

# KULTURY STARTEROWE W PIEKARSTWIE – MOŻLIWOŚĆ ODZWIERCIEDLENIA TRADYCYJNEGO PROCESU FERMENTACJI POPRZECZ Kształtowanie MIKROBIOTA ZAKWASÓW PIEKARSKICH W PRZEMYSŁOWEJ PRODUKCJI PIECZYWA

Katarzyna Piasecka-Jóźwiak<sup>1\*</sup>, Beata Chabłowska<sup>1</sup>, Ilona Stefańska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
im. prof. Waclawa Dąbrowskiego, Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w październiku 2015 r.  
Zaakceptowano w kwietniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Bioróżnorodność mikrobiologiczna zakwasów. 3. Zdolność do rozwoju i adaptacji LAB w różnych typach zakwasów. Współzawodnictwo bakterii wprowadzonych z kulturą starterową z autochtoniczną mikrobiota zakwasów. 4. Niektóre właściwości LAB umożliwiające im konkurencyjną przewagę w ciastach zakwasowych. 5. Mikrobiota zakwasów ze zbóż niechlebowych i pseudozbóż. 6. Dobieranie składu kultur starterowych z autochtonicznych gatunków LAB czy unifikacja w oparciu o gatunki najbardziej rozpowszechnione. 7. Podsumowanie

## Starter cultures for baked goods – the traditional fermentation process by formation of sourdough microbiota in the industrial bread production

**Abstract:** Application of sourdough, an old fermentation technology, in artisanal bakery allows us to obtain bread with specific flavor and texture. In recent years, this technology has been also reintroduced to the industrial practice, especially due to increased consumer demand for natural bread, without technological additives and preservatives, characterized by traditionally aroma and taste. In order to ensure reproducible and constant quality of bread, specific starter cultures containing lactic acid bacteria (LAB) or, optionally, LAB and yeast strains, are used. The paper discusses issues related to the biodiversity of LAB species representing biota of natural sourdoughs obtained from different cereals. It also presents the specific properties of the LAB strains which allow them to colonize and dominate in the sourdough environment. Moreover, in this review we focus on the role of autochthonous bacterial strains in starter cultures. The use of such strains results in better quality of bread, its original sensory properties and allows the industry to avoid the standardization of taste and smell of baked goods.

1. Introduction. 2. Microbial biodiversity of sourdough. 3. The ability of LAB to grow and adapt to different types of sourdough. Competition of bacteria introduced with the starter culture with the autochthonous microbiota of sourdough. 4. Selected properties of LAB giving them a competitive advantage in sourdough. 5. Microbiota of sourdough non-bread cereals and pseudo-cereals. 6. Selection of LAB autochthonous species for the starter cultures (composition) versus the unification based on the most prevalent species. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** bakteryjne kultury starterowe, zakwasy piekarskie

**Key words:** bacterial starter cultures, sourdough

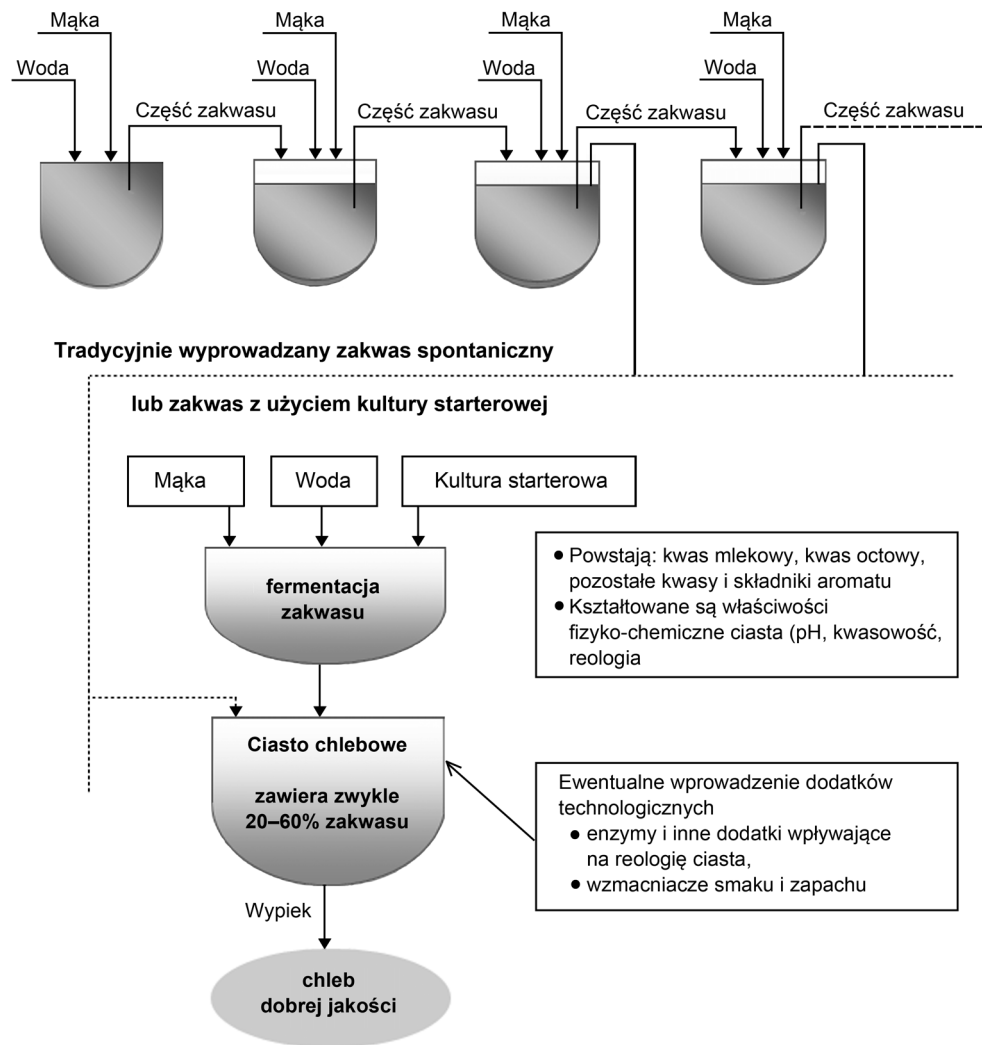
## 1. Wstęp

Kultury starterowe stosowane są powszechnie w przemyśle spożywczym od lat 60. XX wieku. Początkowo celem ich wprowadzania było przede wszystkim podniesienie poziomu higieny i bezpieczeństwa produkcji żywności poprzez inicjowanie fermentacji i opanowanie środowiska przez drobnoustroje zawarte w kulturach. W tamtym okresie drobnoustroje włączane w skład kultur starterowych izolowane były z różnych środowisk i pochodziły w większości z uznanych kolekcji kultur. Za dobre źródło bakterii fermentacji mlekowej (lactic acid bacteria, LAB) uważane były na przykład fermentowane produkty mleczarskie [61, 62].

Mikroorganizmy do kultur starterowych dobierano na podstawie ich poznanych właściwości oraz ustalonych warunków prawidłowego przebiegu procesu produkcyjnego. Taki dobór składu kultur starterowych uznano z czasem za jedną z przyczyn ujednoczenia smaku i utraty tradycyjnych cech organoleptycznych wielu produktów m.in. pieczywa.

W ostatnich latach dominował pogląd, że kultury starterowe powinny zawierać mikroorganizmy charakterystyczne dla mikrobiota danego środowiska np. zakwasów piekarskich, kiszzonek warzywnych, przetworów mlecznych otrzymanych w efekcie spontanicznej fermentacji. Dlatego też środowiska naturalnie fermentowanej żywności (tradycyjnie fermentowanych

\* Autor korespondencyjny: Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa; tel. 22 606 36 56; e-mail: katarzyna.piasecka@ibprs.pl



Rys. 1. Wpływ zastosowania kultury starterowej na skrócenie procesu przygotowania ciasta chlebowego

wyrobów) stały się przedmiotem intensywnych badań mikrobiologicznych mających na celu wykazanie ich bioróżnorodności poprzez izolację i identyfikację możliwie największej liczby drobnoustrojów, które zaczęto włączać w skład kultur starterowych nowej generacji [17]. Kultury starterowe stosowane są nie tylko do zapewnienia stałej i powtarzalnej jakości zakwasów i wypieków, lecz również w celu skrócenia procesu technologicznego w piekarni (rys. 1).

Jednymi z najczęściej badanych środowisk były tradycyjnie prowadzone/rzemieślnicze zakwasy piekarskie, przede wszystkim żytnie i pszenne, w których poszukiwano szczepów bakterii fermentacji mlekowej i drożdży [30]. Pieczywo zakwasowe wytwarzane było tradycyjnie na Północy Europy ze względu na wykorzystywanie w piekarstwie mąki żytniej, natomiast na południu kontynentu proces fermentacji z udziałem LAB stosowano do polepszenia cech technologicznych mąki niskiej jakości, najczęściej pszennej. Pieczywo przygotowywane z udziałem mąki żytniej (w różnych proporcjach do mąki pszennej lub będącej jedynym

surowcem) oraz jęczmiennej jest charakterystyczne dla Europy Środkowej, Wschodniej i Skandynawii. Mąka żytnia stosowana jako surowiec „wymusza” ukwaszenie ciast ponieważ zawiera ona, w stosunku do mąki pszennej, znacznie mniej glutenu, którego obecność powoduje powstawanie pożądanej struktury ciasta pszennego. Proces fermentacji, prowadzonej przez bakterie fermentacji mlekowej, umożliwia powstanie siatki z pentozanów zatrzymującej wodę i dwutlenek węgla oraz pęcznienie skrobi, co w konsekwencji nadaje pieczywu właściwe cechy, takie jak np. porowatość i elastyczność miękiszu. Sposób otrzymywania pieczywa zakwasowego jest bardzo różnorodny w zależności od regionu geograficznego i tradycji kulturowych. Różne rodzaje chlebów i bułek pszennych wypiekanych z ciast ukwaszanych są charakterystyczne dla krajów rejonu Morza Śródziemnego, np. francuskie *pain au levain*, *madre* lub *biga* we Włoszech [10]. Tradycyjne włoskie ciasta *Panettone* lub *Pandoro* są otrzymywane z działem ciasta zakwasowego [40, 52]. We Włoszech zakwas stosowane są w produkcji około 30% pieczywa

w wyniku czego powstaje ponad 200 różnych typów wypieków regionalnych.

W piśmiennictwie istnieją umowne klasyfikacje ciast zakwasowych różniące się w zależności od tego czy są formułowane na potrzeby badań naukowych czy praktyki przemysłowej [10, 27, 44, 82, 87]. W zależności od inicjowania fermentacji ciasta, sposobu i warunków fizycznych prowadzenia procesu fermentacji, zakwasy dzieli się na trzy podstawowe typy. Typ pierwszy to zakwasy prowadzone w sposób tradycyjny, najczęściej poprzez fermentację spontaniczną. Charakteryzują się ciągłym sposobem propagacji, to jest codziennym lub częstszym zaszczepianiem (inokulowaniem) nowej porcji mąki wymieszanej z wodą częścią zakwasu (tzw. zaczątkiem) i powtarzaniem takiego sposobu postępowania przez dłuższy czas, co służy utrzymaniu mikroorganizmów zakwasu w stanie wysokiej aktywności metabolicznej. Proces przebiega w temperaturze od 20°C do 30°C. Zakwasy typu pierwszego wykorzystywane są w produkcji tradycyjnych rodzajów pieczywa: Panaetone, Pugliese, Toscanon, zakwasowy chleb French, pieczywo San Francisco. Zakwasy typu drugiego prowadzone są w temperaturze powyżej 30°C, przy dużej wydajności ciasta w celu otrzymania zakwasu o wysokiej kwasowości i aromacie. Ten typ ciasta wykorzystywany jest najczęściej w produkcji przemysłowej pieczywa. Obecnie w wyprowadzeniu tego typu zakwasu na ogół stosowane są bakteryjne lub bakteryjno-drożdżowe kultury starterowe [86, 90]. Typ trzeci ciast zakwasowych odnosi się do fermentacji rozpoczynanej przez zastosowanie kultury starterowej, a następnie kontynuowanej przez codzienne odświeżanie. Natomiast w produkcji przemysłowej odnosi się do suszonego zakwasu stosowanego jako nośnik smaku i aromatu. W zależności od typu ciasta i sposobu propagacji oraz warunków procesu ustala się specyficzny skład mikrobiota [50, 87, 89, 92].

## 2. Bioróżnorodność mikrobiologiczna zakwasów

Wyniki wieloletnich badań, prowadzonych w różnych krajach, wskazują na związek mikroorganizmów zasiedlających ciasta zakwasowe z regionem geograficznym, gatunkiem zboża, z którego sporządzona jest mąka, rodzajem mąki (całoziarnowa lub oczyszczona), co wiąże się z zawartością popiołu, stopniem jej rozdrobnienia, oraz ze sposobem prowadzenia zakwasów (proporcja mąki i wody czyli wydajność ciasta, temperatura, czas prowadzenie, liczba odnawień zakwasu) [5, 21, 33, 83, 85, 87].

W ekosystemach ciast fermentowanych stwierdzono obecność zróżnicowanych gatunków bakterii fermentacji mlekowej [6, 8, 88]. Największy wpływ na przebieg fermentacji ciast zakwasowych mają, charakterystyczne

dla tych środowisk, LAB hetrofermentywne, w mniejszym stopniu szczepy fakultatywnie heterofermentywne i obligatoryjnie homofermentywne [6, 8, 86]. Spośród ponad sześćdziesięciu gatunków bakterii fermentacji mlekowej, występujących w ciastach zakwasowych, większość należy do rodzaju *Lactobacillus*; w mniejszej liczbie reprezentowane są rodzaje *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* i *Leuconostoc*. Biorąc pod uwagę, że środowisko zakwasów jest specyficzną, złożoną niszą ekologiczną, trudną do odtworzenia przy użyciu podłoży laboratoryjnych, należy założyć, że wiele związanych z tym środowiskiem drobnoustrojów, nie zostało jeszcze poznanych [49, 50]. W zakwasach piekarskich powszechnie stwierdza się obecność takich gatunków, jak *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. sanfranciscensis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. alimentarius*, *L. paralimentarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. amylophilus*, *L. delbruecki*, *L. helveticus*, *L. mindensis*. Wraz z intensyfikacją eksploracji mikrobiota ciast zakwasowych stale powiększa się liczba gatunków *Lactobacillus* spp. wykrywanych w ciastach, wyizolowano także bakterie należące do innych rodzajów jak na przykład *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidililactici*. Gatunkami nietypowymi, rzadziej izolowanymi z zakwasów są *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum* i *Carnobacterium piscicola* [4, 25]. Niektóre spośród bakterii spotykanych w ciastach są szeroko rozpowszechnione w żywności, przede wszystkim produktach fermentowanych; należą do tej grupy *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. amylovorus* [6, 87]. Istnieją także szczepy LAB, które w dotychczasowych badaniach mikrobiologicznych wykryto wyłącznie w środowisku zakwasów np. *L. acidifarinae*, *L. hammesi*, *L. secaliphilus*, *L. zymae*, *L. rosiae* [13]. Ze środowiskiem zakwasów związane są również gatunki *L. pontis*, *L. panis*, *L. paralimentarius*, *L. frumenti*, *L. mindensis*, wyizolowane z ciast pszennych i opisane jako mikroflora autochtoniczna. Spośród bakterii fakultatywnie heterofermentywnych gatunkiem najczęściej spotykanym w zakwasach jest *L. plantarum*, natomiast wśród obligatoryjnie heterofermentywnych wymieniane są szczepy z gatunków *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. sanfranciscensis* oraz należące do gatunków *Weissella cibaria* i *Weissella confusa* [69, 70, 78, 80, 88].

Wprowadzanie do rutynowej praktyki laboratoryjnej technik molekularnych spowodowało reklasyfikację niektórych szczepów LAB izolowanych z ekosystemów zakwasów. Przykładowo, niektóre szczepy przypisane początkowo do gatunku *L. plantarum* zostały obecnie zaliczone do gatunków *L. paraplantarum* lub *L. pentosus* [77].

Spośród szeregu czynników determinujących skład mikrobiota zakwasów jednymi z najważniejszych są surowiec, z którego powstała mąka oraz sposób jej

Tabela I  
Bakterie fermentacji mlekowej związane z ekosystemami zakwasów z mąki ze zbóż chlebowych (pszenica i żyto)  
niechlebowych (jęczmień) i pseudozbóż (gryka)

Rodzaj zboża	Gatunki bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z zakwasów	Piśmiennictwo
Pszenica	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	[22, 38]
	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. brevis</i>	[72]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>Weissella cibaria</i>	[91]
	<i>L. sanfranciscensis</i>	[95, 96]
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1. [32]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farciminis</i>	[23]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>L. lactis</i> subs. <i>lactis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	[7]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i>	[58]
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Carnobacterium divergens</i>	[25]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. hammesi</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. spicheri</i> , <i>L. sakei</i>	[78]
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. rossiae</i> , <i>L. paraalimentarius</i>	[69]
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>P. pentosaceus</i>	[31]
	<i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	[65]
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. graminis</i>	[81]
Żyto	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i>	[34]
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>	[71]
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	[73]
	<i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>W. viridescens</i>	[74]
	<i>L. reuteri</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. amylovorus</i>	[67]
	<i>L. amylovoru</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. reuteri</i>	[55]
Otręby żytnie	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i>	[44]
Jęczmień	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>	[94]
Gryka	<i>L. plantarum</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>Leuconostoc holzapfelii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>P. pentosaceus</i>	[53, 54]

przemiału; od nich bowiem zależy obecność związków mających istotny wpływ na wzrost mikroorganizmów. Należą do nich ilość i rodzaj węglowodanów dostępnych do fermentacji (maltoza, sacharoza, glukoza, fruktoza), obecność aminokwasów, kwasów tłuszczowych, witamin, mikroelementów, a także błonnika pokarmowego,  $\beta$ -glukanu, polifenoli, kwasów fitynowych. Składniki te i enzymatyczna aktywność mąki stymulują aktywność metaboliczną bakterii, co wpływa na ilość syntetyzowanych kwasów (mlekowego i octowego) oraz związków tworzących aromat ciast i pieczywa [28, 33, 68, 90].

Przykłady LAB związanych ze środowiskiem zakwasów z różnych mąk przedstawiono w tabeli I. Najwięcej uwagi poświęcono zakwasom z żyta i pszenicy, będących podstawowymi zbożami chlebowymi. W tabeli uwzględniono również bakterie związane z ekosystemami zbóż niechlebowych i pseudozbóż, gdyż obecnie zaczynają one odgrywać coraz większą rolę w pro-

dukcji pieczywa. Wynika to z trendów związanych z tzw. zdrowym żywieniem i wzrastającym zapotrzebowaniem na żywność funkcjonalną, ekologiczną, a także bezglutenową.

Szeroko opisanym obligatoryjnie heterofermentatywnym gatunkiem autochtonicznym dla zakwasów, zwłaszcza pszennych, jest *L. sanfranciscensis*. Bakterie te zostały po raz pierwszy scharakteryzowane i opisane jako *L. sanfrancisco* w 1971 roku przez Kline i Sugihara [38]. Na podstawie badań materiału genetycznego zidentyfikowano w tym gatunku około 50 szczepów [2, 36, 84]. Jak dotychczas jest to gatunek izolowany wyłącznie z zakwasów i uważany za najlepiej zaadaptowany do specyficznych warunków ciast zakwasowych i konkurencyjny wobec innych LAB [22, 84]. Decydują o tym unikatowe cechy *L. sanfranciscensis*, wyrażające się wysoką efektywnością wykorzystywania znajdujących się w środowisku ciasta węglowodanów: maltozy

i fruktozy, a także rybozy i glukonianu, wysokimi uzołnieniami proteolitycznymi i aktywnością kwaszącą, syntezą związków o charakterze antymikrobiologicznym, bogactwem uwalnianych prekursorów związków lotnych, a także fizjologicznym powinowactwem do drożdży obecnych w zakwasach.

*L. sanfranciscensis* jest auksotrofem w odniesieniu do 12 aminokwasów, natomiast wykazuje zdolność do syntezy m.in. argininy, lizyny, cysteiny, asparagianinu. Obecność dwóch genów dla oligo-1,6-glukozydazy (LSA\_05810; LSA\_01770) wskazuje na zdolność do hydrolizy wiązania  $\alpha$ -1,6-D-glukozydowego oligosacharydów powstających ze skrobi i glikogenu (izomaltoza, izomaltotrioza, izomaltuloza, panoza). Wzrost *L. sanfranciscensis*, przy wykorzystaniu maltozy jako źródła węgla, przebiega szybciej przy obecności w środowisku takich związków jak fruktoza, cytrynian lub  $\alpha$ -ketoglutaran, które mogą stanowić alternatywne akceptory elektronów [84,90].

Poza bakteriami fermentacji mlekowej drugą ważną grupę drobnoustrojów tworzących ekosystem ciast zakwasowych stanowią drożdże. Wchodzą one w różnego rodzaju interakcje z bakteriami i współkształtującą właściwości zakwasów piekarskich i ciast. Wzajemne oddziaływania określonych gatunków LAB i drożdży mają duży wpływ na skład ekosystemów i dominację określonych gatunków w zależności od sposobu prowadzenia ciast. W przypadku zakwasów pszennych fermentujących spontanicznie obecność i wzrost *L. sanfranciscensis*, preferującego jako źródło energii maltozę, stwarza korzystne warunki do rozwoju nie metabolizujących maltozy drożdży *Saccharomyces exiguus* i *Candida humilis*. W efekcie hydrolizy maltozy z udziałem konstytutywnej, wewnątrzkomórkowej fosforylasy maltozy *L. sanfranciscensis* uwalniana jest do środowiska glukoza, co dostarcza substratu do wzrostu tych drożdży, nadając wzajemnym relacjom drobnoustrojów charakter związku mutualistycznego [2, 85]. W ekosystemach ciast zakwasowych powstają stabilne konsorcja LAB i drożdży, w których interakcje pomiędzy drobnoustrojami są zależne od szeregu czynników, jak na przykład temperatury i czasu prowadzenia fermentacji, rodzaju mąki i wydajności ciasta. W tworzeniu takich związków w zakwasach pszennych poza *L. sanfranciscensis* biorą udział szczepy z gatunku *L. plantarum* [45], natomiast w zakwasach żytnich występują stabilne związki pomiędzy *L. reuteri*, *L. johnsonii* a *Issachienkia orientalia*. Zdolność do tworzenia związków bakteryjno-drożdżowych ma charakter szczepowy, a nie gatunkowy [47, 49, 50, 70, 85].

W ciastach zakwasowych zidentyfikowano ponad 20 gatunków drożdży, w większości należących do rodzajów *Saccharomyces* i *Candida* [63]. W nowszych publikacjach jako częsty izololat wymieniany jest gatunek *Issatchienkia orientalis*, będący teleomorfem *Candida*

*krusei*. Gatunkiem najczęściej izolowanym z zakwasów żytnich, dobrze adaptującym się do tego środowiska jest *S. cerevisiae* [3, 16, 45]. Badania zakwasów żytnich pochodzących z rzemieślniczych piekarni, działających w różnych regionach Polski, wykazały powszechną obecność drożdży *S. cerevisiae* [4]. Każda z grup drobnoustrojów, aktywnych w procesie fermentacji, spełnia określone zadanie i dopiero suma ich oddziaływań pozwala uzyskać dojrzały zakwas, a następnie pieczywo o odpowiednich właściwościach. Niniejsze rozważania uwzględniają rolę drożdży w kształtowaniu cech zakwasów piekarskich jedynie w odniesieniu do ich specyficznych relacji z bakteriami fermentacji mlekowej. W celu zapewnienia powtarzalnej i pożądanej jakości zakwasów i pieczywa stosowane są kultury starterowe zarówno bakteryjno-drożdżowe jak i bakteryjne, zawierające jeden lub więcej szczepów LAB. W skład bakteryjno-drożdżowych starterów piekarskich włączane są *S. cerevisiae* i *S. exiguus* oraz drożdże z rodzaju *Candida* i *Torulopsis*, które biorą udział w kształtowaniu cech smakowo-zapachowych pieczywa [24, 28, 29, 44, 56, 59]. W miarę postępu badań nad drobnoustrojami zakwasów piekarskich opracowywane są również nowe kultury starterowe o specyficznych zastosowaniach.

### 3. Zdolność do rozwoju i adaptacji LAB w różnych typach zakwasów. Niektóre właściwości LAB umożliwiające im konkurencyjną przewagę w ciastach zakwasowych

Na kształtowanie się i stabilność mikrobiologicznych ekosystemów zakwasów istotny wpływ mają warunki w jakich prowadzona jest fermentacja, głównie temperatura, a także wartość pH i potencjał oksydo-redukcyjny [44]. Przykładowo związek bakterii *L. sanfranciscensis* i drożdży *Candida humilis* utrzymuje się trwale w zakwasach pszennych i żytnich w temperaturze pomiędzy 20°C a 30°C, przy odświeżaniu co 12–24 godziny, gdy zakwas poprzedniej fazy stanowi 5–20% kolejnej fazy ciasta [83]. Wykazano również, że *L. sanfranciscensis* nie rośnie przy wartościach pH niższych niż 3,8–4,0 [80]. Z kolei konsorcjum *L. reuteri*, *L. johnsonii* i *I. orientalis* utrzymuje się w zakwasach pszennych i żytnich dopóki ich temperatura pozostaje w zakresie 35–40°C, przy czym drożdże *I. orientalis* wymagają do wzrostu odpowiedniej ilości tlenu, dlatego ich rozwojowi sprzyja obecność w zakwasie otrąb, zwiększających porowatość ciasta [85]. Jak już wspomniano, interakcje pomiędzy drożdżami a bakteriami w zakwasach mogą mieć charakter szczepowy, a nie gatunkowy [59]. Obecność w zakwasach pszennych drożdży *S. cerevisiae* i bakterii *L. sanfranciscensis*, *L. paralimentarius*, *L. brevis* oraz w mniejszej liczbie *P. pentosaceus* i *W. cibaria* może powodować wolniej-

szy wzrost obydwu grup drobnoustrojów (ze względu na antagonizm o źródło węgla) oraz zwiększenie przez bakterie syntezy niektórych metabolitów mogących hamować wzrost drożdży np. mannitolu [59]. Sygnalizowano również możliwość negatywnego oddziaływania *L. paralimentarius* na wzrost *L. sanfranciscensis* [57].

Ewolucyjne przystosowania metaboliczne bakterii fermentacji mlekowej pozwalają im między innymi na adaptację do środowiska ciasta, a ich metabolity przyczyniają się do kształtowania właściwości reologicznych i organoleptycznych ciasta oraz jakości sensorycznej pieczywa. Związane jest to z możliwością wykorzystywania przez LAB różnych źródeł węgla i akceptorów elektronów, a także przekształcaniem aminokwasów w związki tworzące aromat pieczywa.

W wyniku fermentacji heksoz przez homofermentywne LAB szlakiem EMP (poprzez glikolizę) powstaje kwas mlekowy, podczas gdy fermentacja glukozy szlakiem fosfoketolazy pentozowej przez bakterie heterofermentywne prowadzi do powstawania, oprócz kwasu mlekowego, kwasu octowego, CO<sub>2</sub> i etanolu, w zależności od dostępności kosubstratów pozwalających na regenerację zredukowanych kofaktorów. Biorąc pod uwagę zapotrzebowanie na regenerację zredukowanych kofaktorów, homofermentywne i heterofermentywne LAB z rodzaju *Lactobacillus* wykazują różny wpływ na reakcje redox (potencjał oksydoredukcyjny) w ciastach [17, 18]. Disacharydy są rozkładane przy udziale specyficznych hydrolaz i fosfhydrolaz do monosacharydów.

Przewaga konkurencyjna heterofermentywnych bakterii fermentacji mlekowej w ciastach zakwasowych jest związana z ich łączną zdolnością do wykorzystania maltozy jako źródła węgla oraz kosubstratów takich jak tlen i fruktoza jako akceptorów elektronów, co jest sprzężone ze zwiększoną syntezą kwasu octowego [8, 60]. Tlen i fruktoza są redukowane odpowiednio do H<sub>2</sub>O i mannitolu, czemu towarzyszy utlenianie NADH, NADPH do odpowiednio NAD i NADP.

Większość szczepów *L. sanfranciscensis* fermentuje glukozę i maltozę, ale nie jest zdolna do wykorzystywania fruktozy jako źródła węgla. Szczepy te jednak wykazują aktywność dehydrogenazy mannitolu i redukują fruktozę do mannitolu z wysoką specyficznością [39]. Preferencyjne zużywanie fruktozy jako akceptora elektronów jest obserwowane w przypadku większości obligatoryjnie heterofermentatywnych pałeczek *Lactobacillus* spp.

Obligatoryjnie homofermentatywne i fakultatywnie heterofermentatywne laktobacillusy degradują maltozę i fruktozę po wyczerpaniu dostępnej w środowisku glukozy [20]. Fermentacja pentoz przez obligatoryjnie i fakultatywnie heterofermentatywne LAB prowadzona jest szlakiem fosfoketolazy pentozanowej. Stwierdzono, że heterofermentatywne bakterie *L. brevis*, *L. fermentum* i *Lactobacillus hilgardii* podczas wzrostu w zakwa-

sach charakteryzują się symultanicznym metabolizmem maltozy i pentoz [20].

Akumulacja tioli przez *L. reuteri* i *L. sanfranciscensis* chroni komórki bakteryjne przed stresem oksydacyjnym. Tirole podlegają następnie reakcjom wymiany z mostkami dwusiarczkowymi w białkach i w ten sposób zakłócają polimeryzację białek glutenowych w ciastach pszennych. Technologiczną konsekwencją tego procesu jest zwiększenie rozpuszczalności białek glutenowych, co w efekcie zmienia reologię ciast i ułatwia proteolityczny rozkład protein mąki [17]. Degradacja białek zbożowych podczas fermentacji zakwasów ma zasadniczy wpływ na zapach pieczywa, a także jego teksturę i objętość [19].

Większość zakwasowych LAB nie wykazuje związanej ze ścianą komórkową aktywności proteolitycznej, choć niektórzy autorzy wskazują na zdolność nielicznych szczepów do hydrolizy frakcji białek glutenowych tj. albumin, globulin i gliadyn [12, 14, 97]. W celu zaspokojenia zapotrzebowania na związki azotowe bakterie fermentacji mlekowej używają głównie peptydy hydrolizowane w większości przez wewnątrzkomórkowe peptydazy [20]. Metabolizm aminokwasów przez LAB przyczynia się do powstawania związków zapachowych, a zatem kształtowania się aromatu ciast zakwasowych i pieczywa. Przykładowo ornityna, jest prekursorem powstającej podczas pieczenia 2-acetyl-1-pyrroliny, kształtującej zapach skórki pieczywa. Szczepy LAB np. *L. amylolyticus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. frumenti*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. sakei* i niektóre szczepy *L. sanfranciscensis* konwertują (przekształcają) ornitynę do argininy poprzez szlak deiminazy argininy – ADI (arginine deiminase pathway). Szlak ten przyczynia się do homeostazy pH i tolerancji bakterii fermentacji mlekowej na kwasy.

#### 4. Mikrobiota zakwasów ze zbóż niechlebowych i pseudozbóż

W ostatnich latach poświęca się coraz więcej uwagi badaniom ekosystemów zakwasów otrzymanych ze zbóż niechlebowych (owies, jęczmień), prosa, ze starych odmian pszenicy (samopsza, płaskurka, orkisz), z pseudo zbóż (gryka, quinoa) i innych roślin nie wykorzystywanych dotychczas w Europie do produkcji pieczywa jak cassawa, amarantus [89]. Obecne zainteresowanie tymi surowcami wynika z bogactwa zawartych w nich składników odżywczych i prozdrowotnych, ponadto większość z nich nie zawiera glutenu.

Zakwasy przygotowane z mąki otrzymanej z takich surowców stanowią specyficzne nisze ekologiczne. Badania ich bioróżnorodności wykazały obecność gatunków bakterii, znanych ze środowisk zakwasów pszennych i żytnich, często jednak dominują w tych

środowiskach gatunki specyficznie do nich przystosowane. Przykładem jest występowanie i utrzymywanie się *L. brevis* w zakwasach jęczmiennych, co jest związane ze zdolnością tego gatunku do degradowania  $\beta$ -glukanu zbożowego, obecnego w jęczmieniu w stosunkowo dużych ilościach [43, 94]. *L. plantarum* jest gatunkiem powszechnie występującym w zakwasach niezależnie od rodzaju mąki, z której zostały sporządzone. Jest to związane z jego zdolnością do wykorzystywania różnych węglowodanów [37, 47, 51] oraz do syntezy większości aminokwasów. Opisano na przykład szczep *L. plantarum* będący auksotrofem w odniesieniu tylko do 3 aminokwasów [84]. Obecność szczepów z gatunku *L. plantarum* wykazywana jest również w naturalnie fermentujących, tradycyjnych produktach z prosa, kukurydzy, amarantusa, orkisz. W zakwasach z gryki, fermentujących przy udziale autochtonicznej bioty LAB, stwierdzono obecność gatunków z rodzajów *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici* i *Weissella cibaria* [54, 56]. Różnorodność gatunków LAB wchodzących w skład mikrobiota zakwasów z gryki zależy od warunków prowadzenia procesu. Na przykład przy prowadzeniu zakwasu gryczanego w temperaturze 35°C, wydajności ciasta 275 i odświeżaniu co 24 godziny, po 2–5 dni fermentacji stwierdzono przede wszystkim obecność *L. plantarum*, zanikały natomiast obecne na początku fermentacji szczepy z gatunków *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. crispatus*, *L. vaginalis*, *Leuconostoc holzapfelii*. Z kolei przy fermentacji w 25°C, wydajności ciasta 200 i przeszczepianiu co 12 h dominowały *P. pentosaceus* i *L. amylovorus*; wykazano także obecność *L. plantarum*, *W. cibaria*, *L. holzapfelii*, *L. sakei* [53].

##### **5. Komponowanie składu kultur starterowych z autochtonicznych gatunków LAB czy unifikacja w oparciu o gatunki najbardziej rozpowszechnione**

W piśmiennictwie przeważał w ostatnich latach pogląd, że w kulturach starterowych do zakwasów piekarskich powinny być wykorzystywane autochtoniczne szczepy bakterii fermentacji mlekowej, które są lepiej przystosowane do specyficznych warunków panujących w ekosystemie ciast i dostępnych w nich substratów. Jest to związane z coraz większym zainteresowaniem zastosowaniem nietypowych dla piekarstwa surowców, w tym mąk bezglutenowych [14]. Jakość pieczywa otrzymanego z takich mąk może ulec znacznej poprawie przy wykorzystaniu technologii opartej na zakwasach [11, 26]. Wprowadzenie do badań bioróżnorodności zakwasów piekarskich technik umożliwiających monitorowanie dynamiki zmian składu populacji mikroorganizmów podczas prowadzenia fermentacji – jak PCR-DGGE (PCR i elektroforeza

we wzrastającym stężeniu czynnika denaturującego) pozwoliło na wykazanie zdolności bakterii i drożdży do adaptacji i opanowania środowiska, a także zdominowania mikrobiota zakwasów [44, 45, 47, 53, 54, 57, 86].

W komercyjnych kulturach starterowych najpowszechniej stosowanymi szczepami bakterii są *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* oraz *L. reuteri*, *L. pontis*. W aktualnych publikacjach i patentach proponowane są dla piekarstwa kultury starterowe o specyficznych właściwościach, np. zapewniające wydłużenie czasu przydatności pieczywa do spożycia dzięki zastosowaniu szczepów bakterii wykazujących zdolność do syntezy kwasu propionowego lub aktywność przeciwplesniową [9, 15, 48, 79]. W kulturach starterowych do pieczywa pszennego mogą znaleźć zastosowanie szczepy LAB syntetyzujące egzopolisacharydy, które wpływają korzystnie na właściwości reologiczne ciast i sprzyjają powstawaniu właściwej tekstury pieczywa [35, 75, 76, 93]. Dominacji określonych szczepów LAB w zakwasach sprzyja także zdolność do syntezy bakteriocyn jak w przypadku *L. reuteri*. Pomimo tej właściwości *L. reuteri* zastosowany jako składnik kultury starterowej nie utrzymuje się w zakwasach z gryki [55].

W zakwasach żytnich, po wielokrotnych przeszczepieniach, obecność szczepów bakterii, wprowadzonych z kulturą starterową, stwierdzano najczęściej w przypadku gatunków *L. sanfranciscensis*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* a także *L. pontis*, *L. panis*, *L. frumenti*, *L. fermentum*, *L. crispatus*. Przy czym głównym czynnikiem selekcyjnym była temperatura prowadzenia zakwasów; niektóre szczepy bakterii rosły lepiej poniżej 30°C inne powyżej tej temperatury [45]. W odniesieniu do ekosystemów ciast pszennych wykazano stabilność starterów złożonych z *L. sanfranciscensis* lub *L. plantarum*, przy czym niektóre szczepy zasiedlały ekosystem zakwasów wspólnie ze szczepami autochtonicznymi gatunków *P. pentosaceus*, *L. rosiae* [47].

Konkurencja środowiskowa pomiędzy szczepami LAB wprowadzonymi z kulturą starterową a autochtoniczną biotą bakteryjną zakwasów prowadzić może do eliminacji LAB pochodzących z kultury starterowej [54, 86, 94]. Specyfikę zakwasów z różnych surowców jako zróżnicowanych nisz ekologicznych do zasiedlania przez bakterie z kultur starterowych potwierdziły badania, w których porównano skład bioty LAB w zakwasach pszennych i z udziałem mąki jęczmiennej [94]. Spośród 19 szczepów reprezentujących 10 gatunków bakterii, wchodzących w skład kultur starterowych, zastosowanych do wszystkich zakwasów, w zakwasach pszennych, po dwumiesięcznym prowadzeniu zakwasów dominowały bakterie z gatunku *L. plantarum*. Natomiast w analogicznie przygotowanych zakwasach jęczmienno-pszennych i jęczmiennych, poza *L. plantarum*, utrzymywała się większa liczba gatunków w tym *L. paralimentarius* (w mieszanym) i *L. brevis*; nieocze-

kiwanie w żadnym zakwasie nie wykryto obecności *L. sanfranciscensis*, pomimo wprowadzenia 3 szczepów tego gatunku w kulturach starterowych [94].

W przypadku gdy jako składniki kultur starterowych do fermentacji takich surowców jak: gryka, quinoa, amarantus, proso, kukurydza i ryż stosowano autochtoniczne szczepy LAB z gatunków *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. paralimentarius*, *L. pontis*, skład mikrobiota tych zakwasów pozostawał stabilny pomimo wielokrotnego przeszczepiania [86]. W ostatnio przeprowadzonych badaniach wykazano przydatność wybranych szczepów *L. plantarum* do prowadzenia zakwasów pszennych. Szczepy te dominowały lub razem z *L. sanfranciscensis* współdominowały w środowisku tych zakwasów [81]. Zapewnia to uzyskanie zakwasów (i ciast) o dobrych parametrach technologicznych. Potwierdzono jednocześnie, że szczepy autochtoniczne łatwiej uzyskują przewagę w środowisku, zatem ich pochodzenie jest istotne przy komponowaniu składu kultur [81].

Badania wskazują, że z punktu widzenia produkcji pieczywa w ciągłym systemie przemysłowym uniwersalne powinno być wykorzystywanie kultur starterowych zawierających szczepy *Lactobacillus plantarum*, ponieważ ten gatunek jest nie tylko szeroko rozpowszechniony w zakwasach, ale również wykazuje zdolność do dominacji w ekosystemie.

Większość badań dotyczących dominacji *L. plantarum* przeprowadzono jednak w ciastach pszennych. W zakwasach z mąk niechlebowych i pseudozbóż występują w większej liczbie składniki mogące wpływać na wzrost bakterii, takie jak np. związki mineralne, błonnik, polifenole. Zatem przy projektowaniu starterów do pieczywa należy uwzględnić różne gatunki i szczepy LAB w zależności od przeznaczenia kultury starterowej. Biorąc pod uwagę jakość otrzymanego pieczywa pszenne wykazano, że zastosowanie kultur starterowych zawierających szczepy *L. plantarum* lub *Leuconostoc* spp. w przemysłowym procesie produkcji pieczywa pszenne pozwala osiągnąć odpowiednie parametry technologiczne ciasta (kwasowość, pH, zawartość kwasu mlekowego i octowego) jeżeli fermentacja jest prowadzona przez około 20 godzin i każdorazowo proces jest powtarzany od początku, tj. od inokulacji mąki i wody przy użyciu startera [66]. W takim systemie produkcji nie jest konieczne uzyskanie stabilnego konsorcjum mikroorganizmów zakwasu w długim czasie, nie ma też zagrożenia, że mikroorganizmy startera zostaną zdominowane przez drobnoustroje autochtoniczne. Zapewniona jest natomiast powtarzalna jakość zakwasu i ciasta. Mimo wielokrotnego potwierdzenia, że zastosowanie *L. plantarum* wpływa pozytywnie na cechy zakwasów i otrzymanego pieczywa, stosowanie jednoskładnikowej kultury starterowej może jednak prowadzić do zubożenia cech smakowo-zapa-

chowych pieczywa i jego ujednolicenia [33]. Zakwasy otrzymywane przy użyciu kilku gatunków i szczepów LAB różnią się nie tylko pod względem zawartości kwasów organicznych lecz także związków tworzących aromat czy też egzopolisacharydów istotnych w kształtowaniu tekstury pieczywa. Skład kultur starterowych można zatem dobrać, uwzględniając np. różnorodność szczepów gatunków *Weissella* spp., *Pediococcus* spp. i innych [1] uzyskując unikalne, charakterystyczne dla wyrobu i piekarni cechy sensoryczne pieczywa.

## 6. Podsumowanie

W przemysłowej produkcji pieczywa kultury starterowe są powszechnie stosowane w celu uzyskiwania pieczywa dobrej jakości. Wprowadzanie zróżnicowanych kultur starterowych jest w zgodzie z aktualnym trendem konsumenckim polegającym na powrocie do tradycyjnych metod produkcji żywności, gdyż zastępuje lub ogranicza używanie technologicznych dodatków piekarskich (np. polepszacze, enzymy, kwasy). Różnorodność bakterii fermentacji mlekowej, zasiedlających specyficzne nisze ekologiczne zakwasów, sięga około 60 gatunków przy czym szczególnie rozpowszechnione są heterofermentatywne LAB z rodzaju *Lactobacillus*. Do kultur starterowych dla piekarstwa selekcionowane są szczepy bakterii charakteryzujące się zdolnością do szybkiego zakwaszania środowiska ciasta, syntezy związków kształtujących aromat pieczywa, wpływających pozytywnie na właściwości reologiczne ciast i teksturę pieczywa, a także jednoczesną zdolnością do szybkiego opanowywania i zasiedlania środowiska zakwasów. Różnicowanie składu kultur starterowych jest również jednym ze sposobów przeciwdziałania ujednoliceniu smaku pieczywa [64]. Obecnie, poszukuje się również szczepów syntetyzujących związki o charakterze antypleśniowym co pozwala na wydłużenie trwałości pieczywa [41, 42]. Wzrastająca popularność pieczywa z udziałem mąk innych niż tradycyjnie stosowane pszena i żytnia (tzw. mąki niechlebowe i pseudozbóż) wymaga dostosowania technologii oraz składu kultur starterowych do tych surowców. W takich kulturach starterowych najlepiej sprawdzają się szczepy bakterii wywodzące się z ekosystemów tych środowisk.

## Piśmiennictwo

1. Alfonzo A., Ventimiglia G., Corona O., Di Gerlando R., Gaglio R., Francesca N., Settanni L.: Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiol.* **36**, 343–354 (2013)
2. De Angelis M., Di Cagno R., Gallo G., Curci M., Siragusa S., Crecchio C., Parente E., Gobbetti M.: Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 69–82 (2007)



3. Brandt M.J., Hammes W.P., Gänzle M.G.: Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* **218**, 333–338 (2004)
4. Chabłowska B., Piasecka-Jóźwiak K., Szkudzińska-Rzeszowski E., Kliszcz M., Rozmierska J., Stecka K.: Charakterystyka mikroflory naturalnie fermentujących zakwasów piekarskich pochodzących z różnych regionów polskich. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.* **62**, 31–40 (2007)
5. Coda R., Di Cagno R., Gobbetti M., Rizzello C. G.: Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiol. Lett.* **37**, 51–58 (2014)
6. Corsetti A., De Angelis M., Dellaglio F., Paparella A., Fox P.F., Settanni L., Gobbetti M.: Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 641–654 (2003)
7. Corsetti A., Lavermicocca P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N., Gobbetti M.: Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 95–104 (2001)
8. Corsetti A., Settanni L.: Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* **40**, 539–558 (2007)
9. Dal Bello E., Clarke C.I., Ryan L.A.M., Ulmer H., Schober T.J., Strom K., Sjorgren J., Van Sinderen D., Schnurer J. and Arendt E.K.: Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.* **45**, 309–318 (2007)
10. Decock P., Capelle S.: Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 113–120 (2005)
11. Di Cagno R., De Angelis M., Corsetti A., Lavermicocca P., Arnault P., Tossut P., Gobbetti M.: Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiol.* **20**, 67–75 (2003)
12. Di Cagno R., De Angelis M., Lavermicocca P., De Vincenzi M., Giovannini C., Faccia M., Gobbetti M.: Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 623–633 (2002)
13. Di Cagno R., De Angelis M., Gallo G., Settanni L., Berloco M.G., Siragusa S., Gobbetti M.: Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* strains isolated from sourdough. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 821–835 (2007)
14. Di Cagno R., Rizzello C.G., De Angelis M., Cassone A., Giuliani G., Benedusi A., Gobbetti M.: Use of selected sourdough strains of *Lactobacillus* for removing gluten and enhancing the nutritional properties of gluten-free bread. *J. Food Protect.* **71**, 1491–1495 (2008)
15. Garofalo C., Zannini E., Aquilanti L., Silvestri G., Fierro O., Picariello G., Clementi F.: Selection of sourdough lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 7719–7728 (2012)
16. Gatto V., Torriani S.: Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Ann. Microbiol.* **54**, 31–42 (2004)
17. Gänzle M.G.: From gene to function: metabolic traits of starter cultures for improved quality of cereal foods. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 29–36. (2009)
18. Gänzle M.G.: Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* **2**, 106–117. (2015)
19. Gänzle M.G., Loponen J., Gobbetti M.: Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci. Tech.* **19**, 513–521 (2008)
20. Gänzle M.G., Vermeulen N., Vogel R.F.: Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* **24**, 128–138 (2007)
21. Gobbetti M., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R.: Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 57–69 (2005)
22. Gobbetti M., Corsetti A.: *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiol.* **14**, 175–187 (1997)
23. Gobbetti M., Corsetti A., Rossi, J. La Rosa F., De Vincenzi S.: Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy. *Ital. J. Food Sci.* **6**, 85–94 (1994)
24. Gullo M., Romano A.D., Pulvirenti A., Giudici P.: *Candida humilis*-dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 55–59 (2003).
25. Gül H., Özçelik S., Sağdıç O., Certel M.: Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochem.* **40**, 691–697 (2005)
26. Hammes W.P., Brandt M.J., Francis K.L., Rosenheim J., Seitter M.F., Vogelmann S.A.: Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 4–11 (2005)
27. Hammes W.P., Gänzle M.G.: Sourdough breads and related products (w) Microbiology of fermented foods. Springer, US, 1997, s. 199–216
28. Hansen Å., Hansen B.: Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Z. Lebensm. Unters. F.A.*, **202**, 244–249 (1996)
29. Hansen A., Schieberle P.: Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 85–94 (2005)
30. Huys G., Daniel H.M., De Vuyst L.: Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria (w) Handbook on Sourdough Biotechnology, red. Gobetti M., Gänzle M., Springer US, 2013, s. 105–154
31. Iacumin L., Cecchini F., Manzano M., Osualdini M., Boscolo D., Orlic S., Comi G.: Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol.* **26**, 128–135 (2009)
32. Infantes M., Tourneur C.: Etude de la flore lactique de levains naturels de panification provenant de différentes régions françaises. *Sci. Alim.* **11**, 527–545 (1991)
33. Katina K., Heiniö R.L., Autio K., Poutanen K.: Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT-Food Sci. Technol.* **39**, 1189–1202 (2006).
34. Kazanskaya L., Afanasyeva O., Patt V.: Microflora of rye sours and some specific features of its accumulation in bread baking plants of the USSR (w) Developments in food science, Progress in cereal chemistry and technology, 5B, red. Holas J., Kratochvil F. Elsevier, London, 1983, s. 759–763
35. Ketabi A., Soleimani-Zad S., Kadivar M., Sheikh-Zeinodin M.: Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. *Food Res. Int.* **41**, 948–951 (2008)
36. Kitahara M., Sakata S., Benno Y.: Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from five sourdoughs. *Let. Appl. Microbiol.* **40**, 353–357 (2006)
37. Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Siezen R.J.: Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1990–1995 (2003)
38. Kline L., Sugihara T.F.: Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl. Microbiol.* **21**, 459–465 (1971)

39. Korakli M., Vogel R.F.: Purification and characterisation of manitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 281–286 (2003)
40. Lattanzi A., Minervini F., Di Cagno R., Diviccaro A., Antonielli L., Cardinali G., Gobbetti M.: The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. *Int. J. Food Microbiol.* **163**, 71–79 (2013)
41. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M.: Purification and characterization of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4084–4090 (2000)
42. Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J.: Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 129–135 (2003)
43. Marklinder I., Johansson L.: Sour dough fermentation of barley flours with varied content of mixed-linked (1→3), (1→4)  $\beta$ -D-glucans. *Food Microbiol.* **12**, 363–371 (1995)
44. Meroth C.B., Hammes W.P., Hertel C.: Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7453–7461 (2003a)
45. Meroth C.B., Walter J., Hertel C., Brandt M.J., Hammes W.P.: Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 475–482 (2003b)
46. Minervini F., De Angelis M., Di Cagno R., Gobbetti M.: Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int. J. Food Microbiol.* **171**, 136–146 (2014)
47. Minervini F., De Angelis M., Di Cagno R., Pinto D., Siragusa S., Rizzello C.G., Gobbetti M.: Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiol.* **27**, 897–908 (2010a)
48. Minervini F., De Angelis M., Surico R.F., Di Cagno R., Gänzle M., Gobbetti M.: Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, 130–135 (2010b)
49. Minervini F., Di Cagno R., Lattanzi A., De Angelis M., Antonielli L., Cardinali G., Gobbetti M.: Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1251–1264 (2012a)
50. Minervini F., Lattanzi A., De Angelis M., Di Cagno R., Gobbetti M.: Influence of artisan bakery- or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5328–5340 (2012b)
51. Molenaar D., Bringel F., Schuren F.H., De Vos W.M., Siezen R.J., Kleerebezem M.: Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *J. Bacteriol.* **187**, 6119–6127 (2005)
52. Montanari C., Bargossi E., Lanciotti R., Chinnici F., Gardini F., Tabanelli G.: Effects of two different sourdoughs on the characteristics of Pandoro, a typical Italian sweet leavened baked good. *LWT-Food Sci. Technol.* **59**, 289–299 (2014)
53. Moroni A.V., Arendt E.K., Dal Bello F.: Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiol.* **28**, 497–502 (2011)
54. Moroni A.V., Arendt E.K., Morrissey J.P., Dal Bello F.: Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. *Int. J. Food Microbiol.* **142**, 142–148 (2010)
55. Müller M.R.A., Wolfrum G., Stolz P., Ehrmann M.A., Vogel R.F.: Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. *Food Microbiol.* **18**, 217–227 (2001)
56. Oura E., Soumalainen H., Viskari R.: Breadmaking (w) Economic Microbiology. Vol. 7. Red. Rose A.H., Academic Press, New York, 1982, s. 87–146
57. Paramithiotis S., Chouliaras Y., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G.: Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochem.* **40**, 2813–2819 (2005)
58. Paramithiotis S., Tsiasiotou S., Drosinos E.: Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 883–8 (2010)
59. Paramithiotis S., Gioulatos S., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G.: Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem.* **41**, 2429–2433 (2006)
60. Paramithiotis S., Sofou A., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G.: Flour carbohydrate catabolism and metabolite production by sourdough lactic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1417–1423 (2007).
61. Plessas S., Pherson L., Bekatorou A., Nigam P., Koutinas A.A.: Bread making using kefir grains as baker's yeast. *Food Chem.* **93**, 585–589 (2005)
62. Plessas S., Alexopoulos A., Mantzourani I., Koutinas A., Voidarou C., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E.: Application of novel starter cultures for sourdough bread production. *Anaerobe*, **17**, 486–489 (2011)
63. Pulvirenti A., Solieri L., Gullo M., De Vero L., Giudici P.: Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Let. Appl. Microbiol.* **38**, 113–117 (2004)
64. Ravyts F., De Vuyst L.: Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough. *Food Microbiol.* **28**, 1129–1139 (2011)
65. Reale A., Di Renzo T., Succi M., Tremonte P., Coppola R., Sorrentino E.: Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 237–244 (2011)
66. Robert H., Gabriel V., Lefebvre D., Rabier P., Vayssier Y., Fontagné-Faucher C.: Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT-Food Sci. Technol.* **39**, 256–265 (2006)
67. Rosenquist H., Hansen Å.: The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiol.* **17**, 241–250 (2000)
68. Salim-ur-Rehman, Paterson A., Piggott J.R.: Flavour in sourdough breads: a review. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 557–566 (2006)
69. Settanni L., Valmorri S., van Sinderen D., Suzzi G., Paparella A., Corsetti A.: Combination of multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3793–3796 (2006)
70. Siragusa S., Di Cagno R., Ercolini D., Minervini F., Gobbetti M., De Angelis M.: Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1099–1109 (2009)
71. Salovaara H., Katunpää H.: An approach to the classification of lactobacilli isolated from Finnish sour rye dough ferments. *Acta Aliment. Pol.* **10**, 231–239 (1984)
72. Spicher G.: Die Mikroflora des Sauerteiges. I. Mitteilung: Untersuchungen über die Art der in Sauerteigen anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). *Zeitblatt für Bakteriologie II Abt.* **113**, 80–106 (1959)
73. Spicher G.: Weitere Untersuchungen über die Zusammensetzung und die Variabilität der Mikroflora handelsüblicher Sauerteig-Starter. *Z. Lebensm. Unters. F.A.* **178**, 106–109 (1984)

74. Spicher G., Lönner C.: Die Mikroflora des Sauerteiges. XXI. Mitteilung: Die in Sauerteigen schwedischer Bäckereien vorkommenden Lactobacillen. *Z. Lebensm. Unters. F.A.* **181**, 9–13 (1985)
75. Tiekling M., Gänzle M. G.: Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 79–84 (2005)
76. Tingirikari J. M. R., Kothari D., Shukla R., Goyal A.P.: Structural and biocompatibility properties of dextran from *Weissella cibaria* JAG8 as food additive. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **65**, 686–691 (2014)
77. Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F.: Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3450–3454 (2001)
78. Valcheva R., Korakli M., Onno B., Prévost H., Ivanova I., Ehrmann M.A., Vogel R.F.: *Lactobacillus hammesii* sp. nov., isolated from French sourdough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 763–767 (2005)
79. Valerio F., Favilla M., De Bellis P., Sisto A., de Candida S., Lavermicocca P.: Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 438–448 (2009)
80. Valmorri S., Settanni L., Suzzi, G., Gardini F., Vernocchi P., Corsetti A.: Application of a novel polyphasic approach to study the lactobacilli composition of sourdoughs from the Abruzzo region (central Italy). *Lett. Appl. Microbiol.* **43**, 343–349 (2006)
81. Ventimiglia G., Alfonzo A., Galluzzo P., Corona O., Francesca N., Caracappa S., Settanni L.: Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **51**, 57–68 (2015)
82. Vogel R. F., Böcker G., Stolz P., Ehrmann M., Fanta D., Ludwig W., Hammes W. P.: Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 223–229 (1994)
83. Vogel R.F., Ehrmann M.A., Ganzle M.G.: Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *An tonie Van Leeuwenhoek*, **81**, 631–638 (2002)
84. Vogel R.F., Pavlovic M., Ehrmann M.A., Wiezer A., Liesegang H., Offschanka S., Voget S., Angelov A., Bocker G., Liebl W.: Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microb. Cell. Fact.* **10**, Suppl. 1, S6 (2011)
85. Vogelmann S.A., Hertel C.: Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **28**, 583–589 (2011)
86. Vogelmann S.A., Seitter M., Singer U., Brandt M.J., Hertel C.: Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *Int. J. Food Microbiol.* **130**, 205–212 (2009)
87. De Vuyst L., Neysens P.: The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 43–56 (2005)
88. De Vuyst L., Vancanneyt M.: Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **24**, 120–127 (2007)
89. De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Harth H., Huys G., Daniel H.M., Weckx S.: Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiol.* **37**, 11–29 (2014)
90. De Vuyst L., Vrancken G., Ravyts F., Rimaux T., Weckx S.: Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiol.* **26**, 666–675 (2009)
91. De Vuyst L., Schrijvers V., Paramithiotis S., Hoste B., Vancanneyt M., Swings J., Messens W.: The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6059–6069 (2002)
92. Wick M., Stolz P., Böcker G., Lebeault J.M.: Influence of several process parameters on sourdough fermentation. *Acta Biotechnol.* **23**, 51–61 (2003)
93. Wolter A., Hager A.S., Zannini E., Czerny M., Arendt E.K.: Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking properties and sensory profile of gluten-free and wheat breads. *Int. J. Food Microbiol.* **172**, 83–91 (2014)
94. Zannini E., Garofalo C., Aquilanti L., Santarelli S., Silvestri G., Clementi F.: Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. *Food Microbiol.* **26**, 744–753 (2009)
95. Zapparoli G., De Benedictis P., Salardi C., Veneri G., Torriani S., Dellaglio F.: *Lactobacilli* of sourdoughs from Verona bakery: a preliminary investigation. *Adv. Food Sci.* **18**, 163–166 (1996)
96. Zapparoli G., Torriani S., Dellaglio F.: Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 325–332 (1998)
97. Zotta T., Piraino P., Ricciardi A., McSweeney P.L., Parente E.: Proteolysis in model sourdough fermentations. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 2567–2574 (2006)