

JUSTYNA KOZIÓŁ, WALDEMAR GUSTAW, ADAM WAŚKO,  
KATARZYNA SKRZYPCZAK, ANETA SŁAWIŃSKA, BARTOSZ SOŁOWIEJ

## WPŁYW WYBRANYCH PREPARATÓW BIAŁEK MLEKA NA WZROST I PRZEŻYwalNOŚĆ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* ORAZ WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNE MLECZNYCH NAPOJÓW FERMENTOWANYCH

### Streszczenie

Białka serwatkowe są źródłem bioaktywnych peptydów i zawierają aminokwasy niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Preparaty białek mleka zastosowane do produkcji mlecznych napojów fermentowanych wpływały stymulująco na wzrost szczepu *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Dodatek  $\alpha$ -laktalbuminy do mleka pełnego wpłynął na skrócenie czasu powstawania skrzepu kwasowego przy wykorzystaniu szczepu *Lb. acidophilus* LA-5. Po dwutygodniowym przechowywaniu w warunkach chłodniczych mlecznych napojów fermentowanych, uzyskanych z pełnego mleka w proszku, najwyższą liczbę komórek ( $4,1 \times 10^7$  jtk/ml) bakterii szczepu *Lb. acidophilus* LA-5 stwierdzono w produktach wzbogaconych WPC 65 – w ilości 1 %. Największą twardością (1,51 N) i wartością modułu zachowawczego  $G'$  (5567 Pa) charakteryzowały się napoje otrzymane z 2-procentowym dodatkiem WPI. Wraz ze wzrostem stężenia  $\alpha$ -la i WPI wzrastała twardość żeli kwasowych otrzymanych przy użyciu szczepu *Lb. acidophilus* LA-5. Mleczne napoje fermentowane otrzymywane z mleka odtłuszczonego charakteryzowały się wyższymi wartościami takich parametrów, jak twardość oraz moduł zachowawczy. Napoje z mleka odtłuszczonego wykazywały jednak większą synerезę w porównaniu z napojami z mleka pełnego. Wzrost dodatku preparatów białek mleka w napojach powodował stopniowe zmniejszanie ilości wydzielonej serwatki. Najniższą wartością synerезy (1,97 %) cechowały się napoje mleczne z 2-procentowym dodatkiem WPI. Oprócz poprawy właściwości fizykochemicznych mlecznych napojów fermentowanych, wzbogacenie preparatami białek mleka wpłynęło na zwiększenie walorów prozdrowotnych oraz nadało produktom cechy żywności funkcjonalnej.

**Słowa kluczowe:** preparaty białek mleka, bakterie probiotyczne, *Lactobacillus acidophilus*, synerезa, tekstura

---

Dr J. Kozioł, dr A. Waśko, dr inż. B. Solowiej, Katedra Biotechnologii, Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, prof. dr hab. W. Gustaw, mgr inż. K. Skrzypczak, dr A. Sławińska, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin. Kontakt: justynakozio183@wp.pl

## Wprowadzenie

*Lactobacillus acidophilus* to Gram dodatnie pałeczki termofilne, których obecność została stwierdzona w mlecznych produktach fermentowanych, a także w wielu produktach zbożowych oraz mięsnych. Występują naturalnie m.in. w jamie ustnej oraz w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt [3]. Bakterie te są odporne na niskie pH środowiska, wysokie stężenie kwasu żołądkowego oraz na działanie żółci, ponadto wykazują zdolność do szybkiej kolonizacji jelit. Do najczęściej wykorzystywanych probiotycznych szczepów tego gatunku należą: *Lb. acidophilus* NCFM, *Lb. acidophilus* LA-5, jak również *Lb. acidophilus* NCFB 1748 [19, 31]. Wytwarzają one witaminy z grupy B (kwas foliowy, witaminę B<sub>6</sub>, niacynę), nadtlenek wodoru i/lub bakteriocyny (np. acidofilinę, acidolinę) oraz kwasy organiczne, przez co zapobiegają rozwojowi wielu patogenów i hamują rozwój niepożądaną mikroflory [2, 18]. Zarówno badania *in vivo*, jak i *in vitro* potwierdzają znaczny wpływ *Lb. acidophilus* na hamowanie rozwoju i obniżanie przeżywalności *Helicobacter pylori* [5, 9]. *Lb. acidophilus* wykazuje właściwości prozdrowotne, m.in. zmniejsza nietolerancję laktozy i stymuluje układ immunologiczny. Udowodniono, że gatunek ten wykazuje aktywność przeciwnowotworową w stosunku do raka okrężnicy [19, 30, 31].

Mleczne napoje fermentowane, w tym głównie jogurty, produkowane są na skalę przemysłową metodą zbiornikową. Jednym z etapów przemysłowej produkcji jest zwiększenie suchej masy mleka przerobowego. W celu uzyskania odpowiedniej tekstury najczęściej stosowany jest dodatek hydrokoloidów polisacharydowych lub preparatów białkowych, przede wszystkim białek serwatkowych [10, 28]. Wzrost zainteresowania białkami serwatkowymi wynika z ich właściwości funkcjonalnych, jak i żywieniowych [29]. Białka serwatkowe zawierają aminokwasy niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Hydrolizaty białek serwatki, pochodzące z proteolitycznego rozkładu kazeiny, wzmacniają funkcjonowanie układu odpornościowego poprzez zwiększenie proliferacji limfocytów oraz przeciwciał, jak również syntezę cytokin [8]. Z tego powodu dodatek preparatów białek mleka wpływa na zwiększenie walorów prozdrowotnych mlecznych napojów fermentowanych.

Bioaktywne peptydy, uwalniane z białek mleka w reakcjach proteolizy bakteryjnej, wykazują działanie immunomodulujące, cytostymulujące, antyhypertensyjne, przeciwutleniające, przeciwzakrzepowe, hipocholesterolemiczne, przeciwdrobnoustrojowe. Mają także zdolność do wiązania związków mineralnych oraz wykazują aktywność agonistyczną lub/i antagonistyczną wobec receptorów opioidowych [21].

Obecnie obserwuje się coraz większe zainteresowanie produktami spożywczymi otrzymywanymi przy udziale mikroflory probiotycznej, pozytywnie wpływającej na zdrowie konsumentów.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu wyselekcjonowanych preparatów białek mleka na właściwości fizykochemiczne i reologiczne mlecznych napojów fer-

mentowanych otrzymanych metodą termostatową przy użyciu bakterii *Lb. acidophilus*. Działanie prozdrowotne mlecznych napojów fermentowanych z dodatkiem kultur probiotycznych jest uzależnione od odpowiedniej liczby żywych komórek, dlatego też określono wpływ dodatku preparatów białek mleka na wzrost *Lb. acidophilus* w mlecznych napojach fermentowanych oraz przeżywalność szczepu podczas chłodniczego przechowywania produktu.

### Material i metody badań

Material biologiczny wykorzystany do badań stanowiły szczepy *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen, Polska) oraz *Lb. acidophilus* L10 (LAFTI-DSM, Polska).

W badaniach zastosowano także: podłoże podstawowe MRS (BTL, Łódź), sole żółci (Sigma-Aldrich, Poznań), pełne mleko w proszku (OSM Krasnystaw), odtłuszczone mleko w proszku (Biomlek Chełm), koncentrat białek serwatkowych WPC65 (Milei GmbH, Allgau, Niemcy), izolat białek serwatkowych (WPI) (Milei GmbH, Allgau, Niemcy), serwatkę w proszku demineralizowaną (SPD) (Euroserum, Port-Sur-Saone, Francja), kazeinoglikomakropeptyd (CGMP) (Arla Food, Dania) oraz  $\alpha$ -laktoalbuminę (Arla Food, Dania).

W celu określenia wpływu wybranych preparatów białek mleka na wzrost badanych szczepów bakterii mierzono gęstość optyczną hodowli bakteryjnych (OD) przy wykorzystaniu automatycznego czytnika wzrostu drobnoustrojów – *Bioscreen C* (OY Growth Curves, Finlandia). Hodowle bakteryjne prowadzono na mikropłytkach w podłożu płynnym MRS o zmodyfikowanym składzie, w którym źródło azotu organicznego wchodzącego w skład pożywki (pepton K) zastąpiono poszczególnymi preparatami białek mleka w stężeniu 0,25 %. Każdy wariant podłoża o objętości 350  $\mu$ l (w dziesięciokrotnym powtórzeniu) zaszczepiano 50  $\mu$ l inokulum szczepu. Układ kontrolny stanowiły hodowle komórek bakterii szczepów *Lb. acidophilus* prowadzone w bulionie MRS o pełnym składzie. Inkubację prowadzono w temp. 37 °C przez 48 h. Pomiar zmian gęstości optycznej hodowli bakteryjnych następował co 2 h przy długości fali  $\lambda = 600$  nm.

Odtłuszczone mleko w proszku w ilości 100 g stopniowo rozpuszczano w 1000 ml wody destylowanej przez ciągłe mieszanie mieszadłem magnetycznym. Mleko sterylizowano, a następnie schładzano do temp. 40 ÷ 45 °C i zaszczepiono 100  $\mu$ l zawiesiny komórek *Lb. acidophilus* LA-5. Próbkę inkubowano w łaźni wodnej w temp. 37 °C do czasu uzyskania  $10^7 \div 10^8$  jtk/ml [6, 14, 26]. Przygotowane w ten sposób inokulum posłużyło do szczepienia podłoża w hodowli stacjonarnej.

Mleczne napoje fermentowane z użyciem monokultury bakterii *Lb. acidophilus* LA-5 otrzymywano metodą termostatową. Do 500 g regenerowanego odtłuszczonego mleka w proszku lub pełnego mleka w proszku o stężeniu 13 % (m/m) dodawano po-

szczególne preparaty białek mleka w takiej ilości, aby uzyskać 0,5-, 1- i 2-procentowe stężenie w gotowym produkcie. Mleko rozlewano następnie po 30 ml do opakowań jednostkowych i pasteryzowano w łaźni wodnej, w temp. 80 °C przez 30 min. Próbkę kontrolną stanowiły układy bez dodatku preparatów białek mleka. Każdą analizowaną próbkę przygotowano w pięciu powtórzeniach. Po ochłodzeniu do temp.  $20 \pm 2$  °C próbki zaszczipiano inokulum w ilości 2 % i inkubowano w 37 °C do momentu obniżenia wartości pH do 4,6. Otrzymane w ten sposób mleczne napoje fermentowane schładzano do temp. 4 °C i przechowywano przez 12 h.

Wielkość synerezy oznaczano po 12 h od zakończenia procesu fermentacji [1]. Próbkę ważono, a następnie ustawiano pod kątem 45 stopni. Wydzieloną serwatkę zlewano, po czym ponownie ważono próbki. Po obliczeniu różnicy mas wielkość wycieku serwatki przedstawiano procentowo.

Liczbę komórek *Lb. acidophilus* LA-5 w mlecznych napojach fermentowanych oznaczano metodą płytkową na podłożu MRS-agar z 0,2-procentowym dodatkiem soli żółci zgodnie z PN-EN ISO 4833:2004 [24]. Posiewy wykonywano po 12 h od zakończenia fermentacji oraz po 1, 7, 14 oraz 21 dniach chłodniczego przechowywania na podłożu. Każdy posiew wykonano w dwóch powtórzeniach.

Twardość mlecznych napojów fermentowanych oznaczano za pomocą analizatora tekstury TA-XT2i (Stable Micro Systems, Godalming, UK) po 12-godzinnym przechowywaniu w temp. 4 °C. Próbkę badano, stosując zmodyfikowany test TPA [4]. Średnica trzpienia wynosiła 15 mm, głębokość penetracji 20 mm, natomiast prędkość przesuwu głowicy analizatora była równa 1 mm/s. Pomiar wykonano w dwóch seriach po pięć powtórzeń.

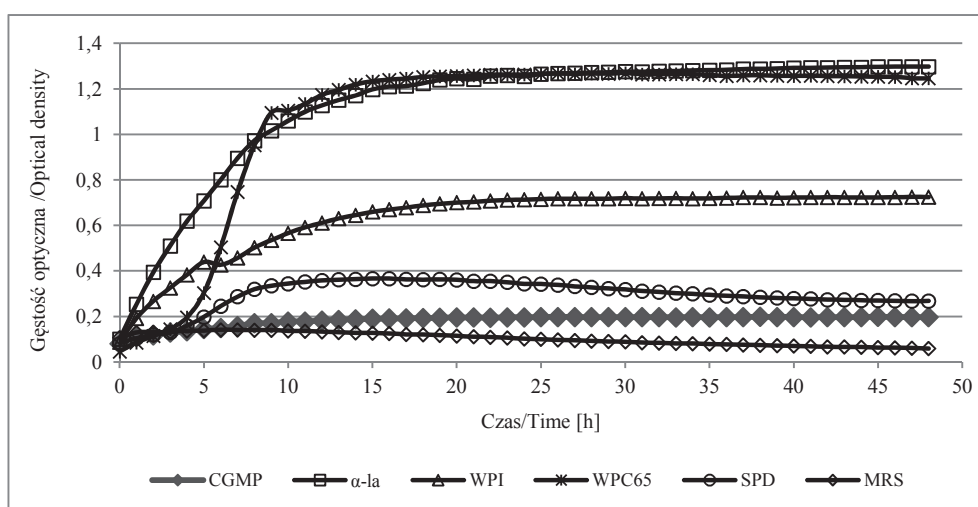
Proces fermentacji mlecznych napojów fermentowanych monitorowano przy użyciu reometru dynamicznego RS300 wyposażonego w układ cylindrów współosiowych (Z31) (Haake, Karlsruhe, Niemcy). Rejestrowano zmiany modułu zachowawczego ( $G'$ ) przy  $f = 0,1$  Hz i odkształceniu równym 0,01. Pomiar prowadzono w ciągu 20 h inkubacji w temp. 37 °C. Po upływie tego czasu badany układ schładzano i przechowywano przez 5 h w temp. 4 °C.

Na podstawie wyników badań dokonano analizy statystycznej, uwzględniając: synerezę, twardość, moduł zachowawczy oraz moduł stratności. Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Zastosowano analizę wariancji (ANOVA) na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ . Do oceny różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano test Tukeya.

## Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badań sprawdzono wpływ wybranych preparatów białek mleka na wzrost szczepów *Lb. acidophilus* na zmodyfikowanym podłożu MRS. Przebieg krzywych na wykresie (rys. 1) obrazuje zmiany gęstości optycznej (OD) zacho-

dzące podczas hodowli szczepu LA-5 na płynnych pożywkach MRS z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka. Na podłożach z zastosowaniem dodatku WPC 65 i  $\alpha$ -la wartości mierzonego parametru wzrastały systematycznie od pierwszych godzin hodowli, a najwyższe wartości uzyskano odpowiednio po 22 i 23 h inkubacji. Zdecydowanie mniejszy wpływ na wzrost szczepu LA-5 miał dodatek SPD oraz CGMP. Każdy wariant podłoża wzbogacany preparatami białek mleka stymulował namnażanie komórek bakterii. Badany szczep najslabiej namnażał się na podłożu kontrolnym (MRS o podstawowym składzie). Podobne wyniki uzyskano badając wzrost bakterii kwasu mlekowego na regenerowanej serwatce w proszku [7].



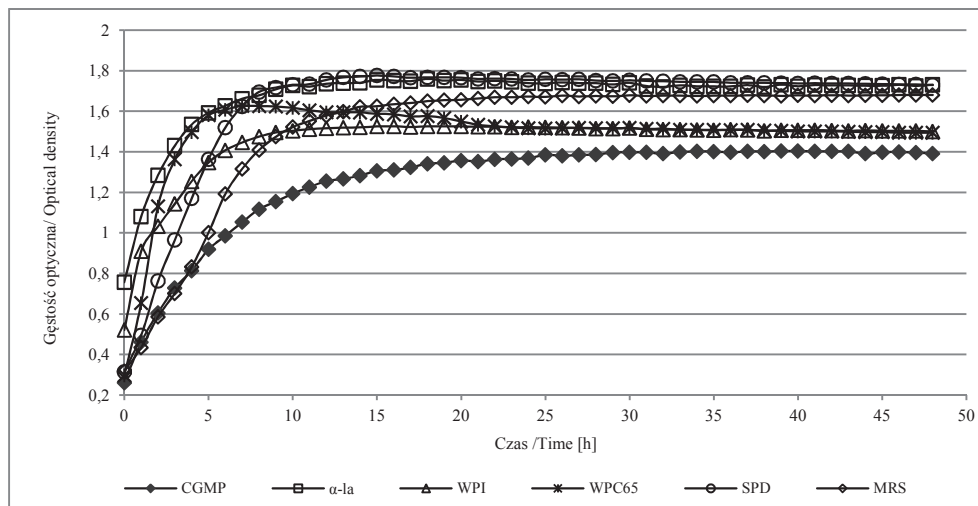
Objaśnienia: / Explanatory notes:

CGMP – kazeinoglikomakropeptyd / caseinoglicomacropptide;  $\alpha$ -la –  $\alpha$ -laktoalbumina /  $\alpha$ -lactalbumin; WPI – izolat białek serwatkowych / whey protein isolate; WPC 65 – koncentrat białek serwatkowych / whey protein concentrate; SPD – serwatka w proszku demineralizowana / demineralised whey powder; MRS – podłoże kontrolne / control medium.

Rys. 1. Wpływ dodatku preparatów białek mleka na wzrost *Lb. acidophilus* LA-5.

Fig 1. Effect of milk protein preparations added on growth of *Lb. acidophilus* LA-5.

W celu porównania wpływu preparatów białek mleka na wzrost bakterii *Lb. acidophilus* przebadano również szczep L-10 (rys. 2). Wpływ dodatku preparatu białek mleka na rozwój komórek L-10 był niewielki. Komórki badanego szczepu najlepiej namnażały się na podłożach z dodatkiem  $\alpha$ -la oraz WPC 65. Najslabszy wzrost zaobserwowano w hodowli bakteryjnej na podłożu z dodatkiem CGMP.



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Wpływ dodatku preparatów białek mleka na wzrost *L. acidophilus* L-10.

Fig. 2. Effect of milk protein preparations added on growth of *L. acidophilus* L10.

W następnym etapie badań otrzymano mleczne napoje fermentowane z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka. Wzbogacenie regenerowanego odtłuszczonego mleka w proszku (OMP) lub pełnego mleka w proszku (PMP) preparatami białek mleka miało wpływ na liczbę komórek bakterii w uzyskanych produktach. Największą liczbą komórek bakterii *Lb. acidophilus* LA-5 charakteryzowały się produkty otrzymane zarówno z PMP, jak i OMP (tab. 1), w których zastosowano 2-procentowy dodatek CGMP. Analizowany szczep słabiej namnażał się w napojach otrzymanych z OMP zarówno w próbach kontrolnych, jak również wzbogaconych 0,5-procentowym dodatkiem WPC 65 oraz 0,5-procentowym dodatkiem WPI ( $1,9 \times 10^8$  jtk/ml).

Wszystkie zastosowane w produkcji mlecznych napojów fermentowanych preparaty białek mleka stymulowały wzrost szczepu LA-5. Zdecydowanie niższą liczbą komórek charakteryzowały się próby kontrolne, czyli napoje otrzymane bez udziału preparatów białek mleka (tab. 1). Podobne wyniki uzyskali McComas i Gilliland [20]. Po dodaniu do mleka odtłuszczonego 1 % hydrolizatu białek serwatkowych wykazali korzystny wpływ tego preparatu na wzrost szczepów *Lb. acidophilus* O16 oraz L-1. Nie zaobserwowali natomiast porównywalnego efektu w stosunku do szczepu *Lb. acidophilus* NCFM [20]. Stymulację wzrostu bakterii kwasu mlekowego na regenerowanej serwatce w proszku zaobserwowano w przypadku szczepów *Lb. acidophilus* CRL 636, *Lb. acidophilus* LA-5 oraz *L. casei* LC-01. Liczba komórek utrzymywała się przeciętnie na poziomie  $10^9$  jtk/ml [23].



Tabela 1. Liczba komórek szczepu LA-5 (*L. acidophilus*) w mlecznych napojach fermentowanych otrzymanych z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka.Table 1. Number of bacterial cells of LA-5 (*L. acidophilus*) strain in fermented milk beverages produced with milk protein preparations added.

Dodatek preparatu białek mleka Milk protein preparation added [%]	LA-5 [jtk/ml / cfu/ml]				
	CGMP	$\alpha$ -la	WPC 65	WPI	SPD
OMP:					
0	1,9×10 <sup>8</sup>				
0,5	2,3×10 <sup>8</sup>	2,2×10 <sup>8</sup>	1,9×10 <sup>8</sup>	1,9×10 <sup>8</sup>	2,1×10 <sup>8</sup>
1	2,4×10 <sup>8</sup>	2,3×10 <sup>8</sup>	2,3×10 <sup>8</sup>	2,1×10 <sup>8</sup>	2,3×10 <sup>8</sup>
2	2,5×10 <sup>8</sup>	2,4×10 <sup>8</sup>	2,1×10 <sup>8</sup>	2,2×10 <sup>8</sup>	2,4×10 <sup>8</sup>
PMP:					
0	2,0×10 <sup>8</sup>				
0,5	2,4×10 <sup>8</sup>	2,5×10 <sup>8</sup>	2,1×10 <sup>8</sup>	2,0×10 <sup>8</sup>	2,4×10 <sup>8</sup>
1	2,5×10 <sup>8</sup>	2,7×10 <sup>8</sup>	2,3×10 <sup>8</sup>	2,2×10 <sup>8</sup>	2,6×10 <sup>8</sup>
2	2,7×10 <sup>8</sup>	2,6×10 <sup>8</sup>	2,5×10 <sup>8</sup>	2,4×10 <sup>8</sup>	2,5×10 <sup>8</sup>

Objaśnienia: / Explanatory notes:

OMP – odtłuszczone mleko w proszku / skimmed milk powder; PMP – pełne mleko w proszku / whole milk powder. Pozostałe objaśnienia jak pod rys. 1. / Other explanatory notes as in Fig. 1.

Dodatek preparatów białek mleka do mlecznych napojów fermentowanych miał wyraźny wpływ na ich właściwości reologiczne. Żele kwasowe otrzymane z OMP przy udziale monokultury probiotycznej *Lb. acidophilus* LA-5 charakteryzowały się wyższą twardością w porównaniu z żelami kwasowymi uzyskanymi z PMP (tab. 2). Preparaty takie jak  $\alpha$ -la, i WPI zwiększały twardość otrzymanych żeli wraz ze wzrostem ich stężenia, natomiast pozostałe preparaty białek mleka pogarszały właściwości reologiczne żeli (obserwowane zmniejszenie twardości lub wzrost stężenia preparatu nie miał wpływu na twardość żeli). W przypadku wszystkich produktów otrzymanych z dodatkiem WPC 65 stwierdzono zmniejszenie twardości wraz ze wzrostem stężenia tego preparatu. Podobny efekt zaobserwowano we wcześniejszych badaniach [10].

Największą twardością (1,83 N) odznaczały się mleczne napoje fermentowane na bazie OMP z 1-procentowym dodatkiem CGMP, a wśród produktów uzyskanych z PMP – próby z 2-procentowym dodatkiem WPI (1,08 N).

Żele kwasowe otrzymane z OMP lub PMP z dodatkiem preparatów białek mleka, fermentowane przez LA-5, charakteryzowały się wyższymi wartościami  $G'$  i  $G''$  w porównaniu z próbą kontrolną (tab. 3). Napoje z OMP, wzbogacone preparatami białek mleka, były bardziej sprężyste niż próby powstałe z PMP. Wyniki pomiarów właściwości lepkosprężystych są zbieżne z wynikami pomiaru twardości napojów

mlecznych fermentowanych. Najwyższe wartości  $G'$  i  $G''$  miały produkty powstałe zarówno z OMP, jak i PMP z 1-procentowym dodatkiem GCMP i znacznie przekraczały wartości modułów zachowawczych i stratności pozostałych produktów.

Tabela 2. Twardość mlecznych napojów fermentowanych przez LA-5 (*L. acidophilus*).  
Table 2. Hardness of fermented milk beverages affected by LA-5 (*L. acidophilus*) strain.

Dodatek preparatu białek mleka Milk protein preparation added [%]	Twardość / Hardness [N]				
	CGMP	$\alpha$ -la	WPC 65	SPD	WPI
OMP:					
0	$0,35^a \pm 0,03$				
0,5	$0,31^a \pm 0,1$	$0,50^a \pm 0,18$	$0,75^{ab} \pm 0,15$	$0,58^{ab} \pm 0,02$	$0,77^{abc} \pm 0,12$
1	$1,83^{de} \pm 0,61$	$0,69^{ab} \pm 0,03$	$0,44^a \pm 0,04$	$0,74^{abc} \pm 0,15$	$0,72^{ab} \pm 0,06$
2	$0,58^{ab} \pm 0,08$	$0,78^{abc} \pm 0,08$	$0,32^a \pm 0,02$	$0,42^a \pm 0,05$	$1,51^{cd} \pm 0,16$
PMP:					
0	$0,29^a \pm 0,04$				
0,5	$0,26^a \pm 0,03$	$0,27^a \pm 0,01$	$0,22^a \pm 0,02$	$0,25^a \pm 0,02$	$0,37^{ab} \pm 0,04$
1	$0,36^{ab} \pm 0,05$	$0,43^{ab} \pm 0,05$	$0,23^a \pm 0,10$	$0,38^{ab} \pm 0,04$	$0,53^{abc} \pm 0,07$
2	$0,20^a \pm 0,09$	$0,56^{abc} \pm 0,03$	$0,24^a \pm 0,01$	$0,26^a \pm 0,03$	$1,08^c \pm 0,12$

Objaśnienia: / Explanatory notes:

w tabeli przedstawiono wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe / Table shows mean values  $\pm$  standard deviations; n = 5; różnice pomiędzy wartościami średnimi prób otrzymanych z jednego rodzaju mleka, oznaczone różnymi literami są statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ) / differences amid means obtained from one type of milk, denoted by different letters are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Wraz ze wzrostem zawartości WPC 65, wartości  $G'$  oraz  $G''$  zmniejszały się. Wszystkie próby miały żelową konsystencję, co potwierdzają wyższe wartości  $G'$  w porównaniu z  $G''$  w całym zakresie zastosowanych częstotliwości. Koncentraty białek serwatkowych, dzięki zdolnościom teksturotwórczym, wpływają na zmiany właściwości fizykochemicznych jogurtów, jednak duże znaczenie ma także równowaga pomiędzy związkami mineralnymi występującymi w tych produktach [13, 28].

Proces żelowania napojów mlecznych, otrzymanych z PMP z 1-procentowym dodatkiem  $\alpha$ -la, w wyniku fermentacji szczepem LA-5 przedstawiono na rys. 3.



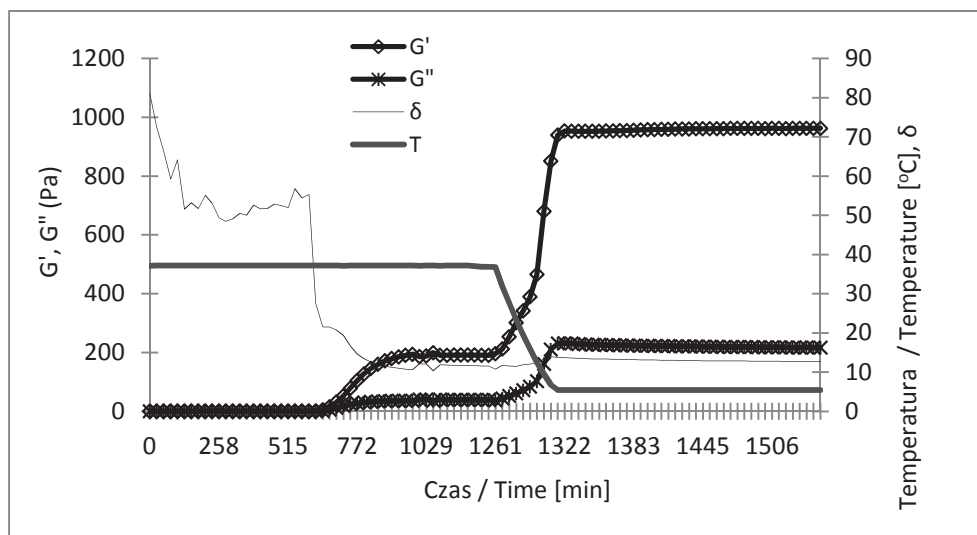
Tabela 3. Wartości modułu zachowawczego ( $G'$ ) i modułu stratności ( $G''$ ) mlecznych napojów, fermentowanych przez LA-5 (*L. acidophilus*), otrzymanych z OMP i PMP z dodatkiem preparatów białek mleka, oznaczone przy częstotliwości drgań 1 Hz.

Table 3. Values of storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) of milk beverages fermented by LA-5 (*L. acidophilus*) strain and produced from OMP and PMP with milk protein preparations added as determined at 1 Hz oscillation frequency.

Dodatek preparatu białek mleka Milk protein preparation added [%]	Moduły Modulus	$G', G''$ [Pa]				
		CGMP	$\alpha$ -la	WPC 65	SPD	WPI
OMP:						
0	$G'$	317 <sup>a</sup> ± 28				
	$G''$	103 <sup>abc</sup> ± 17				
0,5	$G'$	1482 <sup>c</sup> ± 27	2547 <sup>gh</sup> ± 24	4085 <sup>m</sup> ± 48	1504 <sup>c</sup> ± 16	3557 <sup>l</sup> ± 54
	$G''$	158 <sup>bc</sup> ± 23	172 <sup>bc</sup> ± 25	1190 <sup>j</sup> ± 36	167 <sup>bc</sup> ± 18	950 <sup>f</sup> ± 27
1	$G'$	7204 <sup>u</sup> ± 68	4942 <sup>o</sup> ± 45	2458 <sup>g</sup> ± 32	5211 <sup>p</sup> ± 50	3819 <sup>i</sup> ± 39
	$G''$	2069 <sup>n</sup> ± 26	1494 <sup>l</sup> ± 23	717 <sup>e</sup> ± 16	1506 <sup>l</sup> ± 22	1088 <sup>hi</sup> ± 40
2	$G'$	5447 <sup>r</sup> ± 50	5972 <sup>s</sup> ± 45	1907 <sup>d</sup> ± 21	2948 <sup>i</sup> ± 29	5567 <sup>r</sup> ± 49
	$G''$	1689 <sup>l</sup> ± 22	1863 <sup>m</sup> ± 39	575 <sup>d</sup> ± 30	887 <sup>t</sup> ± 24	1479 <sup>±</sup> 24
PMP:						
0	$G'$	523 <sup>a</sup> ± 34				
	$G''$	186 <sup>a</sup> ± 22				
0,5	$G'$	2059 <sup>k</sup> ± 29	2669 <sup>l</sup> ± 31	1558 <sup>ef</sup> ± 27	2533 <sup>l</sup> ± 29	2842 <sup>m</sup> ± 34
	$G''$	561 <sup>l</sup> ± 18	749 <sup>jl</sup> ± 21	434 <sup>igh</sup> ± 14	674 <sup>k</sup> ± 22	778 <sup>l</sup> ± 25
1	$G'$	1830 <sup>jl</sup> ± 27	2534 <sup>l</sup> ± 32	1156 <sup>c</sup> ± 26	1716 <sup>gh</sup> ± 30	2853 <sup>m</sup> ± 24
	$G''$	505 <sup>jl</sup> ± 14	709 <sup>kl</sup> ± 18	325 <sup>cd</sup> ± 16	460 <sup>ghi</sup> ± 10	758 <sup>l</sup> ± 15
2	$G'$	1289 <sup>d</sup> ± 33	4225 <sup>p</sup> ± 43	824 <sup>b</sup> ± 16	1525 <sup>ef</sup> ± 24	4241 <sup>p</sup> ± 37
	$G''$	391 <sup>ef</sup> ± 12	1284 <sup>p</sup> ± 21	234 <sup>ab</sup> ± 14	436 <sup>igh</sup> ± 22	1095 <sup>o</sup> ± 38

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

Dodatek preparatu białkowego ( $\alpha$ -la) do PMP wpłynął na skrócenie czasu tworzenia się skrzepu. Żele kwasowe z 1-procentowym dodatkiem  $\alpha$ -la zaczynały powstawać o około 30 min wcześniej niż próby bez dodatku preparatu białkowego. Zaobserwowane zjawisko można tłumaczyć tym, że wraz z upływem czasu ogrzewania roztworu białek serwatkowych zwiększa się ilość powstałych agregatów białkowych. Twardość jogurtów wzrasta wraz z wydłużaniem okresu agregacji roztworów białek serwatkowych, zastosowanych do produkcji mlecznych produktów [11]. Wraz z rozpoczęciem procesu żelowania wzrastały wartości  $G'$  i  $G''$ . Po upływie 25 h badane parametry osiągnęły odpowiednio: 963 oraz 217 Pa. Dodatek 1 %  $\alpha$ -la do mleka pełnego ukwaszonego szczepem LA-5 wpłynął na znaczne wzmocnienie struktury żeli mlecznych napojów fermentowanych.



T – temperatura / temperature

Rys. 3. Wpływ szczepu LA-5 (*L. acidophilus*) na zmiany modułu zachowawczego ( $G'$ ), modułu stratności ( $G''$ ) i kąta fazowego ( $\delta$ ) podczas fermentacji i przechowywania napojów mlecznych otrzymanych z PMP z 1-procentowym dodatkiem  $\alpha$ -la.

Fig. 3. Effect of LA-5 (*L. acidophilus*) strain on changes in storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), and phase angle ( $\delta$ ) during fermentation and storage of milk beverages produced from PMP with 1% of  $\alpha$ -la added.

Żele kwasowe otrzymane podczas fermentacji OMP i PMP przez szczep LA-5 charakteryzowały się stosunkowo dużym wyciekaniem serwatki (tab. 4). Produkty otrzymane z OMP wykazywały wyższy poziom synerезy w porównaniu z mlecznymi napojami otrzymanymi z PMP. Dodatek 0,5 % preparatów białek mleka w większości przypadków (za wyjątkiem WPI) powodował wyraźny wzrost synerезy zarówno w produktach otrzymanych z OMP, jak i PMP. Zwiększenie udziału poszczególnych preparatów białkowych w produktach powodowało stopniowy spadek ilości wydzielanej serwatki. Zmniejszenie poziomu synerезy w mlecznych napojach fermentowanych na skutek dodatku białek serwatkowych opisano dotychczas w kilku pracach naukowych [15, 22, 25].

Zjawisko synerезy zachodziło najintensywniej w produktach na bazie OMP z 0,5-procentowym udziałem SPD (25,48 %) oraz z 0,5-procentowym dodatkiem WPI. Najmniejsza ilość serwatki wydzielana się w próbach z 2-procentowym dodatkiem WPI i w napojach z OMP i PMP wynosiła odpowiednio: 1,97 i 3,25 %. Wraz ze wzrostem stężenia WPC 65 zarówno w produktach uzyskanych z mleka pełnego, jak i odtłuszczonego obserwowano zmniejszanie ilości wydzielanej serwatki. Podobną prawidłowość zaobserwowali Sordini i wsp. [28]. Większa zdolność wiązania wody w produktach

wzbogaconych dodatkiem koncentratu białek serwatkowych może być tłumaczona wyższym poziomem usieciowania tych skrzepów w porównaniu z jogurtami kontrolnymi [25, 27].

Tabela 4. Wielkość synerезy mlecznych napojów fermentowanych z dodatkiem preparatów białek mleka, otrzymanych w wyniku fermentacji przez szczep LA-5 (*L. acidophilus*).

Table 4. Syneresis volume of fermented milk beverages with milk protein preparations added, produced through the fermentation by LA-5 (*L. acidophilus*) strain.

Dodatek preparatu białek mleka Milk protein preparation added [%]	Synereza / Syneresis [%]				
	CGMP	$\alpha$ -la	WPC 65	SPD	WPI
OMP:					
0	12,07 <sup>de</sup> ± 0,69				
0,5	24,38 <sup>kl</sup> ± 1,12	21,14 <sup>hijkl</sup> ± 0,80	25,12 <sup>l</sup> ± 2,63	25,48 <sup>l</sup> ± 1,78	6,68 <sup>bc</sup> ± 0,71
1	16,73 <sup>fgh</sup> ± 0,63	13,58 <sup>def</sup> ± 0,78	13,67 <sup>def</sup> ± 1,00	21,42 <sup>ijkl</sup> ± 2,06	4,85 <sup>ab</sup> ± 0,63
2	16,63 <sup>efgh</sup> ± 1,09	9,85 <sup>cd</sup> ± 1,00	9,33 <sup>bcd</sup> ± 0,99	13,08 <sup>def</sup> ± 0,59	1,97 <sup>a</sup> ± 0,69
PMP:					
0	10,57 <sup>cdefg</sup> ± 1,68				
0,5	14,89 <sup>ijkl</sup> ± 1,17	10,75 <sup>cdefg</sup> ± 0,07	12,67 <sup>fghij</sup> ± 1,19	15,52 <sup>jk</sup> ± 0,59	8,80 <sup>bcd</sup> ± 1,00
1	11,62 <sup>efghi</sup> ± 0,60	10,43 <sup>cdefg</sup> ± 2,07	10,84 <sup>cdefg</sup> ± 1,03	13,28 <sup>ghijkl</sup> ± 0,89	7,75 <sup>bcd</sup> ± 0,90
2	10,90 <sup>defgh</sup> ± 0,60	6,68 <sup>b</sup> ± 0,77	9,31 <sup>bcd</sup> ± 0,27	11,44 <sup>efgh</sup> ± 0,71	3,25 <sup>a</sup> ± 0,37

Objaśnienia jak w tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

Otrzymane mleczne napoje fermentowane przechowywano przez 21 dni w warunkach chłodniczych. Jednym z podstawowych problemów w produkcji probiotycznych mlecznych napojów fermentowanych jest zmniejszenie liczby bakterii probiotycznych podczas przechowywania [12]. Zmiany liczby komórek bakterii *L. acidophilus* LA-5 podczas chłodniczego przechowywania mlecznych napojów fermentowanych otrzymanych z PMP z 1-procentowym dodatkiem wybranych preparatów białkowych przedstawiono w tab. 5. Wraz z upływem czasu chłodniczego przechowywania napojów liczba komórek bakterii stopniowo malała we wszystkich produktach. Niezależnie od składu białkowego skrzepu, po pierwszym dniu przechowywania prób

w warunkach chłodniczych liczba komórek szczepu LA-5 utrzymywała się na poziomie  $10^8$ . W kolejnych dniach chłodniczego przechowywania prób zaobserwowano zmniejszenie liczby komórek szczepu LA-5 o jeden rząd wielkości. Po upływie 21 dni najmniejszą liczbę komórek bakteryjnych zawierały fermentowane napoje mleczne uzyskane z pełnego mleka w proszku z 1-procentowym dodatkiem CGMP ( $1,14 \times 10^7$  jtk/ml). Najwyższą liczbę komórek bakteryjnych  $3,51 \times 10^7$  jtk/ml w ostatnim dniu chłodniczego przechowywania zaobserwowano w próbach kontrolnych.

Tabela 5. Przeżywalność szczepu LA-5 (*L. acidophilus*) w mlecznych napojach fermentowanych z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka, podczas chłodniczego przechowywania.

Table 5. Survival of LA-5 (*L. acidophilus*) strain in fermented milk beverages with some selected milk protein preparations added, during cold storage.

Czas przechowywania Time of storage [dni/days]	LA-5 [jtk/ml / cfu/ml]		
	PMP	PMP + 1 % CGMP	PMP + 1 % WPC 65
1	$2,45 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
7	$5,47 \times 10^7$	$6,20 \times 10^7$	$6,63 \times 10^7$
14	$3,54 \times 10^7$	$1,54 \times 10^7$	$4,10 \times 10^7$
21	$3,51 \times 10^7$	$1,14 \times 10^7$	$2,81 \times 10^7$

W napojach fermentowanych otrzymanych z pełnego mleka w proszku najwyższą liczbę komórek bakterii uzyskano w próbach z 1-procentowym dodatkiem WPC 65. Po 7 dniach chłodniczego przechowywania prób liczba bakterii kształtowała się na poziomie  $6,63 \times 10^7$  jtk/ml, a po upływie 14 dni zmalała do  $4,10 \times 10^7$  jtk/ml. Zwiększoną liczbę komórek *L. acidophilus* w porównaniu z próbą kontrolną podczas chłodniczego przechowywania jogurtów z dodatkiem WPC zaobserwowali również Kailasapathy i Supriadi [16].

Po upływie kolejnych 7 dni nastąpiło znaczące obniżenie liczby komórek bakterii badanego szczepu w mlecznych napojach fermentowanych z dodatkiem WPC 65 w porównaniu z próbą kontrolną.

## Wnioski

1. Preparaty białek mleka zastosowane do produkcji mlecznych napojów fermentowanych stymulowały wzrost probiotycznego szczepu bakterii *Lb. acidophilus* LA-5.
2. Dodatek preparatów białek serwatkowych miał wpływ na właściwości reologiczne mlecznych napojów fermentowanych, uzyskanych przy udziale szczepu LA-5.

- Produkty mleczne otrzymywane z mleka odtłuszczonego charakteryzowały się wyższymi wartościami takich parametrów, jak twardość oraz moduł zachowawczy.
3. Wraz ze wzrostem stężenia  $\alpha$ -la i WPI wzrastała twardość żeli kwasowych otrzymanych przy użyciu szczepu *Lb. acidophilus* LA-5.
  4. Dodatek  $\alpha$ -la w ilości 1 % wpłynął na skrócenie czasu powstania kwasowego skrzepu z mleka pełnego fermentowanego przez *Lb. acidophilus* LA-5.
  5. Napoje otrzymane z odtłuszczonego mleka charakteryzowały się wyższym poziomem synerезy w porównaniu z mlecznymi napojami z mleka pełnego.
  6. Wzrost dodatku preparatów białek mleka w napojach powodował stopniowe zmniejszanie ilości wydzielonej serwatki.
  7. Po dwutygodniowym okresie przechowywania w warunkach chłodniczych napojów uzyskanych z pełnego mleka w proszku, najwyższą liczbę bakterii szczepu *Lb. acidophilus* LA-5 oznaczono w próbach z 1-procentowym dodatkiem WPC.

### Literatura

- [1] Amatayakul T., Sherkat F., Shah N.P.: Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. *Food Hydrocoll.*, 2006, **20**, 314-32.
- [2] Avonts L., van Uytven E., de Vuyst L.: Cell growth and bacteriocin production of probiotic. *Int. Dairy J.*, 2004, **14**, 947-955.
- [3] Bemardeau M., Vernoux J.P., Dubemet S.H., Gueguen M.: Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, **126**, 278-285.
- [4] Bonczar G., Wszolek M., Siuta A.: The effect of certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. *Food Chem.* 2002, **79**, 85-91.
- [5] Coconier M.H., Lievin V., Hemery E., Servin A.L.: Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vivo* and *in vitro* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain L.B. *Appl. Environ. Microb.*, 1998, **64** (11), 4573-4580.
- [6] Donkor O.N., Nilmini S., Stolic P., Vasiljevic T., Shah N.: Survival and activity of selected probiotic lactic acid bacteria and probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.*, 2007, **17**, 657-665.
- [7] Drgalic I., Tratnik L., Bozanic R.: Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. *Lait*, 2005, **85**, 1-9.
- [8] Gill H.S., Doull F., Rutherford K.J., Cross, M.L.: Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.*, 2000, **84** (1), 111-117.
- [9] Goderska K., Andrzejewska E., Szkaradkiewicz A., Czarnecki Z.: Antagonistyczny wpływ *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 na bakterie patogenne izolowane od ludzi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **3** (82), 114 -131.
- [10] Gustaw W., Kordowska-Wiater M., Koziół J.: The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yoghurt production. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2011, **10** (4), 455-66.
- [11] Gustaw W., Sz wajgier D., Mleko S: The rheological properties of yoghurt with the addition of lyophilized polymerized whey protein. *Milchwissenschaft*, 2009, **1** (64), 60-64.
- [12] Gustaw W.: Effect of addition of whey protein aggregates obtained by single and double heating method on the rheological properties of set yoghurts. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2007, **3** (52), 33-36.

- [13] Guzman Gonzalez M., Morais F., Ramos M., Amigo L.: Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 1117-1122.
- [14] Haq I., Mukhtar H.: Biosynthesis of protease from *Lactobacillus paracasei*: Kinetic analysis of fermentation parameters. *Indian J. Biochem. Bioph.*, 2006, **43**, 377-381.
- [15] Isleten M., Karagul-Yuceer Y.: Effects of dried dairy ingredients on physical and sensory properties of nonfat yogurt. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89** (8), 2865-2872.
- [16] Kailasapathy K., Supriadi D.: Effect of whey protein concentrate on the survival of *Lactobacillus acidophilus* in lactose hydrolyzed yogurt during refrigerated storage. *Milchwissenschaft*, 1996, **51** (10), 566-569.
- [17] Kisielewska E., Kordowska-Wiater M.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i mikrobiologii żywności. Wyd. UP w Lublinie, Lublin 2004.
- [18] Klewicka E., Libudzisz Z., Czajka D., Kuc K.: Antagonistyczna aktywność bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1999, **4** (21) Supl., 168-175.
- [19] Libudzisz Z.: Probiotyki i prebiotyki w fermentowanych napojach mlecznych. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 2002, **4** (1), 19-25.
- [20] Mccomas Jr. K.A., Gilliland S.E.: Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *J. Food Sci.*, 2003, **68** (6), 2090-2095.
- [21] Meisel H., Fitzgerald R.J.: Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.*, 2003, **9**, 1289-1295.
- [22] Patocka G., Cervenková R., Narine S., Jelen P.: Rheological behaviour of dairy products as affected by soluble whey protein isolate. *Int. Dairy J.*, 2006, **16** (5), 399-405.
- [23] Pescuma M., Hébert E.M., Mozzi F., Font de Valdez G.: Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiol.*, 2008, **25** (3), 442-451.
- [24] PN-EN ISO 4833:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [25] Puvanenthiran A., Williams R.P.W., Augustin M.A.: Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey proteins ratios. *Int. Dairy J.*, 2002, **12**, 383-391.
- [26] Ramchandran L., Shah N.P.: Effect of addition of Versagel on microbial, chemical, and physical properties of low-fat yogurt. *J. Food Sci.*, 2008, **73** (7), 360-367.
- [27] Remeuf F., Mohammed S., Sodini I., Tissier J.P.: Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *Int. Dairy J.*, 2003, **13**, 773-782.
- [28] Sodini I., Montella J., Tong P.: Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey proteins concentrates. *J. Sci. Food Agric.*, 2005, **85**, 853-859.
- [29] Solowiej B., Mleko S., Gustaw W., Udeh K.O.: Effect of whey protein concentrates on texture, meltability and microstructure of acid casein processed cheese analogs. *Milchwissenschaft*, 2010, **2** (65), 169-173.
- [30] Zaręba D.: Przeżywalność probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* w mleku niefermentowanym i fermentowanym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5** (60), 189-196.
- [31] Ziarno M.: Prozdrowotne właściwości bakterii mlekowych. *Przegl. Mlecz.*, 2004, **54** (11), 4-10.

## EFFECT OF SELECTED MILK PROTEIN PREPARATIONS ON GROWTH AND SURVIVAL OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* AS WELL AS ON RHEOLOGICAL PROPERTIES OF FERMENTED MILK BEVERAGES

### Summary

Whey proteins are a source of bioactive peptides and contain amino acids that are essential to the human body to properly function. Milk protein preparations used in the production of fermented milk beverages stimulated the growth of *Lb. acidophilus* LA-5 strain. A supplement of  $\alpha$ -lactalbumin added to the whole milk caused the time of curd formation with the use of *Lb. acidophilus* LA-5 strain to be reduced. After a two week period of cold storage of the fermented milk beverages produced from the whole milk powder, the highest cell count ( $4.1 \times 10^7$  cfu/ml) of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 strain was reported in the products enriched with WPC 65 added in an amount of 1 %. The beverages produced with a 2 % of WPI added were characterized by the highest values of hardness (1.51 N) and storage modulus G' (5567 Pa). Along with the increasing concentration of  $\alpha$ -la and WPI, the hardness increased of the acid gels produced with the application of *Lb. acidophilus* LA-5 strains. The fermented milk beverages made from skimmed milk were characterized by higher values of the parameters such as hardness and storage modulus. However, the milk beverages from skimmed milk had higher levels of syneresis compared to beverages from the whole milk. The increase in the amount of milk protein preparations added to the beverages caused the amount of separated whey to gradually decrease. The milk beverages with 2 % of WPI added were characterized by the lowest value of syneresis (1.97 %). The enriching of fermented milk beverages with milk protein preparations improves physical and chemical properties of those beverages, influences the increase in their pro-health values, and gives those products the characteristics of functional beverages.

**Key words:** milk protein preparations, probiotic bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, syneresis, texture 