

Przeżywalność mikroflory technicznej w śmietanie jogurtowej przechowywanej w warunkach chłodniczych

MAŁGORZATA ZIARNO, MONIKA MAKOWSKA

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydziału Technologii Żywności SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

Ziarno M., Makowska M.

Viability of technical microflora in yoghurt cream during refrigerated storage

Summary

The objective of the study was the qualification of the viability of the microflora of 16 chosen starter cultures in yogurt cream (the content 12% fat) during cold storage. The samples of yogurt cream have been microbiologically analyzed immediately after fermentation process and every week during 21 days of storage in $6.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Total Lactococcus and Leuconostoc count, Streptococcus count, total Lactobacillus and Bifidobacterium count were determined. The study confirmed that the production of yogurt cream containing the proper number of thermophilic yogurt bacteria, including probiotic strains or potentially probiotic strains, is possible. During 21d cold storage in 6°C , of the yogurt cream samples fermented by monocultures the population of *Lb. acidophilus* decreased faster in comparison to other investigated monocultures (*Bifidobacterium* sp., *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, traditional mesophilic dairy starter cultures). In case of the yogurt cream samples produced using classical yogurt cultures (*S. salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), the viability of bacteria was strain and species dependent. The microflora of the 16 chosen starter cultures in the yogurt cream (yogurt and probiotic starter cultures) showed good viability and after 21 days of the cold storage; their population were still over 10^6 cfu/g.

Keywords: yogurt cream, probiotic strains, viability, technical microflora, lactic acid bacteria, refrigerated storage

Śmietana jest produktem o zawartości tłuszczu co najmniej 10% (m/m), poddanym procesowi fermentacji z użyciem kultur bakterii kwasu mlekowego. Tradycyjna śmietana jest uzyskiwana w wyniku ukwaszenia śmietanki przez mezofilne bakterie fermentacji mlekowej, np.: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Do produkcji śmietany można również zastosować kultury termofilne (bakterie jogurtowe) *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ze względu na walory zdrowotne i terapeutyczne, do tradycyjnych szczepionek mleczarskich można wprowadzić także probiotyczne szczepy bakterii gatunku *Lactobacillus acidophilus* lub rodzaju *Bifidobacterium* (4, 5, 8, 12). Zastosowanie kultur termofilnych (jogurtowych i/lub szczepów probiotycznych), łącznie lub osobno z kulturami mezofilnymi, pozwala skrócić czas biologicznego dojrzewania biośmietany, zwiększyć zdolności przerobowe mleczarni oraz nadać produktowi nowe właściwości terapeutyczne i sensoryczne. Stosowane kultury starterowe muszą jednak spełniać pewne wymagania technologiczne, aby mogły być używane w produkcji śmietany jogurtowej lub probiotycznej. Do

kryteriów tych należą m.in.: łatwość namnażania, dobra przeżywalność w procesie technologicznym i podczas magazynowania w warunkach chłodniczych. Wiedza o przeżywalności mikroflory technicznej śmietany jogurtowej, zawierającej kultury jogurtowe i/lub szczepy probiotyczne, łącznie lub osobno z tradycyjnymi kulturami mezofilnymi, pozwala na właściwy wybór kultur starterowych oraz końcową ocenę produktów wytwarzanych w zakładach mleczarskich.

Celem badań było określenie stopnia przeżywalności mikroflory wybranych kultur starterowych, w tym probiotycznych, podczas chłodniczego przechowywania śmietany jogurtowej, otrzymanej w warunkach laboratoryjnych.

Materiał i metody

Produkcję śmietany jogurtowej przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych, z wykorzystaniem 16 komercyjnych mleczarskich kultur starterowych, liofilizowanych, przeznaczonych do bezpośredniego zaszczepiania mleka, o charakterystyce podanej w tab. 1. Próbkę śmietany jogurtowej zawierały wyłącznie mikroflorę termofilną. Dodatkowo, wyprodukowano próbkę tradycyjnej śmietany, z wykorzystaniem tylko mezofilnej kultury starterowej PROBAT 505. Do jałowych

Tab. 1. Charakterystyka mleczarskich kultur starterowych wykorzystanych w badaniach

Symbol kultury	Skład	Producent
PROBAT 505	<i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. diacetylactis</i> , <i>Leu. cremoris</i>	Wisby
Lac-4	<i>Lb. acidophilus</i>	Ezal Texel France
La-5		Chr Hansen
Bb-12	<i>B. bifidum</i>	
TAO 40	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Ezal Texel France
Culture de yoghourt	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Rosell Canada
Yo-Mix VM 1-30		Wisby
YC-180		Chr Hansen
MYE 92		Rhodia Food France
MYE 96		
ABT-1	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	Chr Hansen
ABT-2		
MY BIO 2	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Rhodia Food France
MY BIO 6		
ABY-2		
MSK-Mix AB N 1-45	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i>	Wisby

butelek o pojemności 300 cm³ odmierzone, przeniesiono jałowo po 250 cm³ śmietanki o zawartości 12% tłuszczu i ogrzano do temperatury 25°C ± 0,5°C. Następnie dodano po 0,6 g szczepionki mleczarskiej rozproszanej w 5 cm³ mleka UHT. Fermentację prowadzono w temperaturze 45°C ± 0,5°C przez 4 h (w przypadku użycia kultur termofilnych) lub w temperaturze 23°C ± 0,5°C przez 20 h (w przypadku kultury mezofilnej PROBAT 505). Gotowe próbki chłodzono do temperatury 6,0°C ± 0,5°C i przechowywano w tych warunkach przez 21 dni, co 7 dni analizując mikrobiologicznie. W ten sposób przeprowadzono 2 serie doświadczeń.

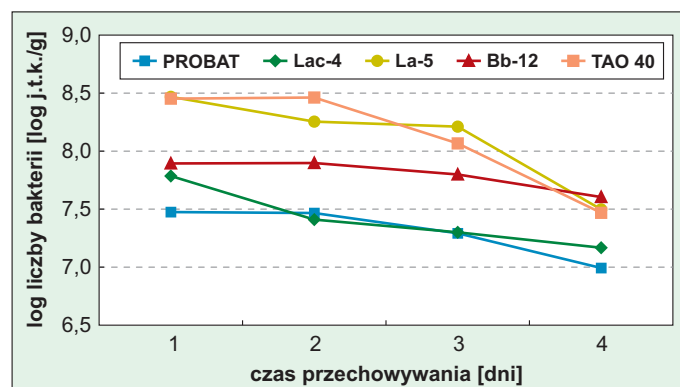
Próbki śmietany bezpośrednio po ukwaszeniu oraz po określonym czasie przechowywania poddawano analizom mikrobiologicznym. W tradycyjnej śmietanie (fermentowanej mezofilną kulturą PROBAT 505) oznaczano metodą płytkową łączną liczbę *Lactococcus* i *Leuconostoc*, stosując podłoże agarowe M17 (Merck) i tlenowe warunki inkubacji w temperaturze 30°C. W próbkach śmietany jogurtowej oznaczano liczbę *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* stosując podłoże agarowe M17 i tlenowe warunki inkubacji w temperaturze 37°C. Natomiast łączną liczbę bakterii rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oznaczono stosując podłoże agarowe MRS (Merck) i beztlenowe warunki inkubacji w temperaturze 37°C (10).

Wyniki i omówienie

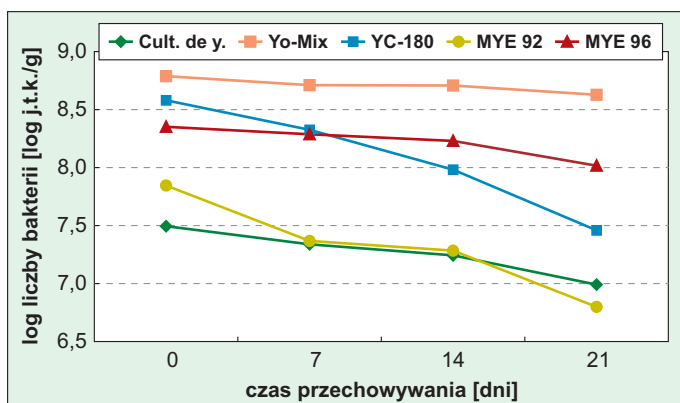
Bezpośrednio po zakończeniu procesu fermentacji śmietana tradycyjna, otrzymana przy użyciu kultury PROBAT 505, zawierała średnio 7,5 log jtk/g ± 0,4 log jtk/g paciorkowców mezofilnych (ryc. 1). Po 21 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych stwierdzono zmniejszenie populacji bakterii rodzajów *Lactococ-*

cus i *Leuconostoc* w analizowanych próbkach tradycyjnej śmietany średnio o 0,5 rzędu logarytmicznego. Znaczniejszą redukcję liczebności żywych komórek odnotowano w śmietanie fermentowanej przez monokulturę *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (TAO 40). W tym przypadku początkowa liczba mikroflory wynosiła średnio 8,5 log jtk/g i po 21 dniach obniżyła się do średnio 7,5 log jtk/g. W próbkach fermentowanych przez monokultury *Lactobacillus acidophilus* Lac-4 liczba bakterii bezpośrednio po procesie fermentacji wynosiła 7,8 log jtk/g, a w próbkach fermentowanych przez monokulturę La-5 8,5 log jtk/g. Stwierdzono spadek liczby tych drobnoustrojów w czasie 21 dni przechowywania, nieznaczny w przypadku Lac-4 (o średnio 0,6 rzędu logarytmicznego) i znaczny w przypadku śmietany fermentowanej z udziałem La-5 (średnio o 1 rząd logarytmiczny). Natomiast liczebność bifidobakterii monokultury Bb-12 uległa nieznacznemu zmniejszeniu z początkowych 7,9 log jtk/g (bezpośrednio po fermentacji) do 7,6 log jtk/g w 21. dniu chłodniczego przechowywania (ryc. 1). Zauważono silniejszą redukcję populacji bakterii w monokulturach *Lb. acidophilus* (przeżywalność na poziomie 11%-25%), w porównaniu do innych badanych monokultur (średnia przeżywalność dla *Bifidobacterium* sp. 54%, dla *S. salivarius* subsp. *thermophilus* – 34% i dla mikroflory kultury PROBAT 505 – 55%).

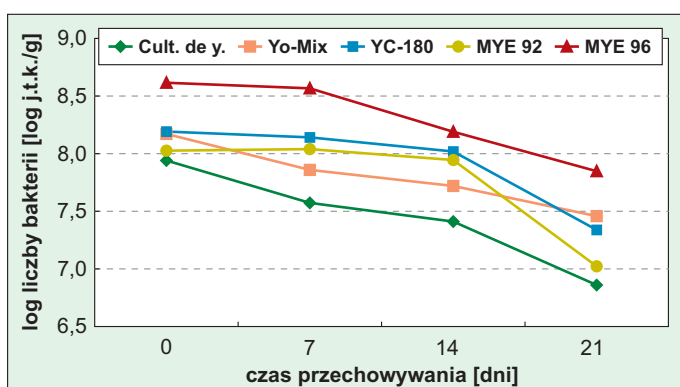
Analizując wyniki uzyskane dla dwóch szczepów *Lb. acidophilus*, można wnioskować, że o przeżywalności decyduje dobór odpowiedniego szczepu, użytego do fermentacji śmietany. Bolin i wsp. (3) przeprowadzili badania nad przeżywalnością *Lb. acidophilus* w fermentowanym mleku, przechowywanym przez 35 dni w temperaturze 7°C. Po tym okresie przechowywania stwierdzili istotne zmiany w żywotności poszczególnych szczepów. W przypadku trzech szczepów *Lb. acidophilus* nie odnotowali znaczącego spadku liczebności i jedynie populacja szczepu La-5 została zredukowana do poziomu 4 log jtk/g, a więc znacznie silniej niż w niniejszych badaniach. Podobne spostrzeżenia, ale w odniesieniu do szczepów bifidobakterii, poczynili Akalin i wsp. (1), badając ich przeżywalność w jogurtach podczas przechowywania przez 28 dni w temperaturze 4°C.



Ryc. 1. Zmiany liczby bakterii w próbkach śmietany tradycyjnej (PROBAT 505) i śmietany fermentowanej monokulturami bakterii termofilnych, przechowywanych w temperaturze 6,0°C



Ryc. 2. Zmiany liczby *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* w próbkach śmietany fermentowanej kulturami bakterii jogurtowych, przechowywanych w temperaturze 6,0°C



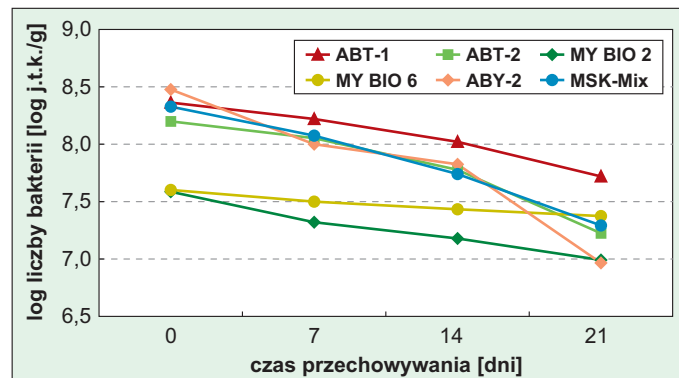
Ryc. 3. Zmiany liczby *S. salivarius* subsp. *thermophilus* w próbkach śmietany fermentowanej kulturami bakterii jogurtowych, przechowywanych w temperaturze 6,0°C

Szczep *B. animalis* wykazał lepszą przeżywalność niż szczep *B. longum*. Po 21 dniach chłodniczego przechowywania liczba badanych szczepów była rzędu odpowiednio 10^7 i 10^6 jtk/g. Natomiast Wilson i wsp. (13) zaobserwowali statystycznie istotną różnicę w przeżywalności szczepów *Lb. reuteri*. Inni autorzy również wykazali, że czas przechowywania biośmietany jest czynnikiem istotnie wpływającym na obniżenie się liczby bakterii rodzajów *Streptococcus*, *Lb. acidophilus* i *Bifidobacterium* (4, 5, 11).

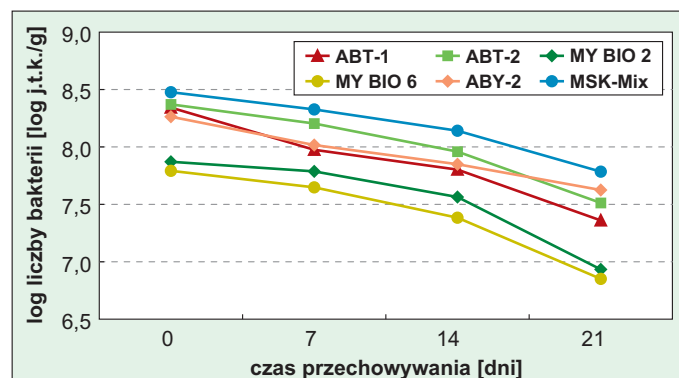
W niniejszych badaniach interesujące okazały się wyniki przeżywalności mikroflory kultur starterowych pięciu rodzajów śmietany, uzyskanych z zastosowaniem tradycyjnych kultur jogurtowych, zawierających dwa gatunki bakterii *S. salivarius* subsp. *thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ryc. 2 i 3). W ich przypadku, po 21 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych, stwierdzono przeżywalność na poziomie 8-73% dla *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i 11-20% dla *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Najsilniejszą redukcję populacji bakterii *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zaobserwowano w próbkach śmietany fermentowanej przez kultury YC-180 i MYE 92, zaś populacji *S. salivarius* subsp. *thermophilus* – w śmietanie zawierającej kulturę Culture de yoghourt i MYE 92. Uzyskane wyniki wskazują, że przeżywalność bakterii zależy nie tylko od ich gatunku, ale również od szczepu obec-

nego w kulturze starterowej. Zaobserwowano, że liczba *S. salivarius* subsp. *thermophilus* zmniejszała się szybciej dopiero po 14 dniach niż w początkowym okresie przechowywania. Natomiast liczba *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* obniżała się stopniowo podczas całego okresu przechowywania próbek w warunkach chłodniczych (wyjątkiem była kultura YC-180). Prawdopodobnie jest to związane z występowaniem symbiozy między obydwooma gatunkami, polegającej na wytwarzaniu kwasu mrówkowego i pirogronianów oraz obniżaniu potencjału redoks przez paciorkowce, co sprzyja rozwojowi pałeczek. Natomiast pałeczki, bardziej proteolityczne, wolniej i jednocześnie silniej kwaszące, uwalniają z białek aminokwasy, szczególnie walinę, stymulujące wzrost paciorkowców (4, 5, 8).

Wraz z upływem czasu przechowywania, stwierdzono w niniejszych badaniach istotne zmniejszanie się liczby populacji bakterii w próbkach śmietany fermentowanej przez kultury starterowe zawierające mikroflorę jelitową, w tym probiotyczną: Bb-12 i La-4 (ryc. 4 i 5). Bezpośrednio po zakończeniu procesu fermentacji, we wszystkich badanych próbkach śmietany jogurtowej łączna liczba pałeczek *Lactobacillus* i bifidobakterii osiągnęła wartość od 7,6 log jtk/g do 8,5 jtk/g, zależnie od użytej szczepionki (ryc. 4), zaś populacja *S. salivarius* subsp. *thermophilus* mieściła się w zakresie od 7,8 log jtk/g do 8,5 log jtk/g (ryc. 5). Po 21 dniach przechowywania próbek śmietany w warunkach chłodniczych,



Ryc. 4. Zmiany liczby pałeczek rodzaju *Lactobacillus* i bifidobakterii w próbkach śmietany fermentowanej kulturami starterowymi, przechowywanych w temperaturze 6,0°C



Ryc. 5. Zmiany liczby *S. salivarius* subsp. *thermophilus* w próbkach śmietany fermentowanej probiotycznymi kulturami starterowymi, przechowywanych w temperaturze 6,0°C

liczba pałeczek *Lactobacillus* i bifidobakterii zmniejszyła się w zakresie od 7,0 log jtk/g do 7,2 log jtk/g. Najsilniejszą redukcję populacji tych drobnoustrojów zaobserwowano w śmietanie fermentowanej kulturą ABY-2, zaś najlepszą przeżywalnością wykazała się mikroflora zawarta w kulturze MY BIO 6. W przypadku populacji *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, po 21 dniach chłodniczego przetrzymania próbek, liczebność drobnoustrojów wynosiła od 6,9 log jtk/g do 7,8 log jtk/g, przy czym najlepiej przeżyła mikroflora obecna w kulturach starterowych MSK-Mix i ABY-2. Liczba *S. salivarius* subsp. *thermophilus* zmniejszała się znacząco dopiero po 14 dniach, natomiast liczebność *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i bifidobakterii obniżała się stopniowo podczas przechowywania próbek w warunkach chłodniczych. Beal i wsp. (2) wykazali, że przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej mieści się w przedziale 40-75% i znacznie większa jest przeżywalność bakterii rodzaju *Lactobacillus* niż rodzaju *Streptococcus*. Wskazuje to na zmiany zachodzące we wzajemnych proporcjach bakterii fermentacji mlekowej podczas przechowywania biośmietany. Podobnych obserwacji dokonali Cais-Sokolińska i Pikul (5).

Liczba i przeżywalność bakterii mlekowych podczas przechowywania decydują o wartości dietetyczno-terapeutycznej produktu, szczególnie zawierającego bakterie o właściwościach probiotycznych (6). Śmietany jogurtowe otrzymane w niniejszych badaniach zawierały wysoką liczbę bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepów jelitowych (probiotycznych i potencjalnie probiotycznych). Bezpośrednio po wyprodukowaniu śmietany liczba mikroflory technicznej była na poziomie 7-8 rzędu logarytmicznego w 1 g. Podczas przechowywania mikroflora pozostawała żywa, a jej liczebność pomimo zmniejszenia nie była niższa niż 10^6 jtk/g. Wilson i wsp. (13) przeanalizowali przeżywalność czterech szczepów probiotycznych *Lb. reuteri* (MM 2-3 i MM 7) i *B. longum* (ATCC 5708 i NCFB 2254) w śmietanie przetrzymywanej w temperaturze 4°C przez 2 tygodnie. Wykazali, że po tym czasie przechowywania próbek śmietany probiotycznej liczba mikroflory technicznej uległa redukcji z początkowej 10^7 jtk/cm³ do nie mniejszej niż $5,0 \times 10^5$ jtk/cm³.

Podobne badania przeprowadzone w odniesieniu do jogurtów tradycyjnych i probiotycznych, przechowywanych przez 4 tygodnie w temperaturze 6°C, wykazały zmniejszanie liczby bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Streptococcus* z poziomu 10^6 do 10^4 , a nawet do 10^3 jtk/g (4). Liczba bakterii rodzaju *Bifidobacterium* obniżała się również z początkowego poziomu od 10^6 do 10^4 jtk/g już po dwóch tygodniach przechowywania (4). Nighswonger i wsp. (9) zbadali przeżywalność 5 szczepów *Lb. acidophilus* (MUH-41, O-16, L-1, 43121 i La-5) w jogurtach i maślanie podczas 28-dniowego przechowywania w temperaturze 5-7°C. Stwierdzili, że w maślanie liczebność bakterii ze szczepów *Lb. acidophilus* MUH-41, O-16 i L-1 nie uległa redukcji, jedynie szczepy 43121 i La-5 wykazały słabszą przeżywalność. Dla odmiany, w jogurcie przeżywalność komórek *Lb. acidophilus* zależała w dużym stopniu od rodzaju kul-

tury jogurtowej użytej do otrzymania jogurtu. Wynika z tego, że o przeżywalności decyduje nie tylko dobór szczepów, ale również środowisko, w którym te drobnoustroje bytują. Niniejsze badania wykazały, że w śmietanie, produkcie bogatym w tłuszcz, komórki bakterii termofilnych (jogurtowych, w tym probiotycznych i potencjalnie probiotycznych) długo zachowują żywotność, dzięki czemu gwarantowana jest właściwa jakość mikrobiologiczna i cechy terapeutyczne śmietany jogurtowej.

Wnioski

1. Istnieje możliwość wyprodukowania śmietany jogurtowej zawierającej we właściwej liczbie termofilne bakterie jogurtowe, w tym szczepy probiotyczne lub potencjalnie probiotyczne.

2. Podczas 21-dniowego chłodniczego przechowywania śmietany otrzymanej z wykorzystaniem monokultur populacja bakterii *Lb. acidophilus* ulega silniejszej redukcji w porównaniu do innych badanych monokultur (*Bifidobacterium* sp., *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, tradycyjne kultury mezofilne).

3. Przeżywalność mikroflory śmietany uzyskanej z zastosowaniem tradycyjnych kultur jogurtowych (*S. salivarius* subsp. *thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) zależy od szczepów obecnych w kulturze starterowej.

4. W śmietanie o zawartości 12% tłuszczu, mikroflora wybranych termofilnych kultur starterowych (jogurtowych i probiotycznych) wykazuje zadowalającą przeżywalność i po 21 dniach przechowywania w temperaturze 6°C jej populacja nadal wynosi ponad 10^6 jtk/g.

Piśmiennictwo

1. Akalin A. S., Fenderya S., Akbulut N.: Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. Int. J. Food Sci. Technol. 2004, 39, 613-621.
2. Beal C., Skokanova J., Latrille E., Martin N., Corrieu G.: Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. J. Dairy Sci. 1999, 82, 673-678.
3. Bolin Z., Libudzisz Z., Moneta J.: Viability of *Lactobacillus acidophilus* in fermented milk products during refrigerated storage. Pol. J. Food Nutr. Sci. 1998, 48, 465-472.
4. Cais-Sokolińska D., Danków R., Pikul J.: Mikroflora probiotyczna biośmietany. Prace Mat. Zoot. 2002, 14, 47-53.
5. Cais-Sokolińska D., Pikul J.: Trwałość biośmietany w zależności od warunków temperaturowych przechowywania. Chłodnictwo 2001, 36, 10, 42-45.
6. Garcia H. S., Rodas B. A., Angulo J. O.: Viability of *Lactobacillus reuteri* in buttermilk during manufacturing and storage. IFT Annual Meeting, New Orleans, Louisiana 2001.
7. Kailasapathy K., Rybka S.: *Lb. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: their therapeutic potential and survival in yoghurt. Austr. J. Dairy Technol. 1997, 52, 28-33.
8. Molska I.: Zarys mikrobiologii mleczarskiej. PWRiL, Warszawa 1988.
9. Nighswonger B. D., Brashears M. M., Gilliland S. E.: Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. J. Dairy Sci. 1996, 79, 212-219.
10. PN-A-86034-15:1998. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Jogurt – oznaczenie liczby charakterystycznych drobnoustrojów.
11. Shah N. P., Lankaputhra W. E. V., Britz M., Kyle W. S. A.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. Int. Dairy J. 1995, 5, 515-521.
12. Varnam A. H., Sutherland J. P.: Milk and Milk Products. Technology, Chemistry and Microbiology. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland 2001.
13. Wilson E. D., Seo C. W., Shahbazi A., Ibrahim S. A.: Survival and growth of probiotic cultures in sour cream products. IFT Annual Meeting, Las Vegas, NV 2004.

Adres autora: dr inż. Małgorzata Ziarno, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa; e-mail: malgorzata_ziarno@sggw.pl