

WŁADYSŁAW PIECZONKA

WPLYW DODATKU LIZOZYMU NA PRZEBIEG UKWASZANIA MLEKA KOZIEGO ZAKWASEM JOGURTOWYM I TWAROGOWYM

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu dodatku roztworu lizozymu na kinetykę ukwaszania mleka koziego bakteriami zakwasu jogurtowego i twarogowego.

Lizozym obniża intensywność fermentacji kwasu mlekowego prowadzonej w mleku kozim przez termofilne bakterie jogurtowe, jak też – wydłuża okres indukcji ukwaszania tego mleka zakwasem twarogowym.

Wstęp

W ostatnich latach polski przemysł mleczarski wprowadził szereg metod utrwalania niektórych przetworów mlecznych, szczególnie – twarogów (termizacja) i napojów fermentowanych mikroflorą jogurtową (dodatek środków stabilizujących konsystencję, termizacja). Równocześnie kolejne zakłady przetwórcze podejmują produkcję nie tylko pasteryzowanego mleka koziego, ale i serów twarogowych oraz jogurtów z tego mleka, wzorując się na schematach technologicznych stosowanych w przetwarzaniu mleka krowiego.

Ze względu jednak na to, iż większość nabywców produktów z mleka koziego traktuje je jako swego rodzaju środki terapeutyczne, celowym wydaje się poszukiwanie takich sposobów ich utrwalania, które nie budziłyby zastrzeżeń z punktu widzenia zdrowotności.

Interesujące możliwości w tym zakresie stwarza zastosowanie wzbogacania surowca preparatem lizozymu, otrzymanym z białka jaj kurzych. Lizozym jest enzymem szczególnie aktywnym wobec bakterii Gram-dodatnich, a zawarte w dostępnej literaturze informacje świadczą o wykorzystaniu go na coraz szerszą skalę w przemyśle spożywczym do utrwalania np. świeżej żywności pochodzenia morskiego, surowych warzyw i owoców, mięsa, wędlin i konserw mięsnych [4, 7, 8]. W przemyśle mleczar-

skim lizozym wprowadzany jest do mleka serowarskiego, przeciwdziała bowiem wzrostowi *Cl. tyrobutyricum* wywołującym późne wzdęcia serów twardych [1, 3, 12]. Wyniki badań wykonanych w Filii AR w Rzeszowie sugerują, że wzbogacenie surowego mleka koziego preparatem lizozymu przedłuża trwałość mleka, inaktywując część Gram-dodatniej mikroflory psychrofilnej (rodzaje bakterii o działaniu lipo- i proteolitycznym) [9]. O spadku liczby bakterii proteolitycznych i lipolitycznych w gęstwie serowej potraktowanej odpowiednią dawką tego enzymu donoszą też Kebarý i wsp. [6]. To samo doniesienie, jak też rezultaty przedstawione przez Kamalý'ego i wsp. [5] wskazują na to, że wprowadzenie lizozymu do surowców lub półproduktów mleczarskich może stymulować przemiany zachodzące w czasie dojrzewania serów podpuszczkowych, (wzrost zawartości rozpuszczalnego azotu, ilości niektórych wolnych aminokwasów i lotnych kwasów tłuszczowych). Informacje zawarte w literaturze sugerują też, że lizozym nie przeciwdziała wzrostowi bakterii kwasu mlekowego, nie zakłóca więc np. przebiegu dojrzewania serów [8, 12]. Nie są to jednak informacje jednoznaczne, tym bardziej, że i wśród tych bakterii znajdują się gatunki Gram-dodatnie.

Celem wykonanych badań było ustalenie, czy i w jakim stopniu wprowadzony do mleka koziego preparat lizozymu wpływa na kinetykę fermentacji mlekowej inicjującej i prowadzonej przez bakterie zakwasu jogurtowego i twarogowego.

Materialy i metody

Surowcem do otrzymania materiału doświadczalnego było mleko kozie pozyskiwane w prywatnym gospodarstwie rolnym zlokalizowanym w Tyczynie k/Rzeszowa. Mleko zdajano od zdrowych, nie leczonych antybiotykiem, kóz rasy białej polskiej uszlachetnionej, w wieku od 3 do 8 lat. Bezpośrednio po doju i schłodzeniu do temp. $+4^{\circ}\text{C}$ mleko przewożono do laboratorium, gdzie w skali mikrotechnicznej wytwarzano z niego ser twarogowy i jogurt.

Sposób przygotowania jogurtu:

- pasteryzacja mleka (podgrzanie do temp. 72°C),
- wprowadzenie do mleka roztworu lizozymu o stężeniu 2.5 % obj., który przygotowano z preparatu chlorku lizozymu – produktu belgijskiej firmy Belovo.

Mleko po pasteryzacji i wychłodzeniu do temp. ok. 45°C dzielono na trzy partie, z których do pierwszej (L_0) nie dodawano roztworu lizozymu, do drugiej (L_1) wprowadzano roztwór w ilości $1.6\text{ cm}^3/\text{dm}^3$ mleka ($40\text{ mg enzymu}/\text{dm}^3$), a do trzeciej (L_2) – $5.0\text{ cm}^3/\text{dm}^3$ mleka ($125\text{ mg enzymu}/\text{dm}^3$),

- zaszczepienie mleka zakwasem jogurtowym (*Str. thermophilus* + *Lb. bulgaricus*) sporządzonym z kultur bakteryjnych produkcji firmy „Biolacta-Textel”. W każdej

z trzech partii mleka (L_0 , L_1 , L_2) stosowano dwa warianty ilości zakwasu: 3 % (Z_1) i 6 % (Z_2),

- rozlew mleka do opakowań jednostkowych i termostatowanie w temp. 42°C przez 4 godziny.

Ser twarogowy sporządzano w następujący sposób:

- pasteryzacja mleka (podgrzanie do temp. 72°C) i wychłodzenie do temp. ok. 30°C,
- dodatek roztworu (2.5 obj.) chlorku lizozymu w czterech wersjach:
 - * $L_0 - 0$;
 - * $L_1 - 1.6 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$ mleka (40 mg enzymu/ dm^3);
 - * $L_2 - 3.0 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$ mleka (74 mg enzymu/ dm^3);
 - * $L_3 - 5.0 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$ mleka (125 mg enzymu/ dm^3);
- zaprawienie podpuszczką (7.0 mg/ dm^3 mleka) i zakwasem (2.0 cm^3/dm^3 mleka) sporządzonym z koncentratu bakteryjnego produkcji firmy „Biolacta-Textel” zawierającego: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremonis*, *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremonis*,
- ukwaszanie w temp. 26°C przez 20 godzin,
- obróbka skrzepu, prasowanie i wychłodzenie do temp. + 4°C.

W trakcie ukwaszania mleka (przy wyrobie obu produktów) dokonywano pomiarów zmian wartości pH (potencjometrycznie).

Za miarę obrazującą zmiany pH przyjęto formułę:

$$X_t = [\text{pH}_t - \text{pH}_1],$$

w której;

pH_t – wartość pH po upływie okresu „t” od chwili rozpoczęcia ukwaszania,

pH_1 – wartość pH w chwili rozpoczęcia ukwaszania.

Zarówno dla jogurtu, jak i twarogu cykl badań (produkcja wyrobu i jego ocena) powtórzono trzykrotnie.

Wyniki i dyskusja

Materiał liczbowy skompletowany w trakcie pomiarów wskazywał na trójfazowy przebieg zmian kwasowości czynnej. W fazie pierwszej przyrost bezwzględnych wartości pH był albo tak nieznaczny, że nieuchwytny przez zastosowaną metodę potencjometryczną (pierwsze dwie godziny ukwaszania zakwasem twarogowym), albo zdecydowanie powolniejszy, niż w fazie następnej (pierwsza godzina ukwaszania mleka zakwasem jogurtowym, trzecia godzina – przy wyrobie twarogu). Po zakończeniu tej fazy nastąpiło wyraźne przyspieszenie fermentacji mlekowej. Produkcja kwasu mle-

kowego była intensywniejsza, a zmiany wartości pH coraz szybsze. W drugiej i trzeciej godzinie produkcji jogurtu pH mleka obniżało się przeciętnie o 1.5 jednostki, a pomiędzy czwartą i ósmą godziną ukwaszania mleka na twaróg zmiany tego miernika wynosiły od 1.2 do 1.4 jednostki. W literaturze faza ta nosi nazwę niehamowanej fermentacji; bakterie kwasu mlekowego, mając zapewnioną optymalną temperaturę środowiska, nie napotykają też na inne bariery ograniczające ich procesy życiowe. Taki czynnik ograniczający pojawia się dopiero w postaci nadmiernego stężenia kwasu mlekowego zakwaszającego środowisko do poziomu, który nie sprzyja dalszemu wzrostowi komórek bakteryjnych [2]. W badanym materiale ujawniło się to w czwartej godzinie ukwaszania mikroflorą termofilną (zmiany pH średnio tylko o 0.1–0.2 jednostki) oraz pomiędzy dziesiątą i piętnastą godziną ukwaszenia zakwasem twarogowym (zmiany pH o 0.1–0.3 jednostki). Można więc przyjąć, że przyrost bezwzględnych wartości wykładnika jonów wodorowych przebiegał w trzech etapach: indukcji, niehamowanego ukwaszenia i hamowanego ukwaszenia – zgodnie z krzywą sigmoidalną prezentowaną za Roederem przez Budślawskiego [2]. Wykonane wcześniej badania własne również potwierdzają taki charakter zmian kwasowości miareczkowej i czynnej mleka koziego w efekcie działania bakterii kwasu mlekowego [9, 10].

Oszacowanie zmian wartości pH wykonano więc za pomocą modelu funkcji sigmoidalnej (logistycznej) o postaci [11]:

$$X_t = \frac{a}{1 + b \cdot e^{-k \cdot t}}$$

gdzie:

- a – wartość asymptoty górnej,
- b – współczynnik,
- e – podstawa logarytmu naturalnego,
- k – stała szybkości zmian X_t .

Obliczone funkcje pozwoliły na wyznaczenie następujących parametrów kinetycznych (tabela 1 i 2):

- k – stała szybkości, charakteryzująca przeciętną chwilową prędkość zmian badanej cechy w całym obszarze czasowym,
- t_i – okres indukcji, tzn. okres czasu, w którym zastosowana metoda pomiarowa nie jest zdolna do wykrycia zmian wartości badanej cechy (w pierwszym stadium pomiarów). W badaniach przyjęto, że okres indukcji kończy się z chwilą, gdy pH obniżyło się o 0.2 jednostki,
- V_{\max} – maksymalna szybkość zmian, którą można uznać za parametr opisujący intensywność działania mikroflory mlekowej przed osiągnięciem fazy spowalniania,

a – maksymalny przyrost miary albo „wysokość krzywej” jako wskaźnik proporcji oddziaływania – w fazie niehamowanego ukwaszania – czynników przyspieszających i opóźniających.

Tabela 1

Jogurt – wartości parametrów funkcji logistycznej i wyniki ich analizy wariancji

Wariant	Powt.	Parametr		
		\bar{k}	v_{\max}	a
L ₀ Z ₁	1	0.0305	0.163	2.17
	2	0.0328	0.153	2.39
	3	0.0255	0.160	2.28
L ₀ Z ₂	1	0.0324	0.189	2.00
	2	0.0350	0.157	2.30
	3	0.0275	0.165	2.20
	średnio	0.0306	0.164	2.22
L ₁ Z ₁	1	0.0275	0.132	1.91
	2	0.0297	0.137	2.17
	3	0.0253	0.135	2.05
L ₁ Z ₂	1	0.0280	0.142	1.78
	2	0.0298	0.142	2.17
	3	0.0262	0.144	2.00
	średnio	0.0277	0.139	2.01
L ₂ Z ₁	1	0.0240	0.125	1.92
	2	0.0270	0.097	1.78
	3	0.0217	0.106	1.88
L ₂ Z ₂	1	0.0260	0.129	1.85
	2	0.0270	0.134	1.90
	3	0.0275	0.125	1.90
	średnio	0.0255	0.119	1.87
Wartości testu F				
Lizozym		5.295*	34.491*	11.663*
Zakwas		1.790	8.807*	0.699
Interakcja		0.241	0.635	0.442

*wartość F statystycznie istotna przy poziomie $\alpha = 0.05$

Ponadto na podstawie uśrednionych wartości parametrów funkcji (a, b, k) wyznaczono krzywe obrazujące zmiany pH poszczególnych wersji materiału doświadczalnego (rysunek 1 i 2).

Wartości parametrów kinetycznych wykazują zróżnicowanie zarówno między-objektowe (pomiędzy poszczególnymi wersjami materiału doświadczalnego), jak i wewnątrzobjektowe (pomiędzy powtórzeniami). To drugie wynika z wpływu czynników niekontrolowanych. Należy tu zaliczyć te wszystkie elementy, które mogą mieć wpływ na intensywność procesu fermentacji mlekowej, np. liczba bakterii kwasu mle-

kowego, która pozostała w surowcu po pasteryzacji, obecność w nim naturalnych czynników immunizujących i bakteriostatycznych (w tym również – lizozymu), wreszcie – różnice w aktywności zakwasów. Ocena istotności zróżnicowania między-objektowego, a więc odpowiedź na pytanie, czy intensywność przemian fermentacyjnych zależy od lizozymu wprowadzonego do mleka, może być więc – na podstawie tych wartości liczbowych – tylko orientacyjna. Dlatego dla stwierdzenia wpływu wielkości dodatku lizozymu i dodatku zakwasu na szybkość procesu fermentacji mlekowej (na poziom obliczonych parametrów kinetycznych) wykonano analizę wariancji (jedno- lub dwuczynnikowej). Obliczone wartości testu F interpretowano przy założonym poziomie istotności $\alpha = 0.05$ (tabela 1 i 2).

Tabela 2

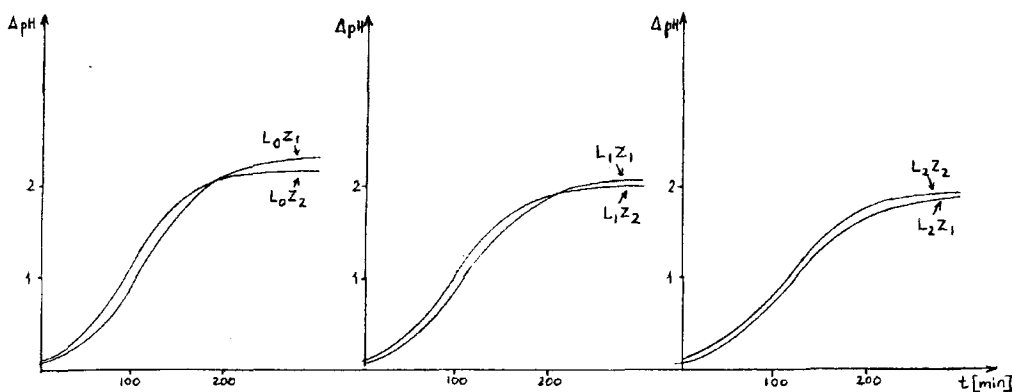
Twaróg – wartości parametrów funkcji logistycznej i wyniki ich analizy wariancji

Wariant	• Powt.	Parametr			
		\bar{k}	t_i	v_{max}	a
L ₀	1	0.562	2.0	0.31	2.23
	2	0.594	2.0	0.33	2.18
	3	0.530	2.5	0.30	2.30
	średnio	0.562	2.17	0.31	2.24
L ₁	1	0.669	3.5	0.36	2.19
	2	0.604	3.5	0.33	2.22
	3	0.699	3.5	0.38	2.16
	średnio	0.657	3.5	0.36	2.19
L ₂	1	0.651	3.5	0.34	2.14
	2	0.670	3.0	0.36	2.12
	3	0.620	3.5	0.33	2.20
	średnio	0.647	3.33	0.34	2.15
L ₃	1	0.667	3.5	0.36	2.17
	2	0.610	3.5	0.33	2.20
	3	0.688	3.5	0.38	2.14
	średnio	0.655	3.5	0.36	2.17
F		4.451*	29.833*	2.891	2.175

*wartość F statystycznie istotna przy poziomie $\alpha = 0.05$

Oddziaływanie lizozymu na przebieg fermentacji mlekowej prowadzonej przez termofilne bakterie jogurtowe było wyraźne, albowiem obliczone wartości F dla wszystkich badanych parametrów kinetycznych okazały się statystycznie istotne (tabela 1). Nie uwzględniono w tych obliczeniach okresu indukcji „ t_i ”, ponieważ byłyby one obciążone zbyt dużym błędem – po upływie 30 minut termostatowania zmiana pH była już dość znaczna (o ponad 0.2 jednostki). Przeciętna prędkość przemian prowadzących do wzrostu stężenia jonów wodorowych na przestrzeni całego

okresu wykonywania pomiarów (4.5 godziny) była odwrotnie proporcjonalna do ilości lizozymu wprowadzonego do mleka. W wariancie L_0 stała szybkości „k” była najwyższa i wynosiła średnio 0.0306, w wariancie L_1 była niższa o około 0.003, a dalsze zwiększenie ilości lizozymu (wariant L_2) spowodowało obniżenie wartości „k” o około 0.002. Wzbogacenie surowca w ten enzym wpływa więc na efektywność prowadzenia fermentacji przez *Str. thermophilus* i *Lb. bulgaricus*. Pośrednio świadczy to o podatności komórek tych bakterii, które usytuowane są w grupie bakterii Gram-dodatnich, na lityczne działanie chlorku lizozymu. Oddziaływanie to zaznaczyło się wyraźnie w drugiej fazie przemian – niehamowanego ukwaszenia. Wskazują na to wyniki analizy wariancyjnej wykonanej dla maksymalnej prędkości zmian – V_{max} – i dla parametru „a” charakteryzującego „wysokość” krzywej sigmoidalnej. Najwyższą szybkość maksymalną (po upływie 100–110 minut fermentacji) uzyskano w wariancie L_0 (średnio 0.16 jednostek pH/10 min), a najniższą – w wariancie L_2 (tylko około 0.12 jednostek pH/10 min). Wskazuje to na obniżenie aktywności zakwasu przez lizozym już w pierwszej części stadium niehamowanej fermentacji – przed uzyskaniem maksymalnej prędkości. Obrazuje to też nachylenie krzywych na rys. 1.

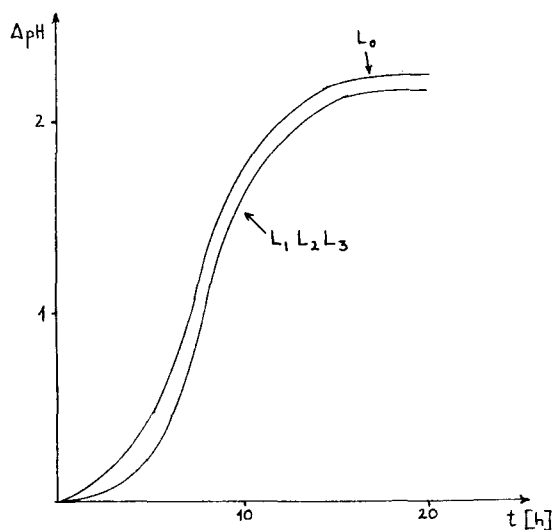


Rys. 1. Oszacowanie zmian pH mleka koziego z różnym dodatkiem lizozymu w czasie ukwaszania zakwasem jogurtowym.

Hamujące oddziaływanie lizozymu utrzymało się praktycznie do końca przemian, na co wskazują różnice pomiędzy wartościami parametru „a”. „Głębokość” zmian pH była najwyższa w wariancie L_0 (spadek pH o ponad 2.2 jednostki), a najniższa – znów w wariancie L_2 – o około 1.9 jednostki (rys. 1). Dodatek preparatu lizozymu do mleka koziego jako surowca do wyrobu jogurtu obniża zatem aktywność zakwasu jogurtowego i prędkość fermentacji, jednak nie zaburza w znaczącym stopniu procesu technologicznego. Należy się jedynie liczyć z tym, że lizozym nie pozwoli na uzyskanie wymaganego końcowego odczynu produktu. Zapobiec temu jednak można przez zaszcze-

pienie mleka większą ilością zakwasu. Wariant Z_2 pozwolił bowiem na wyraźne przyspieszenie fermentacji (tabela 1 – istotna statystycznie wartość F dla v_{\max}), co umożliwia uzyskanie prawidłowego pH na koniec okresu termostatowania.

W odmienny sposób lizozym wpływa na mezofilne bakterie zakwasu twarogowego (tabela 2, rys. 2). Wpływ ten ujawnił się tylko poprzez wydłużenie – o około 1.5 godziny okresu indukcji (statystycznie istotna wartość testu F). Należy więc sądzić, że enzym „pracuje” skutecznie przez pierwsze 4 godziny ukwaszania inaktywując część komórek bakteryjnych i – tym samym – wydłuża okres ich namnażania do ilości niezbędnej dla rozpoczęcia fermentacji. W następnym odcinku czasowym ilość lizozymu jest niewystarczająca do tego, by zakłócać przebieg przemian. Co więcej – statystycznie istotne wyższe wartości stałej szybkości dla wariantów L_1 , L_2 i L_3 oraz nieznacznie wyższe wartości prędkości maksymalnej w tych trzech wariantach sugerują, że wzbogacenie mleka w lizozym korzystnie wpływa na przebieg zmian w stadium niehamowanego ukwaszania. Na podstawie tych wyników można jedynie przypuszczać, że dodatek lizozymu spowodował „przy okazji” inaktywację komórek tych bakterii, które w określonych warunkach mogą konkurować z bakteriami kwasu mlekowego [12]. Należy też zwrócić uwagę na różnicę pomiędzy temperaturą, w której pracowały bakterie zakwasów. Efektywność litycznego oddziaływania lizozymu była wyraźniej zauważalna, co jest oczywiste, w temp. 42°C niż w temp. 26°C . Stąd – im niższa temperatura, w której przebiegają przemiany biochemiczne prowadzone przez Gram-dodatnie bakterie, tym lizozym w mniejszym stopniu będzie zaznaczał swoją obecność i wpływał na procesy technologiczne. Dlatego preparaty lizozymu, wprowadzone do



Rys. 2. Oszacowanie zmian pH mleka koziego z różnym dodatkiem lizozymu w czasie ukwaszania zakwasem twarogowym.

mleka serowarskiego, nie zakłócały dojrzewania serów, które prowadzi się w temperaturach niższych od 20°C [3, 12].

Wnioski

1. Preparat chlorku lizozymu wprowadzony do mleka koziego obniża intensywność ukwaszania tego mleka zakwasem zawierającym termofilne bakterie jogurtowe, jednak nie w takim stopniu, by istotnie zakłócać przebieg termostataowania jogurtu.
2. Wzbogacenie mleka koziego preparatem chlorku lizozymu wydłuża okres indukcji ukwaszania mleka zakwasem twarogowym sporządzonym z mezofilnych bakterii mlekowych. Nie utrudnia to jednak prowadzenia procesu produkcji twarogu kwasowo-podpuszczkowego.

LITERATURA

- [1] Bottazzi V. i in.: Clostridium spore germination and lysosyme action in Grana cheese. *Sci. e Tecn. Latt. – Casaria*, 1993, 2, s. 79, (FSTA, 1994, 4P94).
- [2] Budślawski J.: *Zarys chemii mleka*. PWRiL, Warszawa 1971.
- [3] Crapisi A. i in.: Enhanced microbial cell lysis by the use of lysosyme immobilized on different carriers. *Proces Biochem.* 1993, 1, s. 17.
- [4] Cunningham F.E. i in.: Egg-white lysosyme as a food preservative: an overview. *World's Poultry Sci. J.*, 1991, 2, s. 141.
- [5] Kamaly K.M. i in.: Properties of rennet gels of lysosyme-treated milks of different species. *Egypt. J. Dairy Sci.*, 1992, 2, s. 249.
- [6] Kebary K.M.K. i in.: Effect of lysosyme on the quality of Cephalotyre (RAS) cheese slurry. *Cult. Dairy Prod. J.*, 1992, 4, s. 13.
- [7] Kim Y.B. i in.: Effect of addition of lysosyme and sodium ultraphosphate on the shelf-life of pressed ham. *Korean J. Animal Sci.*, 1991, 2, s. 176, (FSTA, 1991, 12S78).
- [8] Leśniewski G., Kijowski J.: Aktywność enzymatyczna lizozymu i jej wykorzystanie do utrwalania żywności. *Przem. Spoż.*, 1995, 4, s. 116.
- [9] Pieczonka W., Burek E.: Trwałość surowego mleka koziego wzbogaconego w lizozym. *Przem. Spoż.*, 1994, 4, s. 112.
- [10] Pieczonka W.: Trwałość mleka koziego. *Konf. Nauk. PTT, Trzemeśnia 1988.*
- [11] Stokłosa K. i in.: *Kinetyka kwalitonomiczna*. AE, Kraków 1985.
- [12] Zalewski S.J., *Mikrobiologia żywności pochodzenia zwierzęcego*. WNT, Warszawa 1985.

THE INFLUENCE OF ADDITION OF LYSOSYME ON ACIDIFICATION OF GOAT MILK BY YOGHURT AND TVAROH STARTERS

S u m m a r y

The aim of experiments was a determination of influence of addition of lysosyme solution on the kinetics of goat milk's acidification by bacteria of yoghurt and tvaroh starter.

The lysosyme decreases intensity of lactic acid fermentation in goat milk led by thermophilic yoghurt bacteria, and – it elongates the period of acidification induction by tvaroh starter. ❖