

Utjecaj različitih početnih koncentracija probiotičkih bakterija na fermentaciju slatke sirutke

Bojan Matijević, Katarina Lisak, Rajka Božanić, Ljubica Tratnik

Stručni rad - Professional paper

UDK: 637.344

Sažetak

*Sirutka je nutritivno visokovrijedan sporedni proizvod sirarstva, nedovoljno iskorišten u ljudskoj prehrani. Ukoliko se fermentacija sirutke provodi probiotičkim bakterijama, dodatno se povećava njezina nutritivna i zdravstvena vrijednost. U radu je ispitan utjecaj dodatka različitih količina inokuluma (2,5, 5 i 7,5 %) monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 ili *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 na fermentaciju rekonstituirane slatke sirutke pri 37 °C. Tijekom fermentacije i 28 dana čuvanja fermentiranih uzoraka u hladnjaku praćeni su pH-vrijednost, titracijska kiselost i broj živih bakterija. Fermentacija sa 7,5 % inokuluma monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 trajala je najkraće (oko 13,3 sati), dok je fermentacija sa 2,5 % inokuluma trajala najduže (oko 15,5 sati). Broj živih stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 u svim uzorcima sirutke tijekom fermentacije povećao se oko 1,3 log CFU/mL i na kraju fermentacije iznosio oko 8,5 log CFU/mL. Fermentacija sirutke sa 7,5 % dodanog inokuluma monokulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 nije bila kraća u odnosu na fermentaciju sirutke sa 2,5 % dodanog inokuluma. Broj živih stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 tijekom fermentacije sirutke povećao se oko 0,9 log CFU/mL i na kraju fermentacije iznosio oko 8,7 log CFU/mL. Međutim, količina inokuluma nije utjecala na preživljavanje probiotičkih bakterija u fermentiranoj sirutki tijekom čuvanja bez obzira na uporabljenu monokulturu.*

Ključne riječi: sirutka, probiotici, inokulum, fermentacija, preživljavanje

Uvod

Sirutka je sporedni proizvod koji nastaje u tehnološkom procesu proizvodnje sira, a ovisno o načinu koagulacije kazeina, može biti kisela ili slatka. Sastav i svojstva sirutke ovise o tehnologiji proizvodnje osnovnog proizvoda te o kakvoći korištenog mlijeka (Tratnik, 1998.). Prema

prosječnom kemijskom sastavu, sirutka sadržava oko 93 % vode a u nju prelazi oko 50 % suhe tvari mlijeka. Najveći dio sirutke čini laktoza, dok je manje od 1 % proteina sirutke (Beucler i sur., 2005.). U sirutku prelaze svi ugljikohidrati mlijeka, od kojih je 90 % laktoze te nešto glukoze, galaktoze, oligosaharida i aminošećera. Proteini sirutke nisu osjetljivi na djelovanje kiseline i enzima pa tijekom koagulacije mlijeka ostaju nepromijenjeni i u cijelosti prelaze u sirutku (Tratnik, 1998.). Aminokiselinski sastav čini proteine sirutke nutritivno vrednijima od kazeina koji zaostaje u siru. Sirutka je bogata vitaminima skupine B, osobito vitaminom B₂, od kojeg potječe njezina žutozeleno boja (Tratnik, 2003.). Zbog visokog sadržaja vitamina skupine B te vitamina B₁₂, sirutka se koristi u terapijama kod raznih bolesti kao što su demencija i Alzheimerova bolest (Michaelidou i Steijns, 2006.). Slatka sirutka, zbog neutralnog okusa s lagano izraženom slanošću, nije baš prihvatljiva. Jednom od mogućnosti za dobivanje proizvoda poželjnih senzorskih svojstava pokazala se proizvodnja fermentiranih napitaka na bazi sirutke. U ovoj kategoriji proizvoda velika pozornost posvećuje se razvoju probiotičkih sirutkinih napitaka, budući da su već od prije poznati korisni učinci probiotika na čovjekovo zdravlje (Jeličić i sur., 2008.). Definicija probiotika, prema Havenaar i Huis in't Veld (1992.) i Šušković (1996.), glasi: «Probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore». Probiotici mogu blagotvorno djelovati na «domaćina» putem dvaju mehanizama: neposrednog djelovanja živih mikrobnih stanica ili posrednog djelovanja putem metabolita tih stanica (Tamime i sur., 2003.). Kako bismo ostvarili blagotvoran učinak probiotika, mora se unositi određen minimalan broj živih stanica. Postoje različita mišljenja o minimalnom broju, ali smatra se da mora biti $\geq 10^6$ CFU/mL (Kailasapathy i Rybka, 1997.; Walstra i sur., 2006.). Svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj različite količine inokuluma probiotičkih bakterija *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 na fermentaciju sirutke, da se dobije što veći broj živih stanica i zadrži terapijski minimum tijekom 28 dana čuvanja.

Materijali i metode rada

Priprava rekonstituirane sirutke

Rekonstituirana sirutka pripravljena je otapanjem komercijalne slatke sirutke u prahu (Zdenka d.d., Veliki Zdenci) u vodi do sadržaja suhe tvari od

6 %. Kemijski sastav sirutke bio je sljedeći: 73-75 % laktoza; 11-14 % proteini; 7-10 % pepeo; do 1 % mliječne masti u suhoj tvari i do 6 % vode. Uzorci pripremljene sirutke pasterizirani su na temperaturi od 73 °C/15 s i ohlađeni na temperaturu od 37 °C.

Probiotička kultura

Korištene su DVS monokulture, *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Chr. Hansen, Danska). Inokulum je priređen tako da je u 100 mL pasterizirane sirutke, ohlađene na 37 °C, otopljen 1 g mikrobne kulture uz vrijeme aktivacije od 30 minuta.

Uzorci fermentirane sirutke

Za procjenu rasta i preživljavanja probiotičkih sojeva *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 pripremljena su tri uzorka rekonstituirane sirutke koji su inokulirani s količinama inokuluma. Količina inokuluma od 2,5 % (v/v) preporuka je proizvođača kultura, a odabrana je za kontrolnu skupinu. U prvi uzorak dodano je 2,5 (kontrolna skupina), drugi uzorak pripremljen je uz dodatak 5, a treći uz dodatak 7,5 % (v/v) inokuluma (pokusne skupine). Fermentacija svih uzoraka vođena je do oko pH-4,6.

Kemijske i mikrobiološke analize

Kiselost uzoraka sirutke analizirana je kao aktivna i titracijska kiselost. Aktivna kiselost određena je potenciometrijski (pH-metar; «Knick» tip 647-1), a titracijska kiselost (°SH) metodom prema Soxhlet Henkelu (Sabadoš, 1996.a; Sabadoš, 1996.b).

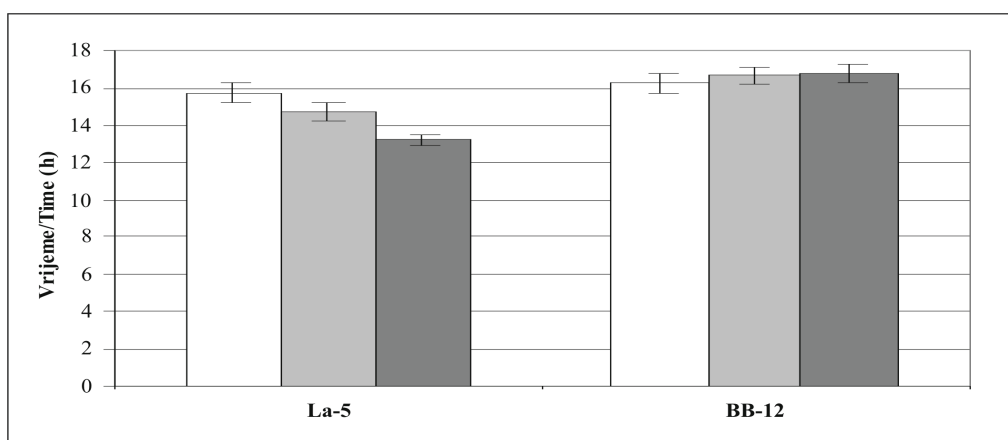
Broj živih bakterijskih stanica (CFU/mL) određen je standardnom metodom na MRS agaru (Biolife, Milano, Italija) nakon tri dana inkubacije na 37 °C. Za *Lactobacillus acidophilus* La-5 inkubacija je provedena u mikroaerofilnim uvjetima, koji su postignuti prelijevanjem inokuliranog MRS agara dodatnim slojem MRS (International Dairy Federation, 1995.). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 inkubiran je u anaerobnim uvjetima koji su postignuti u anaerobnim loncima s anaerogenom (Oxoid Limited, Hampshire, England) (Østlie i sur., 2003.).

Uzorci su analizirani tijekom fermentacije nakon 0, 5, 8, 10 sati te na kraju, kada je pH-vrijednost bila približno 4,6. Tijekom čuvanja na temperaturi od 4 °C uzorci sirutke analizirani su 1., 7., 14., 21. i 28. dana. Pokusi su

ponovljeni triput. Rezultati su statistički obrađeni u programu Microsoft Office Excel 2007 i prikazani kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju.

Rezultati i rasprava

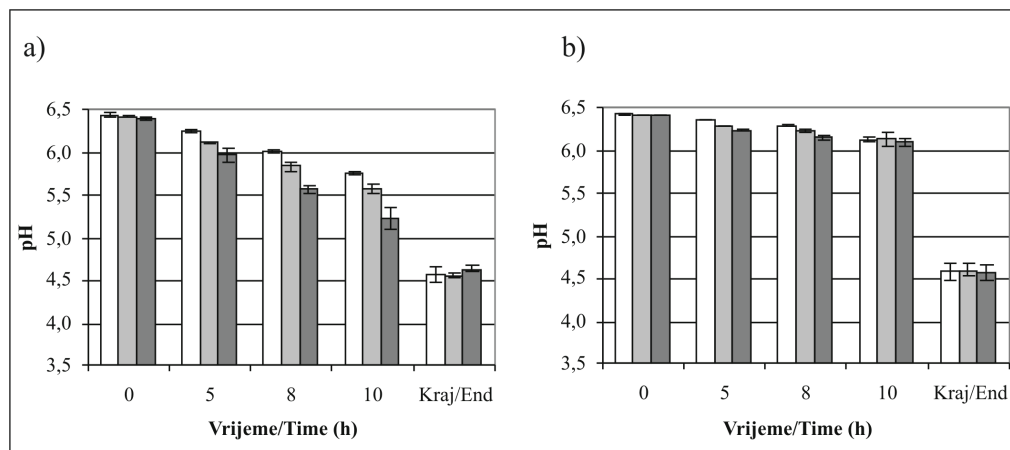
Dodatak različite količine inokuluma utjecao je na trajanje fermentacije kada se koristila monokultura *Lactobacillus acidophilus* La-5, ali nije utjecao na trajanje fermentacije korištenjem monokulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (grafikon 1).



Grafikon 1: Vrijeme fermentacije sirutke sa 2,5 (□), 5 (▒) i 7,5 (■) % dodanog inokuluma monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

Fig. 1: Whey fermentation time with 2.5 (□), 5 (▒) and 7.5 (■) % of monoculture *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 inoculum addition

Početna pH-vrijednost svih uzoraka sirutke bila je oko 6,4 jedinice (grafikon 2). Brži pad pH-vrijednosti zabilježen je kod uzoraka sirutke fermentiranih s *Lactobacillus acidophilus* La-5 u odnosu na uzorke s *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. Vrijednost od 4,6 pH- jedinica brže je postignuta kod sirutke sa 7,5% inokuluma monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 (oko 13,3 sati), dok je za postizanje te vrijednost kod kontrolnog uzorka sa 2,5% trebalo nešto više vremena (oko 15,5 sati) (grafikon 2).



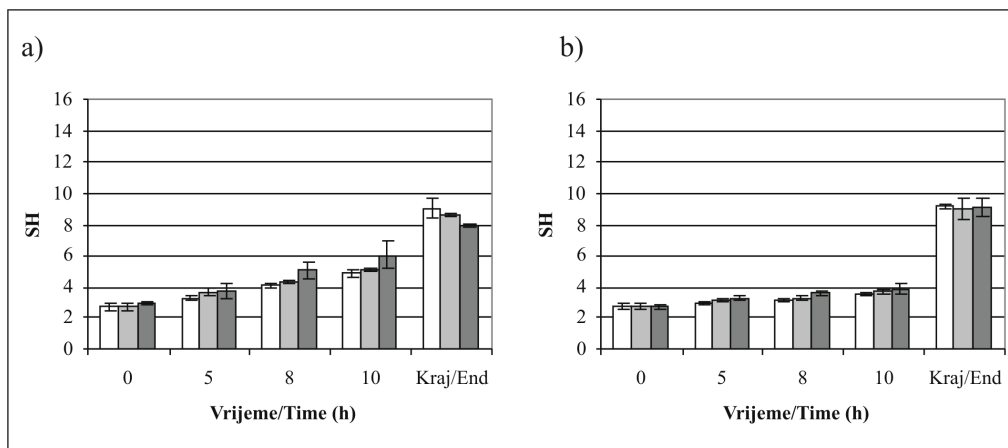
Grafikon 2: pH-vrijednosti sirutke sa 2,5 (□), 5 (■) i 7,5 (■) % dodanog inokuluma tijekom fermentacije sojevima *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b)

Fig. 2: Whey pH-value with 2.5 (□), 5 (■) and 7.5 (■) % of inoculum addition during fermentation with *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b)

Trostruka količina inokuluma monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 skratila je fermentaciju sirutke oko 2,2 sata. Fermentacija mlijeka monokulturom *Lactobacillus acidophilus* La-5 može trajati od 15 do 17 sati, a da se ne postigne pH-vrijednost niža od 5 jedinica (Antunes i sur., 2005.). Uzrok tako dugačke fermentacije je slabija aktivnost probiotičkih laktobacila u mlijeku i sirutki, jer to nisu njihova prirodna staništa. Prema istraživanju Božanić (2000.), fermentacija kravljeg i kozjeg mlijeka sa 2 % inokuluma *Lactobacillus acidophilus* La-5 trajala je oko 12 sati, što je oko 3,5 sata kraće od vremena fermentacije sirutke sa 2,5% dodanog inokuluma. Također, u istraživanju Božanić i sur. (2001.) fermentacija mlijeka s *Lactobacillus acidophilus* La-5 do pH-vrijednosti od 4,6 jedinica trajala je oko 10,5 sati, što je čak 5 sati kraće u odnosu na sirutku. Na temelju tih rezultata može se uočiti da su laktobacili manje aktivni u sirutki u odnosu na mlijeko. Kod monokulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 dodatak veće količine inokuluma nije skratio trajanje fermentacije sirutke. Vrijednost od 4,6 pH-jedinica postignuta je u kontrolnom uzorku sirutke za oko 16,3 sati najmanjom količinom inokuluma (2,5 %), a za uzorak s najvećom količinom inokuluma (7,5 %) trebalo je oko 16,8 sati. Značajan pad pH-vrijednosti

sirutke tijekom fermentacije s *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 zabilježen je tek nakon desetog sata (slika 2). U radu Božanić i Tratnik (2001.) fermentacija mlijeka s *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 trajala je oko 28 sati, a ni nakon tog razdoblja nije postignuta pH-vrijednost od 4,6 već pH oko 5. Uzrok kraće fermentacije sirutke i pad pH \approx 4,6 mogao bi biti što sirutka ima puno slabiji pufer kapacitet od mlijeka (s obzirom na to da sadržava dvostruko manje suhe tvari, manje proteina i ne sadržava kazein), a kada bakterije proizvedu određenu količinu mliječne kiseline pH-vrijednost naglo padne.

Sličan tijek fermentacije sirutke sa 2, odnosno 2,5% inokuluma monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 postignuli su Drgalić i sur. (2005.) i Matijević i sur. (2008.) u svojim istraživanjima.



Grafikon 3: Titracijske kiselosti ($^{\circ}$ SH) sirutke sa 2,5 (□), 5 (■) i 7,5 (■) % dodanog inokuluma tijekom fermentacije sojevima *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b)

Fig. 3: Titratable acidity ($^{\circ}$ SH) of whey with 2.5 (□), 5 (■) and 7.5 (■) % of inoculum addition during fermentation with *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b)

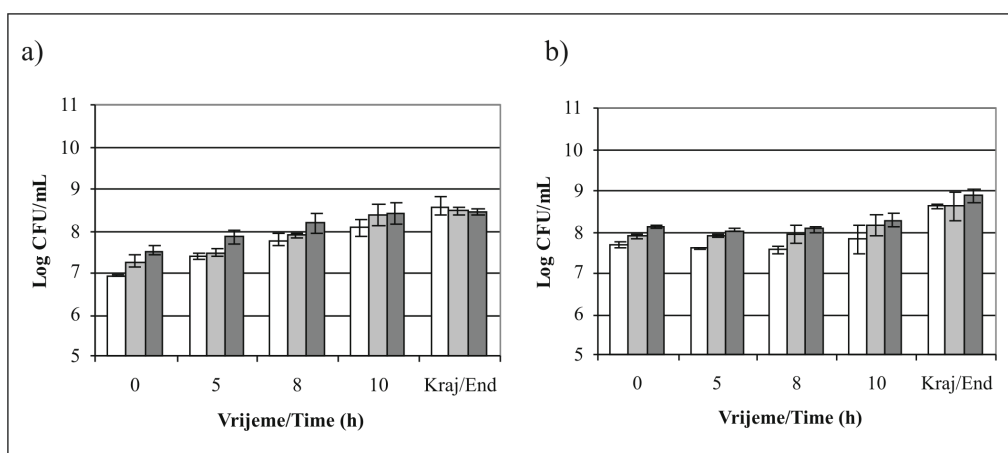
Titracijska kiselost sirutke na početku fermentacije bila je oko 2,8 $^{\circ}$ SH bez obzira na količinu dodanog inokuluma i vrstu monokulture (grafikon 3). Promjena titracijske kiselosti u potpunosti prati promjenu pH-vrijednosti

(grafikon 3). Na kraju fermentacije uočljive su razlike titracijske kiselosti između uzoraka s različitom količinom inokuluma kod monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 u odnosu na monokulturu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12.

Najveću titracijsku kiselost imao je uzorak fermentirane sirutke inokulirane sa 2,5 % monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 (oko 9,0 °SH), a najmanju uzorak sa 7,5 % inokuluma (grafikon 3). Uzorci sirutke fermentirane monokulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 imali su ujednačenu titracijsku kiselost na kraju fermentacije (oko 9,2 °SH) bez obzira na količinu dodanog inokuluma.

Uočljive su razlike u broju živih bakterija između uzoraka s različitom količinom inokuluma kod *Lactobacillus acidophilus* La-5 u odnosu na *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (grafikon 4). Najmanji početni broj *Lactobacillus acidophilus* La-5 imali su kontrolni uzorci sirutke sa 2,5 % inokuluma (oko 6,9 log CFU/mL), a najveći broj uzorci sa 7,5 % inokuluma (oko 7,5 log CFU/mL). Kod uzorka sa 2,5% inokuluma porast broja stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 gotovo je proporcionalan, sve do kraja fermentacije (grafikon 4). Kod uzoraka inokuliranog većom količinom inokuluma (5 i 7,5 %) nakon 10. sata fermentacije porast broja stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 bio je znatno manji (grafikon 4). Veća količina inokuluma nije rezultirala većim konačnim brojem stanica. Taj broj je i nešto manji u uzorcima sirutke inokulirane većom količinom monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 u odnosu na kontrolni uzorak (Δ log CFU/mL oko 0,13). Najveći porast stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 bio je u kontrolnom uzorku sa 2,5 % inokuluma (oko 1,6 Δ log CFU/mL), a nešto manji u uzorcima sa 5 i 7,5 % inokuluma (oko 1,2 i 0,9 Δ log CFU/mL). Ta razlika mogla bi biti posljedica kraćeg trajanja fermentacije uzoraka sirutke s većom količinom inokuluma. Najmanji broj stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 bio je u kontrolnom uzorku sa 2,5 % inokuluma (oko 7,7 log CFU/mL), a najveći u uzorku sa 7,5 % inokuluma (oko 8,1 log CFU/mL). Broj stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 bio je gotovo nepromijenjen do osmog sata fermentacije (grafikon 4). Izrazitiji rast *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 počinje tek nakon 10. sata fermentacije, što je u skladu i s promjenama kiselosti (grafikoni 2 i 3). Najveći porast stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 bio je u kontrolnom uzorku (oko 0,9 Δ log CFU/mL), a nešto manji (oko 0,7 Δ log CFU/mL) u uzorcima s većom količinom inokuluma (5 i 7,5 %).

Rast obaju sojeva probiotičkih bakterija ograničen je u sirutki bez obzira na količinu dodanog inokuluma. Ovo može biti povezano sa slabom proteolitičkom aktivnošću (Hidalgo-Morales i sur., 2005.) probiotičkih bakterija, ili ograničenom količinom hranjivih tvari potrebnih za rast ovih bakterija. Molder i Villa-Garcia (1993.) u svojim istraživanjima pronašli su da obogaćivanje sirutke cisteinom i ekstraktom kvasaca potiče rast probiotičkih bakterija.



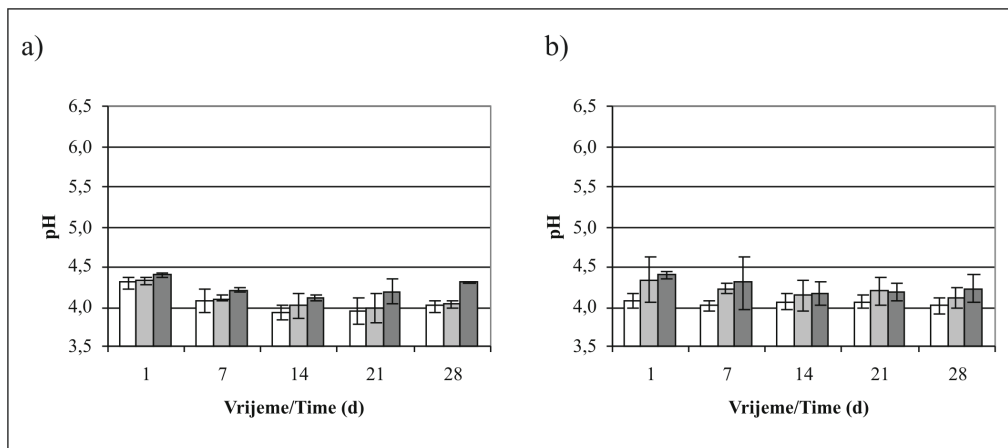
Grafikon 4: Broj živih bakterijskih stanica u sirutki sa 2,5 (□), 5 (■) i 7,5 (■) % dodanog inokuluma tijekom fermentacije sojevima *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b)

Fig. 4: Viable cells count of whey with 2.5 (□), 5 (■) and 7.5 (■) % of inoculum addition during fermentation with *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b)

Fermentirani uzorci sirutke čuvani na temperaturi od 4 °C analizirani su 1., 7., 14., 21. i 28. dana. Prvog dana čuvanja uzorci sirutke fermentirane monokulturom *Lactobacillus acidophilus* La-5 imali su gotovo istovjetnu pH-vrijednost (pH≈4,3) bez obzira na količinu inokuluma (grafikon 5). Već 7. dana čuvanja zabilježen je pad pH-vrijednosti u uzorcima sirutke sa 2,5 i 5 % monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Δ pH=0,30), i ta vrijednost zadržala se do 28. dana čuvanja.

Uzorak sirutke inokulirane sa 7,5 % monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 tijekom 28 dana čuvanja imao je nešto višu pH-vrijednost u odnosu na kontrolni uzorak (oko 4,2 pH jedinice). Na početku čuvanja najnižu pH-vrijednost imao je kontrolni uzorak sirutke (2,5 % inokuluma) fermentirane monokulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (oko 4,1 pH jedinica), a nešto više vrijednosti (oko 4,3 pH-jedinice) imali su uzorci s većom količinom inokuluma (5 i 7,5 %).

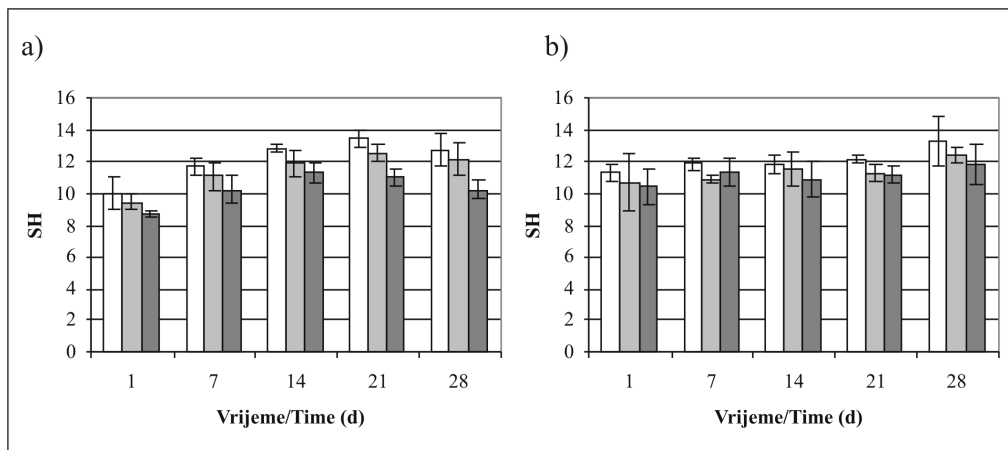
Tijekom čuvanja od 28. dana pH-vrijednost sirutke fermentirane monokulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 nije se značajno mijenjala (grafikon 5).



Grafikon 5: pH-vrijednosti sirutke fermentirane sa 2,5 (□), 5 (▒) i 7,5 (■) % dodane monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b) tijekom 28 dana hladnog čuvanja

Fig. 5: pH-value of whey fermented with 2.5 (□), 5 (▒) and 7.5 (■) % of monoculture *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b) addition, during 28 days of cool storage

Slične pH-vrijednosti sirutke fermentirane monokulturom *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 tijekom 28 dana čuvanja dobili su Drgalić i sur. (2005.) i Matijević i sur. (2008.).



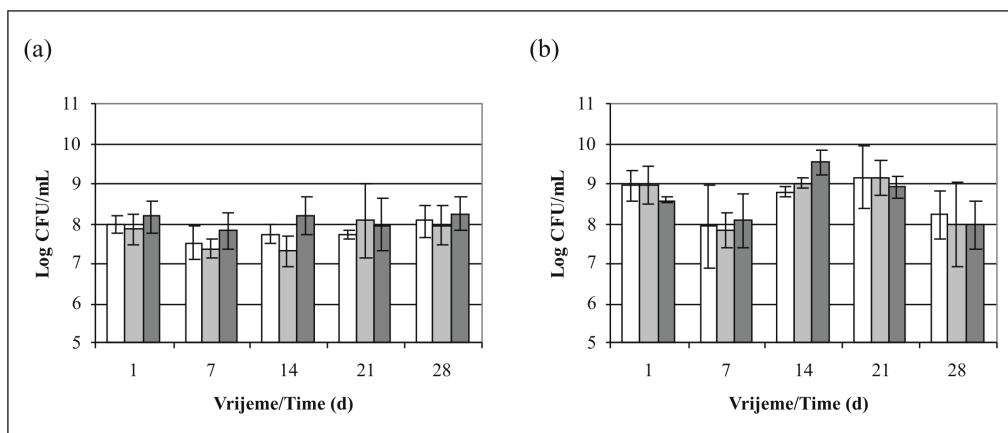
Grafikon 6: Titracijske kiselosti ($^{\circ}\text{SH}$) sirutke fermentirane sa 2,5 (\square), 5 (\blacksquare) i 7,5 (\blacksquare) % dodane monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b) tijekom 28 dana hladnog čuvanja

Fig. 6: Titratable acidity ($^{\circ}\text{SH}$) of whey fermented with 2.5 (\square), 5 (\blacksquare) and 7.5 (\blacksquare) % of monoculture *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b) addition, during 28 days of cool storage

Promjena titracijske kiselosti tijekom čuvanja uzoraka (grafikon 6) u potpunosti prati promjenu pH-vrijednosti (grafikon 5). Na početku čuvanja nešto nižu titracijsku kiselost imali su uzorci sirutke fermentirane monokulturom *Lactobacillus acidophilus* La-5 (oko 9,4 $^{\circ}\text{SH}$) u odnosu na uzorke fermentirane *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (10,8 $^{\circ}\text{SH}$). Količina inokuluma nije značajnije utjecala na promjenu titracijske kiselosti tijekom čuvanja uzoraka, što je i očekivano budući da se ni broj živih bakterijskih stanica na kraju fermentacije nije znatno razlikovao (grafikon 7). Uzorci sirutke fermentirane monokulturom *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 imaju titracijsku kiselost (oko 13 $^{\circ}\text{SH}$) tijekom 28 dana čuvanja (grafikon 6) sličnu vrijednostima koje navodi literatura (Drgalić i sur., 2005.; Matijević i sur., 2008.).

Količina inokuluma monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 nije bitno utjecala na broj živih stanica u uzorcima fermentirane sirutke tijekom 28 dana hladnog čuvanja

(grafikon 7). Prosječno smanjenje broja stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 u uzorcima sirutke tijekom čuvanja bilo je oko 0,32 log CFU/mL. Na kraju fermentacije nešto veći broj stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 bio je u uzorcima sirutke fermentirane sa 7,5 % inokuluma u odnosu na kontrolni uzorak (grafikon 4), ali to nije utjecalo na njihovo preživljavanje. Prosječno smanjenje broja stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 u uzorcima sirutke tijekom čuvanja bilo je oko 0,77 log CFU/mL (grafikon 7).



Grafikon 7: Broj živih bakterijskih stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b) u fermentiranoj sirutki sa 2,5 (□), 5 (■) i 7,5 (■) % dodanog inokuluma tijekom 28 dana hladnog čuvanja

Fig. 7: Viable cells counts of *Lactobacillus acidophilus* La-5 (a) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (b) in fermented whey with 2.5 (□), 5 (■) and 7.5 (■) % inoculum addition, during 28 days of storage

Dobiveni rezultati pokazuju da monokultura *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 dobro preživljavaju u sirutki i broj stanica je u svim uzorcima bio iznad minimalne terapijske razine od 6 log CFU/mL. Slične rezultate dobili su Drgalić i sur. (2005.) i Matijević i sur. (2008.) tijekom fermentacije sirutke s *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 i njezina skladištenja kroz 28 dana. U tim radovima broj stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 bio je na

kraju čuvanja uzoraka viši od 7,3 log CFU/mL. Donkor i sur. (2006.) također su dobili slične rezultate prateći preživljavanje laktobacila i bifidobakterije u jogurtu s dodatkom amiloze i inulina te bez dodataka. Preživljavanje tih bakterija praćeno je kroz razdoblje od 28 dana na +4 °C. Mlijeko je tada fermentirano na 42 °C uz dodatak 1 % jogurtne kulture i 1 % probiotičke kulture *Lactobacillus acidophilus* La-10, odnosno 1 % *Bifidobacterium lactis* B-94. U jogurtu bez dodataka broj laktobacila smanjio se samo 0,2 log CFU/mL, a bifidobakterije 0,77 log CFU/mL i bio veći od minimalne preporučene terapijske količine.

Zaključak

Rezultati istraživanja pokazuju da veća količina inokuluma monokulture *Lactobacillus acidophilus* La-5 ili *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 nije utjecala na veći broj živih stanica ovih bakterija u fermentiranoj sirutki do pH≈4,6. Konačan broj živih stanica u svim uzorcima fermentirane sirutke bio je sličan kontrolnom uzorku bez obzira na dodanu monokulturu. Trostruka količina (7,5 %) inokuluma skratila je vrijeme fermentacije sirutke s monokulturom *Lactobacillus acidophilus* La-5 (oko 2,2 sata) u odnosu na kontrolni uzorak (2,5 %), ali nije utjecala na trajanje fermentacije sirutke s monokulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. Oba probiotička soja dobro preživljavaju u sirutki i njihov broj je tijekom 28 dana čuvanja bio iznad terapijskog minimuma u svim uzorcima. Za uzorke s *Lactobacillus acidophilus* La-5 bio je veći od 8,1 log CFU/mL, a za uzorke s *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 bio je veći od 7,7 log CFU/mL.

THE INFLUENCE OF THE DIFFERENT INITIAL PROBIOTIC BACTERIA CONCENTRATION ON SWEET WHEY FERMENTATION

Summary

*Whey is nutritiously very high-quality secondary product from cheese making which is not used enough in human diet. When the fermentation is performed with probiotic bacteria it additionally increases its nutritional and health values. This research examines the influence of different amount of inoculum addition (2.5, 5 and 7.5 %) of monoculture *Lactobacillus acidophilus* La-5 or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, on the*

course of fermentation of reconstituted sweet whey at 37 °C. During fermentation and 28 days of cool storage fermented whey pH value, titratable acidity and the viable cells count was monitored. Fermentation with 7.5 % inoculum of monoculture *Lactobacillus acidophilus* La-5 lasted the shortest (about 13.3 hours), while the fermentation with 2.5 % inoculum lasted the longest (about 15.5 hours). The viable cells count of *Lactobacillus acidophilus* La-5 cells in all whey samples has increased during fermentation for about 1.3 log CFU/mL and at the end of fermentation was about 8.5 log CFU/mL. Whey fermentation with 7.5 % added inoculum of monoculture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 showed no difference in duration time in comparison to whey fermentation with 2.5 % inoculum addition. The viable cells count of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 has increased during fermentation for about 0.9 log CFU/mL and at the end of fermentation was about 8.7 log CFU/mL. The amount of inoculum had no influence on survival of probiotic bacteria in fermented whey regardless of monoculture used.

Key words: whey, probiotics, inoculum, fermentation, survival

Literatura

- ANTUNES, A.E.C., CAZETTO, T.F., BOLINI, H.M.A. (2005) Viability of probiotic microorganisms during storage postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology* 58 (3), 169-173.
- BEUCLER, J., DRAKE, M., FOEGEDING, E.A. (2005): Design of a beverage from Whey permeate, *Journal of Food Science* 70, 277-285.
- BOŽANIĆ, R. (2000): Utjecaj vrste i sastava mlijeka na aktivnost intestinalnih bakterija mliječne kiseline i kakvoću fermentiranih napitaka. Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- BOŽANIĆ, R., ROGELJ, I., TRATNIK, LJ. (2001): Fermented acidophilus goat's milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk. *Milchwissenschaft* 56 (11), 215-236.
- BOŽANIĆ, R., TRATNIK, LJ. (2001): Quality of Cow's and Goat's Fermented Bifido Milk during Storage, *Food Technology and Biotechnology* 39 (2), 109-144.
- DONKOR, O.N., HENRIKSSON, A., VASILJEVIĆ, T., SHAHAH, N.P. (2006): Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal* 16, 1181-1189.
- DRGALIĆ, I., TRATNIK, LJ., BOŽANIĆ, R. (2005): Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. *Le Lait* 85, 171-179.

HAVENAAR, R., HUIS IN'T VELD, J.H.J. (1992): Probiotics: A General View, *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, Vol. 1, Elsevier Applied Science, London, 151-170.

HIDALGO-MORALES, M., ROBLES-OLVERA, V., GARCIA, H.S. (2005): Lactobacillus reuteri β -galactosidase activity and low milk acidification ability, *Canadian Journal of Microbiology* 51, 261-267.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1995): Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus* culture media, *IDF Bulletin* 306, 23-33.

JELIČIĆ, I., BOŽANIĆ, R., TRATNIK, LJ. (2008): Napitci na bazi sirutke - nova generacija mliječnih proizvoda, *Mljekarstvo* 58 (3), 257-274.

KAILASAPATHY, K., RYBKA, S. (1997): Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp.-Their therapeutic potential and survival in yogurt, *Australian Journal of Dairy Technology* 52, 28-35.

MATIJEVIĆ, B., BOŽANIĆ, R., TRATNIK, LJ., JELIČIĆ, I. (2008): Utjecaj koncentrata proteina sirutke na rast i preživljavanje probiotičkih bakterija u sirutki, *Mljekarstvo* 58 (3), 243-255.

MICHAELIDOU, A., STEIJNS, J. (2006): Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides, *International Dairy Journal* 16, 1421-1426.

MOLDER, H.W., VILLA-GARCIA, L. (1993): The growth of Bifidobacterium longum in whey-based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity, *Cultured Dairy Products Journal* 28, 4-8.

ØSTLIE, H.M., HELLAND, M.H., NARVHUS, J.A. (2003): Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk, *International Journal of Food Microbiology* 87, 17-27.

SABADOŠ, D. (1996a): Titracijske metode određivanja stupnja kiselosti mlijeka, *Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda*, II. dopunjeno izdanje, Hrvatsko mljekarstvo društvo, Zagreb, 70.

SABADOŠ, D. (1996b): Ispitivanje jogurta, kiselog mlijeka, mlaćenice i kefira, *Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda*, II. dopunjeno izdanje, Hrvatsko mljekarstvo društvo, Zagreb, 166-169.

ŠUŠKOVIĆ, J. (1996): Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

TAMIME, A.Y., BOŽANIĆ, R., ROGELJ, I. (2003): Probiotički fermentirani mliječni proizvodi, *Mljekarstvo* 53 (2), 111-134.

TRATNIK, LJ. (1998): *Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija*, Hrvatska mljekarska Udruga, Zagreb.

TRATNIK, LJ. (2003): Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane, *Mljekarstvo* 53 (4), 325-352.

WALSTRA, P., WOUTERS, J.T.M., GEURTS, T.J. (2006): *Dairy Science and Technology*, Second Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenog projekta «Slatki i fermentirani proizvodi na bazi sirutke i sojinog mlijeka», provedenog uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

Adrese autora - Author's addresses:

Mr. sc. Bojan Matijević
Odjel prehrambene tehnologije
Veleučilište u Karlovcu
Trg J. J. Strossmayera 9, Karlovac
e-mail: bojan.matijevic@vuka.hr

Katarina Lisak, dipl. ing.
Prof. dr. sc. Rajka Božanić
Prof. dr. sc. Ljubica Tratnik
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda
Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Pierottijeva 6, Zagreb

Prispjelo - Received: 20.07.2008.

Prihvaćeno - Accepted: 18.11.2008.