

JUSTYNA KOZIÓŁ, KATARZYNA SKRZYPCZAK, WALDEMAR GUSTAW,  
ADAM WAŚKO

## WPLYW PREPARATÓW BIAŁEK MLEKA NA WZROST BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

### Streszczenie

Probiotyczne szczepy z rodzaju *Bifidobacterium* słabo namnażają się w mleku. Celem niniejszej pracy była modyfikacja podłoża Garchesa przez zmianę źródła azotu na wybrane preparaty białek mleka oraz sprawdzenie ich zdolności do stymulowania wzrostu bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium*. Najwyższą aktywnością proteolityczną charakteryzowały się szczepy Bi30 i KD14, nieznacznie niższe wartości oznaczono w przypadku pozostałych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*. Najkorzystniejszą dla wzrostu szczepu Bb-12 pożywką z dodatkiem preparatów białek serwatkowych było podłoże zawierające izolat białek serwatkowych (WPI) ( $1,2 \times 10^8$  jtk/ml). Na podstawie wyników uzyskanych po hodowli szczepu KN29 stwierdzono, że składnikiem podłoża hodowlanego zaprojektowanego przy użyciu modelu Placketta-Burmana, w największym stopniu stymulującym wzrost tego szczepu, były WPI oraz  $\alpha$ -laktoalbumina ( $\alpha$ -la). Największe zagęszczenia komórek bakterii szczepu Bb-12 i KN29 uzyskano podczas wzrostu na podłożach z dodatkiem kazeinianu sodu (KNa) i kazeinianu wapnia (KCa), a w przypadku preparatów białek serwatkowych – WPI i  $\alpha$ -la.

**Słowa kluczowe:** *Bifidobacterium*, aktywność proteolityczna, plan Placketta-Burmana, WPI,  $\alpha$ -laktoalbumina

### Wprowadzenie

Wraz z poznaniem pozytywnego wpływu bakterii fermentacji mlekowej na zdrowie człowieka podjęto próby stosowania konkretnych gatunków, a nawet szczepów bakterii do produkcji mlecznych napojów fermentowanych. Probiotyczne szczepy z rodzaju *Bifidobacterium* słabo namnażają się w mleku. Przebadano wiele substancji o właściwościach prebiotycznych, które mogłyby zostać włączone w skład produktów mlecznych [9, 10]. W literaturze publikowane są liczne informacje dotyczące stymulowania wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* przez oligosacharydy [7, 11, 18,

---

*Dr J. Koziół, mgr inż. K. Skrzypczak, dr A. Waśko, Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności; dr hab. W. Gustaw, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów; Wydż. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin*

26, 28]. Znacznie mniej badań dotyczyło wykorzystania różnych białek mleka jako substancji stymulujących wzrost bakterii probiotycznych.

Białka mleka mają bogaty skład aminokwasowy i zawierają wszystkie niezbędne aminokwasy, które są źródłem azotu organicznego dla bakterii [12, 17]. Kazeinoma-kropeptyd (CMP) wzbudził największe zainteresowanie wśród białek mleka ze względu na jego właściwości stymulujące wzrost bakterii probiotycznych. W badaniach nad wpływem CMP na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* nie uzyskano jednak jednoznacznych wyników. Azuma i wsp. [1] zaobserwowali stymulujący wpływ CMP wyizolowanego z mleka kobycego na wzrost *B. infantis*. Poch i Bezkorovainy [24] nie stwierdzili podobnej zależności przy wykorzystaniu CMP z mleka krowiego. Natomiast Idota i wsp. [15] z powodzeniem wykorzystali CMP z mleka krowiego jako stymulator wzrostu *Bifidobacterium* spp. Odmiennie wyniki prawdopodobnie były spowodowane różną zawartością aminocukrów w CMP pochodzącym z mleka kobycego i krowiego – ich udział w CMP z mleka krowiego jest trzy razy mniejszy [22]. Udowodniono również wpływ kazeinianu sodu na stymulację wzrostu bakterii probiotycznych. Mleczne napoje fermentowane suplementowane tym dodatkiem charakteryzowały się większą liczbą komórek *B. animalis* ssp. *lactis* niż produkty, w których źródłem białka było tylko odtłuszczone mleko w proszku. Określono również wpływ różnych kombinacji preparatów białkowych, z których najlepszymi stymulatorami wzrostu *B. animalis* ssp. *lactis* okazał się koncentrat białek serwatkowych (WPC), zastosowany wraz z kazeinianem sodu oraz odtłuszczone mlekiem w proszku. Na tym podłożu liczba bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wynosiła 7,8 log jtk/ml w porównaniu z 6,9 log jtk/ml w próbie kontrolnej [21].

Celem niniejszej pracy była modyfikacja podłoża Garchesa przez zmianę źródła azotu na wybrane preparaty białek mleka i określenie ich zdolności do stymulowania wzrostu bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium*.

### **Material i metody badań**

W badaniach zastosowano następujące preparaty białek mleka: odtłuszczone mleko w proszku (OMP) (OSM Krasnystaw), koncentraty białek serwatkowych WPC 35 (Laktopol, Warszawa), WPC 65 i WPC 80 (Milei, Leutkirch, Niemcy), izolat białek serwatkowych (WPI) (Milei, Leutkirch, Niemcy), serwatkę w proszku (SP) (OSM Krasnystaw), serwatkę w proszku demineralizowaną (SPD) (Euroserum, Port-sur-Saône, Francja), serwatkę w proszku o obniżonej zawartości laktozy (SPOL) (Foremokus Baraboo, WI, USA), kazeinoglikomakropeptyd (CGMP) i  $\alpha$  - laktoalbuminę ( $\alpha$ - la) (Arla Food, Dania), kazeinian sodu (KNa) i wapnia (KCa) (Polsero, Sokołów Podlaski). Skład chemiczny preparatów przedstawiono w tab. 1.

W badaniach wykorzystano również ekstrakt drożdżowy, peptobak, i chlorowodorek cysteiny (BTL Polska), laktozę (PARK Scientific Ltd. Northampton, U. K), octan sodu, wodorofosforan sodu i diwodorofosforan potasu (POCH, Gliwice).

W badaniach użyto następujących szczepów bakterii: Bb-12 – *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (Chr. Hansen, Polska), ATCC1567 – *Bifidobacterium infantis* (American Type Culture Collection), KN29 – *Bifidobacterium longum*, KD14 – *Bifidobacterium catenulatum* i Bi30 – *Bifidobacterium animalis* (PAN, Olsztyn).

Tabela 1

Skład chemiczny preparatów białek mleka (wg producentów) [%].

Chemical composition of milk protein preparations (by manufacturers) [%].

| Lp. No. | Preparat<br>Preparate | Białko<br>Protein | Laktoza<br>Lactose | Tłuszcz<br>Fat | Zw. miner. jako popiół<br>Ash | Woda<br>Water |
|---------|-----------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------------------------|---------------|
| 1.      | OMP                   | 32,40             | 51,20              | 0,75           | –                             | 3,35          |
| 2.      | PMP                   | 26,00             | 38,00              | 26,25          | –                             | 3,15          |
| 3.      | WPC 35                | 35,50             | 48,50              | 3,70           | 7,70                          | 4,50          |
| 4.      | WPC 65                | 65,00             | 20,00              | 5,00           | 4,00                          | 5,00          |
| 5.      | WPC80                 | 80,00             | 5,00               | 5,00           | 3,00                          | 5,00          |
| 6.      | WPI                   | 90,00             | 1,00               | 1,00           | 2,00                          | 5,00          |
| 7.      | SP                    | 10,10             | 69,20              | 8,50           | 8,10                          | 3,90          |
| 8.      | SPD                   | 12,50             | 79,90              | 1,30           | 2,70                          | 3,10          |
| 9.      | SPOL                  | 23,70             | –                  | –              | 14,80                         | 2,81          |
| 10.     | CGMP                  | 85,00             | 2,00               | 0,50           | 6,50                          | 5,00          |
| 11.     | α-LA                  | 88,00             | 10,00              | 2,00           | 5,00                          | 5,50          |
| 12.     | KNa                   | 88,20             | –                  | 1,50           | –                             | 5,80          |
| 13.     | KCa                   | 88,15             | –                  | 1,50           | –                             | 5,95          |

*Określenie wpływu składników podłoża na wzrostu szczepów z rodzaju Bifidobacterium z wykorzystaniem planu Placketta-Burmana*

Wpływ wybranych preparatów białek mleka na wzrost szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* badano, wykorzystując plan Placketta-Burmana. Skład kombinacji podłoży hodowlanych Garchesa wyznaczono za pomocą programu statystycznego Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Obejmował on 12 podłoży bulionu Garchesa o zróżnicowanym składzie (tab. 2).

Tabela 2

Skład podłoży hodowlanych Garchesa po modyfikacjach.  
Modification of the Garches media composition.

| Nr podłoża<br>Medium No. | Składniki podłoża / Compounds in medium |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                          | A                                       | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K |
| 1.                       | +                                       | - | + | - | + | - | + | + | + | - | - |
| 2.                       | +                                       | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - |
| 3.                       | -                                       | + | + | - | + | + | + | - | - | + | - |
| 4.                       | +                                       | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + |
| 5.                       | +                                       | + | - | + | - | - | + | - | + | + | - |
| 6.                       | +                                       | + | + | - | - | - | - | + | - | + | + |
| 7.                       | -                                       | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 8.                       | -                                       | - | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 9.                       | -                                       | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + |
| 10.                      | +                                       | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| 11.                      | -                                       | + | - | - | - | + | + | + | + | - | + |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

A – ekstrakt drożdżowy/ yeast extract, B – peptobak, C – chlorowodorek cysteiny/ cysteine hydrochloride, D – laktoza/ lactose, E – octan sodu/ sodium acetate, F – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, G – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H – WPI, I – WPC 80, J – CGMP, K – α-la.

Szczepy *Bifidobacterium* przechowywano w sterylnym roztworze glicerolu w temp. -80 °C. W celu przygotowania inoculum odważano składniki bulionu Garchesa o podstawowym składzie [27]. Zawiesiny komórek bakteryjnych przenoszono po 100 µl do przygotowanego wcześniej bulionu Garchesa. Zaszczepione pożywki inkubowano w cieplarni w temp. 37 °C przez 24 h. Otrzymane inoculum służyło do zaszczepiania właściwych podłoży hodowlanych. Hodowle wszystkich szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* prowadzono w probówkach, w 10 ml jałowego bulionu Garchesa o zmodyfikowanym składzie. Każde z 12 podłoży sporządzano w dwóch powtórzeniach. Podłoża zaszczepiano 100 µl inoculum oraz zatykano watą. Korki nasączano 250 µl 30-procentowego roztworu pirogalolu oraz 250 µl nasyconego roztworu kwasnego węgla sodu. Dodatkowo próbki zamykano gumowymi korkami w celu zapewnienia beztlenowych warunków wzrostu. Hodowle prowadzono w cieplarni w temp. 37 °C przez 72 h. Po inkubacji szczepów bakteryjnych na podłożach z dodatkiem komponentów białkowych wykonywano szereg rozcieńczeń hodowli płynnych w celu przygotowania posiewów płytkowych. Inkubację płytek prowadzono w słojach do hodowli beztlenowych (OXOID, Hampshire, UK) z użyciem wkładów AnaeroGEN

(OXOID, Hampshire, UK). Hodowle prowadzono przez 72 h w temp. 37 °C. Po zakończeniu hodowli bakteryjnych obliczano ogólną liczbę bakterii [20].

*Określenie wpływu wybranych preparatów białek mleka na dynamikę wzrostu szczepów z rodzaju Bifidobacterium z wykorzystaniem pomiaru gęstości optycznej hodowli bakteryjnych (OD)*

Podłoża hodowlane sterylizowano w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 min. Po wystudzeniu każdą z pożywek przenoszono za pomocą pipety automatycznej do dołków na mikropłytkach hodowlanych (każda mikropłytką zawierała 100 ponumerowanych dołków) w ilości 350 µl do każdego dołka. Każdy rodzaj podłoża hodowlanego o zmodyfikowanym składzie przenoszony był do 10 dołków, z czego dwa pierwsze stanowiły próbę kontrolną (do nich przenoszono po 400 µl podłoża hodowlanego), natomiast pozostałe zaszczepiano 50 µl inoculum. Hodowle bakteryjne prowadzono w aparacie Bioscreen C (OY Growth Curves, Finlandia) w temp. 37 °C przez 96 h.

*Oznaczanie aktywności proteolitycznej szczepów z rodzaju Bifidobacterium*

Aktywność proteolityczną oznaczano metodą OPA [4]. W celu oznaczenia tej aktywności poszczególne szczepy namnażano na podłożu MRS w temp. 37 °C przez 12 h. Do 10-procentowego regenerowanego mleka odtłuszczonego dodawano 1% zawiesiny komórek bakteryjnych. Po dokładnym wymieszaniu próbki inkubowano w temp. 37 °C przez 24 h, łącznie z próbą kontrolną (mleko bez dodatku bakterii). Do 2,5 ml fermentowanego mleka, dokładnie wymieszanego przy użyciu vortexu, dodawano 0,5 ml wody destylowanej i 5 ml 0,75 M TCA (kwas trichlorooctowy) (Sigma-Aldrich, Polska), po czym mieszano do czasu koagulacji mleka. Do odwirowanego (13000 × g przez 15 min.) i przeniesionego do kwarcowej kuwety supernatantu (50 µl) dodawano 1 ml OPA (FLUKA, Buchs, Szwajcaria). Po wymieszaniu roztwór inkubowano przez 2 min. w temp. otoczenia. Następnie mierzono absorbancję ( $\lambda = 340$  nm) w stosunku do próby kontrolnej, przy użyciu spektrofotometru BIO-RAD Smart Spec<sup>TM</sup> Plus (Hercules, USA). Obliczano ilość uwolnionych  $\alpha$ -aminokwasów (mM/l). Analizę wykonywano w trzech powtórzeniach.

*Analiza statystyczna*

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi szacowano testem Tukeya na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## **Wyniki i dyskusja**

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* potrzebują do wzrostu wolnych aminokwasów i peptydów w podłożu. Mleko jest słabą pożywką dla bakterii probiotycznych, co

prawdopodobnie wynika z niewielkiej zawartości wolnych aminokwasów, jak i słabej aktywności proteolitycznej bakterii, szczególnie z rodzaju *Bifidobacterium* [24, 29]. W tab. 3. przedstawiono aktywność proteolityczną badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*. Najwyższą aktywnością proteolityczną charakteryzowały się szczepy Bi30 i KD14, nieznacznie niższe wartości oznaczono w przypadku pozostałych szczepów *Bifidobacterium*.

Tabela 3

Aktywność proteolityczna szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* [mM/l].

Proteolytic activity of strains of *Bifidobacterium* genus [mM/l].

| Bb-12<br>$\bar{x} \pm s / SD$ | ATCC1567<br>$\bar{x} \pm s / SD$ | KN29<br>$\bar{x} \pm s / SD$ | KD14<br>$\bar{x} \pm s / SD$ | Bi30<br>$\bar{x} \pm s / SD$ |
|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 991 <sup>a</sup><br>± 147     | 1061 <sup>a</sup><br>± 10        | 907 <sup>a</sup><br>± 103    | 1524 <sup>b</sup><br>± 201   | 1693 <sup>b</sup><br>± 80    |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s / SD$  – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation;

Różnice między wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ) / Differences between mean values denoted by different letters are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Donkor i wsp. [8], po przeanalizowaniu zdolności proteolitycznych *B. lactis* B94 i *B. longum* Bl 536 po 24 h fermentacji, stwierdzili, że były one o około 50 % mniejsze w porównaniu z *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. W badaniach poświęconych określeniu wpływu wybranych bakterii probiotycznych na proteolizę serów podczas dojrzewania stwierdzono, że *B. lactis* nie wykazał żadnej działalności proteolitycznej w przeciwieństwie do *L. acidophilus* [2].

W tab. 4. przedstawiono wyniki badań liczby szczepów *Bifidobacterium* hodowanych na modyfikowanych podłożach Garchesa. Skład podłoży wyliczono, stosując plan Placketta-Burmana zgodnie z wcześniej stosowaną metodyką [25, 30]. Najkorzystniejszym podłożem hodowanym z dodatkiem preparatów białek serwatkowych do wzrostu szczepu Bb-12 okazało się podłoże nr 2, zawierające WPI ( $1,2 \times 10^8$  jtk/ml). W przypadku szczepu ATCC1567 najlepszą kombinacją było również podłoże nr 2 zawierające WPI ( $4,9 \times 10^7$  jtk/ml). W przypadku szczepu KB14 stwierdzono, że najlepszymi zmodyfikowanymi podłożami hodowanymi były kombinacje nr 4 ( $3,1 \times 10^7$  jtk/ml), 5 ( $3,1 \times 10^7$  jtk/ml) i 6 ( $3,1 \times 10^7$  jtk/ml). W skład tych podłoży wchodziły następujące preparaty białek mleka: CGMP, WPC80 jak i  $\alpha$ -la. Szczep KN29 namnażał się najlepiej na podłożu zmodyfikowanym nr 5 ( $2,4 \times 10^7$  jtk/ml), zawierającym CGMP oraz WPC80. Natomiast najlepszą pożywką dla szczepu Bi30 było podłoże nr 7 ( $6,5 \times 10^7$  jtk/ml), w którym jako komponenty białkowe zastosowano WPC80 oraz  $\alpha$ -la.

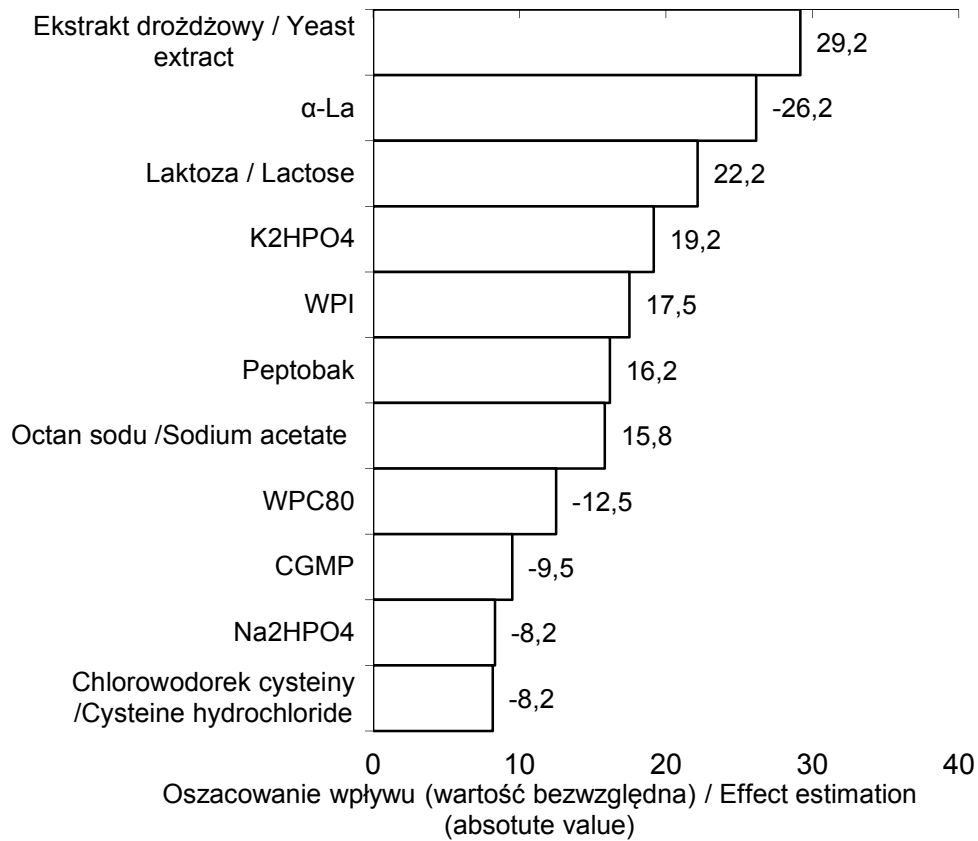
Tabela 4

Liczba bakterii różnych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* na podłożu Garches o zmodyfikowanym składzie wyznaczonym wg planu Placketta-Burmana [jtk/ml].

Bacteria count of different strains of *Bifidobacterium* genus in Garches medium having composition modified according to Plackett-Burman design [cfu/ml].

| Nr podłoża<br>Culture medium number | Bb-12             | ATCC1567          | KB14              | Kn29              | Bi30              |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1                                   | $3,3 \times 10^7$ | $2,8 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^7$ |
| 2                                   | $1,2 \times 10^8$ | $4,9 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^7$ | $3,7 \times 10^6$ |
| 3                                   | $8,0 \times 10^6$ | $4,9 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^7$ | $6,4 \times 10^6$ | $2,2 \times 10^7$ |
| 4                                   | $4,4 \times 10^7$ | $9,0 \times 10^6$ | $3,1 \times 10^7$ | $5,6 \times 10^6$ | $3,2 \times 10^7$ |
| 5                                   | $2,0 \times 10^7$ | $3,4 \times 10^7$ | $3,1 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^7$ | $2,7 \times 10^7$ |
| 6                                   | $1,9 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^7$ | $9,0 \times 10^6$ | $5,0 \times 10^7$ |
| 7                                   | $2,4 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^6$ | $7,6 \times 10^6$ | $6,5 \times 10^7$ |
| 8                                   | $1,2 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^7$ |
| 9                                   | $1,1 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ | $9,5 \times 10^6$ | $9,4 \times 10^6$ | $1,9 \times 10^7$ |
| 10                                  | $1,6 \times 10^7$ | $2,6 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^7$ |
| 11                                  | $2,2 \times 10^7$ | $3,7 \times 10^6$ | $1,2 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ | $3,1 \times 10^6$ |
| 12                                  | $3,1 \times 10^1$ | $5,0 \times 10^1$ | $1,0 \times 10^2$ | $8,6 \times 10^1$ | $1,5 \times 10^2$ |

Wyniki badań przedstawione w tab. 4. poddano analizie wariancji z zastosowaniem programu statystycznego Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Poszczególne składniki wchodzące w skład podłoża hodowlanych wpływały w różnym stopniu na wzrost analizowanych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Preparaty białkowe, takie jak: WPI, i  $\alpha$ -la stymulowały wzrost badanych szczepów bakteryjnych. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunkach 1 – 3. Najlepszym komponentem wpływającym na wzrost szczepu Bb-12 był ekstrakt drożdżowy oraz  $\alpha$ -la (rys. 1). Wartości ujemne widoczne przy niektórych składnikach podłoża wskazywały na zastosowanie ich w maksymalnej ilości w podłożu. Większa ilość danego składnika nie będzie miała dodatkowego wpływu na wzrost badanego szczepu bakterii. Wodorofosforan sodu i chlorowodorek cysteiny nie miały większego wpływu na namnażanie się szczepu Bb-12.

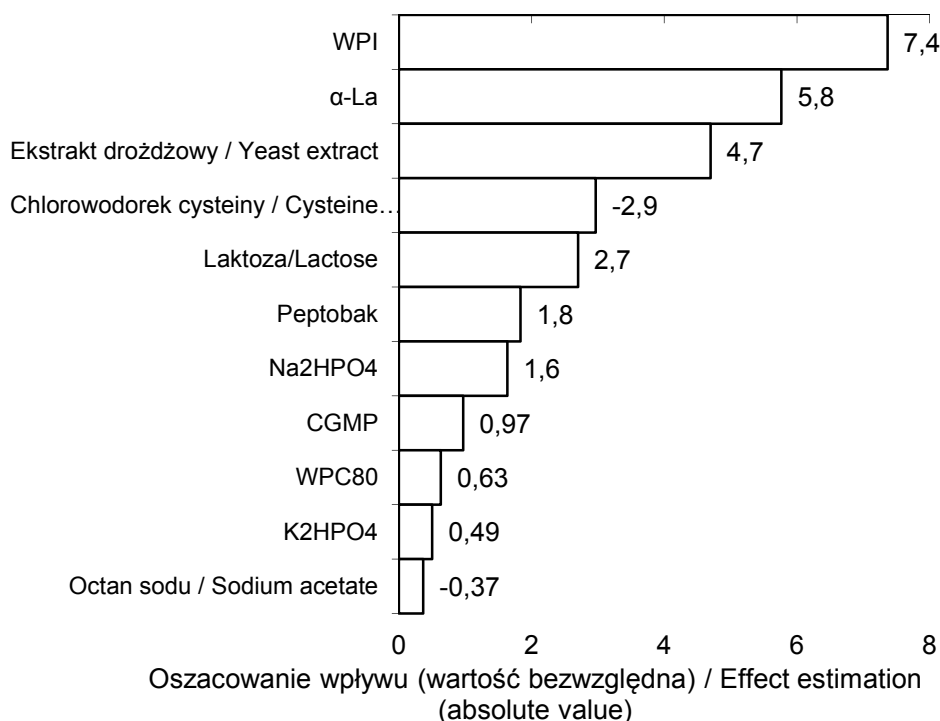


Rys. 1. Wpływ komponentów podłoża na wzrost szczepu *B. animalis* ssp. *lactis* - Bb-12.

Fig. 1. Effect of medium components on growth of *B. animalis* ssp. *lactis* - Bb-12 strain.

Składnikami podłoża hodowlanego w największym stopniu stymulującym wzrost szczepu KN29 były WPI (7,4) oraz  $\alpha$ -la (5,8) (rys. 2). Na wzrost badanego szczepu najslabszy wpływ miały K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,49) oraz octan sodu (-0,37). Najlepszym stymulatorem wzrostu szczepu ATCC1567 był ekstrakt drożdżowy (18,2). Udziały laktozy (9,6) oraz  $\alpha$ -la (9,5) były na podobnym poziomie. Wpływ CGMP (0,87) był nieistotny w stymulacji wzrostu szczepu ATCC1567.





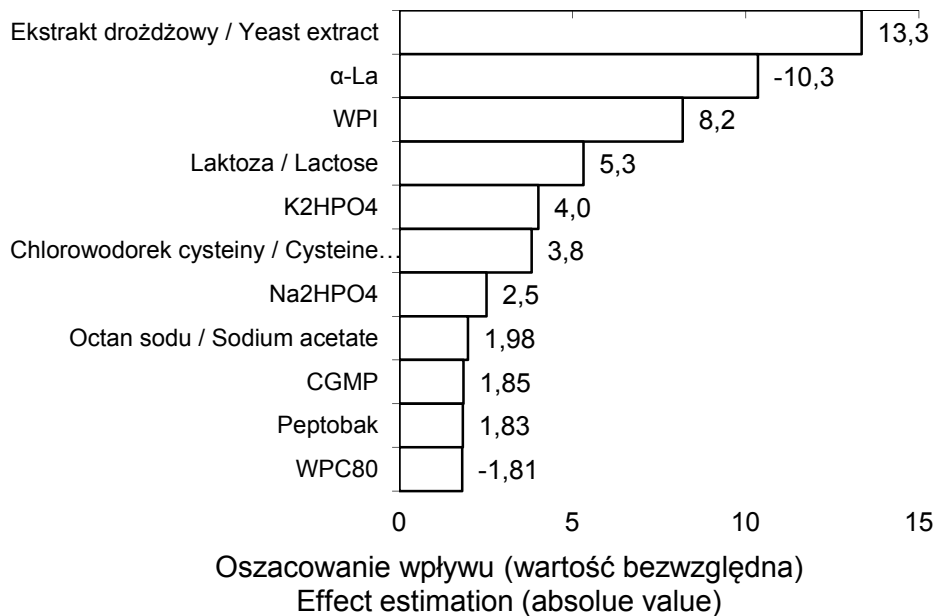
Rys. 2. Wpływ komponentów podłoża na wzrost szczepu *B. longum* -KN29.

Fig. 2. Effect of medium components on growth of *B. longum* -KN29 strain.

Substancjami, które najlepiej stymulowały wzrost szczepu KD14 okazały się ekstrakt drożdżowy (13,3) oraz  $\alpha$ -la (-10,3) (rys. 3). Nieznacznie mniejszy wpływ na wzrost wyżej wymienionego szczepu miał WPI (8,2). Jednak w porównaniu z pozostałymi składnikami podłoża hodowlanego jego udział w stymulacji wzrostu KD14 można określić jako znaczny. Najmniejszy wpływ na namnażanie szczepu KD14 wywierał dodatek WPC80 (-1,81).

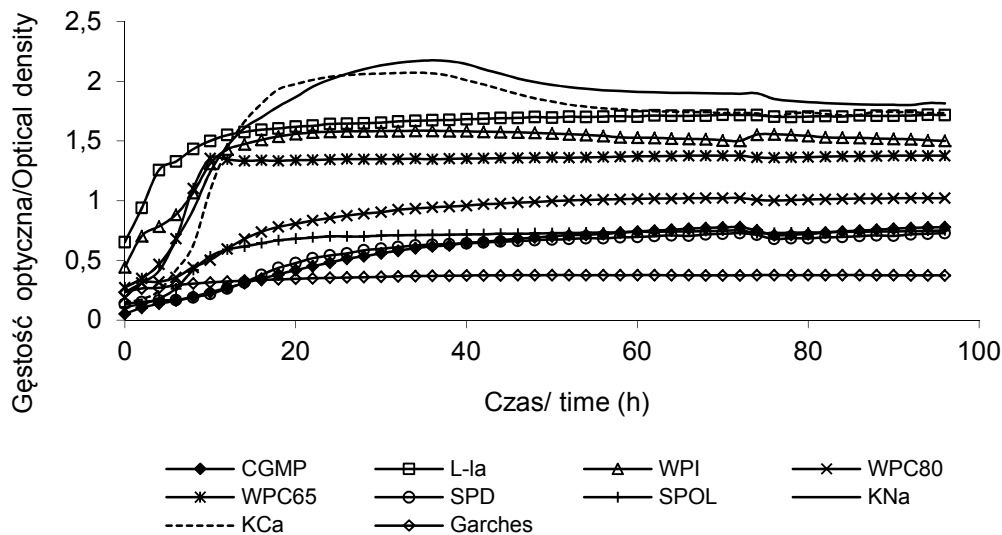
Czynnikami promującymi wzrost szczepu BI30 były  $\alpha$ -la i WPI. Pozostałe składniki podłoża słabiej wpływały na wzrost szczepu Bi30. Natomiast komponentami podłoża hodowlanego, które wykazały niewielki wpływ na stymulację wzrostu szczepu Bi30 były octan sodu i laktoza (5,8).

Janer i wsp. [16] stwierdzili stymulowanie wzrostu *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* i *B. infantis* dodatkiem WPI i hydrolizatu pepsynowego WPI [16]. Petschow i Talbott [23] wykazali, że  $\alpha$ -la z mleka krowiego stymulowała wzrost *B. breve* i *B. infantis*. Białko to wpływało na poprawę namnażania *Bifidobacterium* spp. już przy stężeniu 3,5 mg/ml [14].



Rys. 3. Wpływ komponentów podłoża na wzrost szczepu *B. catenulatum* -KD14.

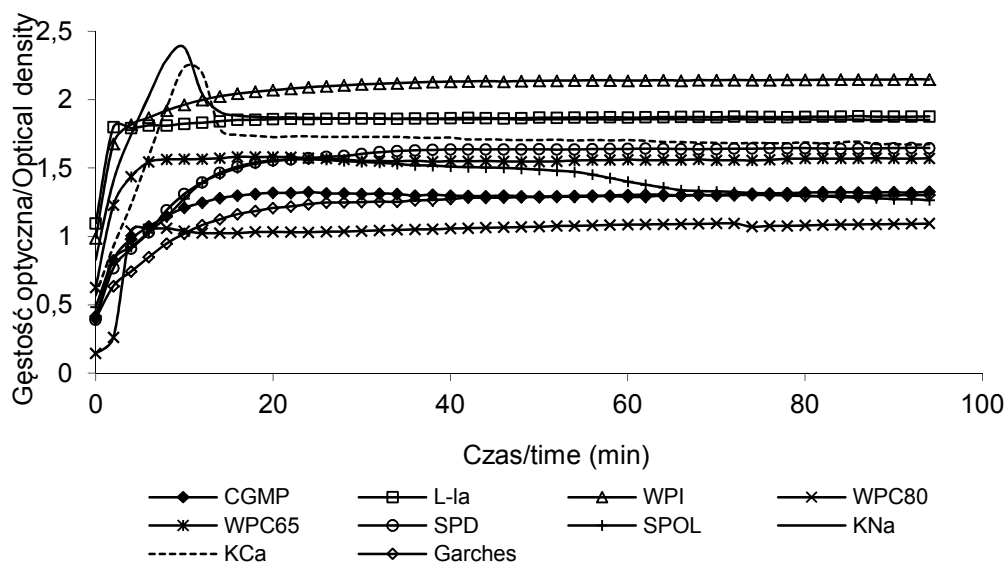
Fig. 3. Effect of medium components on growth of *B. catenulatum* -KD14 strain.



Rys. 4. Wpływ białek mleka na wzrost szczepu Bb-12 (*B. animalis* ssp. *lactis*) na podłożu Garchesa podczas 96 h hodowli w temp. 37 °C.

Fig. 4. Effect of milk proteins on growth of *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 strain on Garches medium during 96 h incubation at a temperature of 37 °C.

W następnym etapie przebadano wpływ szerokiej gamy preparatów białkowych na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Na rys. 4 - 6 przedstawiono zmiany gęstości optycznej (OD) podczas hodowli wybranych szczepów *Bifidobacterium* na zmodyfikowanym podłożu Garchesa w ciągu 96 h. Najwyższe wartości OD zanotowano podczas wzrostu szczepu Bb-12, na podłożach z dodatkiem KNa i KCa, co wskazuje na największe zagęszczenie komórek bakterii na tych podłożach (rys. 4). Hodowle z dodatkiem KNa oraz KCa osiągnęły największą gęstość optyczną pomiędzy 15. a 40. godziną inkubacji. Po 40 h hodowli wartość OD utrzymywała się na podobnym poziomie do końca trwania inkubacji. Otrzymane wyniki potwierdzają obserwacje innych naukowców, którzy wykazali lepszy wzrost *B. animalis* ssp. *lactis* w fermentowanych produktach otrzymywanych z dodatkiem kazeinianu sodu w porównaniu z produktami, w których źródłem białka było tylko odtłuszczone mleko w proszku [21]. Wzbogacenie mleka hydrolizatami kazeiny wpływało na polepszenie właściwości fermentacyjnych *Bifidobacterium* spp. [29].



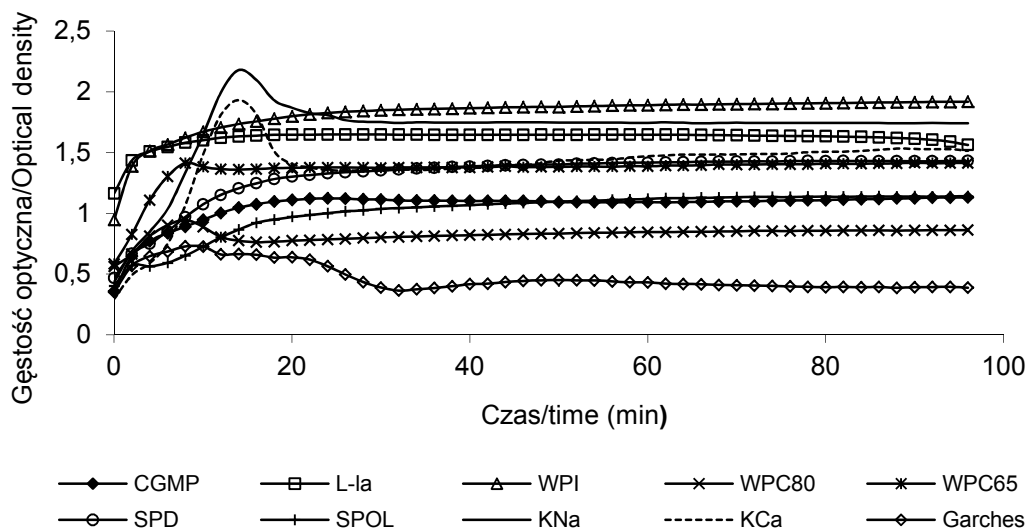
Rys. 5. Wpływ białek mleka na wzrost szczepu *B. longum* - KN29 na podłożu Garchesa podczas 96 h hodowli w temp. 37 °C.

Fig. 5. Effect of milk proteins on growth of *B. longum* - KN29 strain on Garches medium during 96 h incubation at a temperature of 37 °C.

Niższy, jednak również znaczny, wpływ na wzrost Bb-12 miał dodatek  $\alpha$ -la oraz WPI. Uzyskane w tym doświadczeniu wyniki potwierdzają, że WPI i  $\alpha$ -la stymulują wzrost tego szczepu, co stwierdzono w badaniach z wykorzystaniem planu Placketta-Burmana. Szczep Bb-12 charakteryzował się najslabszym wzrostem na pożywce Gar-

chesa o podstawowym składzie, której gęstość optyczna utrzymywała się na podobnym poziomie przez cały okres hodowli (rys. 4).

Podobnie, jak w przypadku hodowli szczepu Bb-12, również szczep KN29 charakteryzował się największym zagęszczeniem komórek bakteryjnych w hodowlach na podłożach z dodatkiem WPI, KNa, KCa i  $\alpha$ -la (rys. 5). Na krzywych obrazujących zależność gęstości optycznej od czasu hodowli w podłożach z dodatkiem KNa i KCa zaobserwowano piki, które osiągnęły maksymalne wartości po 10 h inkubacji. Po tym czasie wartości OD obniżyły się do pewnego poziomu, na którym utrzymały się do czasu zakończenia hodowli. Znaczny wzrost liczby komórek bakterii w pierwszych godzinach i wyraźne zmniejszenie podczas dalszej hodowli można tłumaczyć wykorzystaniem np. wolnych aminokwasów w podłożu. Pozostałe hodowle szczepu KN29 osiągnęły najwyższe wartości OD po 10 h inkubacji, a liczba komórek bakteryjnych utrzymywała się na podobnym poziomie do końca prowadzenia hodowli. Jedynie w przypadku podłoża suplementowanego SPOL nastąpiło nieznaczne zmniejszenie gęstości optycznej hodowli bakteryjnej od 26 h inkubacji i utrzymywało się na tym poziomie do końca trwania hodowli. Szczep KN29 charakteryzował się najsłabszym wzrostem na podłożu z dodatkiem WPC80. Hodowla ta, jako jedyna, charakteryzowała się niższymi wartościami OD w porównaniu z hodowlą na podłożu Garchesa o podstawowym składzie.



Rys. 6. Wpływ białek mleka na wzrost szczepu *B. catenulatum* - KD14 na podłożu Garchesa podczas 96 h hodowli w temp. 37 °C.

Fig. 6. Effect of milk proteins on growth of *B. catenulatum* - KD14 strain on Garches medium during 96 h incubation at a temperature of 37 °C.

W przypadku szczepów KD14 (rys. 6), Bi30 i ATCC1567 (dane niezamieszczone), dodatek WPI,  $\alpha$ -la oraz KCa i KNa do podłoża hodowlanego miał największy wpływ na namnażanie się bakterii. Wyraźne stymulowanie wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* przez WPI i  $\alpha$ -la w tych hodowlach potwierdza wyniki uzyskane przy zastosowaniu planu Placketta-Burmana. Hodowle KD14 na podłożach z dodatkiem KCa i KNa znacznie szybciej osiągnęły maksymalne wartości OD, bo już po 14 h inkubacji. Po tym czasie, w obu przypadkach wartość OD zmniejszyła się do pewnego poziomu, który nie zmieniał się do końca trwania hodowli. Wartość gęstości optycznej hodowli na podłożu z KCa po 20 h była niższa w porównaniu z hodowlą z dodatkiem WPI. Hodowle bakteryjne na podłożach z WPI, KNa oraz  $\alpha$ -la charakteryzowały się wyższymi wartościami OD w porównaniu z hodowlą na podłożach z dodatkiem KCa do końca trwania inkubacji. Najślabszy wzrost szczepu KD14 zaobserwowano na podłożu Garchesa o podstawowym składzie.

Najślabszy wzrost wszystkich badanych w niniejszej pracy szczepów *Bifidobacterium* obserwowano na pożywkach zawierających dodatek serwatki w proszku, WPC80 i CGMP. Zbliżone wyniki otrzymali Čurda i Cicvárek [6], dodając 1 lub 2 % kazeinomakropeptydu (CMP) do jogurtów, których mikroflorę wzbogacano o *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 lub *B. bifidum* CCDM 94. Dodatek CMP wywierał nieznaczny wpływ na wzrost Bb-12 oraz CCDM 94. W innych doniesieniach naukowych publikowane są sprzeczne informacje dotyczące wpływu CMP na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [15, 16, 24], Idota i wsp. [15] stwierdzili, że dodatek 2 % CMP do mleka powodował wzrost liczby komórek *B. animalis lactis* o 1,5 cyklu logarytmicznego w porównaniu z próbą kontrolną. Cicvárek i wsp. [5], na podstawie badań na podłożach syntetycznych, stwierdzili, że dodatek CMP przyspieszał namnażanie komórek *Bifidobacterium* sp., nawet gdy usunięto z podłoża L-cysteinę. Pozytywny wpływ koncentratu białek serwatkowych na wzrost *B. longum* stwierdzili Kehagias i wsp. [19]. Dodatek 3 % WPC20 lub WPC65 do odtłuszczonego mleka krowiego zwiększał liczbę komórek *B. longum* o jeden cykl logarytmiczny (odpowiednio  $2,90 \times 10^8$  i  $2,87 \times 10^8$ ) w porównaniu z próbą kontrolną ( $2,35 \times 10^7$ ) po 24 h inkubacji.

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wytwarzają wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe enzymy glikolityczne, z których te pierwsze charakteryzują się większą aktywnością enzymatyczną. W grupie biokatalizatorów przemian szlaku glikolitycznego stwierdzono u bifidobakterii występowanie  $\alpha$ - i  $\beta$ -galaktozydazy [3]. B-galaktozydazy wyizolowane z bifidobakterii charakteryzowały się różną specyficznością substratową i niektóre nie hydrolizowały laktozy [13]. Bakterie z tego rodzaju wykorzystane w niniejszej pracy nie namnażały się dobrze na pożywkach zawierających duże ilości laktozy, takich jak serwatki w proszku czy koncentraty białek serwatkowych. W przypadku większości badanych szczepów *Bifidobacterium* rosły one lepiej na serwatce o obniżonej zawartości laktozy (SPOL) niż na zwykłej serwatce w proszku.

## Wnioski

1. Spośród badanych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* największą aktywnością proteolityczną charakteryzowały się szczepy KD14, Bi30 i Bb-12.
2. Po zastosowaniu hodowli na podłożach modelowych z wykorzystaniem planu Placketta-Burmana wykazano, że wśród zastosowanych preparatów białkowych decydujący wpływ na wzrost Bb-12 i ATCC 1567 miała  $\alpha$ -la, a w przypadku szczepów Bi30, KN29 i KD14 były to WPI oraz  $\alpha$ -la.
3. Kazeiniany sodu i wapnia najlepiej stymulowały wzrost szczepów *Bifidobacterium* w modyfikowanym podłożu Garchesa.
4. Izolat białek serwatkowych i  $\alpha$ -laktoalbumina, wśród preparatów białek serwatkowych, miały największy wpływ na namażanie szczepów *Bifidobacterium*.

## Literatura

- [1] Azuma, N., Yamauchi, K., Mitsuoka, T.: Bifidus growthpromoting activity of a glycomacropeptide derived from human  $\kappa$ -casein. *Agr. Biol., Chem.*, 1984, **48**, 2159-2162.
- [2] Bergamini C.V., Hynes E.R., Palma S.B., Sabbag N.G., Salazar C.A.: Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *Int. Dairy J.*, 2009, **19**, 467-475.
- [3] Borawska J., Bednarski W., Gołębiewska J.: Charakterystyka sacharydów miodu oraz możliwości zastosowania *Bifidobacterium* do modyfikacji ich składu i właściwości. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **3 (76)**, 29-39.
- [4] Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L.: Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 1983, **66**, 1219-1227.
- [5] Cícvárek J., Čurda L., Elich O., Dvorakova E., Dvorak M.: Effect of caseinomacropeptide concentrate addition on the growth of bifidobacteria. *Czech J. Food Sci.*, 2010, **28(6)**, 485-494.
- [6] Čurda L., Cícvárek J.: Use of caseinomacropeptide concentrate in fermented products containing probiotics. *Proc.Konf., FoodInnova, Walencja 2010*.
- [7] de Castro F.P., Cunha T.M., Ogliari P.J.F., Teofilo R.F., Ferreira M.M.C., Prudencio E.S.: Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. *Food Sci. Technol.*, 2009, **42**, 993-997.
- [8] Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P.: Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk, *Lait*, 2007, **86**, 21-38.
- [9] Gomes A.M.P., Malcata F.X., Klaver F.A.M.: Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 2817-2825.
- [10] Gomes, A.M.P., Malcata, F.X.: Use of small ruminants' milk supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Microbiol.*, 1998, **85**, 839-848.
- [11] Gustaw W., Kordowska-Wiater M., Koziol J.: The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yoghurt production. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2011, **4**, 455-466.
- [12] Hajirostamloo B.: Comparison of nutritional and chemical parameters of soymilk and cow milk. *World Academy of Science, Eng. Technol.*, 2009, **57**, 436-438.

- [13] Hinz S.W.A., van den Broek L.A.M., Beldman G., Vincken J.-P., Voragen A.G.J.:  $\beta$ -Galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 prefers  $\beta$ -(1,4)-galactosides over lactose. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, **66** (3), 276-284.
- [14] Ibrahim S.A., Bezkorovainy A.: Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. J. Food Sci., 1994, **59**, 189-191.
- [15] Idota T., Kawakami H., Nakajima I.: Growth-promoting effects of N-acetylneuraminic acid-containing substances on bifidobacteria. Biosci. Biotech. Bioch., 1994, **58**, 1720-1722.
- [16] Janer C., Peláez C., Requena T.: Caseinomaclopeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. Food Chem., 2004, **86**, 263-267.
- [17] Kafley S., Woan-Sub K.I.M., Kumura H., Shimazaki K.-I.: Growth performance of whey protein hydrolysates in the media on different strains of probiotic bacteria. Milchwissenschaft., 2010, **65** (3), 245-248.
- [18] Kaplan H., Hutkins R.W.: Fermentation of fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Appl Environ. Microbiol., 2000, **66** (6), 2682-2684.
- [19] Kehagias C., Csapó J., Konteles S., Kolokitha E., Koulouris S., Csapó-Kiss Zs.: Support of growth and formation of D-amino acids by *Bifidobacterium longum* in cows', ewes', goats' milk and modified whey powder products. Int. Dairy J. 2008, **18**, 396-402.
- [20] Kisiełowska E., Kordowska-Wiater M.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i mikrobiologii żywności. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Lublin 2004.
- [21] Marafon A.P., Sumi A., Alcántara M.R., Tamime A.Y., Oliveira M.N.: Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. Food Sci. Technol., 2011, **44**, 511-519.
- [22] Modler H.W.: Bifidogenic factors – sources, metabolism and applications. Int. Dairy J. 1994, **4**, 383-407.
- [23] Petschow, B.W., Talbott, R.D.: Response of *Bifidobacterium* species to growth promoters in human and cow milk. Pediatric Res., 1991, **29**, 208-213.
- [24] Poch M., Bezkorovainy A.: Bovine milk  $\kappa$ -casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus *Bifidobacterium*. J. Agric. Food Chem., 1991, **39**, 73-77.
- [25] Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Podleśny M., Targoński Z., Kubik-Komar A.: Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology. Pol J Microbiol., 2010 **59** (2), 113-118.
- [26] Ramirez-Farias C., Slezak K., Fuller Z., Duncan A., Holtrop G., Louis P.: Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. Br. J. Nutr., 2009, **101** (4), 541-550.
- [27] Rasic J.L.: Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. Bull. IDF, 1990, **252**, 24-34.
- [28] 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. Environ. Microbiol., 2005, **71** (10), 6150-6158.
- [29] Shihata A., Shah N.P.: Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. Int. Dairy J., 2000, **10**, 401-408.
- [30] Waśko A., Kordowska-Wiater M., Podleśny M., Polak-Berecka M., Targoński Z., Kubik-Komar A.: The plackett-burman design in optimization of media components for biomass production of *Lactobacillus rhamnosus* OXY. Acta Agron. Hung., 2010, **61** (3), 344-355.

## EFFECT OF MILK PROTEIN PREPARATIONS ON GROWTH OF *BIFIDOBACTERIUM*

### S u m m a r y

Probiotic strains of the *Bifidobacterium* genus multiply poorly in milk. The objective of this study was to modify the Garches medium through replacing a nitrogen source by some selected milk protein preparations and to verify their ability to stimulate the growth of probiotic strains of the *Bifidobacterium* genus. The Bi30 and KD14 strains were characterized by the highest proteolytic activity; slightly lower values were determined for other strains of the *Bifidobacterium* genus. For the growth of Bb-12 ( $1.2 \times 10^8$  cfu/ml), the most favourable medium was that containing a whey protein isolate (WPI). Based on the results obtained after the incubation of KN29, it was found that the WPI and  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la), the compounds of the culture medium that was designed using a Plackett-Burman model, were those to stimulate the growth of that strain to the highest degree. The highest density of cells of Bb-12 and KN29 bacteria was reported during the incubation of those strains on the media supplemented with a sodium caseinate (KNa) and calcium caseinate (KCa), and in the case of the whey protein preparations, this effect was reported for the media with WPI and  $\alpha$ -la.

**Key words:** *Bifidobacterium*, proteolytic activity, Plackett-Burman design, WPI,  $\alpha$ -lactalbumin ☒