

MARCELINA KARBOWIAK, WIOLETTA MOSIEJ, DOROTA ZIELIŃSKA

## WPLYW DODATKU BŁONNIKA I B-GLUKANU NA PRZEŻYwalNOŚĆ BAKTERII PROBIOTYCZNYCH W MLECZNYCH NAPOJACH FERMENTOWANYCH

### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Zainteresowanie konsumentów żywnością prozdrowotną przyczynia się do rozwoju produktów funkcjonalnych, które dzięki obecności zawartych w nich składników aktywnych mają zapewniać korzyści zdrowotne. Mleczne napoje fermentowane są jednymi z najchętniej spożywanych przez konsumentów produktów zaliczanych do żywności funkcjonalnej. Doceniane są szczególnie ze względu na walory smakowe oraz korzystne właściwości odżywcze i prozdrowotne. Celem badania była ocena przeżywalności szczepu probiotycznego *Lactobacillus rhamnosus* GG w modelowym napoju fermentowanym z dodatkiem (1) błonnika lub (2)  $\beta$ -glukanu oraz (3) bez dodatków, a także ocena jakości tych produktów w trakcie chłodniczego przechowywania.

**Wyniki i wnioski.** Wykazano, że, mleczne napoje fermentowane stanowiły dobrą pożywkę do wzrostu bakterii probiotycznych. Liczba żywych komórek bakterii we wszystkich napojach w ciągu całego okresu przechowywania była wyższa od minimalnej dawki rekomendowanej dla produktów probiotycznych. Ponadto napój fermentowany z dodatkiem  $\beta$ -glukanu cechowała zbliżona do napoju kontrolnego ogólna jakość sensoryczna. Przeprowadzone badania potwierdzają, że  $\beta$ -glukan może zostać wykorzystany do opracowania mlecznego napoju fermentowanego o dużej liczebności ( $>7,5$  log jtk/ml) bakterii probiotycznych. Dodatkowo, zaprojektowany napój wpisuje się w definicję żywności funkcjonalnej, gdyż jedna porcja (200 ml) zawiera 3 g  $\beta$ -glukanu, któremu przypisuje się korzystne właściwości zmniejszenia ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, i dla którego może być stosowane oświadczenie zdrowotne.

**Słowa kluczowe:** mleczne napoje fermentowane, probiotyk, prebiotyk, synbiotyk, błonnik,  $\beta$ -glukan

### Wprowadzenie

Żywność funkcjonalną stanowią produkty spożywcze, które wykazują udokumentowany pozytywny wpływ na organizm człowieka wykraczający ponad ten, który wy-

---

*Mgr M. Karbowiak, ORCID: 0000-0002-5643-3468, mgr W. Mosiej, dr hab. inż. D. Zielińska, prof. SGGW, ORCID: 0000-0001-7845-1352, Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa.  
Kontakt: marcelina\_karbowiak@sggw.edu.pl*

nika z efektu odżywczego zawartych w nich składników pokarmowych uznawanych za niezbędne [5]. Wśród żywności funkcjonalnej na całym świecie, jednymi z najczęściej spożywanych są produkty zawierające probiotyki i/lub prebiotyki, które w głównej mierze dostarczane są do organizmu jako składniki żywności poddanej fermentacji. Spośród nich fermentowane produkty mleczne cieszą się największą popularnością. Wynika to z faktu, iż powszechnie kojarzą się one z probiotyczną oraz prozdrowotną żywnością oraz cechują się przyjemnymi i atrakcyjnymi profilami sensorycznymi [15]. W celu uzyskania korzyści terapeutycznych ze spożycia żywności probiotycznej sugerowany minimalny poziom bakterii probiotycznych w mleku fermentowanym (takich jak z rodzaju *Lactobacillus* spp. czy *Bifidobacterium* spp.) powinien wynosić powyżej  $6 \log_{10}$  jednostek tworzących kolonie w 1 ml (jtk/ml) [21]. Za żywotność organizmów probiotycznych odpowiada kilka czynników. Jednym ze sposobów wsparcia przeżywalności probiotyków jest zastosowanie prebiotyków – najczęściej inuliny lub oligofruktozy, przez co uzyskuje się produkty synbiotyczne [9]. Według aktualnej definicji Międzynarodowego Towarzystwa Naukowego ds. Probiotyków i Prebiotyków (ISAPP, ang. *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics*), terminem prebiotyk określa się substrat, który jest selektywnie wykorzystywany przez mikroorganizmy gospodarza, przynosząc korzyści zdrowotne [6]. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że błonnik pokarmowy wykazuje działanie prebiotyczne, wpływając korzystnie na wzrost mikroorganizmów jelitowych [1]. Prócz tego jego dodatek może prowadzić do zmian właściwości fizycznych, teksturalnych i reologicznych produktów [17]. Szczególnymi właściwościami cechuje się błonnik pochodzący z owsa oraz wyodrębniona z niego frakcja rozpuszczalna –  $\beta$ -glukan [18]. Do najważniejszych prozdrowotnych właściwości owsa, głównie wskutek obecności  $\beta$ -glukanu, zalicza się: zdolność obniżania poziomu cholesterolu, w tym frakcji LDL, zmniejszanie ryzyka otyłości, choroby wieńcowej serca czy łagodzenie stanów zapalnych jelita i śluzówki żołądka [12]. Liczne badania i dowody naukowe na poparcie korzystnej roli  $\beta$ -glukanu z owsa, skłoniły Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) [4] oraz Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) [19] do zezwolenia na posługiwanie się oświadczeniami zdrowotnymi w stosunku do produktów owsianych, przypisującymi im zmniejszenie ryzyka chorób sercowo-naczyniowych przy spożywaniu co najmniej 3 g  $\beta$ -glukanu dziennie.

Celem niniejszego badania była ocena przeżywalności szczepu probiotycznego *Lactobacillus rhamnosus* GG w modelowym napoju fermentowanym, przechowywanym w temp. 4 °C przez 21 dni, w zależności od dodatku błonnika pochodzącego z owsa z 15 % zawartością  $\beta$ -glukanu oraz czystego  $\beta$ -glukanu wyodrębnionego z drożdży piwowskich, dodanych w takich proporcjach, aby każda z porcji produktu (200 ml), zarówno z dodatkiem błonnika, jak i  $\beta$ -glukanu, zawierała rekomendowaną dzienną dawkę  $\beta$ -glukanu – 3 g.

## Material i metody badań

Material do badań stanowił napój wytworzony w warunkach laboratoryjnych na bazie mleka UHT o zawartości tłuszczu 2 % (Łaciate, Polska). Do produkcji napoju fermentowanego użyto szczepu probiotycznego *Lactobacillus rhamnosus* GG (Ch. Hansen). Kultury bakterii *L. rhamnosus* GG poddano inkubacji w temperaturze 37 °C przez 24 godziny w bulionie MRS (Merck), otrzymując hodowlę o gęstości około  $10^9$  jtk/ml. Przygotowaną hodowlę bakteryjną (10 ml) odwirowywano w urządzeniu Eppendorf Centrifuge 5804 R (Hamburg, Germany) przez 5 minut przy 10 000 r.p.m. w celu oddzielenia komórek bakterii od pożywki hodowlanej, następnie przepłukiwano solą fizjologiczną i zawieszano w 10 ml mleka UHT. Tak przygotowaną ożywioną kulturę probiotyczną, zawierającą bakterie *L. rhamnosus* GG, zaszczepiano do prób mleka. Dodatek kultury bakterii wynosił 1 ml ( $10^9$  jtk) na każde 100 ml mleka.

W celu przygotowania prób badanych do zaszczepionej bakteriami *L. rhamnosus* GG mleka dodawano: (1) błonnik owsiany (Młyn Oliwski), który zgodnie z deklaracją producenta zawierał 15 %  $\beta$ -glukanu lub (2)  $\beta$ -glukan pochodzący z drożdży piwowskich *Saccharomyces cerevisiae* Yastimun 1,3-1,6  $\beta$ -D (ALINESS) i był to suplement diety w postaci kapsułek z proszkiem, gdzie 1 kapsułka zawierała 500 mg  $\beta$ -glukanu. Do przygotowania każdej z prób badanych, zarówno z dodatkiem błonnika, jak i  $\beta$ -glukanu, użyto takiej ilości  $\beta$ -glukanu, której przypisuje się korzystne właściwości zmniejszenia ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, i dla której może być stosowane oświadczenie zdrowotne – 3 g/dzień [19]. Ostatnia próba (3) stanowiła próbę kontrolną i nie zawierała dodatków prebiotycznych.

Przygotowane mieszaniny poddawano fermentacji (zakwaszeniu) prowadzonej w temperaturze 37 °C przez około 72 godziny do uzyskania skrzepu o wartości pH mieszczącej się w zakresie 4,5-4,6. Proces fermentacji przerywano poprzez schłodzenie prób badanych i próby kontrolnej do temperatury 4 °C. Po fermentacji próby przechowywano w warunkach chłodniczych (w temperaturze 4 °C) przez 21 dni. Wszystkie próby poddano analizie na początku przechowywania oraz odpowiednio po 7, 14 i 21 dniach przechowywania.

### Badanie mikrobiologiczne

Przeżywalność szczepu probiotycznego zbadano metodą płytkową, stosując posiew powierzchniowy na agar MRS (Merck). Wszystkie oznaczenia zostały wykonane w trzech powtórzeniach. Posiewany material został pobrany w ilości 1 ml i rozcieńczony przez szereg rozcieńczeń dziesiętnych w jałowej wodzie peptonowej (Biocorp, Polska). Inkubację posiewów prowadzono w temp. 37 °C przez 48 h. Po tym czasie liczono wyrosłe na płytkach kolonie, a za wynik przyjęto średnią z trzech powtórzeń. Liczbę bakterii wyrażano jako  $\log_{10}$  jtk/ml.

### *Pomiar wartości pH*

Pomiar zmian wartości pH wykonano przy pomocy pH-metru Elmetron CP-501 (Zabrze, Polska) metodą potencjometryczną w trzech powtórzeniach. Wskazania pH-metru zaokrąglono do 0,1.

### *Ocena sensoryczna*

Przygotowane próby napojów poddano ocenie sensorycznej metodą sensorycznej analizy opisowej profilowania – QDP (ang. *Quantitative Descriptive Profiles*), zgodnie z normą ISO 13299:2016 [13]. Analizę sensoryczną przeprowadzono jednorazowo, bezpośrednio po fermentacji. W celu przeprowadzenia oceny sensorycznej przygotowane wcześniej napoje w jałowych warunkach umieszczono w bezwonnych, przezroczystych, jednorazowych pojemnikach wraz z pokrywką, o pojemności 30 ml. Wszystkie próby zostały zakodowane, aby spełnić kryteria anonimowości i uniknąć sugerowania odpowiedzi. Każdy z oceniających otrzymywał 3 różne próbki, podawane w losowej kolejności. W celu zneutralizowania smaku uczestników badania poinstruowano o konieczności spożycia wody pomiędzy ocenianymi próbkami. Intensywność wyróżników zaznaczano na nieustrukturalizowanej skali graficznej (0 – 10 ju – jednostek umownych), będącej 10-centymetrowym odcinkiem, bez podziałki, zakończonym skrajnymi określeniami brzegowymi. Zespół oceniający liczył 8 ekspertów i były to osoby z odpowiednimi kwalifikacjami metodycznymi i doświadczeniem w realizowaniu ocen metodą QDP w odniesieniu do mlecznych produktów fermentowanych. Badane atrybuty obejmowały 4 wyróżniki zapachu: mleczno-fermentacyjny, słodki, drażniący, obcy; 3 wyróżniki konsystencji: gęstość, gładkość, lepkość; 7 wyróżników smaku: mleczno-fermentacyjny, kwaśny, słodki, słony, gorzki, obcy, drażniący oraz jakość ogólną prób. Dla wyróżników zapachu i smaku zastosowano oznaczenia brzegowe takie jak niewyczuwalny – bardzo intensywny, natomiast dla wyróżników konsystencji i jakości ogólnej określenia te były zależne od danej cechy. Wynik końcowy, odnoszący się do intensywności wyróżników, jest średnią arytmetyczną z 16 wyników jednostkowych.

### *Analiza statystyczna*

Do przeprowadzenia analizy statystycznej wyników badań wykorzystano oprogramowanie Statistica 13.3 (StatSoft, Polska) oraz Microsoft Excel. Obliczono średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe. W przypadku badań mikrobiologicznych i sensorycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Porównanie średnich *post-hoc* wykonano testem HSD Tukeya. Z kolei w badaniu zmian pH zastosowano nieparametryczną alternatywę jednoczynnikowej analizy wariancji. Wykonano test rang Kruskala-Wallisa. Różnicę uznano za statystycznie istotną, gdy  $p < 0,05$  w odniesieniu do wszystkich wykonanych oznaczeń. Dodatkowo wyniki ana-

lizy sensorycznej poddano analizie składowych głównych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*) z wykorzystaniem macierzy korelacji.

## Wyniki i dyskusja

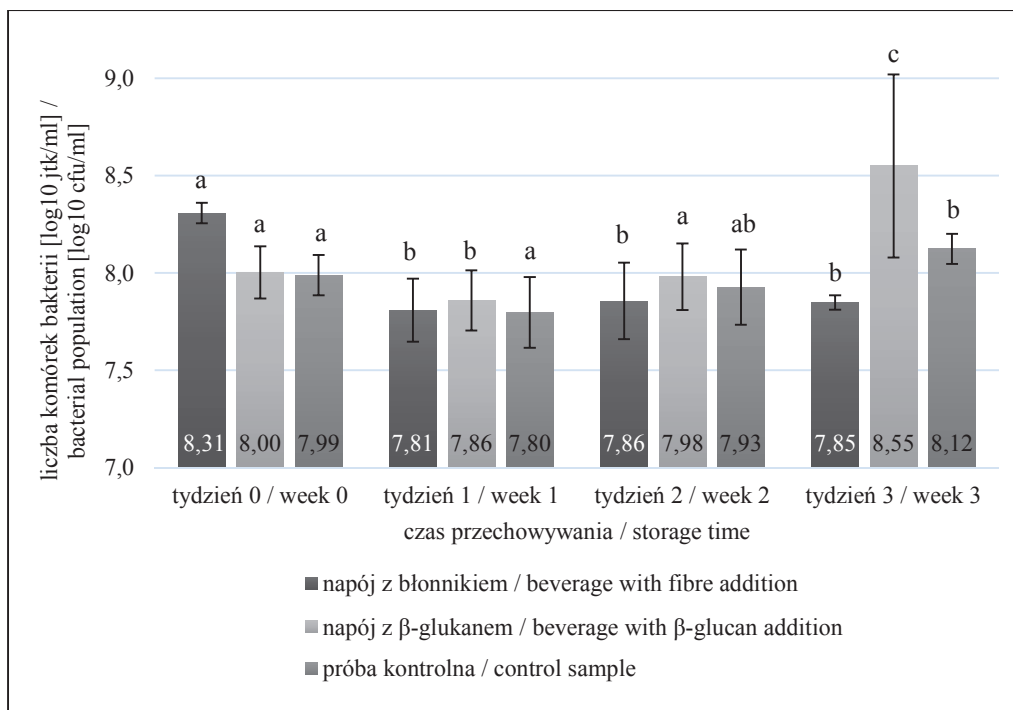
### *Zmiany w liczbie bakterii w fermentowanych napojach podczas przechowywania*

Na rysunku 1 zaprezentowano średnie wartości liczby żywych komórek bakterii w poszczególnych napojach fermentowanych wraz z odchyleniem standardowym, w zależności od czasu przechowywania.

W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono, że zastosowanie dodatków takich jak błonnik i/lub  $\beta$ -glukan wpłynęło na zmianę liczby komórek szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) w obu zaprojektowanych mlecznych napojach fermentowanych. Liczba komórek LGG w napojach utrzymywała się na wysokim poziomie rzędu 7-8  $\log_{10}$  jtk/ml podczas przechowywania w warunkach chłodniczych (4 °C) przez 21 dni. Nie zaobserwowano znaczącego spadku populacji komórek LGG podczas całego okresu przechowywania w żadnym z badanych napojów. Największą redukcję liczby komórek bakterii w porównaniu z wartością początkową stwierdzono w napoju z dodatkiem błonnika, natomiast w pozostałych próbach liczba żywych komórek bakterii nieznacznie wzrosła w końcowym okresie przechowywania.

Należący do prebiotyków  $\beta$ -glukan, dodany do zaprojektowanych mlecznych napojów fermentowanych, wpływał stymulująco na wzrost *Lactobacillus rhamnosus* GG. Było to widoczne przede wszystkim między początkowym i ostatnim tygodniem przechowywania. W próbie z dodatkiem  $\beta$ -glukanu rozwinęło się w trakcie 21-dniowego przechowywania znacznie więcej komórek bakterii fermentacji mlekowej (8,55  $\log_{10}$  jtk/ml) niż w próbie z błonnikiem i kontrolnej. Początkowo jednak w pierwszym i drugim tygodniu liczba bakterii obniżyła się w stosunku do liczby początkowej, co mogło być spowodowane wyginieniem komórek bakterii po obniżeniu temperatury do 4 °C podczas przechowywania. Stwierdzono, że żywotność komórek *Lactobacillus rhamnosus* GG po fermentacji mleka z dodatkiem  $\beta$ -glukanu była istotnie wyższa ( $p < 0,05$ ) niż w przypadku fermentacji mleka z dodatkiem błonnika oraz bez dodatków prebiotycznych. Najbardziej stabilną liczbą komórek bakterii w trakcie całego okresu przechowywania (21 dni) charakteryzowała się próba kontrolna, czyli mleko fermentowane z dodatkiem szczepu LGG bez dodatków prebiotycznych. Z kolei liczba komórek bakterii podczas przechowywania napoju z dodatkiem błonnika obniżała się stopniowo w trakcie przechowywania i osiągnęła najniższą, w porównaniu z pozostałymi próbami, wartość w trzecim tygodniu przechowywania (7,85  $\log_{10}$  jtk/ml). Przeżywalność bakterii probiotycznych w próbie z błonnikiem była niższa, wciąż jednak wyższa niż minimalna dawka rekomendowana dla produktów probiotycznych ( $>6 \log_{10}$  jtk/ml) [21]. Zgodnie z definicją [11], probiotyki w gotowych produktach spożywczych muszą

charakteryzować się wysoką przeżywalnością i stabilnością pożądanych cech bakterii w trakcie całego okresu przechowywania i dystrybucji.



Objaśnienia / Explanatory notes: jtk – jednostka tworząca kolonię / cfu – colony-forming unit; a, b, c – wartości średnie w obrębie próby oznaczone różnymi literami różnią się między sobą statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ) / a, b, c – mean values within each sample, which are marked with various letters, are statistically significantly different ( $p < 0.05$ )

Rysunek 1. Liczba komórek bakterii szczepu LGG [ $\log_{10}$  jtk/ml] w próbie z dodatkiem błonnika, próbie z dodatkiem  $\beta$ -glukanu oraz w próbie kontrolnej w zależności od czasu przechowywania

Figure 1. Mean counts of LGG populations [ $\log_{10}$  cfu/ml] in the sample with the addition of fibre, in the sample with the addition of  $\beta$ -glucan and in the control sample depending on the storage time

Stosowanie prebiotyków pozwala utrzymać znacznie wyższą liczbę żywych bakterii probiotycznych, zarówno w fermentowanych produktach mlecznych, jak i w przewodzie pokarmowym żywiciela [15]. Przeżycie szczepów probiotycznych w wytwarzanym produkcie zależy między innymi od warunków produkcji i rodzaju zastosowanego prebiotyku. Związki te mogą także wpływać na profil sensoryczny oraz właściwości fizykochemiczne probiotycznych fermentowanych produktów mlecznych głównie poprzez zdolność regulowania zawartości wody. Prebiotyki składają się głównie z niestrawnych oligosacharydów, które mogą być selektywnie wykorzystywane

jako odpowiedni substrat przez probiotyki. Inulina, laktuloza, oligofruktoza czy polidekstroza to przykłady prebiotyków o udowodnionej efektywności do zwiększania przeżywalności szczepów probiotycznych [3]. Jednakże, w przemyśle spożywczym, wciąż poszukuje się nowych dodatków funkcjonalnych, wykazujących potencjalne działanie prebiotyczne. Z tego względu w badaniu własnym skupiono się na analizie potencjału prebiotycznego odmiennych od powszechnie stosowanych fruktooligosacharydów (FOS) czy galaktooligosacharydów (GOS) – czyli nietrawionych składników żywności, takich jak błonnik owsiany i wyodrębniony z drożdży piwowarskich  $\beta$ -glukan.

Badania innych autorów potwierdzają korzystny wpływ dodatków takich jak  $\beta$ -glukan czy błonnik na przeżywalność bakterii probiotycznych w produktach fermentowanych. W badaniu Lazaridou i wsp. [16] dodatek 1,4 % owsianego  $\beta$ -glukanu do mleka fermentowanego z kulturami jogurtowymi, wzbogaconego o szczep probiotyczny *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B117, wpłynął na wzrost liczby żywych komórek tego szczepu podczas przechowywania. Pozwoliło to uzyskać funkcjonalny produkt probiotyczny łączący immunomodulujące, hipocholesterolemiczne i hipoglikemiczne właściwości  $\beta$ -glukanów. Z kolei w badaniu Hang i wsp. [10] określano liczbę żywych komórek bakterii *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 po 48-godzinnej fermentacji w temp. 35 °C oraz po 25-dniowym przechowywaniu fermentowanego mleka z dodatkiem ekstraktu z owsa oraz ekstraktu słodowego w temperaturze 4 °C. Liczebność żywych komórek bakterii wynosiła 9,04 log<sub>10</sub> jtk/g (p < 0,05) po 48 godzinach zakwaszania, a pod koniec 25-dniowego przechowywania próby – 8,61 log<sub>10</sub> jtk/g (p < 0,05). Wpływ ekstraktu z owsa na tempo wzrostu szczepu probiotycznego *Lactobacillus plantarum* w fermentowanym mleku był silniejszy niż w przypadku zaobserwowanego w badaniu własnym wpływu błonnika owsianego na przeżywalność szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG. W innym badaniu, przeprowadzonym przez Güler-Akın i wsp. [8], wykazano, że dodatek błonnika z owsa do morelowego probiotycznego jogurtu pitnego poprawiał żywotność bakterii *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* BB-12 oraz *Streptococcus thermophilus* na podobnym poziomie jak dodatek inuliny, jednoznacznie potwierdzając prebiotyczny potencjał błonnika owsianego.

#### *Zmiany pH w fermentowanych napojach podczas przechowywania*

We wszystkich badanych próbach stwierdzono obniżenie wartości pH napojów podczas przechowywania w temp. 4 °C przez 21 dni (tab.1).

W napoju z dodatkiem  $\beta$ -glukanu, błonnika oraz w próbie kontrolnej odnotowano statystycznie istotne obniżenie pH pomiędzy pierwszym a ostatnim tygodniem przechowywania. W napoju fermentowanym z błonnikiem pH w pierwszym i drugim tygodniu pozostało niezmiennione. Wartości pH próby kontrolnej zawierającej mleko i szczep LGG oraz mlecznego napoju fermentowanego z dodatkiem  $\beta$ -glukanu po fer-

mentacji były zbliżone, mimo że wzrost bakterii podczas fermentacji umiarkowanie się różnił, zwłaszcza w ostatnim tygodniu przechowywania. Największą zmianę wartości pH (o 0,6) odnotowano w próbie napoju fermentowanego z dodatkiem  $\beta$ -glukanu.

Tabela 1. Zmiany wartości pH w badanych mlecznych napojach fermentowanych – próbie z dodatkiem błonnika, próbie z dodatkiem  $\beta$ -glukanu, oraz próbie kontrolnej bez dodatków, w zależności od czasu przechowywania w temp. 4 °C

Table 1. The changes of pH values in sample with the addition of fibre, in sample with the addition of  $\beta$ -glucan and in control sample without additives depending on the storage time at 4 °C

Czas przechowywania Storage time	Napój z $\beta$ -glukanem Beverage with $\beta$ -glucan addition	Napój z błonnikiem Beverage with fibre addition	Próba kontrolna Control sample	<i>p</i>
0 tydzień / week 0	4,9±0,01 <sup>aA</sup>	4,2±0,01 <sup>aB</sup>	4,8±0,01 <sup>aAB</sup>	0,0265
1 tydzień / week 1	4,6±0,01 <sup>abA</sup>	4,2±0,02 <sup>abB</sup>	4,5±0,02 <sup>abAB</sup>	0,0265
2 tydzień / week 2	4,4±0,02 <sup>abAB</sup>	4,0±0,01 <sup>abA</sup>	4,5±0,01 <sup>abB</sup>	0,0273
3 tydzień / week 3	4,3±0,01 <sup>bAB</sup>	3,9±0,01 <sup>ba</sup>	4,4±0,01 <sup>bb</sup>	0,0265
<i>p</i>	0,0151	0,0221	0,0200	

Objaśnienia / Explanatory notes:

a, b – wartości średnie w obrębie próby oznaczone różnymi literami różnią się między sobą statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ); A, B – wartości średnie w obrębie danego okresu przechowywania oznaczone różnymi literami różnią się między sobą statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ )

a, b – mean values within each sample, which are marked with various letters, are statistically significantly different ( $p < 0.05$ ); A, B – mean values within each storage period, which are marked with various letters, are statistically significantly different ( $p < 0.05$ )

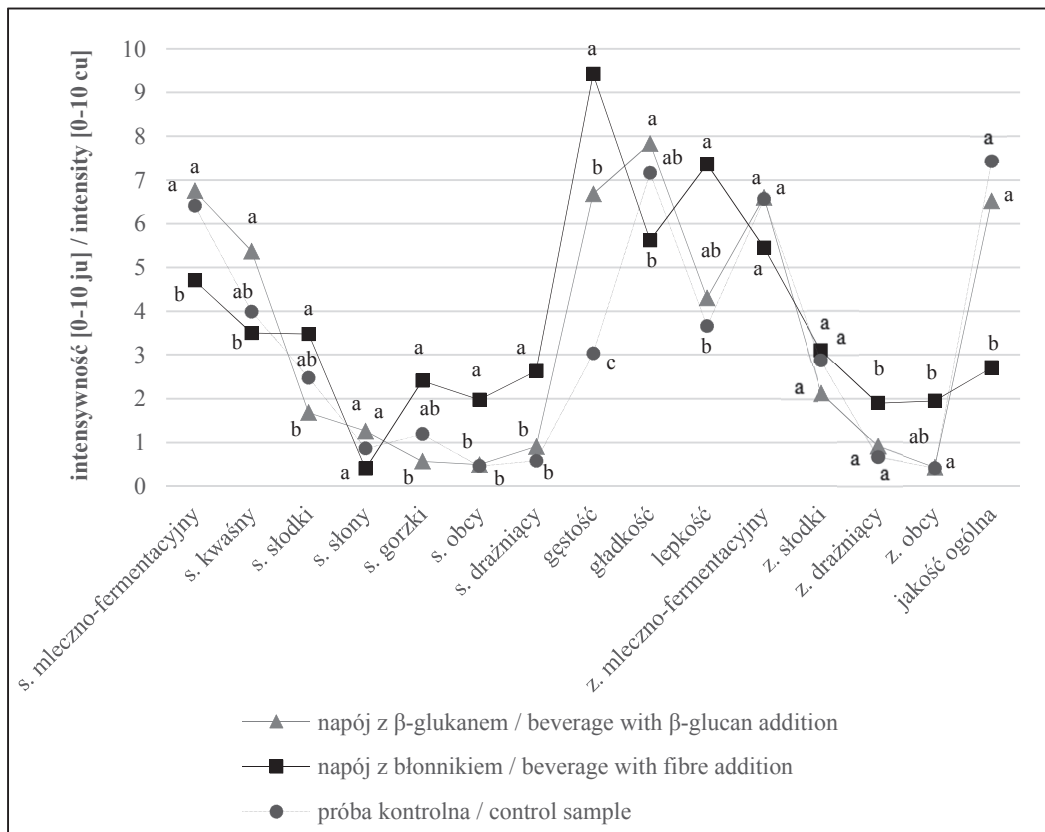
Zmieniająca się kwasowość jest swoistym wskaźnikiem wzrostu drobnoustrojów. Rozwój komórek szczepu LGG w próbach skutkowało zwiększoną syntezą kwasu mlekowego, co spowodowało obniżenie wartości pH napojów podczas przechowywania. Kwas mlekowy powstaje w dużej mierze na drodze fermentacji mlekowej, a mikroorganizmy zdolne do wytwarzania kwasu mlekowego to przede wszystkim bakterie fermentacji mlekowej (LAB, ang. *Lactic Acid Bacteria*), do których zalicza się szczep wykorzystany w niniejszym badaniu – *Lactobacillus rhamnosus* GG. W badaniu Co-man i wsp. [2] podczas fermentacji mleka pełnego z otrębami owsianymi lub mąką gryczaną, czyli potencjalnie prebiotycznym substratem roślinnym, stwierdzono znacznie szybsze niż w badaniu własnym obniżenie wartości pH podczas przechowywania w temperaturze 4 °C przez 28 dni. Dodatek składników o charakterze prebiotycznym spowodował selektywny wzrost populacji bakterii probiotycznych w mleku i wpływał w pozytywny sposób na stabilność drobnoustrojów w czasie 28-dniowego przechowywania. Autorzy potwierdzili dodatkowo, że mleczne produkty fermentowane z dodatkiem otrębów z owsa wywierały korzystny efekt na organizm gospodarza dzięki wyso-



kiej zawartości błonnika rozpuszczalnego pod postacią  $\beta$ -glukanu oraz błonnika nierozpuszczalnego w formie arabinoksylianów i celulozy.

### Ocena sensoryczna zaprojektowanych napojów mlecznych po fermentacji

Średnie wyniki intensywności wybranych do oceny wyróżników charakteryzujących badane mleczne napoje fermentowane zamieszczono na rys. 2.



Objaśnienia / Explanatory notes: ju – jednostki umowne / cu – conventional units;

Tested attributes: fermented milk f. (flavour), sour f., sweet f., salty f., bitter f., untypical f., acrid f.; thickness, smoothness, viscosity; fermented milk o. (odour), sweet o., acrid o., untypical o.; overall quality

a, b, c – wartości średnie w obrębie badanego wyróżnika oznaczone różnymi literami różnią się między sobą statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ); a, b, c – mean values within each tested attribute, which are marked with various letters, are statistically significantly different ( $p < 0.05$ )

Rysunek 2. Ocena intensywności wyróżników sensorycznych przygotowanych trzech rodzajów napojów (metoda QDP)

Figure 2. Evaluation of intensity of sensory attributes of prepared three kinds of beverage samples (QDP method)

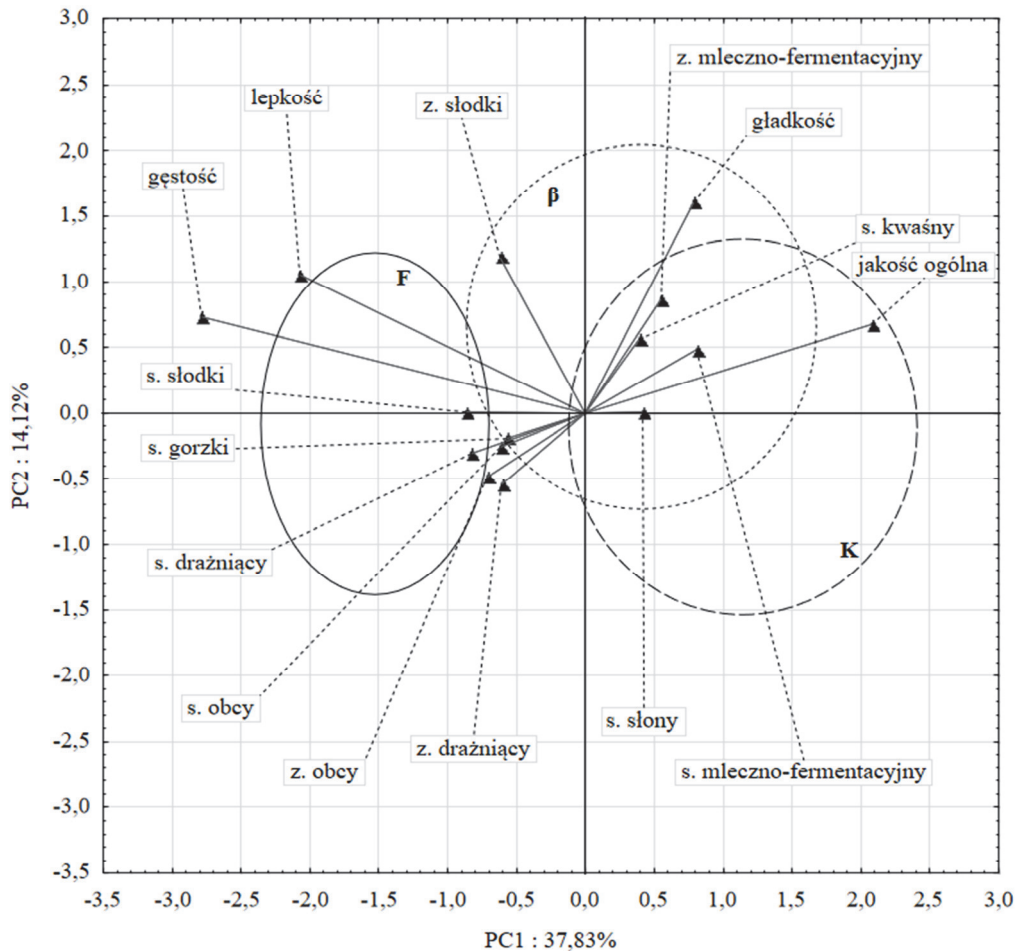
Próba napoju fermentowanego bez dodatków uzyskała najwyższą ocenę ogólnej jakości w porównaniu z pozostałymi ocenianymi próbkami. Napój z dodatkiem  $\beta$ -glukanu charakteryzował się podobną jakością i oceniony był na poziomie 6,52 ju. Różnica ta nie była istotna statystycznie względem próbki kontrolnej ( $p > 0,05$ ). Próba z dodatkiem błonnika charakteryzowała się najniższymi ocenami jakości ogólnej, w porównaniu z pozostałymi próbkami i była to różnica istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ).

Napój z dodatkiem  $\beta$ -glukanu charakteryzował się najwyższą intensywnością smaku i zapachu mleczno-fermentacyjnego, który postrzegany jest jako korzystny i charakterystyczny dla mlecznych produktów fermentowanych. Próba ta była również odmienna od napoju przygotowanego z dodatkiem błonnika pod względem smaku kwaśnego i słodkiego. Ocena intensywności wybranych wyróżników konsystencji mlecznych napojów fermentowanych była zróżnicowana. Wszystkie badane produkty różniły się znacząco gęstością ( $p < 0,05$ ). Najmniejszą intensywność odczucia gęstości (3,03 ju) stwierdzono w próbce napoju bez dodatków prebiotycznych, natomiast największą (9,42 ju) obserwowano w napoju z dodatkiem błonnika. Wynika to z fizycznej zdolności błonnika do wiązania wody w swojej matrycy. Próbę kontrolną oraz napój z dodatkiem  $\beta$ -glukanu cechowały porównywalne noty intensywności gładkości oraz lepkości. Produkt z dodatkiem błonnika oceniony został jako mniej gładki (5,62 ju), jednak bardziej lepki (7,36 ju).

Analiza PCA (rys. 3) wykazała że największy pozytywny wpływ na parametr jakości ogólnej w badanych produktach miały: smak i zapach mleczno-fermentacyjny, smak kwaśny oraz gładkość. Wyróżniki w największym stopniu wpływające na pogorszenie jakości ogólnej to: lepkość i gęstość oraz zapach obcy i zapach drażniący, a także smak gorzki i smak słodki. Punkty w układzie współrzędnych odpowiadające badanym próbom napojów fermentowanych korelowały ( $r > 0,65$ ) z wyróżnikami znajdującymi się w obrębie elips ukazanych na wykresie. Przypadki dotyczące napoju z błonnikiem były w głównej mierze powiązane z wyróżnikami negatywnie wpływającymi na jakość ogólną próbki. Próbki napoju kontrolnego oraz przygotowanego z dodatkiem  $\beta$ -glukanu były bezpośrednio powiązane z wyróżnikami oddającymi pozytywne cechy jakościowe produktu. Rozkład na wykresie przypadków dotyczących tych próbek był bezpośrednio związany z umiejscowieniem wyróżników pozytywnie wpływających na jakość ogólną badanych napojów.

Z badań innych autorów wynika, że dodatek błonnika może zmieniać atrybuty sensoryczne i pogarszać właściwości mlecznych produktów fermentowanych, do których jest dodawany. W badaniu Tomic i wsp. [20] wzbogacano jogurty nierozpuszczalnym błonnikiem pochodzącym z pszenżyta, pszenicy lub owsa. Dodawanie do jogurtów pszenżyta powodowało zmianę ich barwy na żółtobrazową, wyraźną chropowatość i ziarnisty smak. Dodatkowo jogurty z 0,15 % dodatkiem błonnika z pszenżyta, pszenicy lub owsa zostały wyżej ocenione pod względem intensywności wyróżników

odpowiadających za jakość ogólną w porównaniu z produktami ze zwiększonym dwukrotnie (0,3 %) dodatkiem błonnika.



Objaśnienia jak pod Rys. 2. / Explanatory notes as in Fig. 2

Rysunek 3. Wykres konfiguracji punktów reprezentujących zmienne w układzie dwóch pierwszych głównych składowych. Elipsa nakreślona linią ciągłą oznaczoną literą F odnosi się do obszaru reprezentującego przypadki próby z dodatkiem błonnika; elipsa nakreślona linią przerywaną oznaczoną literą  $\beta$  odnosi do obszaru reprezentującego przypadki próby z dodatkiem  $\beta$ -glukanu; elipsa nakreślona linią przerywaną oznaczoną literą K odnosi do obszaru reprezentującego przypadki próby kontrolnej

Figure 3. The graph of configuration of points representing variables in the system of the first two principal components. The solid ellipse marked with the letter F refers to the area representing the sample with the addition of fibre; the dashed ellipse marked with the letter  $\beta$  refers to the area representing the sample with addition of  $\beta$ -glucan; the dashed ellipse marked with the letter K refers to the area representing the control sample

Z kolei Karaca i wsp. [14] zaobserwowali, że wraz ze wzrostem zawartości błonnika w jogurcie probiotycznym pogarszały się jego właściwości reologiczne, strukturalne i sensoryczne, co jest spójne z wynikami badań własnych. Ponadto Güler-Akın i wsp. [8] wykazali, że dodatek błonnika owsianego do probiotycznego napoju owocowego wpływał negatywnie na aromat i ogólną akceptację.

### Wnioski

1. Zaprojektowane w badaniu mleczne napoje fermentowane stanowiły dobrą pożywkę dla wzrostu bakterii probiotycznych. Liczba żywych komórek bakterii we wszystkich zaprojektowanych napojach przekraczała  $7 \log_{10}$  jtk/ml w trakcie 21-dniowego przechowywania w temp. 4 °C, była więc wyższa od minimalnej dawki rekomendowanej dla produktów probiotycznych. Przeżywalność komórek bakterii probiotycznych w produktach była powiązana z obniżeniem wartości pH w czasie przechowywania, przy czym największą żywotność bakterii szczepu probiotycznego *Lactobacillus rhamnosus* GG uzyskano w próbie z dodatkiem  $\beta$ -glukanu, natomiast najmniejszą – w próbie z dodatkiem błonnika.
2. Napój fermentowany z dodatkiem  $\beta$ -glukanu cechowała podobna do napoju kontrolnego ogólna jakość sensoryczna. Próba z dodatkiem błonnika charakteryzowała się istotnie ( $p > 0,05$ ) niższą oceną jakości ogólnej, w porównaniu z pozostałymi próbami, na co wpływały niekorzystne zmiany gęstości i lepkości oraz zwiększona intensywność smaku gorzkiego, drażniącego i obcego.
3. W świetle przedstawionych wyników własnych i prac innych autorów stwierdza się, że  $\beta$ -glukan, będący rozpuszczalną frakcją błonnika, może zostać wykorzystany jako dodatek prebiotyczny do opracowania mlecznego napoju fermentowanego o dużej liczebności bakterii probiotycznych, zadowalającej jakości sensorycznej oraz ulepszonej funkcjonalności. Zaprojektowany napój mógłby stanowić formę żywności funkcjonalnej przeznaczonej dla konkretnej grupy konsumentów np. z otyłością, chorobami układu sercowo-naczyniowego czy zespołem jelita drażliwego, w przypadku której regularna konsumpcja mogłaby korzystnie wpływać na zdrowie.

*Autorki dziękują mgr inż. Marcinowi Krukowi za pomoc w wykonaniu analizy składowych głównych (PCA, ang. Principal Component Analysis) oraz wskazówki dotyczące interpretacji wyników.*

### Literatura

- [1] Chen M., Fan B., Liu S., Imam K.M.S.U., Xie Y., Wen B., Xin F.: The in vitro effect of fibers with different degrees of polymerization on human gut bacteria. *Front. Microbiol.*, 2020, 11, #819.

- [2] Coman M.M., Verdenelli M.C., Cecchini C., Silvi S., Vasile A., Bahrim G.E., Orpianesi C., Cresci A.: Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and their combination SYN BIO®, in synbiotic fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 2013, 167 (2), 261-268.
- [3] De Souza Oliveira R.P., Perego P., de Oliveira M.N., Converti A.: Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2012, 47 (2), 358-363.
- [4] Food and Drug Administration, HHS: Food labeling: health claims; soluble dietary fiber from certain foods and coronary heart disease. Interim final rule. Federal register, 2002, 67 (191), 61773-61783.
- [5] Gawęcki J.: Żywność i żywienie a zdrowie. In.: Żywnienie człowieka a zdrowie publiczne. Eds. J. Gawęcki. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2011, s. 40-41, 53-55.
- [6] Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scott K., Stanton, C., Swanson K.S., Cani P.D., Verbeke K., Reid G.: Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2017, 14, 491-502.
- [7] Gudej S., Filip R., Harasym J., Wilczak J., Dziendzikowska K., Oczkowski M., Jałosińska M., Juszczak M., Lange E., Gromadzka-Ostrowska J.: Clinical outcomes after oat beta-glucans dietary treatment in gastritis patients. *Nutrients*, 2021, 13 (8), #2791.
- [8] Güler-Akın M., Ferliarslan I., Serdar Akın M.: Apricot Probiotic Drinking Yoghurt Supplied with Inulin and Oat Fiber. *Adv. Microbiol.*, 2016, 6 (14), 999-1009.
- [9] Gyawali R., Nwamaioha N., Fiagbor R., Zimmerman T., Newman R.H., Ibrahim S.A.: The Role of Prebiotics in Disease Prevention and Health Promotion. In.: *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases*. Eds. R.R. Watson, V.R. Preedy. Academic Press, 2019, p. 151-167.
- [10] Hang F., Jiang Y., Yan L., Hong Q., Lu W., Zhao J., Zhang H., Chen, W.: Preliminary study for the stimulation effect of plant-based meals on pure culture *Lactobacillus plantarum* growth and acidification in milk fermentation. *J. Dairy Sci.*, 2020, 103 (5), 4078-4087.
- [11] Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H. J., Salminen S., Calder P.C., Sanders, M.E.: Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11 (8), 506-514.
- [12] Ho H.V., Sievenpiper J.L., Zurbau A., Blanco Mejia S., Jovanovski E., Au-Yeung F., Jenkins A.L., Vuksan V.: The effect of oat  $\beta$ -glucan on LDL-cholesterol, non-HDL-cholesterol and apoB for CVD risk reduction: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Br J Nutr.*, 2016, 6 (8), 1369-1382.
- [13] ISO 13299:2016. Sensory Analysis. Methodology. General Guidance for Establishing a Sensory Profile.
- [14] Karaca O.B., Güzeler N., Tangüler H., Yaşar K., Akın, M.B.: Effects of Apricot Fibre on the Physicochemical Characteristics, the Sensory Properties and Bacterial Viability of Nonfat Probiotic Yoghurts. *Foods*, 2019, 8 (1), #33.
- [15] Korbekandi H., Mortazavian A.M., Irvani S.: Technology and stability of probiotic in fermented milks. In.: *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the human health*. Eds. N. Shah, A.G. Cruz, J.A.F. Faria. Nova Science Publishers, New York, 2011, chapter 7.
- [16] Lazaridou A., Serafeimidou A., Biliaderis C.G., Moschakis T., Tzanetakis N.: Structure development and acidification kinetics in fermented milk containing oat  $\beta$ -glucan, a yogurt culture and a probiotic strain. *Food Hydrocoll.*, 2014, 39, 204-214.
- [17] Ning L., Sen M., Li L., Xiaoxi W.: Study on the effect of wheat bran dietary fiber on the rheological properties of dough. *Grain Oil Sci. Technol.*, 2019, 2 (1), 1-5.

- [18] Qu X., Nazarenko Y., Yang W., Nie Y., Zhang Y., Li B. Effect of oat  $\beta$ -glucan on the rheological characteristics and microstructure of set-type yogurt. *Molecules*, 2021, 26 (16), #4752.
- [19] Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to oat beta glucan and lowering blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 2010, 8 (12), 1885.
- [20] Tomic N., Dojnov B., Miocinovic J., Tomasevic I., Smigic N., Djekic I., Vujcic Z.: Enrichment of yoghurt with insoluble dietary fiber from triticale - a sensory perspective. *LWT-Food. Sci. Technol.*, 2017, 80, 59-66.
- [21] Tripathi M.K., Giri S.K.: Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods*, 2014, 9, 225-241.

### EFFECT OF THE ADDITION OF FIBRE AND B-GLUCAN ON THE SURVIVABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA IN FERMENTED MILK BEVERAGES

#### Summary

**Background.** Consumer interest in healthy food contributes to the development of functional products which, due to active ingredients they contain, are supposed to provide health benefits. Fermented milk beverages, classified as functional food, are among the products which consumers choose most frequently. They are appreciated mainly due to their taste, as well as beneficial nutritional and health-promoting properties. The aim of the study was to evaluate the survivability of the *Lactobacillus rhamnosus* GG probiotic strain in a model fermented beverage with the addition of (1) fibre or (2)  $\beta$ -glucan and (3) without additives and to assess the quality of these products during refrigerated storage.

**Results and conclusion.** It was demonstrated that fermented milk beverages provided a good medium for the growth of probiotic bacteria. The number of viable bacterial cells in all beverages during the entire storage period was higher than the minimum dose recommended for probiotic products. Moreover, the overall sensory quality of both the fermented milk beverage with the addition of  $\beta$ -glucan and the control sample was similar. The study conducted confirms that  $\beta$ -glucan can be used to develop a fermented milk beverage with a large number of probiotic bacteria ( $>7.5$  log cfu/ml). In addition, the designed beverage meets the definition of functional food because one serving (200 ml) contains 3 g of  $\beta$ -glucan, which is believed to have beneficial properties reducing the risk of cardiovascular diseases and for which a health claim can be made.

**Key words:** fermented milk beverages, probiotic, prebiotic, synbiotic, fibre,  $\beta$ -glucan 