

DOROTA ZIELIŃSKA

DOBÓR SZCZEPÓW BAKTERII *LACTOBACILLUS* I USTALENIE WARUNKÓW FERMENTACJI NAPOJU SOJOWEGO

Streszczenie

Celem badań było opracowanie sposobu fermentacji napoju sojowego, o właściwościach probiotycznych, dobór warunków fermentacji oraz określenie liczby żywych bakterii podczas 16 dni przechowywania fermentowanego napoju sojowego w temp. 10°C. Oceniono ponadto cechy sensoryczne produktu.

Napój sojowy szczepiono dziesięcioma różnymi kulturami bakterii potencjalnie probiotycznych w liczbie $7,5 \times 10^7$ jtk/ml i poddawano fermentacji: w temp. 32°C przez 9 godz. lub w temp. 37°C przez 6 godz. Stwierdzono, że lepsze warunki fermentacji zapewnia 6-godzinny proces w temp. 37°C. Wykazano, że pomiędzy pięcioma napojami sojowymi, fermentowanymi wcześniej wybranymi szczepami, nie ma istotnych statystycznie różnic pod względem smakowitości. Liczba bakterii w napoju sojowym zaszczipionym *Lactobacillus casei* KN291, fermentowanym przez 6 godz. w temp. 37°C i przechowywanym w temp. 10°C, wzrastała z 8,87 log jtk/ml tuż po fermentacji do 9,29 log jtk/ml po 12 dniach, i utrzymywała się na stałym poziomie do 16. dnia. W tym czasie jakość sensoryczna napoju pogorszyła się, wzrosła intensywność smaku kwaśnego i gorzkiego oraz niekorzystnie zmieniła się konsystencja.

Słowa kluczowe: bakterie probiotyczne, napój sojowy, żywność fermentowana

Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się intensywny rozwój produkcji nowych rodzajów żywności fermentowanej i to zarówno pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego. Do fermentacji surowców pochodzenia roślinnego można stosować specjalnie wyselekcjonowane, o potwierdzonych naukowo właściwościach probiotycznych, szczepy bakterii fermentacji mlekowej, głównie z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* [5].

W celu wywierania efektu prozdrowotnego produkty probiotyczne powinny zawierać dużą liczbę żywych komórek bakterii, rzędu 10^7 – 10^9 jtk/cm³(g) produktu. Opisane, najważniejsze efekty zdrowotne szczepów probiotycznych to: modulacja

systemu immunologicznego, utrzymywanie równowagi mikroflory jelitowej, redukcja aktywności enzymów fekalnych, działanie antynowotworowe, zapobieganie biegunkom „podróżnych”, rotawirusowym i innym, działanie antycholesterolowe, zmniejszenie defektu laktazowego [7].

Zastosowanie bakterii, spełniających powyższe wymagania, do fermentacji produktów roślinnych może poszerzyć listę szeroko dostępnych produktów spożywczych z udziałem probiotyków oraz poprawić wartość odżywczą i dietetyczną żywności fermentowanej. Warzywno-fermentowane, w postaci soków czy sałatek mogą stanowić alternatywę uzupełnienia mikroflory przewodu pokarmowego dla ludzi nietolerujących laktozy i białek mleka, u których rozwój i obecność bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym zostały zachwiane poprzez działanie różnych czynników [3].

W ostatnich latach, m.in. w Instytucie Biotechnologii Żywności (UWM w Olsztynie), podjęto próby fermentowania soków i sałatek warzywnych bakteriami probiotycznymi, stosując szczepy z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* [8]. Innymi interesującymi produktami są fermentowane napoje z soi i ryżu, cechujące się bezpośrednio po wytworzeniu wysoką liczebnością bakterii kwasu mlekowego [14].

Soja jest ważnym surowcem spożywczym, szeroko wykorzystywanym w wielu krajach i na różnych kontynentach. Przykładowo indonezyjskie tempe, chińskie sufu czy indyjskie kinema to sojowe produkty fermentowane. Tempe i sufu to produkty fermentacji wywołanej przez pleśnie (*Rhizopus oligosporus*, *Actinomucor elegans*). Kinema to produkt fermentowany przez bakterie *Bacillus subtilis*. Proces fermentacji prowadzi do uwolnienia aminokwasów i syntezy witamin z grupy B. Antyodżywcze czynniki, takie jak: inhibitory tripsyny, fityniany, hemaglutyniny, oligosacharydy, zostają inaktywowane przez wysoką temperaturę (inhibitory tripsyny), lub przez enzymy (fityniany, oligosacharydy) [9].

Zaobserwowano, że po fermentacji produkty sojowe tracą swoje właściwości alergenne, np. sos sojowy fermentowany, w porównaniu z niefermentowaną mączką sojową, wykazuje o 70–90% niższą alergenicność [4]. Stwierdzono również, że fermentacja soi poprawia przyswajalność genisteiny, białka, które ma właściwości przeciwutleniające, co wpływa zarówno na regulację gospodarki lipidowej, jak i na zmniejszenie ryzyka zachorowań na nowotwory [2]. Właściwości białek soi, w szczególności genisteiny, polegające na regulacji gęstości kości, są przedmiotem badań wielu uczonych. Przypuszcza się, że mogą mieć duże znaczenie w walce z osteoporozą [6].

Zastosowanie bakterii mlekowych do produkcji fermentowanego napoju sojowego może stanowić nowe wyzwanie dla producentów żywności.

Celem niniejszych badań było opracowanie sposobu fermentacji napoju sojowego o właściwościach potencjalnie probiotycznych, z uwzględnieniem cech sensorycznych, wybór właściwych warunków fermentacji oraz określenie przeżywalności bakterii w fermentowanym napoju sojowym.

Materiał i metody badań

Materiałem do badań był napój sojowy naturalny firmy Polgrunt. Zastosowano 10 szczepów bakterii o właściwościach potencjalnie probiotycznych, z kolekcji szczepów Politechniki Łódzkiej, z rodzaju *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei*. Do napoju dodawano 24-godzinne hodowle bakterii, tak aby po zaszczepieniu liczba komórek wynosiła $7,5 \log \text{ jtk/cm}^3$ i poddawano procesowi fermentacji przez 6 lub 9 godz. w temp. 32°C lub 37°C . W celu dokonania wyboru najbardziej odpowiedniego szczepu oraz właściwych warunków fermentacji zastosowano ocenę sensoryczną – metodę szeregowania, w której brało udział każdorazowo od 28 do 45 osób. Przeprowadzono 2–3 powtórzenia oceny [1]. Oceniający mieli za zadanie uszeregować próbki napoju pod względem preferencji smakowitości. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu Friedmana [12], przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wybrany optymalny szczep i ustalone warunki fermentacji zostały zastosowane do produkcji napoju sojowego poddanego próbom przechowalniczym w temp. 10°C przez 16 dni. Oznaczano liczbę bakterii kwasu mlekowego oraz pH bezpośrednio po fermentacji, a następnie co 4 dni.

Liczbę bakterii kwasu mlekowego określano metodą wglębną, stosując podłoże wybiórcze – agar MRS firmy Biokar Diagnostic. Na płytki Petriego wlewano po 1 cm^3 z trzech kolejnych rozcieńczeń, w dwóch powtórzeniach. Próbki inkubowano przez 72 godz. w temp. 30°C [13]. Pomiar pH dokonywano aparatem ELMETRON CP551, z uwzględnieniem temperatury napoju.

Wyniki badań przechowalniczych posłużyły do przeprowadzenia jednozynnkowej analizy wariancji. Hipoteza pierwotna brzmiała, że liczba bakterii podczas przechowywania nie zmieni się istotnie, czyli, że nie istnieje związek (korelacja) między liczbą bakterii a czasem przechowywania.

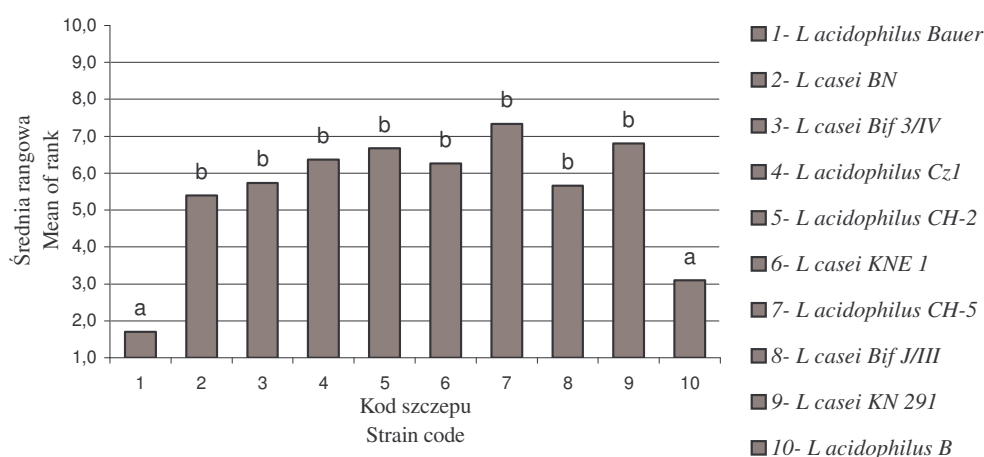
W trakcie przechowywania pobierano próby do oceny sensorycznej napoju sojowego: bezpośrednio po fermentacji, po 7 dniach przechowywania oraz napoju sojowego niefermentowanego. Zastosowano metodę profilową [11], przy czym dokonano wyboru wyróżników jakości i przeszkolono panel osób oceniających. Zdefiniowano cztery wyróżniki zapachu (waniliowy, słodki, fermentacji mlekowej, mleczny), trzy wyróżniki konsystencji (gęstość, gładkość, lepkość), pięć wyróżników smaku (fermentacji mlekowej, kwaśny, słodki, gorzki, mączny) oraz jakość ogólną.

Analizę statystyczną wykonano stosując analizę wariancji jednozynnkowej oraz test Tukey'a.

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badań przeprowadzono trzy doświadczenia w celu wybrania najbardziej odpowiedniego szczepu do fermentacji oraz najlepszych warunków fermentacji napoju sojowego. W wyniku pierwszego doświadczenia stwierdzono, że

istnieją istotne różnice w akceptowalności sensorycznej napoju sojowego fermentowanego przy użyciu dziesięciu różnych szczepów bakterii potencjalnie probiotycznych (rys. 1). Wykazano, że jakość sensoryczna napoju sojowego zaszczonego hodowlą szczepów zakodowanych jako 1 i 10 (*Lactobacillus acidophilus* Bauer, *Lactobacillus acidophilus* B) jest istotnie gorsza. Natomiast jakość sensoryczna napojów fermentowanych z wykorzystaniem pozostałych szczepów nie różni się między sobą statystycznie istotnie. Do dalszych doświadczeń zdecydowano pozostawić 5 szczepów, przy użyciu których otrzymano napoje o najlepszej smakowitości (średnia rangowa powyżej 6,0).



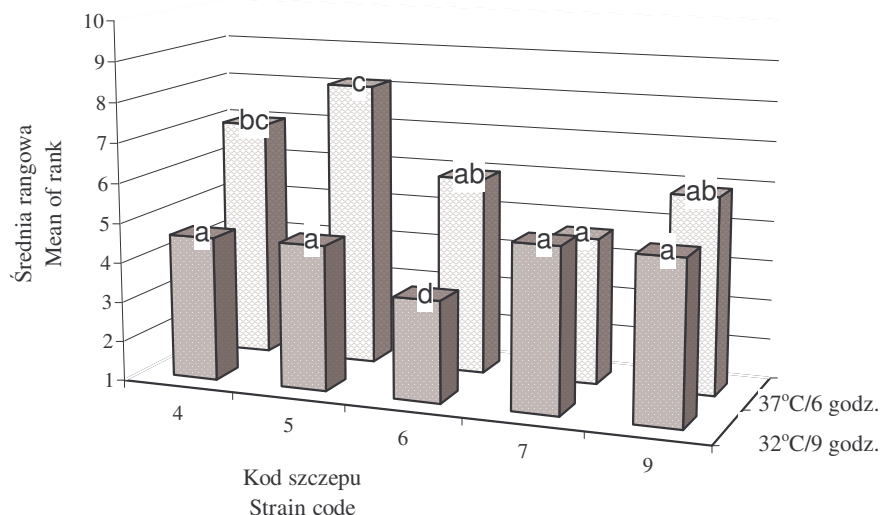
Objaśnienia:/ Explanatory notes:

a; b – wartości średnie oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ($\alpha = 0,05$) / mean values denoted by the same superscripts do not differ statistically significantly from each other ($\alpha = 0,05$).

Rys. 1. Ocena sensoryczna napoju sojowego fermentowanego przez 9 godz. w temp. 32°C z użyciem 10 szczepów bakterii probiotycznych (n = 2); metoda szeregowania.

Fig. 1. Sensory evaluation of a soya drink being 9 hrs fermented using 10 probiotic bacteria strains at a temperature of 32°C (n = 2); a succession method was applied.

W wyniku drugiego doświadczenia wskazano temp. 37°C i okres 6 godz. jako właściwe warunki fermentacji (rys. 2). Stwierdzono, że jakość sensoryczna napojów sojowych fermentowanych w temp. 37°C szczepami zakodowanymi: 4, 5 i 6 (*Lactobacillus acidophilus* Cz 1, *Lactobacillus acidophilus* CH-2, *Lactobacillus casei* KNE1) była istotnie wyższa od jakości napojów fermentowanych tymi samymi szczepami w temp. 32°C. Jakość sensoryczna napojów sojowych fermentowanych w temp. 37°C szczepami zakodowanymi: 7 i 9 (*Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus casei* KN 291) nie różniła się statystycznie od jakości napojów fermentowanych tymi samymi szczepami w temp. 32°C. W dalszych doświadczeniach zdecydowano przeprowadzać fermentację napoju sojowego przez 6 godz. w temp. 37°C.



Objaśnienia:/ Explanatory notes:

- oznaczenia kodu szczepów takie jak na rys. 1. / strain code marks are the same like on fig. 1

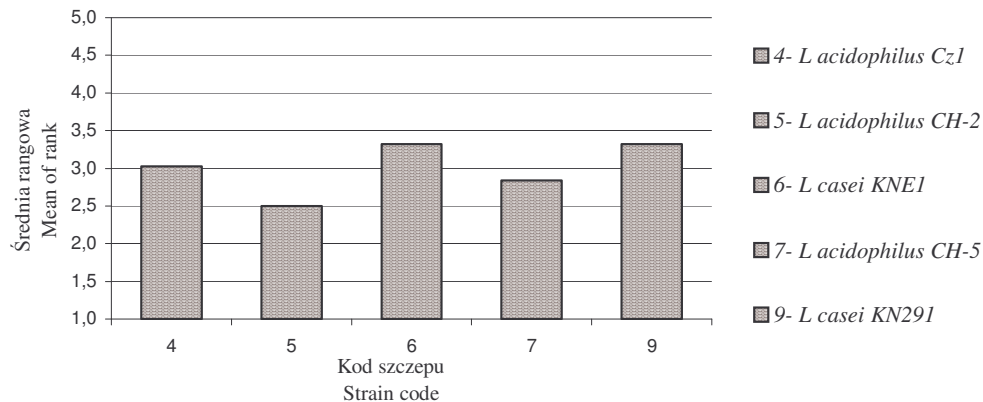
a-d – wartości średnie oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ($\alpha = 0,05$) / mean values denoted by the same superscripts do not differ statistically significantly from each other ($\alpha = 0,05$)

Rys. 2. Ocena sensoryczna napoju sojowego fermentowanego w różnych warunkach, z użyciem 5 szczepów bakterii probiotycznych; metoda szeregowania (n = 2).

Fig. 2. Sensory evaluation of a soya drink fermented using with 5 probiotic bacteria strains under varying fermentation conditions; a succession method was applied (n = 2).

W kolejnym doświadczeniu (n = 3), wykazano, że nie ma statystycznie istotnych różnic pomiędzy jakością sensoryczną pięciu napojów sojowych fermentowanych w temp. 37°C przez 6 godz., z wykorzystaniem wcześniej wybranych szczepów (rys. 3).

Do dalszych badań wybrano szczep *Lactobacillus casei* KN291. Napój sojowy poddawano fermentacji w temp. 37°C przez 6 godz. i przechowywano 16 dni w temp. 10°C. Stwierdzono, że w czasie przechowywania następował ciągły wzrost liczby żywych bakterii do 12. dnia (rys. 4), przy równoczesnym spadku pH, a następnie liczba bakterii utrzymywała się na stałym poziomie (tab. 1). Istotny wzrost liczby bakterii zaobserwowano 4. dnia przechowywania (z 8,88 log jtk/ml tuż po fermentacji do 9,19 log jtk/ml). Po 16 dniach przechowywania fermentowanego napoju sojowego liczba żywych bakterii *Lactobacillus* wynosiła 9,28 log jtk/ml.



Rys. 3. Ocena sensoryczna fermentowanego napoju sojowego w temp. 37°C przez 6 godz., z użyciem 5 szczepów bakterii probiotycznych (n=3); metodą szeregowania.

Fig. 3. Sensory evaluation of a soya drink being 6 hours fermented using 5 probiotic bacteria strains at a temperature of 37°C (n=3); a succession method was applied

Tabela 1

Wartości średnie liczby bakterii *L. casei* KN291 [log jtk/ml] i pH w trakcie przechowywania fermentowanego napoju sojowego.

Mean values of CFU *L. casei* KN291 strains [log cfu/ml] and pH while storing the fermented soya drink.

Dni przechowywania Storage days	Wartości średnie [log jtk/ml] Mean values [log cfu/ml] $\bar{x} \pm SD$	Wartości średnie pH Mean values pH $\bar{x} \pm SD$
0	8,88 ± 0,210	5,5 ± 0,07
4	9,19 ± 0,297	4,8 ± 0,05
8	9,14 ± 0,213	4,6 ± 0,02
12	9,29 ± 0,113	4,3 ± 0,02
16	9,28 ± 0,127	4,2 ± 0,02

Objaśnienia:/ Explanatory notes:

\bar{x} – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

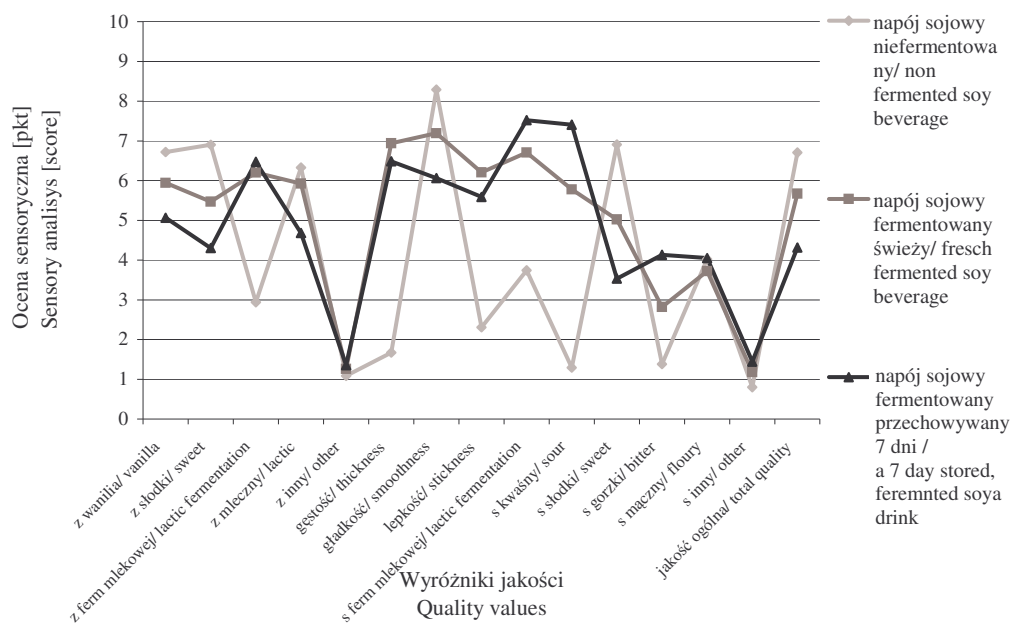
Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji odrzucono hipotezę pierwotną, ponieważ $p = 0,00001$ i $p < 0,05$. Oznacza to, że istnieje związek pomiędzy czasem przechowywania w temp. 10°C a liczbą bakterii potencjalnie probiotycznych w napoju sojowym.

W badaniach sałatek warzywnych, przeprowadzonych przez Warmińską-Radyko i Łaniewską-Moroz [15] w Instytucie Biotechnologii Żywności AR-T w Olsztynie, uzyskano odmienne wyniki: spadek liczby bakterii *Lactobacillus acidophilus* o dwa rzędy logarytmiczne podczas przechowywania przez 14 dni w temp. 8°C.

Z badań przeprowadzonych na mleku zaszczipionym bifidobakteriami i przechowywanym w różnych warunkach (tj. temp. 5, 18, 30°C) wynika, że im wyższa

jest temperatura przechowywania, tym szybciej zmniejsza się liczba bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, przy jednoczesnym pogorszeniu jakości ogólnej [10].

Analiza zmian smaku napoju sojowego fermentowanego podczas przechowywania wykazała, że dłuższy czas przechowywania wpływał na zwiększenie intensywności wyczuwania smaku gorzkiego, kwaśnego oraz zmniejszenie intensywności wyczuwania smaku słodkiego (rys. 5). Przechowywanie napoju w temp. 10°C przez 7 dni wpłynęło również na zmianę konsystencji. Napój stał się mniej gładki, pojawiło się uczucie niejednorodności w ocenie, co może być powodem dyskwalifikacji napoju. Jakość ogólna napoju fermentowanego przechowywanego przez 7 dni została oceniona na poziomie 4,32 pkt, co jest oceną istotnie niższą w porównaniu z jakością napoju fermentowanego świeżego, nieprzechowywanego, (ogólna ocena -5,67 pkt) (rys. 5).



Objaśnienia: / Explanatory notes:
z – zapach / smell; s – smak / taste

Rys. 5. Jakość sensoryczna napojów sojowych oceniana metodą profilowania.

Fig. 5. Sensory quality of soya drink assess using a method of profiling.

W ocenie sensorycznej wykazano, że napoje fermentowane w porównaniu z niefermentowanym charakteryzowały się innymi cechami sensorycznymi. Przede wszystkim napój niefermentowany miał inną konsystencję: mniejszą gęstość i lepkość. Gęstość oceniono na poziomie 1,67 pkt, lepkość na poziomie 2,3 pkt w skali 10-punktowej, co w porównaniu z oceną napojów fermentowanych stanowiło statystycznie istotną różnicę. Gęstość napoju fermentowanego nieprzechowywanego oceniono na poziomie 6,94 pkt, lepkość na poziomie 6,21 pkt. Kolejną różnicą

sensoryczną, wynikającą z procesu fermentacji, był smak napojów. Napój niefermentowany charakteryzował się wysoką intensywnością smaku słodkiego, małą smaku kwaśnego, gorzkiego i smaku charakterystycznego dla fermentacji mlekowej, w porównaniu z napojami fermentowanymi. Jakość ogólną napoju sojowego niefermentowanego oceniono na poziomie 6,70 pkt.

Mleczny i waniliowy zapach napoju był bardziej intensywny w przypadku napojów: niefermentowanego i świeżo fermentowanego w porównaniu z napojem fermentowanym przechowywanym 7 dni. Napój przechowywany miał zdecydowanie mniej intensywny zapach słodki oraz istotnie bardziej wyczuwalny zapach charakterystyczny dla fermentacji mlekowej.

Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych badań wybrano temp. 37°C i okres 6 godz. jako właściwe warunki fermentacji napoju sojowego, niezależnie od zastosowanego szczepu bakterii (*Lactobacillus acidophilus* Cz1, CH-2, CH-5 i *Lactobacillus casei* KNE1, KN291).
2. Po 7 dniach przechowywania w temp. 10°C napoju sojowego fermentowanego szczepem *Lactobacillus casei* KN 291, następuje pogorszenie jego cech sensorycznych, co jest prawdopodobnie związane ze wzrostem liczby bakterii i obniżeniem wartości pH.
3. Wykazano, że możliwe jest otrzymanie fermentowanego napoju sojowego o akceptowanej jakości sensorycznej, ale należy opracować warunki przechowywania, umożliwiające stabilizację cech jakościowych.

Praca wykonana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej

Literatura

- [1] Baryłko-Pikielna N.: Zarys analizy sensorycznej żywności. WNT. Warszawa 1975.
- [2] Fitzpatrick L. A.: Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas* 2003, **44 Suppl. 1**, 21s-29s.
- [3] Goderska K., Czarnecka M., Czarnecki Z.: Przeżywalność wybranych szczepów bakterii potencjalnie probiotycznych w sokach warzywnych. W: Bakterie fermentacji mlekowej. Metabolizm. Genetyka. Wykorzystanie. Wyd. Politechniki Łódzkiej, 2003, s. 124-128.
- [4] Hefle S. L., Lambrecht D. M., Nordlee J. A.: Soy sauce allergenicity through the fermentation/production process. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, **128**, 32.
- [5] Kołożyn-Krajewska D.: Żywność probiotyczna w aspekcie bezpieczeństwa zdrowotnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **4 (29)** Supl., 93-105.
- [6] Lee Alekel D.: Isoflavone- rich soy- protein isolate exerts significant bone sparing in the lumbar spine of peri-menopausal woman. Third international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease – conference review. *Nutrition Volume* 2001, **17**, 1.
- [7] Libudzisz Z.: Mikrobiologiczne i technologiczne aspekty probiotyków. W: Probiotyki. Wyd. Nauk. PTTŻ, 2002, s. 11-22.
- [8] Łaniewska-Moroz Ł.: Fermentowane soki warzywne. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1999, **10 (43)**, 25.

- [9] Messina M., Gardner C., Barnes S.: Gaining insight into the health effects of soya but a long way still to go: commentary on the fourth international symposium on the role of soya in preventing and treating chronic disease. *J. Nutr.* 2002, **132**, 547s-551s.
- [10] Motyl I., Libudzisz Z.: Zmiany wybranych cech jakościowych podczas przechowywania nieukwaszonego i ukwaszonego mleka bifidusowego, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **3 (38)** Supl., 107-118.
- [11] ISO 6564: 1985 Sensory analysis – Methodology - Flavour profile methods.
- [12] ISO 8587: 1988 Sensory analysis – Methodology- Ranking.
- [13] PN-ISO: 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C.
- [14] Owczarek L., Osińska M., Mączyńska D.: Produkty pochodzenia roślinnego a żywność funkcjonalna. *Przem. Spoż.*, 1999, **1 (53)**, 13.
- [15] Warmińska-Radyko I., Łaniewska-Moroz Ł., Kujawa K.: Bakterie propionowe w fermentowanych sałatkach warzywnych, *Przem. Spoż.*, 1997, **7**, 38-39.

SELECTING SUITABLE BACTERIAL STRAINS OF *LACTOBACILLUS* AND IDENTIFYING SOYA DRINK FERMENTATION CONDITIONS

S u m m a r y

The objective of this study was: to develop a special soya drink fermentation technique in order to obtain a soya drink with special probiotic properties, to identify and select fermentation conditions, and to determine the number of live bacteria during a 16 day period of storing the fermented soya drink at a temperature of 10°C. Furthermore, sensory qualities of the product were evaluated.

The soya drink was inoculated using ten different, potentially probiotic bacterial strains, their initial number being $7,5 \times 10^7$ cfu/ml; next, the drink was fermented at a temperature of 32°C during 9 hours or at 37°C during 6 hours. It was stated that the better fermentation conditions were created when the fermentation time was 6 hours, and the fermentation temperature was 37°C. It was proved that there were no statistically significant differences regarding the palatability of the product. The number of bacteria in the soya drink inoculated using *Lactobacillus casei* KN291, fermented during 6 hrs at a temperature of 37°C, and stored at a temperature of 10°C, increased from the initial number of 8,87 log cfu/ml just after the fermentation process accomplished to 9,29 log cfu/ml on the 12th day, and remained at the same level until the 16th day. During this period, the sensory quality of the soya drink worsened, the intensity of sour and bitter taste increased, and consistency of the drink unfavourably changed.

Key words: probiotics, soya drink, fermented food 