

DOROTA ZIELIŃSKA

BADANIA NAD PRZEŻYWALNOŚCIĄ BAKTERII *LACTOBACILLUS CASEI* KN291 W NAPOJU SOJOWYM

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie przeżywalności bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym, przechowywanym w temp. 5 i 10°C. Napój sojowy zaszczerpiono kulturami bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291 w liczbie 4,5 log jtk/ml i poddano fermentacji, a następnie przechowywano w wybranych warunkach temperaturowych. W trakcie przechowywania, co 4 dni oznaczano liczbę bakterii oraz pH fermentowanego napoju sojowego.

Stwierdzono, że bakterie *Lactobacillus casei* KN291 przeżywają w napoju sojowym zarówno w temp. 5°C, jak i 10°C. W czasie przechowywania napoju sojowego w temperaturze 10°C nastąpiło znaczne obniżenie pH, co może być przyczyną pogorszenia jakości sensorycznej produktu.

Słowa kluczowe: fermentowany napój sojowy, probiotyki, przeżywalność, przechowywanie

Wprowadzenie

Probiotyki to żywe mikroorganizmy, które spożywane w odpowiedniej ilości mają korzystny wpływ na zdrowie organizmu [1]. Probiotyki wykazują wiele efektów prozdrowotnych, między innymi: redukują symptomy nietolerancji laktozy, stymulują system immunologiczny, utrzymują równowagę mikroflory jelitowej, modulują koncentrację cholesterolu we krwi, hamują proliferację komórek rakowych, a także poprawiają funkcje przewodu pokarmowego [8]. Z kolei prebiotyki są składnikami żywności, których korzystne działanie na organizm ludzki jest związane ze stymulacją wzrostu i aktywności niektórych szczepów mikroflory rodzimej lub wprowadzonej z zewnątrz wraz ze spożytą żywnością. Niektóre sacharydy (inulina, oligosacharydy) przez stymulację wzrostu bakterii probiotycznych mogą odgrywać istotną rolę w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego człowieka, a szczególnie jelita grubego [7].

Mgr inż. D. Zielińska, Katedra Techniki i Technologii Gastronomicznej, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

Oligosacharydom zawartym w soi przypisuje się także funkcje prebiotyków [5]. Soja i produkty sojowe zawierają ponadto znaczne ilości składników odżywczych, takich jak: białka, o korzystnym składzie aminokwasów oraz wiele innych substancji odżywczych. Z drugiej strony soja zawiera antyodżywcze składniki (np.: inhibitory tripsyny, fityniany, hemaglutyniny). Problem stanowi także specyficzny, nie przez każdego akceptowany, smak soi. Dlatego fermentacja mlekowa odgrywa istotną rolę, gdyż nadaje nowym produktom atrakcyjny smak, poprawia strawność i podnosi biodostępność składników odżywczych [11].

Soja i produkty sojowe znane są również ze swoich właściwości prozdrowotnych, między innymi zapobiegają chronicznym chorobom, takim jak: arterioskleroza, nowotwory, osteoporoza oraz zmniejszają dolegliwości związane z menopauzą [10]. Fermentowane produkty sojowe (np. tempeh) wykazują działanie hamujące biegunkę wywołaną bakteriami *E. coli* przez zmniejszenie adhezji bakterii *E. coli* do komórek nabłonka [11]. Fermentowanym produktom sojowym przypisuje się funkcje przeciwutleniające, działanie przeciwnowotworowe oraz zapobieganie chorobom naczyniowym [3].

Napój sojowy (mleko sojowe) jest wodnym ekstraktem nasion soi. Jest to produkt bogaty w białka o wysokiej wartości odżywczej, niezawierający cholesterolu ani laktozy i tylko małe ilości nasyconych kwasów tłuszczowych [16]. W ostatnich latach podejmuje się próby fermentowania napoju sojowego różnymi szczepami bakterii probiotycznych. Biorąc pod uwagę występowanie w soi prebiotyków sacharydowych, napój sojowy fermentowany bakteriami kwasu mlekowego może być uznany za produkt synbiotyczny [6, 8].

Celem niniejszej pracy było określenie przeżywalności bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym, przechowywanym w dwóch warunkach temperaturowych.

Materiał i metody badań

Materiałem do badań był napój sojowy firmy Polgrunt o smaku naturalnym oraz szczep bakterii potencjalnie probiotycznych z kolekcji szczepów Politechniki Łódzkiej - *Lactobacillus casei* KN291. Do napoju dodawano 24-godzinne hodowle bakterii i poddawano procesowi fermentacji w temp. 37°C przez 6 godz. Optymalne warunki fermentacji ustalono we wcześniejszych badaniach [17]. Początkowa liczba bakterii kwasu mlekowego w zafermentowanym napoju sojowym wynosiła średnio 6,3 log jtk/cm³. W ten sposób przygotowano 20 prób po 200 cm³ każda. Po 10 próbach fermentowanego napoju sojowego przechowywano w temp. 5 i 10°C przez 28 dni. W trakcie przechowywania, co 4 dni, oznaczano liczbę bakterii kwasu mlekowego metodą płytkową na podłożu wybiórczym MRS firmy Biokar Diagnostic. Na płytki Petriego wylewano po 1 cm³ zawiesiny bakteryjnej z trzech kolejnych rozcieńczeń (w zależności

od oczekiwanej liczby bakterii), w dwóch powtórzeniach. Płytki zalewano upłynnionym, ostudzonym agarem, mieszano i pozostawiano do inkubacji (czas inkubacji 72 godz. w temp. 30°C [13]). Do liczenia wybierano płytki zawierające od 15 do 300 kolonii.

Jednocześnie w trakcie przechowywania, co 4 dni oznaczano pH fermentowanego napoju sojowego aparatem Elmetron Cp551, z uwzględnieniem temperatury napoju. Badanie prowadzono w 10 powtórzeniach w jednym niezależnym doświadczeniu.

Wyniki badań przechowalniczych poddano jednoczynnikowej analizie wariancji. Hipoteza pierwotna brzmiała, że liczba bakterii oraz pH napoju podczas przechowywania w temp. 5 i 10°C nie zmienia się istotnie czyli, że nie istnieje związek (korelacja) między liczbą bakterii a czasem przechowywania oraz pomiędzy pH a czasem przechowywania. Do szczegółowej analizy zastosowano test LSD.

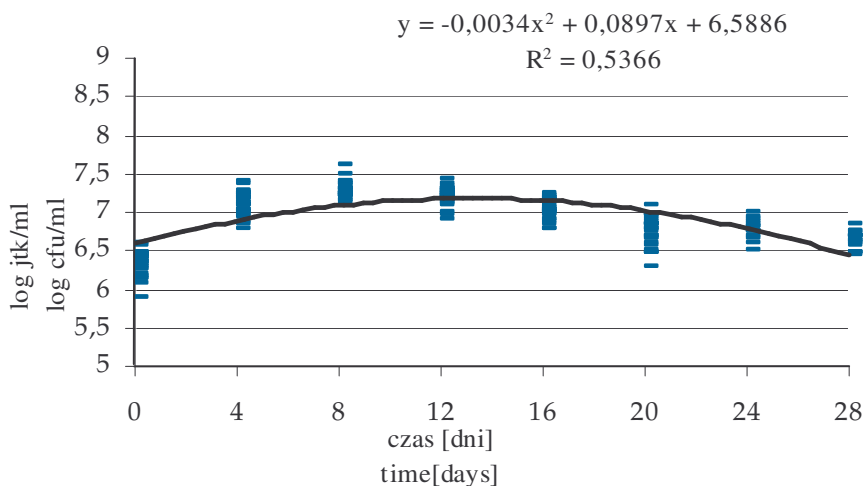
Podjęto również próbę dopasowania funkcji opisującej zjawisko przeżywania bakterii w napoju do średnich wartości liczby bakterii w zadanej temperaturze i czasie przechowywania. Wyznaczono współczynniki determinacji, świadczące o stopniu dopasowania funkcji.

Wyniki i dyskusja

Liczba bakterii *Lactobacillus casei* KN291 bezpośrednio po zaszczepieniu wynosiła około 4,5 log jtk/cm³ i zwiększyła się do około 6 log jtk/cm³ po 6 godz. fermentacji. We wcześniejszych badaniach [17] wykazano, że większa liczba bakterii *L. casei* KN291 w napoju sojowym po 6 godz. fermentacji (tj. 8,8 log jtk/cm³) powoduje zbyt szybkie zakwaszenie środowiska (pH = 5,5), a co za tym idzie pogorszenie jakości sensorycznej napoju w porównaniu z napojem niefermentowanym. Ogólna jakość sensoryczna tego napoju po 7 dniach przechowywania w temp. 10°C była istotnie niższa, dlatego zdecydowano się zmniejszyć liczbę bakterii, tak aby zafermentowany napój zawierał liczbę bakterii około 6 log jtk/cm³. W przypadku żywności funkcjonalnej przyjmuje się minimalną dawkę żywej mikroflory probiotycznej wynoszącą od 10⁵ do 10⁶ komórek/cm³ lub g produktu. Wykazano bowiem, że w celu uzyskania wyraźnych efektów zdrowotnych niezbędne jest minimalne spożycie ok. 10⁸ do 10⁹ komórek żywych mikroorganizmów dziennie [9]. Taka liczba bakterii *Lactobacillus casei* KN291, jaką zdecydowano się użyć w badaniu, może zagwarantować probiotyczność fermentowanego napoju sojowego. Niemniej jednak przy stężeniu bakterii 10⁶ jtk/cm³ oznaczałoby to konieczność dziennego spożycia 1 litra fermentowanego napoju sojowego, co ze względu na inne składniki produktu nie powinno być zalecane. Dlatego dalsze badania koncentrować się będą nad poprawą walorów smakowych, tak aby było możliwe zwiększenie liczby bakterii w napoju.

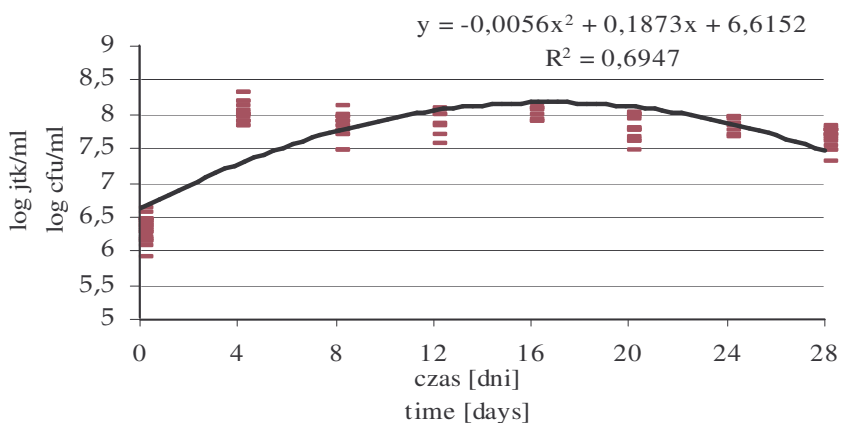
Temperaturę przechowywania (5 i 10°C) dobrano celowo, aby ocenić wpływ przechowywania w warunkach. chłodniczych na jakość produktu.

W napojach przechowywanych w temp. 5°C zaobserwowano wzrost liczby bakterii, średnio o 0,93 log jtk/cm³, w ciągu pierwszych 8 dni przechowywania (z liczby średnio 6,35 log jtk/cm³ po fermentacji do liczby średnio 7,28 log jtk/cm³). W ciągu kolejnych dni przechowywania zaobserwowano powolne zmniejszanie się liczby bakterii (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Krzywa przeżywalności bakterii *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym w temp. 5°C (n = 10).

Fig. 1. Survival curve of *Lactobacillus casei* KN291 in fermented soybean beverage at temp. 5°C (n = 10).



Rys. 2. Krzywa przeżywalności bakterii *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym w temp. 10°C (n = 10).

Fig. 2. Survival curve of *Lactobacillus casei* KN291 in fermented soybean beverage at temp. 10°C (n = 10).

W przypadku napojów przechowywanych w temp. 10°C wzrost liczby bakterii w ciągu pierwszych 4 dni przechowywania wyniósł średnio 1,7 log jtk/cm³ (z liczby średnio 6,33 log jtk/cm³ po fermentacji do liczby średnio 8,03 log jtk/cm³). W kolejnych dniach przechowywania w temp. 10°C obserwowano zmniejszanie się liczby bakterii.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji odrzucono hipotezę pierwotną, która brzmiała, że liczba bakterii podczas przechowywania w temp. 5 i 10°C nie zmieni się istotnie, ponieważ $p=0,00001$ i $p<0,05$.

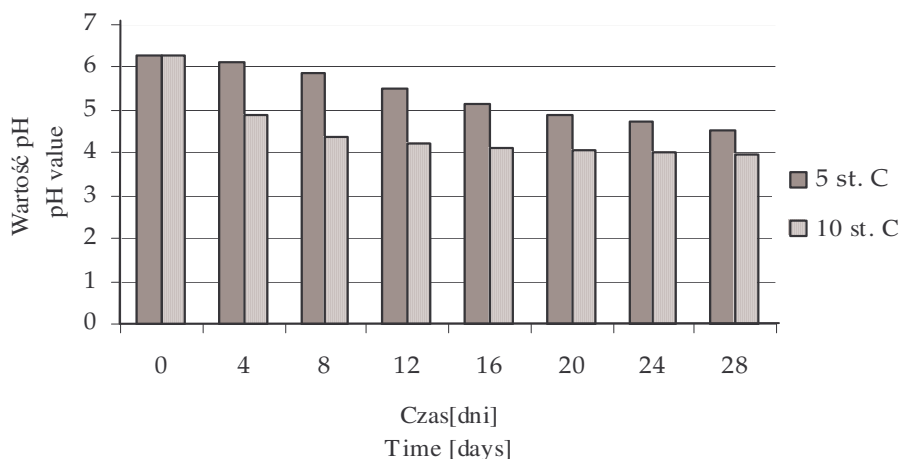
Przy zastosowaniu testu LSD dotyczącego napoju przechowywanego w temp. 5°C wyznaczono grupy homogeniczne, przy 95% poziomie istotności. Grupę homogeniczną stanowiły próby z 20. i 24. dnia przechowywania. Oznacza to, że przedłużenie czasu przechowywania z 20. do 24. dnia przechowywania nie spowoduje istotnej zmiany liczby bakterii.

Na podstawie testu LSD dotyczącego napoju przechowywanego w temp. 10°C wyznaczono trzy grupy homogeniczne, przy 95% poziomie istotności. Pierwszą grupę homogeniczną stanowiły próby z dni: 8., 12., 20., 24., kolejną: 12. i 16., ostatnią próby z dni: 4. i 16. Liczba bakterii potencjalnie probiotycznych od 4. dnia przechowywania utrzymywała się na prawie stałym poziomie do 24. dnia. Oznacza to, że przechowywanie fermentowanego napoju sojowego można wydłużyć do 24. dnia bez istotnej zmiany liczby bakterii potencjalnie probiotycznych.

Wartość pH fermentowanych napojów sojowych przechowywanych w temp. 10°C obniżyła się z 6,27, tuż po fermentacji, do 3,97 po 28 dniach przechowywania (rys. 3), przy czym największą różnicę zaobserwowano 4. dnia (o 1,4). W przypadku temp. przechowywania 5°C obserwowano łagodne obniżanie pH z wartości 6,26, tuż po fermentacji, do wartości 4,52 po 28 dniach przechowywania. W przypadku temp. 10°C, pH od 4. dnia przechowywania utrzymywało się na prawie stałym poziomie aż do 28. dnia składowania.

Na podstawie analizy wariancji odrzucono hipotezę pierwotną, która brzmiała, że pH napoju przechowywanego w temp. 5 i 10°C nie zmieni się istotnie w czasie, ponieważ $p=0,00001$ i $p<0,05$. Przy zastosowaniu testu LSD dotyczącego temp. 5°C wyznaczono grupy homogeniczne, przy 95% poziomie istotności. Grupę homogeniczną stanowią próby z 20. i 24. dnia przechowywania.

Na podstawie testu LSD dotyczącego temp. 10°C wyznaczono trzy grupy homogeniczne, przy 95% poziomie istotności. Pierwszą grupę homogeniczną stanowią próby z dni: 8., 12., 20., 24. i 28., kolejną: 8., 16., 20. i 24., ostatnią próby z dni: 4., 16., 20. i 24.



Rys. 3. Zmiana pH fermentowanego napoju sojowego przechowywanego w temp. 5 i 10°C.
Fig. 3. pH changes during fermented soybean beverage stored at 5°C and 10°C.

Przedstawione obliczenia wskazują, że liczba bakterii *L. casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym była zgodna z funkcją wielomianu. Po 8. dniach przechowywania liczba bakterii w napoju sojowym przechowywanym w 10°C stabilizowała się, natomiast w przypadku napoju przechowywanego w temp. 5°C, bakterie ulegały powolnemu zamieraniu. Prawdopodobnie temp. 5°C była za niska do wzrostu i przeżycia bakterii szczepu *L. casei* KN291. Zaskakujące jest jednak obniżenie pH, towarzyszące zamieraniu bakterii w fermentowanym napoju sojowym przechowywanym w temp. 5°C. Wydaje się, że przyczyną może być nagromadzenie innych metabolitów np. kwasu mlekowego, octowego, aldehydu octowego. W celu wyjaśnienia tego zjawiska w kolejnych badaniach planuje się oznaczenie zawartości wytworzonego kwasu mlekowego.

Podobny efekt wzrostu bakterii *Lactococcus lactis* do 7. dnia przechowywania (ok. 1 rząd logarytmiczny), a następnie zamierania do 14. dnia i ponowny wzrost do 21. dnia składowania w temp. 6°C zaobserwowali Beasley i wsp.[2]. Takiemu zachowaniu się bakterii towarzyszył nieznaczny spadek pH od 4,4 do 4,2.

Bakterie kwasu mlekowego to głównie mezofile, mogą jednak rosnąć zarówno w niskiej temp. 5°C, jak i w wysokiej 45°C. Podobnie wówczas, gdy większość szczepów rośnie w środowisku o pH 4,0-4,5, niektóre z nich są aktywne w pH 9,6, inne w pH 3,2. Szczepy te wykazują słabe właściwości proteolityczne i lipolityczne. Większość z nich wymaga również obecności w podłożu witamin: B₁ (tiamina), B₂ (ryboflawina), kwasu nikotynowego (niacyna), kwasu pantotenowego, kwasu foliowego, biotyny oraz puryn i pirymidyn. Wszystkie bakterie kwasu mlekowego produkują kwas mlekowy, który jest podstawowym produktem końcowym metabolizmu węglowodanów [4].

Wzrost bakterii *Lactobacillus casei* KN291 do 8. dnia przechowywania napoju w temp. 5°C i do 4. dnia w temp. 10°C świadczy o niezakończonych fermentacji produktu. Można przypuszczać, że bakterie po 6 godzinach fermentacji dopiero rozpoczęły fazę wzrostu, która trwa w czasie przechowywania napoju w temp. chłodniczych. Przypuszczenie to jest wskazówką, aby ponownie dopracować warunki fermentacji napoju sojowego. Wydaje się, że konieczna będzie faza dojrzewania produktu w obniżonej temperaturze. Dalsze badania będą koncentrować się na wyznaczeniu optymalnych warunków (czasu i temperatury) dojrzewania zafermentowanego napoju.

Owczarek i wsp. [12] badając napój sojowy naturalny firmy Polgrunt fermentowany szczepem bakterii probiotycznych *Bifidobacterium infantis* otrzymali podobne wyniki. Podczas przechowywania zafermentowanego napoju przez 4 tygodnie w temp. $4 \pm 1^\circ\text{C}$ liczba bakterii probiotycznych zwiększyła się z $7,15 \text{ jtk/cm}^3$ do $8,74 \text{ log jtk/cm}^3$. Z kolei Shimakawa i wsp. [14] otrzymali odmienne wyniki dotyczące napoju sojowego fermentowanego *Bifidobacterium breve*. W trakcie przechowywania napoju w temp. 10°C w warunkach beztlenowych przez 20 dni, liczba bakterii zmniejszyła się, w zależności od zastosowanego szczepu, o 2 do 4 rzędów logarytmicznych.

W badaniach przeprowadzonych przez Warmińską-Radyko i Łaniewską-Moroz [15], a dotyczących fermentowanych sałatek warzywnych, uzyskano również odmienne wyniki, tzn. zmniejszenie liczby bakterii *Lactobacillus acidophilus* o dwa rzędy logarytmiczne podczas przechowywania przez 14 dni w temp. 8°C.

Wnioski

1. Bakterie potencjalnie probiotyczne *Lactobacillus casei* KN291 przeżywają w zafermentowanym napoju sojowym przechowywanym w temp. 5 i 10°C przez 28 dni, co świadczy o zachowaniu właściwości probiotycznych produktu.
2. Wzrost bakterii *Lactobacillus casei* KN291 do 8. dnia przechowywania napoju w temp. 5°C i do 4. dnia w temp. 10°C świadczy o niezakończonych burzliwej fazie fermentacji produktu, co jest wskazówką, aby wprowadzić fazę dojrzewania produktu w obniżonej temperaturze.

Praca wykonana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej była prezentowana na XI Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Warszawa, 24–25 maja 2006.

Literatura

- [1] Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Raport a Joint FAO/WHO Working Group, 2002.

- [2] Beasley S., Tuorila H., Saris P. E. J.: Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. Int. J. Food Mikrob., 2003, **81**, 159-162.
- [3] Brouns F.: Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector. Food Res. Int., 2002, **35**, 187-193.
- [4] Caplice E., Fitzgerald G. F.: Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food Mikrob., 1999, **50**, 131-149.
- [5] Chow JM.: Probiotics and prebiotics: A brief overview. J. Renal. Nutr., 2002, **12**, 76-86.
- [6] Gibson G. R., Roberfroid M. B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. Nutr., 1995, **125**, 1401-1412.
- [7] Goderska K., Czarnicka M., Czarnicki Z.: Przeżywalność wybranych szczepów bakterii potencjalnie probiotycznych w sokach warzywnych. W: Bakterie fermentacji mlekowej. Metabolizm, Genetyka, Wykorzystanie. Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź 2003, s. 124-128.
- [8] I-Chi Cheng, Huey-Fang Shang, Tzann-Feng Lin, Tseng-Hsing Wang, Hao-Sheng Lin, Shyh-Hsiang Lin: Effect of fermented soy milk on the intestinal bacterial ecosystem. World J. Gastroenterol., 2005, **11** (8), 1225-1227.
- [9] Klessen B., Bezirtzoglou E., Matto J.: Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb. Ecol. Health Dis., 2000, **2** (12) Supl., 53-63.
- [10] Messina M., Gardner C., Barnes S.: Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go: commentary on the fourth international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease. J. Nutr. 2001, **132**, 547-551.
- [11] Nout R.: Food fermentation. In: Health functionality of fermented soybean foods. Ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen 2005, pp. 95-100.
- [12] Owczarek L., Bielecka M., Grzybowski A. R., Zduńczyk Z., Majkowska A., Biedrzycka E., Jasińska U., Sokołowska B., Juśkiewicz J.: Probiotic, fermented beverages based on soy and cereal preparations. Roadshow 3 Gut Health Support, 2005, **4**, 1.
- [13] PN-ISO: 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C.
- [14] Shimakawa Y., Matsubara S., Yuki N., Ikeda M., Ishikawa F.: Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. Int. J. Food Mikrob. 2003, **81**, 131-136.
- [15] Warmińska-Radyko I., Łaniewska-Moroz Ł., Kujawa K.: Bakterie propionowe w fermentowanych sałatkach warzywnych. Przem. Spoż. 1997, **7**, 38-39.
- [16] Yi-Chieh Wang, Roch-Chui Yu, Hsin-Yi Yang, Cheng-Chun Chou: Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. Food Microbiol., 2003, **20**, 333-338.
- [17] Zielińska D.: Dobór szczepów bakterii *Lactobacillus* i ustalenie warunków fermentacji napoju sojowego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, **2** (43) Supl., 289 - 297.

LACTOBACILLUS STRAIN SURVIVAL STUDY IN FERMETED SOY BEVERAGE

Summary

The aim of the study was to determine survival of potentially probiotic bacteria *Lactobacillus casei* KN291 in fermented soybean beverage, during storage at temperature 5°C and 10°C. Soybean beverage was inoculated with potentially probiotic bacteria *Lactobacillus casei* KN291 at initial number 4,5 log cfu/cm³, fermented and stored at various temperatures. During storage, every 4th day, the number of probiotic bacteria and pH in fermented soybean beverage were determined.

It was found that potentially probiotic bacteria *Lactobacillus casei* KN291 survive at fermented soybean beverage as well at temperature 5°C as 10°C (-). At temperature 10°C during storage of fermented soybean beverage, the significant decrease of pH was recognized what can be reason of soybean beverage sensory quality decreasing.

Key words: ermented soybean beverage, probiotics, survival, storage 