

UTICAJ RAZLIČITOG ODNOSA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE NA SPEKTAR AMINOKISELINA JOGURTA PROIZVEDENIH IZ KRAVLJEG MLIJEKA*

Natalija KAPAC-PARKAČEVA, O. BAUER i T. ČIZBANOVSKI
Zemljodjelsko-šumarski fakultet, Skopje

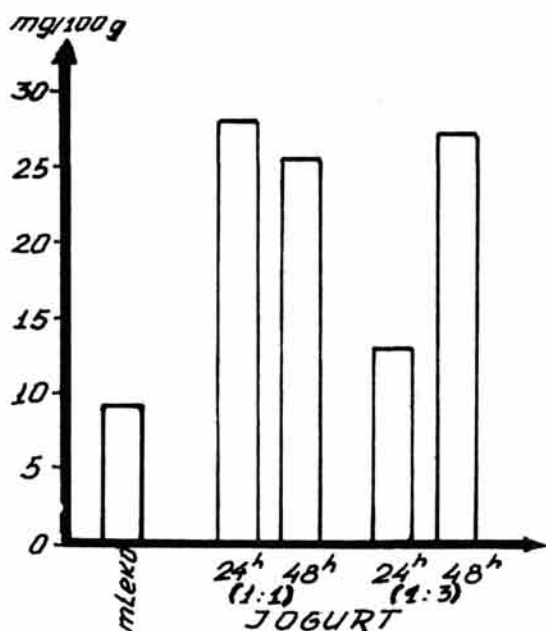
U V O D

Već dugi niz godina mlečno-kiseli proizvodi su predmet opsežnih naučnih ispitivanja. Počevši od MEČNIKOVA (1908) koji je, potaknut radovima Pastera, rasvetlio ulogu bakterija pri proizvodnji jogurta pa sve do danas, velik broj autora nastoji da svojim istraživanjima, na bazi biohemijskih i mikrobioloških saznanja, pruži doprinos poznavanju mlečno-kiselih proizvoda sa aspekta uticaja mnogobrojnih faktora na njihova organoleptička svojstva, na hemijski sastav, njihovu biološku i dijetetsku vrednost kao i tehnologiju. Deo tih istraživanja usmeren je ulozu koju mlečno-kisele bakterije imaju, ne samo pri mlečno-kiseloj fermentaciji, na kojoj se zasniva tehnologija mlečno-kiselih proizvoda, već i ulozu koje one imaju pri razlaganju mlečnih belančevina. U tom smislu detaljna istraživanja što su ih preduzeli BROCH et al. (1959) pokazala su da se veća svarljivost kiselomlečnih proizvoda u odnosu na sirovinu zasniva isključivo na sposobnosti mlečno-kiselih bakterija. Prema istima, dok sa jedne strane svojim prisustvom omogućavaju stvaranje mlečne kiseline, koja doprinosi snažnijem delovanju sokova za varenje, te iste bakterije mlečne kiseline, u zavisnosti od vrste, deluju u manjem ili većem opsegu i na mlečne belančevine, razgrađujući ih delomično do nisko molekularnih, peptida i aminokiselina (DAVIS et al., 1973; PETERSON, 1948; BULLOK et al, 1956; i dr.). U tom smislu, daljnja saznanja (TARTANEN, 1930; BARIBO & FOPSTER, 1951; i dr.) su pokazala da je proteolitička aktivnost bakterija mlečne kiseline različita. Dok SASAKI & NAKAE (1960) uočavaju veoma malu mogućnost razlaganja belančevina od strane streptokoka, POZNANSKI et al., (1965) utvrđuju da poređenje sa vrstom *Streptococcus, Thermophilus*, veću proteolitičku moć ima *Lactobacillus bulgaricus*. Ovakve konstatacije dopunjuju i istraživanja što su ih izveli MILLER & KANDLER (1964, 1966, 1967) koji ukazuju da jedan deo oslobođenih aminokiselina asimiliraju bakterije, a drugi ostaje u mlečnom serumu. Konstatacija istih, dopunjena istraživanjima drugih autora (DUNN et al., 1947; GUIRARD et al., 1962), ukazuje da broj i količina slobodnih aminokiselina nije identičan kod kiselomlečnih proizvoda. Dok je mali broj slobodnih aminokiselina konstantna pojava u sirovom mleku, spektar aminokiselina proizvedenih kiselomlečnih proizvoda je količinski bogatija, ali je zato veoma kolebljiv i ovisan, ne samo od vrste već i od soja korišćenih bakterija mlečne kiseline. Takva pojava je posledica nejednake asimilacije slobodnih aminokiselina koje u različitom opsegu, samo delimično služe pojedinim bakterijama mlečne kiseline za izgradnju svojih ćelija. To je razlog kvalitativne i kvantitativne neidentičnosti slobodnih aminokiselina belančevina mleka kao sirovine i proizvedenih mleč-

*Rad je finansirao Fond za naučni rad SR Makedonije — Zagreb, 5-7. 2. 1975. Referat održan na XIII seminaru za mljekarsku industriju, Tehnološki fakultet.

no-kiselinskih proizvoda, kod njih u zavisnosti od dužine kiseljenja od korišćenih vrsta bakterija, pa čak i soja, svaki ima svoj karakteristični spektar aminokiselina.

Uticaj različitih bakterija mlečne kiseline na sadržinu slobodnih aminokiselina istraživali su MORGAN et al. (1951), CHEBOTATREV (1962), HETZEL (1958), IHLOV & FRITSCHKE (1962), VAN de ZANT et al. (1953), SAMUELSON (1959) LÜCK & PAVLIK (1964), MILLER & KANDLER (1964, a 1966, 1967) OBRADOVIĆ et al. (1967), i dr. Sva ova ispitivanja potvrđuju tendenciju bakterija mlečne kiseline da u većem ili manjem obimu obogaćuju proizvod istim onim aminokiselinama koje su u sirovini (mleku) zastupljene u znatno malim količinama, a što u stvari uzrokuje njihovu kvantitativnu promenu.

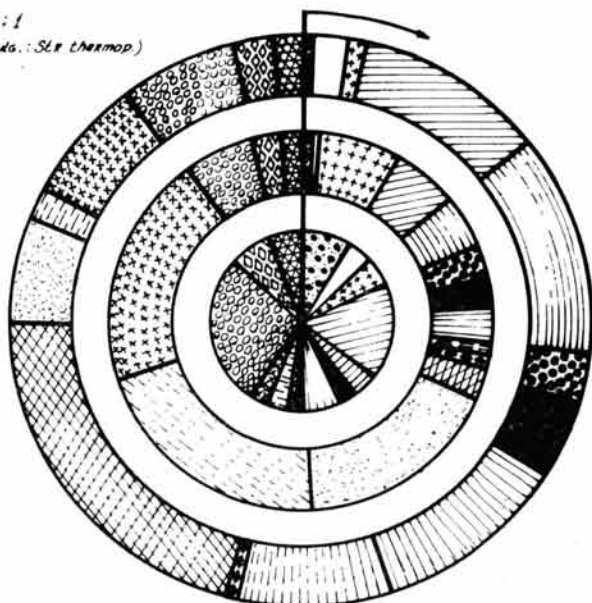


Graf. 1 Dinamika ukupnih slobodnih aminokiselina u toku kiseljenja

Obzirom na sve širu primenu kiselomlečnih proizvoda u ishrani naših ljudi a znajući njihovu hranljivu vrednost i povoljno delovanje na zdravlje, postavili smo za cilj da u ovome radu, proučimo dinamiku slobodnih aminokiselina u procesu kiseljenja mleka. Pri tome, uzimajući kao predmet istraživanja jogurt, imali smo za zadatak da utvrdimo:

- kakva je dinamika slobodnih aminokiselina u procesu proizvodnje jogurta;
- kako različiti odnos bakterija mlečne kiseline za proizvodnju jogurta utiče na formiranje spektra aminokiselina;
- kako se spektar aminokiselina menja u toku lagerovanja jogurta.

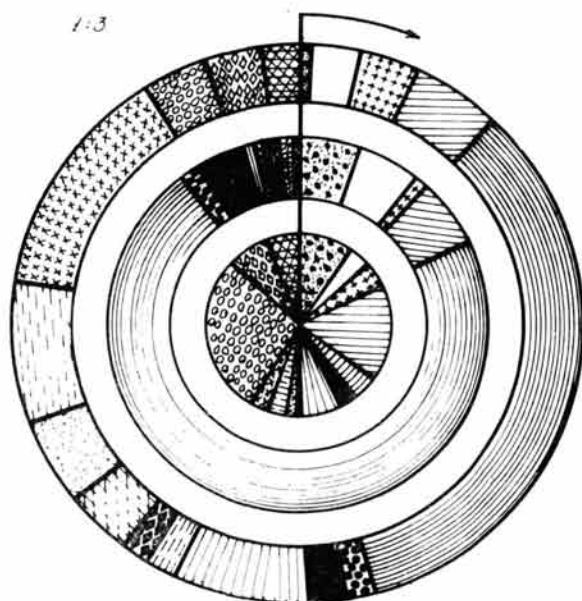
1:1
(Lact. Bdg.: Str. thermop.)



Legenda:

-  glutaminska kiselina
-  prolin
-  glicin
-  alanin
-  cistin
-  valin
-  metionin
-  izoleucin
-  leucin
-  tirozin
-  fenilalanin
-  lizin
-  histidin
-  arginin
-  asparaginska kiselina
-  creonin
-  serin

1:3



Graf. 2 Dinamika slobodnih aminokiselina u jogurtu koji je proizveden upotrebom jogurtnih kiselina s različitim međusobnim odnosom bakterija mlečne kiseline (*Lactobaciluh bulgarius* i *Streptococcus thermophilus*)

METARIJAL I METODIKA RADA

Za proizvodnju jogurta korišćeno je sveže kravlje mleko sa fakultetskog poljoprivrednog gazdinstva. Nakon ukuvavanja od pola časa, mleko je razdeljeno na dva dela, a potom hlađeno do 42°C, na kojoj temperaturi je izvršeno potkiseljavanje uz dodavanje 2% mase za jogurt. Za tu svrhu korišćene su čiste jogurtne kulture dobijene od Instituta za mlekarstvo iz Novog Beograda, a kod kojih je odnos između vrsta *L. bulgaricus*: *thermophilus* bio 1:1 i 1:3. Pa završenom kiseljenju, koje je trajalo oko 2,5 časa, jogurt je hlađen do +4°C. Da bi se ustanovilo kako proces kiseljenja utiče na dinamiku slobodnih aminokiselina na relaciji sirovina — jogurt, uzimani su uzorci mleka kao i jogurta nakon 24 časa od izrade, a da bi se sagledao uticaj kraćeg lagerovanja jogurta na dinamiku istih, nakon 48 časova lagerovanja. Istovremeno je određivana kiselost jogurta, i to titracionom metodom (°T) i određivanjem vrednosti pH.

Za istraživanje slobodnih aminokiselina korišćen je Beckmanov automatski analizator, model 120C, pri čemu su uzorci pripremani preko ekstrakcije jogurta alkoholom i propuštanjem dobivenog ekstrakta kroz stub kationjskog izmjenjivača (MOORE & STEIN, 1956). Pri određivanju slobodnih aminokiselina nije određivan triptofan. Uporedo je izvršeno pet ponavljanja, tako, da dobijeni rezultati predstavljaju prosečne vrednosti izračunate varijaciono statističkom obradom rezultata.

REZULTATI I DISKUSIJA

Dinamika slobodnih aminokiselina u mleku i nakon njegovog kiseljenja prikazana je u tab. 1. Iz iste može da se vidi broj identificiranih slobodnih aminokiselina, njihove prosečne vrednosti u mleku i jogurtu proizvedenom koriš-

amino kiselina					
	mleko	1:1* 24h	1:1 48h	1:3* 24h	1:3 48h
Asparaginska kis.	0,90	0,35	0,19	0,65	0,02
Treonin	0,34	0,10	0,57	0,70	0,88
Serin	0,43	2,10	0,16	0,13	0,88
Glutaminska kis.	1,55	1,60	2,74	0,78	1,44
Prolin	0,36	1,37	3,08	9,13	8,94
Glicin	trg.	0,65	0,65	0,19	0,40
Alanin	0,31	0,81	1,13	0,59	0,70
Cistinin	0,65	0,88	2,70	0,11	1,98
Valin	trg.	0,25	2,23	0,03	0,48
Metionin	trg.	0,32	0,13	trg.	0,43
Izoleucin	0,05	0,78	5,18	0,03	0,99
Leucin	0,14	4,86	1,45	0,11	1,31
Tirozin	0,37	5,93	0,43	0,02	2,07
Fenilalanin	0,26	5,03	1,73	0,03	3,60
Lizin	2,47	1,71	1,64	0,26	1,04
Histidin	0,65	0,75	0,57	0,02	0,22
Arginin	0,52	0,60	0,46	—	0,62
Ukupno:	9,00	28,09	25,04	12,78	26,62

*odnos bakterija *L. bulgaricus* prema bakterijama *str. thermophilus* u jogurtnoj kulturi

Polazeći od iste sirovine, u kojoj preovlađuju lizin, glutaminska i asparaginska kiselina, kako je to već spomenuto, nakon 24 časa od kiseljenja u jogurtu kod kojeg je odnos vrsta *L. bulgaricus* : *Str. thermophilus* bio 1:1, pokraj ukupnog povećanja slobodnih aminokiselina, dolazi i do znatne promene njihovog pojedinačnog učešća. Ako izvršimo grupnu raspodelu slobodnih aminokiselina prema učešću, analogno grupama kod mleka ($< 2\%$, $2-5\%$, $5-10\%$ i $> od 10\%$), vodeće mesto preuzimaju tirozin, fenilalanin i leucin sa ukupno $56,32\%$; potom slede serin, lizin i glutaminska kiselina sa $19,26\%$; treću grupu čine prolin, cistin, alanin, izoleucin, histidin, glicin i arginin sa ukupno $20,79\%$; dok poslednju grupu sačinjavaju asparaginska kiselina, metionin, valin i treonin sa $3,63\%$. Pri ostalim istim uslovima, primenom kultura u odnosu 1:3, malo količinsko povećanje ukupnih slobodnih aminokiselina popraćeno je velikim jednostranim promenama odnosa učešća pojedinih slobodnih aminokiselina. Apsolutno vodeće mesto vode uzima prolin sa $71,43\%$; slede glutaminska kiselina, asparaginska kiselina i treonin sa $16,66\%$; treću grupu čine alanin i lizin sa ukupno $6,76\%$; dok četvrtu grupu čini devet slobodnih aminokiselina, i to: glicin, serin, cistin, leucin, valin, izoleucin, fenilalanin, tirozin i histidin sa ukupno $5,24\%$. Međutim i arginin ovde su prisutni samo u tragovima.

U toku sledećih 24 časa (ukupno 48 časova) od potkiseljavanja, nastaju daljnje značajne promene, pri čemu kod odnosa 1:1 vodeće mesto preuzimaju izoleucin, prolin, glutaminska kiselina i cistin sa ukupno $54,71\%$; sledi grupa valin, fenilalanin, lizin, leucin sa ukupno $28,15\%$; u treću grupu dolaze alanin, glicin, histidin i treonin sa ukupno $11,67\%$; dok poslednju grupu čine arginin, tirozin, asparaginska kiselina, serin i metionin sa $5,4\%$. Istovremeno kod odnosa upotrebljenih bakterija mlečne kiseline u jogurnim kulturama 1:3, pri velikom povećanju ukupnih slobodnih aminokiselina, uz prolin u vodeću grupu dolazi i fenilalanin koje aminokiseline ukupno čine $47,13\%$; sledi grupa tirozin, cistin, glutaminska kiselina i leucin sa ukupno $25,67\%$; trećoj grupi pripadaju lizin, izoleucin, treonin, serin, histidin, alanin i arginin sa ukupno $22,29\%$, a u poslednjoj grupi su valin, metionin, glicin i asparaginska kiselina sa ukupno 5% .

Ovde treba da se napomene da su tri slobodne aminokiseline glicin, valin i metionin, ustanovljene u sirovini samo u tragovima, dok se u toku kiseljenja iste javljaju u količinama od $0,52-6,90\%$.

Upoređenjem podataka za slobodne aminokiseline jogurta pri različitom odnosu bakterija mlečne kiseline, iz tab. 1 kao i iznesene diskusije, vidi se da nakon 24 časa, jogurt sa odnosom upotrebljenih bakterija 1:1 ima 14 slobodnih aminokiselina u osetno većim količinama, nego onaj sa odnosom 1:3, pri čemu se naročito ističu: izoleucin, leucin, tirozin, fenilalanin, serin, lizin i glutaminska kiselina. Tri slobodne aminokiseline prolin, asparaginska kiselina i treonin nalaze se u većim količinama kod odnosa bakterija 1:3.

U istom slučaju iz daljnjeg upoređenja podataka vidi se da nakon 48 časova od izrade, postižući približno jednake količine ukupnih slobodnih aminokiselina kod jogurta sa odnosom bakterija u kulturi 1:1, devet kiselina od istih imaju veće vrednosti od onih kod odnosa 1:3. Među njima naročito se ističu većom razlikom još uvek izoleucin, glutaminska kiselina i lizin. Međutim, kod odnosa bakterija u kulturi 1:3, osam slobodnih aminokiselina se javlja u većim količinama, nego kod odnosa 1:1, a naročito se ističu prolin, fenilalanin i tirozin.

Bazirajući se na fiziološkom značenju slobodnih aminokiselina (sl. 3) iz ovakve njihove zastupljenosti pri različitom odnosu bakterija u jogurtnoj kulturi može da se zaključi da u poređenju sa mlekom, kod koga je odnos esencijalnih i zamenljivih aminokiselina bio približno jednak, kod jogurta se on bitno menja u ovisnosti od bakterija u kulturi. Pri ostalim istim uslovima, kod jogurta sa odnosom bakterija 1:1 na esencijalne aminokiseline nakon 24 časa otpada 51,27⁰/₀, a nakon 48 časova 55,75⁰/₀, dok na zamenljive 48,73⁰/₀ odnosno 44,25⁰/₀. Nasuprot ovome, kod jogurta sa odnosom bakterija u kulturi 1:3 na esencijalne aminokiseline nakon 24 časa od potkiseljavanja otpada svega 9,23⁰/₀, odnosno posle 48 časova 38,25⁰/₀, što u poređenju sa prethodnim kao i mlekom, predstavlja znatno niže vrednosti. Prema tome, jogurt izrađen sa odnosom bakterija u kulturi 1:1 ima znatno veću prisutnost nezamenljivih slobodnih aminokiselina.

Velikom količinom posebno se ističe kod odnosa bakterija u kulturi 1:3 prolin, što se poklapa sa nalazima spomenutih autora koji su utvrdili da u prisustvu bakterije *Str. thermophilus* dolazi do velike akumulacije prolina. Kod nekih slobodnih aminokiselina naši rezultati se kvantitativno razlikuju od drugih autora, što je i razumljivo kada se uzmu u obzir različite sirovine, metodika rada, a naročito različite jogurtne kulture.

Sumirajući naše rezultate moguće je na kraju ukazati da obzirom na spektar slobodnih aminokiselina i njihovo fiziološko značenje, treba dati prednost jogurtu koji je izrađen od kultura u kojima je odnos bakterije *L. bulgaricus* : *Str. thermophilus* 1:1 i 24—48 časova.

ZAKLJUČCI

Na osnovu izvršenih istraživanja slobodnih aminokiselina u jogurtu pri različitim odnosu bakterija mlečne kiseline u jogurtnim kulturama (*L. bulgaricus* : *Str. thermophilus* 1:1 i 1:3) moguće je izvući sledeće zaključke:

U mleku i jogurtu proizvedenom iz tog istog mleka, sa izuzetkom triptofana, indentificirano je ukupno 17 slobodnih aminokiselina, čija je količina veoma neujednačena.

Nakon potkiseljavanja, količina ukupnih slobodnih aminokiselina se povećava u zavisnosti od odnosa spomenutih bakterija u jogurtnim kulturama i vremena kiseljenja.

U mleku je utvrđeno 9,0 mg/100 g ukupnih slobodnih aminokiselina. Nakon 24 časa od kiseljenja, primenom odnosa bakterija u kulturi 1:1, količina slobodnih aminokiselina u jogurtu je 28,09 mg/100 g, ili za tri puta veća nego u mleku, a kod odnosa 1:3 iznosi 12,7 mg/100 g što čini samo za 1,5 puta više. Međusobnim upoređenjem, količina ukupnih slobodnih aminokiselina u jogurtu kod odnosa bakterija mlečne kiseline 1:1 je za 2,2 puta veća od one kod odnosa 1:3.

Posle kraćeg lagerovanja (48 časova, ukupna količina slobodnih aminokiselina u jogurtu se skoro izjednačava, pri čemu kod odnosa bakterija 1:1 ona iznosi 25,04 mg/100 g, a kod odnosa 1:3 iznosi 26,62 mg/100 g, što ukazuje da se maksimalna vrednost istih kod odnosa bakterija u kulturi 1:1 postiže nakon 24 časa, a u drugom slučaju za dva puta duže vreme.

U okviru ukupnih slobodnih aminokiselina, zastupljenost njihova u toku kiseljenja je veoma različita. Kod sirovine preovlađuju lizin, glutaminska i

asparaginska kiselina, u jogurtu pri odnosu bakterija u kulturi 1:1 posle 24 časa, pri osetnom povećanju ukupnih slobodnih aminokiselina, vodeće mesto preuzimaju tirozin, fenilalanin i leucin (56,32%), potom sledi serin, lizin, glutaminska kiselina (19,26%), dok su ostale zastupljene u manjim količinama. Kod odnosa bakterija u kulturi 1:3 uz znatno manje količinsko povećanje ukupnih slobodnih aminokiselina, apsolutno vodeće mesto uzima prolin (71,43), sledi glutaminska kiselina, asparaginska kiselina i treonin. Metionin i arginin su prisutni samo u tragovima, a ostale slobodne aminokiseline u relativno malim količinama.

Nakon daljnja 24 časa lagerovanja, kod odnosa bakterija u kulturi 1:1 vodeće mesto preuzimaju izoleucin, prolin, glutaminska kiselina i cistin (54,71%) iza kojih slede valin, fenilalanin, lizin i leucin (28,15%), dok su ostale u malim količinama. Istovremeno, kod odnosa bakterija u kulturi 1:3 pri velikom povećanju ukupnih slobodnih aminokiselina, u vodstvo pored prolina dolazi i fenilalanin (ukupno 47,13%) iza kojih u znatno manjoj količini slede tirozin, cistin, glutaminska kiselina i leucin (25,67%), dok su sve ostale u znatno manjim količinama.

Prema fiziološkom značenju, u poređenju sa mlekom, kod kojeg je odnos esencijelnih i zamenljivih slobodnih aminokiselina približno jednak, jogurt sa odnosom bakterija u kulturi 1:1, kako posle 24 časa tako i nakon 48 časova od kiseljenja ima nešto više esencijelnih slobodnih aminokiselina. Međutim, kod odnosa bakterija 1:3, esencijelne slobodne aminokiseline su zastupljene u malim količinama nakon 24 časa a nakon 48 časova još uvek zaostaju iza vrednosti u mleku.

Literatura

- BARIBO, L. & FORSTER, E. M. (1951): **J. Dairy Sci.** 34.
 BARIBO, L. & FORSTER, E. M. (1952): **J. Dairy Sci.** 35.
 BROCH, E. et al. (1959): Monographie — Ministere de l'Agriculture de Province de Quebec.
 BULLOK, D. H. et al. (1956): **J. Dairy Sci.** 39.
 CHEBOTAREV, A. I. (1962): Inter. Dairy Congress, Copenhagen, 6.
 DAVIS, J. G. et al. (1973): **J. Dairy Res.** 8.
 DUN, M. et al. (1947): **J. Biol. Chem.** 168 (1).
 GROUX, M. (1973): **Lait** 53, Mars-Avril.
 GUIRARD, B. M. et al. (1962): In: »The Bacteria«, IV, New York and London.
 HETZEL, H. (1958). **Milchwissenschaft** 13.
 IHLOW & FRITSCH (1961): **Milchwissenschaft** 16 (5)
 IHLOW, F. (1962): **Medizin und Ernährung** 4 (3).
 LUCK, H. & PAVLIK, A. (1964): **Milchwissenschaft** 19.
 MÜLLER, I. & KANDLER, O. (1964): **Medizin und Ernährung** 5 (5).
 MÜLLER, I., KANDLER, O. et al. (1964a): **Milchwissenschaft** 19.
 MÜLLER, I. & KANDLER, O. (1966): Inter. Dairy Congress, E/F.
 MÜLLER, I. & KANDLER, O. (1967): **Milchwissenschaft** 22.
 MOORE, S. & STEIN, W. H. (1956): **J. Biol. Chem.** 192
 MORGAN, M. E. et al. (1951): **J. Dairy Sci.** 34.
 NAKAE, T. & ELLIOT, J. A. (1965): **J. Dairy Sci.** 48, March.
 OBRADOVIĆ, B. et al. (1967): Zbornik Poljoprivrednog fakulteta, Zemun.
 PETERSON, M. H. (1948): **J. Dairy Sci.** 31.
 PETTE, J. W. & LÖLKEMA, H. (1950): **Neth. Milk and Dairy J.** 4, 209.
 POZNANSKI, S. et al. (1965): **Lait** 45, 441-442.
 SAMUELSON, E. G. (1958): **Milchwissenschaft** 13, 269.
 SASKI, R. & NAKAE, T. J. (1960): **J. Dairy Sci.** 22.
 TARTANEN, J. (1930): Akadem. Abhandlung, University of Helsinki.
 VAN der ZANT et al. (1953): **J. Dairy Sci.** 36, 1104.

Summary

INFLUENCE OF DIFFERENT RATIOS OF LACTIC ACID BACTERIA TO THE SPECTRUM OF FREE AMINOACIDS IN YOGHURT PRODUCED FROM COW'S MILK

The free aminoacids in raw cow's milk and in yoghurt 24 and 48 hours after its production were qualitatively and quantitatively determined. Prepared raw milk was cultured with the starter containing *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* at the ratios of 1:1 lyzer (Model 1200) was used. According to the obtained results, it could be concluded:

lyzer (Model 1200) was used. According to the obtained results, it could be concluded:

In the raw milk and yoghurt 17 free aminoacids, except that of tryptophan, were identified; its content in the yoghurt varied in dependence of kinds and ratios of lactic acid bacteria in the used starters.

Total free aminoacids content in the milk was 9.00 mg/100 g. In the hours old yoghurt, produced with the starter containing mentioned lactic acid bacteria at the ratio of 1:1, a total free aminoacids content of 28.09 mg/100 g was identified; that means, 1.2 times more than at the lactic ratio of 1:3. The total free aminoacids content in the 48 hours old yoghurt produced at both lactic ratios became similar.

The 24 hours old yoghurt produced with the starter containing lactics at the ratio of 1:1 has an increased amount of all free aminoacids, particularly tyrosine, phenylalanine and leucine (56.32%), after that came serine, lysine, and glutamic acid (19.26%), while at the lactic ratio of 1:3 the greatest content belonged to proline (71.43%).

In the 48 hours old yoghurt produced at the lactic ratio of 1:1 the first places had valine, phenylalanine, lysine, and leucine, while at the lactic ratio of 1:3, with a relatively great increase of the total free aminoacids content, still in the first place came proline and then phenylalanine.

According to the physiological importance, the yoghurt produced with a starter containing lactic acid bacteria at the ratio of 1:1, in all cases contained much more essential free aminoacids.