

KATARZYNA SKRYPLONEK, MAŁGORZATA JASIŃSKA

## JAKOŚĆ FERMENTOWANYCH NAPOJÓW PROBIOTYCZNYCH OTRZYMANÝCH Z MROŻONEJ SERWATKI KWASOWEJ I MLEKA W CZASIE CHŁODNICZEGO PRZECHOWYWANIA

### Streszczenie

Serwatka stanowi produkt uboczny przemysłu mleczarskiego charakteryzujący się właściwościami odżywczymi oraz prozdrowotnymi, a niezagospodarowana stanowi zagrożenie dla środowiska. Stale zwiększająca się produkcja serów i – w konsekwencji – serwatki, zmusza do poszukiwania nowych sposobów wykorzystania serwatki, głównie w przemyśle spożywczym. Jedną z możliwości jest produkcja probiotycznych napojów fermentowanych z udziałem serwatki. Spośród szczepów probiotycznych do produkcji mlecznych napojów fermentowanych bardzo często wykorzystywane są bakterie *Lactobacillus acidophilus*. Celem pracy było określenie jakości fermentowanych napojów zawierających probiotyczny szczep *L. acidophilus* La-5, otrzymanych z rozmrożonej serwatki kwasowej połączonej z mlekiem w stosunku 1 : 1. Wyprodukowano 4 warianty napojów: bez dodatków funkcjonalnych, z dodatkiem oligofruktozy, z dodatkiem koncentratu białek serwatkowych WPC 35 oraz z dodatkiem oligofruktozy i WPC 35, które przechowywano w warunkach chłodniczych przez 14 dni. Po 1, 7 oraz 14 dniach przechowywania napoje poddano ocenie sensorycznej oraz określono ich kwasowość i zawartość aldehydu octowego, a także liczbę bakterii *L. acidophilus*. Stwierdzono, że wszystkie warianty napojów charakteryzowały się bardzo dobrym lub dobrym smakiem i zapachem, jednak ich wadą była wyraźna synergeza. W czasie przechowywania obserwowano zwiększenie kwasowości i zmniejszenie zawartości aldehydu octowego w ocenianych napojach probiotycznych. Liczba *L. acidophilus* przez cały okres przechowywania kształtowała się na wysokim poziomie, przekraczając znacznie rekomendowaną przez WHO liczbę bakterii –  $10^6$  jtk/cm<sup>3</sup> w produktach probiotycznych.

**Słowa kluczowe:** serwatka kwasowa, serwatka mrożona, napój probiotyczny, *Lactobacillus acidophilus*

## Wprowadzenie

Serwatka to produkt uboczny przemysłu mleczarskiego powstający w dużych ilościach głównie podczas produkcji serów podpuszczkowych oraz twarogowych. Objętość serwatki stanowi  $85 \div 90$  % objętości mleka użytego w procesie produkcji. Serwatka składa się w ok. 93 % z wody, a zawiera ok. 55 % składników suchej masy mleka. Głównym składnikiem suchej masy serwatki jest laktoza, która w ok. 96 % przechodzi z mleka do serwatki. Zawartość białek w serwatce wynosi ok. 1 %, przy czym są to głównie białka serwatkowe charakteryzujące się wysoką wartością odżywczą oraz właściwościami prozdrowotnymi. Serwatka zawiera ponadto znaczne ilości związków mineralnych, w tym głównie wapnia i fosforu, a także witaminy z grupy B. Dodatkowo wywiera ona korzystny wpływ na funkcjonowanie organizmu m.in. poprzez działanie przeciwdrobnoustrojowe, zapobieganie rozwojowi osteoporozy, przeciwdziałanie niektórym nowotworom oraz wspomaganie odchudzania [10, 17].

Przetwórstwo serwatki polega w głównej mierze na stosowaniu procesów membranowych, takich jak: odwrócona osmoza, nanofiltracja i ultrafiltracja oraz procesów suszenia w celu otrzymania koncentratów oraz izolatów białek serwatkowych, a także serwatki w proszku, znajdujących zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu spożywczego. Produkty te otrzymywane są przede wszystkim z tzw. serwatki słodkiej, powstającej podczas produkcji serów podpuszczkowych [24]. Zagospodarowanie serwatki kwasowej, będącej produktem ubocznym przy produkcji twarogów, jest znacznie utrudnione ze względu na jej niskie pH ( $<5$ ) [2]. Zainteresowanie wykorzystaniem płynnej serwatki do produkcji żywności jest niewielkie. Stosuje się ją przede wszystkim do wytwarzania serów serwatkowych, takich jak włoska ricotta. Na rynku krajowym brakuje natomiast napojów z serwatki.

Wzrastający popyt na mleczne napoje fermentowane oraz zwiększające się zainteresowanie żywnością funkcjonalną sprawia, że pożądanym kierunkiem przetwórstwa serwatki może być jej wykorzystanie do produkcji probiotycznych napojów fermentowanych, w tym napojów zawierających szczepy bakterii *Lactobacillus acidophilus* [11]. Proces fermentacji wpłynie na zwiększenie walorów serwatki poprzez zmniejszenie zawartości laktozy oraz zmniejszenie alergenicności białek serwatkowych. Zastosowanie w procesie fermentacji szczepów bakterii probiotycznych umożliwiłoby uzyskanie produktu o cechach żywności funkcjonalnej.

Celem pracy było określenie wybranych cech jakościowych fermentowanych napojów probiotycznych otrzymanych z rozmrożonej serwatki kwasowej i mleka w czasie chłodniczego przechowywania.

## Material i metody badań

Przedmiotem badań były napoje wytworzone z serwatki kwasowej zamrożonej, a następnie rozmrożonej i mleka, poddane fermentacji mlekowej z udziałem szczepionki bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* La-5 firmy Chr. Hansen (Dania). Kulturę typu DVS uaktywniano poprzez rozprowadzenie 0,6 g liofilizowanej kultury w 1000 ml sterylizowanego odtłuszczonego mleka (firmy Paturages, Belgia) i inkubację w temp. 42 °C przez 4 h, do momentu otrzymania skrzepu.

Serwatka kwasowa pochodziła z przemysłowej produkcji twarogu półtłustego i otrzymano ją z jednego z zakładów mleczarskich z okolic Szczecina. Serwatkę pozyskano bezpośrednio z linii produkcyjnej, a następnie przetransportowano w warunkach chłodniczych do Zakładu Technologii Mleczarskiej i Przechowalnictwa Żywności Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Bezpośrednio po przewiezieniu serwatkę poddano procesowi pasteryzacji w temp. 72 °C przez 10 min. Następnie serwatkę schładzano, zamrażano oraz przechowywano w temp.  $-18 \pm 1$  °C przez 3 tygodnie. W przeddzień produkcji napojów serwatkę rozmrażano poprzez 18-godzinne przetrzymanie w szafie chłodniczej w temp.  $5 \pm 1$  °C. W serwatce kwasowej po rozmrożeniu oznaczano kwasowość potencjalną w °SH [8], kwasowości czynną za pomocą pehametru, gęstość – metodą areometryczną z wykorzystaniem laktodensymetru [8] oraz zawartość suchej masy – metodą odwoławczą poprzez suszenie serwatki na zwiniętych paskach bibuły do sączenia. Gęstość serwatki wynosiła  $1,026 \text{ g/cm}^3$ , zawartość suchej masy – 5,77 %, kwasowość potencjalna (miareczkowa) – 26,3 °SH, natomiast kwasowość czynna (pH) – 4,45.

W ramach doświadczenia przygotowano w warunkach laboratoryjnych 4 partie napojów fermentowanych metodą termostatową. Rozmrożoną serwatkę łączono w proporcji 1 : 1 z mlekiem UHT, firmy Paturages (Belgia), o zawartości 3,2 % tłuszczu, 4,6 % laktozy i 3 % białka (zgodnie z deklaracją producenta). Wybór mleka UHT wynikał z jego większej czystości mikrobiologicznej w porównaniu z mlekiem pasteryzowanym. Wzbogacenie serwatki w mleko miało na celu zwiększenie zawartości suchej masy oraz nadanie napojom cech mlecznych napojów fermentowanych. Jak podają Bulatović i wsp. [3], dodatek mleka do serwatki zwiększa przeżywalność bakterii probiotycznych w produkcji. Otrzymaną mieszaninę podgrzewano do temp. 42 °C, a następnie dzielono na 4 części. W pierwszej partii napoju (N) nie zastosowano żadnego dodatku. Do drugiej partii (NO) dodano 2 % (m/v) prebiotyku oligofruktozy ORAFI P95, firmy Hortimex (Polska). W przypadku trzeciej partii napoju (NW) zastosowano 1-procentowy dodatek koncentratu białek serwatkowych WPC 35, firmy Spomlek (Polska), o zawartości ok. 35 % białek. Ostatni wariant napoju (NOW) wzbogacono w 2-procentowy dodatek oligofruktozy oraz 1-procentowy – WPC 35. Każdy z wariantów napoju zaszczepiano poprzez dodatek 5 % (v/v) zakwasu otrzymanego w wyniku wcześniejszego uaktywnienia szczepionki probiotycznej. Po dokładnym

wymieszaniu napoje rozlewano po ok. 50 ml do pojemników jednostkowych z tworzywa sztucznego PE-LD o pojemności 80 ml, przykrywano folią aluminiową i poddawano inkubacji w temp. 42 °C przez 4 h do momentu otrzymania skrzepu. Czas ukwaszania był taki sam dla wszystkich wariantów fermentowanego napoju. Pomimo że optymalna temperatura wzrostu bakterii *L. acidophilus* zawiera się w zakresie 35 ÷ 40 °C [9], zdecydowano się, na podstawie wcześniejszych badań, na zastosowanie wyższej temperatury, która nie przekraczała jednak maksymalnej temperatury wzrostu wynoszącej 42 °C [9]. Jak podają Bulatović i wsp. [3], podniesienie temperatury inkubacji pozwala na zmniejszenie czasu fermentacji i otrzymanie produktu o niższej kwasowości [3]. Kwasowość produktu jest natomiast czynnikiem wpływającym na przeżywalność *L. acidophilus*, która najbardziej wzrasta w środowisku o pH 6,4 ÷ 4,5 [25]. Otrzymane w ten sposób próby doświadczalne schładzano i przechowywano w warunkach chłodniczych w temp. 5 ± 1°C przez 14 dni. Próbkę do analiz pobierano po 1, 7 oraz 14 dniach przechowywania.

Otrzymane probiotyczne napoje serwatkowe oceniano sensorycznie, oznaczano w nich wybrane wskaźniki fizykochemiczne oraz poddawano je analizie mikrobiologicznej. Punktową ocenę sensoryczną napojów przeprowadziła przeszkolona 6-osobowa grupa oceniających, w pomieszczeniu przystosowanym do analiz sensorycznych, zgodnie z wytycznymi podanymi w literaturze i normie [1, 23]. Określano wygląd, smak, zapach i konsystencję napojów według skali 5-punktowej rozszerzonej o oceny połówkowe. Nota 5 oznaczała bardzo dobrą jakość danego wyróżnika, a nota 1 – złą. Określano także ogólną jakość sensoryczną napojów w skali od 1 do 5, którą obliczano sumując poszczególne wyróżniki oceny sensorycznej pomnożone przez współczynniki ważkości. Współczynniki ważkości przyjęte dla poszczególnych cech to: wygląd – 0,15, smak i zapach – po 0,30, konsystencja – 0,25 [21]. Analiza właściwości fizykochemicznych napojów obejmowała: pomiar kwasowości potencjalnej (miareczkowej), wyrażanej w stopniach Soxhleta-Henkla (°SH) [8], pomiar kwasowości czynnej (pH) przy użyciu pehametru, model pHep HI 98128 (Hanna Instruments, Włochy), zgodnie z instrukcją producenta, oznaczenie zawartości aldehydu octowego metodą dyfuzyjną z chlorowodorkiem hydrazonu w naczynkach Conwaya [15] oraz oznaczenie zawartości suchej masy metodą techniczną, poprzez suszenie w 130 °C przez 30 min [8]. Analiza mikrobiologiczna polegała na oznaczeniu liczby bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* w 1 ml napoju. Przygotowane zgodnie z wytycznymi Polskiej Normy [22] rozcieńczenia dziesiętne napojów posiewano na podłoże MRS Agar (firma BTL, Polska). Posiewy wykonywano metodą płytek lanych z nawarstwieniem dodatkową warstwą podłoża w celu uzyskania warunków mikroaerofilnych. Tak przygotowane posiewy inkubowano w temp. 37 °C przez 72 h [6].

Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach, a uzyskane wyniki porównano statystycznie testem t-Studenta na poziomie istotności  $p = 0,05$  przy użyciu programu Microsoft Excel 2007.

## Wyniki i dyskusja

Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowane dodatki oraz czas chłodniczego przechowywania w zróżnicowany sposób wpływały na zawartość mikroflory oraz właściwości fizykochemiczne badanych napojów probiotycznych.

### *Właściwości sensoryczne*

Wszystkie warianty probiotycznych napojów serwatkowych miały zbliżone cechy sensoryczne. Wyniki punktowej oceny sensorycznej przedstawiono w tab. 1. Każdy z wariantów charakteryzował się bardzo wyraźnym podciekiem serwatki, wynoszącym do 1/3 objętości próbki. Wada ta wpływała na niską ocenę wyglądu napojów. Nie zaobserwowano wpływu dodatku oligofruktozy oraz koncentratu białek serwatkowych na wielkość synerезy. Konsystencja wszystkich wariantów napojów określona została jako mało zwarta i półpłynna. Wygląd i konsystencja napojów praktycznie nie uległy zmianom w czasie przechowywania i wyróżniki te oceniono podobnie po 1, 7 oraz 14 dniach doświadczenia. Smak i zapach napojów były czyste, orzeźwiające, łączyły odczucia charakterystyczne dla serwatki i mleka fermentowanego. W przypadku prób wzbogaconych w oligofruktozę wyczuwalny był posmak słodki, charakterystyczny dla tego składnika. Wraz z wydłużającym się okresem przechowywania zwiększała się intensywność kwaśnego smaku i zapachu napojów. Określono także ogólną jakość sensoryczną napojów, na którą w największym stopniu wpływały oceny za smak i zapach, a w najmniejszym ocena wyglądu [21]. Najwyższą jakością sensoryczną w całym okresie przechowywania charakteryzował się napój zawierający oba dodatki funkcjonalne, a najniższą – napój bez dodatków. Jakość sensoryczna wszystkich wariantów napoju ulegała obniżeniu w czasie przechowywania.

Dla konsumenta najważniejszym wskaźnikiem jakości produktu fermentowanego są jego właściwości sensoryczne. Istotne jest jednak nie tylko osiągnięcie pożądanых cech sensorycznych, ale także ich stabilność w czasie chłodniczego przechowywania produktu [4]. Tę stabilność uzyskano w otrzymanych napojach. Najwyżej ocenianymi wyróżnikami jakości sensorycznej były smak i zapach produktów, którym w początkowym okresie przechowywania przypisano oceny bardzo dobre, a w końcowym oceny dobre. Jak podają Kołczak i Kupiec [12], to właśnie te wyróżniki są czynnikami najistotniejszymi dla konsumenta.

Tabela 1. Wyniki oceny sensorycznej napojów probiotycznych w czasie chłodniczego przechowywania  
 Table 1. Results of sensory assessment of probiotic beverages during refrigerated storage

Wyróżniki jakościowe Quality factors	Czas przechowywania [dni]/ Storage time [days]											
	1				7				14			
	N	NO	NW	NOW	N	NO	NW	NOW	N	NO	NW	NOW
Wygląd Appearance	1,7	1,8	2,1	2,2	1,7	1,7	2,1	2,2	1,7	1,8	2	2,1
Smak / Taste	4,9	5 <sup>1</sup>	4,8	5 <sup>1</sup>	4,3	4,9 <sup>1</sup>	4,5	5 <sup>1</sup>	3,9	4,2 <sup>1</sup>	4	4,2 <sup>1</sup>
Zapach / Smell	5	5	5	5	5	4,9	4,6	4,9	4,5	4,1	4	4,2
Konsystencja Consistency	3	3	3,2	3,3	2,8	3	3,2	3,2	2,7	2,7	3,1	3,2
Ogólna jakość sensoryczna Overall sensory quality	3,98	4,02	4,06	4,16	3,75	3,95	3,85	4,10	3,45	3,44	3,48	3,64

Objaśnienia / Explanatory notes:

N – napój bez dodatków funkcjonalnych / beverage without functional additives; NO – napój z dodatkiem oligofruktozy / beverage with oligofructose added; NW – napój z dodatkiem WPC 35 / beverage with WPC 35 added; NOW – napój z dodatkiem oligofruktozy i WPC 35 / beverage with oligofructose and WPC 35 added; 1 – smak słodkawy / slightly sweet taste.

### Właściwości fizykochemiczne

Zawartość aldehydu octowego, czyli jednego z głównych związków kształtujących aromat mlecznych napojów fermentowanych [13] kształtowała się na niskim poziomie  $0,175 \div 0,529 \text{ mg/dm}^3$  w całym okresie trwania doświadczenia (tab. 2). Najwięcej tego związku w czasie 14 dni przechowywania było w napoju probiotycznym bez dodatków (wariant N). Jednak stwierdzone różnice pod względem zawartości aldehydu octowego w poszczególnych napojach były statystycznie nieistotne ( $p = 0,05$ ) – tab. 3. Wszystkie próbki charakteryzowały się znacznym zmniejszeniem zawartości aldehydu octowego w czasie przechowywania, przy czym największy ubytek tego związku wystąpił w napoju NOW – o 64 % pomiędzy 1. a 14. dniem doświadczenia, a najmniejszy w przypadku napoju N – o 38 % w tym samym czasie.

Zawartość aldehydu octowego w mlecznych napojach fermentowanych jest zróżnicowana i w jogurtach może wynosić nawet  $10 \div 15 \text{ mg/dm}^3$  [16], a próg jego wyczuwalności przez zmysł węchu człowieka wynosi  $0,415 \text{ mg/dm}^3$  [14]. Substratem do produkcji aldehydu octowego przez bakterie fermentacji mlekowej są: laktoza i inne sacharydy, a także związki azotowe, w tym aminokwas treonina. Mała zawartość aldehydu octowego w badanych napojach może wynikać z mniejszych zdolności bakterii *Lactobacillus acidophilus* do wytwarzania związków lotnych w porównaniu z kulturą

jogurtową [26]. Znacznie mniejsza zawartość aldehydu octowego od przytoczonego zakresu została stwierdzona także w jogurcie z mleka krowiego [20] oraz w napojach fermentowanych z mleka koziego w czasie chłodniczego przechowywania [18, 19].

Kolejnym wyznacznikiem jakości napojów była kwasowość potencjalna (miareczkowa) oraz kwasowość czynna (pH). Kwasowość miareczkowa kształtowała się na poziomie  $25,1 \div 31,3$  °SH (tab. 2). Najniższą kwasowość miareczkową w całym okresie trwania doświadczenia oznaczono w napojach wariantu N (bez dodatków funkcjonalnych), najwyższą po 1 i 7 dniach badań – w napojach wariantu NOW (z dodatkiem oligofruktozy i koncentratu białek serwatkowych), a po 14 dniach przechowywania – w napojach wariantu NW (z dodatkiem koncentratu białek serwatkowych), co wynika również ze zwiększenia zawartości białek w tym wariantcie napoju. Pod względem kwasowości miareczkowej, napój bez dodatków różnił się statystycznie istotnie ( $p = 0,05$ ) od napojów NW oraz NOW (tab. 3). W przypadku napoju bez dodatków funkcjonalnych oraz napoju z dodatkiem oligofruktozy kwasowość miareczkowa wzrastała w całym okresie przechowywania odpowiednio o 19 i 23 %. W napojach NW i NOW obserwowano wzrost wartości tego wskaźnika pomiędzy 1. a 7. dniem oraz nieznaczne obniżenie pomiędzy 7. a 14. dniem przechowywania. Sumaryczny wzrost kwasowości pomiędzy pierwszym a ostatnim pomiarem wynosił w tych napojach odpowiednio: 17 i 15 %. Mniejszy wzrost kwasowości w tych napojach może wynikać z buforującego działania dodanych białek serwatkowych [11]. Dodatek oligofruktozy należącej do fruktooligosacharydów nie wpływał istotnie na kwasowość miareczkową napojów. Brak wpływu inuliny należącej również do fruktooligosacharydów, jednak o wyższym stopniu polimeryzacji niż oligofruktoza, na kwasowość fermentowanej serwatki stwierdzili także Drgalić i wsp. [6].

Kwasowość czynna napojów wzrastała we wszystkich ocenianych próbkach w całym okresie przechowywania, co wyrażało się obniżeniem wartości pH. Po pierwszym dniu przechowywania wartość pH kształtowała się na poziomie  $4,82 \div 4,88$ , po 7 dniach – na poziomie  $4,49 \div 4,57$ , a po 14-dniowym przechowywaniu wartość pH była najniższa i wynosiła  $4,40 \div 4,45$ . Statystycznie istotna różnica kwasowości czynnej wystąpiła jedynie pomiędzy napojem NO a napojem NW. Po 14 dniach przechowywania najwyższe wartości pH oznaczono w napojach wzbogaconych w koncentrat białek serwatkowych, co może wynikać z ich właściwości buforujących.

Podobne zjawisko wzrostu kwasowości w czasie przechowywania biojogurtów zawierających *L. acidophilus* stwierdzili Shah i wsp. [25]. Wzrost kwasowości mógł być spowodowany dalszą aktywnością bakterii fermentacji mlekowej mimo ograniczenia temperatury chłodniczej. Aktywność kwaszącą bakterii *L. acidophilus* w czasie chłodniczego przechowywania napojów na bazie serwatki podpuszczkowej i mleka zaobserwowali także Castro i wsp. [5]. Tendencję do wzrostu kwasowości miareczkowej oraz kwasowości czynnej w napojach z rekonstruowanej serwatki podpuszczko-

wej ukwaszonej przez szczep *L. acidophilus* La-5 stwierdzili Drgalić i wsp. [6], a Shah i wsp. [25] wykazali obniżenie wartości pH jogurtów zawierających bakterie *L. acidophilus* podczas przechowywania.

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne oraz liczba bakterii probiotycznych w fermentowanych napojach serwatkowych w czasie chłodniczego przechowywania

Table 2. Physicochemical properties and count of probiotic bacteria in fermented whey beverages during refrigerated storage

Warianty doświadczalne Experimental variants	Czas przechowywania [dni] / Storage period [days]		
	1	7	14
Zawartość aldehydu octowego [mg/dm <sup>3</sup> ] / Content of acetaldehyde [mg/dm <sup>3</sup> ]			
N	0,529 ± 0,01	0,479 ± 0,03	0,326 ± 0,00
NO	0,513 ± 0,04	0,387 ± 0,02	0,249 ± 0,03
NW	0,488 ± 0,03	0,392 ± 0,01	0,205 ± 0,02
NOW	0,491 ± 0,03	0,299 ± 0,02	0,175 ± 0,01
Różnice istotne stat.*	Brak różnic/ no differences		
Kwasowość miareczkowa [°SH] / Titratable acidity [°SH]			
N	25,1 ± 0,23	29,6 ± 0,00	30,0 ± 0,40
NO	25,3 ± 0,46	29,7 ± 0,23	31,2 ± 0,00
NW	26,5 ± 0,23	31,3 ± 0,23	31,1 ± 0,23
NOW	26,8 ± 0,00	31,3 ± 0,23	30,8 ± 0,00
Różnice istotne stat.*	N:NW, N:NOW		
Kwasowość czynna [pH] / Active acidity [pH]			
N	4,88 ± 0,04	4,54 ± 0,04	4,40 ± 0,01
NO	4,83 ± 0,01	4,49 ± 0,04	4,40 ± 0,01
NW	4,88 ± 0,03	4,57 ± 0,04	4,44 ± 0,01
NOW	4,82 ± 0,01	4,54 ± 0,04	4,45 ± 0,01
Różnice istotne stat.*	NO:NW		
Zawartość suchej masy [%] / Dry matter content [%]			
N	8,46 ± 0,01	8,60 ± 0,22	8,39 ± 0,08
NO	9,93 ± 0,33	10,21 ± 0,10	9,84 ± 0,18
NW	9,44 ± 0,11	9,21 ± 0,09	9,15 ± 0,10
NOW	10,94 ± 0,07	10,90 ± 0,15	10,71 ± 0,16
Różnice istotne stat.*	Wszystkie napoje różnią się między sobą / All beverages differ		
Liczba komórek <i>L. acidophilus</i> [log jtk/ml] / Count of cells of <i>L. acidophilus</i> [log jtk/ml]			
N	8,39 ± 0,09	8,45 ± 0,16	8,38 ± 0,01
NO	8,36 ± 0,08	8,36 ± 0,12	8,24 ± 0,15
NW	8,38 ± 0,22	8,41 ± 0,30	8,37 ± 0,28
NOW	8,46 ± 0,17	8,45 ± 0,15	8,44 ± 0,28
Różnice stat. istotne *	NO: NOW		

Objaśnienia / Explanatory notes:

N, NO, NW, NOW – objaśnienia symboli jak w tab. 1. / explanations of symbols as in Tab. 1. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; \* – poziom istotności p = 0,05 / level of significance p = 0.05.



Tabela 3. Wyniki porównań parami właściwości fizykochemicznych oraz liczby bakterii probiotycznych w napojach  
 Table 3. Results of pairwise comparisons of physicochemical properties and counts of probiotic bacteria in beverages

Warianty doświadczalne Experimental variants	NO	NW	NOW
Zawartość aldehydu octowego / Content of acetaldehyde			
N	t = 2,5559 p = 0,1250 (-)	t = 3,5806 p = 0,0699 (-)	t = 2,8395 p = 0,1049 (-)
NO	-	t = 1,0739 p = 0,3952 (-)	t = 3,2009 p = 0,0853 (-)
NW	-	-	t = 1,4204 p = 0,2913 (-)
Kwasowość miareczkowa / Titratable acidity			
N	t = 1,4237 p = 0,2905 (-)	t = 8,0829 p = 0,015 (+)	t = 4,6667 p = 0,043 (+)
NO	-	t = 1,7538 p = 0,2215 (-)	t = 1,3832 p = 0,3008 (-)
NW	-	-	t = 0 p = 1 (-)
pH / pH			
N	t = 2 p = 0,1835 (-)	t = 1,9414 p = 0,1917 (-)	t = 0,1048 p = 0,9261 (-)
NO	-	t = 4,715 p = 0,0422 (+)	t = 1,5 p = 0,2724 (-)
NW	-	-	t = 1,3152 p = 0,3190 (-)
Zawartość suchej masy / Dry matter content			
N	t = 30,0007 p = 1,1092 E-3 (+)	t = 7,2905 p = 0,0183 (+)	t = 41,5496 p = 5,7875 E-4 (+)
NO	-	t = 4,8979 p = 0,0392 (+)	t = 9,2496 p = 0,0115 (+)
NW	-	-	t = 28,2358 p = 1,2519 E-3 (+)
Liczba komórek <i>L. acidophilus</i> / Count of cells of <i>L. acidophilus</i>			
N	t = 2,4763 p = 0,1316 (-)	t = 1,796 p = 0,2143 (-)	t = 1,9964 p = 0,1840 (-)
NO	-	t = 1,857 p = 0,2044 (-)	t = 4,5864 p = 0,0444 (+)
NW	-	-	t = 4,1711 p = 0,0529 (-)

Objaśnienia / Explanatory notes:

N, NO, NW, NOW – objaśnienia symboli jak w tab. 1. / Explanations of symbols as in Tab. 1;

t – wartości statystyki testowej t / values of t parameter; p – poziomy istotności / significance level; (+) – różnice statystycznie istotne (p = 0,05) / statistically significant differences (p = 0.05); (-) – różnice statystycznie nieistotne (p = 0,05) / statistically insignificant differences (p = 0.05).

Ostatnim badanym wskaźnikiem fizykochemicznym napojów była zawartość suchej masy. Najmniej suchej masy zawierał napój bez dodatków funkcjonalnych – średnio 8,48 %, następnie napój z koncentratem białek serwatkowych – 9,27 %, napój z oligofruktozą – 9,99 %, a najwięcej suchej masy miał napój wzbogacony w oba dodatki – 10,85 %. Zawartość suchej masy w napojach nie ulegała zmianom w czasie ich chłodniczego przechowywania. Wszystkie warianty napojów różniły się między sobą statystycznie istotnie ( $p = 0,05$ ) pod względem tego wskaźnika (tab. 3).

#### *Przeżywalność bakterii probiotycznych*

Ważnym wskaźnikiem jakości napojów fermentowanych zawierających probiotyczne szczepy bakterii kwasu mlekowego jest określenie liczby tych bakterii w 1 ml produktu, w całym okresie jego przydatności do spożycia. Zgodnie z wytycznymi FAO/WHO [7] minimalna liczba bakterii probiotycznych w produkcie gwarantująca osiągnięcie efektu terapeutycznego wynosi 6 log jtk/ml. Zawartość żywych komórek bakterii probiotycznych w badanych napojach w całym 14-dniowym okresie przechowywania nie wykazywała istotnych wahań i kształtowała się na poziomie  $8,24 \div 8,46$  log jtk/ml (tab. 2). Oznacza to, że otrzymane napoje spełniły kryterium stawiane produktom probiotycznym i mogą być do nich zaliczone.

Pod względem wpływu dodatków wprowadzonych do napojów wykazano, że jednoczesny dodatek oligofruktozy oraz WPC 35 wpłynął na istotne zwiększenie liczby bakterii probiotycznych w stosunku do wariantu z samą oligofruktozą. Najwyższa liczba bakterii La-5 w napoju wariantu NOW dowodzi, że wprowadzenie białek serwatkowych wpłynęło pozytywnie na przeżywalność bakterii poprzez stabilizację kwasowości i zwiększenie zawartości związków azotowych. Dodatek samej oligofruktozy nie spowodował wzrostu przeżywalności oznaczanego szczepu bakterii w napojach serwatkowych. Drgalić i wsp. [6] stwierdzili taką samą zależność w przypadku dodatku inuliny, która nie miała istotnego wpływu na zawartość bakterii La-5 w fermentowanej serwatce, przechowywanej w warunkach chłodniczych. Zawartość bakterii w serwatce bez dodatku inuliny oraz z jej dodatkiem kształtowała się w początkowych 14 dniach przechowywania na poziomie  $7,5 \div 8$  log jtk/ml, a więc była zbliżona do wyników uzyskanych w niniejszych badaniach. Shah i wsp. [25] analizowali przeżywalność bakterii *L. acidophilus* w komercyjnych biojogurtach przechowywanych przez 5 tygodni i wykazali, że liczba bakterii kształtowała się w różnych produktach w zakresie  $5 \div 8$  log jtk/ml i ulegała nieznacznemu zmniejszeniu w początkowych 14 dniach przechowywania. W uzyskanych przez Mituniewicz-Małek i wsp. [18] biojogurtach z mleka koziego zawartość bakterii z rodzaju *Lactobacillus* sp. podczas 3-tygodniowego przechowywania wynosiła  $7,2 \div 7,9$  log jtk/ml i podobnie jak w przypadku niniejszych napojów nie ulegała obniżeniu w czasie przechowywania. Należy podkreślić, że liczba bakterii probiotycznych zarówno w wytworzonych z mleka jogur-

tach, jak i w otrzymanych na bazie serwatki połączonej z mlekiem napojach z niniejszego doświadczenia oraz w fermentowanej serwatce kształtowała się na podobnym poziomie. Potwierdza to stwierdzenie Castro i wsp. [5], że zastąpienie mleka serwatką w napojach fermentowanych nie powoduje zmniejszenia przeżywalności bakterii probiotycznych.

### Wnioski

1. Fermentowane probiotyczne napoje na bazie mrożonej serwatki kwasowej zostały wysoko ocenione pod względem smaku i zapachu. Ich wadą była półpłynna konsystencja oraz wyraźna synereza.
2. W okresie przechowywania w fermentowanych napojach probiotycznych obserwowano wzrost kwasowości oraz zmniejszenie zawartości aldehydu octowego.
3. Liczba komórek bakterii probiotycznych w napojach w okresie trwania badań (14 dni) przekraczała 8 log jtk/ml i była wyższa od minimalnej dawki terapeutycznej rekomendowanej dla produktów probiotycznych.
4. Napój na bazie serwatki kwasowej i mleka jest dobrym środowiskiem zapewniającym przeżywalność bakterii *Lactobacillus acidophilus* i może być uznany za nowy wyrób probiotyczny.

### Literatura

- [1] Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I.: Sensoryczne badania żywności. Podstawy. Metody. Zastosowania. Wyd. II. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2014.
- [2] Bednarski W.: Doskonalenie technologii oraz organizacji przetwarzania serwatki w Polsce. Przem. Spoż., 2001, **2**, 32-34.
- [3] Bulatović M.L., Krupić T.Ž., Vukašinić-Skulić M.S., Zarić D.B., Rakin M.B.: Quality attributes of a fermented whey-based beverage enriched with milk and a probiotic strain. Roy. Soc. Ch., 2014, **4**, 55503-55510.
- [4] Bulatović M.L., Rakin M.B., Mojović L.V., Nikolić S.B., Vukašinić-Skulić M.S., Đukić Vuković A.P.: Improvement of production performance of functional fermented whey-based beverage. Chem. Ind. Chem. Eng. Q., 2014, **20** (1), 1-8.
- [5] Castro W.F., Gruz A.G., Bisinotto M.S., Guerreiro L.M.R., Faria J.A.F., Bogini H.M.A., Cucha R.L., Deliza R.: Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. J. Dairy Sci., 2013, **96**, 16-25.
- [6] Drgalić I., Tratnik L., Božanić R.: Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. Lait, 2005, **85**, 171-179.
- [7] FAO/WHO: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001.
- [8] Gawel J., Molska I.: Analiza techniczna w przetwórstwie mleczarskim. WSiP, Warszawa 1990
- [9] Gomes A.M.P., Malacata F.X.: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci. Technol., 1999, **10**, 139-157.

- [10] Ha E., Zemel M.B.: Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people (Review). *J. Nutr. Biochem.*, 2003, **14**, 251-258.
- [11] Kailasapathy K., Chin J.: Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol. Cell Biol.*, 2000, **78**, 80-88.
- [12] Kołczak T., Kupiec B.E.: Analiza sensoryczna w opracowywaniu nowych produktów spożywczych. *Przem. Spoż.*, 2004, **1**, 32-37.
- [13] Kornacki K.: Mikrobiologia mleka i jego przetworów. W: *Mleczarstwo. Tom I. Red. S. Ziajka. Wyd. UWM, Olsztyn 2008*, ss. 152-204.
- [14] Lees G.J., Jago G.R.: Role of acetaldehyde in metabolism: A review 2: The metabolism of acetaldehyde in cultured dairy products. *J. Dairy Sci.*, 1978, **61** (9), 1216-1224.
- [15] Less G.J., Jago G.R.: Methods for the estimation of acetaldehyde in cultured dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.*, 1969, **24**, 181-185.
- [16] Libudzisz Z.: Tworzenie związków aromatu przez bakterie fermentacji mlekowej. W: *Bakterie fermentacji mlekowej. Klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie. Red. Z. Libudzisz, P. Walczak, J. Bardowski. Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź 1998*, ss. 110-122
- [17] Madureira A.R., Pereira C.I., Gomes A.M.P., Pintado M.E., Malcata F.X.: Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res. Int.*, 2007, **40**, 1197-1211.
- [18] Mituniewicz-Małek A., Dmytrów I., Balejko J., Ziarno M.: Komercyjne kultury probiotyczne *Lactobacillus* sp. (*Lb. plantarum*, *casei* i *Lb. acidophilus*) w napojach fermentowanych z mleka koziego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **88** (3), 99-110.
- [19] Mituniewicz-Małek A., Dmytrów I., Nowak Z.: Cechy jakościowe jogurtu wyprodukowanego z mleka koziego przechowywanego w warunkach chłodniczych. *Przeł. Mlecz.*, 2009, **7**, 4-8.
- [20] Mituniewicz-Małek A., Dmytrów I., Pilarczyk R., Brajer A.: Ocena wybranych cech jakościowych jogurtów o podwyższonej zawartości tłuszczu w czasie chłodniczego przechowywania. *Przeł. Mlecz.*, 2010, **6**, 12-18.
- [21] Pieczonka W.: *Mleko i przetwory mleczne. Standaryzacja jakości i metody badań. Wyd. UR w Krakowie, Kraków 2015.*
- [22] PN-EN ISO 6887-5:2010. Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 5: Specyficzne zasady przygotowania mleka i przetworów mlecznych.
- [23] PN-ISO 22935-2:2013-07. Mleko i przetwory mleczne. Analiza sensoryczna. Część 2: Zalecane metody oceny sensorycznej
- [24] Prazeres A.R., Carvalho F., Rivas J.: Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manag.*, 2012, **110**, 48-68.
- [25] Shah N.P., Lankaputhra W.E.V., Britz M.L., Kyle W.S.A.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *Int. Dairy J.*, 1995, **5**, 515-521.

#### QUALITY OF FERMENTED PROBIOTIC BEVERAGES MADE FROM FROZEN ACID WHEY AND MILK DURING REFRIGERATED STORAGE

##### S u m m a r y

Whey is a by-product in the dairy industry and it is characterized by nutritional values and health benefits; however, if unmanaged, it poses a serious danger to the environment. The steadily increasing production of cheese and, consequently, of whey makes it necessary to search for new methods of utilizing

whey, mainly in the food industry. One of the options is the production of probiotic fermented beverages containing whey. Of the probiotic strains applied to the fermented milk beverages production, *Lactobacillus acidophilus* bacteria are those that are very often used. The objective of this research study was to determine the quality of fermented beverages containing the *L. acidophilus* La-5 probiotic strain made from frozen acid whey mixed with milk in the ratio 1:1. Four variants of beverages were produced: N without functional additives; NO containing oligofructose; NW with a WPC 35 whey protein concentrate; and NOW with oligofructose and WPC 35; all of them were stored under refrigerated conditions for a period of 14 days. After the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup>, and 14<sup>th</sup> day of storage, their organoleptic properties, acidity, and the content of acetaldehyde were determined as was the number of *L. acidophilus* therein. It was found that all the variants of beverages were characterized by a very good or good taste and smell; however, the apparent syneresis was their disadvantage. During the storage, there were reported an increase in the acidity and a decrease in the content of acetaldehyde. During the entire period of storage, the number of viable probiotic bacteria was high and significantly exceeded a level of  $10^6$  cfu /cm<sup>3</sup>, i.e. the minimum level as required by WHO in the probiotic products.

**Key words:** acid whey, frozen whey, probiotic beverage, *Lactobacillus acidophilus* ☒