

Kinetika rasta *Bifidobacterium bifidum* u retentatima mlijeka i demineralizirane sirutke*

Mr. Branka MAGDALENIĆ, prof. dr. Ljerka KRŠEV,
Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper
Prispjelo: 5. 7. 1990.

UDK: 637.145/.6: 637.34:66.067.38

Sažetak

Za uzgoj bakterije *Bifidobacterium bifidum* korišten je retentat mlijeka ugušćen do 1/3 početnog volumena i mješavina retentata mlijeka i demineralizirane sirutke u omjeru 50:50.

Rast i aktivnost bakterijske kulture *B. bifidum* praćen je određivanjem kinetičkih parametara: brzine rasta (dN/dt) i brzine nastajanja mliječne kiseline (dp/dt).

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da veća koncentracija proteina u retentatu obranog mlijeka stimulira rast *B. bifidum* te da se dodavanjem retentata sirutke u retentat mlijeka postiže bolji rast *B. bifidum* za kraće vrijeme fermentacije.

Riječi natuknice: *Bifidobacterium bifidum*, brzina rasta, retentat mlijeka, retentat demineralizirane sirutke.

Uvod

U mljekarskoj industriji posljednjih se godina sve više koristi ultrafiltracija mlijeka. Mliječni proizvodi od mlijeka ugušćenog procesom ultrafiltracije imaju bolja fizikalno-kemijska, organoleptička i nutritivna svojstva (Glover, 1971).

Cilj ovog rada bio je da se na retentatima i mješavini retentata mlijeka i sirutke istraži proizvodnja mliječne kiseline i rast bakterije *Bifidobacterium bifidum*. Kultivacija odabrane kulture u navedenim supstratima vođena je do pH 4,6.

Materijal rada

U radu je korištena liofilizirana kultura *B. bifidum* tvrtke CHR. Hansen's Laboratories iz Danske. Za praćenje rasta i aktivnosti odabrane bakterijske kulture korišteni su:

- obrano mlijeko
- obrano mlijeko koncentrirano ultrafiltracijom (retentat mlijeka). Pasterizirano obrano mlijeko ultrafiltrirano ugušćeno je na 1/3 početnog volumena.

* Rad je referiran na 9. jugoslavenskom međunarodnom simpoziju: »Suvremena proizvodnja i prerada mlijeka«, Portorož, 1990.

— slatka demineralizirana sirutka ugušćena ultrafiltracijom na cca 1/20 početnog volumena sirutke (retentat sirutke)

— mješavina retentata mlijeka i retentata sirutke. Retentat obranog mlijeka ugušćenog do 1/3 početnog volumena mlijeka i retentat obrane demineralizirane sirutke (ugušćene do 1/20 početnog volumena sirutke) pomiješani su u omjeru 50:50.

Za određivanje broja bakterija korišten je M.R.S. — agar (Man, i sur., 1960).

Metode rada i analiza

Ultrafiltracija obranog mlijeka i sirutke rađena je na pilot modulu za ultrafiltraciju DDS-20 1, 8, tvrtke Sukkerfabrikker iz Danske, s membranama za ultrafiltraciju II generacije, tipa GR 60 PP.

Priprema inokuluma

Liofilizirana kultura (2%, g/v) nacijepi se u sterilizirano rekonstituirano mlijeko (12,5%-tna otopina obranog mlijeka u prahu sterilizira se pri 121°C/15', ohladi do temperature cijepjenja 37°C i nacijepi čistom liofiliziranom kulturom). Kultura se inkubira 25—30 sati pri temperaturi 37°C. Dobivena laboratorijska kultura precjepljuje se 2—3 puta uzastopno zbog dobivanja aktivnog inokuluma.

Praćenje fermentacije

U 200 ml pripremljene podloge retentata mlijeka ili mješavine retentata mlijeka i sirutke, nacijepi se 2% (v/v) bakterijske kulture *B. bifidum* i inkubira pri 37°C 25—30 sati. Tijekom inkubacije mjeri se aktivna kiselost i titracijska kiselost sve do postizanja pH 4,6. Usporedno (za svako određivanje kiselosti) uzimaju se uzorci potrebni za određivanje broja živih stanica u ispitivanim supstratima.

Broj živih stanica *B. bifidum* tijekom fermentacije u istraživanim supstratima određen je na M.R.S.-agaru (inkubacija pri 37°C u toku 72 sata).

Aktivna kiselost je određena mjerenjem pH vrijednosti, pH-metrom »Iskra« MA 5735.

Količina mliječne kiseline (%) određena je računski.

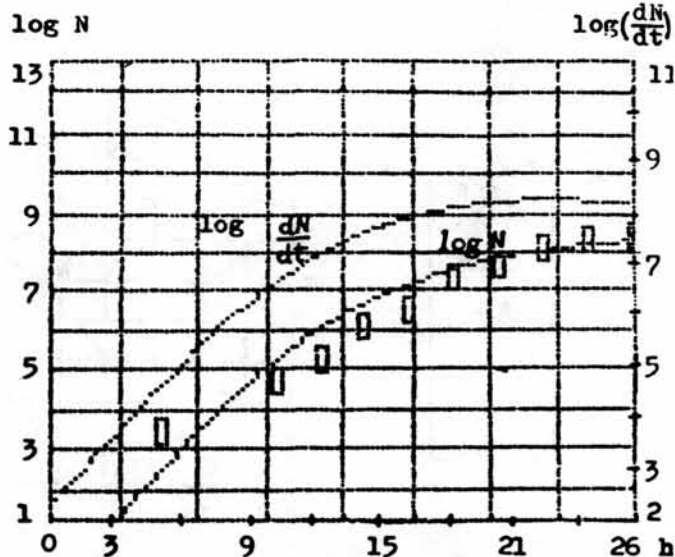
Brzina rasta (dN/dt) i **nastajanja mliječne kiseline** (dp/dt) dobivene su derivacijom krivulje rasta (Luedeking i Piret, 1959). Brzina rasta prikazana je kao brzina promjene broja živih stanica s vremenom (dN/dt) N ml⁻¹h⁻¹. Brzina nastajanja mliječne kiseline prikazana je kao brzina promjene koncentracije mliječne kiseline s vremenom (dp/dt) g l⁻¹h⁻¹.

Rezultati rada

Rezultati praćenja brzine rasta, brzine nastajanja mliječne kiseline u obranom mlijeku, u retentatu obranog mlijeka ugušćenog do 1/3 početnog

$t(h)$ $N(ml^{-1})$

5	3
10	3 · 10 ³
12	4
14	5 · 10 ⁴
16	5
18	2 · 10 ⁵
20	6
22	1.2 · 10 ⁶
24	6
26	3 · 10 ⁶
	7
	2.1 · 10 ⁷
	7
	5 · 10 ⁷
	8
	1.2 · 10 ⁸
	8
	2 · 10 ⁸
	8
	3 · 10 ⁸

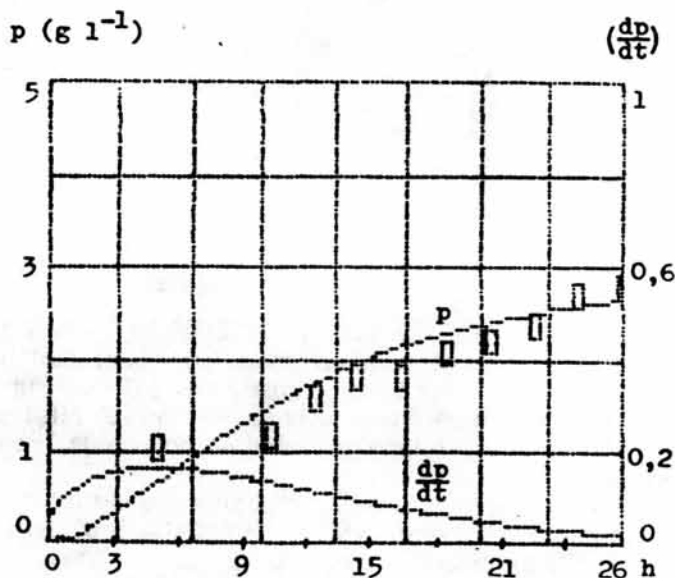


Dijagram 1. Brzina rasta (dN/dt) bakterijske kulture *B. bifidum* u obranom mlijeku

Diagram 1. Growth rate (dN/dt) of *B. bifidum* bacterial culture in skim milk

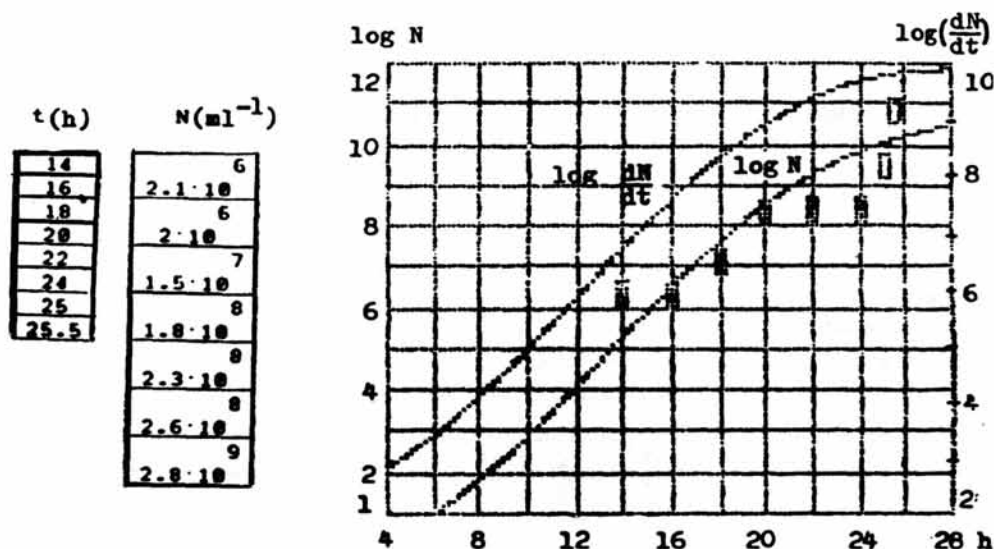
$t(h)$ $p(g\ l^{-1})$

5	1.08
10	1.2
12	1.6
14	1.8
16	1.8
18	2.1
20	2.2
22	2.4
24	2.7
26	2.8



Dijagram 2. Brzina nastajanja mliječne kiseline (dp/dt) u obranom mlijeku za vrijeme fermentacije kulturom *B. bifidum*.

Diagram 2. The rate of lactic acid formation (dp/dt) in skim milk during fermentation with *B. bifidum*



Dijagram 3. Brzina rasta (dN/dt) bakterijske kulture *B. bifidum* u retentatu mlijeka (1/3)

Diagram 3. Growth rate (dN/dt) of *B. bifidum* bacterial culture in milk retentate (1/3)

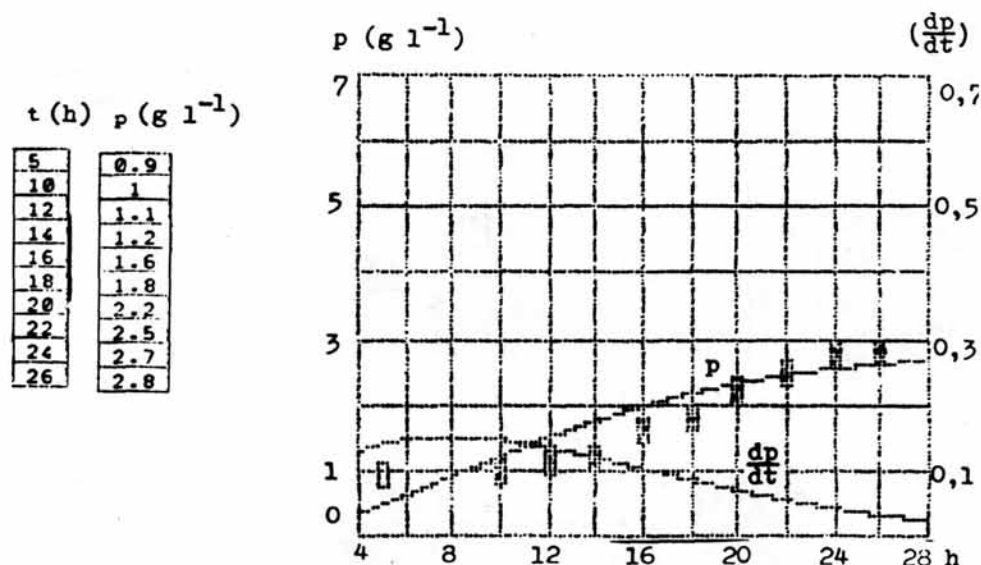
volumena, i mješavini retentata mlijeka (1/3) i retentata demineralizirane sirotke (1/20) u omjeru 50:50 prikazani su u dijagramima od 1 do 6. Uz dijagrame su tabelarno prikazani rezultati promjene količine mliječne kiseline i broj živih stanica tijekom fermentacije.

Diskusija

Rast bakterijske kulture *B. bifidum* u obranom mlijeku je relativno spor, kao što se vidi iz dijagrama 1. Najveći broj živih stanica nađen je nakon 22 sata fermentacije kada je postignut i pH 4,6. Broj živih stanica istraživane bakterijske kulture bio je u redu veličine 10⁶/ml. Produženjem fermentacije do 26 sati nije zabilježeno značajno povećanje broja bakterijskih stanica u mlijeku.

Nacjeppljivanjem istražene bakterijske kulture u obranom mlijeku ugušćenom do 1/3 početnog volumena mlijeka, broj živih stanica u supstratu u redu je veličine kao što je utvrđen u mlijeku (10⁶/ml) nađen nakon 20 sati fermentacije. Produženjem fermentacije na 26 sati broj živih bakterijskih stanica rastao je do 2,8 · 10⁶/ml (dijagram 3).

Rezultati pokazuju da bakterijska kultura *B. bifidum* bolje raste u retentatu mlijeka (ugušćenje do 1/3 početnog volumena), a razlog tome je povećanje



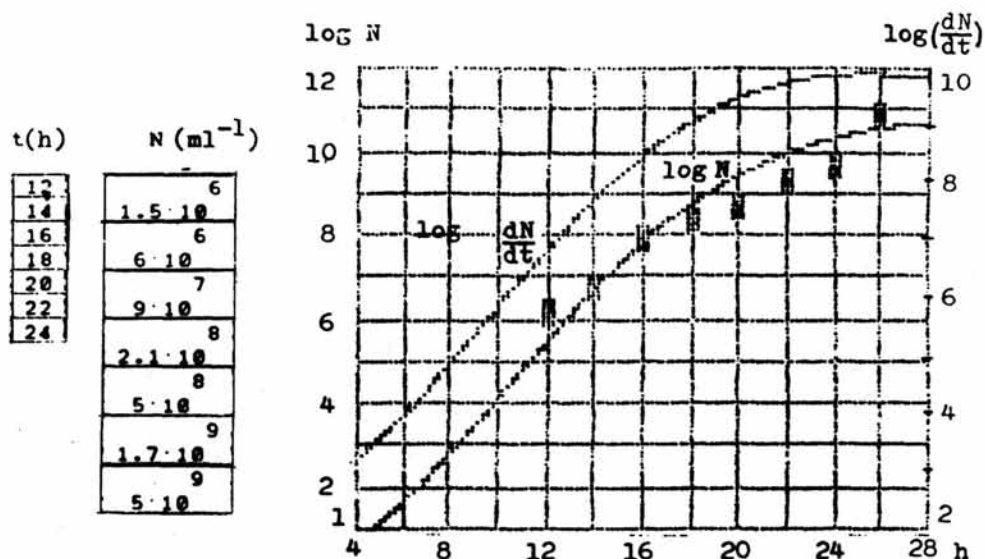
Dijagram 4. Brzina nastajanja mliječne kiseline (dp/dt) u retentatu mlijeka (1/3) za vrijeme fermentacije kulturom *B. bifidum*.

Diagram 4. The rate of lactic acid formation (dp/dt) in milk retentate (1/3) during fermentation with *B. bifidum*

na količina proteina u retentatu i njihovo puferско djelovanje na kiseline proizvedene tijekom fermentacije. Rezultati se slažu s rezultatima istraživanja rasta bakterija mliječne kiseline u retentatima obranog mlijeka (različitih ugušćenja) koje navode Mistry i Kosikowski (1985), te Kršev i Tratnik (1988).

U mješavini retentata obranog mlijeka (ugušćenog do 1/3 početnog volumena) i retentata demineralizirane obrane sirutke (ugušćene do 1/20 početnog volumena) u omjeru 50:50, broj bakterijskih stanica u redu veličine 10^8 /ml (kao u mlijeku) utvrđen je nakon 18 sati fermentacije. Produživanjem fermentacije (do 26 sati) utvrđeno je $5 \cdot 10^9$ /ml živih stanica u supstratu (dijagram 5). Rezultati pokazuju da dodatak koncentrata sirutkinih proteina (retentat sirutke) povoljno utječe na rast istraživane bakterijske kulture. Razlog takvom, značajno povoljnom, djelovanju sirutkinih proteina nije samo pufer kapacitet dodanih proteina već i neke tvari koje pospešuju rast *B. bifidum* vrste, a koje se oslobađaju tijekom pripreme supstrata (mješavine retentata) za fermentaciju, tj. toplinskom obradom supstrata pri $80^\circ\text{C}/15-20$ sek. (Kršev, Tratnik, 1988).

Maksimalna brzina nastajanja kiseline (dp/dt) tijekom fermentacije mlijeka bakterijskom kulturom *B. bifidum* utvrđen je nakon 3 sata fermentacije



Dijagram 5. Brzina rasta (dN/dt) bakterijske kulture *B. bifidum* u mješavini retentata mlijeka (1/3) i retentata demineralizirane sirutke (1/20) u omjeru 50:50

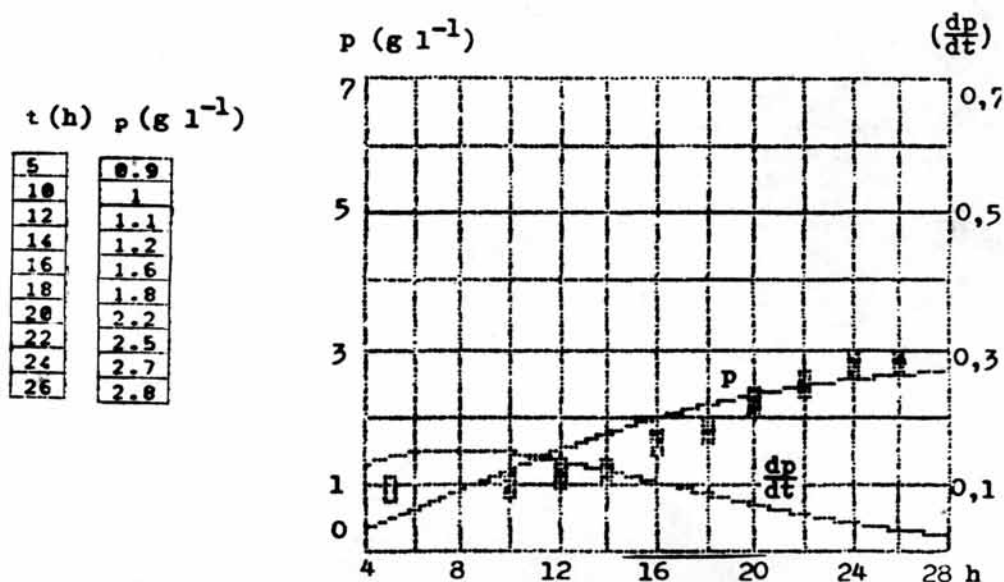
Diagram 5. Growth rate (dN/dt) of *B. bifidum* bacterial culture in mixture of milk (1/3) and demineralized whey retentates (1/20) (proportion 50:50)

(dijagram 2), a u retentatu obranog mlijeka ugušćenog do 1/3 početnog volumena i mješavini retentata obranog mlijeka (ugušćenog do 1/3 početnog volumena) i retentata demineralizirane sirutke (ugušćene do 1/20 početnog volumena) maksimalna brzina nastajanja mliječne kiseline (dp/dt) nađena je nakon 6 sati fermentacije, što upućuje na pufersko djelovanje proteina u retentatu mlijeka odnosno u mješavini (omjer 50:50) retentata mlijeka i sirutke (dijagrami 4, 6).

Zaključak

Rezultati rada i njihova diskusija omogućuju slijedeći zaključak koji se odnosi na rast *B. bifidum* u mlijeku, retentatu mlijeka i mješavini retentata mlijeka i sirutke:

— Za rast bakterijske kulture *B. bifidum* povoljnije je koristiti retentat mlijeka (ugušćenog do 1/3 početnog volumena) i retentata obrane demineralizirane sirutke ugušćene do 1/20 početnog volumena u omjeru 50:50, jer se za kraće vrijeme fermentacije razvije isti broj bakterijskih stanica u supstratu.



Dijagram 6. Brzina nastajanja mliječne kiseline (dp/dt) u mješavini retentata mlijeka (1/3) i retentata demineralizirane sirutke (1/20) u omjeru 50:50 za vrijeme fermentacije kulturom *B. bifidum*

Diagram 6. The rate of lactic acid formation (dp/dt) in mixture of milk (1/3) and demineralized whey (1/20) retentates (proportion 50:50) during fermentation with *B. bifidum*

KINETICS OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM GROWTH IN RETENTATES OF MILK AND DEMINERALIZED WHEY

Summary

Milk retentate condensed to 1/3 of its original volume and 50:50 mixture of milk and demineralized whey retentates were used for *B. bifidum* cultivation.

Growth and activity of *B. bifidum* culture were observed by determining kinetic criteria: growth rate (dN/dt) and lactic acid formation rate (dp/dt).

According to results skim milk retentate containing more proteins stimulated growth of *B. bifidum*, and addition of whey retentate to milk retentate resulted in better growth of *B. bifidum* and shorter fermentation length of time.

Additional index words: *Bifidobacterium bifidum*, growth rate, Milk retentate, Demineralized whey retentate.

Literatura

- GLOVER, F. A. (1971): Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry, Technical Bulletins 5, The National Institute for Research in Dairy Industry.
- KRŠEV, Ljerka, TRATNIK, Ljubica, (1988): Međurepublički YU—SAD projekt, pp-70
•Unapređenje tehnologije prerade mlijeka u korištenju membranskih procesa•.
- LUEDEKING, R. and PIRET, E. L. (1959): A kinetic study of the lactic acid fermentation batch at controlled pH, *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, **1**, 393-412.
- MAN, J. C. De., ROGOSA, M., SHARPE, M. E. (1960): *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130
- MISTRY, V. V., KOSIKOWSKI, F. V., J. (1985): *Dairy Sci.* **68**, 2536