

WPLYW TEMPERATURY PASTERYZACJI „NAPOJU SŁODOWEGO” NA PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ I DROŻDŻY

Wiesław Wzorek, Joanna Koskowska, Agata Korytkowska
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Celem pracy było określenie możliwości zastosowania procesu pasteryzacji „napoju słodowego” do eliminacji drożdży *S. cerevisiae* z pozostawieniem żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej, mających możliwość dalszego namnażania się. Pasteryzacja napoju w probówkach w temperaturze 60°C (10 min) spowodowała całkowitą eliminację drożdży z pozostawieniem części bakterii fermentacji mlekowej (10^1 - 10^2 jtk/cm³) (rys. 1 i 2). 15-minutowa pasteryzacja napoju w butelkach w 65°C powoduje inaktywację stosowanych drożdży i pozostawienie części żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej (10^1 - 10^2 jtk/cm³) (rys. 3 i 4). Po 48 godzinach po pasteryzacji bakterie namnażają się (temp. pokojowa – ok. 22°C) w przybliżeniu do poziomu sprzed pasteryzacji (10^6 - 10^7 jtk/cm³).

Słowa kluczowe: bakterie fermentacji mlekowej, drożdże, probiotyki, pasteryzacja, „napój słodowy” bioaktywny

WSTĘP

Ze względu na rosnącą świadomość roli składu mikroflory jelitowej w zachowaniu zdrowia człowieka obserwuje się w ostatnich latach rozwój produkcji żywności fermentowanej z udziałem bakterii mlekowych o właściwościach prozdrowotnych. Wielu badaczy opisuje ich korzystny wpływ na organizm człowieka, polegający m.in. na hamowaniu rozwoju mikroorganizmów chorobotwórczych, zmniejszeniu częstotliwości występowania biegunek podróżnych, łagodzeniu przebiegu niektórych biegunek bakteryjnych i wirusowych, zapobieganiu występowania lub łagodzeniu biegunek poantybiotykowych, zmniejszeniu objawów nietolerancji laktozy, działaniu hipocholesterolemicznemu, stymulacji systemu odpornościowego, aktywności antykancerogennej i przeciwalergicznnej [Bomba i in. 2002, Kaur i in. 2002, Cebeci i Gurakan 2003, Koop-Hoolihan 2001].

Adres do korespondencji – Corresponding author: prof. dr hab. Wiesław Wzorek, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 c, 02-787 Warszawa, e-mail: wzorek@delta.sggw.waw.pl

Bakterie fermentacji mlekowej są odpowiedzialne za kształtowanie cech sensorycznych żywności fermentowanej z ich udziałem, nadając jej specyficzny smak i aromat, a dzięki produkcji tzw. substancji antagonistycznych zapewniają również ochronę przed rozwojem mikroorganizmów niepożądanych. Biokonserwacja surowców spożywczych poprzez fermentację mlekową pozwala na rezygnację lub zmniejszenie dawki stosowanych konserwantów chemicznych, co jest bardziej akceptowalne przez konsumenta [Klewicka i in. 1999, Klewicka i Libudzisz 1998, Varnam 2002].

Większość dostępnych na rynku probiotycznych lub bioaktywnych produktów żywnościowych zawierających bakterie fermentacji mlekowej stanowią fermentowane wyroby mleczne. Na skutek wzrostu zainteresowania tzw. żywnością prozdrowotną (funkcjonalną) i tendencją do odchodzenia od profilaktycznego stosowania środków farmakologicznych, prowadzone są badania mające na celu rozszerzenie oferowanego asortymentu wyrobów o bioaktywne fermentowane produkty roślinne.

Produktem takim wydaje się kwas chlebowy lub napój podobnego typu. Napój ten jest popularny w krajach byłego ZSRR. Otrzymuje się go metodą ograniczonej fermentacji alkoholowej i mlekowej z brzezki pochodzącej ze specjalnie przygotowanego słoju żytniego i jęczmiennego lub też przez saturację dwutlenkiem węgla napoju sporządzonego ze słoju żytniego (bez fermentacji). Skład kultur bakteryjnych stosowanych do szczepienia nie jest podawany. Kwas, otrzymywany metodą fermentacji, sprzedawany jest zwykle z beczkwozów (zawiera bakterie fermentacji mlekowej) i ma okres trwałości około 2, 3 dni, czyli zbyt krótki aby oferować go w sprzedaży w butelkach. Kwas sprzedawany w butelkach ma dłuższy okres przydatności do spożycia, ale nie posiada bakterii mlekowych, natomiast zawiera konserwanty [Kowalski 1997].

W technologii produkcji kwasu chlebowego stosuje się ograniczoną fermentację alkoholową w celu umiarkowanego nasycenia wyrobu dwutlenkiem węgla, przy czym zawartość alkoholu w produkcie nie powinna przekraczać 0,5% objętościowych. Dlatego w produkcji kwasu chlebowego lub napoju słodowego jest konieczne zastosowanie metody eliminacji drożdży, z pozostawieniem żywych bakterii fermentacji mlekowej.

Jedną z metod eliminacji może być filtracja przy nadciśnieniu CO₂ przez selektywną przegrodę filtracyjną (np. kartony filtracyjne K7, AF 70) lub ziemię okrzemkową o wysokiej ostrości filtracji (np. Standard Super Cel). Należy przy tym pamiętać o możliwości wtórnych zakażeń drożdżowych i wystąpieniu dalszego ich wzrostu, powodującego zwiększenie stężenia alkoholu i ciśnienia w butelkach. Innym rozwiązaniem mogłaby być taka pasteryzacja napoju, która zapewni inaktywację drożdży z jednoczesnym pozostawieniem żywych bakterii fermentacji mlekowej (przynajmniej części).

Celem niniejszej pracy było określenie możliwości zastosowania pasteryzacji w celu inaktywacji drożdży (przerwania fermentacji alkoholowej) w napoju słodowym, przy równoczesnym zachowaniu w nim żywych bakterii fermentacji mlekowej, które mogłyby się dalej rozmnażać i decydować o właściwościach prozdrowotnych napoju.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach stosowano szczepy bakterii fermentacji mlekowej:

- *Lactobacillus plantarum* 44 z Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
- *Lactobacillus plantarum* 299v wyizolowany z napoju ProViva (Skane Dairy – Szwecja),

– *Lactobacillus plantarum* 1 pochodzący z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie oraz drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*.

Doświadczenia prowadzono na „brzeczce napoju słodowego” uzyskiwanej przez rozpuszczenie i zmieszanie (w proporcjach ustalonych w próbach wstępnych) następujących składników: cukru konsumpcyjnego, przemysłowego koncentratu słodowego (Wytwórnia Ekstraktu Słodowego Wolsztyn) i cukru palonego.

Temperatury procesu pasteryzacji zabójcze dla drożdży, ale pozwalające przeżyć bakteriom fermentacji mlekowej ustalano w następujący sposób:

- Brzeczke napoju słodowego w probówkach (9 cm³) szczepiono kulturą bakteryjną jednego ze szczepów lub drożdżami. Pasteryzację przeprowadzano umieszczając próbki na 10 minut w łaźni wodnej o temperaturze 45, 50, 55, 60, 65 i 70°C. Przeżywalność bakterii i drożdży określano bezpośrednio po pasteryzacji.

- Brzeczke napoju słodowego w butelkach (0,4 dm³) szczepiono kulturą drożdżową w ilości 5 cm³ oraz 5 cm³ kultury bakteryjnej jednego ze szczepów i zamykano kapslami koronowymi. Po 4 godzinach fermentacji przeprowadzano pasteryzację w temperaturach 55, 60 i 65°C przez 15 minut od chwili uzyskania założonej temperatury wewnątrz butelki. Przeżywalność bakterii i drożdży określano bezpośrednio po pasteryzacji oraz po upływie 48 godzin.

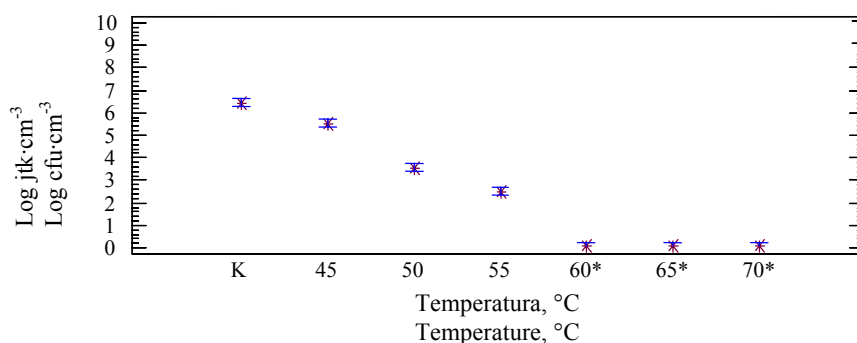
Liczbę bakterii fermentacji mlekowej (*L. plantarum*) oznaczano metodą płytkową na podłożu MRS o pH = 6,5, inkubując płytki 48 godzin w temperaturze 28°C w atmosferze 5% CO₂ (v/v) [Drago i in. 1997, Klewicka i in. 1999] (temperatura optymalna dla *L. plantarum* wynosi 28-32°C). Liczbę komórek drożdży określano metodą płytkową na brzeczce (jtk/cm³), inkubując płytki 48 godzin w temperaturze 28°C.

Wykonano trzy serie doświadczeń, każdą w dwóch powtórzeniach. Wyniki opracowano statystycznie za pomocą programu Statgraphics Plus Ver. 4.1, stosując jedno- lub wieloczynnikową analizę wariancji ($\alpha = 0,05$) i obliczając NIR wg Tuckey'a (jako HSD).

WYNIKI I Dyskusja

W celu wstępnego ustalenia temperatur procesu pasteryzacji zabójczych dla drożdży, ale pozwalających przeżyć bakteriom fermentacji mlekowej, badano ten proces najpierw w probówkach. Pasteryzację prowadzono w temperaturach 45-70°C, a wyniki przedstawiono na rys. 1 i 2.

Po pasteryzacji w temperaturach 65 i 70°C nie stwierdzono obecności żywych komórek zarówno bakterii, jak i drożdży, natomiast pasteryzacja w temperaturach 45, 50 i 55°C była niewystarczająca dla inaktywacji drożdży. W temperaturze 60°C nie stwierdzono obecności żywych komórek drożdży, ale stwierdzono obecność żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej. Najwyższą przeżywalnością w tych warunkach odznaczał się szczep *Lactobacillus plantarum* 1; w próbce znajdowało się średnio $6,2 \times 10^2$ jtk/cm³ (rys. 2 a). W wypadku szczepu *Lactobacillus plantarum* 299 v przeżyło średnio $1,8 \times 10^2$ jtk/cm³ (rys. 2 c), a *Lactobacillus plantarum* – $44,18 \times 10^1$ jtk/cm³ (rys. 2 b). Przy przetrzymaniu tych próbek w temperaturze pokojowej prawdopodobnie bakterie te mogłyby się namnożyć.



K – próbka kontrolna
 = NIR wg Tuckey'a, jednoczynnikowa analiza wariancji, $\alpha = 0,05$
 ✕ Brak żywych komórek
 K – control sample
 = Tukeys HSD Intervals, One-Way ANOVA, $\alpha = 0.05$
 ✕ Not determined viable cells

Rys. 1. Wpływ temperatury pasteryzacji na przeżywalność drożdży *S. cerevisiae* (próbki) (średnia z trzech serii)
 Fig. 1. Effect of temperature of pasteurization on survival ability yeast *S. cerevisiae* (tubes) (average from 3 series)

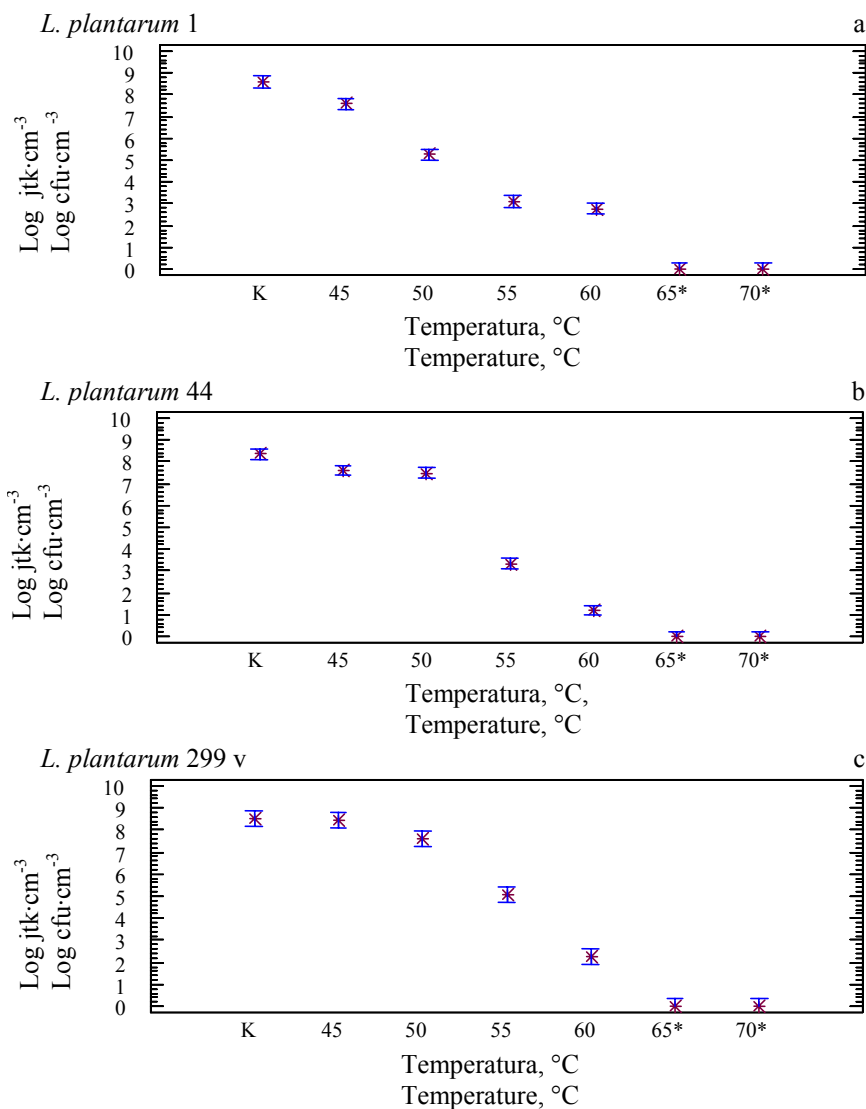
Stwierdzenie różnic temperatur inaktywacji badanych bakterii i drożdży pozwala przypuszczać, że możliwe będzie dobranie parametrów pasteryzacji w przepływie (pasteryzatory hermetyczne), pozwalających na pozostawienie znacznych ilości żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej i całkowitą eliminację drożdży.

Pasteryzację w butelkach przeprowadzono w celu sprawdzenia możliwości zastosowania pasteryzacji tunelowej (w butelkach) do przerywania fermentacji alkoholowej napoju słodowego, z zachowaniem w nim żywych bakterii fermentacji mlekowej, które następnie mogłyby namnażać się i ukwaszać napój. Taki produkt mógłby stanowić źródło żywych bakterii fermentacji mlekowej.

Stwierdzono, że w naszych warunkach temperatura 65°C (15 minut) powodowała inaktywację drożdży w napoju (rys. 3). Natomiast w wypadku bakterii fermentacji mlekowej, w próbach po pasteryzacji znajdowały się następujące ilości żywych komórek: *Lactobacillus plantarum* 1 – średnio $1,1 \times 10^1$ jtk/cm³ (rys. 4 a), *Lactobacillus plantarum* 44 – $3,4 \times 10^1$ jtk/cm³ (rys. 4 b), zaś dla *Lactobacillus plantarum* 299 v – $2,0 \times 10^2$ jtk/cm³ (rys. 4 c). Po 48-godzinnym przetrzymywaniu napoju (w temperaturze pokojowej około 22°C) po pasteryzacji liczba komórek bakterii w napoju słodowym wynosiła 10^6 - 10^7 jtk/cm³, czyli w przybliżeniu znajdowała się na poziomie sprzed pasteryzacji.

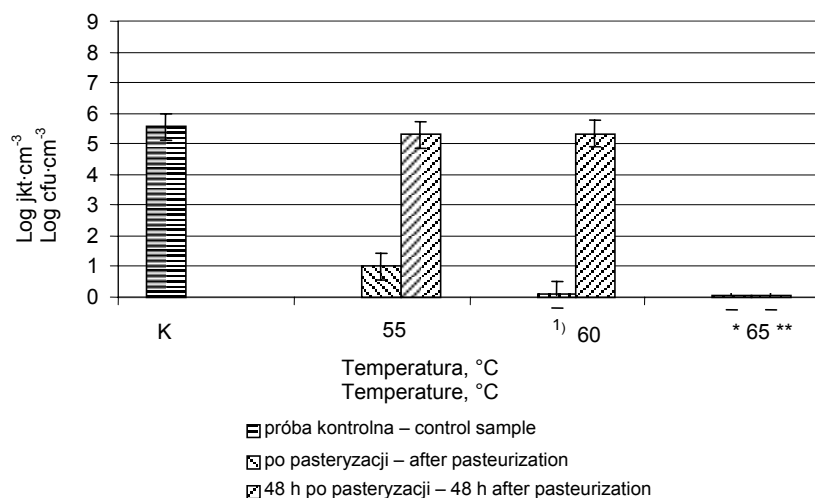
Należy zwrócić uwagę, że w wypadku piwa stosuje się pasteryzację w butelkach w temperaturze 60-63°C z przetrzymaniem przez 15-20 minut, ale w piwie znajduje się kilka procent alkoholu [Kunze 1999].

W wypadku rozlewu wina owocowego na ciepło, za wystarczającą uważa się temperaturę wina 50-55°C, ale w tych wyrobach jest co najmniej 9% alkoholu [Wzorek i Pogorzelski 1998].



K – próbka kontrolna
 = NIR wg Tuckey'a, jednoczynnikowa analiza wariancji, $\alpha = 0,05$
 *Brak żywych komórek
 K – control sample
 = Tukeys HSD Intervals, One-Way ANOVA, $\alpha = 0.05$
 *Not determined viable cells

Rys. 2. Wpływ temperatury pasteryzacji na przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej (próbówki) (średnia z 3 serii)
 Fig. 2. Effect of temperature of pasteurization on survival ability lactic acid bacteria (tubes) (average from 3 series)



┌ NIR wg Tuckey'a, wieloczynnikowa analiza wariancji, $\alpha = 0,05$

¹⁾ Pasteryzacja w 60°C – $1,0 \times 10^0$ jtk/cm³

* Po pasteryzacji - brak żywych komórek

** 48 h po pasteryzacji – brak żywych komórek

┌ Tukeys HSD Intervals, Multifactor ANOVA, $\alpha = 0.05$

¹⁾ Pasteurization at 60°C – $1,0 \times 10^0$ cfu/cm³

* After pasteurization – not determined viable cells

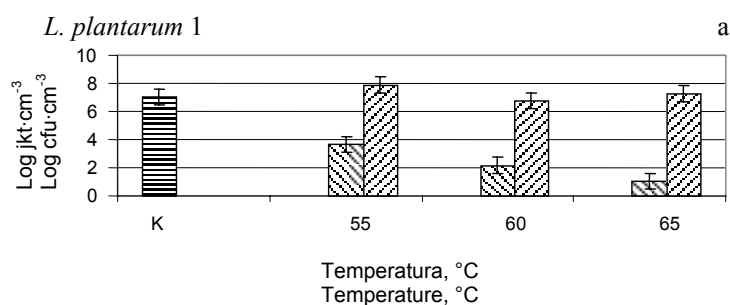
** 48 h after pasteurization – not determined viable cells

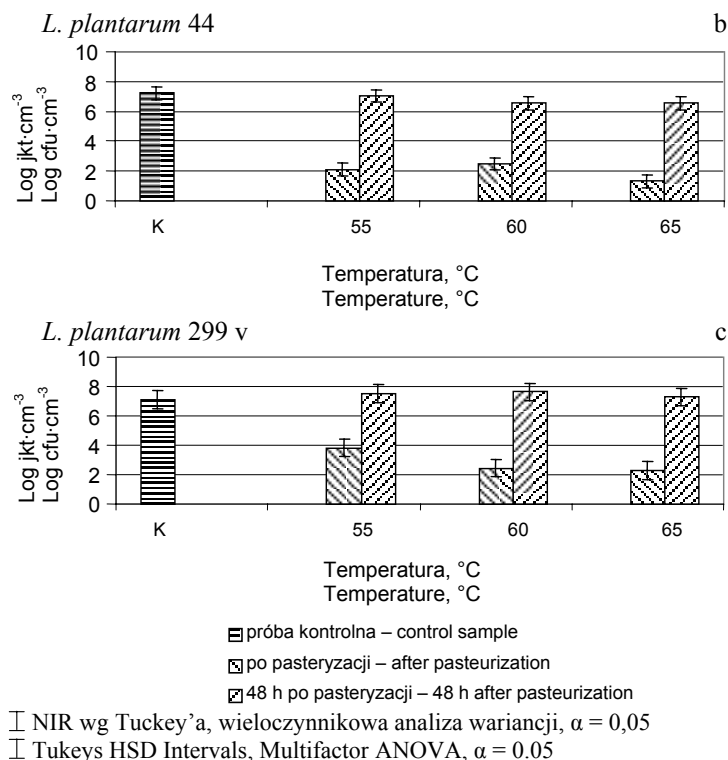
Rys. 3. Wpływ temperatury pasteryzacji na przeżywalność drożdży *S. cerevisiae* (butelki) (średnia z trzech serii)

Fig. 3. Effect of temperature of pasteurization on survival ability yeast *S. cerevisiae* (bottles) (average from 3 series)

Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że można ustalić taką temperaturę pasteryzacji w butelkach, w której zostaną wyeliminowane drożdże, a pozostaną żywe bakterie fermentacji mlekowej.

Napój słodowy wytwarzany w niniejszej pracy był technologicznie najbardziej zbliżony do produkcji piwa (słód, otrzymanie brzezki, fermentacja alkoholowa) [Kunze 1999]. Można również próbować wykorzystać inne metody usunięcia drożdży z napoju, np. filtrację z użyciem ziemi okrzemkowej lub płyt typu K7.





Rys. 4. Wpływ temperatury pasteryzacji na przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej (butelki) (średnia z 3 serii)
 Fig. 4. Effect of temperature of pasteurization on survival ability of lactic acid bacteria (bottles) (average from 3 series)

WNIOSKI

1. Przypuszcza się, że możliwe będzie dobranie parametrów pasteryzacji napoju w przepływie tak, by inaktywować komórki drożdży i zachować żywe bakterie fermentacji mlekowej. Pasteryzacja w próbkach w temperaturze 60°C z 10 minutowym przetrzymaniem powodowała inaktywację drożdży, przy czym część bakterii fermentacji mlekowej przeżywała (10^1 - 10^2 jtk/cm³). Pasteryzacja w temperaturach 65 i 70°C powodowała inaktywację zarówno bakterii, jak i drożdży.

2. Wydaje się możliwe zastosowanie pasteryzacji napoju w butelkach (tunelowej) do zahamowania fermentacji alkoholowej i otrzymania napoju zawierającego żywe kultury bakterii fermentacji mlekowej, które mogłyby decydować o jego właściwościach prozdrowotnych. Pasteryzacja napoju słodowego w butelkach, prowadzona w temperaturze 65°C przez 15 min, powodowała inaktywację drożdży z zachowaniem części żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej. Po upływie 48 h od końca procesu pasteryzacji, bakterie mlekowe namnażały się w napoju do ilości 10^6 - 10^7 komórek w centymetrze sześciennym.

PIŚMIENNICTWO

- Bomba A., Nemcova R., Mudronova D., Guba P., 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 13, 121-126.
- Cebeci A., Gurakan C., 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol.* 20, 511-518.
- Drago L., Gismondo M.R., Lombardi A., Haën C., Gozzini L., 1997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 455-463.
- Kaur I.P., Chopra K., Saini A., 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 1-9.
- Klewicka E., Libudzisz Z., 1998. Przeciwdrobnoustrojowa aktywność bakterii mlekowych. *Prz. Mlecz.* 12, 411-416.
- Klewicka E., Libudzisz Z., Czajka D., Kuc K., 1999. Antagonistyczna aktywność bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus*. *Żywność, Supl.* 42(21), 168-175.
- Koop-Hoolihan L., 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *J. Am. Diet. Assoc.* 101, (2), 229-239.
- Kovalski L.P., 1997. Technologija piščevykh proizvodstv. *Kolos Moskva*, 519-533.
- Kunze W., 1999. *Technologia piwa i słodu*. PIWOCHMIEL Warszawa.
- Varnam A., 2002. *Lactobacillus*: occurrence and significance in non-dairy foods. *Microbiol. Today* 29, 2, 13-17.
- Wzorek W., Pogorzelski E., 1998. *Technologia winiarstwa owocowego i gronowego*. Sigma NOT Warszawa.

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE OF PASTEURIZATION “MALT BEVERAGE” ON SURVIVAL ABILITY OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEAST

Abstract. The aim of the work was to preliminary establish the pasteurization temperature of beverage, in which *Saccharomyces cerevisiae* are inactivated but lactic acid bacteria survive. The possibility to use of pasteurization for elimination of yeast from beverage was screened in tubes for 10 min at temperature 45, 50, 55, 60, 65 and 70°C. Inactivation yeast when lactic acid bacteria was survived (10^1 - 10^2 cfu/ml) was caused by the pasteurization, which was kept in tubes at the temperature of 60°C. The pasteurization of beverage was conducted also in bottles at temperatures of 55, 60 i 65°C for 15 min. Also it was proved that pasteurization in bottles at 65°C is sufficient for inactivation of yeast. After that in beverage viable lactic acid bacteria were left, which after 48 hours multiplied to the level before pasteurization.

Key words: lactic acid bacteria, yeast, probiotic, pasteurization, “malt beverage” bioactive

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 28.04.2004 r.

Do cytowania - For citation: Wzorek W., Koskowska J., Korytkowska A., 2004. Wpływ temperatury pasteryzacji „napoju słodowego” na przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej i drożdży. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 3(1), 55-62.