

# Możliwości zastosowania wysokich ciśnień w technologii potencjalnie probiotycznych mlecznych napojów fermentowanych

Application of high pressure in technology of potentially probiotic milk beverages

Aleksandra Grześkiewicz

Institut Innowacji Przemysłu Mleczarskiego Sp. z o.o., Mrągowo

## Streszczenie

Technologia wysokich ciśnień jest alternatywną metodą utrwalania żywności zapewniającą zachowanie wysokiej jakości produktów o pożądanych właściwościach sensorycznych i odżywczych oraz wydłużonym terminie przydatności do spożycia.

Celem pracy było określenie możliwości zastosowania technologii wysokich ciśnień w produkcji potencjalnie probiotycznych mlecznych napojów fermentowanych.

We wstępnych badaniach potwierdzono, iż skład podłoża hodowlanego, w tym zawartość węglowodanów, ma znaczący wpływ na wzrost bakterii, ich aktywność kwaszącą oraz antybakteryjną hodowli wobec szczepów testowych badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*.

Przeżywalność wyselekcjonowanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus acidophilus* poddanych działaniu wysokich ciśnień 30; 60; 90; 300 MPa/1 min./18°C była zróżnicowana, zależała od badanego szczepu oraz wysokości ciśnienia.

Wyselekcjonowany do dalszych badań szczep *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 najniższą przeżywalność wykazywał po presuryzacji w 300 lub 400 MPa, niezależnie od składu podłoża oraz parametrów presuryzacji. Skład podłoża hodowlanego, wysokość stosowanego ciśnienia oraz temperatura presuryzacji zróżnicowanie wpływały na aktywność antybakteryjną *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Nie wszystkie przygotowane zestawy szczepowe, zawierające *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, okazały się korzystne do przygotowania mlecznych napojów fermentowanych. Liczba bakterii w przygotowanych napojach fermentowanych wynosiła nie mniej niż  $10^7$  jtk/ml i była zgodna z wymaganiami norm FAO/WHO i FIL/IDF. Kwasowość czynna i miareczkowa napojów odpowiadała wymaganiom dla mlecznych napojów fermentowanych. Cechy sensoryczne większości przygotowanych mlecznych napojów fermentowanych odpowiadały wymaganiom oceniających. Najkorzystniejszymi cechami sensorycznymi wyróżniał się napój przygotowany przy użyciu zastawu szczepowego: *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* Ł0853, *Lactobacillus acidophilus* T132/2, *Lactobacillus casei* 0889.

Liczba żywych bakterii we wszystkich napojach fermentowanych odpowiadała wymaganiom Codex Standard (2003) i wynosiła nie mniej niż  $10^8$  jtk/ml bezpośrednio po produkcji oraz w czasie okresu przechowywania. W czasie 4 tygodni w temperaturze 4°C przechowywania stwierdzono niewielki wzrost kwasowości. Przygotowane mleczne napoje fermentowane otrzymane w wyniku wymieszania hodowli pojedynczych szczepów charakteryzowały się wyższą liczbą bakterii i wyższą kwasowością w porównaniu z napojami otrzymanymi w wyniku hodowli wspólnej.

W napojach suplementowanych bakteriami probiotycznymi z jogurtów presuryzowanych w 200 lub 250 MPa/15 min./4 i 18 °C, liczba bakterii probiotycznych i jogurtowych utrzymywała się na wymaganym poziomie zgodnym z obowiązującymi normami przez 8 tygodniowy okres przechowywania w temperaturze 4 °C. Wyższą przeżywalność bakterii *Lactobacillus acidophilus* stwierdzono w napoju z jogurtu presuryzowanego w 200 MPa/15 min/18°C. Napój z jogurtu presuryzowanego 200 MPa/15 min w temperaturze 4°C, w przeciwieństwie do presuryzacji w temperaturze 18°C, charakteryzował się, w czasie przechowywania, wyższą aktywnością antybakteryjną wobec szczepów testowych. Zaobserwowano wpływ presuryzacji, a zwłaszcza temperatury, na cechy sensoryczne napojów, tj. smak i zapach. Presuryzacja napojów fermentowanych prowadziła do korzystnej zmiany konsystencji napojów. Najkorzystniejsze cechy smakowo-zapachowe stwierdzono dla napoju z jogurtu presuryzowanego 200 MPa/15 min/18°C.

Przeprowadzone badania i otrzymane wyniki wskazują, że technologia wysokich ciśnień może być stosowana jako metoda przedłużania trwałości probiotycznych i potencjalnie probiotycznych mlecznych napojów fermentowanych bez zmian ich cech sensorycznych i wartości odżywczych.

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus acidophilus* • aktywność antybakteryjna • antybiotykooporność • wysokie ciśnienia

## Adres do korespondencji:

dr inż. Aleksandra Grześkiewicz  
Instytut Innowacji Przemysłu  
Mleczarskiego Sp. z o.o.  
ul. Kormoranów 1  
11-700 Mrągowo  
e-mail:  
aleksandra\_grzeskiewicz@iipm.pl

## Summary

High pressure technology is an alternative method of food preservation ensuring maintenance of high-quality products that have desirable sensory and nutritional properties, and an extended shelf-life.

The aim of this study was to determine the possibility of using high pressure technology in the production of potentially probiotic fermented milk beverages.

Preliminary studies confirmed that the composition of the culture medium, including the carbohydrate content, has a significant effect on the growth of bacteria, the antibacterial activity of the culture and the acidity of tested strains of *Lactobacillus acidophilus*.

Survival of bacteria selected from the genus *Lactobacillus acidophilus* varied when treated with high-pressure of 30, 60, 90, 300 MPa / 1 min / 18 °C, depending on the strain and applied pressure. Pressurization to 300 MPa slightly affected the acidifying activity of the tested strains.

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 strain was selected for further studies. It showed lowest survival after pressurization at 300 or 400 MPa, independent of the composition of the media and pressurization parameters. Composition of the culture medium, temperature and pressure applied, affected antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Not all the tested strains of *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* were useful for the preparation of fermented milk beverages; some of the tested strains showed mutual antagonism. The number of bacteria in prepared fermented beverages was not less than  $10^7$  cfu / ml, consistent with the FAO / WHO and FIL / IDF specifications. Titratable and active acidity of the beverages was consistent with the requirements for fermented milk beverages. Most sensory characteristics of the prepared fermented beverages satisfied the requirements of the evaluators. A beverage prepared with *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* Ł0853, *Lactobacillus acidophilus* T132 / 2, and *Lactobacillus casei* 0889 had the best sensory qualities .

The number of live bacteria in all fermented drinks fulfilled the requirements of the Codex Standard (2003) and was not less than  $10^8$  cfu / ml immediately after production and during the storage period. During four weeks of storage at 4 °C a slight increase in acidity was observed. Fermented milk beverages made using individually cultured strains had a higher number of bacteria and higher acidity compared to the beverages made using a mixed culture.

The number of bacteria was within specifications during an 8 week storage period at 4 °C when the beverages were supplemented with probiotic bacteria from yoghurt pressurized at 200 or 250 MPa/15 min. / 4 and 18 °C. Pressurization of yoghurt at 200 MPa/15 min / 4 or 18 °C reduced the acidifying ability of bacteria . A beverage made with yoghurt pressurized at 200 MPa/15 min at 4 °C, in contrast to pressurization at 18 °C, exhibited higher antibacterial activity against test strains during storage. The effect of pressurization and, in particular temperature was observed on the sensory properties of beverages - such as taste and smell. Pressurization of fermented beverages led to a favorable change in the consistency of beverages. The most desirable flavor and aroma were observed for a yoghurt drink pressurized at 200 MPa/15 min/18 °C.

The presented study and results show that high-pressure technology can be used as a method for extending shelf life of probiotic products and potentially probiotic fermented beverages without altering their sensory properties and nutritional values.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, antibacterial activity, antibiotic resistance, high pressure

**Key words:** *Lactobacillus acidophilus* • antibacterial activity • antibiotic resistance • high pressure

## 1. Wstęp

Słowo probiotyk wywodzi się z języka greckiego, w którym „pro bios” oznacza „dla życia”. Wielokrotnie dokonywano prób zdefiniowania „probiotyku”. Jedna z najnowszych definicji określa probiotyki jako żywe mikroorganizmy, które - wprowadzone do pożywienia - mogą wpływać na skład i aktywność mikroflory jelitowej, poprawiać niespecyficzną barierę jelitową oraz wzmacniać lub modulować odpowiedź immunologiczną organizmu.

Wśród artykułów żywnościowych najpopularniejszą grupę produktów wzbogacanych w bakterie probiotyczne stanowią produkty mleczne, ponieważ mleko jest naturalnym środowiskiem bytowania tych bakterii. W grupie mlecznych produktów probiotycznych największym zainteresowaniem konsumentów cieszy się jogurt i inne mleczne napoje fermentowane.

Mleczne produkty fermentowane posiadają właściwości lecznicze polegające na odtwarzaniu lub uzupełnianiu mikroflory rodzimej jelit oraz „odtruwaniu” organizmu i neutralizacji związków prokancerogennych, tj. pronowotworowych. Wartość odżywcza i dietetyczna mlecznych produktów fermentowanych jest wyższa niż mleka dzięki wzbogaceniu w witaminy i enzymy oraz produkty hydrolizy składników mleka.

Rozpowszechnieniu produkcji artykułów mleczarskich sprzyja postęp współczesnej technologii. Nowe techniki wytwarzania, utrwalania i pakowania pozwalają na otrzymanie mlecznych napojów fermentowanych o znacznie lepszej jakości i trwałości od ich tradycyjnych odpowiedników.

W ciągu ostatnich lat coraz większa liczba konsumentów zainteresowana jest zdrowym odżywianiem się, odpowiednią dietą i wartością odżywczą spożywanych produktów. Cechy nowoczesnych produktów żywnościowych spełnia szeroki asortyment mlecznych napojów fermentowanych.

Bez wątplenia żywność funkcjonalna generuje jeden z najbardziej obiecujących i dynamicznie rozwijających się segmentów przemysłu spożywczego. Rosnący popyt na żywność zdrową i wygodną spowodował lawinowy rozwój technologii produkcji jak również stwarza warunki do wprowadzania nowatorskich i innowacyjnych rozwiązań.

Przemysł spożywczy, chcąc zaspokoić gusta konsumentów, zachowując jednocześnie wysoką, jakość i atrakcyjność cenową, zmuszony jest do wdrażania nowych rozwiązań technologicznych.

Do nowoczesnych metod przetwarzania i utrwalania żywności zalicza się technikę wysokich ciśnień (HPP – High Pressure Processing).

W porównaniu z produktami utrwalonymi metodami klasycznymi zaletą żywności utrwalonej metodą

wysokociśnieniową jest wysoka jakość zdrowotna, trwałość oraz zachowanie naturalnych walorów odżywczych i sensorycznych. Warunkiem przydatności i potencjalnego wykorzystania techniki wysokociśnieniowej do utrwalania żywności jest ustalenie takich parametrów procesu, które:

- nie powodują obniżenia wartości odżywczej i cech sensorycznych produktu
- zachowują jego jakość i trwałość.

## 2. Cel pracy

Celem pracy było określenie możliwości zastosowania wysokich ciśnień w technologii produkcji potencjalnie probiotycznych mlecznych napojów fermentowanych.

Cel pracy zrealizowano poprzez:

- określenie dynamiki wzrostu i dynamiki ukwaszania 23 szczepów *Lactobacillus acidophilus* w aspekcie ich przydatności do otrzymania mlecznych napojów fermentowanych;
- określenie wpływu składu podłoża hodowlanego na liczbę bakterii, aktywność kwaszącą oraz aktywność antybakteryjną wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*;
- określenie wpływu ciśnienia o 30; 60; 90 oraz 300 MPa/1 minutę/18°C na przeżywalność, aktywność kwaszącą, aktywność antybakteryjną, antybiotykoporność wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*;
- określenie wpływu wybranych parametrów presuryzacji 100 i 300 MPa / 5; 10; 15 min / 4, 18 i 37°C na przeżywalność i aktywność antybakteryjną wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*;
- określenie wpływu wybranych parametrów presuryzacji 100; 200; 300; 400 MPa / 15 min / 4, 18 i 37°C na wybrane właściwości wyselekcjonowanego szczepu;
- ocenę przydatności bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* do przygotowania zestawów szczepowych do otrzymania mlecznych napojów fermentowanych;
- określenie optymalnego składu zestawu szczepowego bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* do otrzymania mlecznego napoju fermentowanego o akceptowalnych cechach sensorycznych;
- ocenę techniki wysokich ciśnień do utrwalania jogurtów pitnych suplementowanych bakteriami probiotycznymi po procesie presuryzacji.

## 3. Metodyka

### 3.1 Materiał badawczy

- szczepy bakterii pochodzące z kolekcji Instytutu Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej oraz Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności UWM w Olsztynie – 23 *Lactobacillus acidophilus*; 3 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*; 5 *Lactobacillus casei*; 1 *Lactobacillus paracasei*;

- szczepionki probiotyczne firmy Christian Hansen Poland - *Lactobacillus acidophilus* LA5 oraz *Bifidobacterium* BB12;
- handlowy jogurt pitny „MILKO” naturalny, wyprodukowany przez SM Mlekoop w Grajewie, Zakład Produkcyjny w Mrągowie.

### 3.2 Zakres badań

Zakres pracy obejmował następujące problemy badawcze:

- charakterystykę szczepów *Lactobacillus acidophilus*;
- wpływ wysokich ciśnień na wybrane właściwości szczepów *Lactobacillus acidophilus*:
  - Etap I - 30; 60; 90 oraz 300 MPa/1 min./18°C
  - Etap II - 100 i 300 MPa / 5; 10; 15 min / 4, 18, 37°C
  - Etap III - 100; 200; 300; 400 MPa/15 min./4, 18, 37°C
- ocena napojów fermentowanych przygotowanych przy użyciu:
  - 20 zestawów szczepowych z badanych bakterii mlekowych
  - 4 zestawów szczepowych – bakterie mlekowych w hodowli wspólnej i oddzielnej
- suplementacja bakteriami presuryzowanego napoju jogurtowego.

### 3.3 Przebieg doświadczenia

1. Charakterystyka badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus* obejmowała:

- a) dynamikę wzrostu bakterii i ukwaszania na podłożu płynnym;
- b) wpływ składników podłoża na aktywność antybakteryjną badanych bakterii mlekowych;
- c) wybór metody oznaczania aktywności antybakteryjnej wybranych bakterii.

2. Wpływ wysokich ciśnień na wybrane właściwości szczepów *Lactobacillus acidophilus*;

3. Przygotowanie zestawów szczepowych bakterii *Lactobacillus* do otrzymania mleka fermentowanego;

4. Otrzymywanie mleknych napojów fermentowanych;

5. Suplementacja bakteriami probiotycznymi presuryzowanego napoju jogurtowego.

### 3.4 Metodyka badań

- analizy mikrobiologiczne
  - liczbę bakterii *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Bifidobacterium sp.* – oznaczano metodą płytkową
  - aktywność antybakteryjna – oznaczana wybranymi metodami
  - antybiotykooporność – oznaczana metodą dyfuzyjno-krażkową
- oznaczenie kwasowości:
  - potencjalnej metodą miareczkową;
  - czynnej przy użyciu pH-metru HI 221 (HANNA)
- ocena sensoryczna - według Polskiej Normy PN – 83/A – 86086: 2002 z późniejszymi zmianami
- statystyczna analiza otrzymanych wyników.

## 4. Omówienie wyników

### 4.1 Charakterystyka badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*

#### 4.1.1 Dynamika wzrostu i ukwaszania na podłożu płynnym

W trakcie badań prześlędzono wzrost i dynamikę ukwaszania 23 szczepów *Lactobacillus acidophilus* w aspekcie ich przydatności do otrzymania mleknych napojów fermentowanych, w tym mleknych napojów poddanych działaniu wysokich ciśnień.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, iż bakterie różnych szczepów należących do tego samego gatunku mogą różnić się między sobą optymalnym czasem inkubacji oraz optymalnym czasem ukwaszania podłoża płynnego.

Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano osiem szczepów bakterii o podobnych właściwościach technologicznych, tj. o zbliżonym czasie inkubacji, dla osiągnięcia maksymalnej liczby komórek bakterii oraz o zbliżonej lub zróżnicowanej aktywności kwaszącej.

Cechy te pozwolą na łatwiejszy i właściwszy dobór szczepów i skomponowanie nietradycyjnych zestawów szczepowych do otrzymania mleknych napojów fermentowanych.

#### 4.1.2 Wpływ wybranych składników podłoża na aktywność antybakteryjną badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*

##### 4.1.2.1 Wpływ składu podłoża na liczbę bakterii

Zaobserwowano znaczny wpływ składników pięciu podłoży na liczbę bakterii podczas hodowli wyselekcjonowanych ośmiu szczepów *Lactobacillus acidophilus*.

Zarówno rodzaj sacharydu, jak również jego procentowa zawartość miały wpływ na dynamikę wzrostu badanych bakterii *Lactobacillus acidophilus*. Podłoża z większym dodatkiem sacharydów (MRS z 2% dodatkiem glukozy i MRS z 2% dodatkiem laktozy) korzystnie wpływały na wzrost bakterii badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*. Przy dziesięciokrotnie mniejszej zawartości sacharydów w podłożu (0,2%) liczba bakterii badanych szczepów była znacznie mniejsza. Obecność sacharydów w podłożu hodowlanym jest istotnym czynnikiem stymulującym wzrost bakterii.

##### 4.1.2.2 Wpływ składu podłoża na aktywność kwaszącą badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*

Zastosowanie badanych podłoży hodowlanych wpłynęło na aktywność kwaszącą bakterii badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*.

Kwasowość czynna podłoża po hodowli była zróżnicowana i zależała od rodzaju podłoża hodowlanego, jego początkowego pH i od rodzaju bakterii szczepu namnażane-

nego na tym podłożu.

Rodzaj zastosowanego sacharydu jak i jego ilość wpłynęła na aktywność syntezy metabolitów przez bakterie mlekowe, obniżając pH hodowli.

Wyniki potwierdzają, że niska zawartość źródeł węgla w podłożu powoduje ograniczenie aktywności kwasotwórczej bakterii badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*.

Uzyskane wyniki aktywności kwaszącej bakterii badanych szczepów z rodzaju *Lactobacillus acidophilus* wskazują na dużą elastyczność w przystosowywaniu badanych bakterii do wykorzystania różnych źródeł węgla.

#### 4.1.2.3 Wpływ wybranych składników podłoża na Aktywność antybakteryjną badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*

W licznych doniesieniach naukowych aktywność antybakteryjna bakterii jest oznaczana różnymi metodami. W niniejszych badaniach oceniano 7 metod w celu porównania ich przydatności do oznaczania aktywności antybakteryjnej badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*.

W trakcie wykonywania doświadczenia badania antagonizmu międzyszczepowego w stosunku do bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* oraz *Enterobacter* przeprowadzono na pięciu podłożach hodowlanych o zmniejszonej zawartości sacharydów dla ograniczenia aktywności kwasotwórczej badanych bakterii, a tym samym aktywności antybakteryjnej - pochodzącej od kwaśnych metabolitów bakterii fermentacji mlekowej.

W oparciu o uzyskane w trakcie badań wyniki stwierdzono, że zróżnicowana zdolność hamowania wzrostu bakterii testowych posiadają wszystkie bakterie badanych szczepów z rodzaju *Lactobacillus acidophilus*. Efektywność inhibicji wzrostu wyraźnie zależała od wrażliwości szczepu testowego na metabolity badanych bakterii fermentacji mlekowej, zastosowanej metody badawczej oraz od składu podłoża stosowanego do hodowli badanych bakterii mlekowych.

Zastosowanie w badaniach podłoża uboższego w składniki odżywcze - podłożo z ekstraktem mięsnym spowodowało, że ilość syntetyzowanych metabolitów nie hamowała wzrostu bakterii Gram-ujemnych. Żaden z badanych szczepów z rodzaju *Lactobacillus acidophilus*, namnożony na tym podłożu, nie wykazywał zdolności do inhibicji wzrostu szczepów testowych.

## 4.2. Wpływ wysokich ciśnień na właściwości wybranych szczepów *Lactobacillus acidophilus*

### 4.2.1 Etap 1

Biorąc pod uwagę aktywność antybakteryjną badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*, do dalszych badań wyselekcjonowano cztery szczepy:

- *Lactobacillus acidophilus* Diat Ł0939;
- *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938;
- *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937;
- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

#### 4.2.1.1 Wpływ wysokiego ciśnienia na liczbę bakterii

W trakcie badań stwierdzono, iż, z czterech badanych szczepów, najbardziej odporny na działanie wysokich ciśnień okazał się szczep *Lactobacillus acidophilus* Diat Ł0939.

Zaobserwowano, że presuryzacja 30 MPa/1min, powodowała na nieznaczne zwiększenie liczby jednostek tworzących kolonie szczepu *Lactobacillus acidophilus* Diat Ł0939.

Najniższą przeżywalnością w wyniku presuryzacji w 30 MPa charakteryzował się szczep *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Wraz ze wzrostem wartości ciśnienia do 90 MPa liczebność komórek bakterii badanych szczepów zmieniła się w niewielkim stopniu. Presuryzacja w 300 MPa/1 min spowodowała znaczny spadek liczby bakterii. Redukcję liczby komórek tylko o jeden rząd logarytmiczny zaobserwowano po presuryzacji w 300 MPa/1 min bakterii szczepu *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938.

#### 4.2.1.2 Wpływ wysokiego ciśnienia na aktywność kwaszącą

Po ciśnieniowaniu hodowli bakterii badanych szczepów w 30 - 90 MPa/1 min aktywność kwasząca bakterii kształtowała się zróżnicowanie, zależnie od szczepu. Dla szczepu *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938 po ciśnieniowaniu, zaobserwowano obniżanie się pH hodowli wraz ze wzrostem ciśnienia. Natomiast szczepy *Lactobacillus acidophilus* Diat Ł0939, *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 oraz *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 poddane działaniu ciśnień wykazywały tylko nieznacznie obniżoną aktywność kwaszącą.

Po ciśnieniowaniu w 300 MPa zaobserwowano zróżnicowany spadek aktywności kwaszącej bakterii badanych szczepów. Największe obniżenie aktywności kwaszącej zaobserwowano dla bakterii szczepu *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356.

Wszystkie obserwacje dotyczące aktywności kwaszącej badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus* potwierdzają także wyniki pomiaru kwasowości miareczkowej.

#### 4.2.1.3 Wpływ wysokich ciśnień na aktywność antybakteryjną

Stwierdzono, że zdolność hamowania wzrostu bakterii testowych wykazują wszystkie bakterie badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*.

Największą aktywnością antybakteryjną, w stosunku do wszystkich szczepów testowych, odznaczały się niepresuryzowane hodowle bakterii *Lactobacillus acidophilus*

T294, zaś najmniejszą *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938.

Analizując wielkość stref zahamowania wzrostu szczepów testowych zaobserwowano, że zastosowanie wysokich ciśnień wpłynęło na obniżenie aktywności antybakteryjnej bakterii badanych szczepów. Wszystkie bakterie niepresuryzowanych szczepów odznaczały się znacznie wyższą aktywnością antybakteryjną wobec szczepów testowych. W większości przypadków wraz ze wzrostem ciśnienia obserwowano nieznaczne obniżenie aktywności antybakteryjnej bakterii.

#### 4.2.1.4 Wpływ wysokich ciśnień na antybiotykooporność

Analizując uzyskane wyniki podczas oznaczania oporności pałeczek *Lactobacillus acidophilus* na różne antybiotyki stwierdzono, że badane szczepy wykazywały wrażliwość na wszystkie użyte w doświadczeniu antybiotyki poza kanamycyną. Ciśnieniowanie bakterii badanych szczepów do 90 MPa/1 min nie wpływało na ich antybiotykooporność. Dopiero ciśnienie 300 MPa/1 min powodowało wyraźny spadek oporności badanych szczepów.

#### 4.2.2 Etap 2

##### 4.2.2.1 Wpływ wysokich ciśnień na przeżywalność bakterii

Ciśnienie 100 MPa działające przez 5, 10 i 15 minut w temperaturach 4, 18 i 37°C w przeciwieństwie do ciśnienia 300 MPa nieznacznie wpływało na liczbę bakterii badanych szczepów w hodowli na mleku.

Redukcja liczby bakterii, po ciśnieniowaniu 300 MPa, w temperaturze 4°C była niższa niż w temperaturach 18°C i 37°C. Największą redukcję liczby bakterii stwierdzono dla szczepu *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 w temperaturze 18 i 37°C.

##### 2.2.2 Wpływ wysokich ciśnień na aktywność antybakteryjną

Aktywność antybakteryjną szczepów *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 oraz *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 wobec pięciu szczepów testowych była zróżnicowana i zależała od podłoża hodowlanego.

Aktywność antybakteryjna bakterii *Lactobacillus acidophilus* hodowli prowadzonych na mleku była znacznie niższa od aktywności antybakteryjnej hodowli na MRS, niezależnie od czasu trwania i temperatury presuryzacji.

Presuryzowane w 300 MPa hodowle na mleku bakterii szczepu *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 jak i *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, nie wykazywały aktywności antybakteryjnej.

Aktywność antybakteryjna presuryzowanych bakterii w 100 MPa, niezależnie od czasu i temperatury, zarówno szczepu *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 jak i *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 po hodowli na mle-

ku była nieznacznie niższa od aktywności antybakteryjnych hodowli kontrolnych.

Aktywność antybakteryjna presuryzowanych hodowli na MRS bakterii szczepu *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 była nieznacznie niższa niż aktywność antybakteryjna presuryzowanych hodowli na MRS bakterii szczepu *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Aktywność antybakteryjna bakterii *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 i *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 po hodowli na podłożu MRS i presuryzacji w 100 MPa była wyższa niż po presuryzacji w 300 MPa. Czas presuryzacji i temperatura nie miały istotnego wpływu na aktywność antybakteryjną badanego szczepu.

Należy nadmienić, że najwyższą aktywność antybakteryjną charakteryzowały się bakterie *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 presuryzowane 300 MPa / 4°C po hodowli na MRS.

#### 4.2.3 Etap 3

##### 4.2.3.1 Wpływ wysokich ciśnień na przeżywalność badanego szczepu *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Potwierdzono, że ciśnienia 100 MPa i 200 MPa / 15 min w temperaturze 4°C, 18°C i 37°C po hodowli *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 na podłożu MRS, jak i na mleku, nieznacznie wpływały na przeżywalność bakterii. Wzrost ciśnienia do 300 i 400 MPa powodował znaczne zmniejszenie liczby komórek. Po ciśnieniowaniu 300 MPa / 15 min zaobserwowano spadek przeżywalności bakterii o dwa do trzech rzędów logarytmicznych, a w 37°C nawet do czterech rzędów logarytmicznych. Najbardziej wrażliwe na działanie ciśnienia 400 MPa/18°C były bakterie *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 po hodowli na podłożu MRS. Najwyższą odpornością na wysokie ciśnienie wykazały się bakterie, presuryzowane w temperaturze 4°C.

Podłoża hodowlane nie miały znaczącego wpływu na przeżywalność bakterii badanych szczepów po presuryzacji.

##### 4.2.3.2 Wpływ wysokich ciśnień na aktywność antybakteryjną badanego szczepu *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Uzyskane wyniki wskazują, iż badany szczep *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 wykazał zróżnicowaną aktywność antybakteryjną wobec stosowanych szczepów testowych. Wielkości stref zahamowania wzrostu szczepów patogennych przez *Lactobacillus* w próbach kontrolnych oraz w próbach poddanych presuryzacji były istotnie wyższe dla hodowli bakterii na podłożu MRS w porównaniu do hodowli na mleku.

Wraz ze wzrostem zastosowanego ciśnienia do 400 MPa / 15 min, w większości przypadków, obserwowano obniżanie aktywności antybakteryjnej bakterii.

#### 4.2.3.3 Wpływ wysokich ciśnień na antybiotykooporność badanego szczepu *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Bakterie *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 po hodowli na położu MRS i na mleku w hodowlach kontrolnych oraz poddanych presuryzacji 100 – 400 MPa / 15 min w temperaturze 4°C były niewrażliwe na kanamycynę. Po presuryzacji w temperaturze 18°C niewielką wrażliwość bakterii zaobserwowano w hodowli na podłożu MRS oraz w hodowli na mleku presuryzowanej w 100 MPa. Po ciśnieniowaniu w temperaturze 37°C wraz ze wzrostem ciśnienia antybiotykooporność *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 malała.

W przypadku presuryzacji bakterii 400 MPa/18°C nie zaobserwowano wzrostu bakterii badanego szczepu.

W przypadku hodowli bakterii *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 na mleku, a następnie presuryzacji 100 – 400 MPa / 15 min w 37°C oraz w podłożu MRS i presuryzacji w 4°C antybiotykooporność bakterii wobec tetracykliny nie zmieniała się znacząco wraz ze wzrostem ciśnienia.

#### 4.4. Suplementacja bakteriami probiotycznymi presuryzowanego jogurtu „Milko”

Przygotowano napoje jogurtowe z handlowego jogurtu pitnego „Milko”, do których po presuryzacji 200 i 250 MPa/4 i 18°C/15 min dodano pojedyncze hodowle bakterii *Lactobacillus acidophilus* LA-5 i *Bifidobacterium* sp. BB-12. Napojem kontrolnym był napój przygotowany z niepresuryzowanego jogurtu z dodatkiem hodowli w/w bakterii probiotycznych.

##### 4.4.1 Przeżywalność bakterii jogurtowych oraz bakterii probiotycznych w mlecznych napojach otrzymanych z presuryzowanego jogurtu „Milko”

We wszystkich badanych mlecznych napojach fermentowanych, zarówno kontrolnych jak i otrzymanych z presuryzowanego jogurtu, liczba bakterii *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* oraz *Lactobacillus acidophilus* przez cały okres ośmiotygodniowego przechowywania wynosiła powyżej  $10^7$  jtk/g czyli odpowiadała wymaganiom jakościowym.

Największy spadek liczby bakterii *Streptococcus thermophilus* zaobserwowano w mlecznych napojach fermentowanych, zarówno kontrolnych jak i z jogurtu poddanego działaniu ciśnienia 250 MPa/18°C/15 min. Tendencja ta utrzymywała się podczas całego okresu przechowywania. W napojach z jogurtu presuryzowanego w temperaturze 4°C liczba bakterii była wyższa niż w napojach z jogurtu presuryzowanych w temperaturze 18°C.

Najwyższą liczbę bakterii *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* zaobserwowano w napojach z jogurtu presuryzowanego w 200MPa/4°C/15 min. Zaobserwowano, iż w napoju z jogurtu presuryzowanego w 200 MPa/18°C/15 min liczba bakterii była wyższa niż w kontrolnym mlecznym napoju fermentowanym.

Wyższą liczbę bakterii *Lactobacillus acidophilus* zaobserwowano w napojach z jogurtów presuryzowanych w temperaturze 4°C niż w temperaturze 18°C. W napoju otrzymanym z jogurtu presuryzowanego w 250 MPa/18°C/15 min liczba bakterii była najniższa.

We wszystkich badanych mlecznych napojach fermentowanych liczba bakterii *Bifidobacterium bifidum* przez cały okres przechowywania wynosiła powyżej  $10^6$  jtk/g. W napoju z jogurtu presuryzowanego w 250MPa/18°C w 8 tygodniu przechowywania liczba bakterii wynosiła  $10^6$  jtk/g. Podczas przechowywania w napoju z jogurtu presuryzowanego w 200 MPa/4°C/15 min zaobserwowano wyższą liczbę bakterii niż w jogurcie kontrolnym.

##### 4.4.2 Kwasowość czynna i miareczkowa mlecznych napojów otrzymanych z presuryzowanego jogurtu „Milko”

Presuryzacja jogurtów w 250 MPa/15min w 18° C i w 4° C, przed dodaniem bakterii probiotycznych, oraz w 200 MPa/15min w 18° C i w 4°C spowodowała nieznaczny spadek kwasowości otrzymanych napojów w porównaniu z próbami kontrolnymi.

Bezpośrednio po przygotowaniu kwasowość mlecznych napojów fermentowanych, otrzymanych z jogurtów zarówno presuryzowanych jak i niepresuryzowanych, wynosiła pH 4,47 (36,0°SH). W trakcie przechowywania kwasowość badanych mlecznych napojów fermentowanych wzrastała zarówno w próbach kontrolnych jak i w próbach presuryzowanych. Kwasowość napoju z presuryzowanego jogurtu w 200MPa/18°C/15min i 200MPa/4°C/15min podczas przechowywania była nieco niższa od kwasowości jogurtu kontrolnego.

##### 4.4.3 Aktywność antybakteryjna bakterii mlecznych napojów otrzymanych z presuryzowanego jogurtu „Milko”

Nie zaobserwowano, aby presuryzacja jogurtu znacząco wpływała na aktywność antybakteryjną otrzymanego napoju jogurtowego. Zaobserwowano, że aktywność antybakteryjna napojów fermentowanych, wobec pięciu badanych szczepów testowych była zbliżona i tylko nieznacznie obniżała się w miarę upływu czasu ich przechowywania.

Porównując aktywność antybakteryjną badanych napojów przygotowanych z presuryzowanego jogurtu w 4 i 18°C stwierdzono, iż nieznacznie wyższą antybakteryjnością cechował się napój otrzymany z jogurtu presuryzowanego w 250 MPa/15 min w temperaturze 18°C. Zaobserwowano, że oba napoje podczas przechowywania wykazywały coraz niższą aktywność antybakteryjną.

Presuryzacja jogurtu w 200 MPa/15 min w temperaturze 4 i 18°C wpłynęła nieznacznie na obniżenie aktywności antybakteryjnej bakterii w napoju jogurtowym bezpośrednio po presuryzacji w porównaniu do jogurtu kontrolnego.

Zarówno napój kontrolny i z presuryzowanego jogurtu wykazywały właściwości antybakteryjne wobec wszyst-

kich szczepów testowych podczas sześciu tygodni przechowywania w temperaturze 4°C.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż najwyższą aktywnością antybakteryjną charakteryzowały się bakterie napoju z presuryzowanego jogurtu w 200 MPa/15 min w temperaturze 18°C. Pozostałe napoje z presuryzowanych jogurtów charakteryzowały się zbliżoną aktywnością antybakteryjną.

#### 4.4.4 Antybiotykooporność bakterii napojów jogurtowych otrzymanych z presuryzowanego jogurtu „Milko”

Zaobserwowano, że badane bakterie wykazywały najmniejszą odporność na tetracyklinę, ampicylinę, penicylinę oraz erytromycynę. Wobec antybiotyków amino glikozydowych: neomycyna, kanamycyna i gentamycyna charakteryzowały się znaczną odpornością. Odporność na badane antybiotyki bakterii jogurtowych i probiotycznych w napoju kontrolnym nie wykazywała istotnych zmian w trakcie ośmiu tygodni przechowywania w temperaturze 4°C.

Dla napoju z jogurtu presuryzowanego 250 MPa / 15 min w 4°C nie odnotowano istotnych zmian antybiotykooporności bakterii podczas przechowywania.

Najwyższą odporność bakterii obu napojów jogurtowych, tj. ciśnieniowanych w 4 i 18°C, zaobserwowano wobec neomycyny. W ósmym tygodniu przechowywania bakterie napoju jogurtu presuryzowanego charakteryzowały się znacznie wyższą antybiotykoopornością od napoju kontrolnego.

Stwierdzono, że lepszą antybiotykoopornością charakteryzowały się bakterie napoju z jogurtu presuryzowanego 200 MPa/ 15 min w temperaturze 18°C. Stwierdzono, iż bakterie jogurtowe i probiotyczne w napoju z presuryzowanego jogurtu w temperaturze 18°C, są całkowicie odporne na gentamycynę. Bakterie tego jogurtu dodatkowo wykazują mniejszą lub równą wrażliwość na neomycynę.

Presuryzacja jogurtu w 200 MPa/15 min w temperaturze 4 i 18°C wpłynęła na obniżenie antybiotykooporności bakterii napoju na niektóre z badanych antybiotyków.

#### 4.4.5 Ocena sensoryczna mlecznych napojów otrzymanych z presuryzowanego jogurtu „Milko”

Bezpośrednio po przygotowaniu otrzymane z niepresuryzowanego jogurtu napoje fermentowane charakteryzowały się jednolitym zwartym skrzepem. Konsystencja była gęsta, w przekroju gładka, o porcelanowym połysku.

Smak napojów był typowy jogurtowy, lekko kwaśny, orzeźwiający, bez obcych posmaków. W trzecim tygodniu przechowywania, w temperaturze 4°C zaobserwowano podciek serwatki, a smak był bardzo kwaśny z posmakiem kefirowym.

Smak napojów z jogurtów presuryzowanych w 200 lub 250 MPa / 15 min, zarówno w temperaturze 18°C

jak i w temperaturze 4°C, był czysty, lecz bez jogurtowego posmaku. Napoje charakteryzowały się jednolitym skrzepem, bardziej gęstym niż skrzep jogurtów kontrolnych. Konsystencja była jednorodna i gęsta. W napojach z jogurtów presuryzowanych, podobnie jak w napojach kontrolnych zmiany wyróżników jakości zaobserwowano od trzeciego tygodnia przechowywania. Napój z jogurtu presuryzowanego w 250 MPa/18°C podczas przechowywania cechował się zmianą smaku na delikatnie słodki, natomiast z jogurt presuryzowanego w 250 MPa/4°C nastąpiła zmiana smaku z typowego na bardziej kwaśny. Porównując opinie oceniających stwierdzono, że najwyższą ocenę uzyskał napój otrzymany z jogurtu presuryzowanego w temperaturze 18°C.

Porównując napoje z jogurtów presuryzowanych w 200 MPa/15 min w temperaturach 18°C i 4°C, stwierdzono, iż w czasie 8 tygodni przechowywania oba zachowywały prawidłową barwę, wygląd i konsystencję. Nieco lepsze walory smakowo-zapachowe zachowywał napój z jogurtu presuryzowanego w 200 MPa/18°C/15 min.

W 8 tygodniu przechowywania zaobserwowano nieznaczne zmiany smaku i zapachu tj. utratę intensywności zapachu jogurtowego.

Większe zmiany cech smakowo-zapachowych podczas przechowywania zaobserwowano w napoju z jogurtu presuryzowanego w temperaturze 4°C.

Przeprowadzona komisyjna ocena sensoryczna wykazała, że najbardziej „pożądanymi” były napoje jogurtowe przygotowane z jogurtu ciśnieniowanego w 200 MPa.

## 5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- a) potwierdzono zróżnicowaną wrażliwość szczepów testowych na syntetyzowane metabolity badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*;
- b) najwyższą zdolnością do syntezy związków antybakteryjnych, spośród 23, charakteryzowały się szczepy:
  - *Lactobacillus acidophilus* Diat Ł0939,
  - *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938,
  - *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937,
  - *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356;
- c) presuryzacja do 300 MPa wpływała nieznacznie na aktywność kwaszącą bakterii badanych szczepów, natomiast presuryzacja 300 MPa powodowała spadek aktywności kwaszącej;
- d) presuryzacja do 90 MPa/1min/18°C nieznacznie zwiększała działanie antagonistyczne badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus* wobec bakterii szczepów testowych oraz powodowała wzrost oporności tych szczepów na badane antybiotyki;
- e) najniższą przeżywalność po presuryzacji powyżej 200 MPa, niezależnie od składu podłoża hodowlanego oraz parametrów presuryzacji wykazywał szczep



*Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*;

- f) antybiotykooporność bakterii *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* wobec badanych antybiotyków była zależna od składu podłoża hodowlanego, wysokości ciśnienia i temperatury presuryzacji;
- g) najkorzystniejszymi cechami sensorycznymi wyróżniał się napój przygotowany przy użyciu: *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus Ł0853*, *Lactobacillus acidophilus T132/2*, *Lactobacillus casei 0889*;
- h) liczba bakterii w przygotowanych napojach fermentowanych wynosiła nie mniej niż  $10^7$  jtk/ml i była zgodna z wymaganiami norm FAO/WHO i FIL/IDF, a ich kwasowość czynna i miareczkowa odpowiadała normom dla mlecznych napojów fermentowanych;
- i) napoje fermentowane o korzystnych walorach sensorycznych wykazywały zróżnicowaną aktywność antibakteryjną wobec szczepów testowych; najwyższą aktywnością antibakteryjną charakteryzowały się bakterie napoju o składzie:
- *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus Ł0853*, *Lactobacillus acidophilus Nestle Ł0937*;
  - *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus Ł0851*, *Lactobacillus acidophilus Diat Ł0939*, *Lactobacillus casei 0889*;

- j) w napojach otrzymanych z handlowego jogurtów presuryzowanych w 200 lub 250 MPa/15 min./4 i 18 °C suplementowanych bakteriami probiotycznymi, liczba bakterii odpowiadała normom podczas 8 tygodniowego przechowywania w temperaturze 4 °C;
- k) najkorzystniejszymi cechami smakowo-zapachowymi charakteryzował się napój z jogurtu presuryzowanego 200 MPa/15 min/18°C;
- l) technika wysokich ciśnień może być stosowana do otrzymania nowych mlecznych napojów fermentowanych, probiotycznych i potencjalnie probiotycznych, o przedłużonej trwałości bez zmian ich cech sensorycznych i wartości odżywczych.

Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na możliwość wykorzystania presuryzowanego jogurtu do otrzymania mlecznego napoju fermentowanego suplementowanego bakteriami probiotycznymi.

Zastosowanie wysokich ciśnień do presuryzacji jogurtu przed dodaniem bakterii probiotycznych pozwala uzyskać mleczny napój fermentowany o wysokich walorach sensorycznych i odżywczych.