 41,8 ^a	583,2 \pm 47,5 ^b
Zeaksantyna	97,7 \pm 1,4 ^b	86,3 \pm 0,4 ^a	75,7 \pm 2 ^c	94,1 \pm 1,4 ^b	83,8 \pm 3,6 ^a
9-cis luteina	67,3 \pm 1,9 ^c	105,1 \pm 3,5 ^{ab}	111,1 \pm 9,5 ^{ab}	115,7 \pm 4,4 ^b	98,5 \pm 8,4 ^a
β -kryptoksantyna	40,0 \pm 0,8 ^c	4,6 \pm 0,8 ^a	0 \pm 0 ^b	7,1 \pm 0,5 ^a	5,8 \pm 0,9 ^a
β -karoten	674,7 \pm 12,0 ^c	552,3 \pm 8,2 ^a	635,7 \pm 9,5 ^b	636,3 \pm 24,9 ^b	531,9 \pm 14,6 ^a
Karotenoidy ogółem	1939,1\pm26,7^c	1430,9\pm17,0^a	1586,8\pm78,3^b	1605,9\pm71,9^b	1334,1\pm73,0^a

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka, i in., 2021)

24 godzinny proces fermentacji mlekowej przyczynił się do spadku ogólnej zawartości karotenoidów niezależnie od kultury starterowej z 1939 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ do przedziału od 1605 - 1334 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Jednakże, poziom pojedynczych związków był uzależniony od indywidualnych szlaków metabolicznych zastosowanych mikroorganizmów, czy to w postaci monokultury czy kultur mieszanych. Dla wszystkich badanych wariantów soku odnotowano istotny wzrost 9-cis luteiny. Rozważając zmiany w biokonwersji karotenoidów przez poszczególne warianty produktu zaobserwowano, że fermentacja soku z wykorzystaniem szczepu *L. sakei* JS032 oraz konsorcjum bakteryjnego MIX A w najmniejszym stopniu wpłynęła na obniżenie zawartości karotenoidów w porównaniu ze świeżym sokiem. Metabolizm obu wariantów (*L. sakei* JS032 i MIX A) pozwolił na utrzymanie zawartości all-trans luteiny porównywalnej do tej w świeżym soku z jarmużu zielonego. Co ciekawe, konsorcjum mikroorganizmów występujące w MIX A przyczyniło się również do utrzymania zawartości zeaksantyny, co prawdopodobnie jest wynikiem występowania szczepu *L. mesenteroides* JS027 w danym wariantcie. Z kolei jedynie w przypadku soku fermentowanego z *L. sakei* JS032 zaobserwowano całkowity spadek β -kryptoksantyny. W przypadku dwóch pozostałych próbek soku wytworzonych na drodze fermentacji z użyciem szczepu *L. plantarum* oraz konsorcjum MIX B odnotowano największy spadek ogólnej zawartości karotenoidów. Warianty te przyczyniły się do istotnych zmian zawartości all-trans luteiny, β -karotenu oraz neoksantyny.

Podobne wyniki uzyskali Kun, Rezessy-Szabó, Nguyen, i Hoschke (2008) podczas kontrolowanej fermentacji soku marchwiowego z zastosowaniem wybranych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*. Autorzy wykazali 15-45% degradację α -karotenu i β -karotenu w soku marchwiowym po 24 godzinach fermentacji, w zależności od zastosowanego szczepu. Natomiast, Di Cagno i in., (2019) w swoich badaniach zaobserwowali różne straty β -karotenu w sfermentowanym soku z *Portulaca oleracea* L. w zależności od użytego szczepu bakterii fermentacji mlekowej. W przypadku szczepów *L. brevis* i *L. rossiae* straty te były mniejsze (2% i 0,5%) niż w przypadku szczepów *P. pentosaceus*

i *L. mesenteroides* (12,5% i 10,5%). Z kolei w przypadku szczepów *L. plantarum* straty β -karotenu wynosiły od 2 do 7,5%. W przeciwieństwie do niniejszych badań, autorzy (Xu i in., 2020) dowiedli, że proces kontrolowanej fermentacji soku marchwiowego (zwykłego oraz zagęszczonego) prowadzony przez dwa różne szczepy *L. gasseri* przyczynił się do wzrostu zawartości karotenoidów, w szczególności β -karotenu w soku zagęszczonym. Autorzy przypuszczają, że jest to powiązane z odpowiedzią *L. gasseri* na wyższy poziom stresu oksydacyjnego, ponieważ liczne gatunki bakterii fermentacji mlekowej są znane z syntezy karotenoidów jako mechanizmu ochronnego przed stresem. Co więcej, autorzy podkreślają, że proces fermentacji mlekowej może również zwiększać uwalnianie i biodostępność karotenoidów w matrycy soku (Xu i in., 2020).

Ostatnim etapem w scharakteryzowaniu właściwości prozdrowotnych fermentowanych soków była analiza uwzględniająca zmiany w zawartości glukozynolanów. Glukozynolany stanowią dobrze zdefiniowaną klasę anionowych związków naturalnych występujących w kapustach, gorczycach i roślinach pokrewnych (Blažević i in., 2020). Potencjalne korzystne właściwości tych związków oraz produktów ich enzymatycznej hydrolizy to: działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniające, antymutagenne i przeciwnowotworowe (Vig i in., 2009). Wyniki zmian w zawartości glukozynolanów w fermentowanych sokach z jarmużu zielonego przedstawiono w tabeli 40.

Tabela 40. Zawartość glukozynolanów (mg/100 ml) w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego

		Świeży sok	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	MIX A	MIX B
Glukozynolany alifatyczne	GI	43,6±4,3 ^c	10,1±0,4 ^b	14,4±0,6 ^a	15,3±1,5 ^a	15,5±0,9 ^a
	PG	3,9±0,3 ^b	1,7±0,2 ^a	2,0±0,4 ^a	2,7±0,3 ^c	3,7±0,6 ^b
	SG	6,0±1,1 ^a	6,1±0,8 ^a	1,7±0,4 ^b	5,0±0,4 ^a	5,2±0,9 ^a
	GR	31,0±0,8 ^d	10,6±0,2 ^c	18,0±0,9 ^{ab}	18,5±1,6 ^b	15,8±1,9 ^a
	GN	5,7±0,3 ^c	0,9±0,1 ^a	1,4±0,4 ^b	1,3±0,3 ^{ab}	1,2±0,2 ^{ab}
Glukozynolany indolowe	4h-GB	16,3±1,2 ^b	1,6±0,6 ^a	1,6±0,5 ^a	1,8±0,2 ^a	1,3±0,4 ^a
	GB	65,8±1,3 ^d	4,3±0,8 ^a	5,0±0,5 ^{ab}	6,1±0,3 ^{bc}	6,3±0,5 ^c
	4m-GB	2,4±0,1 ^d	1,4±0,2 ^a	0,6±0,1 ^b	1,1±0,1 ^c	1,4±0,1 ^a
	NGB	1,4±0,5 ^b	0,8±0,2 ^a	0,8±0,2 ^a	0,8±0,1 ^a	0,9±0,1 ^a
Glukozynolany ogółem		176,0±3,1^d	37,5±3,2^b	45,4±3,3^c	52,4±2,9^a	51,3±2,1^a

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w wierszu nie różniły się istotnie przy $p < 0,05$

GI-glukoiberyna, PG-progoitryna, SG-sinigrina, GR-glukorafanina, GN-glukonapina, 4h-GB-4-hydroksyglukobrassycyna, GB-glukobrassycyna, 4m-GB-4-metoksyglukobrassycyna, NGB-neoglukobrassycyna

Źródło: (Szutowska, Gwiazdowska, Rybicka, i in., 2021)

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano istotny spadek zawartości glukozynolanów w trakcie procesu fermentacji mlekowej. Zawartość poszczególnych związków była różna w zależności od użytej kultury starterowej w procesie. Fermentacja soku z wykorzystaniem konsorcjum bakteryjnego MIX A oraz MIX B przyczyniła się w najmniejszym stopniu do strat w zawartości glukozynolanów – odpowiednio 52,4 mg/100 ml oraz 51,3 mg/100 ml. W obu prototypach produktu

zawartość sinigriny pozostała na porównywalnym poziomie jak w świeżym soku. Ponadto, sok fermentowany z użyciem kultury bakteryjnej MIX B sprzyjał utrzymaniu stałej zawartości progoitryny. Również metabolizm szczepu *L. plantarum* JS052 pozwolił na zachowanie porównywalnego poziomu sinigriny w stosunku do soku niefermentowanego, aczkolwiek użycie tego szczepu wiązało się największymi stratami glukozynolanów spośród innych badanych wariantów. Z kolei sok kiszony z wykorzystaniem szczepu *L. sakei* JS032 spowodował spadek zawartości wszystkich związków, ale w mniejszym stopniu niż szczep *L. plantarum* JS052.

Zgodnie z literaturą przedmiotu proces fermentacji mlekowej może wpływać na zawartość glukozynolanów. W przeciwieństwie do niniejszych wyników, badania koncentrujące się na kontrolowanej fermentacji puree z brokułów dowiodły, że bakterie fermentacji mlekowej mogą przyczynić się do wzrostu zawartości glukozynolanów (Ye i in., 2019). Autorzy wykorzystali różne autochtoniczne szczepy bakterii przynależące do gatunków *L. mesenteroides* oraz *L. plantarum*. Przed fermentacją próbki puree zostały poddane obróbce termicznej, podobnie jak sok w niniejszej pracy. Autorzy zaobserwowali, że obróbka termiczna przyczyniła się do obniżenia zawartości glukozynolanów. Jednakże, po przeprowadzeniu fermentacji mlekowej zawartość glukozynolanów (glukoiberyny, progoitryny oraz glukorafaniny) znacznie wzrosła, a całkowite stężenie glukozynolanów wahało się od 55 µg/g do 359 µg/g. Co ciekawe, badacze odnotowali szczepozależne szlaki metaboliczne bakterii w obrębie gatunków. Przykładowo zawartość glukoiberyny podczas fermentacji różnymi szczepami *L. plantarum* wahała się od 0 do 56,2 µg/g. A zawartość glukorafaniny wynosiła od 29 µg/g do 169 µg/g w zależności od użytego szczepu *L. mesenteroides*. Z drugiej strony, podobne wyniki do niniejszej pracy uzyskali Nugrahedi, Widianarko, Dekker, Verkerk, i Oliviero (2015) którzy odnotowali 80% spadek zawartości glukozynolanów podczas fermentacji kapusty sitowatej. Autorzy sugerowali, że podczas fermentacji mlekowej bakterie wykazywały pewną aktywność mirozynazopodobną, która katalizowała hydrolizę glukozynolanów. Inni autorzy również dowiedli, że fermentacja mlekowa przyczynia się do spadku zawartości glukozynolanów w przypadku spontanicznie kiszonej kapusty (Palani i in., 2016). Degradacja glukozynolanów rozpoczęła się od drugiego dnia procesu a od piątego dnia nastąpił już znaczny spadek zawartości, kiedy to około 90% wszystkich glukozynolanów uległo degradacji. Autorzy zwrócili uwagę na fakt, że silny spadek zawartości glukozynolanów był skorelowany z rosnącą liczebnością bakterii fermentacji mlekowej, które wykazują zdolność do metabolizowania tych związków. Co ciekawe po 7 dniu procesu nie zaobserwowano już wykrywalnej ilości glukozynolanów.

Należy wspomnieć, że występujące w roślinach glukozynolany są nieaktywne. Dopiero w momencie różnego rodzaju procesów (tj. krojenie, żucie) glukozynolany podlegają hydrolizie enzymatycznej z udziałem mirozynazy (glukohydrolaza β-tioglukozydowa [EC 3.2.1.147]), która występuje naturalnie w komórkach roślinnych, ale przed jakimkolwiek działaniem jest przestrzennie oddzielona od tych związków. Po uszkodzeniu roślin, glukozynolany są rozkładane przez mirozynazę do

szeregu fizjologicznie aktywnych związków, takich jak izotiocyjaniany, tiocyjaniany, proste nitryle i epitiocyjaniany (Bhat i Vyas, 2019; Martinez-Ballesta i Carvajal, 2015). Jednakże, biorąc pod uwagę przeprowadzony proces pasteryzacji soku z jarmużu zielonego możliwe jest, że pewna część enzymu mirozynyzy została inaktywowana. Enzym ten jest bowiem wrażliwy na wysokie temperatury (Oloyede i in., 2021). W związku z tym wydaje się, że glukozynolany nie będą wykazywać swoich właściwości prozdrowotnych. Należy jednak wziąć pod uwagę badania wskazujące, że mikrobiota jelitowa może z sukcesem hydrolizować glukozynolany do ich wartościowych pochodnych poprzez wytwarzanie bakteryjnego enzymu mirozynyzy (Sikorska-Zimny i Beneduce, 2021). W związku z tym, pomimo możliwej degradacji enzymu mirozynyzy, kiszony sok z jarmużu może być dobrym źródłem wartościowych glukozynolanów i ich pochodnych.

Podsumowanie

Nadrzędnym celem etapu rozwoju nowego produktu spożywczego było zaprojektowanie innowacyjnego produktu w oparciu o fermentowany sok z jarmużu zielonego z wykorzystaniem autochtonicznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej o potencjale probiotycznym. W tym celu kompleksowe badania w tym rozdziale zmierzały do stworzenia i przetestowania czterech prototypów produktu o właściwościach prozdrowotnych - soków z jarmużu poddanych kontrolowanej fermentacji z wykorzystaniem potencjalnie probiotycznych mikroorganizmów. W pierwszej kolejności przeprowadzono badania pilotażowe koncentrujące się na wyborze najbardziej optymalnych kultur starterowych (spośród 10 wybranych izolatów na etapie badań stosowanych) pod względem wysokiej liczebności komórek oraz skutecznego zakwaszania produktu. Tym sposobem, wyselekcjonowano 3 izolaty bakterii fermentacji mlekowej *L. mesenteroides* JS027, *L. sakei* JS032 oraz *L. plantarum* JS052, które w badaniu właściwym zostały wykorzystane jako monokultury i kultury mieszane w kontrolowanej fermentacji soku. Kolejno, bardzo szczegółowo zbadano wpływ poszczególnych kultur starterowych na właściwości fermentowanego soku z jarmużu. Przedstawione badania wykazały, że wpływ na cechy produktu zależy od indywidualnych szlaków metabolicznych zastosowanych kultur starterowych. W trakcie badań zaobserwowano, że szczep *L. sakei* JS032 posiada zdolność do syntezy zarówno ryboflawiny, jak i pirydoksyny. Natomiast fermentacja z użyciem *L. plantarum* JS052 wykazała wzrost zawartości pirydoksyny i spadek zawartości ryboflawiny. Również wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa przyczynia się do zwiększenia właściwości prozdrowotnych fermentowanego soku z jarmużu. Pod tym względem fermentacja z udziałem *L. plantarum* JS052 przyczyniła się do uzyskania najkorzystniejszych wyników antybakteryjnych wobec wszystkich badanych patogenów. Co ważne, wszystkie testowane warianty charakteryzowały się odpowiednio wysoką liczebnością i żywotnością bakterii fermentacji mlekowej, a w szczególności wariant z *L. plantarum* JS052, który wykazywał najlepszą żywotność komórek. Powyższe cechy

świadczą o ich przydatności technologicznej, jak również o ich potencjalnych właściwościach probiotycznych, ze względu na możliwą efektywną kolonizację mikrobioty jelitowej.

Następnie udowodniono zależny od szczepu wpływ na biokonwersję związków fenolowych, karotenoidów i glukozynolanów. Metabolizm szczepu *L. plantarum* JS052 przyczynił się do utrzymania znacznej zawartości kwasów fenolowych, a zwłaszcza kwasów: kofeinowego i synapowego. Natomiast fermentacja z udziałem *L. sakei* JS032 spowodowała większe obniżenie zawartości związków fenolowych, przy czym szczególnie duże straty odnotowano w przypadku kwercetyny i kemferolu. W przypadku karotenoidów większą degradację zaobserwowano w próbkach fermentowanych przy użyciu *L. plantarum* JS052 i MIX B w porównaniu z *L. sakei* JS032 i MIX A. Zawartość glukozynolanów może być również modyfikowana przez metabolizm użytych szczepów. Najlepsze parametry produktu pod względem zawartości glukozynolanów można uzyskać po fermentacji z użyciem kultur mieszanych (zarówno MIX A, jak i MIX B). Powyższe badania umożliwiły **pozytywną weryfikację hipotezy H4** oraz **zweryfikowały hipotezę H5**. Weryfikacja **pozytywna hipotezy 5** dotyczyła wzrostu zawartości witamin z grupy B oraz wyższej zawartości 9-cis-luteiny dla wszystkich badanych wariantów. Natomiast weryfikacja **negatywna obejmowała** właściwości przeciwutleniające, ogólną zawartość związków fenolowych, dla glukozynolanów indolowych, części związków fenolowych, karotenoidów i części glukozynolanów alifatycznych.

Podsumowanie

Celem niniejszej pracy doktorskiej było **zaprojektowanie i rozwój prototypu nowego produktu spożywczego poprzez fermentację soku z jarmużu przy użyciu wyselekcjonowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej**. Cały proces badawczy opierał się na koncepcji rozwoju nowego produktu z uwzględnieniem specyfikacji dla projektowania produktów spożywczych. Przedstawiona praca doktorska, koncentrująca się na kompleksowej charakterystyce fermentowanego soku z jarmużu na bazie koncepcji rozwoju nowego produktu spożywczego, wymagała zastosowania wielokierunkowych metod badawczych, tj. systematycznego przeglądu literatury obejmującego analizę modeli rozwoju nowego produktu spożywczego, badań ankietowych dotyczących zachowań konsumentów na rynku niemlecznej żywności fermentowanej oraz metod mikrobiologicznych, fizykochemicznych i instrumentalnych koncentrujących się na określeniu właściwości prozdrowotnych i wyróżników jakościowych fermentowanego soku z jarmużu zielonego.

Szereg przeprowadzonych analiz, obejmujący koncepcję rozwoju nowego produktu fermentowanego, istotnie wzbogacił istniejący stan wiedzy, zarówno w warstwie teoretycznej jak również empirycznej. W warstwie teoretycznej, wypracowany model rozwoju nowych produktów spożywczych, dzięki uwzględnieniu specyfiki branży, uzupełnia obecny stan wiedzy z zakresu zarządzania procesem rozwoju nowych produktów w ujęciu projektowym. Z kolei w warstwie empirycznej, liczne badania laboratoryjne wskazują na możliwość nowatorskiego wykorzystania soku z jarmużu zielonego w postaci fermentowanego produktu o właściwościach funkcjonalnych obejmujących właściwości probiotyczne oraz wysoką zawartość związków bioaktywnych.

Na podstawie danych literaturowych stwierdzono, że branża spożywcza jest branżą dojrzałą z dominującą pozycją nielicznych, największych przedsiębiorstw. Przyjmując porterowskie podejście do analizy konkurencji w ramach branży (Porter, 1980; Porter, 2008) ustalono, iż występowanie w branży spożywczej ograniczonej liczby liderów rynkowych niesie ze sobą ryzyko kontroli cen w branży i rodzi potrzebę wzrostu konkurencji pozacenowej. W związku z tym, realizacja strategii różnicowania – stanowiąca alternatywę dla strategii przywództwa cenowego – ma wysokie szanse powodzenia dla przedsiębiorstw spożywczych, gdyż pomimo aktywnego zaangażowania podmiotów w działalność badawczo-rozwojową, w branży tej dominują innowacje inkrementalne (Jurek-Stępień i Wysocki, 2007). Dlatego też jednym ze skutecznych elementów strategii dyferencjacji jest projektowanie nowych produktów niosących ze sobą unikatowe właściwości.

Konieczność rozwoju nowych produktów jest naturalną konsekwencją organizacji rynku spożywczego, w którym silna konkurencja wymusza dostosowanie podaży do popytu rynkowego. Osiągnięcie sukcesu rynkowego przez nowy produkt wymaga, aby został on zaakceptowany przez konsumentów. Wykorzystanie wiedzy o użytkownikach końcowych pozwala rozwijać produkty

spożywcze, które będą w stanie zaspokoić potrzeby konsumentów, a tym samym będą dopasowane do oczekiwań potencjalnych nabywców (Anwar, 2016). W pracy wyjaśniono, że dopasowanie produktu do oczekiwań konsumentów jest jedną z podstawowych cech wpływających na późniejszy sukces rynkowy nowego produktu. Wprowadzenie nowego produktu na rynek jest procesem złożonym i działanie to nieodłącznie związane jest z ryzykiem niepowodzenia, co dla przedsiębiorstw spożywczych jest kwestią problematyczną. W odniesieniu do powyższych rozważań, w pracy wypracowano modelowe podejście do rozwoju nowych produktów spożywczych, którego wykorzystanie przez przedsiębiorstwa potencjalnie mogłoby zminimalizować ryzyko niepowodzeń.

W celu wypracowania modelu rozwoju nowego produktu spożywczego przeprowadzono systematyczny przegląd literatury obejmujący różne podejścia do rozwoju nowego produktu w branży spożywczej. Opracowany model obejmuje siedem wyróżniających się etapów: generowanie pomysłu, selekcję pomysłu, badania, rozwój, testowanie, wprowadzenie na rynek oraz monitorowanie. Model ten przyjmuje perspektywę procesową opartą na logice sekwencyjnej, w której kolejne etapy następując po sobie, tworzą spójny ciąg. U podstaw kompozycji modelu leży założenie, że w celu rozwoju nowego produktu spożywczego należy zrealizować sekwencję logicznie wyodrębnionych czynności. Model bazuje na założeniu, że wszystkie etapy są ze sobą powiązane, a proces może przebiegać zarówno od wcześniejszych do późniejszych etapów, jak i może zostać cofnięty z późniejszych etapów do etapów wcześniejszych (np. nieudane testowanie może sprawić, że produkt trafi z powrotem do etapu rozwoju). W ramach pracy dokładnie scharakteryzowano wszystkie etapy procesu:

1. **Generowanie pomysłu** - wykorzystanie wszystkich dostępnych wewnętrznych i zewnętrznych źródeł pomysłów na nowe produkty.
2. **Selekcja pomysłu** - selekcja pomysłów w oparciu o ustalone kryteria oceny obejmujące analizę otoczenia i strategię firmy.
3. **Badania** - prowadzenie zarówno badań podstawowych (skoncentrowanych na zdobywaniu nowej wiedzy) oraz badań stosowanych (skoncentrowanych na konkretnych i z góry określonych zastosowaniach docelowych).
4. **Rozwój** - wykorzystanie istniejącej wiedzy zdobytej podczas etapu badań w celu wytworzenia prototypu produktu.
5. **Testowanie** - przeprowadzenie obowiązkowych testów jakościowych oraz określenie pozycji nowego produktu na rynku.
6. **Wprowadzenie na rynek** - produkcja nowych produktów i możliwe dostosowanie obecnego procesu produkcyjnego, a także wprowadzenie produktów na rynek.
7. **Monitorowanie** - zdobywanie doświadczenia, rejestrowanie danych jakościowych i ilościowych oraz wykonywanie analiz w celu poszerzenia bazy wiedzy firmy.

W odniesieniu do dwóch pierwszych etapów procesu - **generowania i selekcji pomysłów**, stwierdzono, iż jednym z dominujących obecnie trendów w branży spożywczej jest trend związany ze zdrowym odżywianiem. Szczególnie dużą szansę na akceptację ze strony konsumentów, a tym samym sukces rynkowy, posiadają produkty o właściwościach prozdrowotnych. Wyjaśniono na bazie teorii planowanego zachowania (Ajzen, 1991), iż ze względu na oddziaływanie społeczne wywierane przez inicjatywy promujące prozdrowotne zachowania żywieniowe następuje zmiana w zakresie postaw, subiektywnych norm oraz poczucia sprawowania kontroli nad możliwością stosowaniem zbilansowanej diety przez konsumentów. Tym samym zachowania prozdrowotne konsumentów będą w przyszłości utrzymywały się na danym poziomie bądź przybierały na sile.

Rozwój żywności funkcjonalnej, rozumianej jako żywność, która korzystnie wpływa na jedną lub więcej docelowych funkcji w organizmie, ponad działaniem odżywczym, oferuje istotne możliwości rozwoju dla przedsiębiorstw z branży spożywczej. Analizując możliwości ukierunkowania rozwoju nowych produktów funkcjonalnych ustalono, iż konsumenci nie postrzegają żywności funkcjonalnej jako jednorodnej kategorii produktowej, a potencjalna akceptacja nowego produktu zależy od charakterystyki materiału bazowego. Konsumenci są szczególnie zainteresowani żywnością funkcjonalną rozwijaną na bazie materiału, który postrzegają jako zdrowy (np. warzyw). Jednakże, opracowywanie i wprowadzanie do obrotu żywności funkcjonalnej jest drogie, ryzykowne i pociąga za sobą konieczność prowadzenia licznych badań laboratoryjnych, a w związku z tym zarządzanie ich rozwojem jest szczególnie wymagające.

Przyjmując za podstawę strategię dyferencjacji określono, że aby skutecznie się wyróżnić, przedsiębiorstwa powinny rozwijać nowe produkty funkcjonalne na bazie produktów, które były w niewielkim stopniu obecne na rynku w przeszłości. Pewną niszę stanowią produkty fermentowane, w tym przede wszystkim napoje fermentowane. Ustalono, iż rynek zdominowany jest przez fermentowane produkty mleczne, a tym samym rozwój niemlecznych produktów fermentowanych na bazie owoców i warzyw stanowi szczególnie ważny i potencjalny kierunek rozwoju nowych produktów. Żywność fermentowana może być zaliczana do kategorii produktów funkcjonalnych z uwagi na zmiany zachodzące podczas fermentacji (biokonwersja związków biologicznie czynnych) oraz z uwagi na obecność mikroorganizmów o potencjale probiotycznym. W związku z tym, regularne spożywanie fermentowanych produktów przyczynia się do poprawy zdrowia konsumentów (Marco i in., 2021; Septiembre-Malaterre i in., 2018).

Przeprowadzenie studiów literaturowych oraz analiza kiszonych produktów dostępnych na rynku umożliwiła wybór wartościowego materiału roślinnego - jarmużu zielonego, na bazie którego może być rozwinięty produkt spełniających kryteria określone powyżej. Warto podkreślić, że obecnie na rynku zaobserwowano brak produktów w oparciu o fermentowany sok z jarmużu, mimo, że oferta obejmuje różne kiszane soki na bazie warzyw. Selekcji materiału dokonano również na podstawie

charakterystyki jarmużu. Warzywo to charakteryzuje się wysoką zawartością związków bioaktywnych (witamin, związków fenolowych, karotenoidów, glukozyzolanów) i składników mineralnych, które mają pozytywny wpływ na zdrowie człowieka. Z uwagi na zawartość wymienionych związków jarmuż cechuje się licznymi właściwościami prozdrowotnymi, które obejmują zapobieganie wystąpieniu przewlekłych chorób zwyrodnieniowych, chorób układu krążenia i powstawaniu nowotworów (Šamec i in., 2018; Thavarajah i in., 2016).

W uzupełnieniu do powyższych rozważań dalsza część prac badawczych w obrębie generowania i selekcji pomysłu wiązała się z przeprowadzeniem badań konsumenckich. Było to istotne, ponieważ to opinia konsumentów po części wpływa na sukces komercyjny produktu. W pracy ustalono, że kiszone produkty warzywne kojarzą się przede wszystkim z konkretnymi produktami (kapustą i ogórkami), właściwościami prozdrowotnymi i charakterystycznym smakiem. Podstawowe ich zalety to, w opinii respondentów, przede wszystkim właściwości prozdrowotne, właściwości probiotyczne i dłuższy okres przydatności do spożycia. W badaniu ustalono, iż kiszone soki warzywne cieszą się umiarkowaną częstotliwością zakupu wśród respondentów, mniejszą niż inne kiszone produkty warzywne. Jako najważniejsze kryterium wyboru kiszonych soków warzywnych respondenci wskazali smak (48%), a następnie właściwości prozdrowotne (46%), skład produktu (45%), właściwości probiotyczne (43%) i wartości odżywcze (39%). Ponadto, w opinii respondentów, oferta fermentowanych soków warzywnych mogłaby podlegać dalszemu rozszerzeniu. W odniesieniu do kiszonych soków warzywnych respondenci wskazali takie wady jak niska dostępność, nieodpowiedni smak lub zapach i wysoka cena. Wskazując ich zalety najczęściej wymieniali ich prozdrowotny charakter, niepowtarzalny smak i długi termin przydatności do spożycia.

Weryfikując pierwszą hipotezę ustalono, iż czynniki demograficzne nie determinują wyborów konsumentów w zakresie konsumpcji kiszonych przetworów warzywnych. Uszczegółowienie badania poprzez jego zawężenie do kiszonych soków warzywnych pozwoliło jednak wykazać, iż czynniki te mają istotne znaczenie dla tej kategorii produktów. Badając konkretnie kiszone soki warzywne ustalono, iż szansa, że kobiety będą częściej spożywać kiszone soki warzywne jest 0,856 razy większa niż w przypadku mężczyzn. Natomiast, szansa, że osoby młode (w wieku 21-30 lat) będą częściej spożywać kiszone soki warzywne jest ponad dwukrotnie niższa (-2,305) niż w przypadku osób w wieku powyżej 60 lat. Z kolei szansa, że osoby zamieszkujące miasta o liczbie mieszkańców mieszczącej się w przedziale 20-99 tys. będą częściej spożywać kiszone soki warzywne jest 0,849 razy większa niż w przypadku osób zamieszkujących największe ośrodki miejskie (powyżej 500 tys.).

Hipoteza pierwsza, mówiąca, że czynniki demograficzne determinują wybory konsumentów w zakresie konsumpcji kiszonych produktów warzywnych- została zweryfikowana pozytywnie

w przypadku kiszonych soków warzywnych oraz **negatywnie** w przypadku kiszonych przetworów warzywnych.

W dalszej części pracy (badań i rozwoju), skoncentrowano się na aspektach technologicznych rozwoju nowego produktu spożywczego – fermentowanego soku z jarmużu. Badania laboratoryjne obejmowały kompleksową charakterystykę fermentowanego soku, co wymagało zastosowania wielokierunkowych metod badawczych, tj. metod mikrobiologicznych i instrumentalnych. Na podstawie aktualnej literatury naukowej dotyczącej potencjalnych zastosowań jarmużu stwierdzono, że istnieje luka badawcza dotycząca kompleksowej charakterystyki fermentowanego soku na bazie jarmużu zielonego. Innowacyjne wykorzystanie jarmużu w postaci produktu fermentowanego znacząco wzbogaca obecny stan wiedzy, jak również stanowi nowatorską propozycję wykorzystania jarmużu jako soku o potencjalnych właściwościach prozdrowotnych.

W etapie **badań podstawowych** przeprowadzono wstępne analizy laboratoryjne, które miały na celu zdobycie nowej wiedzy dotyczącej możliwości przeprowadzenia spontanicznej fermentacji soku z jarmużu oraz określenie jego wybranych wyróżników jakościowych. Należy przy tym podkreślić, że jarmuż nie jest tradycyjnie poddawany procesowi fermentacji, w związku z tym jest to swoiste novum naukowe. Jakość mikrobiologiczna surowca i fermentowanego soku okazała się satysfakcjonująca – nie wykryto obecności wybranych mikroorganizmów patogennych. Jak wykazały przeprowadzone badania, po 48 godzinach procesu liczba bakterii fermentacji mlekowej znacznie wzrosła w porównaniu ze świeżym jarmużem. Było to kluczowe z uwagi na powodzenie dalszych etapów badawczych w procesie rozwoju nowego produktu spożywczego. Im wyższa liczebność bakterii fermentacji mlekowej, tym wyższe prawdopodobieństwo różnorodności gatunkowej izolatów, a tym samym większa możliwość wyselekcjonowania wartościowych szczepów bakterii. Spontaniczna fermentacja soku z jarmużu przyczyniła się do biokonwersji związków biologicznie czynnych, co przejawiało się wzrostem właściwości przeciwutleniających i wzrostem całkowitej zawartości związków fenolowych. Z drugiej strony zaobserwowano spadek zawartości witaminy C. Natomiast poziom składników mineralnych pozostał bez zmian. Wykazano ponadto, że spontaniczna fermentacja soku przyczynia się do uzyskania potencjalnych właściwości prozdrowotnych poprzez poprawę właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Obecność mikrobioty fermentującej jak i jej metabolitów nie pozostaje również bez znaczenia, ponieważ może ona wywierać korzystny efekt na zdrowie człowieka.

*W związku z tym, **hipoteza druga**: Spontanicznie fermentowany sok z jarmużu charakteryzuje się wyższą zawartością związków bioaktywnych niż sok świeży, została **zweryfikowana pozytywnie** wobec wyższych właściwości przeciwutleniających oraz wyższej zawartości*

związków fenolowych. Natomiast **negatywna weryfikacja** dotyczyła spadku zawartości witaminy C.

Następnie przeprowadzono **badania stosowane**, polegające na wykonaniu analiz ukierunkowanych na konkretny cel i zastosowanie. Badania obejmowały określenie potencjalnych właściwości probiotycznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. W pierwszym etapie wyizolowano 80 szczepów bakterii fermentacji mlekowej podczas różnych etapów procesu. Następnie, po przeprowadzeniu wstępnej charakterystyki, poddano je badaniom przesiewowym – określono ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe, wrażliwość wobec wybranych antybiotyków oraz zidentyfikowano je do poziomu gatunku metodą proteomiczną.

Na podstawie światowych wytycznych oraz literatury przedmiotu dokonano metodycznego wyboru najbardziej wartościowych szczepów bakteryjnych, zarówno pod względem ich właściwości, jak również z uwagi na różnorodność gatunkową. W rezultacie, przeprowadzone badania pozwoliły na wyselekcjonowanie 12 wartościowych i różnorodnych gatunkowo szczepów bakterii fermentacji mlekowej spośród 80 izolatów. Dziesięć szczepów bakterii fermentacji mlekowej zostało zidentyfikowanych genetycznie do poziomu gatunku. Mikroorganizmy te należały do gatunków *L. mesenteroides*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. coryniformis*. Wybrane 10 szczepów można zaliczyć do potencjalnych mikroorganizmów probiotycznych ze względu na: odpowiedni brak oporności na wybrane antybiotyki, wysokie właściwości przeciwdrobnoustrojowe, odpowiednią przeżywalność w warunkach symulowanego przewodu pokarmowego, a także identyfikację genetyczną do poziomu szczepu.

Hipoteza trzecia - wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane podczas spontanicznej fermentacji jarmużu zielonego charakteryzują się potencjalnymi właściwościami probiotycznymi, została **zweryfikowana pozytywnie**.

Na etapie **rozwoju** w pierwszej kolejności przeprowadzono wstępne analizy obejmujące 7 wyselekcjonowanych uprzednio mikroorganizmów bazujące na liczebności bakterii w matrycy soku oraz efektywności w zakwaszaniu produktu. Etap ten umożliwił wybór trzech izolatów bakterii, które posłużyły jako monokultury (*L. plantarum* JS052 i *L. sakei* JS032), jak i kultury mieszane (MIX A: *L. mesenteroides* JS027, *L. plantarum* JS052, *L. sakei* JS032 oraz MIX B: *L. plantarum* JS052 i *L. sakei* JS032) w stworzeniu 4 prototypów fermentowanego soku z jarmużu zielonego. Z uwagi na nieefektywne obniżanie pH soku izolaty przynależące do gatunku *L. coryniformis* nie zostały uwzględnione przy tworzeniu prototypów produktu.

W trakcie procesu fermentacji mlekowej zaobserwowano zależne od szczepu właściwości wpływające na biokonwersję związków biologicznie czynnych i właściwości odżywcze. Zmiany w wartości odżywczej były stosunkowo podobne dla wszystkich użytych wariantów. Najistotniejszą różnicą była zdolność do metabolizowania cukrów i zakwaszania soku. Szczep *L. plantarum* JS052 w największym stopniu metabolizował fruktozę i glukozę. Ponadto zarówno *L. plantarum* JS052 i MIX B najefektywniej przyczyniały się do spadku pH produktu, co zostało również potwierdzone poprzez badanie kwasowości miareczkowej. Ustalono, że w zależności od zastosowanego szczepu, zarówno w postaci monokultury, jak i konsorcjum bakteryjnego, można kształtować zawartość wybranych związków biologicznie czynnych, co można przedstawić następująco:

- Jeżeli celem jest uzyskanie fermentowanego soku z jarmużu bogatego w witaminy z grupy B (w szczególności witaminę B₂ i B₆), należy zastosować szczep *L. sakei* JS032.
- Aby uzyskać produkt charakteryzujący się wysoką zawartością związków fenolowych, fermentację należy prowadzić z użyciem szczepu *L. plantarum* JS052.
- Wysoką zawartość karotenoidów można uzyskać stosując *L. sakei* JS032 i MIX A.
- Zawartość glukozyolanów może być również modyfikowana przez metabolizm badanych bakterii, dlatego najlepsze parametry produktu pod względem zawartości glukozyolanów można uzyskać po fermentacji z użyciem kultur mieszanych (zarówno MIX A, jak i MIX B).

Również wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa przyczynia się do zwiększenia właściwości prozdrowotnych kiszzonego soku z jarmużu. Pod tym względem fermentacja z udziałem szczepu *L. plantarum* JS052 umożliwiła uzyskanie najlepszych parametrów wobec wszystkich badanych mikroorganizmów wskaźnikowych. Co ważne, wszystkie testowane warianty charakteryzowały się wystarczająco wysokim wzrostem, a zwłaszcza wariant *L. plantarum* JS052 wykazywał najlepszą liczebność i żywotność komórek. Świadczy to o ich przydatności technologicznej, jak również o ich potencjalnych właściwościach probiotycznych, ze względu na możliwą efektywną kolonizację mikrobioty jelitowej.

W związku z powyższym, hipoteza czwarta, mówiąca, że mikrobiota jarmużu stanowi źródło bakterii fermentacji mlekowej przydatnych jako kultury starterowe do modelowania wybranych właściwości prozdrowotnych fermentowanego soku z jarmużu zielonego, została zweryfikowana pozytywnie.

Dodatkowo, na podstawie badań przeprowadzonych w etapie rozwoju produktu, stwierdzono, że kontrolowana fermentacja mlekowa przyczyniła się do znacznych zmian w zawartości różnych związków. Zaobserwowano wzrost zawartości witamin z grupy B (w soku fermentowanym z udziałem

L. sakei JS032 i kultury MIX A – pirydoksyny i ryboflawiny, a w soku fermentowanym z udziałem *L. plantarum* JS052 i kultury MIX B – pirydoksyny), wzrost ogólnej zawartości związków fenolowych oraz wyższą zawartość 9-cis luteiny dla wszystkich badanych wariantów. Jednocześnie aktywność przeciwutleniająca pozostała taka sama jak w świeżym soku, jak również poziom kwasu ferulowego i innych kwasów hydroksycynamonowych pozostał bez zmian dla wszystkich prototypów. Natomiast zawartość poszczególnych związków pozostała na takim samym poziomie w zależności od wykorzystanej kultury bakteryjnej. Wykorzystanie kultury MIX A przyczyniło się do zachowania poziomu kwasu synapowego, kemferolu, all-trans luteiny, zeaksantyny oraz sinigriny. Z kolei fermentacja z udziałem szczepu *L. plantarum* JS052 wpłynęła na utrzymanie poziomu kwercetyny, kemferolu sinigriny również pozostał bez zmian. W przypadku zastosowania kultury MIX B zmianom nie uległa zawartość następujących związków: kwasu synapowego, progroityny oraz sinigriny. Wykorzystanie *L. sakei* JS032 przyczyniło się do utrzymania all-trans luteiny na takim samym poziomie, co w świeżym soku. Zaobserwowano natomiast obniżenie zawartości poszczególnych związków bioaktywnych, takich jak: kwas kofeilochinowy, kwas kawowy, neoksantyna, wiolaksantyna, 13-cis luteina, β -karoten, β -kryptoksantyna oraz glukozynolany indolowe we wszystkich prototypach soku. Również poziom glukozynolanów alifatycznych w przypadku większości związków uległ obniżeniu we wszystkich badanych wariantach. Jak wspomniano wcześniej, zmiany zawartości badanych związków były silnie powiązane z metabolizmem użytej kultury starterowej.

Hipoteza piąta - kontrolowana fermentacja soku z jarmużu pozwala na uzyskanie wyższej zawartości wybranych składników bioaktywnych w porównaniu ze świeżym sokiem i sokiem poddanym spontanicznej fermentacji, **została zweryfikowana pozytywnie hipotezy** w zakresie wzrostu zawartości witamin z grupy B oraz wyższej zawartości 9-cis-luteiny dla wszystkich badanych wariantów. Natomiast weryfikacja **negatywna obejmowała** właściwości przeciwutleniające, ogólną zawartość związków fenolowych, dla glukozynolanów indolowych, części związków fenolowych, karotenoidów i części glukozynolanów alifatycznych.

Cały proces badawczy przedstawiony w ramach niniejszej dysertacji doktorskiej jednoznacznie pokazał, że projektowanie i rozwój nowego produktu spożywczego, na przykładzie żywności fermentowanej o właściwościach prozdrowotnych, jest procesem złożonym. Na właściwości prozdrowotne, których często oczekują konsumenci, zasadniczy wpływ mają stosowane kultury starterowe, których właściwości są szczepozależne. W związku z tym, aby zaoferować innowacyjny i prozdrowotny produkt, należy przeprowadzić badania konsumenckie oraz wieloaspektowe analizy laboratoryjne w celu zapewnienia jego kompleksowej charakterystyki i określenia potencjalnych kierunków rozwoju w oparciu o zależne od szczepu szlaki metaboliczne.

Warto zaznaczyć, że sok z jarmużu poddany kontrolowanej fermentacji należy uznać za produkt innowacyjny o właściwościach funkcjonalnych, głównie ze względu na obecność pożytecznych mikroorganizmów o potencjalnie probiotycznym charakterze oraz utrzymanie wysokiej zawartości większości związków biologicznie czynnych. Zatem wszystkie te właściwości prozdrowotne zwiększają jego wartość komercyjną dla potencjalnych producentów i żywieniową dla klientów zainteresowanych niemlecznymi produktami o właściwościach probiotycznych.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej, pomimo swojej złożoności i zaawansowania, charakteryzują również pewne ograniczenia, które jednocześnie wyznaczają przyszłe kierunki badań.

Przedstawione badanie ankietowe zostało przeprowadzone w Polsce. W związku z tym, iż w branży spożywczej działają m.in. przedsiębiorstwa prowadzące działalność na rynku międzynarodowym, zakres przestrzenny można traktować jako pewne ograniczenie. Uzyskane wyniki prezentują zachowania polskich konsumentów, są więc specyficzne i zawężone do rynku krajowego. Wyniki nie powinny być bezpośrednio wykorzystywane w analizach prowadzonych w innych krajach, natomiast mogą w takiej sytuacji stanowić wartościowy materiał porównawczy. Dlatego też, istotnym kierunkiem przyszłych badań może być powtórzenie badania po rozszerzeniu zakresu przestrzennego. Ponadto, zasadnym wydaje się aby badanie o charakterze ilościowym zostało w przyszłości uzupełnione pogłębionym badaniem jakościowym (np. w formie wywiadów bezpośrednich). Badanie pozwoliłoby wskazać przyczyny stojące za różnicowaniem m.in. częstotliwości spożycia kiszonych produktów warzywnych.

W zakresie badań laboratoryjnych, dotyczących potencjalnych właściwości probiotycznych izolatów bakterii, przeprowadzono zalecane analizy *in vitro* obejmujące właściwości przeciwdrobnoustrojowe, wrażliwość na antybiotyki, tolerancję soli żółciowych oraz kwasów jak również identyfikację genetyczną do poziomu gatunku (FAO/WHO, 2006). Pewnym ograniczeniem badań w tym obszarze jest brak analiz *in vivo*. W uzupełnieniu, należałoby przeprowadzić badania obejmujące adhezję komórek bakteryjnych np. do linii komórkowej Caco-2, które odzwierciedlałyby możliwość kolonizacji nabłonka jelitowego konsumenta, potwierdzając tym samym prozdrowotny wpływ mikroorganizmów na mikrobiotę jelitową. Należałoby także uwzględnić badania kliniczne dotyczące właściwości probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej w kiszonym soku z jarmużu. Zgodnie z przesłankami FAO/WHO (2006) w przypadku tego rodzaju badań należy przeprowadzić randomizowane, podwójnie ślepe badania z udziałem ludzi w celu ustalenia skuteczności produktu probiotycznego. Ponadto, uznano, że istnieje potrzeba, aby próby badawcze charakteryzowała odpowiednia liczba osób, w celu osiągnięcia istotności statystycznej. Badania kliniczne potwierdziłyby również właściwości funkcjonalne fermentowanego produktu.

Pomimo przeprowadzenia licznych badań (zarówno konsumenckich jak i laboratoryjnych) nie podjęto próby przeprowadzenia badań obejmujących testowanie produktu przez konsumentów. Biorąc pod uwagę, że smak jest istotną cechą wpływającą na ogólne wrażenie i akceptację niemlecznych produktów fermentowanych (bazując na przeprowadzonych badaniach ankietowych w niniejszej pracy), przyszłe badania powinny koncentrować się na charakterystyce sensorycznej i akceptacji produktu przez potencjalnych konsumentów. Analizy te powinny obejmować różne metody, takie jak panel ekspertów czy też badanie konsumenckie np. z wykorzystaniem oceny hedonicznej.

Pewnym ograniczeniem w niniejszej rozprawie było przeprowadzenie badań dotyczących jedynie części etapów autorskiego modelu rozwoju nowego produktu spożywczego. Jednakże, niniejsza praca przyjęła perspektywę akademicką, a pozostałe etapy procesu tj. testowanie, wprowadzenie na rynek oraz monitorowanie, są utożsamiane głównie z przedsiębiorstwami spożywczymi a nie jednostkami naukowo-badawczymi.

Pomimo, że zaprezentowane w niniejszej rozprawie badania mają charakter naukowy, można z nich zaczerpnąć pewne implikacje dla praktyki gospodarczej. Stworzony w ramach rozprawy model rozwoju nowych produktów spożywczych, choć bazujący na analizie literatury przedmiotu, może stanowić istotną wskazówkę w zakresie organizacji procesu projektowania nowego produktu. Z punktu widzenia praktyki gospodarczej, możliwą korzyścią jest przyjęcie w ramach organizacji struktury odzwierciedlającej kolejne etapy wyróżnione w modelu, a następnie przypisanie do nich działań zdefiniowanych w ramach modelu, co pozwoli zarządzać w sposób schematyczny procesem rozwoju nowych produktów. Kolejnym elementem badań, który może być istotny z punktu widzenia praktyki gospodarczej, są wyniki badania konsumenckiego. Badanie to poświęcone było ustaleniu zachowań polskich konsumentów dotyczących niemlecznych produktów fermentowanych. Treść rozprawy zawiera więc konkretne wyniki dotyczące zachowań zakupowych w zakresie ogółu kiszonych produktów warzywnych oraz konkretnie kiszonych soków warzywnych. Ponadto, wyniki badania mogą stanowić istotną wskazówkę odnoszącą się do takich zagadnień jak marketing, czy dystrybucja kiszonych produktów. Wiedza ta jest o tyle ważna dla praktyki gospodarczej, że finalnej weryfikacji nowych produktów dokonują klienci, a jej uwzględnienie pozwoli przynajmniej częściowo (w ramach zagadnień poruszanych w badaniu) dopasować procesy rozwojowe do panującej obecnie na rynku sytuacji. Kolejnym elementem istotnym dla praktyki gospodarczej są wyniki badań laboratoryjnych – mikrobiologicznych, instrumentalnych oraz fizykochemicznych. Dzięki ich przeprowadzeniu możliwe było zaprojektowanie prototypu nowego produktu spożywczego. Uzyskane rezultaty, a także prowadzona dyskusja mogą być inspiracją dla rozwoju konkretnego produktu w oparciu o proces fermentacji mlekowej z wykorzystaniem autochtonicznych mikroorganizmów o potencjale probiotycznym. W niniejszych badaniach skoncentrowano się na jarmużu zielonym i bakteriach

fermentacji mlekowej, jednakże cały proces może zostać z sukcesem zaadaptowany dla innych surowców roślinnych, jak również dla innych grup mikroorganizmów.

Założeniem niniejszej pracy było zaprojektowanie produktu o cechach prozdrowotnych. W związku z tym, etap badań był na tyle rozbudowany, że został podzielony na dwa rodzaje – badania podstawowe oraz stosowane. Badania podstawowe pozwoliły zdobyć nową wiedzę obejmującą możliwość przeprowadzenia spontanicznej fermentacji materiału oraz określenie jego wstępnych charakterystyk. Z kolei badania stosowane umożliwiły określenie właściwości probiotycznych mikroorganizmów autochtonicznych bazując na określonym schemacie selekcji bakterii. Ostatni etap – rozwój prototypów produktu – pozwolił ustalić wpływ wybranych kultur bakteryjnych na właściwości prozdrowotne fermentowanego produktu. Zdobyta wiedza (np. proces selekcji mikroorganizmów o charakterze probiotycznym lub metodyki określające zawartość różnych związków) może być z powodzeniem wykorzystywana w podobnych badaniach, a jej aplikacja pozwoli na ograniczenia zarówno czasu jak i nakładów pracy, co jest szczególnie istotne dla przedsiębiorstw. Praca może więc stanowić podwalinę dla konkretnych działań rozwojowych, w szczególności obejmujących projektowanie fermentowanego produktu z użyciem potencjalnie probiotycznych kultur starterowych.

Literatura

1. AACC. (2009). AACCI 30-25.01 Crude Fat in Wheat, Corn, and Soy Flour, Feeds, and Mixed Feeds. In *AACC International Approved Methods*. AACC International. <https://doi.org/10.1094/AACCIIntMethod-30-25.01>
2. Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. i Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>
3. Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S. i Zeng, X. (2014). Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.06.002>
4. Acur, N., Kandemir, D. i Boer, H. (2012). Strategic Alignment and New Product Development: Drivers and Performance Effects. *Journal of Product Innovation Management*, 29(2), 304–318. <https://doi.org/10.1111/j.1540-5885.2011.00897.x>
5. Adams, R., Bessant, J. i Phelps, R. (2006). Innovation management measurement: A review. *International Journal of Management Reviews*, 8(1), 21–47. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2370.2006.00119.x>
6. Adetuyi, F. O., Osagie, A. U. i Adekunle, A. T. (2008). Antioxidant Degradation in Six Indigenous Okra *Abelmoschus esculentus* (L) Moench Varieties During Storage in Nigeria. *Journal of Food Technology*, 6(5), 227–230.
7. Agarwal, S., Fulgoni, V. L. i Welland, D. (2019). Intake of 100% fruit juice is associated with improved diet quality of adults: NHANES 2013–2016 analysis. *Nutrients*, 11(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu11102513>
8. Ajzen, I. (1991). The theory of planned behavior. *Organizational Behavior and Human Decision Processes*, 50(2), 179–221.
9. Akdaş, Z. Z. i Bakkalbaşı, E. (2017). Influence of different cooking methods on color, bioactive compounds, and antioxidant activity of kale. *International Journal of Food Properties*, 20(4), 877–887. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1188308>
10. Albuquerque, B. R., Heleno, S. A. 8., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L. i Ferreira, I. C. F. R. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food and Function*, 12(1), 14–29. <https://doi.org/10.1039/d0fo02324h>
11. Alvarez, M. V., Moreira, M. del R., Roura, S. I., Ayala-Zavala, J. F., i González-Aguilar, G. A. (2015). Using natural antimicrobials to enhance the safety and quality of fresh and processed fruits and vegetables: Types of antimicrobials. In *Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality* (pp. 287–313). Elsevier.
12. An, J. J., Seok, H. i Ha, E. M. (2021). GABA-producing *Lactobacillus plantarum* inhibits metastatic properties and induces apoptosis of 5-FU-resistant colorectal cancer cells via GABAB receptor signaling. *Journal of Microbiology*, 59(2), 202–216. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-0562-5>
13. Anastácio, M., dos Santos, A. P. M., Aschner, M. i Mateus, L. (2018). Determination of trace metals in fruit juices in the Portuguese market. *Toxicology Reports*, 5(January), 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.03.010>
14. Antonio, J. i Gonzalez, A. (2009). Market trends and consumer profile at the organic farmers market in Costa Rica. *British Food Journal*, 111(5), 498–510. <https://doi.org/10.1108/00070700910957320>
15. Anwar, K. (2016). Comparison between cost leadership and differentiation strategy in agricultural businesses. *Custos e Agronegocio*, 12(2), 212–231.
16. Argyri, A. A., Zoumpoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z. i Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
17. Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M. i Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/584183>
18. Ayaz, F. A., Hayirlioglu-Ayaz, S., Alpay-Karaoglu, S., Grúz, J., Valentová, K., Ulrichová, J. i Strnad, M. (2008). Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 107(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.003>
19. Ayaz, G. R. H., Millson, M., Huang, H. S., Chuang, L. T., Sanz, C. i Hayirlioglu-Ayaz, S. (2006). Nutrient

- contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). *Food Chemistry*, 96(4), 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.011>
20. Azanedo, L., Garcia-Garcia, G., Stone, J. i Rahimifard, S. (2020). An overview of current challenges in new food product development. *Sustainability (Switzerland)*, 12(8), 10–13. <https://doi.org/10.3390/SU12083364>
 21. Balasubramanian, S. K. i Cole, C. (2002). Consumers' Search and Use of Nutrition Information: The Challenge and Promise of the Nutrition Labeling and Education Act. *Journal of Marketing*, 66(3), 112–127. <https://doi.org/10.1509/jmkg.66.3.112.18502>
 22. Bassett-Gunter, R. L., Levy-Milne, R., Naylor, P. J., Downs, D. S., Benoit, C., Warburton, D. E. R., Blanchard, C. M. i Rhodes, R. E. (2013). Oh baby! Motivation for healthy eating during parenthood transitions: a longitudinal examination with a theory of planned behavior perspective. *Nutrition and Physical Activity*, 10(88), 1–11.
 23. Becerra-Moreno, A., Alanís-Garza, P. A., Mora-Nieves, J. L., Mora-Mora, J. P. i Jacobo-Velázquez, D. A. (2014). Kale: An excellent source of vitamin C, pro-vitamin A, lutein and glucosinolates. *CYTA - Journal of Food*, 12(3), 298–303. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.850743>
 24. Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Jokić, M. i Šušković, J. (2014). Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. *Microbiological Research*, 169(7–8), 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.015>
 25. Begley, M., Hill, C. i Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729–1738. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006>
 26. Bencardino, D., Vitali, L. A. i Petrelli, D. (2018). Microbiological evaluation of ready-to-eat iceberg lettuce during shelf-life and effectiveness of household washing methods. *Italian Journal of Food Safety*, 7(1), 50–54. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.6913>
 27. Bernstein, B. i Singh, P. J. (2006). An integrated innovation process model based on practices of Australian biotechnology firms. *Technovation*, 26(5–6), 561–572. <https://doi.org/10.1016/j.technovation.2004.11.006>
 28. Bhat, R. i Vyas, D. (2019). Myrosinase: insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(4), 508–523. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1576024>
 29. Biegańska-Marecik, R., Radziejewska-Kubzdela, E. i Marecik, R. (2017). Characterization of phenolics, glucosinolates and antioxidant activity of beverages based on apple juice with addition of frozen and freeze-dried curly kale leaves (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* L.). *Food Chemistry*, 230, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.047>
 30. Bigliardi, B. i Galati, F. (2013). Models of adoption of open innovation within the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.001>
 31. Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A. i Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
 32. Biswas, K., Upadhayay, S., Rapsang, G. F. i Joshi, S. R. (2017). Antibacterial and Synergistic Activity Against β -Lactamase-Producing Nosocomial Bacteria by Bacteriocin of LAB Isolated From Lesser Known Traditionally Fermented Products of India. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(2), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.08.008>
 33. Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C. E., Burow, M., Rollin, P. i Agerbirk, N. (2020). Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*, 169(November 2019), 112100. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>
 34. Bogue, J. i Sorenson, D. (2007). Case study of consumer-oriented food product development: reduced-calorie foods. In H. MacFie (Ed.), *Consumer-led food product development* (pp. 524–550). CRC Press.
 35. Bogue, J., Collins, O. i Troy, A. J. (2017). Market analysis and concept development of functional foods. In D. Bagchi & N. Sreejayan (Eds.), *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products* (pp. 29–45). Elsevier.
 36. Bontsidis, C., Mallouchos, A., Terpou, A., Nikolaou, A., Batra, G., Mantzourani, I., Alexopoulos, A. i Plessas, S. (2021). Microbiological and chemical properties of chokeberry juice fermented by novel lactic acid bacteria with potential probiotic properties during fermentation at 4°C for 4 weeks. *Foods*, 10(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods10040768>
 37. Booth, A., Papaioannou, D., i Sutton, A. (2012). *Systematic Approaches to a Successful Literature Review*. Sage.
 38. Boroń, W. (2010). Zarządzanie projektowaniem a marketingowa strategia rozwoju nowych produktów -

- przykład zastosowania w jednostce badawczej. *Marketing Instytucji Naukowych i Badawczych*, 163–178.
39. Bourdichon, F., Alper, I., Bibiloni, R., Dubois, A., Laulund, S., Miks, M., Morelli, L., Zuliani, V. i Yao, S. (2018). Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products. *Bulletin of the International Dairy Federation* 495/2018, 455. <https://store.fil-idf.org/wp-content/uploads/2017/10/2017WDSs-preview.pdf>
 40. Bowers, J. i Khorakian, A. (2014). Integrating risk management in the innovation project. *European Journal of Innovation Management*, 17(1), 25–40. <https://doi.org/10.1108/EJIM-01-2013-0010>
 41. Bröring, S. (2008). How systemic innovations require alterations along the entire supply chain: the case of animal-derived functional foods. *Journal on Chain and Network Science*, 8(2), 107–119. <https://doi.org/10.3920/JCNS2008.x093>
 42. Busse, M. i Siebert, R. (2017). The role of consumers in food innovation processes. *European Journal of Innovation Management*, 21(1), 20–43. <https://doi.org/10.1108/EJIM-03-2017-0023>
 43. Büyükkaragöz, A., Bas, M., Sağlam, D. i Cengiz, Ş. E. (2014). Consumers' awareness, acceptance and attitudes towards functional foods in Turkey. *International Journal of Consumer Studies*, 38(6), 628–635. <https://doi.org/10.1111/ijcs.12134>
 44. Campana, R., Federici, S., Ciandrini, E. i Baffone, W. (2012). Antagonistic activity of lactobacillus acidophilus ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of Human Campylobacter jejuni. *Current Microbiology*, 64(4), 371–378. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0080-0>
 45. Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C. i Antunes, P. (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005>
 46. Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M. T., López, P. i Spano, G. (2012). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: A great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1383–1394. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4440-2>
 47. Centralna Biblioteka Rolnicza. (2022). *Żywność funkcjonalna*.
 48. Centrum Doradztwa Rolniczego. (2017). *Żywność nowej generacji - funkcjonalna, wygodna, transgeniczna*.
 49. Champomier-Vergès, M. C., Chaillou, S., Cornet, M. i Zagorec, M. (2002). Erratum: Lactobacillus sakei: Recent developments and future prospects. *Research in Microbiology*, 153(2), 115–123. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01296-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01296-7)
 50. Chandra, P., Sharma, R. K. i Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. In *Food Research International* (Vol. 129). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108849>
 51. Chaochotechuang, P. i Mariano, S. (2016). Alignment of new product development and product innovation strategies: a case study of Thai food and beverage SMEs. *International Journal of Globalisation and Small Business*, 8(2), 179–206.
 52. Chesbrough, Henry i Bogers, M. (2014). Explicating Open Innovation. Clarifying an Emerging Paradigm for Understanding Innovation. In H. Chesbrough, W. Vanhaverbeke & J. West (Eds.), *New Frontiers in Open Innovation* (pp. 3–28). Oxford University Press.
 53. Choo, K. Y., Kho, C., Ong, Y. Y., Thoo, Y. Y., Lim, L. H., Tan, C. P. i Ho, C. W. (2018). Fermentation of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) for betalains concentration. *International Food Research Journal*, 25(6), 2539–2546.
 54. Cirlini, M., Ricci, A., Galaverna, G. i Lazzi, C. (2020). Application of lactic acid fermentation to elderberry juice: Changes in acidic and glucidic fractions. *Lwt*, 118(May 2019), 108779. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108779>
 55. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2019). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLSI Document M100, 29th Edition*. Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne.
 56. Colombo, M., Nero, L. A. i Todorov, S. D. (2020). Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00227-y>
 57. Commission Of The European Communities. (2000). *White Paper on Food Safety* (Issue January).
 58. Commission Regulation (EU). (2005). No 2073/2005 of 15 November on microbiological criteria for foodstuff. *Official Journal of the European Union*.
 59. Commission Regulation (EU). (2006). The Regulation (EC) N. 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Union*.
 60. Commission Regulation (EU). (2014). No. 488/2014 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.

61. Cooper, R. G. (2008). Perspective: The Stage-Gates® Idea-to-Launch Process - Update, What's New, and NexGen systems. *Journal of Product Innovation Management*, 25(3), 213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1540-5885.2008.00296.x>
62. Cooper, R. i Kleinschmidt, E. J. (1995). Benchmarking the Firm's Critical Success Factors in New Product Development. *Journal of Product Innovation Management*, 12(5), 374–391.
63. Costa, A. I. A. i Jongen, W. M. F. (2006). New insights into consumer-led food product development. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.02.003>
64. Davies, A., Titterton, A. J. i Cochrane, C. (1995). Who buys organic food? A profile of the purchasers of organic food in Northern Ireland. *British Food Journal*, 97(10), 17–23.
65. Davis, R. (1993). The Role of Market Research in the Development of New Consumer Products. *Journal of Product Innovation Management*, 10(4), 309–317.
66. de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V. i Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
67. de Sá, M. C. i Rodriguez-Amaya, D. B. (2004). Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables - Comparison of analytical and calculated data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(1), 37–51. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00100-5](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00100-5)
68. Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. i Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
69. Di Cagno, R., Filannino, P., Vincentini, O., Cantatore, V., Cavoski, I. i Gobbetti, M. (2019). Fermented portulaca oleracea L. Juice: A novel functional beverage with potential ameliorating effects on the intestinal inflammation and epithelial injury. *Nutrients*, 11(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu11020248>
70. Di Cagno, R., Surico, R. F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J. C., Buchin, S., De Gara, L. i Gobbetti, M. (2009). Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.017>
71. Do, T. V. T. i Fan, L. (2019). Probiotic Viability, Qualitative Characteristics, and Sensory Acceptability of Vegetable Juice Mixture Fermented with Lactobacillus Strains. *Food and Nutrition Sciences*, 10(04), 412–427. <https://doi.org/10.4236/fns.2019.104031>
72. Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V. i Cámara, M. (2020). An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. *Journal of Functional Foods*, 68(December 2019), 103896. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103896>
73. Durst, S., Hinteregger, C., Temel, S. i Yesilay, B. (2018). Insights from the later stage of the new product development process: findings from Turkey. *European Journal of Innovation Management*, 21(3), 456–477. <https://doi.org/10.1108/EJIM-08-2017-0102>
74. Earle, M., Earle, R. i Anderson, A. (2001). *Food Product Development: Maximising Success*. Elsevier.
75. Economist. (2021). *Treating beef like coal would make a big dent in greenhouse-gas emissions*.
76. EFSA. (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal*, 5(12), 1–16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>
77. EFSA. (2012). EFSA Panel on Additives and products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(2740).
78. EFSA. (2020). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 11: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2019. *EFSA Journal*, 18(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5965>
79. Eisenbach, L., Geissler, A. J., Ehrmann, M. A. i Vogel, R. F. (2019). Comparative genomics of Lactobacillus sakei supports the development of starter strain combinations. *Microbiological Research*, 221(November 2018), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.01.001>
80. Elvira-Torales, L. I., García-Alonso, J. i Periago-Castón, M. J. (2019). Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review. *Antioxidants*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/antiox8070229>
81. EN ISO 9167:2019. (2019). *EN ISO 9167:2019: Rapeseed and rapeseed meals - Determination of glucosinolates content - Method using high-performance liquid chromatography*.
82. Eurostat. (2009). *European Business: Facts and figures*. <https://doi.org/10.2785/23246>
83. Eurostat. (2022). *Food and drink industry*. Internal Market, Industry, Entrepreneurship and SMEs.

84. Fahey, J. W., Stephenson, K. K., Wade, K. L. i Talalay, P. (2013). Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.126>
85. Fang, F., Feng, T., Du, G. i Chen, J. (2016). Evaluation of the impact on food safety of a *Lactobacillus coryniformis* strain from pickled vegetables with degradation activity against nitrite and other undesirable compounds. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 33(4), 623–630. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1156774>
86. FAO. (2022). *Food safety and quality. Codex Alimentarius*.
87. FAO i WHO. (2004). Fruit and vegetables for Health. *Report of a Joint FAO/WHO Workshop, September*, 1–3. <https://doi.org/10.4324/9781315159874-13>
88. FAO i WHO. (2006). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *Food and Nutrition Paper*, 85, 71.
89. Faour-Klingbeil, D., Murtada, M., Kuri, V. i Todd, E. C. D. (2016). Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control*, 62, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.024>
90. Favela-González, K. M., Hernández-Almanza, A. Y. i De la Fuente-Salcido, N. M. (2020). The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (Brassica) as antimicrobials and antioxidants: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), 1–21. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13414>
91. FDA. (2021). *Generally Recognized as Safe*.
92. FDA. (2022). *Functional food*. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/food/food-labeling-nutrition>
93. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenesis: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
94. Filannino, P., Azzi, L., Cavoski, I., Vincentini, O., Rizzello, C. G., Gobbetti, M. i Di Cagno, R. (2013). Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.002>
95. Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M. i Ganzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, 46, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018>
96. Filannino, P., Di Cagno, R., Crecchio, C., De Virgilio, C., De Angelis, M. i Gobbetti, M. (2016). Transcriptional reprogramming and phenotypic switching associated with the adaptation of *Lactobacillus plantarum* C2 to plant niches. *Scientific Reports*, 6(May), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep27392>
97. Filannino, P., Di Cagno, R. i Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.016>
98. Filieri, R. (2013). Consumer co-creation and new product development: a case study in the food industry. *Marketing Intelligence & Planning*, 31(1), 40–53. <https://doi.org/10.1108/02634501311292911>
99. Fogt, L., Grunert, K. G., Alsted, H., Steenbekkers, B., Dekker, M. i Lahteenmakia, L. (2014). Improving internal communication between marketing and technology functions for successful new food product development. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.005>
100. Fonseca, H. C., Melo, D. de S., Ramos, C. L., Menezes, A. G. T., Dias, D. R. i Schwan, R. F. (2022). Sensory and flavor-aroma profiles of passion fruit juice fermented by potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0743 strain. *Food Research International*, 152, 110710. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110710>
101. *Food for Specified Health Uses (FOSHU)*. (2022). Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. <https://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>
102. FoodDrinkEurope, 2020. (2020). *FoodDrinkEurope Data Trends 2020*. <https://www.fooddrinkeurope.eu/publication/data-trends-of-the-european-food-and-drink-industry-2020/>
103. Franzò, S., Urbinati, A., Chiaroni, D. i Chiesa, V. (2021). Unravelling the design process of business models from linear to circular: An empirical investigation. *Business Strategy and The Environment*, 30, 2758–2772. <https://doi.org/10.1002/bse.2892>
104. Frewer, L., Scholderer, J. i Lambert, N. (2003). Consumer acceptance of functional foods: issues for the future. *British Food Journal*, 105(10), 714–731. <https://doi.org/10.1108/00070700310506263>

105. Fröder, H., Martins, C. G., De Souza, K. L. O., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M. i Destro, M. T. (2007). Minimally Processed Vegetable Salads: Microbial Quality Evaluation. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1277–1280. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.5.1277>
106. FUFOSÉ. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. In *British Journal of Nutrition* (Vol. 81, Issue 4). <https://doi.org/10.1017/S0007114599000471>
107. Gao, H., Wen, J.-J., Hu, J.-L., Nie, Q.-X., Chen, H.-H., Nie, S.-P., Xiong, T. i Xie, M.-Y. (2019). Momordica charantia juice with Lactobacillus plantarum fermentation: Chemical composition, antioxidant properties and aroma profile. *Food Bioscience*, 29, 62–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.03.007>
108. Gao, H., Wen, J.-J., Hu, J.-L., Nie, Q.-X., Chen, H.-H., Xiong, T., Nie, S.-P. i Xie, M.-Y. (2019). Fermented Momordica charantia L. juice modulates hyperglycemia, lipid profile, and gut microbiota in type 2 diabetic rats. *Food Research International*, 121, 367–378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.055>
109. Gehlhar, M. J., Regmi, A., Stefanou, S. E. i Zoumas, B. L. (2009). Brand leadership and product innovation as firm strategies in global food markets. *Journal of Product & Brand Management*, 18(2), 115–126. <https://doi.org/10.1108/10610420910949013>
110. Gliszczynska-Świągło, A., Ciska, E., Pawlak-Lemańska, K., Chmielewski, J., Borkowski, T. & Tyrakowska, B. (2006). Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Additives and Contaminants*, 23(11), 1088–1098. <https://doi.org/10.1080/02652030600887594>
111. Gliszczynska-Świągło, A. i Tyrakowska, B. (2003). Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *Journal of Food Science*, 68(5), 1844–1849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12340.x>
112. Gliszczynska-Świągło, A. i Rybicka, I. (2015). Simultaneous Determination of Caffeine and Water-Soluble Vitamins in Energy Drinks by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection. *Food Analytical Methods*, 8(1), 139–146. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9880-0>
113. Gobbetti, M., Di Cagno, R. i de Angelis, M. (2010). Functional microorganisms for functional food quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 716–727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499770>
114. Gołaś, Z. (2010). Czynniki kształtujące wydajność pracy w przedsiębiorstwach przemysłu spożywczego. *Zagadnienia Ekonomiki Rolnej*, 4, 30–50.
115. Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G. i Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 93–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
116. Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Faria, A. F. i Cruz, A. G. (2010). Functional and Nondairy Probiotic Food Development : Trends , Concepts , and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 292–302.
117. Gray, J., Armstrong, G. i Farley, H. (2003). Opportunities and constraints in the functional food market. *Nutrition & Food Science*, 33(5), 213–218.
118. Grønhoj, A., Bech-larsen, T., Chan, K. i Tsang, L. (2013). Using theory of planned behavior to predict healthy eating among Danish adolescents. *Health Education*, 113(1), 4–17. <https://doi.org/10.1108/09654281311293600>
119. Guan, Q., Xiong, T. i Xie, M. (2021). Influence of Probiotic Fermented Fruit and Vegetables on Human Health and the Related Industrial Development Trend. *Engineering*, 7(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.03.018>
120. Güney, D. i Güngörmüşler, M. (2021). Development and Comparative Evaluation of a Novel Fermented Juice Mixture with Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2), 495–505. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09710-2>
121. Gwiazdowska, D. i Trojanowska, K. (2005). Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, 1(68), 114–140.
122. Hallstedt, S. I., Thompson, A. W. i Lindahl, P. (2013). Key elements for implementing a strategic sustainability perspective in the product innovation process. *Journal of Cleaner Production*, 51, 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.01.043>
123. Hardy, N. (2010). *Future Innovations in Food and Drinks to 2015: NPD, trend convergence and emerging growth opportunities*.
124. Hashemi, S. M. B., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F. J., Nemati, Z., Sohrabi Shokofti, S. i Alizadeh, F. (2017). Fermented sweet lemon juice (Citrus limetta) using Lactobacillus plantarum LS5: Chemical

- composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Functional Foods*, 38, 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.040>
125. Havlíček, K., Thalassinos, E. i Berezkinova, L. (2013). Innovation Management and Controlling in SMEs. *European Research Studies*, XVI(Special Issue on SMEs), 57–70.
 126. Heasman, M. i Melletin, J. (2001). *The functional foods revolution: Healthy people, healthy profit* (Issue 2). Earthscan Publications.
 127. Herman, L., Chemaly, M., Cocconcelli, P. S., Fernandez, P., Klein, G., Peixe, L., Prieto, M., Querol, A., Suarez, J. E., Sundh, I., Vlaskovic, J. i Correia, S. (2019). The qualified presumption of safety assessment and its role in EFSA risk evaluations: 15 years past. *FEMS Microbiology Letters*, 366(1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny260>
 128. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. i Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
 129. Holden, J. M., Eldridge, A. L., Beecher, G. R., Marilyn Buzzard, I., Bhagwat, S., Davis, C. S., Douglass, L. W., Gebhardt, S., Haytowitz, D. i Schakel, S. (1999). Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12(3), 169–196. <https://doi.org/10.1006/jfca.1999.0827>
 130. Horackova, S., Vesela, K., Klojdova, I., Bercikova, M. i Plockova, M. (2020). Bile salt hydrolase activity , growth characteristics and surface properties in *Lactobacillus acidophilus*. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03518-8>
 131. Horvat, A., Behdani, B., Fogliano, V. i Luning, P. A. (2019). A systems approach to dynamic performance assessment in new food product development. *Trends in Food Science and Technology*, 91(July), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.036>
 132. Horvat, A., Granato, G., Fogliano, V. i Luning, P. A. (2019). Understanding consumer data use in new product development and the product life cycle in European food firms – An empirical study. *Food Quality and Preference*, 76(February), 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.03.008>
 133. Hutkins, R. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Foods* (Second Edi). John Wiley & Sons, Ltd.
 134. IBM. (2022). *Regresja porządkowa*.
 135. ISO. (2007). *ISO 2171:2007 Cereals, pulses and by-products - Determination of ash yield by incineration*. International Organization for Standardization.
 136. ISO. (2013). *ISO 20483:2013 Cereals and pulses - Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content - Kjeldahl method*. International Organization for Standardization.
 137. Iwatani, S. i Yamamoto, N. (2019). Functional food products in Japan: A review. *Food Science and Human Wellness*, 8(2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.011>
 138. Jach, M., Łoś, R., Maj, M. i Malm, A. (2013). Probiotyki - Aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Postepy Mikrobiologii*, 52(2), 161–170.
 139. Jąder, K. (2019). Zmiany w produkcji i konsumpcji warzyw oraz ich powiązania w ujęciu regionalnym. *Intercathedra*, 2(39), 141–151.
 140. Jagtap, S., Nguyen, L. i Duong, K. (2020). *Improving the new product development using big data: a case study of a food company*. 121(11), 2835–2848. <https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2019-0097>
 141. Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H. i Verpoorte, R. (2009). Health affecting Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(Ferguson 1999), 31–43.
 142. Jaiswal, A. K. i Abu-Ghannam, N. (2013). Kinetic studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 50, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.028>
 143. Janda, K., Kasprzak, M. i Wolska, J. (2015). *Witamina C – budowa , właściwości , funkcje i występowanie* *Vitamin C – structure , properties , occurrence and functions*. 419–425.
 144. Jarosz, M. (2012). *Normy żywienia dla populacji polskiej - nowelizacja. [Nutrition standards for the Polish population - amendment]*. National Food and Nutrition Institute.
 145. Jovanovic, P. i Beric, I. (2018). Analysis of the Available Project Management Methodologies. *Management: Journal of Sustainable Business and Management Solutions in Emerging Economies*, 23(3), 1. <https://doi.org/10.7595/management.fon.2018.0027>
 146. Jreissat, M. i Makatsoris, C. (2022). Towards consumer driven food new product development : a closed-loop platform. *International Journal of Computer Integrated Manufacturing*, 35(2), 183–202.

- <https://doi.org/10.1080/0951192X.2021.1992652>
147. Jurek-Stępień, S. i Wysocki, J. (2007). Wykorzystanie metody pięciu sił konkurencyjnych M. E. Portera do analizy sektora na przykładzie przemysłu odzieżowego. In *Strategie rozwoju przedsiębiorstwa* (s. 99–128). Wydawnictwo Szkoły Głównej Handlowej.
148. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz. U. z 2020 r. poz. 2021, z 2022 r. poz. 24, 138), (2006).
149. Kandylis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M. i Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>
150. Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., Sarkar, D. i Shetty, K. (2017). Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 59(May), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.019>
151. Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N. i Somboonpanyakul, P. (2018). B vitamins and prebiotic fructooligosaccharides of cashew apple fermented with probiotic strains *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* and *Bifidobacterium longum*. *Process Biochemistry*, 70, 9–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.009>
152. Karelakis, C., Zevgitis, P., Galanopoulos, K. i Mattas, K. (2020). Consumer Trends and Attitudes to Functional Foods. *Journal of International Food and Agribusiness Marketing*, 32(3), 266–294. <https://doi.org/10.1080/08974438.2019.1599760>
153. Khalil, R. K. S. (2016). Effect of abusive storage temperatures on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on leafy salad vegetables in Egypt. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 954–962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.034>
154. Khan, R., Grigor, J., Winger, R. i Win, A. (2013). Functional food product development: Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.004>
155. Kim, K. H., Chun, B. H., Baek, J. H., Roh, S. W., Lee, S. H. i Jeon, C. O. (2020). Genomic and metabolic features of *Lactobacillus sakei* as revealed by its pan-genome and the metatranscriptome of kimchi fermentation. *Food Microbiology*, 86(June 2019), 103341. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103341>
156. Kleef, E. Van, Trijpp, H. C. M. Van i Luning, P. (2005). Functional foods: health claim-food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. *Appetite*, 44, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2005.01.009>
157. Kohli, A. K. i Jaworski, B. J. (1990). Market Orientation: The Construct Research Propositions, and Managerial Implications. *Journal of Marketing*, 54(2), 1–18.
158. Kok, R. A. W., Hillebrand, B. i Biemans, W. (2002). *Market-Oriented Product Development as an Organizational Learning Capability: Findings from Two Cases* (Issue Research report no. 02B13). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11885-7>
159. Komisja Europejska. (2002). *Draft Proposal for Regulation of the European Parliament and of the Council on Nutrition, Functional and Health Claims Made on Foods*.
160. Komisja Europejska. (2010). *Functional Foods*.
161. Komisja Europejska. (2016). *The competitive position of the European food and drink industry*.
162. Komisja Europejska. (2022a). *Food Safety. General Food Law*.
163. Komisja Europejska. (2022b). *Health Promotion. Nutrition*.
164. Kothe, E. J., Mullan, B. A. i Butow, P. (2012). Promoting fruit and vegetable consumption: Testing an intervention based on the theory of planned behaviour. *Appetite*, 58(3), 997–1004.
165. Kotler, P. i Armstrong, G. (1991). *Principles of Marketing* (5th ed.). Prentice Hall, Englewood Cliffs.
166. Kraus, A., Annunziata, A. i Vecchio, R. (2017). Sociodemographic Factors Differentiating the Consumer and the Motivations for Functional Food Consumption. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(2), 116–126. <https://doi.org/10.1080/07315724.2016.1228489>
167. Krishnan, V. i Ulrich, K. T. (2001). Product development decisions: A review of the literature. *Management Science*, 47(1), 1–21. <https://doi.org/10.1287/mnsc.47.1.1.10668>
168. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. i Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549.
169. Kun, S., Rezessy-Szabó, J. M., Nguyen, Q. D. i Hoschke, Á. (2008). Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. *Process Biochemistry*, 43(8), 816–821. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.03.008>
170. Kurilich, A. C., Tsau, G. J., Brown, A., Howard, L., Klein, B. P., Jeffery, E. H., Kushad, M., Wallig, M. A.

- i Juvik, J. A. (1999). Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1576–1581. <https://doi.org/10.1021/jf9810158>
171. Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., Xiao, L. & Tahir, H. E. (2018). Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.009>
172. Lahteenmaki, L. (2003). Consumers and functional foods. In T. Mattila-Sandholm & M. Saarela (Eds.), *Functional dairy products*. Woodhead Publishing Limited.
173. Leblanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., de Valdez, G. F., de Giori, G. S. i Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1297–1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>
174. Lee, Y., Oh, H., Seo, Y., Kang, J., Park, E. i Yoon, Y. (2022). Microbial Risk Analysis Risk and socio-economic impact for *Staphylococcus aureus* foodborne illness by ready-to-eat salad consumption. *Microbial Risk Analysis*, May, 100219. <https://doi.org/10.1016/j.mran.2022.100219>
175. Lefsrud, M., Kopsell, D., Wenzel, A. i Sheehan, J. (2007). Changes in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. *Scientia Horticulturae*, 112(2), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.026>
176. Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B. i Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3622–3632. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9265>
177. Li, A., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M. i Li, H. Bin. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
178. Li, C., Ding, Q., Nie, S. P., Zhang, Y. S., Xiong, T. i Xie, M. Y. (2014). Carrot juice fermented with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(49), 11884–11891. <https://doi.org/10.1021/jf503681r>
179. Li, T., Jiang, T., Liu, N., Wu, C., Xu, H. i Lei, H. (2021). Biotransformation of phenolic profiles and improvement of antioxidant capacities in jujube juice by select lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 339(July 2020), 127859. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127859>
180. Li, Y., Liu, Y., Cao, C., Zhu, X., Wang, C., Wu, R. i Wu, J. (2020). International Journal of Biological Macromolecules Extraction and biological activity of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* SN-8. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.150>
181. Li, Z., Li, Y., Xiao, C., Yan, Z., Pan, R., Gao, Y., Li, B., Wei, J., Qiu, Y., Liu, K., Shao, D. i Ma, Z. (2022). Genomic and metabolic features of the *Lactobacillus sakei* JD10 revealed potential probiotic traits. *Microbiological Research*, 256(July 2021), 126954. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126954>
182. Lienhardt, J. (2004). *The food industry in Europe Statistics in focus*.
183. Lima, M. C., Paiva de Sousa, C., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J. D. i de Souza, E. L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 130(March), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>
184. Liu, Y., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., Zhang, G. i Chen, W. (2018). Beneficial effects of tomato juice fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*: Antioxidation, antimicrobial effect, and volatile profiles. *Molecules*, 23(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23092366>
185. Louw, Louis, Schutte, C., Seidel, C. i Imser, C. (2018). Towards a Flexible Innovation Process Model Assuring Quality and Customer Needs. *South African Journal of Industrial Engineering*, 29(1), 155–168. <https://doi.org/10.7166/29-1-1911>
186. M'hir, S., Minervini, F., Di Cagno, R., Chammem, N. i Hamdi, M. (2012). Technological, functional and safety aspects of enterococci in fermented vegetable products: A mini-review. *Annals of Microbiology*, 62(2), 469–481. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0363-x>
187. MacFie, H. (2007). *Consumer-led food product development*. CRC Press.
188. Magnusson, J. i Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 1–5. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.1>
189. Makosz, E. (2019). Rynek owoców i warzyw. *Agencja Rynku Rolnego*, 3, 10–16.
190. Manfio, N. M. i Lacerda, D. P. (2016). Definition of scope in new product development projects for the food industry: a proposed method. *Gestão & Produção*, 23(3), 18–36.
191. Manikandan, R., Thiagarajan, R., Goutham, G., Arumugam, M., Beulaja, M., Rastrelli, L., Skalicka-

- Woźniak, K., Habtemariam, S., Orhan, I. E., Nabavi, S. F. i Nabavi, S. M. (2016). Zeaxanthin and ocular health, from bench to bedside. *Fitoterapia*, *109*, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.12.009>
192. Mantzourani, I., Kazakos, S., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A. i Plessas, S. (2018). Potential of the Probiotic *Lactobacillus Plantarum* ATCC 14917 Strain to Produce Functional Fermented Pomegranate Juice. *Foods*, *8*(1), 4. <https://doi.org/10.3390/foods8010004>
193. Mapelli-Brahm, P., Barba, F. J., Remize, F., Garcia, C., Fessard, A., Mousavi Khaneghah, A., Sant'Ana, A. S., Lorenzo, J. M., Montesano, D. i Meléndez-Martínez, A. J. (2020). The impact of fermentation processes on the production, retention and bioavailability of carotenoids: An overview. *Trends in Food Science and Technology*, *99*(October 2019), 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.013>
194. Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E. i Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *18*(3), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>
195. Mark-Herbert, C. (2002). *Functional Foods for Added Value: Developing and Marketing a New Product Category*. Swedish University of Agricultural Science.
196. Martín, R., Olivares, M., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L. i Rodríguez, J. M. (2005). Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *104*(3), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.007>
197. Martínez-Ballesta, M. del C. i Carvajal, M. (2015). Myrosinase in Brassicaceae: the most important issue for glucosinolate turnover and food quality. *Phytochemistry Reviews*, *14*(6), 1045–1051. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9430-4>
198. Martirosyan, D. M. i Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Functional Foods in Health and Disease*, *5*(6), 209. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v5i6.183>
199. Mathur, S. i Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. *International Journal of Food Microbiology*, *105*(3), 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
200. Meiselman, H. L. (2007). Integrating consumer responses to food products. In H. MacFie (Ed.), *Consumer-led food product development* (pp. 3–33). CRC Press.
201. Meybodi, N. M., Mortazavian, A. M., Arab, M. i Nematollahi, A. (2020). Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. *International Dairy Journal*, *109*, 104793. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104793>
202. Michalak, M., Gustaw, K., Waśko, A. i Polak-Berecka, M. (2018). Composition of lactic acid bacteria during spontaneous curly kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) fermentation. *Microbiological Research*, *206*, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.011>
203. Michalak, M., Kubik-Komar, A., Waśko, A. i Polak-Berecka, M. (2020). Starter culture for curly kale juice fermentation selected using principal component analysis. *Food Bioscience*, *35*(April), 100602. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100602>
204. Michalak, M., Skrzypczak, K., Nastaj, M., Terpiłowski, K., Skrzypek, T., Waśko, A. i Polak-Berecka, M. (2020). Possibility of using fermented curly kale juice to manufacture feta-type Cheese. *Applied Sciences (Switzerland)*, *10*(11), 1–19. <https://doi.org/10.3390/app10114020>
205. Michalak, M., Szwajgier, D., Paduch, R., Kukula-Koch, W., Waśko, A. i Polak-Berecka, M. (2020). Fermented curly kale as a new source of gentisic and salicylic acids with antitumor potential. *Journal of Functional Foods*, *67*(February), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103866>
206. Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L. i Hussain, M. A. (2019). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*(16), 2626–2641. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1462760>
207. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010 r. w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności (Dz. U. poz. 1184), (2010).
208. Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M., Dar, B. N., Greiner, R. i Roohinejad, S. (2018). Microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. *Food Control*, *85*, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.006>
209. Mortara, L. i Minshall, T. (2011). How do large multinational companies implement open innovation? *Technovation*, *31*, 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.technovation.2011.05.002>
210. Moskowitz, H. R., Saguy, I. S. i Straus, T. (2009). *An Integrated Approach to New Food Product*

Development. CRC Press.

211. Muhialdin, B. J., Kadum, H. i Meor Hussin, A. S. (2021). Metabolomics profiling of fermented cantaloupe juice and the potential application to extend the shelf life of fresh cantaloupe juice for six months at 8 °C. *Food Control*, 120(April 2020), 107555. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107555>
212. Muhialdin, B. J., Kadum, H., Zarei, M. i Meor Hussin, A. S. (2020). Effects of metabolite changes during lacto-fermentation on the biological activity and consumer acceptability for dragon fruit juice. *Lwt*, 121(December 2019), 108992. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108992>
213. Muñoz, R., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Reverón, I., Santamaría, L., Esteban-Torres, M., Curiel, J. A., Rodríguez, H. i Landete, J. M. (2017). Biotransformation of Phenolics by *Lactobacillus plantarum* in Fermented Foods. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00004-2>
214. Myers, S. i Marquis, D. G. (1969). *Successful industrial innovation: a study of factors underlying innovation in selected firms*. National Science Foundation.
215. Mynarska, M. (2012). Wykorzystanie teorii planowanego zachowania w celu wyjaśnienia różnicowania intencji rodzicielskich – ocena operacjonalizacji i dobroci pomiaru zmiennych. *Studia Psychologica*, 12(1), 83–100.
216. Narodowe Centrum Edukacji Żywnościowej. (2022). *Nowe zalecenia żywieniowe*.
217. Naughton, P. J., Marchant, R., Naughton, V. i Banat, I. M. (2019). Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 12–28. <https://doi.org/10.1111/jam.14243>
218. Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E., Cherie Millar, B. i Xu, J. (2011). Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 62(3), 1081–1089. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9856-2>
219. Nayak, B. S., Marshall, J. R., Isitor, G. i Adogwa, A. (2011). Hypoglycemic and hepatoprotective activity of fermented fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) in diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/875293>
220. Niemczak, M., Kaczmarek, D. K., Klejdysz, T., Gwiazdowska, D., Marchwińska, K. i Pernak, J. (2019). Ionic Liquids Derived from Vitamin C as Multifunctional Active Ingredients for Sustainable Stored-Product Management. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(1), 1072–1084. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04696>
221. Nugraheedi, P. Y., Widianarko, B., Dekker, M., Verkerk, R. i Oliviero, T. (2015). Retention of glucosinolates during fermentation of *Brassica juncea*: a case study on production of sayur asin. *European Food Research and Technology*, 240(3), 559–565. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2355-0>
222. O’Sullivan, M. (2017). *A Handbook for Sensory and Consumer-Driven New Product Development. Innovative Technologies for the Food and Beverage Industry*. Elsevier.
223. OECD. (2015). *Frascati Manual. Guidelines for collecting and reporting data on research and experimental development*. OECD Publishing.
224. OECD i Eurostat. (2018). *Oslo Manual. Guidelines for collecting, reporting and using data on innovation* (4th ed.). OECD Publishing.
225. Oliveira, M. A. de, Maciel de Souza, V., Morato Bergamini, A. M. i De Martinis, E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400–1403. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.020>
226. Oliveira, L. i Cardoso, E. L. (2021). Development and implementation of a model for promoting innovation in traditional food products through academic entrepreneurship. *Journal of Culinary Science & Technology*, 1–10. <https://doi.org/10.1080/15428052.2021.1938773>
227. Oloyede, O. O., Wagstaff, C. i Methven, L. (2021). Influence of cabbage (*Brassica oleracea*) accession and growing conditions on myrosinase activity, glucosinolates and their hydrolysis products. *Foods*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/foods10122903>
228. Olsen, H., Aaby, K. i Borge, G. I. A. (2009). Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. acephala var. sabellica) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf803693t>
229. Ozbek, N. i Akman, S. (2016). Method development for the determination of calcium, copper, magnesium, manganese, iron, potassium, phosphorus and zinc in different types of breads by microwave induced plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 200, 245–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.043>
230. Paasi, J., Valkokari, P., Maijala, P., Luoma, T. i Toivonen, S. (2007). Managing Uncertainty in the Front End of Radical Innovation Development. *International Association for Management of Technology*

- (IAMOT), 1–19.
231. Palani, K., Harbaum-Piayda, B., Meske, D., Keppler, J. K., Bockelmann, W., Heller, K. J. i Schwarz, K. (2016). Influence of fermentation on glucosinolates and glucobrassicin degradation products in sauerkraut. *Food Chemistry*, 190, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.012>
 232. Panda, S. K., Behera, S. K., Witness Qaku, X., Sekar, S., Ndinteh, D. T., Nanjundaswamy, H. M., Ray, R. C. i Kayitesi, E. (2017). Quality enhancement of prickly pears (*Opuntia* sp.) juice through probiotic fermentation using *Lactobacillus fermentum* - ATCC 9338. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.026>
 233. Panghal, A., Janghu, S., Virkar, K., Gat, Y., Kumar, V. i Chhikara, N. (2018). Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Bioscience*, 21(December 2017), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.003>
 234. Park, S. E., Seo, S. H., Kim, E. J., Byun, S., Na, C. S. i Son, H. S. (2019). Changes of microbial community and metabolite in kimchi inoculated with different microbial community starters. *Food Chemistry*, 274(May 2018), 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.032>
 235. 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 bezpiec, (2002).
 236. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 r. w sprawie nowej żywności, zmieniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlament, (2015).
 237. Parra, M., Stahl, S. i Hellmann, H. (2018). Vitamin B6 and its role in cell metabolism and physiology. *Cells*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/cells7070084>
 238. Pascucci, S., Dentoni, D. i Mitsopoulos, D. (2015). The perfect storm of business venturing? The case of entomology- based venture creation. *Agricultural and Food Economics*, 3(9), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40100-014-0025-y>
 239. Patel, A., Prajapati, J. B., Holst, O. i Ljungh, A. (2014). Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. *Food Bioscience*, 5, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.10.002>
 240. Pinna, C., Galati, F., Rossi, M., Saidy, C., Harik, R. i Terzi, S. (2018). Effect of product lifecycle management on new product development performances: Evidence from the food industry. *Computers in Industry*, 100(August 2017), 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.compind.2018.03.036>
 241. Polak-Berecka, M., Kubik-Komar, A., Gustaw, K., Michalak, M., Kazimierzczak, W. i Waško, A. (2018). Functional traits of *Lactobacillus plantarum* from fermented *Brassica oleracea* var. capitata L. in view of multivariate statistical analysis. *European Food Research and Technology*, 244(10), 1719–1727. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3084-6>
 242. Polish Committee of Standarization. (2013). *PN-EN 12147:2000 Fruit and vegetable juices - determination of titratable acidity*.
 243. Polska Agencja Informacji i Inwestycji Zagranicznych. (2013). *Sektor spożywczy w Polsce. Profil sektorowy*.
 244. Polska Agencja Inwestycji i Handlu. (2021). *Sektor spożywczy*.
 245. Ponce, A. G., Moreira, M. R., del Valle, C. E. i Roura, S. I. (2008). Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 432–441. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.021>
 246. Porter, M. E. (1980). *Competitive Strategy: Techniques for Analyzing Industries and Competitors*. Free Press.
 247. Porter, M. E. (2008). *On competition*. Harvard Business School Publishing.
 248. Project Management Institute. (2008). A Guide to the Project Management Body of Knowledge (PMBOK Guide). In *National Conference Publication - Institution of Engineers, Australia* (Fourth, Issue 83 /1). Project Management Institute, Inc. <https://doi.org/10.4324/9781003170075-26>
 249. Quansah, J. K., Kunadu, A. P. H., Saalia, F. K., Díaz-Pérez, J. i Chen, J. (2018). Microbial quality of leafy green vegetables grown or sold in Accra metropolis, Ghana. *Food Control*, 86, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.001>
 250. Rakin, M., Vukasinovic, M., Siler-Marinkovic, S. i Maksimovic, M. (2007). Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. *Food Chemistry*, 100(2), 599–602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.077>
 251. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. i Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–

- 10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
252. Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N. i Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
253. Reverón, I., de las Rivas, B., Muñoz, R. i López de Felipe, F. (2012). Genome-wide transcriptomic responses of a human isolate of *Lactobacillus plantarum* exposed to p-coumaric acid stress. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(12), 1848–1859. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200384>
254. Ribeiro, E. S. S., Damasceno, K. S. F. S. C., da Costa Dantas, L. M., de Azevedo, W. M., Leite, P. I. P., de Assis, C. F. i de Sousa Junior, F. C. (2020). Fermented yellow mombin juice using *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495: Chemical composition, bioactive properties and survival in simulated gastrointestinal conditions. *PLoS ONE*, 15(9 September), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239392>
255. Rivas-Rojas, E. i Cuffia, F. (2020). Identifying consumers' profile and factors associated with the valorization of pulque: A traditional fermented beverage in Central Mexico. *Food Science and Technology*, 26(7), 593–602.
256. Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M. i Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>
257. Rogers, E. (2003). *Diffusion of innovations (5th edition)*. Free Press.
258. Ru, X., Zhang, C. C., Yuan, Y. H., Yue, T. L. i Guo, C. F. (2019). Bile salt hydrolase activity is present in nonintestinal lactic acid bacteria at an intermediate level. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 893–902. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9492-5>
259. Rudder, A., Ainsworth, P. i Holgate, D. (2001). New food product development: Strategies for success? *British Food Journal*, 103(9), 657–671. <https://doi.org/10.1108/00070700110407012>
260. Rybicka, I. i Gliszczynska-Świgło, A. (2021). Sugars in dairy products of different flavours. *International Dairy Journal*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104933>
261. Ryynanen, T. i Hakatie, A. (2014). “We must have the wrong consumers” – a case study on new food product development failure. *British Food Journal*, 116(4), 707–722. <https://doi.org/10.1108/BFJ-08-2012-0215>
262. Saguy, I. S. i Sirovinskaya, V. (2014). Challenges in exploiting open innovation's full potential in the food industry with a focus on small and medium enterprises (SMEs). *Trends in Food Science & Technology*, 38, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.006>
263. Saifullah, S., Abbas, F., Samad, A., Rizwan, M., Bugti, F., S., Saima, R., Yousaf, M., Mykhalo, T. i Raziq A. (2018). *Staphylococcus aureus* prevalence in the fresh salad and vegetables of the Quetta city. *Pure and Applied Biology*, 7(1), 255–262. <https://doi.org/10.19045/bspab.2018.70031>
264. Saitou, N. i Imanishi, T. (1989). Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining. *Mol. Biol. Evol*, 6(5), 514–525. http://sayer.lab.nig.ac.jp/~saitou/paper-pdf/Saitou_MBE89.pdf
265. Šamec, D., Urlić, B. i Salopek-Sondi, B. (2018). Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: review of the scientific evidence behind the statement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2411–2422. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1454400>
266. Samtiya, M., Aluko, R. E., Puniya, A. K. i Dhewa, T. (2021). Enhancing micronutrients bioavailability through fermentation of plant-based foods: A concise review. *Fermentation*, 7(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020063>
267. Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A. i Gänzle, M. G. (2011). Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1176–1184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05141.x>
268. Sarkar, S. i Costa, A. (2008). Dynamics of open innovation in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.006>
269. Schumpeter, J. A. (1939). *Business cycles. A Theoretical, Historical and Statistical Analysis of the Capitalist Process*. McGraw-Hill Book Company.
270. Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G. i Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>
271. Septembre-Malaterre, A., Remize, F. i Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, 104(August 2017), 86–99.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.031>
272. Shahidi, F. i Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
273. Sharif, M. K., Zahid, A. i Shah, F. ul H. (2018). Role of Food Product Development in Increased Food Consumption and Value Addition. In *Food Processing for Increased Quality and Consumption*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811447-6.00015-1>
274. Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V. i Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.025>
275. Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El-Sahn, M. A. i Youssef, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2016.03.001>
276. Siau, K. i Long, Y. (2005). Synthesizing e-government stage models - a meta-synthesis based on meta-ethnography approach. *Industrial Management & Data Systems*, 105(4), 443–458.
277. Sikorska-Zimny, K. i Beneduce, L. (2021). The metabolism of glucosinolates by gut microbiota. *Nutrients*, 13(8), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu13082750>
278. Singleton, V. L. i Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
279. Sliburyte, L. i Skeryte, I. (2014). What We Know about Consumers' Color Perception. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 156(April), 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.11.223>
280. Sofía, A., Salom, M., Fuentes, E., Mozzi, F., Nieuwenhove, C. Van i Rodríguez, L. (2020). Functional fermented cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) juice using autochthonous lactic acid bacteria. *Food Research International*, 138(September), 109729.
281. Spundak, M. (2014). Mixed agile/traditional project management methodology – reality or illusion? *Procedia – Social and Behavioral Sciences*, 119, 939 – 948.
282. Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A. L., Habjanič, K. i Matoć, S. (2010). Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296–307.
283. Szajdek, A. i Borowska, J. (2004). Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(41), 5–28.
284. Szutowaska, J. (2020). Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. *European Food Research and Technology*, 246(3), 357–372. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03425-7>
285. Szutowaska, J. i Gwiazdowska, D. (2021). Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice. *Archives of Microbiology*, 203, 975–988. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02095-4>
286. Szutowaska, J., Gwiazdowska, D., Rybicka, I., Pawlak-Lemańska, K., Biegańska-Marecik, R. i Gliszczyńska-Świątło, A. (2021). Controlled fermentation of curly kale juice with the use of autochthonous starter cultures. *Food Research International*, 149(August). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110674>
287. Szutowaska, J., Gwiazdowska, D. i Sojkin, B. (2021). Consumer Behaviour on the Non-Dairy Fermented Market. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio H - Oeconomia*, 55(3), 117–131. <https://doi.org/10.17951/h.2021.55.3.117-131>
288. Szutowaska, J., Rybicka, I., Pawlak-Lemańska, K. i Gwiazdowska, D. (2020). Spontaneously fermented curly kale juice: Microbiological quality, nutritional composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Journal of Food Science*, 85(4), 1248–1255. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15080>
289. Tamang, J. P., Cotter, P. D., Endo, A., Han, N. S., Kort, R., Liu, S. Q., Mayo, B., Westerik, N. i Hutkins, R. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 184–217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>
290. Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C. i Holzapfel, W. H. (2009). Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 135(1), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.016>
291. Tamura, K., Nei, M. i Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenesis by using neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 11030–11035.
292. Thavarajah, D., Siva, N., Johnson, N., McGee, R. i Thavarajah, P. (2019). Effect of cover crops on the yield and nutrient concentration of organic kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). *Scientific Reports*, 9(1),

- 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46847-9>
293. Thavarajah, D., Thavarajah, P., Abare, A., Basnagala, S., Lacher, C., Smith, P. i Combs, G. F. (2016). Mineral micronutrient and prebiotic carbohydrate profiles of USA-grown kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Journal of Food Composition and Analysis*, *52*, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.07.003>
294. Torres, S., Verón, H., Contreras, L. i Isla, M. I. (2020). An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*, *9*(2), 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.02.006>
295. Traill, W. B. i Meulenber, M. (2002). Innovation in the Food Industry. *Agribusiness*, *18*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1002/agr.10002>
296. Trott, P. (2017). *Innovation Management and New Product Development* (6th ed.). Pearson.
297. Tsao, R. i Yang, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1018*(1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.034>
298. Tsimiklis, P., Ceschin, F., Green, S., Qin, S. F., Song, J., Baurley, S., Rodden, T. i Makatsoris, C. (2015). A Consumer-Centric Open Innovation Framework for Food and Packaging Manufacturing. *International Journal of Knowledge and Systems Science*, *6*(3), 52–69. <https://doi.org/10.4018/ijks.2015070104>
299. Tsimiklis, P. i Makatsoris, C. (2015). *An Open Innovation Framework for collaborative food product design & manufacturing*. *4*, 134–163.
300. Urala, N. i Lahteenmaki, L. (2003). Reasons behind consumers' functional food choices. *Nutrition & Food Science*, *33*, 148–158. <https://doi.org/10.1108/00346650310488499>
301. Urala, N. i Liisa, L. (2004). Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods. *Food Quality and Preference*, *15*, 793–803. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.02.008>
302. Urban, D. G. L. i Hauser, J. R. (1993). *Design and Marketing Of New Products*. Prentice-Hall.
303. USDA. (2019). *Food Composition Database*. Retrieved from <https://Ndb.Nal.USda.Gov/Ndb/Nutrients/Index>.
304. USDA. (2021). *Food Composition Databases*. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/query=kale>
305. USDA. (2022). *Food Composition Database*. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/323505/nutrients>
306. Valero-Cases, E. i Frutos, M. J. (2017). Effect of Inulin on the Viability of *L. plantarum* during Storage and In Vitro Digestion and on Composition Parameters of Vegetable Fermented Juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, *72*(2), 161–167. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0601-x>
307. Vallejo, F., Toms-Barbern, F. A. i Garca-Viguera, C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *82*(11), 1293–1297. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1183>
308. Valmohammadi, C. (2012). Investigating innovation management practices in Iranian organizations. *Innovation*, *14*(2), 247–255. <https://doi.org/10.5172/impp.2012.14.2.247>
309. Vera-Pingitore, E., Jimenez, M. E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., von Wright, A., Vignolo, G. i Plumed-Ferrer, C. (2016). Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. *LWT - Food Science and Technology*, *71*, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.046>
310. Verloop, J. (2004). *Insight in Innovation: Managing innovation by understanding the Laws of Innovation*. Elsevier Science.
311. Verón, H. E., Di Risio, H. D., Isla, M. I. i Torres, S. (2017). Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. *LWT*, *84*, 231–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.058>
312. Verón, H. E., Gauffin Cano, P., Fabersani, E., Sanz, Y., Isla, M. I., Fernández Espinar, M. T., Gil Ponce, J. V. i Torres, S. (2019). Cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice fermented with autochthonous *Lactobacillus plantarum* S-811. *Food and Function*, *10*(2), 1085–1097. <https://doi.org/10.1039/c8fo01591k>
313. Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S. i Arora, S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates - A review. *LWT - Food Science and Technology*, *42*(10), 1561–1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.023>
314. Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N. i Reddy, O. V. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*, 6112–6124. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1795-2>
315. Vitezić, N. i Vitezić, V. (2015). A Conceptual Model Of Linkage Between Innovation Management And Controlling In The Sustainable Environment. *Journal of Applied Business Research*, *31*(1), 175–184.

316. Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C. i Jayabalan, R. (2019). Effect of probiotification with *Lactobacillus plantarum* MCC 2974 on quality of Sohiong juice. *LWT*, *108*, 55–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.046>
317. Volberda, H. W., Bosch, F. A. J. Van Den i Heij, C. V. (2013). Management Innovation: Management as Fertile Ground for Innovation. *European Management Review*, *10*, 1–15. <https://doi.org/10.1111/emre.12007>
318. Wadołowska, L., Babicz-Zielińska, E. i Czarnocińska, J. (2008). Food choice models and their relation with food preferences and eating frequency in the Polish population: POFPRES study. *Food Policy*, *33*(2), 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2007.08.001>
319. Wafa, B. A., Makni, M., Ammar, S., Khannous, L., Hassana, A. Ben, Bouaziz, M., Es-Safi, N. E. i Gdoura, R. (2017). Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.007>
320. Wang, Yu, Li, H., Ren, Y., Wang, Y., Yaopeng, R., Xiaowei, W., Tianli, Y., Zhouli, W. i Zhenpeng, G. (2022). Preparation, model construction and efficacy lipid-lowering evaluation of kiwifruit juice fermented by probiotics. *Food Bioscience*, *47*(October 2021), 101710. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101710>
321. Wang, Yuchen, Tao, Y., Zhang, X., Shao, S., Han, Y., Chu, D.-T., Xie, G. i Ye, X. (2019). Metabolic profile of ginkgo kernel juice fermented with lactic acid bacteria: A potential way to degrade ginkgolic acids and enrich terpene lactones and phenolics. *Process Biochemistry*, *76*, 25–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.006>
322. Wasilewski, A. i Gospodarowicz, M. (2016). Agri-food sector in Poland: The need for innovation policy support. *The Bucharest University of Economic Studies*, *5*, 35–44.
323. Wei, M., Wang, S., Gu, P., Ouyang, X., Liu, S., Li, Y., Zhang, B. i Zhu, B. (2018). Comparison of physicochemical indexes, amino acids, phenolic compounds and volatile compounds in bog bilberry juice fermented by *Lactobacillus plantarum* under different pH conditions. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(6), 2240–2250. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3141-y>
324. Wennstrom, P. (2000). Functional foods and the consumer's perception of health claims. *Scandinavian Journal of Nutrition*, *44*, 30–33.
325. Widuri, R. i Sutanto, J. E. (2019). Differentiation Strategy and Market Competition as Determinants of Earnings Management. *Advances in Economics, Business and Management Research*, *69*, 171–176.
326. Wilczak, M. (2019). Postawy i zachowania konsumentów wybranych krajów europejskich wobec produktów fermentowanych. In *Uwarunkowania bezpieczeństwa i jakości żywności w Polsce*.
327. Winger, R. (2009). Product development. In G. Campbell-Pilat (Ed.), *Foodscience and technology*. John Wiley & Sons, Ltd.
328. Włodarska, K., Pawlak-Lemańska, K., Górecki, T. i Sikorska, E. (2017). Classification of commercial apple juices based on multivariate analysis of their chemical profiles. *International Journal of Food Properties*, *20*(8), 1773–1785. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1219367>
329. Wuyts, S., Beeck, W. Van, Oerlemans, E. F. M., Wittouck, S., Claes, I., De Boeck, I., Weckx, S., De Vujst, L. i Lebeer, S. (2018). Carrot Juice Fermentations as Man-Made Microbial Ecosystems Dominated by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(12), 1–16.
330. Xiong, T., Guan, Q., Song, S., Hao, M. i Xie, M. (2012). Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation. *Food Control*, *26*(1), 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.027>
331. Xu, X., Bao, Y., Wu, B., Lao, F., Hu, X. i Wu, J. (2019). Chemical analysis and flavor properties of blended orange, carrot, apple and Chinese jujube juice fermented by selenium-enriched probiotics. *Food Chemistry*, *289*, 250–258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.068>
332. Xu, Y., Hlaing, M. M., Glagovskaia, O., Augustin, M. A. i Terefe, N. S. (2020). Fermentation by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains enhances the carotenoid and fibre contents of carrot juice. *Foods*, *9*(12). <https://doi.org/10.3390/foods9121803>
333. Yang, X., Hu, W., Xiu, Z., Jiang, A., Yang, X., Saren, G., Ji, Y., Guan, Y. i Feng, K. (2020). Effect of salt concentration on microbial communities, physicochemical properties and metabolite profile during spontaneous fermentation of Chinese northeast sauerkraut. *Journal of Applied Microbiology*, *129*(6), 1458–1471. <https://doi.org/10.1111/jam.14786>
334. Ye, J.-H., Huang, L.-Y., Terefe, N. S. i Augustin, M. A. (2019). Fermentation-based biotransformation of glucosinolates, phenolics and sugars in retorted broccoli puree by lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, *286*, 616–623. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.030>

335. Yi, L., Qi, T., Hong, Y., Deng, L. i Zeng, K. (2020). Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Chinese homemade pickle and dry-cured meat, and bacteriocin identification by genome sequencing. *Lwt*, 125, 109177. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109177>
336. Yien Ong, Y., Siang Tan, W., Rosfarizan, M., Chan, E. S. i Ti Tey, B. (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Fermented Red Dragon Fruit Juices. *Journal of Food Science*, 77(10). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02894.x>
337. Yildiz, H. i Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72(June), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.009>
338. Yoon, K. Y., Woodams, E. E. i Hang, Y. D. (2006). Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97(12), 1427–1430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.018>
339. Yoshii, K., Hosomi, K., Sawane, K. i Kunisawa, J. (2019). Metabolism of dietary and microbial vitamin b family in the regulation of host immunity. *Frontiers in Nutrition*, 6(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00048>
340. Zhang, C., Zhang, J. i Liu, D. (2021). Biochemical changes and microbial community dynamics during spontaneous fermentation of Zhacai, a traditional pickled mustard tuber from China. *International Journal of Food Microbiology*, 347(March), 109199. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109199>
341. Zhao, M. N., Zhang, F., Zhang, L., Liu, B. J. i Meng, X. H. (2019). Mixed fermentation of jujube juice (*Ziziphus jujuba* Mill.) with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: effects on the quality and stability. *International Journal of Food Science and Technology*, 2017, 2624–2631. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14174>
342. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O’toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G. i Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
343. Zizlavsky, O. (2013). Design of Innovation Process Model : Starting Point of R&D Management Control. *Vision 2020: Innovation, Development Sustainability, and Economic Growth, September*, 675–682.

Spis tabel

Tabela 1. Innowacyjne produkty fermentowane na bazie surowców roślinnych	32
Tabela 2. Różnice pomiędzy probiotykami, żywnością fermentowaną i probiotyczną żywnością fermentowaną	42
Tabela 3. Systematyczny przegląd literatury - rozwój nowego produktu w branży spożywczej.....	52
Tabela 4. Podsumowanie modeli rozwoju nowego produktu spożywczego.....	54
Tabela 5. Zarządzanie projektem na przykładzie nowego produktu spożywczego (fermentowanego soku z jarmużu).....	63
Tabela 6. Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej.....	65
Tabela 7. Hipotezy główne oraz cząstkowe pracy doktorskiej	66
Tabela 8. Wykaz mikroorganizmów wskaźnikowych wraz z warunkami inkubacji i zastosowanym podłożem agarowym.....	70
Tabela 9. Charakterystyka podłoża mikrobiologicznych	71
Tabela 10. Charakterystyki socjo-demograficzne respondentów (n=205).....	73
Tabela 11. Specyfikacja analiz mikrobiologicznych.....	74
Tabela 12. Zawartość składników odżywczych, składników mineralnych, witamin i innych związków w surowym jarmużu	87
Tabela 13. Miejsce dokonywania zakupów owoców, warzyw lub ich przetworów przez respondentów	93
Tabela 14. Skojarzenia respondentów z fermentowanymi produktami warzywnymi.....	94
Tabela 15. Częstotliwość zakupu kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych.....	96
Tabela 16. Miejsce dokonywania zakupów kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych.....	96
Tabela 17. Częstotliwość spożycia kiszonych soków warzywnych oraz kiszonych produktów warzywnych.....	97
Tabela 18. Źródła wiedzy na temat kiszonych soków warzywnych	104
Tabela 19. Informacje na opakowaniu kiszonych soków warzywnych, na które respondenci zwracają uwagę.....	105
Tabela 20. Stopień dopasowania (ang. goodness-of-fit) modeli	106
Tabela 21. Wyniki analizy regresji.....	107
Tabela 22. Jakość mikrobiologiczna surowca i fermentowanego soku z jarmużu zielonego	110
Tabela 23. Wartości MBC/MFC i MIC dla świeżego i spontanicznie fermentowanego soku z jarmużu zielonego	113

Tabela 24. Ogólna zawartość związków fenolowych, właściwości antyoksydacyjne, zawartość witaminy C w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego.....	117
Tabela 25. Zawartość składników mineralnych w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego	119
Tabela 26. Zahamowanie wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych przez wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej	127
Tabela 27. Wrażliwość na antybiotyki wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej.....	133
Tabela 28. Tolerancja izolatów wobec NaCl, niskiego pH i soli żółciowych	135
Tabela 29. Identyfikacja proteomiczna izolatów bakterii fermentacji mlekowej.....	139
Tabela 30. Porównanie metod identyfikacji 12 wybranych izolatów za pomocą sekwencji genów 16S rRNA i MALDI-TOF MS.....	143
Tabela 31. Zestawienie wyników badań 7 wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej	148
Tabela 32. Badania wstępne izolatów bakterii w kontrolowanej fermentacji soku z jarmużu zielonego	150
Tabela 33. Składniki odżywcze i witaminy świeżego i fermentowanego soku z jarmużu zielonego ..	155
Tabela 34. Parametry fizykochemiczne oraz pomiar barwy świeżego i fermentowanego soku z jarmużu zielonego	158
Tabela 35. Liczebność żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej	160
Tabela 36. Wartości MIC i MBC dla kontrolowanej fermentacji soku z jarmużu.....	162
Tabela 37. Ogólna zawartość związków fenolowych oraz właściwości przeciwutleniające w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu	166
Tabela 38. Zawartość związków fenolowych (mg/100 ml) w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego	168
Tabela 39. Zawartość karotenoidów ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego	170
Tabela 40. Zawartość glukozyzolanów ($\text{mg}/100\text{ ml}$) w świeżym i fermentowanym soku z jarmużu zielonego	171
Tabela 41. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe izolatów bakterii fermentacji mlekowej	211
Tabela 42. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej wobec antybiotyków	214
Tabela 43. Identyfikacja proteomiczna izolatu JS017 - wynik pogładowy	217
Tabela 44. Identyfikacja proteomiczna izolatu JS018 - wynik pogładowy	218
Tabela 45. Identyfikacja proteomiczna izolatu JS031 - wynik pogładowy	218
Tabela 46. Sekwencje genetyczne wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej złożone w bazie NCBI.....	219

Spis wykresów

Wykres 1. Częstotliwość spożycia owoców, warzyw lub ich przetworów	91
Wykres 2. Częstotliwość spożycia wybranych produktów owocowych i warzywnych	92
Wykres 3. Zalety, z którymi kojarzą się respondentom kiszone produkty warzywne	95
Wykres 4. Częstotliwość spożycia wybranych kiszonych produktów warzywnych	98
Wykres 5. Częstotliwość spożycia wybranych kiszonych soków warzywnych	99
Wykres 6. Najważniejsze kryteria wyboru kiszonych soków warzywnych.....	100
Wykres 7. Najważniejsze kryteria wyboru kiszonych produktów warzywnych.....	101
Wykres 8. Satysfakcja z oferty dostępnych na rynku kiszonych soków warzywnych	102
Wykres 9. Częstotliwość zapoznawania się z informacją zamieszczoną na opakowaniu kiszonych soków warzywnych	104
Wykres 10 (A-K). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe świeżego i fermentowanego soku z jarmużu zielonego względem bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich i drożdży	115
Wykres 11. Odsetek izolatów wykazujących określone działanie przeciwdrobnoustrojowe	126
Wykres 12. Odsetek izolatów wykazujących wrażliwość na antybiotyki	131
Wykres 13 (A-C). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe świeżego i fermentowanego soku z jarmużu wobec bakterii Gram-ujemnych	162
Wykres 14 (A-C). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe świeżego i fermentowanego soku z jarmużu wobec bakterii Gram-dodatnich	163

Spis rysunków

Rysunek 1. Układ rozprawy doktorskiej	13
Rysunek 2. Schemat fermentacji mlekowej	28
Rysunek 3. Schemat systematycznego przeglądu literatury - rozwój nowego produktu na rynku spożywczym.....	51
Rysunek 4. Model rozwoju nowego produktu spożywczego	55
Rysunek 5. Schemat procesu badawczego.....	68
Rysunek 6. Schemat generowania i selekcji pomysłu w procesie rozwoju nowego produktu spożywczego.....	84
Rysunek 7. Procedura selekcji izolatów bakterii fermentacji mlekowej.....	122
Rysunek 8. Drzewo filogenetyczne oparte na sekwencjach genów 16S rRNA pokazujące pozycję 12 izolatów	144
Rysunek 9. Proces badawczy kontrolowanej fermentacji soku z jarmużu zielonego	154

Spis zdjęć

Zdjęcie 1 (A-D). Przykładowe płytki Petriego przedstawiające jakość mikrobiologiczną świeżego jarmużu i fermentowanego soku z jarmużu	111
Zdjęcie 2 (A i B). Przykładowe płytki Petriego z podłożem MRS, z których wyizolowano bakterie fermentacji mlekowej	124
Zdjęcie 3 (A-D). Zdjęcia mikroskopowe izolatów bakterii fermentacji mlekowej.....	124
Zdjęcie 4 (A - D). Przykładowe płytki Petriego przedstawiające właściwości przeciwdrobnoustrojowe izolatów bakterii fermentacji mlekowej.....	128
Zdjęcie 5 (A i B). Przykłady płytek Petriego przedstawiających wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej na antybiotyki	131
Zdjęcie 6 (A i B). Rozdział elektroforetyczny produktów PCR - widoczne fragmenty 1500 bp (zdjęcia wykonano w lampie UV Omega Lum G, Aplegen)	142

Załączniki

Załącznik 1. Kwestionariusz ankiety

Wybory konsumentów w zakresie konsumpcji owoców, warzyw i kiszonych produktów warzywnych

Część I. Wybory konsumentów w zakresie konsumpcji owoców, warzyw i ich przetworów

1. Jak często spożywa Pan/Pani owoce, warzywa lub ich przetwory?

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> codziennie | <input type="checkbox"/> kilka razy w miesiącu |
| <input type="checkbox"/> kilka razy w tygodniu | <input type="checkbox"/> kilka razy w roku |
| <input type="checkbox"/> raz w tygodniu | <input type="checkbox"/> nie spożywam w ogóle |

2. Gdzie dokonuje Pan/Pani zakupu owoców, warzyw lub ich przetworów? Pytanie wielokrotnego wyboru

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> supermarket | <input type="checkbox"/> Internet |
| <input type="checkbox"/> sklep osiedlowy | <input type="checkbox"/> dyskonty (np. Lidl, Biedronka) |
| <input type="checkbox"/> sklep ze zdrową żywnością | <input type="checkbox"/> inne (jakie?) |
| <input type="checkbox"/> targ | |

3. W skali od 1 do 5 proszę określić jak często spożywa Pan/Pani wymienione produkty owocowe i warzywne? (1 – nie spożywam w ogóle, 5 – spożywam regularnie)

- | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Świeże owoce/ warzywa | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 | Przeciery | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| Mrożonki | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 | Soki zagęszczone | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| Susze | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 | Soki | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| Kiszonki | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 | Napoje | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| Marynaty | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 | Kompoty | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| Konserwy | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 | Dżemy, powidła, konfitury
i/lub marmolady | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| Pulpy | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 | | | | | | |

Część II. Wybory konsumentów w zakresie konsumpcji kiszonych produktów warzywnych

4. Jakiej jest Pana/Pani pierwsze skojarzenie z „kiszonymi produktami warzywnymi”?

.....
.....

5. Z jakimi zaletami kojarzą się Panu/Pani kiszone produkty warzywne? Pytanie wielokrotnego wyboru

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> dłuższy okres przydatności do spożycia | <input type="checkbox"/> większa zawartość witaminy C |
| <input type="checkbox"/> lepszy smak | <input type="checkbox"/> właściwości probiotyczne |
| <input type="checkbox"/> właściwości prozdrowotne | <input type="checkbox"/> wyższa zawartość przeciwutleniaczy |
| <input type="checkbox"/> lekkostrawne | <input type="checkbox"/> niska kaloryczność |
| <input type="checkbox"/> niski poziom cholesterolu | <input type="checkbox"/> zwiększanie odporności organizmu |
| <input type="checkbox"/> inne (jakie?) | |

6. Jak często kupuje Pan/Pani kiszone soki warzywne i inne kiszone produkty warzywne?

- | kiszone soki warzywne | inne kiszone produkty warzywne |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> codziennie | <input type="checkbox"/> codziennie |
| <input type="checkbox"/> kilka razy w tygodniu | <input type="checkbox"/> kilka razy w tygodniu |
| <input type="checkbox"/> raz w tygodniu | <input type="checkbox"/> raz w tygodniu |
| <input type="checkbox"/> kilka razy w miesiącu | <input type="checkbox"/> kilka razy w miesiącu |
| <input type="checkbox"/> kilka razy w roku | <input type="checkbox"/> kilka razy w roku |
| <input type="checkbox"/> nie kupuje w ogóle | <input type="checkbox"/> nie kupuje w ogóle |

7. Gdzie dokonuje Pan/Pani zakupu kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych? Pytanie wielokrotnego wyboru

- | kiszone soki warzywne | inne kiszone produkty warzywne |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> supermarket | <input type="checkbox"/> supermarket |
| <input type="checkbox"/> sklep osiedlowy | <input type="checkbox"/> sklep osiedlowy |
| <input type="checkbox"/> sklep ze zdrową żywnością | <input type="checkbox"/> sklep ze zdrową żywnością |
| <input type="checkbox"/> targ | <input type="checkbox"/> targ |
| <input type="checkbox"/> Internet | <input type="checkbox"/> Internet |
| <input type="checkbox"/> dyskonty (np. Lidl, Biedronka) | <input type="checkbox"/> dyskonty (np. Lidl, Biedronka) |
| <input type="checkbox"/> inne (jakie?) | <input type="checkbox"/> inne (jakie?) |

8. W skali od 1 do 5 proszę określić częstotliwość spożycia kiszonych produktów warzywnych? (1 – nie spożywam w ogóle, 5 – spożywam regularnie)

- | Produkt | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Produkt | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Kapusta kiszona | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Kapary kiszone | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Ogórki kiszone | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Marchew kiszona | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Kalafior kiszony | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Kimchi | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Buraki kiszone | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Topinambur kiszony | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Czosnek kiszony | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Inne (jakie?): | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | | | | | | | | | | | |

9. W skali od 1 do 5 proszę określić częstotliwość spożycia kiszonych soków warzywnych? (1 – nie spożywam w ogóle, 5 – spożywam regularnie)

- | Sok kiszony z: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Sok kiszony z: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| kapusty | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | buraków | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ogórków | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | selera | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| pietruszki | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | marchwi | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| brokułów | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Inne (jakie?)..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| wielowarzywny | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | |

10. W skali od 1 do 5 proszę określić jak często przygotowuje Pan/Pani samodzielnie produkty kiszone? (1 – w ogóle nie przygotowuję, 5 – przygotowuję bardzo często)

- | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

11. W skali od 1 do 5 proszę określić jakie są dla Pana/Pani najważniejsze kryteria wyboru kiszonych soków warzywnych i innych kiszonych produktów warzywnych? (1 – w ogóle nieważne, 5 – bardzo ważne)

- | Kryteria | Kiszone soki warzywne | Inne kiszone produkty warzywne |
|--------------------------------------|--|--|
| Smak | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Cena | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Marka produktu | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Producent | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Reklama | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Dostępność | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Estetyka opakowania | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Pojemność opakowania | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Skład produktu | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Wartości odżywcze | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Właściwości prozdrowotne | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Właściwości probiotyczne | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Wygląd produktu | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |
| Rekomendacje znajomych i/lub rodziny | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 |

12. Jakie kiszone produkty warzywne kupił(a) Pan/Pani w ciągu ostatniego miesiąca?

.....
.....

Część III. Oferta rynkowa kiszonych soków warzywnych

13. W skali od 1 do 10 proszę określić czy oferta dostępnych na rynku kiszonych soków warzywnych jest dla Pana/Pani satysfakcjonująca? (1 – NIEsatysfakcjonująca, 10 – satysfakcjonująca)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

14. Jakie są w Pana/Pani opinii największe zalety i wady kiszonych soków warzywnych?

.....
.....

15. Skąd czerpie Pan/Pani wiedzę na temat kiszonych soków warzywnych? Pytanie wielokrotnego wyboru

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Internet | <input type="checkbox"/> gazetki sklepowe (ulotki) |
| <input type="checkbox"/> telewizja np. programy specjalistyczne | <input type="checkbox"/> banery reklamowe |
| <input type="checkbox"/> prasa np. gazety, czasopisma | <input type="checkbox"/> znajomi/rodzina |
| <input type="checkbox"/> targi konsumpcyjne | |
| <input type="checkbox"/> inne (jakie?)..... | |

16. Czy zapoznaje się Pan/Pani z informacją zamieszczoną na opakowaniu kiszonych soków warzywnych?

- nigdy rzadko czasami często zawsze

17. Na jakie informacje na opakowaniu kiszonych soków warzywnych zwraca Pan/Pani uwagę? Pytanie wielokrotnego wyboru

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> nazwa produktu | <input type="checkbox"/> masa netto produktu |
| <input type="checkbox"/> marka produktu | <input type="checkbox"/> termin przydatności do spożycia |
| <input type="checkbox"/> nazwa i adres producenta | <input type="checkbox"/> warunki przechowywania |
| <input type="checkbox"/> kraj pochodzenia | <input type="checkbox"/> certyfikaty np. <i>ekologiczne; ISO; Dobre, Bo Polskie!</i> |
| <input type="checkbox"/> zawartość składników odżywczych w 100g/ml produktu | <input type="checkbox"/> stopień pokrycia zalecanego dziennego zapotrzebowania na dany składnik |
| <input type="checkbox"/> lista składników | <input type="checkbox"/> obecność dozwolonych substancji dodatkowych lub innych dodatków |
| <input type="checkbox"/> oświadczenie żywieniowe np. <i>produkt zawiera witaminę C</i> | <input type="checkbox"/> oświadczenie zdrowotne np. <i>dany składnik obniża ryzyko wystąpienia określonej choroby</i> |
| <input type="checkbox"/> inne (jakie?)..... | |

Metryczka

Płeć kobieta mężczyzna

Wiek do 20lat 21-30lat 31-40lat 41-50lat 51- 60lat 60+

Status materialny (średnia krajowa = 3450 zł netto)

- zdecydowanie powyżej średniej krajowej powyżej średniej krajowej średnia krajowa poniżej średniej krajowej
zdecydowanie poniżej średniej krajowej

Miejsce zamieszkania

- wieś tradycyjna wieś przy mieście miasto poniżej 20 tys. miasto 20-99 tys.
miasto 100-199 tys. miasto 200-499 tys. miasto powyżej 500 tys.

Wykształcenie: podstawowe zawodowe średnie wyższe

Załącznik 2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Tabela 41. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe izolatów bakterii fermentacji mlekowej

L.p.	Izolat	Mikroorganizmy wskaźnikowe												
		Bakterie Gram-ujemne						Bakterie Gram-dodatnie						Drożdże
		<i>E. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
Świeży jarmuż zielony														
1.	JS001	12,00±0,00	14,00±0,00	13,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	13,50±0,71	14,50±0,71	15,00±0,00	15,00±0,00	11,50±0,71	0,00±0,00	0,00±0,00
2.	JS002	0,00±0,00	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	13,00±0,00	14,00±0,00*	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
3.	JS003	11,00±0,00*	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	12,50±0,71	16,00±0,00*	12,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
4.	JS004	12,00±0,00*	11,00±1,41*	11,50±0,71*	11,50±0,71	15,00±0,00	11,00±0,00	15,00±0,00*	20,50±0,71*	11,00±0,00*	12,00±0,00*	11,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00
5.	JS007	11,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,50±0,71*	12,50±0,71	17,00±0,00*	11,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
6.	JS008	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	11,50±0,71	16,00±0,00*	11,00±1,41*	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
7.	JS010	12,00±0,00*	20,00±7,07*	0,00±0,00	15,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	13,00±0,00	11,50±0,71	16,00±0,00*	14,50±0,71*	13,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
8.	JS011	0,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	11,00±0,00*	11,50±0,71*	0,00±0,00	11,00±0,00*	12,00±0,00	17,00±0,00*	13,50±0,00*	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
9.	JS012	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	15,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00	0,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10.	JS013	11,00±0,00*	16,00±0,00*	0,00±0,00	11,50±0,71*	11,00±0,00*	0,00±0,00	13,00±0,00	14,50±0,71	16,00±0,00*	13,50±0,71*	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
11.	JS014	0,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	11,50±0,71*	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	11,50±0,71	17,00±0,00*	13,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
12.	JS015	12,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	15,00±0,00	11,50±0,71*	11,00±0,00	11,00±0,00	0,00±0,00	13,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
13.	JS016	11,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00	11,00±0,00*	12,00±0,00	17,00±0,00*	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
14.	JS017	12,00±0,00	18,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00	0,00±0,00	11,50±0,71	13,50±0,71	18,00±0,00	14,00±0,00	11,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
15.	JS018	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
2 dzień fermentacji														
16.	JS019	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00	17,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
17.	JS020	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00	12,50±0,71*	15,00±0,00*	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00	18,00±0,00*	11,50±0,71*	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00
18.	JS021	0,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	12,50±0,71*	11,00±0,00*	0,00±0,00	12,50±0,71*	0,00±0,00	15,00±0,00*	11,00±0,00*	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00
19.	JS022	0,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	11,00±0,00*	15,50±0,71*	0,00±0,00	12,50±0,71*	12,00±0,00*	16,00±0,00*	14,00±0,00*	0,00±0,00	12,00±0,00*	0,00±0,00
20.	JS023	0,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	12,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00	16,00±0,00*	15,50±0,71*	0,00±0,00	15,50±0,71*	0,00±0,00
21.	JS024	0,00±0,00	15,00±0,00	0,00±0,00	15,00±0,00	14,00±0,00	0,00±0,00	14,50±0,71	11,00±0,00	16,00±0,00	13,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
22.	JS025	12,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	11,00±0,00*	0,00±0,00	12,50±0,71*	0,00±0,00	15,00±0,00*	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
23.	JS026	11,00±0,00*	12,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,50±0,71*	13,50±0,71*	16,00±0,00*	11,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
24.	JS027	12,00±1,41	16,00±0,00	0,00±0,00	16,50±0,71	16,50±0,71	0,00±0,00	16,00±0,00	13,00±0,00	20,00±0,00	14,00±0,00	13,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
25.	JS028	13,00±1,41*	15,00±0,00*	0,00±0,00	16,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	11,00±0,00	16,00±0,00*	15,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
26.	JM002	14,00±0,00*	15,00±0,00*	11,00±0,00*	15,50±0,71*	11,00±0,00*	11,50±0,71*	12,50±0,71*	15,00±0,00	15,00±0,00*	15,00±0,00*	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00

27.	JM010	13,50±0,71*	14,00±0,00*	11,50±0,71*	12,50±0,71*	11,50±0,71*	12,50±0,71*	11,50±0,71*	16,50±0,71*	16,00±0,00*	14,00±0,00*	12,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00
28.	JS031	15,33±1,41	17,00±0,00	12,50±0,00	0,00±0,00	13,50±0,00	14,60±0,71	13,50±0,00	13,60±0,00	15,33±0,71	15,50±0,00	15,50±0,00	13,00±0,71	0,00±0,00
4 dzień fermentacji														
29.	JS032	13,50±0,00	15,00±0,00	0,00±0,00	15,50±0,71	15,00±0,00	0,00±0,00	18,00±0,00	15,00±0,00	18,00±0,00	15,50±0,71	14,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
30.	JS033	15,50±0,71*	11,50±0,71*	14,00±0,00	11,50±0,71*	15,50±0,71*	11,50±0,71*	15,50±0,71*	15,00±2,83	14,50±0,71*	20,00±0,00*	15,50±0,71*	15,50±0,71	0,00±0,00
31.	JS034	15,00±0,00	11,50±0,71	14,00±0,00	14,00±0,00	17,50±0,71	13,00±1,41	17,00±0,00	23,00±1,41	15,50±0,71	19,50±0,71	15,50±0,71	17,50±0,71	0,00±0,00
32.	JS035	11,50±0,71*	12,00±0,00*	0,00±0,00	15,50±0,71*	15,00±0,00*	11,00±0,00*	15,00±0,00*	13,50±0,71	15,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
33.	JS036	12,50±0,71*	0,00±0,00	11,50±0,71	16,00±0,00*	15,50±0,71*	0,00±0,00	16,50±0,71	20,00±0,00	16,50±0,71*	15,50±0,71*	15,00±1,41*	15,00±0,00	0,00±0,00
34.	JS037	15,00±0,00*	13,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	15,00±0,00*	15,00±0,00*	15,00±0,00*	16,50±2,12	16,00±0,00*	15,00±0,00	13,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
35.	JS038	12,00±1,41*	0,00±0,00	13,00±0,00	12,00±0,00	11,00±0,00	0,00±0,00	15,50±0,71	15,50±0,71	16,00±1,41*	15,00±0,00*	12,00±0,00	16,50±0,71	0,00±0,00
36.	JS039	14,00±0,00	11,00±0,00*	15,00±0,00	15,00±0,00	16,00±0,00	11,00±1,41	16,50±0,71*	15,50±0,71	15,00±1,41	16,50±0,71	12,50±0,71	16,00±1,41	0,00±0,00
37.	JS040	11,50±0,71*	15,00±0,00*	0,00±0,00	11,50±0,71*	15,00±0,00*	0,00±0,00	11,00±0,00	0,00±0,00	15,00±0,00*	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
38.	JS041	11,50±0,71*	16,00±0,00*	0,00±0,00	11,00±0,00*	15,00±1,41*	0,00±0,00	16,00±0,00*	15,50±0,71*	17,00±0,00*	16,00±1,41*	11,50±0,71*	12,00±0,00*	0,00±0,00
39.	JS042	12,50±0,71*	12,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	16,00±0,00	15,00±0,00*	17,00±0,00*	17,50±0,71	16,00±0,00*	17,50±0,71*	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
40.	JS043	13,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	15,50±0,71*	15,00±1,41	0,00±0,00	15,00±0,00*	17,50±0,71	18,00±0,00*	14,50±0,71*	15,50±0,71	12,00±0,00*	0,00±0,00
41.	JS044	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	20,00±0,00	15,00±0,00*	12,50±0,71*	15,00±0,00	13,00±0,00*	20,00±1,41	13,00±0,00*	12,00±0,00*	12,00±0,00*
6 dzień fermentacji														
42.	JS045	12,00±0,00*	13,00±0,00*	0,00±0,00	12,00±0,00*	15,00±0,00	13,50±0,71	20,00±0,00*	16,00±0,00	15,00±0,00*	15,50±0,71	13,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
43.	JS047	13,50±0,71*	16,00±0,00*	0,00±0,00	13,00±0,00*	15,50±0,71	0,00±0,00	15,50±0,71*	17,00±0,00	16,50±0,71*	14,00±1,41*	11,50±0,71*	11,50±0,71*	0,00±0,00
44.	JM048	15,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	15,00±0,00*	15,50±0,71*	0,00±0,00	15,00±0,00*	18,00±0,00	15,00±0,00*	16,00±0,00	12,00±0,00*	12,00±0,00*	0,00±0,00
45.	JS048	14,00±1,41*	16,00±0,00*	0,00±0,00	15,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00	14,50±0,71	17,00±0,00*	15,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
46.	JS050	11,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	11,00±0,00	20,00±1,41*	15,50±0,71*	15,00±0,00	15,00±0,00	13,50±0,71*	20,50±0,71	11,00±0,00*	0,00±0,00	11,50±0,71*
47.	JS051	12,00±0,00*	12,50±0,71*	13,50±0,71*	11,50±0,71	20,00±0,00*	11,00±0,00	15,50±0,71	15,00±0,00	11,50±0,71	20,00±0,00*	11,00±0,00*	12,00±0,00	0,00±0,00
48.	JS052	14,00±1,41	14,00±0,00	15,50±0,71	13,00±0,00	16,50±0,71	12,00±0,00	19,00±1,41	21,00±1,41	15,50±0,71	19,50±0,71	13,50±0,71	16,50±0,71	0,00±0,00
49.	JS053	13,00±0,00	13,50±0,71	13,50±2,12	14,00±1,41	17,50±0,71	13,50±0,71	18,00±0,00	21,00±0,00	18,00±0,00	19,50±0,71	14,50±0,71	13,50±0,71	0,00±0,00
50.	JS054	12,50±0,71	13,00±1,41*	12,00±1,41	11,50±0,71	15,00±0,00	12,00±0,00	15,00±0,00	20,00±0,00	12,00±0,00	20,50±0,71*	11,00±1,41	11,50±0,71	0,00±0,00
51.	JS055	11,50±0,71*	15,00±0,00*	11,50±0,71*	15,00±0,00*	15,00±0,00	15,50±0,71*	15,00±1,41*	15,50±0,71	15,00±0,00*	15,00±0,00*	13,50±0,71*	11,50±0,71*	0,00±0,00
52.	JS056	13,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	12,50±0,71*	20,00±0,00*	15,00±0,00*	15,00±0,00*	21,00±0,00	15,00±0,00*	20,00±1,41*	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
53.	JS057	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	12,50±0,00*	21,50±0,71*	15,50±0,71*	15,00±0,00	20,00±0,00	15,50±0,71*	15,00±1,41*	11,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
54.	JM041	11,00±0,00*	13,50±0,71*	12,00±0,00*	12,50±0,71*	16,00±0,00*	0,00±0,00	15,50±0,71*	15,50±0,71	11,00±0,00*	16,00±1,41	11,50±0,71*	12,50±0,71*	0,00±0,00
8 dzień fermentacji														
55.	JM042	12,00±0,00*	12,50±0,71*	11,50±0,71*	15,50±0,71*	16,00±0,00*	0,00±0,00	16,50±0,71*	16,00±0,00	13,50±0,71*	16,50±0,71	12,00±0,00*	15,50±0,71*	0,00±0,00
56.	JM043	15,00±0,00*	0,00±0,00	11,50±0,71*	15,00±0,00*	15,50±0,71*	0,00±0,00	14,50±0,71*	17,50±0,71	15,00±0,00*	17,50±0,71	11,50±0,71*	15,50±0,71*	0,00±0,00
57.	JM044	0,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
58.	JS058	18,50±0,71	13,00±0,00	14,50±0,71	15,50±0,71	16,00±1,41	11,50±0,71	17,50±0,71	21,50±0,71	15,00±0,00	18,00±0,00	13,50±0,71	11,50±0,71	0,00±0,00
59.	JM059	12,50±0,71*	20,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	15,50±0,71	0,00±0,00	16,50±0,71*	16,00±0,00	15,00±0,00*	13,50±0,71*	11,50±0,71*	15,00±0,00*	0,00±0,00
60.	JM060	11,00±0,00*	12,00±0,00*	0,00±0,00	12,50±0,71*	15,00±0,00*	0,00±0,00	13,00±0,00*	12,50±0,71	16,00±0,00*	14,00±0,00*	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00

61.	JS060	14,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	16,00±1,41	0,00±0,00	16,50±0,71*	16,50±0,71	18,00±0,00*	14,00±1,41	15,00±0,00	13,50±0,71*	11,50±0,71*
62.	JS062	15,00±0,00*	16,00±0,00*	15,00±0,00*	15,50±0,71*	15,00±0,00	18,00±0,00*	14,00±1,41*	17,50±0,71	15,00±0,00*	15,50±0,71*	11,50±0,71*	11,00±0,00*	0,00±0,00
63.	JS064	15,50±0,71*	15,00±0,00*	15,00±0,00*	16,00±0,00*	15,00±0,00	18,00±0,00*	16,50±0,71*	16,50±0,71	20,00±0,00*	15,00±0,00*	14,50±0,71*	11,50±0,71*	0,00±0,00
64.	JS067	13,50±0,71*	17,00±0,00*	12,50±0,71*	15,00±0,00*	15,50±0,71	17,00±0,00*	14,50±0,71*	17,00±1,41	16,00±0,00*	15,00±1,41*	11,50±0,71*	11,00±0,00*	0,00±0,00
65.	JS068	11,00±0,00*	11,00±0,00*	15,00±0,00*	15,00±0,00*	20,50±2,12*	29,50±0,71*	16,00±0,00	20,00±0,00	15,00±0,00*	20,00±0,00	15,00±0,00	14,00±0,00*	0,00±0,00
66.	JS069	11,00±0,00*	15,00±0,00*	15,00±0,00*	16,00±0,00*	15,00±0,00	17,00±0,00*	16,00±1,41*	20,00±0,00	20,00±0,00*	15,00±0,00	12,00±0,00*	12,00±0,00*	0,00±0,00
67.	JS070	11,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	21,00±0,00	15,00±0,00	14,00±0,00	20,00±0,00	0,00±0,00	22,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	11,00±0,00
2 tygodnie przechowywania														
68.	JS071	12,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	13,00±0,00*	20,50±0,71*	13,00±0,00*	17,50±0,71*	20,00±0,00	14,50±0,71*	15,00±0,00*	13,00±0,00*	14,00±0,00	0,00±0,00
69.	JS072	11,00±0,00*	11,00±0,00*	15,00±0,00*	12,50±0,71*	15,50±0,71	14,50±0,71*	15,00±0,00	20,00±0,00	14,00±0,00*	21,50±0,71	16,00±0,00	12,50±0,71	0,00±0,00
70.	JS073	12,50±0,71*	15,00±0,00*	11,50±0,71*	11,00±0,00*	15,00±0,00*	17,50±0,71*	14,00±1,41*	16,50±0,71	0,00±0,00	14,00±0,00*	12,50±0,71*	11,00±0,00*	0,00±0,00
71.	JS074	15,00±0,00*	16,00±0,00*	12,50±0,71*	11,00±1,41*	15,00±0,00	16,00±1,41*	16,00±0,00*	15,00±1,41	20,00±0,00*	16,00±0,00*	12,50±0,71*	0,00±0,00	0,00±0,00
72.	JS075	14,50±0,71	15,00±0,00	15,00±0,00	15,00±0,00	17,00±0,00	16,50±0,71	17,50±0,71	21,00±0,00	19,00±0,00	15,50±0,71	13,50±0,71	0,00±0,00	11,00±0,00
73.	JS076	15,50±0,71*	0,00±0,00	15,50±0,71*	15,00±0,00*	15,50±0,71	12,50±0,71*	15,00±0,00*	20,00±0,00*	16,50±0,71*	20,00±0,00*	15,00±0,00*	19,00±0,00	0,00±0,00
74.	JS077	11,50±0,71	11,00±0,00*	15,00±0,00*	13,00±0,00	21,00±0,00	20,00±0,00*	16,00±0,00	20,00±0,00	13,00±0,00	20,50±0,71*	15,50±0,71	13,00±0,00*	0,00±0,00
75.	JS078	15,00±0,00*	13,00±0,00*	11,50±0,71*	11,00±0,00*	15,50±0,71	13,00±1,41*	15,00±0,00	15,00±0,00	13,50±0,71*	20,00±0,00	15,50±0,71	14,50±0,71	0,00±0,00
76.	JS079	12,00±0,00*	13,00±0,00*	15,00±0,00*	11,50±0,71*	15,00±0,00	14,00±0,00*	17,50±0,71	17,00±0,00	14,00±0,00*	20,00±0,00*	11,00±0,00	13,50±0,00*	0,00±0,00
77.	JS080	15,50±2,12*	11,50±0,71	13,50±0,71	16,00±0,00	15,00±1,41	13,00±0,00	19,50±0,71	21,00±1,41	15,50±2,12	15,50±0,71	15,00±0,00	19,00±1,41	0,00±0,00
78.	JM062	13,50±0,71*	16,00±0,00*	11,00±0,00*	15,00±0,00	15,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	15,00±0,00	20,00±0,00*	15,00±0,00*	11,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00
79.	JM063	11,00±0,00	12,50±2,12	13,50±0,71	11,50±0,71	16,50±0,71	12,00±0,00	17,00±0,00	20,50±0,71*	15,50±0,71	21,00±0,00*	15,50±0,71	16,50±0,71	0,00±0,00
80.	JM067	12,50±0,71*	13,00±0,00*	0,00±0,00	15,00±0,00*	17,00±0,00*	0,00±0,00	12,00±0,00*	0,00±0,00	16,00±0,00*	15,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Średnica przedstawiona jako średnia z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym

*efekt bakteriostatyczny

Źródło: opracowanie własne

Załącznik 3. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej wobec antybiotyków

Tabela 42. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej wobec antybiotyków

L.p.	Izolat	Grupa antybiotyków										
		K (30 µg)	S (300 µg)	G (10 µg)	N (30 µg)	C (30 µg)	E (15 µg)	DA (2 µg)	T (30 µg)	AMP (10 µg)	P (1,5 IU)	VA (30 µg)
		Inhibitory syntezy białek								Inhibitory syntezy ściany komórkowej		
Świeży jarmuż zielony												
1.	JS001	R	S	I	I	S	S	S	S	S	I	R
2.	JS002	R	I	R	R	S	S	S	S	I	I	R
3.	JS003	R	R	R	R	S	I	I	S	I	R	R
4.	JS004	R	I	I	I	S	S	S	S	S	I	R
5.	JS007	R	I	R	R	S	S	S	S	S	I	R
6.	JS008	R	I	R	R	S	S	S	S	S	I	R
7.	JS010	R	I	R	I	S	S	S	S	S	I	R
8.	JS011	R	I	R	R	S	I	S	S	S	I	R
9.	JS012	R	I	I	R	S	S	S	S	S	I	R
10.	JS013	R	I	R	R	S	S	S	S	S	I	R
11.	JS014	R	I	R	R	S	S	S	S	S	I	R
12.	JS015	R	S	I	R	S	S	S	S	S	I	R
13.	JS016	R	S	I	I	S	S	I	I	S	I	R
14.	JS017	R	I	R	R	S	S	S	S	S	I	R
15.	JS018	R	R	R	R	I	I	I	R	I	R	R
2 dzień fermentacji												
16.	JS019	R	I	R	I	I	S	S	S	S	R	R
17.	JS020	R	I	R	R	S	I	I	S	I	R	R
18.	JS021	R	R	R	R	S	I	R	I	R	R	R
19.	JS022	R	R	R	R	S	I	I	I	I	R	R
20.	JS023	R	R	R	R	S	I	I	S	I	R	R
21.	JS024	R	R	R	R	S	I	I	I	I	R	R
22.	JS025	R	I	R	R	S	I	I	S	I	R	R
23.	JS026	R	I	R	I	S	S	R	S	I	S	R

24.	JS027	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R
25.	JS028	R	S	R	R	S	S	S	S	I	S	R
26.	JM002	R	I	R	I	I	S	I	I	I	R	R
27.	JM010	R	R	R	I	I	I	I	I	S	I	R
28.	JS031	R	I	R	R	S	S	I	S	S	I	R
4 dzień fermentacji												
29.	JS032	R	I	R	R	I	I	I	S	S	R	R
30.	JS033	R	R	R	R	S	I	I	I	I	R	R
31.	JS034	R	I	R	R	S	S	R	I	S	R	R
32.	JS035	R	I	I	R	S	S	S	S	S	I	R
33.	JS036	R	R	R	R	I	R	I	R	I	R	R
34.	JS037	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
35.	JS038	R	I	R	R	S	S	S	S	S	I	R
36.	JS039	R	R	R	R	S	I	I	I	I	R	R
37.	JS040	R	S	I	I	I	S	R	I	I	S	R
38.	JS041	R	I	I	R	I	I	I	S	R	I	R
39.	JS042	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
40.	JS043	R	I	R	I	I	S	R	I	R	R	R
41.	JS044	R	S	R	I	I	I	R	I	I	R	R
6 dzień fermentacji												
42.	JS045	R	I	R	R	I	I	I	R	S	I	R
43.	JS047	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R
44.	JM048	R	I	R	R	I	R	I	I	I	I	R
45.	JS048	R	I	R	R	I	I	R	I	R	R	R
46.	JS050	R	S	R	R	S	S	S	I	S	S	R
47.	JS051	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R
48.	JS052	R	I	R	R	S	S	R	I	I	R	R
49.	JS053	R	I	R	R	I	I	S	S	S	R	R
50.	JS054	R	I	R	R	I	I	R	I	I	R	R
51.	JS055	R	I	R	R	S	S	I	I	S	I	R
52.	JS056	R	S	R	R	S	I	S	S	R	R	R
53.	JS057	R	I	R	R	I	I	I	R	R	I	R
54.	JM041	R	S	S	R	S	S	I	R	S	S	R
8 dzień fermentacji												
55.	JM042	R	I	R	R	I	I	R	R	I	R	R

56.	JM043	R	I	R	R	I	I	I	R	I	R	R
57.	JM044	R	S	R	R	S	I	I	I	I	I	R
58.	JS058	R	S	I	R	S	S	S	I	S	I	R
59.	JM059	R	R	R	R	S	I	R	I	I	R	R
60.	JM060	R	I	R	R	S	I	R	I	S	R	R
61.	JS060	R	S	I	S	S	S	I	S	S	R	R
62.	JS062	R	S	R	R	I	I	S	S	S	I	R
63.	JS064	R	S	R	S	S	S	I	S	I	R	R
64.	JS067	R	S	R	R	I	R	S	S	S	R	R
65.	JS068	R	I	R	R	I	I	R	R	I	R	R
66.	JS069	R	S	R	R	I	S	S	S	S	R	R
67.	JS070	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
2 tygodnie przechowywania												
68.	JS071	R	I	R	R	S	S	R	I	S	R	R
69.	JS072	R	I	R	R	I	I	R	I	S	R	R
70.	JS073	R	S	R	R	S	S	S	I	I	R	R
71.	JS074	R	S	R	R	S	S	S	S	I	S	R
72.	JS075	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R
73.	JS076	R	R	R	R	I	I	R	S	R	R	R
74.	JS077	R	I	R	R	I	I	R	I	I	R	R
75.	JS078	R	I	R	R	S	S	R	S	S	R	R
76.	JS079	R	I	R	R	S	S	R	I	S	R	R
77.	JS080	R	I	R	R	S	I	R	I	S	R	R
78.	JM062	R	R	R	R	S	I	R	I	I	R	R
79.	JM063	R	I	R	R	S	S	I	S	I	R	R
80.	JM067	R	I	R	R	S	I	I	I	I	R	R

K – kanamycyna, S – streptomycyna, G – gentamycyna, N – neomycyna, C – chloramfenikol, E – erytromycyna, DA – klindamycyna, T – tetracyklina, AMP - ampicylina, P – penicylina, VA – wankomycyna

R – oporny (ang. *resistance*), I – średniowrażliwy (ang. *intermediate susceptibility*), S – wrażliwy (ang. *susceptibility*)

Źródło: opracowanie własne

Załącznik 4. Wyniki identyfikacji proteomicznej izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Tabela 43. Identyfikacja proteomiczna izolatu JS017 - wynik poglądowy

L.p.	Nr izolatu	Identyfikacja	Wartość wskaźnika identyfikacji	NCBI
1.	JS017	<i>Leuconostoc palmae</i>	1,40	<i>Leuconostoc palmae</i> (nr identyfikacyjny: 1243)
2.		<i>Leuconostoc gelidum</i>	1,36	<i>Leuconostoc gelidum</i> (nr identyfikacyjny: 1244)
3.		<i>Leuconostoc gelidum</i>	1,23	<i>Leuconostoc gelidum</i> (nr identyfikacyjny: 1244)
4.		<i>Cronobacter</i> sp.	1,18	<i>Cronobacter sakazakii</i> (nr identyfikacyjny: 28141)
5.		<i>Leuconostoc inhae</i>	1,17	<i>Leuconostoc inhae</i> (nr identyfikacyjny: 178001)
6.		<i>Leuconostoc gelidum</i>	1,16	<i>Leuconostoc gelidum</i> (nr identyfikacyjny: 1244)
7.		<i>Burkholderia cepacia</i>	1,16	<i>Burkholderia cepacia</i> (nr identyfikacyjny: 292)
8.		<i>Pseudomonas putida</i>	1,15	<i>Pseudomonas putida</i> (nr identyfikacyjny: 303)
9.		<i>Weisella viridescens</i>	1,15	<i>Weisella viridescens</i> (nr identyfikacyjny: 1629)
10.		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (nr identyfikacyjny: 72407)

Wynik poglądowy oznacza dziesięć najbliższych dopasowań wygenerowanych przez system Maldi Biotyper do widm masowych mikroorganizmów, znajdujących się w bazie systemu Maldi Biotyper firmy Bruker.

Źródło: opracowanie własne na podstawie raportów Jagiellońskiego Centrum Innowacji

Tabela 44. Identyfikacja proteomiczna izolatu JS018 - wynik poglądowy

L.p.	Nr izolatu	Identyfikacja	Wartość wskaźnika identyfikacji	NCBI
1.	JS018	<i>Haemophilus influenzae</i>	1,49	<i>Haemophilus influenzae</i> (nr identyfikacyjny: 727)
2.		<i>Haemophilus influenzae</i>	1,42	<i>Haemophilus influenzae</i> (nr identyfikacyjny: 727)
3.		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1,34	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (nr identyfikacyjny: 54291)
4.		<i>Glutamicibacter protophormiae</i>	1,24	<i>Glutamicibacter protophormiae</i> (nr identyfikacyjny: 37930)
5.		<i>Haemophilus influenzae</i>	1,23	<i>Haemophilus influenzae</i> (nr identyfikacyjny: 727)
6.		<i>Lactilactobacillus curvatus</i>	1,22	<i>Lactilactobacillus curvatus</i> (nr identyfikacyjny: 28038)
7.		<i>Balneatrix alpica</i>	1,22	<i>Balneatrix alpica</i> (nr identyfikacyjny: 75684)
8.		<i>Evansella clarkii</i>	1,20	<i>Evansella clarkii</i> (nr identyfikacyjny: 79879)
9.		<i>Lactilactobacillus sakei</i>	1,20	<i>Lactilactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i> (nr identyfikacyjny: 214325)
10.		<i>Staphylococcus felis</i>	1,19	<i>Staphylococcus felis</i> (nr identyfikacyjny: 46127)

Wynik poglądowy oznacza dziesięć najbliższych dopasowań wygenerowanych przez system Maldi Biotyper do widm masowych mikroorganizmów, znajdujących się w bazie systemu Maldi Biotyper firmy Bruker.

Źródło: opracowanie własne na podstawie raportów Jagiellońskiego Centrum Innowacji

Tabela 45. Identyfikacja proteomiczna izolatu JS031 - wynik poglądowy

L.p.	Nr izolatu	Identyfikacja	Wartość wskaźnika identyfikacji	NCBI
1.	JS031	<i>Leuconostoc palmae</i>	1,49	<i>Leuconostoc palmae</i> (nr identyfikacyjny: 1243)
2.		<i>Burkholderia cepacia</i>	1,35	<i>Burkholderia cepacia</i> (nr identyfikacyjny: 292)
3.		<i>Burkholderia cepacia</i>	1,21	<i>Burkholderia cepacia</i> (nr identyfikacyjny: 292)
4.		<i>Leuconostoc gelidum</i>	1,19	<i>Leuconostoc gelidum</i> (nr identyfikacyjny: 1244)
5.		<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	1,18	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> (nr identyfikacyjny: 46429)
6.		<i>Burkholderia thailandensis</i>	1,18	<i>Burkholderia thailandensis</i> (nr identyfikacyjny: 57975)
7.		<i>Serratia rubidaea</i>	1,17	<i>Serratia rubidaea</i> (nr identyfikacyjny: 61652)
8.		<i>Serratia rubidaea</i>	1,16	<i>Serratia rubidaea</i> (nr identyfikacyjny: 61652)
9.		<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	1,13	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (nr identyfikacyjny: 60552)
10.		<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	1,13	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> (nr identyfikacyjny: 60550)

Wynik poglądowy oznacza dziesięć najbliższych dopasowań wygenerowanych przez system Maldi Biotyper do widm masowych mikroorganizmów, znajdujących się w bazie systemu Maldi Biotyper firmy Bruker.

Źródło: opracowanie własne na podstawie raportów Jagiellońskiego Centrum Innowacji

Załącznik 5. Sekwencje genetyczne wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Tabela 46. Sekwencje genetyczne wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej złożone w bazie NCBI

L.p.	Nr izolatu	Gatunek	Sekwencja genetyczna umieszczone w bazie NCBI
1.	JS001	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1 aagttggtgg ggtaaaggcc taccaagaca atgatgcata gccgagttga gagactgatc 61 ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctcctacggg aggctgcagt agggaatctt 121 ccacaatggg cgaaagcctg atggagcaac gccgcgtgtg tgatgaaggc ttcgggtcgc 181 taaagcactg ttgtatggga agaacagcta gaataggaaa tgattttagt ttgacggtac 241 cataccagaa agggacggct aaatacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt atgtcccagag 301 cgttatccgg gatttattgg gcgtaaagcg agcgcagacg gtttattaag tctgatgtga 361 aagcccggag ctcaactccg gaatggcatt ggaaactggt taacttgagt gcagtagagg 421 taagtggaac tccatgtgta gcggtggaat gcgtagatat atggaagaac accagtggcg 481 aaggcggctt actggactgc aactgacgtt gaggctcgaa agtgtgggta gcaaacagga 541 ttagataccc tggtagtcca caccgtaaac gatgaacact aggtgttagg aggtttccgc 601 ctcttagtgc cgaagctaac gcattaagtg ttccgcctgg ggagtacgac cgaaaggtg 661 aaactcaaag gaattgacgg ggaccgcaca aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag 721 caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcctttgaag cttttagaga tagaagtgtt 781 cttcttcgga gacaaagtga caggtggtgc atggtcgtcg tcagctcgtg tctgtgagaat 841 gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttattgtta gttgccagca ttcagatggg 901 cacctctagc gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggc ggggacgacg tcagatcatc 961 atgcccctta tgacctgggc tcacacaccg tgccctaaca tggcgcttat acacacgaag 1021 ttg
2.	JS017		Brak identyfikacji
3.	JS024	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1 gattgcacta gccgagctta gagagactga tcggccacat tgggactgag aactggccc 61 aaactcctac gggaggctgc agtagggaat cttccacaat gggcgaaagc ctgatggagc 121 aacgccgctg gtgtgatgaa ggctttcggg tcgtaaagca ctgttgttat gggagaaca 181 gctagaatag gaaatgattt tagtttgacg gtaccatacc agaaagggac ggctaaatac 241 gtgccagcag ccgcggtaat acgtatgtcc cgagcgttat ccgggattta ttgggctgaa 301 agcgagcgca gacggtttat taagtctgat gtgaaagccc ggagctcaac tccggaatgg 361 cattggaaac tggttaactt gagtgcagta gaggtaagtg gaactccatg tgtagcggtg 421 gaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gcttactgga ctgcaactga 481 cgttgaggct cgaaagtgtg ggtagcaaac aggattagat accctggtag tccacaccgt 541 aaacgatgaa cactaggtgt taggaggttt ccgcctcta gtgccgaagc taacgcatta 601 agtgttccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc aaaggaattg acggggaccc 661 gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt 721 gacatccttt gaagctttta gagatagaag tgttcttctt cggagaacaa agtgacaggt

			781 ggtgcatggt cgtcgtcagc tctgtctcgtg agatggtggg ttaagtcccc caacgagcgc
			841 aacccttatt gttagttgcc agcattcaga tggggcactct agcgagactg ccggtgacaa
			901 accggaggaa ggcggggacg acgtcagatc atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac
			961 gtgctacaat gggcgtatac acacgagttg
4.	JS027	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1 caagacaatg gatggcatag gccgagttga gagactgatc ggccacattg ggactgagac
			61 acggcccaaa ctctacggg aggctgcagt agggaatctt ccacaatggg cgaaagcctg
			121 atggagcaac gccgcgtgtg tgatgaaggc tttcgggtcg taaagcactg ttgtattggg
			181 aagaacagct agaataggaa atgattttag tttgacggta ccataccaga aagggacggc
			241 taaatacgtg ccagcagccg cggtaatacg tatgtcccga gcgttatccg gatttatggg
			301 gcgtaaagcg agcgcagacg gtttattaag tctgatgtga aagcccggag ctcaactccg
			361 gaatggcatt ggaaactggt taacttgagt gcagtagagg taagtggaac tccatgtgta
			421 gcggtggaat gcgtagatat atggaagaac accagtggcg aaggcggctt actggactgc
			481 aactgacgtt gaggctcgaa agtgtgggta gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca
			541 caccgtaaac gatgaacact aggtgttagg aggtttccgc ctcttagtgc cgaagctaac
			601 gcattaagtg ttccgcctgg ggagtacgac cgcaagggtg aaactcaaag gaattgacgg
			661 ggaccgcac aagcgggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca
			721 ggtcttgaca tcctttgaag cttttagaga tagaagtgtt ctcttcggag acaaagtgc
			781 agtggtgca tggctcgtctg cagctcgtg cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga
			841 gcgcaaccct tattgttagt tgccagcatt cagatgggca ctctagcagc actgccgtg
			901 acaaaccgga ggaaggcggg gacgacgtca gatcatcatg ccccttatga cctgggctac
			961 acacgtgcta caatggcgta tacacaccga g
5.	JS031		Brak identyfikacji
6.	JS032	<i>Lactilactobacillus sakei</i>	1 gaattgcatt agccgacctg gagagggtaa tgggccacac tgggactgag acacggcca
			61 gactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccacaatg gacgaaagtc tgatggagca
			121 acgccgcgtg agtgaagaag gttttcggat cgtaaaactc tgttggtgga gaagaatgta
			181 tctgatagta actgatcagg tagtgacggt atccaaccag aaagccacgg ctaactacgt
			241 gccagcagcc gcggtaatac gtaggtggca agcgttgtcc ggatttatg ggctgaaagc
			301 gagcgcaggc ggtttcttaa gtctgatgtg aaagccttcg gctcaaccga agaagtgcac
			361 cggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcggtgaaa
			421 tgcgtagata tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct gtctggctctg taactgacgc
			481 tgaggctcga aagcatgggt agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc atgccgtaa
			541 cgatgagtgc taggtgttgg agggtttccg cccttcagtg ccgcagctaa cgcattaagc
			601 actccgcctg gggagtacga ccgcaaggtt gaaactcaaa ggaatttgac gggggccccg
			661 acaagcgggt gagcatgtgg ttttaattcga agcaacgcga agaacttac caggtcttga
			721 catcctttga ccactctaga gatagagctt tcccttcggg gacaaagtga caggtggtgc
			781 atggttgtcg tcagctcgtg tctgagatg tgggttaag ttcccgaac gagcgaacc
			841 cttattacta gttgccagca tttagttggg cactctagtg agaactgccg gtgacaaacc
			901 ggaggaaggt ggggacgacg tcaaatcatc atgtccccgt tatgta

7.	JS034	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	1 cgtattagtc tagatggtgg tcggaataac ggctccactc atggcaatga taggtagccg 61 acctgagagg gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggagggc 121 agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtga 181 gaagggtttc ggctcgtaaa actctgttgt taaagaagaa cataatctgag agtaactggt 241 caggtattga cggtatthaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta 301 atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta aagcgagcgc aggcggtttt 361 ttaagtctga tgtgaaagct tcggctcaac cgaagaagtg catcggaac tgggaaactt 421 gagtgcagaa gaggacagtg gaactccatg ttagcgggtg aaatgcgtag atatatggaa 481 gaacaccagt ggcgaaggcg gctgtctggt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagtatg 541 ggtagcaaac aggattagat accctggtag tccataccgt aaacgatgaa tgctaagtgt 601 tggagggttt ccgcccttca gtgctgcagc taacgcatta agcattccgc ctggggagta 661 cggccgcaag gctgaaactc aaaggaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt 721 ggtttaattc gaagctacgc gaagaacct accaggtctt gacatactat gcaaacttaa 781 gagattagac gtttcccttc ggggacatgg atacaggtgg tgcatggttg tctcagctc 841 gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgc acgagcgcaa cccttattat cagttgccag 901 cattaagtgt ggcactctgg tgagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tgggtagc 961 gtcaaactcat catgcccctt atgacctggg ctactacacg tgcctcacia tgaga
8.	JS052	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	1 catggcaatg atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg 61 gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg 121 gagcaacgcc gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga 181 acatattctg agagtaactg ttcaggtatt gacggtattt aaccagaaag ccacggctaa 241 ctacgtgccg gcagccgagg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggat ttattgggag 301 taaagcgagc gcaggcgggt ttttaagtct gatgtgaaag ccttcggctc aaccgaagaa 361 gtgcatcgga aactgggaaa cttgagtgca gaagaggaca gtggaactcc atgtgtagcg 421 gtgaaatgag tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag gcggctgtct ggtctgtaac 481 tgacgctgag gctcgaaagt atgggtagca aacaggatta gataccctgg tagtccatac 541 cgtaaactgag gaatgctaag tgttggaggg tttccgccct tcagtgtctg agctaacgca 601 ttaagcattc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg 661 cccgcacaag cggtgagca tgtggtttaa tttggagcta cgcaagaac cttaccaggt 721 cttgacatac tatgcaaatc taagagatta gacgttccct tcggggacat ggatacaggt 781 ggtgcatggt tgtcgtccag ctctgtctgt gagaatgttg ggttaagttc ccgcaacgag 841 cgcaaccctt attatcagtt gccagcatta agttgggac tctggtgaga ctgccggtga 901 caaacggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac
9.	JS053	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	1 tagcctagat ggtggggtaa cggctcacca tggcaatgta tacgtagccg acctgagagg 61 gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggagggc agcagtaggg 121 aatcttccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtga gaagggtttc 181 ggctcgtaaa actctgttgt taaagaagaa cataatctgag agtaactggt caggtattga 241 cggtatthaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 301 ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta aagcgagcgc aggcggtttt ttaagtctga

			<p>361 tgtgaaagcc ttcggctcaa ccgaagaagt gcatcggaaa ctgggaaact tgagtgcaga</p> <p>421 agaggacagt ggaactccat gtgtagcggg gaaatgcgta gatatatgga agaaccaccag</p> <p>481 tggcgaaggc ggctgtctgg tctgtaactg acgctgaggc tcgaaagtat gggtagcaaa</p> <p>541 caggattaga taccctggta gtccataccg taaacgatga atgctaagtg ttggagggtt</p> <p>601 tccgcccttc agtgetgcag ctaacgcatt aagcattccg cctggggagt acggccgcaa</p> <p>661 ggctgaaact caaaggaatt gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt</p> <p>721 cgaagctacg cgaagaacct taccaggtct tgacatacta tgcaaattta agagattaga</p> <p>781 cgttcccttc ggggacatgg atacaggtgg tgcatggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag</p> <p>841 atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttattat cagttgccag cattaagttg</p> <p>901 ggcactctgg tgagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tgggatgac gtcaaatcat</p> <p>961 catgccctt atgacctggg ctacacacgt gctcacaata gagatggtac</p>
10.	JS058	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	<p>1 atacgttagc cgacctgaga gggtaatcgg ccacattggg actgagacac ggcccaaact</p> <p>61 cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc acaatggacg aaagtctgat ggagcaacgc</p> <p>121 cgcgtgagtg aagaaggttt taggatcgtg aaactctgtt gttggagaaa gaacagggac</p> <p>181 tagagtaact gttagtcctt tgacggatc caaccagaaa gccacggcta actacgtgcc</p> <p>241 agcagccgcg gtaatacgtg ggtggcaagc gttgtcccgg atttattggg cgtaaagcga</p> <p>301 gcgcaggcgg ttttttaagt ctgatgtgaa agccttcggc ttaaccgaag aagtgcatta</p> <p>361 gaaactggga aacttgagtg cagaagagga cagtggaaact ccatgtgtag cgtgaaatg</p> <p>421 cgtagatata tggagaaca ccagtggcga aggcggctgt ctggctgtga actgacgtg</p> <p>481 aggctcgaaa gtatggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccat accgtaaacg</p> <p>541 atgaatgcta agtgttggag ggtttccgcc cttcagtgtc gcagctaacg cattaagcat</p> <p>601 tccgcctggg gactacgacc gcaagggtga aactcaaagg aattgacggg ggcccgca</p> <p>661 agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga acccttacca ggtcttgaca</p> <p>721 tcctttgacc actgtagaga tacagctttc cttcggggga caaagtgaca ggtggtgcat</p> <p>781 ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatggt gggttaagtc cgcacaacgag cgcaaccctt</p> <p>841 atgactagtt gccagcattt agttgggcac tctagtaaga ctgccggtga caaacggag</p> <p>901 gaagggtggg atggaacgtc aaatcagcca tgccccttat</p>
11.	JS070	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	<p>1 cggttggtaa ggtaacggct taccaagaca atgatacgtg gccgacctga gaggtaatc</p> <p>61 ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctccctacggg aggcagcagt agggaatctt</p> <p>121 ccacaatgga cgaagctctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggt ttaggatcgt</p> <p>181 taaaactctg ttggtggaga agaacagga ctagagtaac tgttagtcct ttgacggtat</p> <p>241 ccaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag</p> <p>301 cgttgtccgg atttattggg cgtaaagcga gcgcaggcgg ttttttaagt ctgatgtgaa</p> <p>361 agccttccgg ctaaccgaa gaagtgcatt agaaactggg aaacttgagt gcagaagagg</p> <p>421 acagtggaac tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat atggaagaac accagtggcg</p> <p>481 aaggcggctg tctggtctgt aactgacgtc gaggctcga agtatgggga gcgaacagga</p> <p>541 ttagataccc tggtagtcca taccgtaaac gatgaatgct aagtgttga ggtttccgc</p> <p>601 cttcagtgc tgcagctaac gcattaagca ttccgcctgg ggagtacgac cgcaaggtt</p> <p>661 aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag</p>

			721 caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcctttgacc actgtagaga tacagctttc
			781 ccttcgggga caaagtgaca ggtgggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtagatgtt
			841 gggtaagtc cgcgaacgag cgcaaccctt atgactagt gccagcattt agttggggcac
			901 tctagtaaga ctgccgggtga caaacccggag gaagggtggg atgacgtcaa atcagcatgc
			961 cccttattga cctgggctac acacgtggct cacaatggtc ggttcacacc acgagt
12.	JS075	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	1 cttaccaaga caatgatacg taggccgacc tgagagggta atcggccaca ttgggactga
			61 gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt
			121 ctgatggagc aacgccgctg gagtgaagaa ggttttagga tctgaaaact ctgttgttgg
			181 agaagaacag ggactagagt aactgttagt cctttgacgg tatccaacca gaaagccacg
			241 gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtagggtggc aagcgttgtc cggatttatt
			301 gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagcctt cggcttaacc
			361 gaagaagtgc attagaaact gggaaacttg agtgcagaag aggacagtgg aactccatgt
			421 gtagcgggtga aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg ctgtctggtc
			481 tgtaactgac gctgaggctc gaaagtatgg ggagcgaaca ggattagata ccctggtagt
			541 ccataccgta aacgatgaat gctaagtgtt ggagggtttc cgcccttcag tgctgcagct
			601 aacgcattaa gcattccgcc tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga
			661 cgggggccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta
			721 ccaggtcttg acatcctttg accactgtag aagatacagc tttcccttcg gggacaaagt
			781 gacaggtggg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag aatgttgggt taagtcccgc
			841 aacggagcgc aacccttatg actagttgcc agcatttagt tgggactct agtaagactg
			901 ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaadc aggcattgtg

Źródło: opracowanie własne