

Rast *Lactobacillus acidophilus* u mešanim starter kulturama (Growth of *Lactobacillus Acidophilus* in Mixed Starter Cultures)

Dr. Ana BANINA, Marina LEVATA, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd; Danica IVANOVIĆ, PKB »Agroekonomik«, Padinska Skela; dr. Dragojlo OBRADOVIĆ, Poljoprivredni fakultet, Beograd; Lj. TOPISIROVIĆ, Centar za genetičko inženjerstvo, Beograd

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper
Prispjelo: 23. 3. 1989.

UDK: 579.864.1

Sažetak

U ovom radu istraživane su karakteristike rasta i biohemijska svojstva tri soja *Lactobacillus acidophilus*. Sojevi su bili stabilni i fermentisali su mleko u periodu od 17 do 24 sata. U pogledu fermentacije šećera, proteolitičke aktivnosti, brzine rasta i rezistencije na žučne soli, utvrđena je određena varijabilnost među sojevima. Na osnovu dobijenih rezultata, odabran je soj *L. acidophilus* (L.a.C) za pravljenje mešanog startera sa *Streptococcus lactis diacetylactis*. Acidofilno mleko dobijeno tim starterom imalo je znatno bolja organoleptička svojstva u poređenju s kontrolom. Utvrđeno je takođe, da nakon 3 dana soj *L. acidophilus* (L.a.C) postaje dominantan soj u populaciji.

Summary

In this paper growth and biochemical characteristics of 3. *L. acidophilus* strains were tested. The strains were stable and fermented milk between 17—24 hours. There was a certain variability between the strains in carbohydrate fermentation, proteolytic activity, growth rate and bile salts tolerance. On the basis of these tests the strain *L. acidophilus* (L.a.C) in combination with *S. lactis* ssp. *diacetylactis* 2100 was selected. *Acidophilus* milk produced with this culture, showed much better organoleptic properties compared to control. It was also found that after 3 days, strain *L. acidophilus* become dominant in population.

Uvod

Među postojećim fermentisanim napicima od mleka, sve veći interes se javlja za proizvodnjom acidofilnog mleka. Razlog tome jeste saznanje da sojevi vrste *Lactobacillus acidophilus*, koji se koriste u proizvodnji acidofilnog mleka, poseduju antimikrobnu aktivnost (Metha et. all., 1984), smanjuju nivo holesterola u krvnom serumu (Thompson, et. all., 1982), a posebno je interesantno da ove bakterije određenim mehanizmima utiču na smanjenje potencijalnog rizika od pojave određenih vrsta tumora (Goldin and Gorbach, 1984). Zbog ovih kao i nekih drugih osobina sojeva *L. acidophilus*, danas vlada mišljenje da te bakterije, odnosno fermentisani mlečni proizvodi s tim bakterijama, utiču na povećanje otpornosti organizma i povoljno deluju na zdravlje ljudi. Nedostatak acidofilnog mleka je u neposedovanju prijatnih organoleptičkih svojstava, što je svojstvo ostalih fermentisanih napitaka, zbog

čega je ovaj proizvod još uvek nedovoljno konzumiran. Da bi se na neki način eliminisao nedostatak okusa, u svetu se proizvodi veliki broj fermentisanih napitaka u kojima se pored sojeva *L. acidophilus* nalaze i druge vrste bakterija mlečne kiseline.

Cilj ovog rada bio je istraživanje biohemijskih i fizioloških karakteristika *L. acidophilus* u cilju selekcije najpovoljnijih sojeva za primenu u mešanim starter kulturama.

Materijal i metode

Sojevi

Za ova istraživanja upotrebljeni su: *L. acidophilus* (L.a.C), Institut za imunologiju i virusologiju Torlak; *L. acidophilus* (L.a.A), Katedra za mikrobiologiju, Poljoprivredni fakultet, Beograd; *L. acidophilus* 1748 kao i soj *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (SH 176).

Hranljivi medijumi

Čiste kulture su održavane u 10% rekonstituisanom obranom mleku i presejavane u intervalu od 7 do 10 dana. U toku rada su korišćene standardne hranljive podloge; obrano mleko, MRS agar i MRS tečna podloga, citratni agar (Kempfer and McKay, 1980), Rogoza podloga (Rogosa and Wiseman, 1951).

Za testiranje sposobnosti kultura da fermentišu šećere korišćena je Andrade peptonska voda i MRS tečna podloga. Proteolitička aktivnost sojeva određivana je metodom po Juffsu (1975), a kiselost grupa je merena standardnim pH metrom (Iskra).

Bakteriocinska aktivnost

Na osušenu čvrstu MRS podlogu iskapavaju se po 0,1 µl istraživanih kultura. Kad se kapi osuše, po površini se izliva 2,5 ml MRS top agara koji sadrži 0,5 ml test kulture senzitivne na bakteriocine. (S. Cremoris NS 5).

Određivanje krive rasta sojeva

Kulture su inokulisane u 100 ml MRS tečne podloge (inokulum 0,5 do 1%) i inkubirane na 37 °C. Rast kulture praćen je periodično, merenjem ekstinkcije na Klett kolorimetru (660 nm).

Specifična brzina rasta određivana je prema formuli Lee i Collins (1975).

$$k = 2,203 (\log_{10}x_2 - \log_{10}x_1) / (t_2 - t_1)$$

t_2 i t_1 , vremena koja odgovaraju ekstinkciji x_2 i x_1 .

Generaciono vreme je izračunato iz specifične brzine rasta pomoću jednačine

$$g = 0,693/k$$

Rezistencija na žučne soli

10 ml tečne podloge MRS i bez 0,3% žučne soli inokulisano je s po 0,1 ml sveže kulture *L. acidophilus* i inkubirano na 37 °C. Rast kulture praćen je merenjem ekstinkcije na Klett kolorimetru na talasnoj dužini 660 nm.

Rezultati

Na osnovu izvršenih istraživanja pokazalo se da svi testirani sojevi *L. acidophilus* zgrušavaju obrano mleko u periodu od 17 do 24 sata na 37 °C, a soj *S. lactis diacetylactis* za 8 sati na 30 °C. Takođe, u pogledu proteolitičke aktivnosti utvrđena je određena varijabilnost među istraživanim sojevima. Ti sojevi laktobacila su slabiji proteoliti u poređenju sa *S. lactis diacetylactis*, s tim što je soj *L. acidophilus* A bio najaktivniji (tablica 1).

Tablica 1. Acidogena i proteolitička aktivnost sojeva *L. acidophilus*, i *S. lactis diacetylactis*

Table 1. Acidogenic and Proteolytic Activity of *L. Acidophilus* and *S. Lactis Diacetylactis* Strains

Soj Strain	Vreme zgrušavanja (h) Curdling Time (h)	Kiselost (pH) Acidity (pH)	Tirozinska vrednost Tyrosine Values
<i>S. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	8,0	4,31	119,97
<i>L. acidophilus</i> A	17,0	3,35	106,85
<i>L. acidophilus</i> C	18,0	3,35	98,73
<i>L. acidophilus</i> 1748	24,0	3,75	78,73

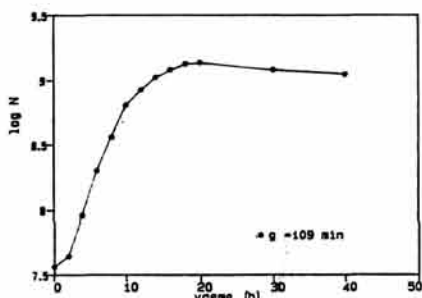
Kod sva tri soja *L. acidophilus* testirana je sposobnost sinteze bakteriocina. Rezultati tog testa pokazali su da među sojevima, testiranim pri ovim uslovima, nema producenata antibiotika.

Sposobnost fermentacije, u cilju identifikacije sojeva, istraživana je na 17 različitih šećera. Dobijeni rezultati pokazuju da, takođe, postoji određena varijabilnost među istraživanim sojevima laktobacila. Soj *L. acidophilus* 1748 ne fermentiše galaktozu; soj *L. acidophilus* A fermentiše manitol, ramnozu i ribozu, dok soj *L. acidophilus* C fermentiše manitol i sorbitol, a ne fermentiše saharozu. Fermentacija ostalih šećera podudarala se s fermentacionom aktivnošću vrste *L. acidophilus* po B e r g e y-u 1974 (tablica 2).

Dobijeni rezultati o načinu rasta kultura pokazuju da ti sojevi imaju karakteristične krive rasta kao i vrednosti specifičnih brzina rasta. Vreme potrebno da se početni broj ćelija u kulturi udvostruči (generaciono vreme) je najkraće kod soja L.a.C (109 minuta), a najduže kod soja L.a.A (258 minuta). Za razliku od tih laktobacila, generaciono vreme *S. lactis diacetylactis* je znatno kraće, samo 60 minuta (dijagrami 1, 2, 3 i 4).

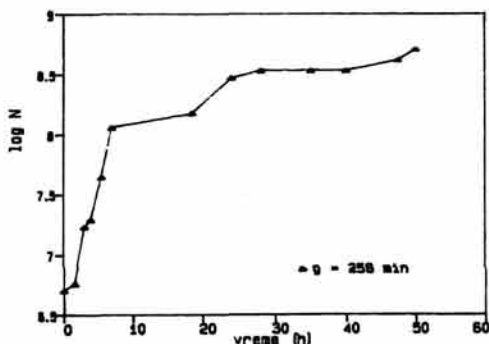
Tablica 2. Sposobnost fermentacije šećera sojeva *L. acidophilus*
Table 2. Sugar Fermentation by *L. Acidophilus* Strains

Šećer Sugar	Po Bergey-u Bergey's manual	Lb. A	Lb. C	1748
Arabinoza	—	—	—	—
Fruktoza	+	+	+	+
Galaktoza	+	+	+	—
Glukoza	+	+	+	+
Laktoza	+	+	+	+
Maltoza	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+
Manitol	—	+	+	—
Manoza	+	+	+	+
Melibioza	d	—	—	—
Rafinoza	d	—	—	—
Ramnoza	—	+	—	—
Riboza	—	+	—	—
Sorbitol	—	—	+	—
Saharcza	+	+	—	+
Trehaloza	d	—	—	—
Ksiloza	—	—	—	—



Dijagram 1. Kriva rasta soja *L. acidophilus* C

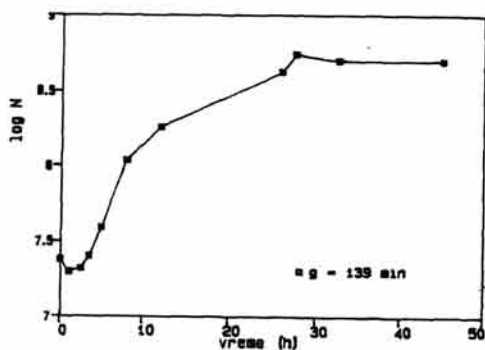
Figure 1. Growth curve of *L. acidophilus* C strain



Dijagram 2. Kriva rasta soja *L. acidophilus* A

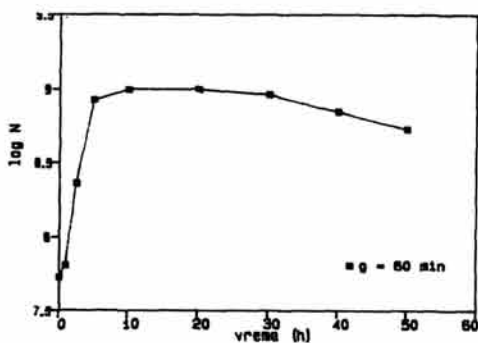
Figure 2. Growth curve of *L. acidophilus* A strain

Jedna od važnih karakteristika sojeva *L. acidophilus* koja im, između ostalog, omogućava preživljavanje u intestinalnom traktu ljudi i životinja, jeste i sposobnost rasta u prisustvu određenih koncentracija žučnih soli. Istraživanja su pokazala da ti sojevi pokazuju određene nivoe rezistencije na 0,3% žučne soli u medijumu. Zavisnost porasta ekstinkcije istraživanih kultura u podlozi sa i bez 0,3% žučne soli data je u dijagramima 5, 6 i 7.



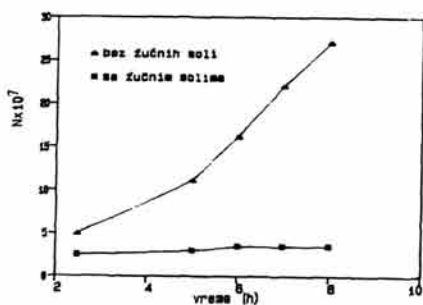
Dijagram 3. Kriva rasta soja *L. acidophilus* 1748

Figure 3. Growth curve of *L. acidophilus* 1748 strain



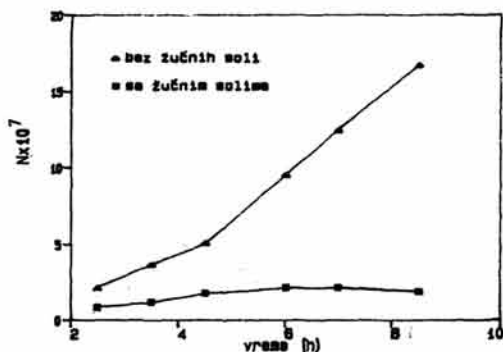
Dijagram 4. Kriva rasta soja *S. lactis* diacetyl. 2100

Figure 4. Growth curve of *S. lactis* diacetyl. 2100 strain



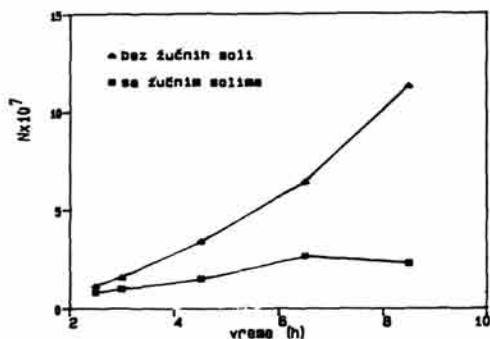
Dijagram 5. Rezistencija soja *L. acidophilus* C na žučne soli

Figure 5. Bile salts tolerance of *L. acidophilus* C strain



Dijagram 6. Rezistencija soja *L. acidophilus* A na žučne soli

Figure 6. Bile salts tolerance of *L. acidophilus* A strain



Dijagram 7. Rezistencija soja *L. acidophilus* 1748 na žučne soli

Figure 7. Bile salts tolerance of *L. acidophilus* 1748 strain

S obzirom da su u pogledu svih istraživanih karakteristika sojevi *L. acidophilus* pokazivali određenu varijabilnost, izabran je soj *L. acidophilus* C za konstrukciju mešanog startera sa *S. lactis diacetylactis*. Pored organoleptičkih svojstava acidofilnog mleka fermentisanog tom mešanom kulturom, istraživano je i preživljavanje pojedinačnih sojeva u toj mešanoj kulturi. Rezultati pokazuju da prisustvo laktobacila u starteru kao i različite temperature inkubacije utiču na nestanak soja *S. lactis diacetylactis* iz startera. *S. lactis diacetylactis* nestaje iz starter kulture nakon 72 sata (30 °C), odnosno nakon 48 sati ukoliko se fermentacija odvija na višoj temperaturi (37 °C). Fermentacija mleka mešanom kulturom na 30 °C trajala je 18 sati, gruša je bio dobre konzistencije, prijatnog okusa uz slabo izdvajanje surutke. Nakon četvrtog dana u tako fermentisanom mleku konstatovano je samo prisustvo ćelija *L. acidophilus* C. U slučaju fermentacije na višoj temperaturi (37 °C), uočen je brži nestanak ćelija *S. lactis diacetylactis* iz populacije (tablica 3).

Tablica 3. Preživljavanje ćelija *S. lactis diacetylactis* i *L. acidophilus* u mešanoj kulturi

Table 3. Survival of *S. lactis diacetylactis* and *Lactobacillus acidophilus* strains in mixture culture

Vreme (dani) Time (days)	Temperature inkubacije Incubation Temperature			
	30 °C		37 °C	
	Broj bakterija Number of Bacteria		Broj bakterija Number of Bacteria	
	<i>S. lactis diacetyl.</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. lactis diacetyl.</i>	<i>L. acidophilus</i>
0	1.0×10^7	4.0×10^7	1.1×10^7	1.1×10^6
1	1.6×10^8	1.4×10^8	1.6×10^4	6.2×10^7
2	5.4×10^8	1.4×10^9	—	9.3×10^8
3	1.2×10^4	7.4×10^8	—	3.3×10^8
4	—	1.7×10^8	—	8.6×10^7
5	—	1.7×10^7	—	6.0×10^7

Diskusija

Na osnovu istraživanja acidogenih i proteolitičkih svojstava tri soja *L. acidophilus*, utvrđeno je da oni zgrušavaju mleko u periodu od 17 do 24 sata, a kiselost gruša kretala se od 3,35 do 4,31, što ukazuje da je acidogena sposobnost karakteristika svakog soja. Poređenjem rezultata proteolitičke aktivnosti istraživanih kultura, s proteolitičkom aktivnošću *S. lactis diacetylactis* može se konstatovati da su, izuzev soja 1748, koji slabije razlaže proteine mleka, ostala dva soja dobri proteoliti.

Rezultati dobijeni za način rasta sojeva pokazuju da istraživani sojevi laktobacila nakon 2 do 3 sata lag faze ulaze u logaritamsku fazu rasta. Izuzetak

čini soj 1748 kod koga lag faza traje skoro 4 sata. Prema tome, među istraživanim sojevima postoje razlike i u brzini rasta, što može biti veoma značajno ukoliko ti sojevi rastu u zajednici s drugim vrstama bakterija mlečne kiseline. Na znatnu varijabilnost sojeva *L. acidophilus* ukazuje i razlika u specifičnim brzinama rasta, odnosno generacionim vremenima. Najkraće generaciono vreme utvrđeno je za *L. acidophilus* C (109 minuta), znatno sporije raste soj 1748 (139 minuta), a najsporije *L. acidophilus* A (258 minuta). Za razliku od tih iaktobacila, ćelijama soja *S. lactis diacetylactis* vreme potrebno da udvostruče početni broj ćelija iznosi samo 60 minuta.

Pored brzine rasta, jedan od važnih parametara u selekciji sojeva laktobacila za proizvodnju acidofilnog mleka jeste i rezistencija sojeva na žučne soli. Otpornost na određene koncentracije soli je od velikog značaja za rast i opstanak tih sojeva u intestinalnom traktu ljudi i životinja (Gilliland, et. al., 1984). Dobijeni rezultati pokazuju da žučne soli u koncentraciji od 0,3% u znatnoj meri inhibiraju rast istraživanih sojeva, s tim, što takođe postoje razlike među testiranim sojevima. Soj *L. acidophilus* C pokazuje nešto veću rezistenciju u odnosu na druga dva soja.

Na osnovu brzine rasta, acidogene sposobnosti, proteolitičke aktivnosti kao i rezistencije na žučne soli odabran je soj *L. acidophilus* C za pravljenje mešane starter kulture sa *S. lactis diacetylactis*. Optimalna temperatura inkubacije verovatno sprečava izrazitiju dominaciju *L. acidophilusa*, što je slučaj na višoj temperaturi (37 °C). Prisustvo *S. lactis diacetylactis* utiče povoljno na organoleptička svojstva acidofilnog mleka. Nakon dva do tri dana soj *S. lactis diacetylactis* nestaje iz populacije, a bakterije *L. acidophilus* postaju dominantne u populaciji. Ti rezultati su značajni zato što je poznato da u sastav mnogih startera ulaze različiti sojevi, vrste pa čak i rodovi bakterija mlečne kiseline, a da usled mnogih faktora dolazi do populacionog efekta, odnosno usled različitih faktora jedna kultura postaje dominantna u populaciji. Faktori koji doprinose dominantnosti jednog soja ili vrste u mešovitoj kulturi uključuju, pored razlika u generacionom vremenu, proizvodnju antibiotika, toleranciju na kiselost, razlike u optimalnoj temperaturi rasta (Hugenholtz, 1986). Dobijeni rezultati pokazuju da postoji znatna varijabilnost među sojevima *L. acidophilus* u pogledu acidogene, proteolitičke aktivnosti, u pogledu rezistencije na žučne soli, odnosno brzine rasta i sposobnosti fermentacije šećera. Takođe je utvrđeno da se zbog svojih karakteristika soj *L. acidophilus* C može upotrebiti za pravljenje mešane kulture sa *S. lactis diacetylactis*. Acidofilno mleko tako dobijeno imalo je poboljšan okus, a u takvom mleku je takođe detektovan znatan broj živih ćelija *L. acidophilus*.

Zaključak

Ispitivani sojevi *L. acidophilus* pokazuju sledeće karakteristike:

- stabilnost u pogledu brzine stvaranja mlečne kiseline; zgrušavaju mleko u intervalu od 17 do 24 sata;
- ne produkuju bakteriocine;
- varijabilnost u pogledu proteolitičke aktivnosti, rezinstencije na žučne soli i brzine rasta.

Soj *L. acidophilus* C pokazuje najbolje karakteristike za rast u mešanoj kulturi sa *S. lactis diacetylactis*.

Acidofilno mleko dobijeno ovakvom mešanom kulturom imalo je znatno bolji okus u odnosu na mleko sa *L. acidophilus* C; taj soj je nakon tri dana postao dominantan soj u mešanoj kulturi.

Za proizvodnju kvalitetnog acidofilnog mleka potrebna su dalja istraživanja sojeva *L. acidophilus*, naročito u pogledu selekcije sojeva s povećanom rezistencijom na žučne soli, sa sposobnošću sinteze bakteriocina kao i istraživanja u pogledu problema vezanih za populacioni efekat.

Literatura

- GILLILAND, S. E., STALEY, T. E. and BUSH, L. J. (1984): Importance of Bile Tolerance of *Lactobacillus acidophilus* Used as a Dietary Adjunct. **J. Dairy Sci.** **67**, 3045—3051.
- GOLDIN, B. R. and GORBACH, S. L. (1984): The effect of oral administration of *Lactobacillus* and antibiotics on intestinal bacterial activity and chemical induction of large bowel tumors. **Develop. Indust. Microbiol.** **25**, 139—150.
- HUGENHOLTZ, J. (1986): Population dynamics of mixed cultures. **Neth. Milk Dairy J.** **40**, 129—140.
- JUFFS, H. S. (1975): Proteolysis detection in milk. **Jour. of Dairy Research** **42**, 31.
- KEMPLER, G. M. and McKAY, L. L. (1980): Improved medium for detection of citrate fermenting *S. lactis* subsp. *diacetylactis*. **Appl. Env. Microbiol.** **39**, 926—927.
- KLAENHAMMER, T. R. (1982): Microbial Consideration in Selection and Preparation of *Lactobacillus* Strains for Use as Dietary Adjuncts. **J. Dairy Sci.** **65**, 1339—1379.
- LEE, D. A. and COLLINS, E. B. (1975): Influences of temperature on growth of *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. **J. Dairy Sci.** **59** (3), 405—409.
- METHA, A. M., PATEL, K. A. and DAVE, P. J. (1984): Purification and some properties of an inhibitory protein isolated from *L. acidophilus* AR 1. **Milchwissenschaft** **39**, 86—89.
- ROGOSA, M. A., WISEMAN, R. F. (1951): A Selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. **J. Bac.** **62**, 132—133.
- THOMPSON, L. U., AMER, D. J. A., REICHERT, M. A., JENKINS, A., KAMULSKI, J. (1982): The effect of fermented milks on serum cholesterol. **Am. J. Clin. Nutr.** **36**, 1106—1111.