

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Wpływ rodzaju mleka na aktywność bakterii fermentacji mlekowej i drożdży w napojach fermentowanych

AGATA LASIK¹, MAŁGORZATA LASIK², JAN PIKUL¹

¹UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Technologii Mleczarstwa

²UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Zakład Fermentacji i Biosyntezy

STRESZCZENIE

Celem pracy była ocena aktywności drobnoustrojów będących komponentami kultury starterowej zastosowanej do produkcji mlecznych napojów fermentowanych wytworzonych z mleka krowiego, owczego i klaczy przy wykorzystaniu pomiaru zmian oporności elektrycznej podłoża hodowlanego. Proces fermentacji prowadzony był z wykorzystaniem bakteryjno-drożdżowej kultury starterowej Kefir DC (Danisco Biolacta Sp. z o.o.). Najniższą aktywność metaboliczną bakterii kwasu mlekowego i drożdży stwierdzono podczas fermentacji mleka klaczy, a najwyższą podczas fermentacji mleka owczego i mleka klaczy zmieszanych w stosunku 1:1.

The influence of the type of milk on metabolic activity of lactic acid bacteria and yeast in fermented milk

ABSTRACT

The aim of this work was to analyze the metabolic activity of bacteria and yeast which are the ingredients of starter culture used in fermented milk manufacturing from cow's, sheep's and mare's milk using electric impedance changes in growth medium. The inoculation was performed by bacteria-yeast starter culture Kefir DC (Danisco Biolacta Sp. z o. o.). The lowest metabolic activity of lactic acid bacteria and yeast was observed during mare's milk fermentation and the highest during fermentation in sheep's and mare's milk mixed in ratio 1:1.

1. WSTĘP

Rynek produktów mlecznych, w tym napojów fermentowanych jest jedną z najdynamiczniej rozwijających się gałęzi przemysłu spożywczego. Różnorodność formy, cechy sensoryczne oraz wartość odżywcza czynią z nich atrakcyjną alternatywę dla coraz chętniej spożywanych przez konsumentów przekąsek. Na przestrzeni ostatnich lat spożycie mlecznych napojów fermentowanych sukcesywnie wzrasta. Stosowane w procesach produkcyjnych kultury bakteryjne stanowią mezofilne i termofilne bakterie przeprowadzające proces homo- lub heterofermentacji mlekowej. Coraz częściej wykorzystywane są również szczepy bakteryjne posiadające prozdrowotny wpływ na organizm człowieka [6], które to nadają produktowi cechy prozdrowotne. Drugim kierunkiem rozwoju mlecznych napojów fermentowanych jest podążanie za tradycją krajów Europy Wschodniej oraz Azji poprzez wykorzystanie drożdży w procesie ich produkcji. Dzięki zastosowaniu tych szczepów gotowy produkt cechuje się specyficznymi walorami sensorycznymi wywołanymi, m.in. obecnością dwutlenku węgla.

Decydujący wpływ na wartość odżywczą mlecznych napojów fermentowanych ma mleko, na bazie którego zostały wyprodukowane. Z powodu zróżnicowania składu chemicznego surowca użytego do produkcji napojów fermentowanych istotną wydaje się analiza kinetyki wzrostu oraz żywotności bakterii i drożdży wchodzących w skład kultur starterowych. Stwarza to możliwość sterowania procesem i wytwarzania produktów o wysokiej jakości, spełniających coraz to nowe, rosnące wymagania konsumentów.

Przeżywalność bakterii w produkcie uwarunkowana jest przez wiele czynników, takich jak obecność mikroflory towarzyszącej w przypadku mieszanych kultur drobnoustrojów, dostęp składników odżywczych, czas i temperatura inkubacji, czas i temperatura przechowywania, zabiegi technologiczne, pH środowiska oraz obecność substancji bakteriostatycznych [9, 10, 11, 12]. Produkcja żywności zawierającej żywe bakterie mlekowe wymaga kontroli i badań modelowych pozwalających na prognozowanie przeżywalności i biologicznej aktywności mikroorganizmów warunkujących stałą jakość produktu [12]. Fermentacja mlekowa, będąca podstawą procesu produkcyjnego, powoduje degradację białek mleka do związków o zmniejszonej masie cząsteczkowej, takich jak peptydy i wolne aminokwasy, co zwiększa przyswajalność tych związków przez organizm. Zachodzące jednocześnie zmiany w układzie koloidalnym mleka powodują, że w żołądku powstaje luźny skrzep, znacznie łatwiej trawiony przez dzieci i dorosłych,

w porównaniu z mlekiem nie poddanym procesom fermentacyjnym [4]. Ze względu na niską aktywność lipolityczną bakterii fermentacji mlekowej, tłuszcze ulegają w mniejszym stopniu degradacji niż białka. Zachodzące częściowo procesy lipolizy poprawiają strawność tłuszczu mlekowego obecnego w mlecznych napojach fermentowanych. Podczas prowadzonego procesu fermentacji zawartość laktozy będącej składnikiem energetycznym dla drobnoustrojów obniża się w zależności od rodzaju stosowanej mikroflory, składu surowca, a także niektórych rozwiązań technologicznych w zakresie normalizacji składu mleka. Laktoza ulega biodegradacji do cukrów prostych, tj. glukozy i galaktozy, a dalej biokonwersji do kwasu mlekowego i innych lotnych i nielotnych metabolitów. Cukier mleczny w przypadkach nietolerancji jest niepożądanym składnikiem pożywienia i może powodować uszkodzenie śluzówki jelita wywołując biegunkę [13].

Celem pracy była ocena aktywności drobnoustrojów będących komponentami kultury starterowej zastosowanej do produkcji mlecznych napojów fermentowanych wytworzonych z mleka krowiego, owczego i kłaczy przy wykorzystaniu pomiaru zmian oporności elektrycznej podłoża hodowlanego.

2. MATERIAŁY I METODY

Surowcem użytym do badań było mleko krowie, owcze oraz mleko kłaczy. Mleko krowie pozyskano z Obrzańkiej Spółdzielni Mleczarskiej w Kościanie, mleko owcze z Zakładu Doświadczalnego w Złotnikach, należącego do Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, natomiast mleko kłaczy ze Stadniny Koni Moszna, Zielina (woj. opolskie). Wymienione rodzaje mleka stanowiły podstawę do skomponowania czterech prób mleka przerobowego: mleko krowie, mleko kłaczy, mleko owcze, mleko owcze i mleko kłaczy zmieszane w stosunku 1:1. Wszystkie próby mleka przerobowego znormalizowano do 1,5% zawartości tłuszczu.

Produkcję mlecznych napojów fermentowanych przeprowadzono przez inokulację wymienionych prób mleka przerobowego liofilizowaną, bakteryjno-drożdżową kulturą starterową Kefir DC (Danisco Biolacta Sp. z o. o.), a następnie inkubacją przez 18h w temp. 30°C, aż do obniżenia wartości pH do 4,6. Zastosowane parametry czasu i temperatury inkubacji oraz aktywność szczepionki dobrano zgodnie ze wskazaniami producenta. Po zakończeniu inkubacji gotowy produkt schłodzono do temp. 4°C. Mleczne napoje fermentowane przechowywano w warunkach chłodniczych, w temp. 4-6°C.

Oznaczenia ogólnej liczby bakterii kwasu mlekowego i ogólnej liczby drożdży dokonano klasyczną metodą posiewów płytkowych, stosując agarowe podłoże MRS – dla oceny ogólnej liczby komórek bakterii kwasu mlekowego oraz podłoże YM – dla oceny ogólnej liczby komórek drożdży.

Aktywność metaboliczną bakterii i drożdży określono przy użyciu metody pomiaru zmian impedancji elektrycznej podłoża hodowlanego [2, 3, 5]. Do badań wykorzystano Automatyczny Analizator Wzrostu Mikroorganizmów BacTrac 4100 firmy Sy-Lab, Austria. Oceny aktywności metabolicznej bakterii dokonano metodą bezpośrednią, poprzez rejestrację zmian impedancji bezpośrednio w podłożu wzrostowym jakim było mleko. Oceny aktywności metabolicznej drożdży dokonano metodą pośrednią, opartą na pomiarze zmian impedancji w roztworze wodorotlenku potasu [7]. Parametrem służącym do analizy porównawczej aktywności mikroorganizmów w próbach był, tzw. czas detekcji (ang. impedance detection time, IDT), po upływie którego następuje wykrywalna zmiana impedancji środowiska [2, 3, 8]. Dla każdego z analizowanych mikroorganizmów przyjęto tzw. próg zmiany impedancji (ang. threshold value, TV), wynoszący 5%.

Do pomiaru aktywności metabolicznej bakterii użyto specjalnych probówek o pojemności 10 cm³, wyposażonych w cztery elektrody. Każdą probówkę napełniono 9 cm³ podłoża, które zaszczepiono 1 cm³ inokulum testowanej kultury starterowej. W ciągu 15 minut od zaszczepienia probówki umieszczono w termostacie Automatycznego Analizatora Wzrostu Mikroorganizmów BacTrac 4100 i inkubowano przez 24h w temp. 30°C. Zmiany impedancji elektrycznej podłoża hodowlanego były rejestrowane automatycznie, co 10 minut podczas trwania hodowli [2, 3, 5].

Pomiar aktywności metabolicznej drożdży wykonano z użyciem specjalnych, dwuczęściowych probówek, w skład których wchodziła jedna probówka, tzw. zewnętrzna o pojemności 10 cm³ wyposażona w dwie elektrody oraz druga, tzw. wewnętrzna, sterylna probówka o pojemności 5 cm³. Sterylną probówkę napełniono 4,5 cm³ podłoża hodowlanego, które zaszczepiono 0,5 cm³ inokulum testowanej kultury starterowej, a następnie umieszczono w probówce zewnętrznej, do której wcześniej wprowadzono 2 cm³ 0,2% roztworu wodorotlenku potasu. W ciągu 15 minut od zaszczepienia

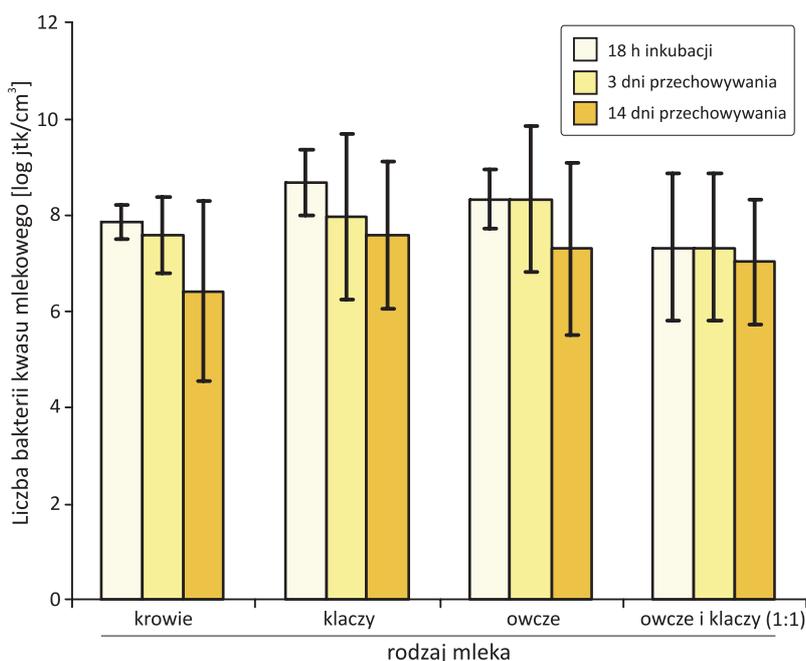
probówki umieszczono w termostacie Automatycznego Analizatora Wzrostu Mikroorganizmów BacTrac 4100 i inkubowano przez 24h w temp. 30°C. Zmiany impedancji elektrycznej podłoża hodowlanego były rejestrowane automatycznie, co 10 minut podczas trwania hodowli [2, 3].

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono w oparciu o pakiet STATISTICA 8 (StatSoft).

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Na podstawie wykonanych posiewów mikrobiologicznych na podłożach agarowych nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w liczbie komórek bakterii kwasu mlekowego oraz drożdży bezpośrednio po zakończeniu procesu inkubacji (18h) oraz w trzecim dniu przechowywania. Statystycznie istotne obniżenie liczby komórek bakterii kwasu mlekowego oraz komórek drożdży zaobserwowano po upływie czternastu dni przechowywania. (Rys.1 i 2). Analiza zmian liczby żywych komórek bakterii i drożdży potwierdza wyniki wcześniejszych badań [1] nad ilościową zależnością bakterii mlekowych i drożdży podczas procesu fermentacji mleka. W obu doświadczeniach obserwowano istotnie większą liczbę komórek bakterii w porównaniu z liczbą komórek drożdży.

W badaniach przeprowadzonych przez Witthuhn i in. [11], analizowano zmiany w populacji mikroflory charakterystycznej dla kefiru na różnych etapach produkcji i przechowywania. Autorzy stwierdzili obniżenie liczby komórek mikroorganizmów cha-



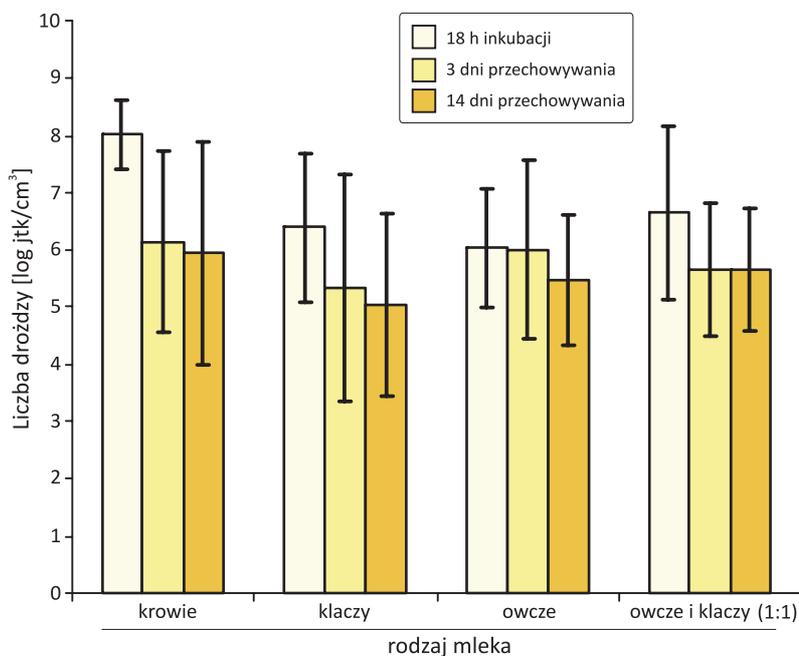
Rysunek 1. Ogólna liczba bakterii kwasu mlekowego w mlęcznych napojach fermentowanych

rakterystycznych dla mlecznych napojów fermentowanych wytworzonych w oparciu o przeprowadzenie procesu fermentacji bakteryjno-drożdżowej. Fakt ten spowodowany był prawdopodobnie przez niedobór składników odżywczych lub zbyt dużą kwasowość podłoża, którym było mleko.

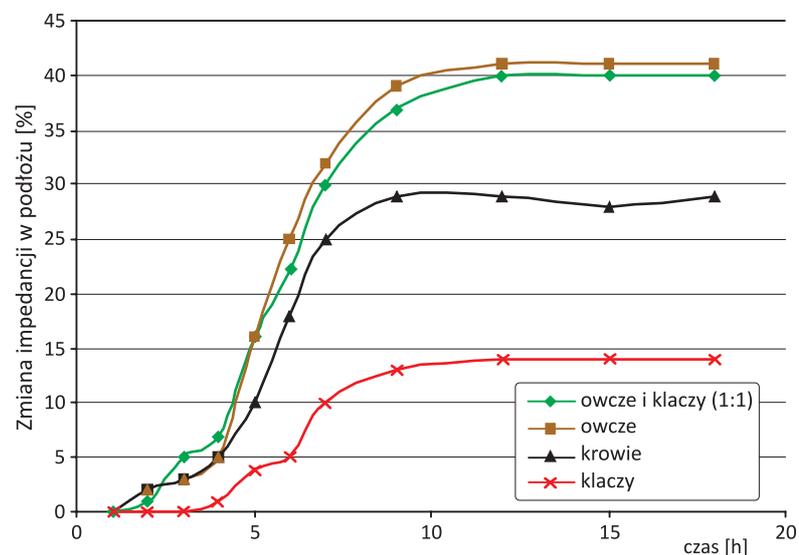
Oceny aktywności metabolicznej bakterii i drożdży zastosowanej kultury starterowej dokonano w oparciu o pomiar zmian impedancji (oporności) elektrycznej wykorzystywanej od niedawna w dziedzinie mikrobiologii do wykrywania obecności oraz monitoringu wzrostu mikroorganizmów [8]. Analiza krzywych będących graficznym obrazem zmian impedancji elektrycznej w czasie, wyrażonych w procentach w stosunku do wartości początkowych pozwoliła na wyodrębnienie trzech grup podłoża, w których kinetyka wzrostu bakterii była bardzo zbliżona (Rys. 3). Do pierwszej grupy zaliczono mleko owcze i mleko kłaczy zmieszane w stosunku 1:1 oraz mleko owcze. Do drugiej grupy zakwalifikowano mleko krowie. Kinetyka wzrostu bakterii w mleku kłaczy odbiegała znacząco od innych analizowanych podłoży skomponowanych z mleka różnych gatunków ssaków.

Zmiany impedancji spowodowane wzrostem i aktywnością drożdży pozwoliły na wyodrębnienie mleka krowiego i mleka owczego jako grupę podłoży charakteryzujących się podobną intensywnością przemian metabolicznych tych mikroorganizmów (Rys. 4). Krzywe odzwierciedlające omówione wcześniej zależności są „lustrzanym odbiciem” krzywych uzyskiwanych metodą bezpośrednią. Wartości podane w procentach, opisujące stopień zmian impedancji w badanym podłożu przyjmują wartości ujemne.

Analiza danych dotyczących zmian impedancji pozwoliła na selekcję podłoża najlepszego dla wzrostu poszczególnych mikroorganizmów. Zarówno w przypadku bakterii kwasu mlekowego jak i drożdży obecnych w zastosowanej w doświadczeniu kulturze starterowej najwyższą aktywność obserwowano podczas wzrostu w podłożu będącym mieszaniną mleka owczego i mleka kłaczy w stosunku 1:1. Najniższą aktywność testowanej kultury starterowej, wyrażoną najdłuższym czasem detekcji zmian impedancji odnotowano podczas fermentacji mleka kłaczy (Rys. 5).



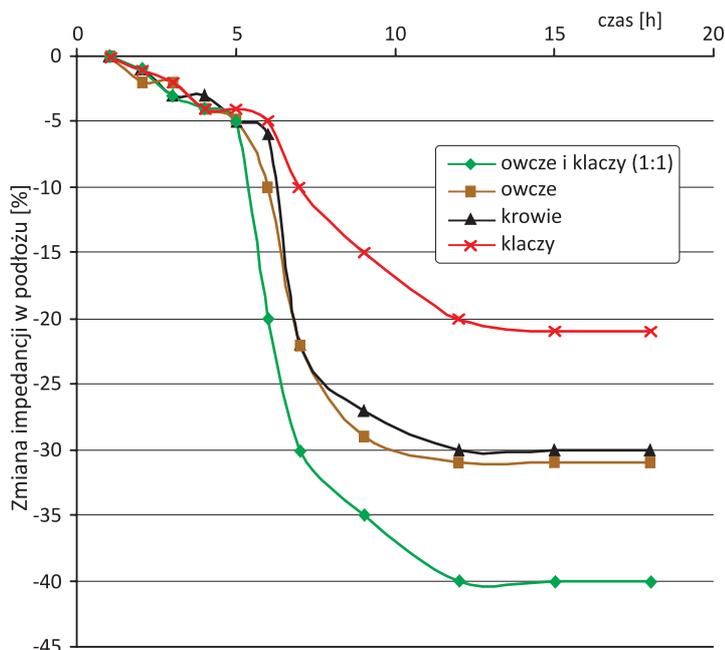
Rysunek 2. Ogólna liczba drożdży w mlecznych napojach fermentowanych



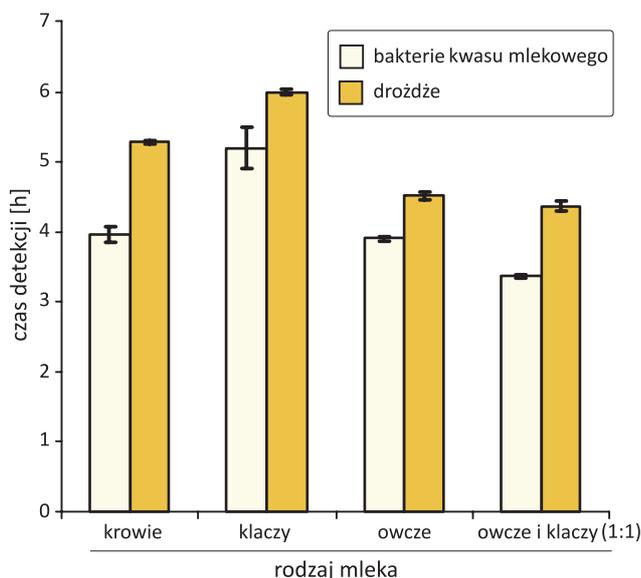
Rysunek 3. Zmiany impedancji podczas inkubacji testowanych bakterii kwasu mlekowego w różnych rodzajach mleka

4. WNIOSKI

1. W wytworzonych mlecznych napojach fermentowanych liczba bakterii kwasu mlekowego była prawie o dwa rzędy wielkości większa do liczby drożdży.
2. Czternastodniowe przechowywanie w warunkach chłodniczych mlecznych napojów fermentowanych spowodowało statystycznie istotne obniżenie liczby komórek bakterii kwasu mlekowego i drożdży.



Rysunek 4. Zmiany impedancji podczas inkubacji testowanych drożdży w różnych rodzajach mleka



Rysunek 5. Czas detekcji na poziomie 5% zmian impedancji wyznaczony podczas inkubacji mleka różnych gatunków ssaków

- Najniższą aktywność metaboliczną bakterii kwasu mlekowego i drożdży stwierdzono podczas fermentacji mleka klaczy, a najwyższą podczas fermentacji mleka owczego i mleka klaczy zmieszanych w stosunku 1:1.
- Metoda pomiaru zmian impedancji elektrycznej pozwoliła na szybką analizę przemian biochemicznych wywołanych aktywnością testowanej kultury starterowej w mlecznych napojach fermentowanych.

LITERATURA

- Álvarez-Martin P., Flórez A. B., Hernández-Barranco A., Mayo B. (2008). Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*, 19, 62-70.
- Flint S. H., Brooks J. D. (2001). Rapid detection of *Bacillus stearothermophilus* using impedance-splitting. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 205-208.
- Gomez R., Bashir R., Bhunia A. K. (2002). Microscale electronic detection of bacterial metabolism. *Sensors and Actuators*, 86, 198-208.
- Kudełka W. (2005). Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych w Unii Europejskiej oraz w Polsce. *Zeszyty Naukowe Akademii Ekonomicznej w Krakowie*, 678, 149-160.
- Lasik M., Nowak J. (2010). Electrical impedance for bacterial metabolic activity screening-evaluation of single and mixed bacterial consortia for wastewater biodegradation. *International Food Research Journal*, 17, 591-599.
- Martin-Diana A. B., Janer C., Peláez C., Requena T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13, 827-833.

- [7] Noble P. A., Dziuba M., Harrison D. J., Albritton W. L. (1999). Factors influencing capacitance – based monitoring of microbial growth. *Journal of Microbiological Methods*, 37, 45-49.
- [8] Nowak J., Lasik M., Czarnecki Z. (2002). Wykrywanie obecności oraz charakterystyka aktywności metabolicznej bakterii poprzez badanie zmian impedancji elektrycznej. *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna*, 1, 38-42.
- [9] Quaglia N.C., Dambrosio A., Normanno G., Parisi A., Patrono R., Ranieri G., Rella A., Celano G. V. (2008). High occurrence of *Helicobacter pylori* in raw goat, sheep and cow milk inferred by *glmM* gene: A risk of food-born infection? *International Journal of Food Microbiology*, 124, 43-47.
- [10] Viljoen B. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 37-44.
- [11] Witthuhn R. C., Schoeman T., Britz T. J. (2005). Characterization of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15, 383-389.
- [12] Zaręba D., Ziarno M., Obiedziński M. (2008). Przeżywalność bakterii jogurtowych i probiotycznych w układach modelowych mleka niefermentowanego i fermentowanego. *Medycyna Weterynaryjna*, 64, 1007-1012.
- [13] Zmarlicki S. (2006). Zdrowotne aspekty mleka i przetworów mlecznych. *Zdrowie Publiczne*, 116, 142-146.