

Rast i aktivnost bakterija *Lactobacillus acidophilus* i *Bacterium bifidum* u retentatu obranog mlijeka i sirutke te mješavini retentata

Ljerka Kršev, Ljubica Tratnik, Anica Borović

Izvorni znanstveni rad – Original scientific paper

UDK: 579.864/873.13

Sažetak

Proučavan je rast i promjene pH vrijednosti, koje svojim razvojem u retentatu obranog mlijeka s faktorom koncentracije proteina $fc_p = 2$ i $fc_p = 2,5$ te u mješavini retentata ($fc_p = 2,5$) i retentata sirutke ili retentata demineralizirane sirutke uzrokuju bakterije *L. Acidophilus* CH-5 i *B. Bifidum* Bb₁₂. Zbog većeg puferskog kapaciteta u retentatu mlijeka potrebno je dulje trajanje inkubacije za postizanje pH 4,6. Ustanovljeno je da je dodatak 20% retentata sirutke/demineralizirane sirutke u retentat mlijeka povoljan za rast bakterije *B. Bifidum* Bb₁₂.

Riječi natuknice: *Lactobacillus acidophilus*, *Bacterium bifidum*, retentat obranog mlijeka, retentat sirutke, mješavina retentata, rast, zakiseljavanje

Uvod

Fermentirani mliječni napitci najpoznatija su i vrlo cijenjena skupina mliječnih proizvoda. Fermentirani mliječni napitci najviše se proizvode zbog njihovih senzorskih svojstava.

Međutim, moderan način života, nastojanje da se živi što zdravije, mijenjaju želje i zahtjeve potrošača, pa zdravstvena svojstva fermentiranih mliječnih napitaka postaju važnija od njihovih senzorskih svojstava (Driessen, at all., 1977; Driessen, 1981.; Gilliland, 1986; Lundtstedt, 1986).

To potvrđuju i radovi prikazani na »Kongresu o fermentiranim mliječnim napitcima« (Peinette Langley-Danysz, 1990.) od 14. do 16. prosinca 1990. u Francuskoj na kojem je posebno obrađena tema: »Fermentirani mliječni napitci – zdrava hrana«.

Interes potrošača posebno je porastao za fermentirane mliječne napitke koji sadržavaju bifidobakterije i, također, fermentirane mliječne napitke proizvedene uz dodatak kulture bakterije *L. acidophilus*, jer novija istraživanja djelovanja navedenih bakterijskih vrsta potvrđuju njihov povoljan utjecaj na zdravlje potrošača.

Tako se za bakteriju *B. bifidum* navodi (Peinette Langley – Danysz, 1990.) da štiti novorođenčad od intoksikacije bakterijom *Clostridium perfringens*.

Leretours i sur. (Peinette Langley-Danysz, 1990.) navode da se dodatkom bakterije *L. acidophilus* u kulturu za proizvodnju jogurta dobiva proizvod koji poboljšava aktivnost laktaze, što olakšava probavljivost proizvoda onim potrošačima koji nemaju dovoljno laktaze. Također, navodi se i podatak o antikancerogenim svojstvima bakterije *L. acidophilus* (Peinette Langely-Danysz, 1990).

Ultrafiltracija i reverzna osmoza noviji su procesi, koji mogu poslužiti za obradu mlijeka namijenjenog proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka. Ultrafiltracija se najviše upotrebljava za ugušćenje sirutke, ali i za ugušćenje mlijeka. Primjenom ultrafiltracije u pripremi mlijeka za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka dobivaju se proizvodi novih fizikalno-kemijskih i senzorskih osobina u usporedbi s tradicionalnim fermentiranim mliječnim napitcima. S druge strane, iskorištavaju se bjelančevine sirutke, što je ekološki i ekonomski korisno, a povećava se i hranjiva vrijednost fermentiranih mliječnih napitaka (Abrahamsen, 1979.; Zerfurides i Manolkides, 1978.; te Kršev i Tratnik, 1984).

Ultrafiltracija (UF) mijenja sastav mlijeka ili sirutke. Laktoza, citrati, B-vitaminski, neproteinski N i minerali prolaze djelomice kroz membranu, a mliječna mast i proteini (i tvari koje su za njih vezane) koncentriraju se tijekom procesa UF (Fischbach-Greene, 1985.; Ford i sur., 1978.; Glover, 1971.; Green i sur., 1984.).

Kako je već dobro poznato uloga je mljekarske kulture važna u postizanju poželjne kvalitete fermentiranih mliječnih napitaka, cilj ovog istraživanja bio ustanoviti rast bakterija i proizvodnju mliječne kiseline, te promjene pH vrijednosti retentata obranog mlijeka i sirutke te mješavine retentata inokuliranih kulturama bakterija *L. acidophilus* i *B. bifidum*.

Materijal i metode rada

Materijal

Za istraživanja su upotrijebljeni:

- obrano mlijeko iz mljekare »Dukat« Zagreb;
- retentat obranog mlijeka s faktorom koncentracije proteina (fc_p) = 2 i fc_p = 2,5;
- retentat slatke sirutke (sirutka iz »Zdenke«, Veliki Zdenci) fc_p = 9,96;
- retentat demineralizirane (ionski izmjenjivači) slatke sirutke fc_p = 12,1;
- mješavine retentata obranog mlijeka (fc_p = 2,5) i retentata slatke sirutke/demineralizirane sirutke u omjeru 80 : 20;
- mljekarske kulture (Chr. Hansen's Lab. Danska): bakterija *B. bifidum* Bb₁₂, DVS, (izravno cijepljenje mlijeka za proizvodnju fermentiranog mliječnog napitka) i bakterija *L. acidophilus* CH-5, DVS;
- za UF upotrijebljene su membrane tipa GR 60 PP.

Metode rada

Za rast i aktivnost istraživanih mljekarskih kultura 100 lit. obranog mlijeka, retentata obranog mlijeka, retentata sirutke ili mješavine retentata mlijeka i reten-

tata slatke sirutke/retentata demineralizirane slatke sirutke pasterizirano je pri 82°C/30 sec, ohlađeno do 37°C i inokulirano s:

L. acidophilus CH – 5, DVS (2,5 g/100 l : uputa proizvođača)

B. bifidum Bb₁₂, DVS (2,5 g/100 l).

Broj bakterija tijekom fermentacije određen je:

- za bakteriju *L. acidophilus* CH-5 brojenjem kolonija na MRS agaru (ploče su inkubirane 48 sati pri 37°C u atmosferi s 90% H₂ + 10% CO₂);
- za bakteriju *B. bifidum* Bb₁₂ brojenjem kolonija na MRS agaru (ploče su inkubirane anaerobno 48 sati pri 37°C (7% CO₂)).

Fizikalno-kemijska svojstva određena su:

- suha tvar – sušenjem pri 102 ± 2°C;
- pepeo – žarenjem pri 550°C;
- laktoza – metodom IDF (1974);
- bjelančevine – metodom Kjeldahl i primjenom faktora 6,38 (Rowland, 1938.);
- mliječna mast – metodom Gerber;
- kiselost – metodom Soxhlet-Henkel;
- pH vrijednost – pH metrom Knick tip 646;
- proteinske frakcije – PAG-elektroforezom (Raymond, 1933.).

Rezultati rada i rasprava

Ultrafiltracija mlijeka i sirutke omogućuje proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka veće hranjive vrijednosti, novih fizikalno-kemijskih i sezorskih osobina.

Primjenom kultura koje sadržavaju intestinalne bakterije *L. acidophilus* ili *B. bifidum* moguće je poboljšati zdravstvenu vrijednost fermentiranih mliječnih napitaka.

Zbog toga je proučen rast i aktivnost tih bakterija u retentatu mlijeka i mješavini retentata mlijeka s retentatom slatke sirutke ili demineralizirane sirutke.

Kemijski sastav obranog mlijeka i retentata

Promjene kemijskog sastava mlijeka nakon ultrafiltracije prikazane su u tablici 1.

Ultrafiltracijom obranog mlijeka povećana je količina suhe tvari od prosječne količine 8,40% na prosječno 11,52% i na 13,9% u retentatu obranog mlijeka (faktor koncentracije bjelančevina bio je oko 2 : 1 i 2,5 : 1).

U tablici 2. prikazane su promjene udjela pojedinih proteinskih frakcija u obranom mlijeku nakon ultrafiltracije.

Membrane za ultrafiltraciju, koje su upotrijebljene u istraživanju propusne su za α -laktalbumine pa su zbog toga i ustanovljene promjene relativnog udjela proteinskih frakcija u retentatu obranog mlijeka.

Tablica 1. Prosječni kemijski sastav mlijeka (M) i retentata obranog mlijeka (n=7)
 Table 1 Average chemical composition of skim milk (M) and skim milk retentate (n = 7)

	Obrano mlijeko Skim milk	Retentate fc _p = 2,0	Retentate fc _p = 2,5
% per cent			
suha tvar total solids	8,4	11,52	13,9
laktoza lactose	4,4	4,85	5,17
bjelančevine proteins	3,08	5,48	6,98
pepeo ash	0,69	0,91	1,07
mast fat	0,09	0,15	0,3
mliječna kiselina lactic acid	0,14	0,21	0,25

Tablica 2. Relativni udjeli proteinskih frakcija u obranom mlijeku i u retentatu obranog mlijeka (n = 7)

Table 2 Relative shares of protein fractions in skim milk and retentate of skim milk (n = 7)

Proteinske frakcije Protein fractions	Obrano mlijeko Skim milk	Retentate fc _p = 2,0	Retentate fc _p = 2,5
% per cent			
kappa-kazein kappa-casein	0,90	1,39	1,46
β-kazein β-casein	36,58	35,27	27,41
α _s -kazein α _s -casein	62,81	63,33	71,12
α-laktalbumin α-lactalbumin	13,79	11,93	5,82
β-laktoglobulin β-lactoglobulin	73,38	67,93	70,87
serum albumin	12,81	17,40	21,56
nepoznata frakcija unknown fraction	–	3,48	1,74

Kemijski sastav mješavine retentata

Mješavine retentata obranog mlijeka ($f_{c_p} = 2,5$) i retentata slatke sirutke ili retentata demineralizirane slatke sirutke u omjeru 80 : 20 prikazane su u sljedećoj tablici.

Tablica 3. Prosječan sastav retentata obranog mlijeka ($f_{c_p} = 2,5$) i mješavini tog retentata i retentata sirutke/demineralizirane sirutke ($n = 7$)

Table 3 Average chemical composition of skim milk retentate ($f_{c_p} = 2,5$) and its mixtures with retentate of whey or demineralized whey ($n = 7$)

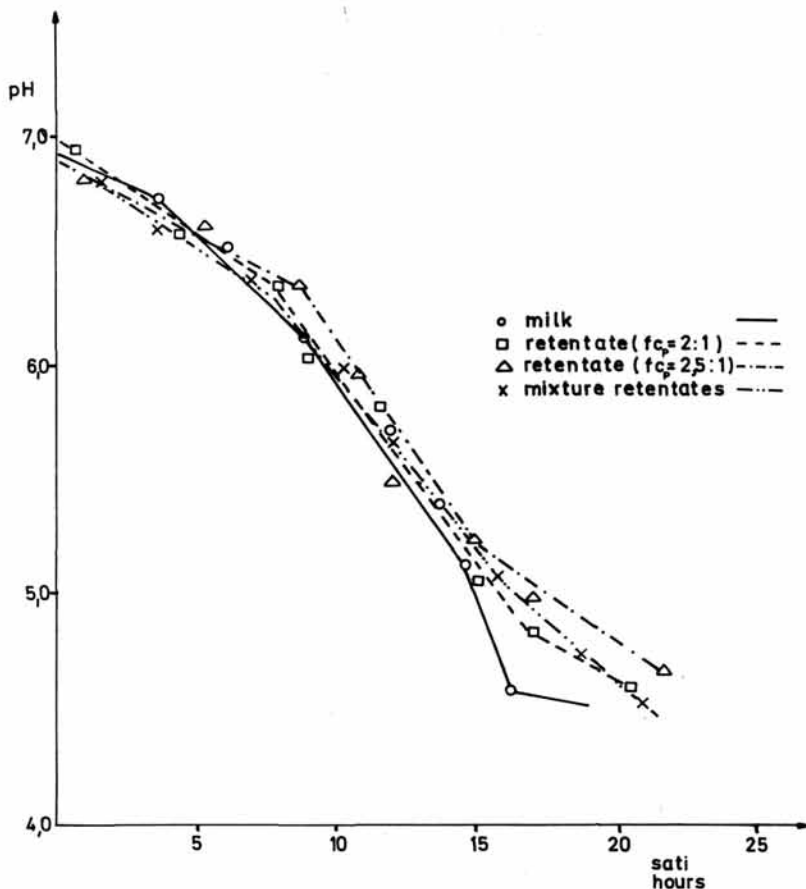
	Retentat obranog mlijeka Retentate of skim milk $f_{c_p} = 2,5$	Mješavina retentata obranog mlijeka s Mixture of skim milk retentate with	
		retentatom sirutke whey retentate	retentatom demine- ralizirane sirutke demineralized whey retentate
%			
suha tvar total solids	13,9	14,34	14,28
laktoza lactose	5,17	5,16	5,37
proteini proteins	6,98	7,48	7,28
pepeo ash	1,07	1,02	0,91
mast fat	0,3	0,41	0,49
mliječna kiselina lactic acid	0,26	0,27	0,23

Aktivnost i rast mljekarskih kultura

Bakterija *Lactobacillus acidophilus* CH-5

Promjene pH vrijednosti obranog mlijeka i retentata obranog mlijeka, te mješavina retentata tijekom fermentacije (pri 37°C) prikazane su u slici 1.

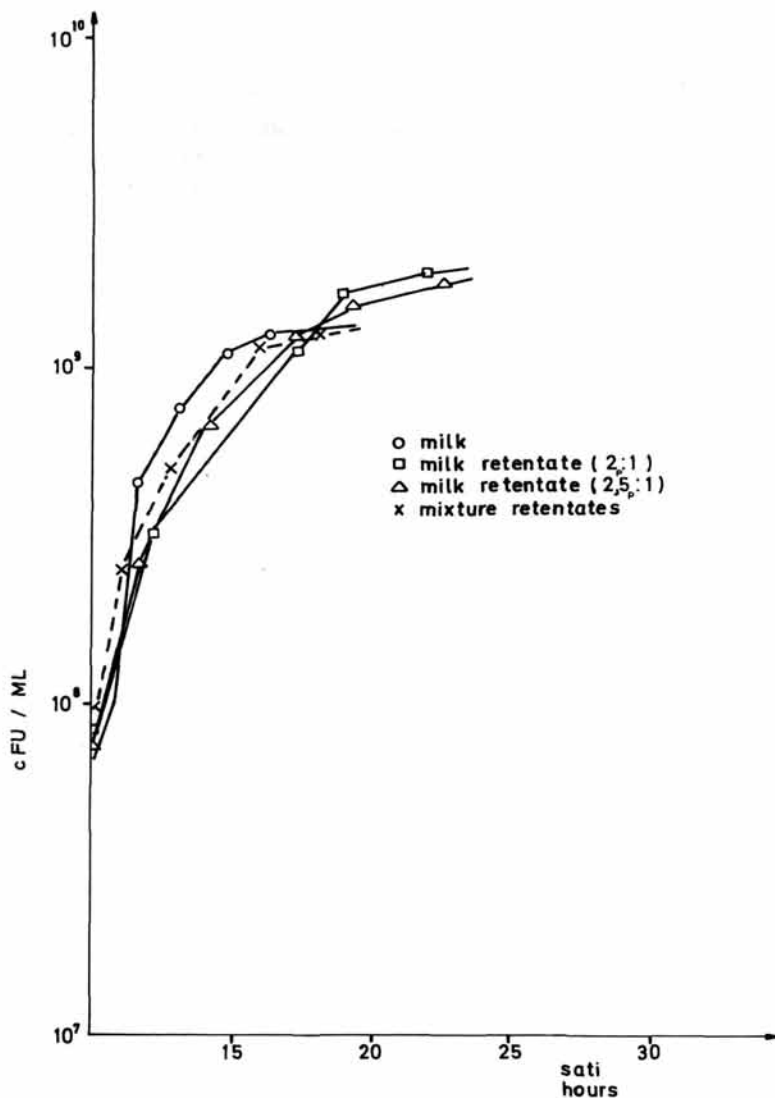
Puferski kapacitet retentata usporava sniženje pH vrijednosti u odnosu na promjene pH vrijednosti obranog mlijeka. Kako veća koncentracija bjelančevina



Slika 1. Promjene pH u obranom mlijeku i retentatu obranog mlijeka te mješavini retentata tijekom fermentacije (pri 37°C) s bakterijom *L. acidophilus* CH-5
 Figure 1 pH changes in skim milk, skim milk retentate and mixture of retentates during fermentation (at 37°C) with *L. acidophilus* CH-5

uzrokuje veći puferi kapacitet (Zerfurides i Manolkides, 1978) pH 4,6 u retentatu obranog mlijeka s $fc_p = 2,0$ postiže se nakon 20 sati, što je duže oko 4 sata od vremena za koje se ista pH vrijednost postiže u obranom mlijeku. Za postizanje pH 4,6 u retentatu s $fc_p = 2,5$ potrebno je 23 sata (slika 2).

Rast kulture bakterije *L. acidophilus* u retantatima mlijeka neznatno je bolji nego u obranom mlijeku, te se nakon 17 sati fermentacije razvije nešto veći broj bakterija. Dodatak retentata sirutke/demineralizirane sirutke nije znatno utjecao na rast bakterije, pa ni na brzinu promjene pH vrijednosti mješavina tijekom fermentacije.

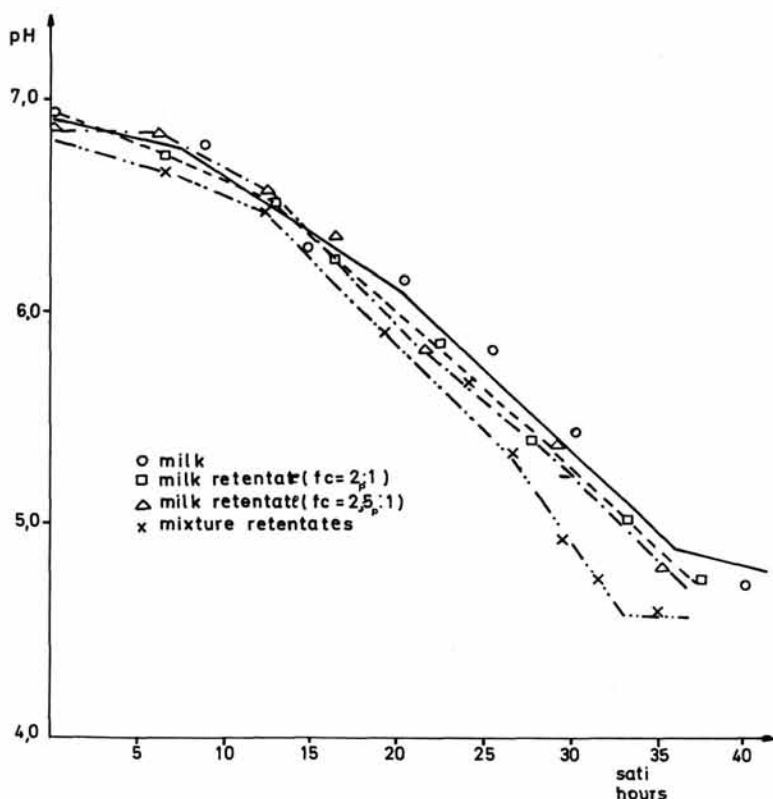


Slika 2. Rast bakterije *L. acidophilus* CH-5 u obranom mlijeku, retentatu obranog mlijeka i mješavini retentata (pri 37°C)

Figure 2 Growth of *L. acidophilus* CH-5 in skim milk, skim milk retentate and mixture of retentates (at 37°C)

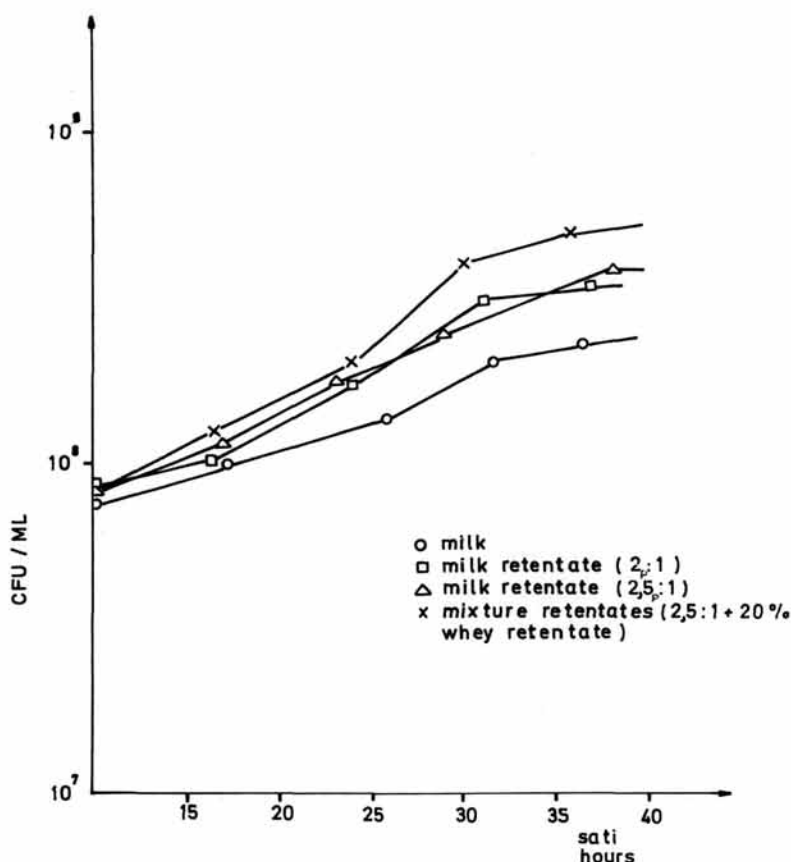
Bakterija *Bacterium bifidum* Bb₁₂

Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije obranog mlijeka, retentata obranog mlijeka i mješavine retentata (pri 37°C) prikazuje slika 3. Za postizanje pH 4,6 u svim analiziranim supstratima trebalo je preko 30 sati fermentacije. Broj bakterija u fermentiranom obranom mlijeku nakon 30 sati inkubacije bio je od 1 do 4×10^8 , a u retentatima od 3 do 5×10^8 . Kultura bakterije *B. bifidum* Bb₁₂ bolje se razvijala u retentatu mlijeka u koji je dodan retentat slatke sirutke (slika 4). Bolji rast bakterija u tako pripremljenoj podlozi može se objasniti izraženom potrebom bifidobakterija za aminokiselinama i utjecajem sniženog oksidoredukcijskog potencijala supstrata zbog dodatka sirutkinih bjelančevina (Zerfurides i Manolkides, 1978.).



Slika 3. Promjene pH obranog mlijeka, retentata obranog mlijeka i smjesi retentata tijekom fermentacije (pri 37°C) s bakterijom *B. bifidum* Bb₁₂.

Figure 3 pH changes in skim milk, skim milk retentate and mixture of retentates during fermentation (at 37°C) with *B. bifidum* Bb₁₂.



Slika 4. Rast bakterije *B. bifidum* Bb₁₂ u obranom mlijeku, retentatu obranog mlijeka i mješavini retentata (pri 37°C)

Figure 4 Growth of *B. bifidum* Bb₁₂ in skim milk, skim milk retentate and mixture of retentates (at 37°C)

Zaključak

Na osnovi rezultata rada može se zaključiti:

- povećanje koncentracije proteina u retentatu mlijeka potiče rast bakterija *L. acidophilus* CH-5 i *B. bifidum* Bb₁₂, ali se vrijeme potrebno za postizanje pH 4,6 produžava zbog većeg puferuskog kapaciteta retentata u odnosu na mlijeko,
- dodatak retentata sirutke/demineralizirane sirutke potiče rast bakterije *B. bifidum* Bb₁₂, pa su mješavine retentata povoljniji supstrat za rast te bakterije.

THE GROWTH AND ACTIVITY OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS AND BACTERIUM BIFIDUM IN SKIM MILK RETENTATE, WHEY RETENTATE AND MIXTURE OF RETENTATES

Summary

Study refers to the growth and activity consequences of *Lactobacillus acidophilus* CH-5 and *Bacterium bifidum* Bb₁₂ cultivation in skim milk retentate ($fc_p = 2.0$ and 2.5) and in mixtures of skim milk retentate with sweet whey/demineralized whey retentates.

Data were compared to growth results of mentioned Bacteria in skim milk.

Owing to high buffer capacity of skim milk retentate it was necessary to inoculate more starter culture and to prolong the cultivation to achieve the same acidifications results.

Addition of 20% whey retentate to milk retentate improved growth of *B. bifidum* Bb₁₂.

Additional index words: *Lactobacillus acidophilus*, *Bacterium bifidum*, skim milk retentate, whey retentate, mixture of retentates, growth, acidification.

Literatura

- ABRAHAMSEN, R. K. (1979), *Milchwissenschaft*, **34**, 65.
DRIESEN, F. M. (1981), Spec. publ. Soc. gen. Microbiol. Acad. Press. p. 99-120.
DRIESEN, F. M., STADHANDERS, J., UBFELS, J. (1977.), *Biotechnol. Bioengineering*, **19**, 821-839.
GILLILAND, S. E. (1986), Proc. XXII Int. Dairy Congress, p. 623-630.
GLOVER, F. A. (1971), *J. Dairy Res.* **38**, 373.
GREEN, M. L., SCOTT, J., ANDERSON, M. A., GRIFFIN, GLOVER, F. A. (1984), *J. Dairy Res.* **51**, 267-278.
FISCHBACH-GREENE, M. S., (1985), Thesis, Dept of Food Sci., Cornell Univ. Ythaca.
FORD, J. E., GLOVER, F. A., SCOTT, K. J. (1978), XX Int. Dairy Congr., Paris, p. 1068.
Int. Dairy Federation (1974.) Doc. No. 28.
LUNDTSTEDT, E. (1986), European Patent No 0073629.
KRŠEV, Lj., TRATNIK, Lj. (1984), *Mljekarstvo*, **34** (9) 256-267.
PEINETTE LANGLEY-DANYSZ (1990), *Revue Latière Française* No 493, 61-64.
ROWLAND, J. C. (1938), *J. Dairy Res.* **9**, 42-47.
RAYMOND, F. (1933), *Anal. Biochem.* **3**, 23
ZERFURIDES, I. V., MANOLKIDES, K. Z. (1978), *Milchwissenschaft* **33**, 617.

Adrese autora – Authors addresses:

Prof. dr. Ljerka Kršev
»Dukat« d.d. Mljekara Zagreb
Doc. dr. Ljubica Tratnik
Mr. Anica Borović
Prehrambeno-biotehnološki
fakultet, Zagreb

Primljeno – Received:

10. 3. 1994.