

JUSTYNA KOZIÓŁ, KATARZYNA SKRZYPCZAK, WALDEMAR GUSTAW,
ADAM WAŚKO

WPLYW PREPARATÓW BIAŁEK MLEKA NA WZROST BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

Streszczenie

Probiotyczne szczepy z rodzaju *Bifidobacterium* słabo namnażają się w mleku. Celem niniejszej pracy była modyfikacja podłoża Garchesa przez zmianę źródła azotu na wybrane preparaty białek mleka oraz sprawdzenie ich zdolności do stymulowania wzrostu bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium*. Najwyższą aktywnością proteolityczną charakteryzowały się szczepy Bi30 i KD14, nieznacznie niższe wartości oznaczono w przypadku pozostałych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*. Najkorzystniejszą dla wzrostu szczepu Bb-12 pożywką z dodatkiem preparatów białek serwatkowych było podłoże zawierające izolat białek serwatkowych (WPI) ($1,2 \times 10^8$ jtk/ml). Na podstawie wyników uzyskanych po hodowli szczepu KN29 stwierdzono, że składnikiem podłoża hodowlanego zaprojektowanego przy użyciu modelu Placketta-Burmana, w największym stopniu stymulującym wzrost tego szczepu, były WPI oraz α -laktoalbumina (α -la). Największe zagęszczenia komórek bakterii szczepu Bb-12 i KN29 uzyskano podczas wzrostu na podłożach z dodatkiem kazeinianu sodu (KNa) i kazeinianu wapnia (KCa), a w przypadku preparatów białek serwatkowych – WPI i α -la.

Słowa kluczowe: *Bifidobacterium*, aktywność proteolityczna, plan Placketta-Burmana, WPI, α -laktoalbumina

Wprowadzenie

Wraz z poznaniem pozytywnego wpływu bakterii fermentacji mlekowej na zdrowie człowieka podjęto próby stosowania konkretnych gatunków, a nawet szczepów bakterii do produkcji mlecznych napojów fermentowanych. Probiotyczne szczepy z rodzaju *Bifidobacterium* słabo namnażają się w mleku. Przebadano wiele substancji o właściwościach prebiotycznych, które mogłyby zostać włączone w skład produktów mlecznych [9, 10]. W literaturze publikowane są liczne informacje dotyczące stymulowania wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* przez oligosacharydy [7, 11, 18,

Dr J. Koziół, mgr inż. K. Skrzypczak, dr A. Waśko, Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności; dr hab. W. Gustaw, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów; Wydż. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

26, 28]. Znacznie mniej badań dotyczyło wykorzystania różnych białek mleka jako substancji stymulujących wzrost bakterii probiotycznych.

Białka mleka mają bogaty skład aminokwasowy i zawierają wszystkie niezbędne aminokwasy, które są źródłem azotu organicznego dla bakterii [12, 17]. Kazeinoma-kropeptyd (CMP) wzbudził największe zainteresowanie wśród białek mleka ze względu na jego właściwości stymulujące wzrost bakterii probiotycznych. W badaniach nad wpływem CMP na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* nie uzyskano jednak jednoznacznych wyników. Azuma i wsp. [1] zaobserwowali stymulujący wpływ CMP wyizolowanego z mleka kobycego na wzrost *B. infantis*. Poch i Bezkorovainy [24] nie stwierdzili podobnej zależności przy wykorzystaniu CMP z mleka krowiego. Natomiast Idota i wsp. [15] z powodzeniem wykorzystali CMP z mleka krowiego jako stymulator wzrostu *Bifidobacterium* spp. Odmiennie wyniki prawdopodobnie były spowodowane różną zawartością aminocukrów w CMP pochodzącym z mleka kobycego i krowiego – ich udział w CMP z mleka krowiego jest trzy razy mniejszy [22]. Udowodniono również wpływ kazeinianu sodu na stymulację wzrostu bakterii probiotycznych. Mleczne napoje fermentowane suplementowane tym dodatkiem charakteryzowały się większą liczbą komórek *B. animalis* ssp. *lactis* niż produkty, w których źródłem białka było tylko odtłuszczone mleko w proszku. Określono również wpływ różnych kombinacji preparatów białkowych, z których najlepszymi stymulatorami wzrostu *B. animalis* ssp. *lactis* okazał się koncentrat białek serwatkowych (WPC), zastosowany wraz z kazeinianem sodu oraz odtłuszczone mlekiem w proszku. Na tym podłożu liczba bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wynosiła 7,8 log jtk/ml w porównaniu z 6,9 log jtk/ml w próbie kontrolnej [21].

Celem niniejszej pracy była modyfikacja podłoża Garchesa przez zmianę źródła azotu na wybrane preparaty białek mleka i określenie ich zdolności do stymulowania wzrostu bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium*.

Material i metody badań

W badaniach zastosowano następujące preparaty białek mleka: odtłuszczone mleko w proszku (OMP) (OSM Krasnystaw), koncentraty białek serwatkowych WPC 35 (Laktopol, Warszawa), WPC 65 i WPC 80 (Milei, Leutkirch, Niemcy), izolat białek serwatkowych (WPI) (Milei, Leutkirch, Niemcy), serwatkę w proszku (SP) (OSM Krasnystaw), serwatkę w proszku demineralizowaną (SPD) (Euroserum, Port-sur-Saône, Francja), serwatkę w proszku o obniżonej zawartości laktozy (SPOL) (Foremokus Baraboo, WI, USA), kazeinoglikomakropeptyd (CGMP) i α - laktoalbuminę (α - la) (Arla Food, Dania), kazeinian sodu (KNa) i wapnia (KCa) (Polsero, Sokołów Podlaski). Skład chemiczny preparatów przedstawiono w tab. 1.

W badaniach wykorzystano również ekstrakt drożdżowy, peptobak, i chlorowodorek cysteiny (BTL Polska), laktozę (PARK Scientific Ltd. Northampton, U. K), octan sodu, wodorofosforan sodu i diwodorofosforan potasu (POCH, Gliwice).

W badaniach użyto następujących szczepów bakterii: Bb-12 – *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (Chr. Hansen, Polska), ATCC1567 – *Bifidobacterium infantis* (American Type Culture Collection), KN29 – *Bifidobacterium longum*, KD14 – *Bifidobacterium catenulatum* i Bi30 – *Bifidobacterium animalis* (PAN, Olsztyn).

Tabela 1

Skład chemiczny preparatów białek mleka (wg producentów) [%].

Chemical composition of milk protein preparations (by manufacturers) [%].

Lp. No.	Preparat Preparate	Białko Protein	Laktoza Lactose	Tłuszcz Fat	Zw. miner. jako popiół Ash	Woda Water
1.	OMP	32,40	51,20	0,75	–	3,35
2.	PMP	26,00	38,00	26,25	–	3,15
3.	WPC 35	35,50	48,50	3,70	7,70	4,50
4.	WPC 65	65,00	20,00	5,00	4,00	5,00
5.	WPC80	80,00	5,00	5,00	3,00	5,00
6.	WPI	90,00	1,00	1,00	2,00	5,00
7.	SP	10,10	69,20	8,50	8,10	3,90
8.	SPD	12,50	79,90	1,30	2,70	3,10
9.	SPOL	23,70	–	–	14,80	2,81
10.	CGMP	85,00	2,00	0,50	6,50	5,00
11.	α-LA	88,00	10,00	2,00	5,00	5,50
12.	KNa	88,20	–	1,50	–	5,80
13.	KCa	88,15	–	1,50	–	5,95

Określenie wpływu składników podłoża na wzrostu szczepów z rodzaju Bifidobacterium z wykorzystaniem planu Placketta-Burmana

Wpływ wybranych preparatów białek mleka na wzrost szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* badano, wykorzystując plan Placketta-Burmana. Skład kombinacji podłoży hodowlanych Garchesa wyznaczono za pomocą programu statystycznego Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Obejmował on 12 podłoży bulionu Garchesa o zróżnicowanym składzie (tab. 2).

Tabela 2

Skład podłoży hodowlanych Garchesa po modyfikacjach.
Modification of the Garches media composition.

Nr podłoża Medium No.	Składniki podłoża / Compounds in medium										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1.	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
2.	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
3.	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
4.	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
5.	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
6.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
7.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
8.	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
9.	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
10.	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
11.	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+

Objaśnienia: / Explanatory notes:

A – ekstrakt drożdżowy/ yeast extract, B – peptobak, C – chlorowodorek cysteiny/ cysteine hydrochloride, D – laktoza/ lactose, E – octan sodu/ sodium acetate, F – Na₂HPO₄, G – KH₂PO₄, H – WPI, I – WPC 80, J – CGMP, K – α-la.

Szczepy *Bifidobacterium* przechowywano w sterylnym roztworze glicerolu w temp. -80 °C. W celu przygotowania inoculum odważano składniki bulionu Garchesa o podstawowym składzie [27]. Zawiesiny komórek bakteryjnych przenoszono po 100 µl do przygotowanego wcześniej bulionu Garchesa. Zaszczepione pożywki inkubowano w cieplarni w temp. 37 °C przez 24 h. Otrzymane inoculum służyło do zaszczepiania właściwych podłoży hodowlanych. Hodowle wszystkich szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* prowadzono w probówkach, w 10 ml jałowego bulionu Garchesa o zmodyfikowanym składzie. Każde z 12 podłoży sporządzano w dwóch powtórzeniach. Podłoża zaszczepiano 100 µl inoculum oraz zatykano watą. Korki nasączano 250 µl 30-procentowego roztworu pirogalolu oraz 250 µl nasyconego roztworu kwasnego węgla sodu. Dodatkowo próbki zamykano gumowymi korkami w celu zapewnienia beztlenowych warunków wzrostu. Hodowle prowadzono w cieplarni w temp. 37 °C przez 72 h. Po inkubacji szczepów bakteryjnych na podłożach z dodatkiem komponentów białkowych wykonywano szereg rozcieńczeń hodowli płynnych w celu przygotowania posiewów płytkowych. Inkubację płytek prowadzono w słojach do hodowli beztlenowych (OXOID, Hampshire, UK) z użyciem wkładów AnaeroGEN

(OXOID, Hampshire, UK). Hodowle prowadzono przez 72 h w temp. 37 °C. Po zakończeniu hodowli bakteryjnych obliczano ogólną liczbę bakterii [20].

Określenie wpływu wybranych preparatów białek mleka na dynamikę wzrostu szczepów z rodzaju Bifidobacterium z wykorzystaniem pomiaru gęstości optycznej hodowli bakteryjnych (OD)

Podłoża hodowlane sterylizowano w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 min. Po wystudzeniu każdą z pożywek przenoszono za pomocą pipety automatycznej do dołków na mikropłytkach hodowlanych (każda mikropłytką zawierała 100 ponumerowanych dołków) w ilości 350 µl do każdego dołka. Każdy rodzaj podłoża hodowlanego o zmodyfikowanym składzie przenoszony był do 10 dołków, z czego dwa pierwsze stanowiły próbę kontrolną (do nich przenoszono po 400 µl podłoża hodowlanego), natomiast pozostałe zaszczepiano 50 µl inoculum. Hodowle bakteryjne prowadzono w aparacie Bioscreen C (OY Growth Curves, Finlandia) w temp. 37 °C przez 96 h.

Oznaczanie aktywności proteolitycznej szczepów z rodzaju Bifidobacterium

Aktywność proteolityczną oznaczano metodą OPA [4]. W celu oznaczenia tej aktywności poszczególne szczepy namnażano na podłożu MRS w temp. 37 °C przez 12 h. Do 10-procentowego regenerowanego mleka odtłuszczonego dodawano 1% zawiesiny komórek bakteryjnych. Po dokładnym wymieszaniu próbki inkubowano w temp. 37 °C przez 24 h, łącznie z próbą kontrolną (mleko bez dodatku bakterii). Do 2,5 ml fermentowanego mleka, dokładnie wymieszanego przy użyciu vortexu, dodawano 0,5 ml wody destylowanej i 5 ml 0,75 M TCA (kwas trichlorooctowy) (Sigma-Aldrich, Polska), po czym mieszano do czasu koagulacji mleka. Do odwirowanego (13000 × g przez 15 min.) i przeniesionego do kwarcowej kuwety supernatantu (50 µl) dodawano 1 ml OPA (FLUKA, Buchs, Szwajcaria). Po wymieszaniu roztwór inkubowano przez 2 min. w temp. otoczenia. Następnie mierzono absorbancję ($\lambda = 340$ nm) w stosunku do próby kontrolnej, przy użyciu spektrofotometru BIO-RAD Smart SpecTM Plus (Hercules, USA). Obliczano ilość uwolnionych α -aminokwasów (mM/l). Analizę wykonywano w trzech powtórzeniach.

Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi szacowano testem Tukeya na poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* potrzebują do wzrostu wolnych aminokwasów i peptydów w podłożu. Mleko jest słabą pożywką dla bakterii probiotycznych, co

prawdopodobnie wynika z niewielkiej zawartości wolnych aminokwasów, jak i słabej aktywności proteolitycznej bakterii, szczególnie z rodzaju *Bifidobacterium* [24, 29]. W tab. 3. przedstawiono aktywność proteolityczną badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*. Najwyższą aktywnością proteolityczną charakteryzowały się szczepy Bi30 i KD14, nieznacznie niższe wartości oznaczono w przypadku pozostałych szczepów *Bifidobacterium*.

Tabela 3

Aktywność proteolityczna szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* [mM/l].

Proteolytic activity of strains of *Bifidobacterium* genus [mM/l].

Bb-12 $\bar{x} \pm s / SD$	ATCC1567 $\bar{x} \pm s / SD$	KN29 $\bar{x} \pm s / SD$	KD14 $\bar{x} \pm s / SD$	Bi30 $\bar{x} \pm s / SD$
991 ^a ± 147	1061 ^a ± 10	907 ^a ± 103	1524 ^b ± 201	1693 ^b ± 80

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s / SD$ – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation;

Różnice między wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ($p < 0,05$) / Differences between mean values denoted by different letters are statistically significant ($p < 0.05$).

Donkor i wsp. [8], po przeanalizowaniu zdolności proteolitycznych *B. lactis* B94 i *B. longum* BI 536 po 24 h fermentacji, stwierdzili, że były one o około 50 % mniejsze w porównaniu z *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. W badaniach poświęconych określeniu wpływu wybranych bakterii probiotycznych na proteolizę serów podczas dojrzewania stwierdzono, że *B. lactis* nie wykazał żadnej działalności proteolitycznej w przeciwieństwie do *L. acidophilus* [2].

W tab. 4. przedstawiono wyniki badań liczby szczepów *Bifidobacterium* hodowanych na modyfikowanych podłożach Garchesa. Skład podłoży wyliczono, stosując plan Placketta-Burmana zgodnie z wcześniej stosowaną metodyką [25, 30]. Najkorzystniejszym podłożem hodowanym z dodatkiem preparatów białek serwatkowych do wzrostu szczepu Bb-12 okazało się podłoże nr 2, zawierające WPI ($1,2 \times 10^8$ jtk/ml). W przypadku szczepu ATCC1567 najlepszą kombinacją było również podłoże nr 2 zawierające WPI ($4,9 \times 10^7$ jtk/ml). W przypadku szczepu KB14 stwierdzono, że najlepszymi zmodyfikowanymi podłożami hodowanymi były kombinacje nr 4 ($3,1 \times 10^7$ jtk/ml), 5 ($3,1 \times 10^7$ jtk/ml) i 6 ($3,1 \times 10^7$ jtk/ml). W skład tych podłoży wchodziły następujące preparaty białek mleka: CGMP, WPC80 jak i α -la. Szczep KN29 namnażał się najlepiej na podłożu zmodyfikowanym nr 5 ($2,4 \times 10^7$ jtk/ml), zawierającym CGMP oraz WPC80. Natomiast najlepszą pożywką dla szczepu Bi30 było podłoże nr 7 ($6,5 \times 10^7$ jtk/ml), w którym jako komponenty białkowe zastosowano WPC80 oraz α -la.

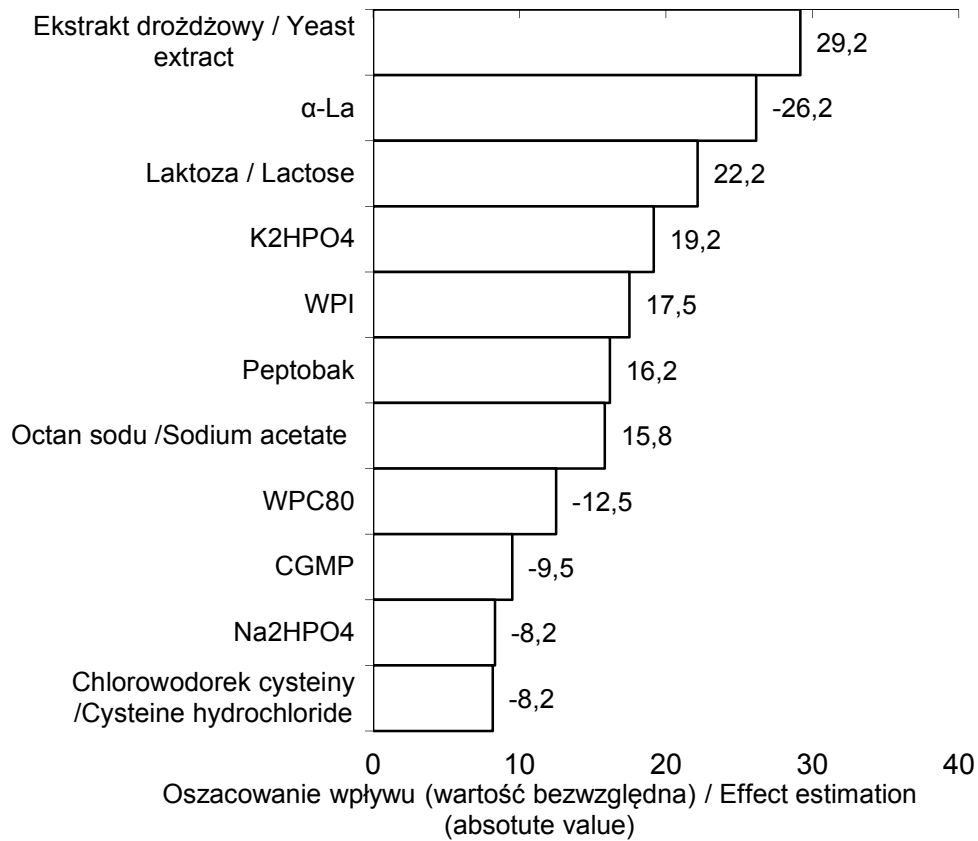
Tabela 4

Liczba bakterii różnych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* na podłożu Garches o zmodyfikowanym składzie wyznaczonym wg planu Placketta-Burmana [jtk/ml].

Bacteria count of different strains of *Bifidobacterium* genus in Garches medium having composition modified according to Plackett-Burman design [cfu/ml].

Nr podłoża Culture medium number	Bb-12	ATCC1567	KB14	Kn29	Bi30
1	$3,3 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
2	$1,2 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$
3	$8,0 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$6,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$
4	$4,4 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	$5,6 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7$
5	$2,0 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
6	$1,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^7$
7	$2,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$6,5 \times 10^7$
8	$1,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
9	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$9,5 \times 10^6$	$9,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$
10	$1,6 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
11	$2,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$3,1 \times 10^6$
12	$3,1 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$8,6 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$

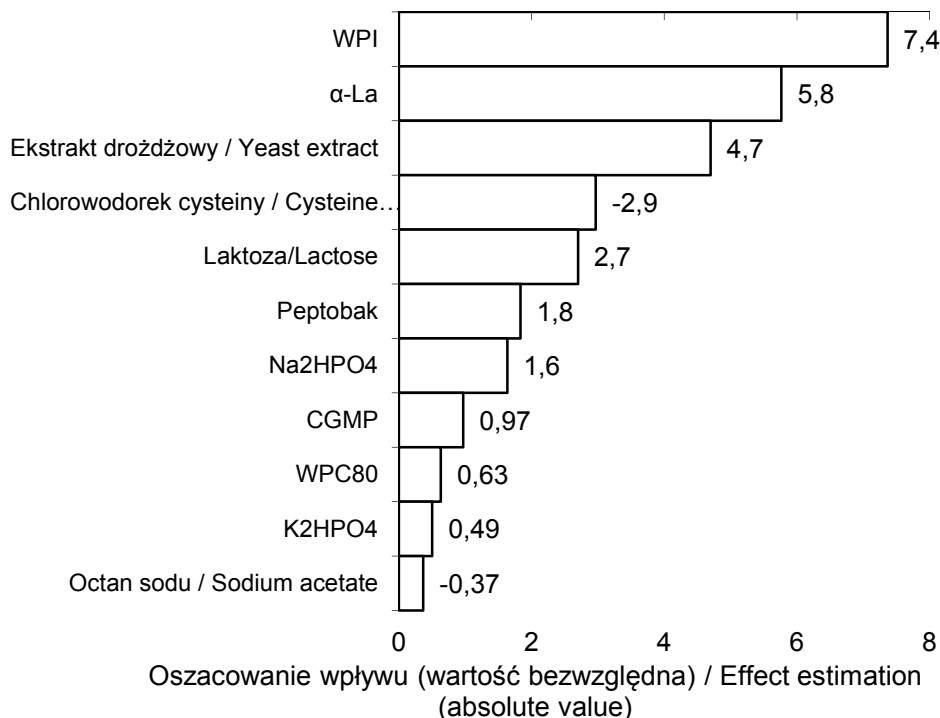
Wyniki badań przedstawione w tab. 4. poddano analizie wariancji z zastosowaniem programu statystycznego Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Poszczególne składniki wchodzące w skład podłoża hodowlanych wpływały w różnym stopniu na wzrost analizowanych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Preparaty białkowe, takie jak: WPI, i α -la stymulowały wzrost badanych szczepów bakteryjnych. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunkach 1 – 3. Najlepszym komponentem wpływającym na wzrost szczepu Bb-12 był ekstrakt drożdżowy oraz α -la (rys. 1). Wartości ujemne widoczne przy niektórych składnikach podłoża wskazywały na zastosowanie ich w maksymalnej ilości w podłożu. Większa ilość danego składnika nie będzie miała dodatkowego wpływu na wzrost badanego szczepu bakterii. Wodorofosforan sodu i chlorowodorek cysteiny nie miały większego wpływu na namnażanie się szczepu Bb-12.



Rys. 1. Wpływ komponentów podłoża na wzrost szczepu *B. animalis* ssp. *lactis* - Bb-12.

Fig. 1. Effect of medium components on growth of *B. animalis* ssp. *lactis* - Bb-12 strain.

Składnikiem podłoża hodowlanego w największym stopniu stymulującym wzrost szczepu KN29 były WPI (7,4) oraz α -la (5,8) (rys. 2). Na wzrost badanego szczepu najslabszy wpływ miały K_2HPO_4 (0,49) oraz octan sodu (-0,37). Najlepszym stymulatorem wzrostu szczepu ATCC1567 był ekstrakt drożdżowy (18,2). Udziały laktozy (9,6) oraz α -la (9,5) były na podobnym poziomie. Wpływ CGMP (0,87) był nieistotny w stymulacji wzrostu szczepu ATCC1567.



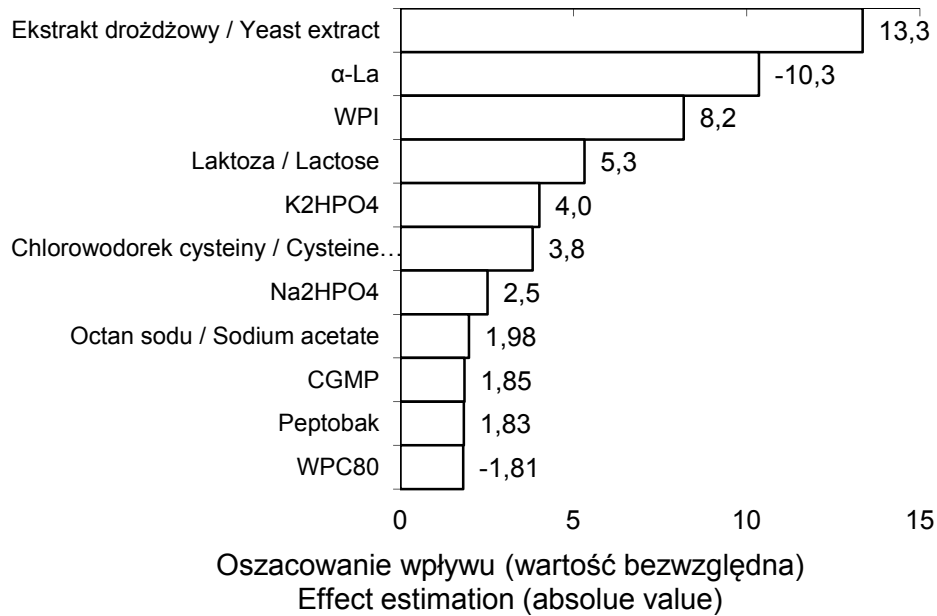
Rys. 2. Wpływ komponentów podłoża na wzrost szczepu *B. longum* -KN29.

Fig. 2. Effect of medium components on growth of *B. longum* -KN29 strain.

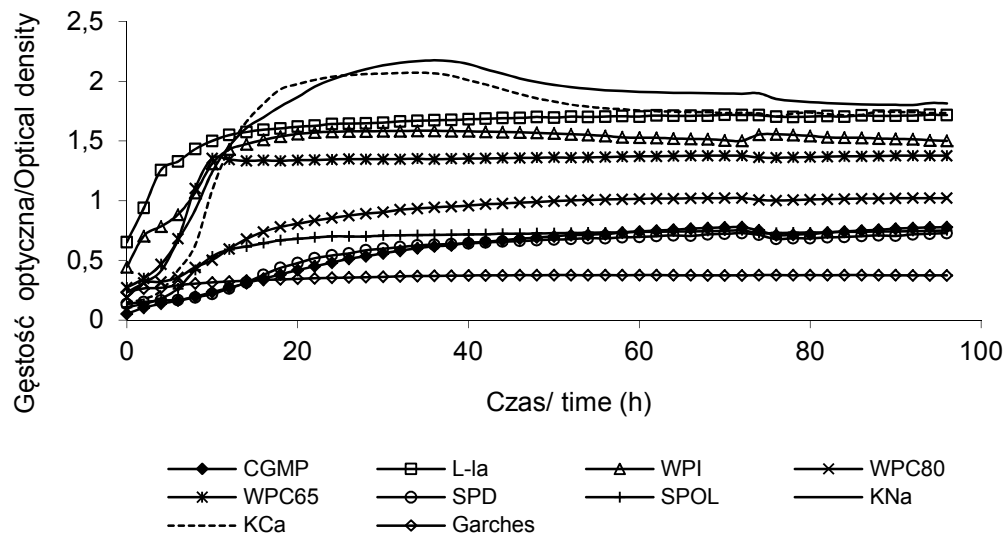
Substancjami, które najlepiej stymulowały wzrost szczepu KD14 okazały się ekstrakt drożdżowy (13,3) oraz α -la (-10,3) (rys. 3). Nieznacznie mniejszy wpływ na wzrost wyżej wymienionego szczepu miał WPI (8,2). Jednak w porównaniu z pozostałymi składnikami podłoża hodowlanego jego udział w stymulacji wzrostu KD14 można określić jako znaczny. Najmniejszy wpływ na namnażanie szczepu KD14 wywierał dodatek WPC80 (-1,81).

Czynnikami promującymi wzrost szczepu BI30 były α -la i WPI. Pozostałe składniki podłoża słabiej wpływały na wzrost szczepu Bi30. Natomiast komponentami podłoża hodowlanego, które wykazały niewielki wpływ na stymulację wzrostu szczepu Bi30 były octan sodu i laktoza (5,8).

Janer i wsp. [16] stwierdzili stymulowanie wzrostu *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* i *B. infantis* dodatkiem WPI i hydrolizatu pepsynowego WPI [16]. Petschow i Talbott [23] wykazali, że α -la z mleka krowiego stymulowała wzrost *B. breve* i *B. infantis*. Białko to wpływało na poprawę namnażania *Bifidobacterium* spp. już przy stężeniu 3,5 mg/ml [14].

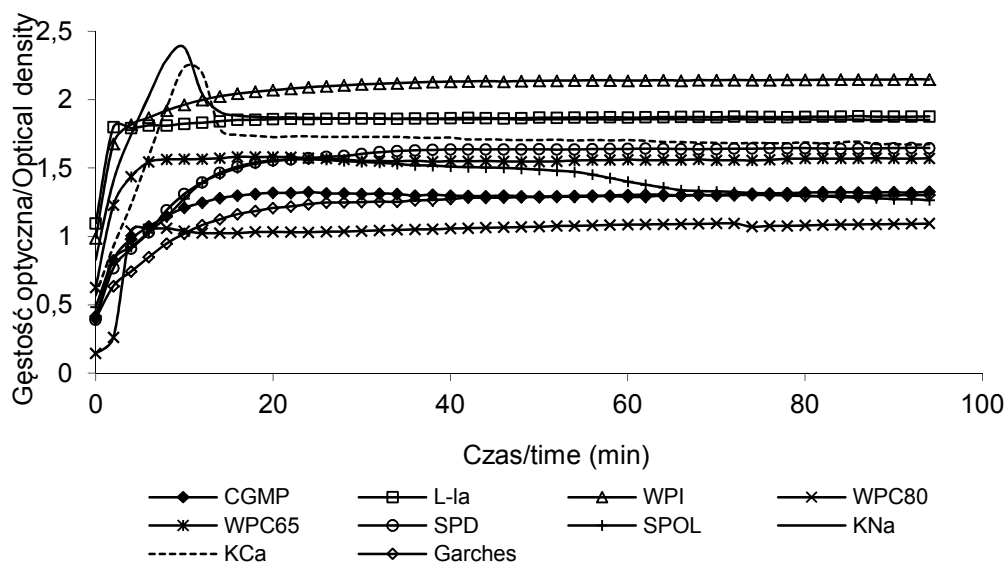


Rys. 3. Wpływ komponentów podłoża na wzrost szczepu *B. catenulatum* -KD14.
 Fig. 3. Effect of medium components on growth of *B. catenulatum* -KD14 strain.



Rys. 4. Wpływ białek mleka na wzrost szczepu Bb-12 (*B. animalis* ssp. *lactis*) na podłożu Garchesa podczas 96 h hodowli w temp. 37 °C.
 Fig. 4. Effect of milk proteins on growth of *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 strain on Garches medium during 96 h incubation at a temperature of 37 °C.

W następnym etapie przebadano wpływ szerokiej gamy preparatów białkowych na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Na rys. 4 - 6 przedstawiono zmiany gęstości optycznej (OD) podczas hodowli wybranych szczepów *Bifidobacterium* na zmodyfikowanym podłożu Garchesa w ciągu 96 h. Najwyższe wartości OD zanotowano podczas wzrostu szczepu Bb-12, na podłożach z dodatkiem KNa i KCa, co wskazuje na największe zagęszczenie komórek bakterii na tych podłożach (rys. 4). Hodowle z dodatkiem KNa oraz KCa osiągnęły największą gęstość optyczną pomiędzy 15. a 40. godziną inkubacji. Po 40 h hodowli wartość OD utrzymywała się na podobnym poziomie do końca trwania inkubacji. Otrzymane wyniki potwierdzają obserwacje innych naukowców, którzy wykazali lepszy wzrost *B. animalis* ssp. *lactis* w fermentowanych produktach otrzymywanych z dodatkiem kazeinianu sodu w porównaniu z produktami, w których źródłem białka było tylko odtłuszczone mleko w proszku [21]. Wzbogacenie mleka hydrolizatami kazeiny wpływało na polepszenie właściwości fermentacyjnych *Bifidobacterium* spp. [29].



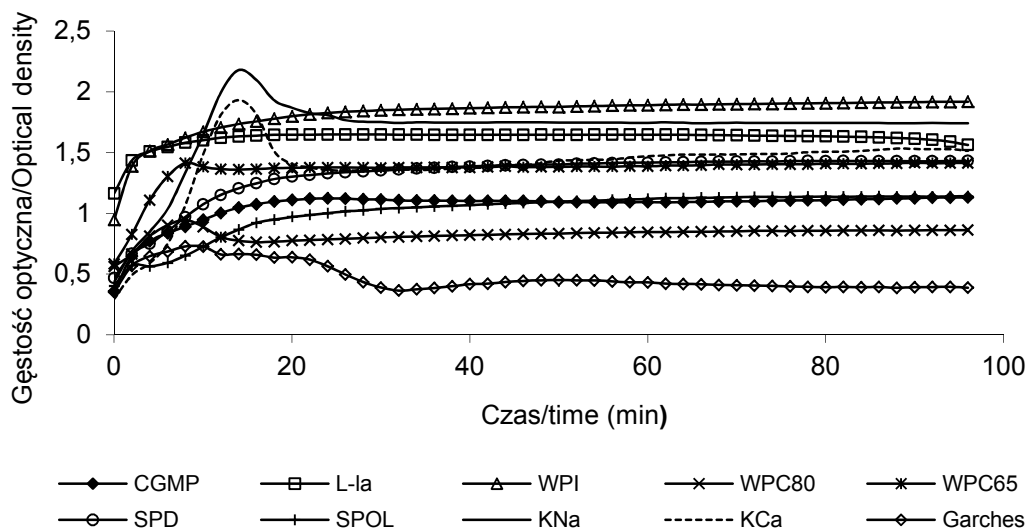
Rys. 5. Wpływ białek mleka na wzrost szczepu *B. longum* - KN29 na podłożu Garchesa podczas 96 h hodowli w temp. 37 °C.

Fig. 5. Effect of milk proteins on growth of *B. longum* - KN29 strain on Garches medium during 96 h incubation at a temperature of 37 °C.

Niższy, jednak również znaczny, wpływ na wzrost Bb-12 miał dodatek α -la oraz WPI. Uzyskane w tym doświadczeniu wyniki potwierdzają, że WPI i α -la stymulują wzrost tego szczepu, co stwierdzono w badaniach z wykorzystaniem planu Placketta-Burmana. Szczep Bb-12 charakteryzował się najslabszym wzrostem na pożywce Gar-

chesa o podstawowym składzie, której gęstość optyczna utrzymywała się na podobnym poziomie przez cały okres hodowli (rys. 4).

Podobnie, jak w przypadku hodowli szczepu Bb-12, również szczep KN29 charakteryzował się największym zagęszczeniem komórek bakteryjnych w hodowlach na podłożach z dodatkiem WPI, KNa, KCa i α -la (rys. 5). Na krzywych obrazujących zależność gęstości optycznej od czasu hodowli w podłożach z dodatkiem KNa i KCa zaobserwowano piki, które osiągnęły maksymalne wartości po 10 h inkubacji. Po tym czasie wartości OD obniżyły się do pewnego poziomu, na którym utrzymały się do czasu zakończenia hodowli. Znaczny wzrost liczby komórek bakterii w pierwszych godzinach i wyraźne zmniejszenie podczas dalszej hodowli można tłumaczyć wykorzystaniem np. wolnych aminokwasów w podłożu. Pozostałe hodowle szczepu KN29 osiągnęły najwyższe wartości OD po 10 h inkubacji, a liczba komórek bakteryjnych utrzymywała się na podobnym poziomie do końca prowadzenia hodowli. Jedynie w przypadku podłoża suplementowanego SPOL nastąpiło nieznaczne zmniejszenie gęstości optycznej hodowli bakteryjnej od 26 h inkubacji i utrzymywało się na tym poziomie do końca trwania hodowli. Szczep KN29 charakteryzował się najsłabszym wzrostem na podłożu z dodatkiem WPC80. Hodowla ta, jako jedyna, charakteryzowała się niższymi wartościami OD w porównaniu z hodowlą na podłożu Garchesa o podstawowym składzie.



Rys. 6. Wpływ białek mleka na wzrost szczepu *B. catenulatum* - KD14 na podłożu Garchesa podczas 96 h hodowli w temp. 37 °C.

Fig. 6. Effect of milk proteins on growth of *B. catenulatum* - KD14 strain on Garches medium during 96 h incubation at a temperature of 37 °C.

W przypadku szczepów KD14 (rys. 6), Bi30 i ATCC1567 (dane niezamieszczone), dodatek WPI, α -la oraz KCa i KNa do podłoża hodowlanego miał największy wpływ na namnażanie się bakterii. Wyraźne stymulowanie wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* przez WPI i α -la w tych hodowlach potwierdza wyniki uzyskane przy zastosowaniu planu Placketta-Burmana. Hodowle KD14 na podłożach z dodatkiem KCa i KNa znacznie szybciej osiągnęły maksymalne wartości OD, bo już po 14 h inkubacji. Po tym czasie, w obu przypadkach wartość OD zmniejszyła się do pewnego poziomu, który nie zmieniał się do końca trwania hodowli. Wartość gęstości optycznej hodowli na podłożu z KCa po 20 h była niższa w porównaniu z hodowlą z dodatkiem WPI. Hodowle bakteryjne na podłożach z WPI, KNa oraz α -la charakteryzowały się wyższymi wartościami OD w porównaniu z hodowlą na podłożach z dodatkiem KCa do końca trwania inkubacji. Najślabszy wzrost szczepu KD14 zaobserwowano na podłożu Garchesa o podstawowym składzie.

Najślabszy wzrost wszystkich badanych w niniejszej pracy szczepów *Bifidobacterium* obserwowano na pożywkach zawierających dodatek serwatki w proszku, WPC80 i CGMP. Zbliżone wyniki otrzymali Čurda i Cicvárek [6], dodając 1 lub 2 % kazeinomakropeptydu (CMP) do jogurtów, których mikroflorę wzbogacono o *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 lub *B. bifidum* CCDM 94. Dodatek CMP wywierał nieznaczny wpływ na wzrost Bb-12 oraz CCDM 94. W innych doniesieniach naukowych publikowane są sprzeczne informacje dotyczące wpływu CMP na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [15, 16, 24], Idota i wsp. [15] stwierdzili, że dodatek 2 % CMP do mleka powodował wzrost liczby komórek *B. animalis lactis* o 1,5 cyklu logarytmicznego w porównaniu z próbą kontrolną. Cicvárek i wsp. [5], na podstawie badań na podłożach syntetycznych, stwierdzili, że dodatek CMP przyspieszał namnażanie komórek *Bifidobacterium* sp., nawet gdy usunięto z podłoża L-cysteinę. Pozytywny wpływ koncentratu białek serwatkowych na wzrost *B. longum* stwierdzili Kehagias i wsp. [19]. Dodatek 3 % WPC20 lub WPC65 do odtłuszczonego mleka krowiego zwiększał liczbę komórek *B. longum* o jeden cykl logarytmiczny (odpowiednio $2,90 \times 10^8$ i $2,87 \times 10^8$) w porównaniu z próbą kontrolną ($2,35 \times 10^7$) po 24 h inkubacji.

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wytwarzają wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe enzymy glikolityczne, z których te pierwsze charakteryzują się większą aktywnością enzymatyczną. W grupie biokatalizatorów przemian szlaku glikolitycznego stwierdzono u bifidobakterii występowanie α - i β -galaktozydazy [3]. B-galaktozydazy wyizolowane z bifidobakterii charakteryzowały się różną specyficznością substratową i niektóre nie hydrolizowały laktozy [13]. Bakterie z tego rodzaju wykorzystane w niniejszej pracy nie namnażały się dobrze na pożywkach zawierających duże ilości laktozy, takich jak serwatki w proszku czy koncentraty białek serwatkowych. W przypadku większości badanych szczepów *Bifidobacterium* rosły one lepiej na serwatce o obniżonej zawartości laktozy (SPOL) niż na zwykłej serwatce w proszku.

Wnioski

1. Spośród badanych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* największą aktywnością proteolityczną charakteryzowały się szczepy KD14, Bi30 i Bb-12.
2. Po zastosowaniu hodowli na podłożach modelowych z wykorzystaniem planu Placketta-Burmana wykazano, że wśród zastosowanych preparatów białkowych decydujący wpływ na wzrost Bb-12 i ATCC 1567 miała α -la, a w przypadku szczepów Bi30, KN29 i KD14 były to WPI oraz α -la.
3. Kazeiniany sodu i wapnia najlepiej stymulowały wzrost szczepów *Bifidobacterium* w modyfikowanym podłożu Garchesa.
4. Izolat białek serwatkowych i α -laktoalbumina, wśród preparatów białek serwatkowych, miały największy wpływ na namażanie szczepów *Bifidobacterium*.

Literatura

- [1] Azuma, N., Yamauchi, K., Mitsuoka, T.: Bifidus growthpromoting activity of a glycomacropeptide derived from human κ -casein. Agr. Biol., Chem., 1984, **48**, 2159-2162.
- [2] Bergamini C.V., Hynes E.R., Palma S.B., Sabbag N.G., Salazar C.A.: Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. Int. Dairy J., 2009, **19**, 467-475.
- [3] Borawska J., Bednarski W., Gołębiewska J.: Charakterystyka sacharydów miodu oraz możliwości zastosowania *Bifidobacterium* do modyfikacji ich składu i właściwości. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2011, **3 (76)**, 29-39.
- [4] Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L.: Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J. Dairy Sci. 1983, **66**, 1219-1227.
- [5] Cívárek J., Čurda L., Elich O., Dvorakova E., Dvorak M.: Effect of caseinomacropeptide concentrate addition on the growth of bifidobacteria. Czech J. Food Sci., 2010, **28(6)**, 485-494.
- [6] Čurda L., Cívárek J.: Use of caseinomacropeptide concentrate in fermented products containing probiotics. Proc.Konf., FoodInnova, Walencja 2010.
- [7] de Castro F.P., Cunha T.M., Ogliari P.J.F., Teofilo R.F., Ferreira M.M.C., Prudencio E.S.: Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. Food Sci. Technol., 2009, **42**, 993-997.
- [8] Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P.: Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk, Lait, 2007, **86**, 21-38.
- [9] Gomes A.M.P., Malcata F.X., Klaver F.A.M.: Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. J. Dairy Sci., 1998, **81**, 2817-2825.
- [10] Gomes, A.M.P., Malcata, F.X.: Use of small ruminants' milk supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. J. Appl. Microbiol., 1998, **85**, 839-848.
- [11] Gustaw W., Kordowska-Wiater M., Koziol J.: The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yoghurt production. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 2011, **4**, 455-466.
- [12] Hajirostamloo B.: Comparison of nutritional and chemical parameters of soymilk and cow milk. World Academy of Science, Eng. Technol., 2009, **57**, 436-438.

- [13] Hinz S.W.A., van den Broek L.A.M., Beldman G., Vincken J.-P., Voragen A.G.J.: β -Galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 prefers β -(1,4)-galactosides over lactose. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, **66** (3), 276-284.
- [14] Ibrahim S.A., Bezkorovainy A.: Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. J. Food Sci., 1994, **59**, 189-191.
- [15] Idota T., Kawakami H., Nakajima I.: Growth-promoting effects of N-acetylneuraminic acid-containing substances on bifidobacteria. Biosci. Biotech. Bioch., 1994, **58**, 1720-1722.
- [16] Janer C., Peláez C., Requena T.: Caseinomacropptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. Food Chem., 2004, **86**, 263-267.
- [17] Kafley S., Woan-Sub K.I.M., Kumura H., Shimazaki K.-I.: Growth performance of whey protein hydrolysates in the media on different strains of probiotic bacteria. Milchwissenschaft., 2010, **65** (3), 245-248.
- [18] Kaplan H., Hutkins R.W.: Fermentation of fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Appl Environ. Microbiol., 2000, **66** (6), 2682-2684.
- [19] Kehagias C., Csapó J., Konteles S., Kolokitha E., Koulouris S., Csapó-Kiss Zs.: Support of growth and formation of D-amino acids by *Bifidobacterium longum* in cows', ewes', goats' milk and modified whey powder products. Int. Dairy J. 2008, **18**, 396-402.
- [20] Kisiełowska E., Kordowska-Wiater M.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i mikrobiologii żywności. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Lublin 2004.
- [21] Marafon A.P., Sumi A., Alcántara M.R., Tamime A.Y., Oliveira M.N.: Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. Food Sci. Technol., 2011, **44**, 511-519.
- [22] Modler H.W.: Bifidogenic factors – sources, metabolism and applications. Int. Dairy J. 1994, **4**, 383-407.
- [23] Petschow, B.W., Talbott, R.D.: Response of *Bifidobacterium* species to growth promoters in human and cow milk. Pediatric Res., 1991, **29**, 208-213.
- [24] Poch M., Bezkorovainy A.: Bovine milk κ -casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus *Bifidobacterium*. J. Agric. Food Chem., 1991, **39**, 73-77.
- [25] Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Podleśny M., Targoński Z., Kubik-Komar A.: Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology. Pol J Microbiol., 2010 **59** (2), 113-118.
- [26] Ramirez-Farias C., Slezak K., Fuller Z., Duncan A., Holtrop G., Louis P.: Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. Br. J. Nutr., 2009, **101** (4), 541-550.
- [27] Rasic J.L.: Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. Bull. IDF, 1990, **252**, 24-34.
- [28] Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zaroni S., Matteuzzi D.: Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. Appl. Environ. Microbiol., 2005, **71** (10), 6150-6158.
- [29] Shihata A., Shah N.P.: Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. Int. Dairy J., 2000, **10**, 401-408.
- [30] Waśko A., Kordowska-Wiater M., Podleśny M., Polak-Berecka M., Targoński Z., Kubik-Komar A.: The plackett-burman design in optimization of media components for biomass production of *Lactobacillus rhamnosus* OXY. Acta Agron. Hung., 2010, **61** (3), 344-355.

EFFECT OF MILK PROTEIN PREPARATIONS ON GROWTH OF *BIFIDOBACTERIUM*

S u m m a r y

Probiotic strains of the *Bifidobacterium* genus multiply poorly in milk. The objective of this study was to modify the Garches medium through replacing a nitrogen source by some selected milk protein preparations and to verify their ability to stimulate the growth of probiotic strains of the *Bifidobacterium* genus. The Bi30 and KD14 strains were characterized by the highest proteolytic activity; slightly lower values were determined for other strains of the *Bifidobacterium* genus. For the growth of Bb-12 (1.2×10^8 cfu/ml), the most favourable medium was that containing a whey protein isolate (WPI). Based on the results obtained after the incubation of KN29, it was found that the WPI and α -lactalbumin (α -la), the compounds of the culture medium that was designed using a Plackett-Burman model, were those to stimulate the growth of that strain to the highest degree. The highest density of cells of Bb-12 and KN29 bacteria was reported during the incubation of those strains on the media supplemented with a sodium caseinate (KNa) and calcium caseinate (KCa), and in the case of the whey protein preparations, this effect was reported for the media with WPI and α -la.

Key words: *Bifidobacterium*, proteolytic activity, Plackett-Burman design, WPI, α -lactalbumin ☒