

Promjena udjela laktoze nakon fermentacije mlijeka različitim mikrobnim kulturama

Ivana Vinko¹, Rajka Božanić^{1*}, Željka Golem²,
Inga Kesner-Koren², Stjepan Mahnet²

¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

²Dukat mliječna industrija d.d./Lactalis JI Europa,
Marijana Čavića 9, Zagreb, Hrvatska

Prispjelo - Received: 15.06.2010.
Prihvaćeno - Accepted: 04.05.2011.

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je pratiti promjene udjela laktoze i promjene kiselosti u mlijeku prije fermentacije te u fermentiranim mliječnim proizvodima koji su čuvani 1 i 28 dana u hladnjaku na 8 °C. Istraživanje je obuhvatilo 5 različitih uzoraka: jogurt, jogurt sa povećanim udjelom laktoze, bifido mlijeko, kiselo vrhnje i kiselo mlijeko. Udjel laktoze određivan je enzimskom metodom. Rezultati su pokazali da termofilne kulture tijekom fermentacije konvertiraju znatno više laktoze u mliječnu kiselinu (oko 30 %), u odnosu na mezofilne kulture (16-20 %). Probiotička kultura vrste *Bifidobacterium* treba znatno dulje vrijeme prilagodbe za fermentaciju laktoze u mlijeku, a konvertirala je najmanji udio laktoze (svega 15 % nakon prvog dana čuvanja uzoraka, a nakon 28 dana oko 19 %).

Ključne riječi: laktoza, fermentacija, enzimska metoda, mliječna kiselina, fermentirani mliječni proizvodi

Uvod

Fermentirani mliječni proizvodi poznati su ljudima već nekoliko tisuća godina. Od davnina se opisuju kao potencijalni lijek za razne poremećaje rada probavnog sustava. Tradicionalni procesi fermentacije mlijeka znanstveno su istraženi kako bi se razjasnile promjene tijekom fermentacije i omogućila izolacija, klasifikacija i proizvodnja mikrobnih kultura, te da bi se omogućila industrijska proizvodnja fermentiranih mliječnih proizvoda ujednačene kvalitete (Vizoso Pinto i sur., 2006; Patrigani i sur., 2006; Ortu i sur., 2007). Popularnost takvih proizvoda raste, ne samo zbog njihovih organoleptičkih svojstava, već i zbog nutritivne vrijednosti i zdravstvenog učinka (Tudor i Havranek, 2009). Osim glavnih sastojaka (proteina, mliječne masti, laktoze, vitamina i mineralnih tvari) u njima su prisutni i laktoferin, imunopeptidi, fosfolipidi, mliječna kiselina i ostali sastojci za koje se zna da imaju blagotvorni zdravstveni utjecaj (Meisel i Bockelmann, 1999). U suhoj tvari

mlijeka najviše ima laktoze (oko 4,7 %). Prema udjelu laktoza je najstabilniji sastojak mlijeka (Tratnik, 1998).

Mliječni proizvodi fermentirani probiotičkim bakterijama imaju dodatnu zdravstvenu vrijednost. Naime, uslijed ubrzanog tempa života, stresa, korištenja antibiotika i raznih drugih lijekova kod ljudi može doći do poremećaja ravnoteže crijevne mikroflore. Tada se smanjuje broj korisnih bakterija, dok istovremeno raste broj bakterija čiji produkti metabolizma mogu biti toksični, pa mogu izazvati probavne probleme (Isolauri i sur., 2004.; Salminen i Isolauri, 2006). Probiotičke bakterije dobro preživljavaju prolaz kroz probavni sustav ljudi, a kad se žive nađu u crijevima, mogu rekolonizirati probavni trakt i nanovo uspostaviti crijevnu mikrofloru (Walker i Duffy, 1998).

Fermentacijom mlijeka smanjuje se udjel laktoze koja konvertira u mliječnu kiselinu. Zbog smanjene količine laktoze i zbog prisustva β -laktaze, fer-

*Corresponding author/Dopisni autor: Phone/Tel.: +385 1 4605 018; E-mail: rbozan@pbf.hr

Tablica 1. Sastav tipiziranog mlijeka te temperatura i trajanje fermentacije za jogurt (J), jogurt sa većim udjelom laktoze (JL), bifido mlijeko (BM), kiselo vrhnje (KV) i kiselo mlijeko (KM)

Uzorak	J	JL	BM	KV	KM
Suha tvar (%)	11,6	12,5	11,6	19,8	11,6
Proteini (%)	3,4	4,5	3,6	3,1	3,6
Mast (%)	3,2	1,5	3,2	12,0	3,2
Temperatura fermentacije (°C)	42	40	38	26	26
Vrijeme fermentacije (h)	5,0	8,0	19,0	16,0	12,5

mentirani mliječni proizvodi važni su u prehrani ljudi sa smanjenom aktivnošću laktaze. (Labayen i sur., 2001.; Miller i sur., 2007).

Postoji više različitih metoda kojima se može određivati udio laktoze u prehrambenim proizvodima. Najčešće se koriste enzimska, titracijska, HPLC (High-performance liquid chromatography), fotometrijska metoda te infracrvena spektrofotometrija (Xinmin i sur., 2008; Ni i sur., 2008, Shapiro i sur., 2002; Shapiro i Silanikove, 2010).

Enzimске metode su relativno brze, jeftine, specifične te dobro istražene. Prva reakcija svih enzimskih metoda jest hidroliza laktoze uz pomoć β -galaktozidaze na D-glukozu i D-galaktozu, nakon čega (ovisno o tipu enzimske metode) slijedi oksidoredukcijska reakcija pri čemu se NAD^+ reducira u $\text{NADH} + \text{H}^+$. Količina formiranog NADH je stehiometrijski jednaka broju molekula hidrolizirane laktoze (Shapiro i sur., 2002).

Ovim radom želi se ispitati koliki udio laktoze konvertira u mliječnu kiselinu tijekom fermentacije mlijeka različitim kulturama (mezofilna, termofilna, probiotička) te kolika je promjena udjela laktoze tijekom skladištenja tako dobivenih fermentiranih proizvoda u hladnjaku pri konstantnoj temperaturi. Promjena udjela laktoze nastoji se povezati sa promjenom pH i °SH te s udjelom nastale mliječne kiseline.

Materijali i metode rada

Za određivanje laktoze i mjerenje kiselosti proizvedeni su sljedeći uzorci: jogurt (J), jogurt sa većim udjelom laktoze (JL), mlijeko fermentirano bifidobakterijama (BM), kiselo mlijeko (KM) i kiselo vrhnje (KV). Mlijeko i vrhnje za fermentaciju je

tipizirano (Tablica 1), homogenizirano, pasteurizirano i inokulirano. Fermentacija uzoraka je vođena pri različitim temperaturama (Tablica 1). Kiselo mlijeko i kiselo vrhnje su fermentirani mezofilnom kulturom *Lactococcus* spp., jogurti s jogurtom kulturom (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), a za fermentaciju bifido mlijeka korištena je kultura *Bifidobacterium* spp.

Aktivna i titracijska kiselost te udio laktoze u uzorcima određivani su prije fermentacije (nakon što je u tipizirano mlijeko dodana kultura za fermentaciju), te nakon završetka fermentacije (ohlađeni uzorak, star 1 dan) i 28. dan nakon čuvanja uzoraka u hladnjaku na temperaturi od 8 °C.

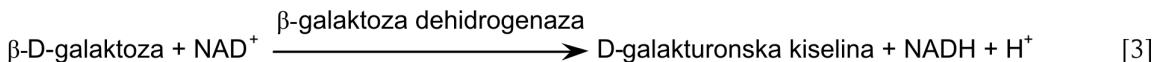
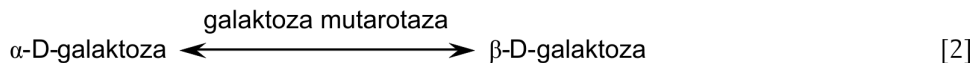
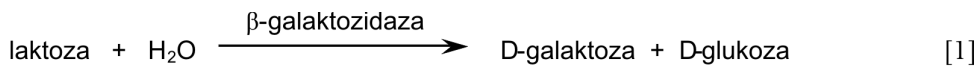
Određivanje kiselosti

Aktivna kiselost je mjerena pH-metrom (MP 220, Mettler Toledo). Titracijska kiselost je mjerena metodom po Soxhlet-Henkelu. Udio mliječne kiseline dobiven je računskim putem na temelju mjerenja vrijednosti °SH (Sabadoš, 1996).

Određivanje udjela laktoze

Laktoza je određivana modificiranom metodom koju je patentirao Megazime International Ireland Ltd. (Official Method AOAC 984.15, 1983).

U odmjernu tikvicu od 100 mL odvagane se 1 g uzorka i doda 60 mL destilirane vode te se tako pripremljena otopina uzorka termostatira na 50 °C tijekom 15 minuta uz povremeno miješanje. Zatim se doda 2 mL otopine Carrez 1 i 2 mL otopine Carrez 2 i lagano promiješa. Na kraju se doda 4 mL otopine NaOH (0,1 mol/L) i jako promiješa te se dopuni destiliranom vodom do oznake. Tako pripremljena



otopina uzorka se ostavi da odstoji na sobnoj temperaturi ($\sim 25^\circ\text{C}$) 30 minuta bez miješanja. Nakon 30 minuta stajanja, otopina uzorka se filtrira preko nabranog Whatman No.1 filter papira. Prvih par mililitara se odbaci.

Slijedi spektrofotometrijsko određivanje udjela laktoze. Ova se metoda bazira na principu da enzim β -galaktozidaza, pH 5,0 katalizira hidrolizu laktoze na D-glukozu i D-galaktozu [1]. Nakon toga enzim galaktoza-mutarotaza katalizira izomerizaciju D-galaktoze iz α -anomernog oblika u β -anomerni oblik [2]. Kod pH 8,6 enzim β -galaktoza dehidrogenaza oksidira β -D-galaktozu u D-galakturonsku kiselinu pri čemu se NAD^+ reducira u NADH [3]. Količina NADH nastalog u ovoj reakciji stehiometrijski je proporcionalna sa količinom laktoze.

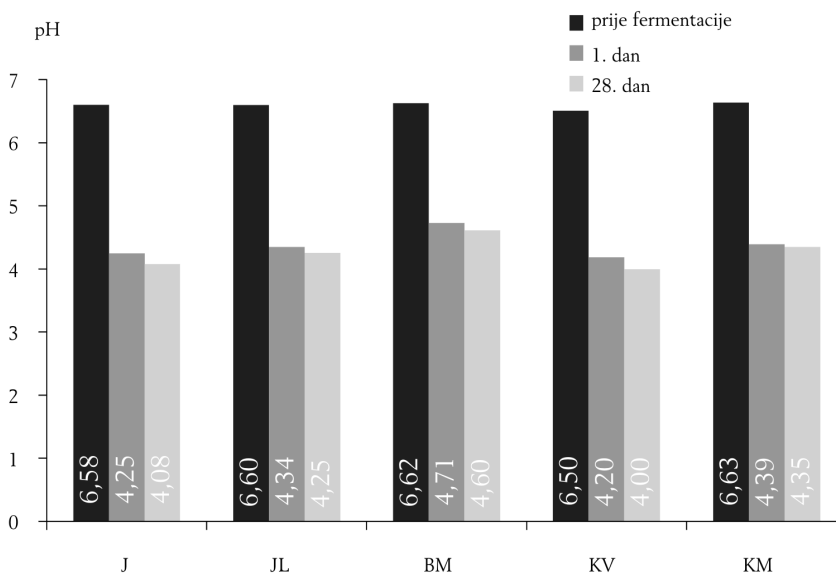
Nakon mjerenja apsorbancije laktoze i galaktoze (A_1) i apsorbancije same galaktoze (A_2), sve pri 340 nm uz pomoć spektrofotometra, računski se dobije apsorbancija laktoze tako da se od A_1 oduzme A_2 . Koncentracija laktoze se izračuna tako da se umnožak konačnog volumena, molekulske mase

analizirane supstance i apsorbancije laktoze podijeli sa umnoškom volumena uzorka, širine prolaska svjetla i koeficijenta ekstincije NADH kod 340 nm (Official Method AOAC 984.15, 1983).

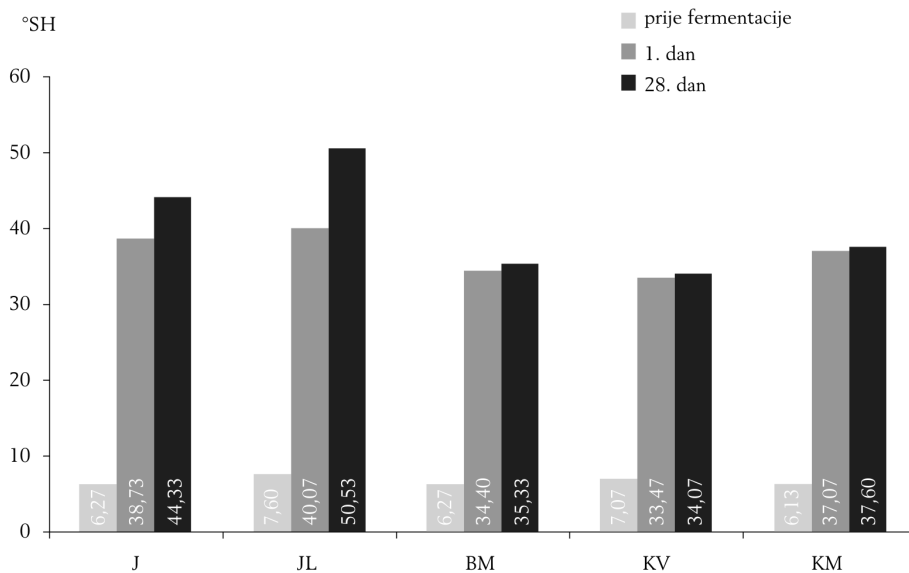
Rezultati i rasprava

Sastav uzoraka mlijeka, odnosno vrhnja, za fermentaciju bio je različit (Tablica 1). Najviše suhe tvari imalo je vrhnje (19,8 %) radi velikog udjela masti (12,0 %), a ujedno je imalo i najmanji udio proteina (3,1 %). Kod uzoraka mlijeka najviše suhe tvari imalo je mlijeko sa povećanim udjelom laktoze (12,5 %), a ono je ujedno imalo i najveći udio proteina (4,5 %), a najmanji udio masti (1,5 %). Ostala mlijeka za fermentaciju imala su jednak udio suhe tvari (11,6 %), te jednak udio masti (3,2 %).

Vrijeme fermentacije uzoraka bilo je različito (tablica 1). Najkraća je bila fermentacija jogurtnom kulturom (5 h), što je bilo za očekivati, jer je to kultura koja pri svojoj optimalnoj temperaturi (42°C)



Slika 1. Usporedni prikaz promjene pH u mlijeku prije fermentacije te u ispitivanim uzorcima nakon 1. odnosno 28. dana čuvanim u hladnjaku na 8°C



Slika 2. Usporedni prikaz promjene °SH u mlijeku prije fermentacije te u ispitivanim uzorcima nakon 1. odnosno 28. dana čuvanim u hladnjaku na 8 °C

u mlijeku raste najbrže (Kršev, 1989). Fermentacija mlijeka s povišenim udjelom laktoze vođena je na nešto nižoj temperaturi (40 °C) za razliku od fermentacije mlijeka s jogurtnom kulturom, pa je stoga i trajanje same fermentacije bilo dulje kod mlijeka s povišenim udjelom laktoze. Osim toga, u tom je uzorku bio veći udio proteina (4,5 %) koji imaju puffer djelovanje, pa je moguće da je to također utjecalo na produljenje fermentacije, jer su sve fermentacije vođene do približno jednake pH vrijednosti. Fermentacija bifidobakterijama trajala je najdulje (19 h). Probiotičke bakterije izolirane su iz probavnog sustava ljudi, te im mlijeko nije prirodna sredina. Radi toga je tim kulturama potrebno dulje vrijeme adaptacije za rast u mlijeku (Tratnik, 1998), pa su fermentacije dugotrajne (Arunachalam, 1999; Sarella i sur., 2000; Tamime i sur., 2003; Donkor i sur., 2005).

Prije fermentacije pH mlijeka u svim je uzorcima bio približno jednak (6,46-6,63), a titracijska kiselost bila je od 6,13 do 7,6 °SH (Slike 1 i 2). Udio laktoze bio je najveći u mlijeku s povećanim udjelom laktoze (5,93 %), dok su ostali ispitivani uzorci prije fermentacije imali podjednak udio laktoze, od 4,27 (KV) do 4,61 (BM) (Slika 3).

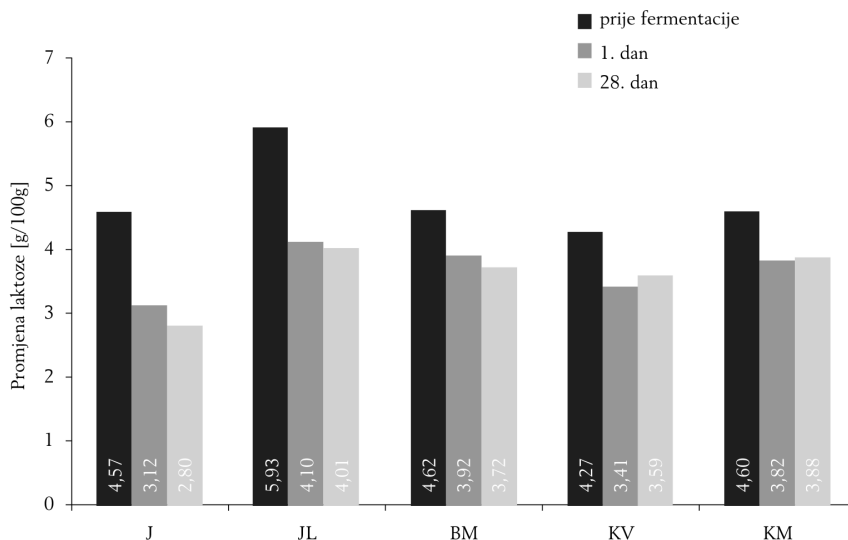
Nakon fermentacije i jednodnevne stabilizacije uzoraka u hladnjaku, pH svih ispitivanih uzoraka bio je od 4,20 do 4,71, dok se titracijska kiselost kretala od 33,47 °SH (KV) 40,0°SH (JL) (Slike 1 i 2) što se

može povezati sa rezultatima mjerenja udjela laktoze. Naime, udio laktoze se naviše smanjio u jogurtu s povećanim udjelom laktoze (za 1,84 g/100 g), a tek nešto malo manje smanjio se u jogurtu (za 1,45 g/100 g). U ostalim uzorcima došlo je do otprilike jednakog smanjenja udjela laktoze (0,7-0,86 g/100 g) (Slika 3).

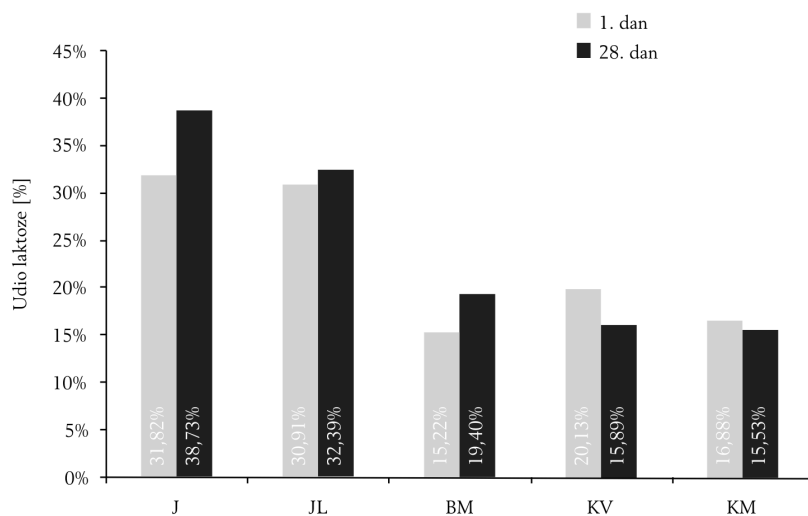
Isto tako, postotak laktoze koji je konvertirao u mliječnu kiselinu nakon fermentacije i jednodnevne stabilizacije u hladnjaku, najveći je kod jogurta (31,82 %) i jogurta s povećanim udjelom laktoze (30,91 %) (Slika 4), dok je kod kiselog vrhnja i kiselog mlijeka konvertiralo manje laktoze (16,88-29,13 %). To je bilo očekivano, jer termofilne kulture tijekom fermentacije pri optimalnoj temperaturi (42 °C) konvertiraju više laktoze u mliječnu kiselinu nego mezofilne kulture (Kršev, 1989).

U bifido mlijeku je, nakon fermentacije i jednodnevne stabilizacije uzorka, u mliječnu kiselinu konvertiralo svega 15 % laktoze (Slika 4), što se može objasniti činjenicom da bifidobakterijama mlijeko nije prirodna sredina, pa je njihova aktivnost u mlijeku manja u odnosu na druge termofilne bakterije (Tratnik, 1998; Arunachalam, 1999; Donkor i sur., 2006).

Nakon 28 dana čuvanja u hladnjaku najniži pH izmjeren je kod kiselog mlijeka (4.0) i kod jogurta (4.08), dok je najviši pH izmjeren kod bifido mlijeka (4.6), što se može objasniti razlikom u aktivno-



Slika 3. Usporedni prikaz udjela laktoze u mlijeku prije fermentacije te u uzorcima nakon 1. odnosno 28. dana čuvanim u hladnjaku na 8 °C



Slika 4. Usporedni prikaz udjela laktoze koji je konvertirao u mliječnu kiselinu u uzorcima 1. odnosno 28. dana čuvanim u hladnjaku na 8 °C

sti pri niskim vrijednostima pH. Naime, dokazno je da bifidobakterije imaju manju aktivnost pri niskim pH nego ostale mezofilne kulture ili jogurtna kultura (Donkor i sur., 2006). Najveća titracijska kiselost izmjerena je kod jogurta s povećanim udjelom laktoze (50,53 °SH), nešto manje je izmjereno kod jogurta (44,33 °SH), dok je u ostalim uzorcima izmjerena otprilike jednaka titracijska kiselost (34,07-37,60°SH). Do velike razlike titracijske kiselosti između uzoraka s termofilnom i mezofilnom kulturom dolazi zbog toga što termofili proizvode veće količine mliječne kiseline. Istovremeno, rezultati mjerenja pH ne variraju u toj mjeri, što bi se moglo objasniti

pufer djelovanjem proteina (Kršev, 1989; Matijević i sur., 2008), kojih u jogurtu s povišenim udjelom laktoze ima u većem udjelu (Tablica 1).

Udio laktoze nakon 28 dana čuvanja u hladnjaku najviše se smanjio u jogurtu (38,73 %), dok se u jogurtu s povećanim udjelom laktoze smanjio za 32,73 % od ukupne količine laktoze. U bifido mlijeku udio laktoze najmanje se smanjio, svega 19,40 % (Slika 4). U uzorcima kiselog vrhnja i kiselog mlijeka nakon 28 dana čuvanja u hladnjaku izmjereno je povećanje udjela laktoze (Slika 3). S obzirom da su i kiselo vrhnje i kiselo mlijeko proizvedeni fermen-

tacijom mezofilnim kulturama, jedino objašnjenje za takav rezultat je da se tijekom čuvanja uzoraka proizvode neke supstance koje apsorbiraju jednaku valnu duljinu koju apsorbira i galaktoza (s obzirom da je u ovom radu laktoza određivana enzimskom metodom preko galaktoze). Kod uzoraka mlijeka fermentiranim termofilnim kulturama do ovakve pojave nije došlo.

Zaključci

Ispitivane termofilne kulture tijekom fermentacije mlijeka konvertiraju oko 30 % laktoze u mliječnu kiselinu, dok mezofilne kulture konvertiraju 16-20 % laktoze. Probiotička kultura roda *Bifidobacterium* treba najduže vrijeme za fermentaciju mlijeka zbog duljeg vremena prilagodbe na mlijeko, a konvertira najmanje laktoze u mliječnu kiselinu.

Change of lactose content after milk fermentation using various microbial cultures

Summary

The purpose of this study was to determine lactose and lactic acid content and acidity changes in typified milk prior to fermentation and in dairy products on 1st and 28th day of their storage at 8 °C in cold environment. In this study 5 different dairy products were observed: yogurt, extra lactose yogurt, bifido milk, sour cream and sour milk. The enzymatic method for determination of lactose has been used. The biggest change in lactose and lactic acid content, according to study results, has happened in the process of fermentation, as expected. About 16-20 % of lactose has been converted by mesophilus, while significantly bigger part (round 30 %) of lactose to lactic acid has been converted by thermophilus. The smallest part of lactose conversion was performed by *Bifidobacterium* therapy culture (just 15 % after the first day and 19 % on 28th day of cold storage) which is due to the greater adjustment period of *Bifidobacterium* in milk for lactose fermentation.

Key words: lactose, fermentation, enzymatic method, lactic acid, fermented milk products

Literatura

1. Arunachalam, K.D. (1999): Role of *Bifidobacteria* in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Researh* 19 (10), 1559-1597.
2. Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2006): Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* 16, 1181-1189.
3. Isolauri, E., Salminen, S., Ouwenhand, A.C. (2004): Probiotics. *Best Practice & Res. Clin. Gastroenterology* 18, 299-313.
4. Kršev, Lj. (1989): Mikrobne kulture u proizvodnji mliječnih proizvoda. Udruženje mljekarskih radnika SR Hrvatske, Zagreb.
5. Labayen, I., Forga, L., Gonzales, A., Lenior-Wijnkoop, I., Nutr, R., Martinez, J.A. (2001): Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Aliment Pharmacol Ther* 15, 543-549.
6. Matijević, B., Božanić, R., Tratnik, Lj., Jeličić, I. (2006): Utjecaj koncentrata proteina sirutke na rast i preživljavanje probiotičkih bakterija u sirutki. *Mljekarstvo* 58 (3), 243-255.
7. Meisel, H., Bockelmann, W. (1999): Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 207-215.
8. Miller, G.D., Jarvis, J.K., Mcbean, L.D. (2007): Handbook of dairy foods and nutrition, 3. izd, Taylor & Francis group, New York.
9. Ni, N.Y., Wang, Y.R., Kokot, S. (2008): Osteryoung square wave voltammetric determination of lactose in food samples by a derivative procedure. *Chinese Chemical Letters* 19, 1491-1494.
10. Official Methods Of Analysis Of Aoac International (1983) Official Method 984.15, 17. izd., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA.
11. Ortu, S., Felis, G.E., Marzotto, M., Deriu, A., Molicotti, P., Sechi, L.A., Dellagio, F., Zanetti, S. (2007): Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *Int. Dairy J.* 17, 1312-1320.
12. Patrigani, F., Lanciotti, R., Mathara, J.M., Guerzoni, M.E., Holzapfel, W.H. (2006): Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *J. Food Microbiol.* 107, 1-11.
13. Sabadoš, D. (1996) Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, 2. izd. (pripremili L. Havranek, Kirin) Hrvatsko mljekarsko društvo, Zagreb.
14. Salminen, S., Isolauri, E. (2006) Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *J. Pediatrics* 149, S115-S120.
15. Saarela, M., Morgensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnology* 84, 197-215.

16. Shapiro, F., Silanikove, N. (2010): Rapid and accurate determination of D- and L- lactate, lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of fluorochromophore: Applications in food quality control. *Food Chemistry* 119, (829-833)
17. Shapiro, F., Shamay, A., Silanikove, N. (2002): Determination of lactose and D-galactose using thio-NAD⁺ instead of NAD⁺. *Int. Dairy J.* 12, 667-669.
18. Tamime, A.Y., Božanić, R., Rogelj, I. (2003): Probiotički fermentirani mliječni proizvodi. *Mljekarstvo* 53 (2) 111-134.
19. Tratnik, LJ. (1998): *Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
20. Tudor, M., Havranek, J. (2009): Nutritivna i zdravstvena vrijednost fermentiranih mlijeka. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4 (3-4), 85-91.
21. Vizoso Pinto, M.G., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (2006): *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *J. Food Microbiol.* 109, 205-214.
22. Walker, W.A., Duffy, L.C. (1998): Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr. Biochem.* 9, 668-675.
23. Xinmin, W., Ruili, Z., Zhihua, L., Yuanhong, W., Tingfu, J. (2008): Determination of glucosamine and lactose in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography. *J. Food Comp. Analysis* 21, 255-258.