

DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA,
ANASTASIA V. SIDARENKA, GALINA I. NOVIK

WZROST I PRZEŻYwalNOŚĆ BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM* W NAPOJU SOJOWYM

Streszczenie

Celem badań była ocena możliwości zastosowania napoju sojowego jako medium do wzrostu i przeżycia bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a także określenie wpływu dodatku cukrów na ich przeżywalność. Badanie podzielono na dwa etapy: w pierwszym zbadano wzrost i przeżywalność szczepów *Bifidobacterium* w napoju sojowym, który poddano fermentacji oraz w napoju niefermentowanym. W drugim etapie badano wpływ dodatku cukrów (glukozy i oligofruktozy) na wzrost i przeżywalność wybranego szczepu *Bifidobacterium* w napoju sojowym.

Napój sojowy szczepiono 5 % (v/v) inoculum 24-godzinnej hodowli *Bifidobacterium* o liczbie komórek od 8,7 - 9,2 log jtk/ml w zależności od zastosowanego szczepu. W próbach niepoddanych fermentacji liczba komórek istotnie zmniejszyła się po 7 dniach chłodniczego przechowywania do wartości 5,8 - 4,1 jtk/ml. Natomiast po procesie fermentacji (37 °C/24 h) liczba komórek badanych szczepów *Bifidobacterium* zwiększyła się o około 2 rzędy logarytmiczne, z wyjątkiem próby z dodatkiem szczepu A6. Wybrany szczep *B. longum* BIM B-647 charakteryzował się dużą produkcją biomasy (już po 15 h fermentacji) >8,7 log jtk/ml. Dodatek oligofruktozy istotnie wpłynął na zwiększenie liczby komórek *B. longum* BIM B-647 w napoju sojowym podczas fermentacji, a także spowodował wydłużenie fazy stacjonarnej w czasie chłodniczego przechowywania prób. Napój sojowy jest dobrym nośnikiem bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i może być wykorzystywany do wytwarzania nowych produktów probiotycznych.

Słowa kluczowe: *Bifidobacterium*, napój sojowy, oligofruktoza, przeżywalność

Wprowadzenie

Bifidobakterie były po raz pierwszy wyizolowane oraz opisane przez Tissiera w latach 1899-1900. Przedstawił on je jako beztlenowe, pałeczkowate, nieprodukujące gazu mikroorganizmy. Ich obecność stwierdzono w jelitach niemowląt karmionych piersią matki i nazwano *Bacillus bifidus*. Ogólnie można je scharakteryzować jako

Dr inż. D. Zielińska, prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C 02-776 Warszawa, mgr A.V. Sidarenka, dr G.I. Nowik, Białoruska Kolekcja Mikroorganizmów, Instytut Mikrobiologii, Białoruska Akademia Nauk.

katalazo-ujemne beztlenowce, gram dodatnie, nieprzetrwalnikujące. Mają różne kształty od krótkich zakrzywionych po rozwidlone pałeczki, np. w kształcie litery Y lub V. Taksonomia bifidobakterii była wielokrotnie zmieniana, obecnie zalicza się je do typu *Actinobacteria*. Rodzaj *Bifidobacterium* liczy ponad 30 gatunków [7, 10].

Bifidobacterium hydrolizują cukier w jelicie grubym i stanowią 25 % bakterii w jelicie dorosłego człowieka oraz 95 % u noworodków. Wytwarzają silne kwasy, takie jak kwas octowy i mlekowy, które są końcowymi produktami metabolizmu. Dzięki niskiemu pH mogą wywierać efekt antybakteryjny w organizmie. Dodatkowym atutem produkcji kwasu przez te bakterie jest dodanie protonu do toksycznego amoniaku, tak aby powstał NH_4^+ . Powoduje to obniżenie poziomu amoniaku we krwi. Bifidobakterie wytwarzają witaminy, głównie, z grupy B, ale także enzymy pokarmowe, fosfatazę kazeinową i lizozym. Ponadto niektóre składniki komórkowe tych mikroorganizmów wykazują działanie immunologiczne i powstrzymują działanie chorobotwórcze [6].

Bifidobakterie są szeroko stosowane w żywności, medycynie i w paszach dla zwierząt. Produkty zawierające te bakterie wzbogacają mikroflorę jelitową, co przyczynia się do poprawy środowiska jelit oraz zdrowia. Udowodniono, że zmniejszenie liczby komórek lub brak *Bifidobacterium* w środowisku jelita może wpłynąć negatywnie na stan zdrowia człowieka. Wiele szczepów *Bifidobacterium* wykazuje właściwości probiotyczne [8, 11].

W wielu pracach wykazano, że napój sojowy (tzw. „mleko sojowe”) jest odpowiednim medium do wzrostu bifidobakterii, niektórzy badacze twierdzą nawet, że lepszym od mleka krowiego [14, 15, 17, 18].

Soja i produkty sojowe są rozpowszechnione w krajach azjatyckich ze względu na dużą zawartość białka i niski koszt produkcji, a mniej doceniane w Europie. Soi przypisuje się wiele właściwości prozdrowotnych, m.in.: wpływ na obniżanie całkowitego poziomu cholesterolu we krwi, zmniejszanie ryzyka wystąpienia chorób sercowo – naczyniowych, nowotworów sutka i prostaty ze względu na obecność naturalnych fitoestrogenów, a także wpływ na zwiększenie gęstości mineralnej kości u kobiet, a w konsekwencji ochronę przed osteoporozą [4, 9]. Napój sojowy z dodatkiem *Bifidobacterium* mógłby być prozdrowotnym produktem probiotycznym.

Celem badań była ocena możliwości zastosowania napoju sojowego jako medium do wzrostu i przeżycia bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a także określenie wpływu dodatku cukrów (glukozy i oligofruktozy) na ich przeżywalność.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* pochodzące z Białoruskiej Kolekcji Mikroorganizmów, Instytutu Mikrobiologii, Białoruskiej Akademii Nauk: *B. adolescentis* BIM B-642 (H1), *B. animalis* ssp. *lactis* BIM B-643 (H2),

B. animalis ssp. *lactis* BIM B-644 (A6), *B. longum* BIM B-646 (H3), *B. longum* BIM B-647 (A4), *B. longum* BIM B-648 (B3).

Badane szczepy *Bifidobacterium* zostały wyizolowane od zdrowych, dorosłych ochotników. Charakteryzują się opornością na środowisko o pH = 2,0 i 4,5 % dodatek soli żółciowych, przeżywają szok termiczny (15 min/65 °C) Ponadto wykazują silne właściwości antagonistyczne w stosunku do wybranych patogenów. Są zdolne do produkcji egzopolisacharydów, nie mają plazmidów.

Nośnikiem bakterii był napój sojowy firmy Frias, wyprodukowany z nasion soi (13 %) i wody. Wartość odżywczą napoju sojowego według deklaracji producenta przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Składniki odżywcze [w 100 g] i wartość energetyczna [kcal] napoju sojowego wg deklaracji producenta. Nutrients [in 100 g] and food energy [kcal] of soy beverage according to the manufacturer's declaration.

Wartość energetyczna / Calories	32,00 kcal
Białko / Protein	3,10 g
Węglowodany / Sugars	1,00 g
Tłuszcz / Fat	1,70 g
Błonnik / Cellulose	0,3 g

Napój sojowy szczepiono 5 % (v/v) inoculum 24-godzinnej hodowli *Bifidobacterium* o liczbie komórek od 8,7 - 9,2 log jtk/ml w zależności od zastosowanego szczepu.

Badanie podzielono na dwa etapy. W pierwszej części określano wpływ procesu fermentacji na wzrost i przeżywalność bifidobakterii w napoju sojowym. W tym celu próby napoju sojowego z dodatkiem 6 badanych szczepów podzielono na dwie partie. Pierwszą z nich poddano fermentacji (37 °C/24 h), a następnie przechowywaniu w temp. 4 °C przez 14 dni, natomiast drugą partię prób nie fermentowano – po inokulacji i dokładnym wymieszaniu bezzwłocznie poddano chłodniczemu przechowywaniu (4 °C). Próby kontrolne przygotowano bez dodatku *Bifidobacterium*. W czasie 14 dni monitorowano wzrost i przeżywalność bakterii w próbach napoju sojowego.

W ramach pierwszego etapu badań określono także dynamikę wzrostu wybranego szczepu w czasie fermentacji w temp. 37 °C przez 27 h.

Druga część badań obejmowała ocenę wpływu dodatku glukozy (Glu) i oligofruktozy (OF) (Hortimex), na wzrost wybranego w pierwszym etapie szczepu bifidobakterii w napoju sojowym w czasie fermentacji (37 °C/48 h) i podczas chłodniczego przechowywania przez 14 dni. Do wszystkich prób napoju dodawano 5 % (v/v) inoculum *Bifidobacterium*. Próby różniły się dodatkiem cukrów. Układ doświadczenia przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Układ prób doświadczenia dotyczącego zbadania wpływu dodatku cukrów na wzrost i przeżywalność *Bifidobacterium* w napoju sojowym.
System of samples under experiment performed to study effect of added sugars on growth and survival of *Bifidobacterium* in soy beverage.

Próba / Sample	Objaśnienia / Explanation
K	NS bez dodatku cukrów (próba kontrolna) / SB without sugars added
1%Glu	NS z dodatkiem 1 % glukozy / SB with 1 % of glucose added
1%OF	NS z dodatkiem 1 % oligofruktozy / SB with 1 % of oligofructose added
1%Glu+1%OF	NS z dodatkiem 1 % glukozy i 1 % oligofruktozy / SB with 1 % of glucose and 1 % of oligofructose added
1%Glu+3%OF	NS z dodatkiem 1 % glukozy i 3 % oligofruktozy / SB with 1 % of glucose and 3 % of oligofructose added
1%Glu+5%OF	NS z dodatkiem 1 % glukozy i 5 % oligofruktozy / SB with 1 % of glucose and 5 % of oligofructose added

NS – napój sojowy/ SB – soy beverage

Badania mikrobiologiczne wykonywano zgodnie z normą PN-ISO:15214:2002 [12]. Liczbę komórek *Bifidobacterium* oznaczano metodą płytkową, przez posiew wgłębny na podłożu BSM (Sigma Aldrich). Posiewy inkubowano w temp. 30 °C przez 72 h.

Pomiar pH wykonywano za pomocą aparatu ELMETRON CP551. Wynik odczytywano z dokładnością 0,05.

Badanie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną wyników (analizę wariancji, test T-Studenta, współczynnik korelacji prostej) wykonano przy użyciu programu statystycznego Statistica 10.0. Przyjęto poziom istotności $p = 0,05$.

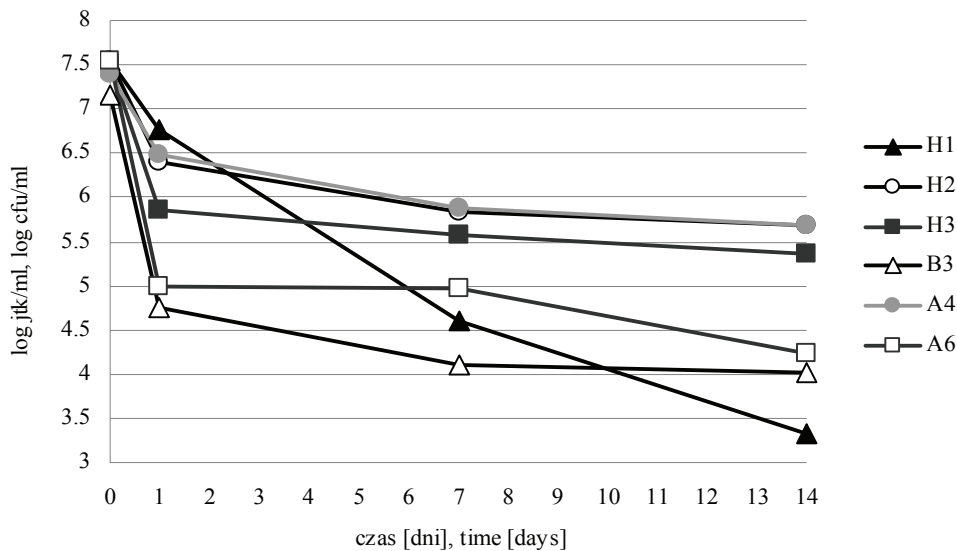
Wyniki i dyskusja

Monitorowanie zmian liczby komórek Bifidobacterium w napoju sojowym w czasie chłodniczego przechowywania

W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono, że proces fermentacji istotnie wpłynął na zmianę liczby komórek *Bifidobacterium* w napoju sojowym podczas chłodniczego przechowywania. W próbach niepoddanych fermentacji (rys. 1) liczba komórek zmniejszyła się po 1 dniu chłodniczego przechowywania z wartości 7,5 log jtk/ml do wartości 5,0 log jtk/ml w przypadku próby z dodatkiem szczepu A6 oraz do wartości 6,4 log jtk/ml w przypadku próby z dodatkiem szczepu H2. W pozostałych próbach (tj. z dodatkiem szczepów H1, H3, B3 i A4) liczba komórek bakterii znacząco

zmniejszyła się dopiero po 7 dniach chłodniczego przechowywania. W kolejnych dniach proces zamierania komórek bifidobakterii postępował we wszystkich próbach, jednak najbardziej intensywnie w próbach z dodatkiem szczepów H1 i A6. W próbach z dodatkiem szczepów H2, H3, B3 i A4 liczba komórek bakterii pomiędzy 7. a 14. dniem chłodniczego przechowywania nie zmieniła się istotnie ($p > 0,05$).

Po 24-godzinnej fermentacji w temp. 37 °C (rys. 2) liczba komórek bifidobakterii zwiększyła się istotnie (o około 2 rzędy logarytmiczne) w próbach z dodatkiem szczepów H1, H2, H3, B3 i A4 ($p < 0,05$). Tylko w próbie z dodatkiem szczepu A6 nie zaobserwowano istotnych zmian pod względem liczby komórek bakterii ($p > 0,05$). W kolejnych dniach chłodniczego przechowywania zafermentowanych prób napoju stwierdzono stabilizację do 7. dnia, a następnie zamieranie komórek bifidobakterii.

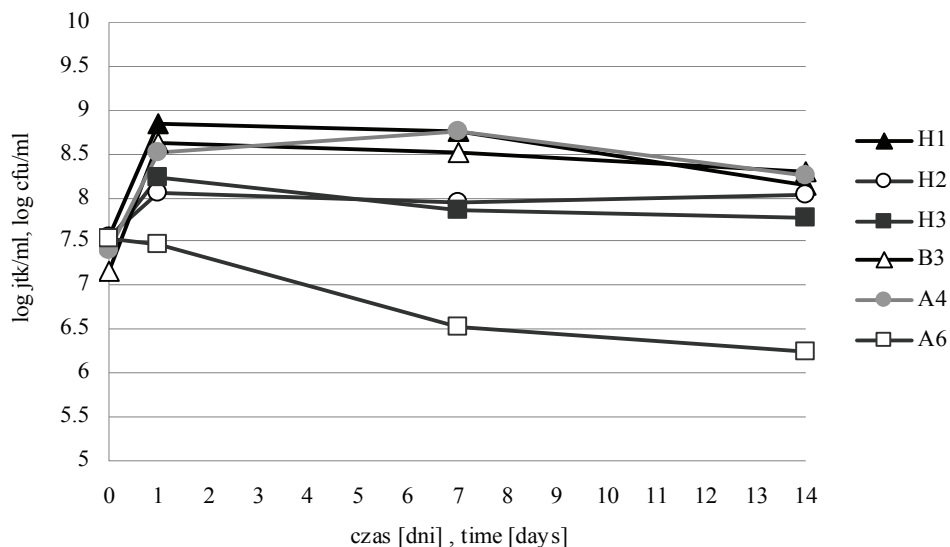


*Próba kontrolna (bez dodatku *Bifidobacterium*) < 1 log jtk/gml / Control sample (no *Bifidobacterium*) < 1 log cfu/ml added)

Rys. 1. Zmiany liczby komórek *Bifidobacterium* w napoju sojowym podczas przechowywania w temp. 4 °C.

Fig. 1. Changes in *Bifidobacterium* cells count in soy beverage during storage at temp. of 4 °C.

Warto zauważyć, że liczba komórek bifidobakterii w napojach poddanych fermentacji (z wyjątkiem próby A6) utrzymywała się na wysokim poziomie 7,7 - 8,8 log jtk/ml podczas 14 dni przechowywania w warunkach chłodniczych. Natomiast w próbach niepoddanych fermentacji liczba komórek bifidobakterii zmniejszyła się istotnie i po 14 dniach chłodniczego przechowywania w każdej z prób wynosiła < 6 log jtk/ml.



*Próba kontrolna (bez dodatku *Bifidobacterium*) < 1 log jtk/gml / Control sample (no *Bifidobacterium*) < 1 log cfu/ml added)

Rys. 2. Zmiany liczby komórek *Bifidobacterium* w napoju sojowym podczas 24-godzinnej fermentacji w temp. 37 °C, a następnie w czasie przechowywania w temp. 4 °C.

Fig. 2. Changes in *Bifidobacterium* cells count in soy beverage during 24 h fermentation at temp. 37 °C, and, next during storage at temp. of 4 °C.

Liczne badania dowodzą, że proces fermentacji wpływa na poprawę przeżywalności bifidobakterii w napoju sojowym. Chou i Hou [3] podczas przechowywania prób fermentowanego napoju sojowego przez 10 dni w temp. 5 °C nie wykazali statystycznie istotnych różnic pod względem liczby żywych komórek bakterii *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 [3]. Wang i wsp. [18] również nie stwierdzili zmniejszenia liczby żywych komórek bakterii *Bifidobacterium infantis* CCRC14633 i *Bifidobacterium longum* B6 w fermentowanym napoju sojowym podczas 10 dni chłodniczego przechowywania. Natomiast Canganella i wsp. [2] po fermentacji napoju sojowego stwierdzili zwiększenie liczby komórek *Bifidobacterium infantis*, następnie stabilizację, a w końcowych dniach chłodniczego przechowywania ich zamieranie. Doświadczenie opisane przez autorów trwało 45 dni.

Zmiany kwasowości, wyrażone wartościami pH, w próbach napojów sojowych z dodatkiem bifidobakterii zamieszczono w tab. 3. W próbach niefermentowanych kwasowość napojów nie zmieniała się istotnie podczas 14 dni przechowywania, natomiast po 24 h fermentacji wykonano istotne obniżenie wartości pH we wszystkich próbach. Zjawisko to było silnie, ujemnie skorelowane ze zwiększeniem się liczby

komórek bakterii w próbach po fermentacji ($r = -0,9$), z wyjątkiem próby z dodatkiem szczepu A6 ($r = 0,6$).

Tsangalis i Shah [16], fermentując napój sojowy różnymi kulturami bifidobakterii, stwierdzili, że wartość pH po 24 h fermentacji obniżyła się o około 1 (do wartości 5,5), w zależności od zastosowanego szczepu. Wydłużanie czasu fermentacji do 48 h nie wpłynęło istotnie na zmianę pH. Podobne rezultaty uzyskano w badaniu własnym.

Tabela 3

Wartości pH prób napoju sojowego z dodatkiem *Bifidobacterium* podczas przechowywania w temp. 4 °C. Changes in pH value of soy beverage samples with *Bifidobacterium* added during storage at temp. of 4 °C.

Szczep Strain	Kwasowość (pH) / Acidity (pH)							
	Próby niefermentowane Unfermented samples				Próby poddane fermentacji Fermented samples			
	0 h	24 h	7 d	14 d	0 h	24 h	7 d	14 d
H1	7,22±0,04	7,28±0,12	7,27±0,06	7,33±0,11	7,21±0,02	4,88±0,05	4,88±0,11	4,82±0,12
H2	7,22±0,04	7,31±0,09	7,23±0,1	7,32±0,05	7,21±0,02	5,67±0,12	5,7±0,03	5,68±0,09
H3	7,22±0,04	7,24±0,14	7,12±0,08	6,63±0,16	7,21±0,02	5,63±0,14	5,7±0,05	5,69±0,14
B3	7,22±0,04	7,29±0,11	7,24±0,02	7,32±0,12	7,21±0,02	5,04±0,09	5,05±0,07	4,98±0,04
A4	7,22±0,04	7,28±0,05	7,18±0,09	7,35±0,18	7,21±0,02	4,92±0,07	4,95±0,12	4,92±0,05
A6	7,22±0,04	7,29±0,02	7,31±0,12	7,36±0,16	7,21±0,02	4,22±0,11	4,3±0,09	4,28±0,05
K	7,22±0,04	7,3±0,10	7,26±0,04	7,24±0,04	7,21±0,02	7,2±0,03	7,18±0,05	7,18±0,02

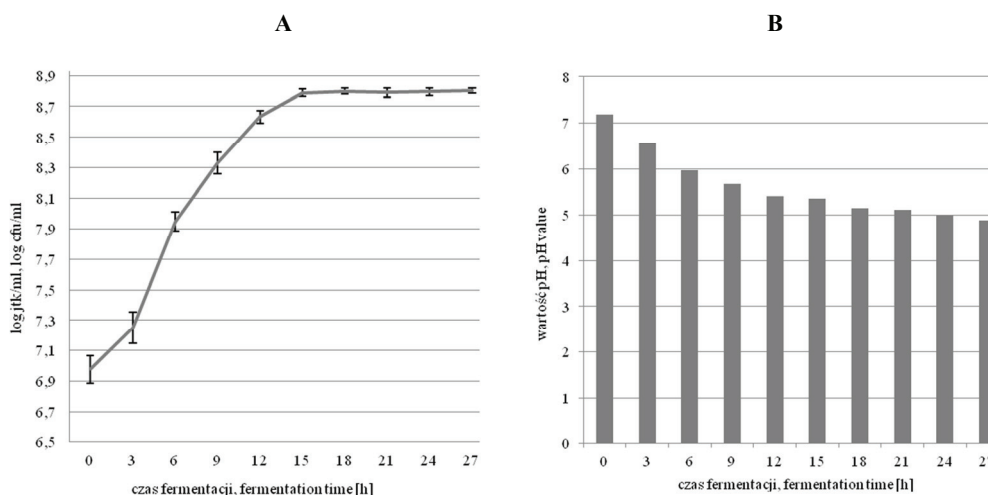
Objaśnienia / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s$ / SD; K – próba kontrolna / control sample; d – dni / days.

Biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonych doświadczeń, a przede wszystkim dobrą przeżywalność podczas chłodniczego przechowywania, do dalszych badań wytypowano szczep *B. longum* BIM B-647 (A4) i na przykładzie tego szczepu zbadano zmiany liczby komórek bakterii i zmiany kwasowości w czasie 27-godzinnej fermentacji w temp. 37 °C (rys. 3 A i B).

Stwierdzono intensywne zwiększanie liczby komórek bifidobakterii do 15. godziny fermentacji, a następnie stabilizację. Kształt krzywej wzrostu nie jest typowy dla wzrostu większości drobnoustrojów, o czym świadczy brak lag-fazy. Liczba komórek *B. longum* BIM B-647 (A4) w czasie fermentacji była skorelowana z kwasowością. Współczynnik korelacji Pearsona równy $r = -0,98$ świadczy o silnej zależności obniżania wartości pH wraz ze wzrostem liczby komórek *Bifidobacterium* w czasie fermentacji. Ponieważ po 15 h fermentacji nastąpiła stabilizacja liczby komórek bakterii (8,8 log jtk/ml), wydaje się, że ten czas jest odpowiedni i wystarczający, aby zakończyć proces fermentacji w przypadku *B. longum* BIM B-647. Po 15 h fermentacji pH próby obniżyło się do wartości 5,4, natomiast po 27 h do 4,9. *Bifidobacterium* nie mają

silnych właściwości zakwaszania środowiska. W wyniku metabolizmu glukozy produkują kwas octowy i mlekowy, najczęściej w proporcji 3 : 2 [10]. Stwierdzono, że dalsze przetrzymywanie prób w temp. 37 °C nie jest korzystne ze względów technologicznych.



Rys. 3. Zmiany liczby komórek bakterii szczepu *Bifidobacterium longum* BIM B-647 (A4) (A) oraz kwasowości (B) w napoju sojowym w czasie fermentacji w temp. 37 °C.

Fig. 3. Changes in cells count of *Bifidobacterium longum* BIM B-647 (A4) (A) strain and in acidity (B) in soy beverage during 24 h fermentation at temp. of 37 °C.

Wpływ dodatku glukozy i oligofruktozy na wzrost *Bifidobacterium* w napoju sojowym w czasie fermentacji i chłodniczego przechowywania

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono wpływ dodatku glukozy i oligofruktozy na wzrost *Bifidobacterium longum* BIM B-647 w napoju sojowym w czasie fermentacji w temp. 37 °C w porównaniu z próbą kontrolną (tab. 4). Istotne zwiększenie liczby komórek bakterii po 24 h wykazano w przypadku prób z dodatkiem 1 % glukozy i 1 % oligofruktozy oraz 1 % glukozy i 3 % oligofruktozy ($p < 0,05$), natomiast po 48 h fermentacji liczba komórek bakterii istotnie zwiększyła się we wszystkich próbach z dodatkiem oligofruktozy ($p < 0,05$). Stwierdzono, że w próbach z dodatkiem oligofruktozy nastąpiło większe zakwaszenie, po 48 h fermentacji pH zmniejszyło się do wartości $< 4,6$. Natomiast w próbie z dodatkiem 1 % glukozy i w próbie kontrolnej wartości pH były $> 4,6$ nawet po 48 h fermentacji.

Tabela 4

Wzrost i przeżywalność *B. longum* BIM B-647 (A4) w napoju sojowym podczas fermentacji w temp. 37 °C, w zależności od dodatku glukozy i oligofruktozy.

Growth and survival of *B. longum* BIM B-647 (A4) in the soy beverage during fermentation at 37 °C depending on the addition of glucose and oligofructose.

Próba Sample	Liczba bakterii [jtk/ml] Count of bacteria [cfu/ml]			Kwasowość (pH) Acidity (pH)		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
K	7,02 ± 0,06	8,79 ± 0,06	8,72 ± 0,06	7,2 ± 0,06	4,99 ± 0,08	4,7 ± 0,07
1%Glu	7,14 ± 0,08	8,9 ± 0,13	8,88 ± 0,13	7,2 ± 0,04	4,92 ± 0,06	4,64 ± 0,13
1%OF	7,11 ± 0,04	9,05 ± 0,08	9,02 ± 0,09	7,2 ± 0,09	4,77 ± 0,11	4,37 ± 0,07
1%Glu+1%OF	6,92 ± 0,09	9,26 ± 0,13	9,36 ± 0,12	7,2 ± 0,12	4,83 ± 0,15	4,26 ± 0,08
1%Glu+3%OF	7,05 ± 0,02	9,53 ± 0,1	9,73 ± 0,06	7,2 ± 0,03	4,74 ± 0,03	4,28 ± 0,15
1%Glu+5%OF	7,03 ± 0,05	9,39 ± 0,19	9,82 ± 0,04	7,2 ± 0,11	4,73 ± 0,06	4,27 ± 0,04

Objasnienie: / Explanatory note:

$\bar{x} \pm s / SD$.

Na działalność mikroorganizmów wpływ ma rodzaj i ilość pożywienia w środowisku. Cukry obecne w podłożu, zarówno glukoza, jak i wielocukry (np. prebiotyki) mogą stanowić źródło węgla, które bakterie są w stanie metabolizować. Zależność pomiędzy zawartością cukrów w podłożu a czasem generacji komórek nie zawsze jest zależnością prostą [19].

W tab. 5. przedstawiono wyniki dotyczące przeżywalności *Bifidobacterium longum* BIM B-647 (A4) w fermentowanym napoju sojowym podczas 14 dni chłodniczego przechowywania prób z dodatkiem glukozy i oligofruktozy. We wszystkich próbach stwierdzono zamieranie komórek bakterii. Podobne badania wykonali Bożanić i wsp. [1], którzy stwierdzili, że 5 % dodatek glukozy spowodował stabilizację oraz wydłużenie fazy stacjonarnej żywotności komórek *Bifidobacterium* spp. w napoju sojowym, w porównaniu z próbą bez dodatku glukozy. Bakterie utrzymywały się na poziomie ok. 7,5 log jtk/ml przez 28 dni. Jednakże w przypadku niniejszych doświadczeń stężenie glukozy było mniejsze, czym można tłumaczyć efekt, który zauważono, po zastosowaniu dodatku tego cukru.

Liczne badania wykazują, że dodatek prebiotyków stymuluje wzrost, a także wydłuża fazę stacjonarną *Bifidobacterium*, podczas przechowywania żywności [5, 13, 15, 17, 19].

Tabela 5

Przeżywalność *B. longum* BIM B-647 (A4) w napoju sojowym po fermentacji, podczas 14 dni chłodniczego przechowywania, w zależności od dodatku glukozy i oligofruktozy.

Growth and survival of *B. longum* BIM B-647 (A4) in soy beverage after fermentation, during 14 days of cold storage depending on the addition of glucose and oligofructose.

Próba Sample	Liczba bakterii [jtk/ml] Count of bacteria [cfu/ml]			Kwasowość (pH) Acidity (pH)		
	0 d	7 d	14 d	0 d	7 d	14 d
K	8,72 ± 0,06	8,2 ± 0,13	7,8 ± 0,07	4,7 ± 0,07	4,71 ± 0,06	4,74 ± 0,12
1 % Glu	8,88 ± 0,13	8,54 ± 0,07	8,03 ± 0,1	4,64 ± 0,13	4,6 ± 0,04	4,57 ± 0,07
1 % OF	9,02 ± 0,09	8,92 ± 0,04	8,87 ± 0,09	4,37 ± 0,07	4,35 ± 0,09	4,32 ± 0,02
1 % Glu+1 % OF	9,36 ± 0,12	9,07 ± 0,16	8,5 ± 0,18	4,26 ± 0,08	4,29 ± 0,03	4,27 ± 0,08
1 % Glu+3 % OF	9,73 ± 0,06	9,57 ± 0,16	8,7 ± 0,12	4,28 ± 0,15	4,28 ± 0,11	4,24 ± 0,04
1 % Glu+5 % OF	9,82 ± 0,04	9,05 ± 0,25	8,8 ± 0,14	4,27 ± 0,04	4,26 ± 0,06	4,24 ± 0,07

Objaśnienia / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s$ / SD; K – próba kontrolna / control sample; d – dni / days.

Stwierdzenia i wnioski

1. Proces fermentacji (37 °C/24 h) spowodował wzrost liczby komórek *Bifidobacterium* spp. w napoju sojowym i wpłynął na ich większą przeżywalność podczas przechowywania w temperaturze 4 °C.
2. Wybrany szczep *B. longum* BIM B-647 charakteryzował się znacznym wzrostem komórek bakterii (powyżej 8,7 log jtk/ml) w ciągu 15 h fermentacji.
3. Dodatek oligofruktozy wpłynął istotnie na zwiększenie liczby komórek *B. longum* BIM B-647 (A4) po fermentacji, a także na przeżywalność komórek podczas chłodniczego przechowywania napoju sojowego.
4. Napój sojowy jest dobrym nośnikiem bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i może być stosowany do otrzymywania nowych produktów probiotycznych.

Badania zrealizowano w ramach Programu Wykonawczego z Republiką Białorusi na lata 2011-2013 „Próba izolacji i charakterystyka bakterii probiotycznych oraz zastosowanie w wybranych produktach żywnościowych”

Literatura

- [1] Bożanić R., Pletikapić G., Lovković S.: Influence of temperature and glucose addition on growth and survival of bacteria from BCT culture in soymilk. *Mljekarstvo*, 2008, **58** (2), 171-179.
- [2] Canganella F., Giontella D., Nespica M.L., Massa S., Trovatelli L.D.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* in yogurts manufactured from cow's milk and soymilk during storage at two temperatures. *Annals of Microbiology*, 2000, **50** (1), 43-53.

- [3] Chuo CC., Huo JW.: Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **56** (2-3), 113-121.
- [4] Cichocka A.: Korzyści zdrowotne ze spożywania produktów sojowych. *Przem. Spoż.*, 2005, **9** (59), 41-43.
- [5] Donkor O., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P.: Rheological Properties and Sensory Characteristics of Set-Type Soy Yogurt. 2007.
- [6] Gibson G.R., Roberfroid, M.B.: Dietary modulation of the human colonie microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 1995, **125** (6), 1401-1412.
- [7] Gomes A.M.P., Malcata F.X.: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10** (4-5), 139-157.
- [8] Inhibashi N., Yaeshima T., Hayasawa H.: Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malaysian J. Nutr.*, 1997, **3** (2), 149-159.
- [9] Kanadys W., Oleszczuk J.: Izoflawony a utrata masy kostnej u kobiet w okresie pomenopauzalnym. I. Wpływ produktów i preparatów z soi na metabolizm kostny. *Postępy Fitoterapii*, 2007, **3**, 136-144.
- [10] Libudzisz Z.: Bakterie fermentacji mlekowej W: *Mikrobiologia techniczna*. Red. Z. Libudzisz., K. Kowal, Z. Żakowska: t. 2. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2008, ss. 25-58.
- [11] Mitsuoka T.: Bifidobacteria and their role in human health. *J. Indus. Microbiol.*, 1990, **6**, 263-268.
- [12] PN-ISO: 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [13] Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zaroni S., Matteuzzi D.: Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Envir. Microbiol.*, 2005, **71** (10), 6150-6158.
- [14] Shimakawa Y., Matsubara S., Yuki N., Ishikawa F.: Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **81**, 131-136.
- [15] Swidan N.: Factors affecting the growth and survival of probiotic in milk. Cardiff School of Health Sciences University of Wales Institute, Cardiff, United Kingdom, 2009.
- [16] Tsangalis D., Shah N.P.: Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2004, **39**, 541-554.
- [17] Varga L., Süle J., Szigeti J.: Stimulation of probiotics lactobacilli and bifidobacteria in cultured dairy foods. International Scientific Conference on Sustainable Development & Ecological Footprint, Sopron, Hungary, March 26-27, 2012.
- [18] Wang Y-C., Yu R-C., Chou C-C.: Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiology*, 2002, **19** (5), 501-508.
- [19] Yeo S-K i Liong M-T: Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics soymilk. *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 267-275.

GROWTH AND SURVIVAL OF *BIFIDOBACTERIUM* IN SOY BEVERAGE

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the potential use of soy beverage as a medium for the growth and survival of *Bifidobacterium* and, also, to determine the effect of added sugars on the survival thereof. The study was divided into two stages: at the first stage, the growth and survival of *Bifidobacterium* strains were studied in fermented and unfermented soy beverage. At the second stage, the effect of added sugars (glucose and oligofructose) was investigated on the growth and survival of a selected *Bifidobacterium* strain in the soy beverage.

The soy beverage was inoculated with a 5 % (v/v) inoculum of the 24-hour culture of the *Bifidobacterium* population, its count being between 8.7 and 9.2 log cfu/ml depending on the strain applied. In the unfermented samples, after 7 days of refrigerated storage thereof, the number of cells significantly decreased to a value of 5.8 - 4.1 cfu/ml. However, after fermentation (37 °C/24 h), the number of *Bifidobacterium* cells increased by approximately 2 logarithmic orders, except for the sample with the A6 strain added. The selected strain of *B. longum* BIM B-647 was characterized by a high biomass production (already after 15 h fermentation) > 8.7 log cfu/ml. The addition of oligofructose significantly impacted the increase in the number of *B. longum* BIM B-647 cells in the soy beverage during fermentation and it also caused the stationary phase during cold storage of the samples to extend. The soy drink is a good carrier for the *Bifidobacterium* and it can be used to produce new probiotic foods.

Key words: *Bifidobacterium*, soy beverage, oligofructose, survival ☒