

Kamil Szopa

Probiotyczne kozie i owcze mleko fermentowane z kolagenem

Streszczenie

Suplementacja staje się co raz popularniejszą praktyką wśród różnych grup wiekowych i ma na celu uzupełnienie codziennej diety skoncentrowanymi witaminami i/lub składnikami mineralnymi w formie leków lub suplementów diety wykazujących odżywczy lub fizjologiczny efekt. Co raz większą uwagę przykładana się do suplementacji kolagenu, ponieważ wraz z wiekiem następuje jego utrata. Spadek zdolności organizmu do produkcji kolagenu rozpoczyna się już w wieku 18–29 lat i po 40 roku życia spadek wynosi średnio o 1 % na rok, a po 80 roku życia produkcja kolagenu spada o 75 %. Dlatego korzystnym dla organizmu jest jego suplementacja już od 30, a nawet 25 roku życia. Właściwości odżywcze i funkcjonalne kolagenu i jego hydrolizatu wykorzystywane są między innymi w sektorze mleczarskim. Dodawanie bioaktywnych składników do przetworów mlecznych w tym zwłaszcza do mleka fermentowanego skutkuje produktami o wyższej wartości odżywczej i biodostępności składników. W celu zwiększenia zawartości dobrze przyswajalnego białka w mleku, można zastosować kolagen lub jego hydrolizat, dzięki czemu uzyskuje się mleko o potencjalnych właściwościach terapeutycznych oraz profilowanych parametrach tekstury. Produkty mleczne pozostają obecnie w czołówce rozwoju żywności probiotycznej. Trend wzrostu spożycia produktów fermentowanych wynika nie tylko z szerokiego asortymentu dostępnego na rynku, ale przede wszystkim z wysokich wartości odżywczych i dietetycznych oraz właściwości leczniczych i profilaktycznych. Fermentowane produkty mleczne, ze względu na swoje szczególne właściwości, stanowią również doskonałą matrycę do włączenia składników odżywczych, które nadają produktowi końcowemu właściwości funkcjonalne. Biorąc pod uwagę rosnące zainteresowanie żywnością prozdrowotną oraz występowanie alergii na frakcję α_{s1} kazeinę w mleku krowim, wzrasta zapotrzebowanie na mleko i przetwory mleczne pochodzące z mleka innych gatunków ssaków. W Polsce i na świecie, oprócz mleka krowiego, do przetwórstwa wykorzystuje się również mleko owcze i kozie, które stają się coraz bardziej popularne jako alternatywa dla produktów na bazie mleka krowiego ze względu na swoje wartości odżywcze i możliwość wykorzystania jako zamiennik mleka krowiego.

Celem pracy było określenie wpływu dodatku różnych rodzajów kolagenu (hydrolizat i kolagen wołowy) w dwóch dawkach (1,5 % i 3,0%), czasu przechowywania (1 dzień i 21 dzień) oraz szczepów probiotycznych (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* i *Lactobacillus rhamnosus*) na jakość fermentowanego mleka owczego i koziego oraz przeżywalność tych szczepów w układzie pokarmowym.

W pierwszym etapie badań dokonano oceny przydatności technologicznej surowego mleka owczego i koziego. Wyniki oceny jakości mleka owczego i koziego wykazały wysoką jakość mleka surowego i odpowiednie właściwości przetwórcze, dające możliwość jego wykorzystania w produkcji probiotycznego mleka fermentowanego. Analizując ogólną liczbę drobnoustrojów stwierdzono, że zarówno surowe mleko owcze jak i kozie przeznaczone do produkcji mleka fermentowanego wymaga poddania obróbce cieplnej (pasteryzacji) w celu zapewnienia wysokiej jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego otrzymanego mleka.

W kolejnym etapie badań w celu określenia możliwości zastosowania kolagenu w produkcji probiotycznego owczego i koziego mleka fermentowanego dokonano oceny właściwości fizykochemicznych, organoleptycznych i mikrobiologicznych otrzymanego mleka.

We wszystkich grupach mleka owczego i koziego stwierdzono, że mleko fermentowane z dodatkiem kolagenu po pierwszym dniu przechowywania miało wyższą wartość pH niż mleko kontrolne bezkolagenu. Wykazano, że rodzaj kolagenu ma znaczenie w różnicowaniu wartości pH, gdyż próby mleka owczego i koziego z hydrolizatem miały w 1 dniu przechowywania wyższą wartość pH niż grupy mleka z kolagenem wołowym, choć nie zawsze były to różnice istotne.

Ponadto zaobserwowano tendencję, że zwiększenie dawki kolagenu z 1,5 % do 3,0 % skutkowało zwiększeniem wartości pH, zarówno w przypadku dodania hydrolizatu, jak i kolagenu wołowego. W zależności od rodzaju i dawki, dodatek kolagenu wpływał także na zawartość kwasu mlekowego w analizowanych próbach.

Fermentowane mleko owcze z dodatkiem 1,5% hydrolizatu cechowało się niższą zawartością kwasu mlekowego niż odpowiedniki kontrolne. Z kolei w fermentowanym mleku kozim wyższą zawartość kwasu mlekowego oznaczono w mleku z dodatkiem kolagenu wołowego niż hydrolizatu. Wyjątek stanowi próbka KLP1.5H, w której wykazano identyczną ilość kwasu mlekowego, jak w KLP. Zwiększenie dawki dodatku z 1,5 % do 3,0 % powodowało podwyższenie zawartości kwasu mlekowego w fermentowanym mleku kozim. Analizując wyniki w 21 dniu przechowywania stwierdzono, że korzystnie na zawartość kwasu mlekowego w mleku kozim fermentowanym wpływa 1,5% dodatek kolagenu wołowego. W tym przypadku wszystkie grupy mleka cechowały się istotnie wyższą zawartością kwasu niż ich odpowiedniki kontrolne. Również w mleku z kolagenem wołowym zwiększenie dawki z 1,5% do 3,0% spowodowało istotne zwiększenie ilości kwasu mlekowego.

Najintensywniej synerzę mleka owczego ograniczał dodatek hydrolizatu zarówno w 1 jak i w 21 dniu przechowywania. Zwiększenie dawki hydrolizatu z 1,5% do 3,0% powodowało istotne obniżenie synerzy w porównaniu do owczych odpowiedników kontrolnych i mleka owczego z 1,5% dodatkiem hydrolizatu. Dodatek kolagenu wołowego nie był już tak skuteczny w ograniczeniu wycieku serwatki. W fermentowanym mleku kozim nie wykazano jednoznacznie czy rodzaj i dawka kolagenu wpływają na wzrost/ograniczenie synerzy. Okazuje się, że dodatek kolagenu wołowego i hydrolizatu ograniczał wyciek serwatki jedynie w mleku kozim fermentowanym przez *L. rhamnosus*. Zwiększenie dawki z 1,5% do 3,0% skutkowało wzrostem synerzy w próbach mleka koziego jedynie w przypadku dodatku kolagenu wołowego. W mleku kozim z hydrolizatem zależności te nie były jednoznaczne.

W tych badaniach analiza wyników jasności L^* wykazała, że w 1 dniu przechowywania dodatek kolagenu zarówno w formie kolagenu wołowego, jak i hydrolizatu powodował pociemnienie barwy owczego i koziego mleka fermentowanego we wszystkich grupach w porównaniu do kontrolnych. Owcze i kozie mleko fermentowane charakteryzowało się udziałem barwy zielonej i żółtej.

W probiotycznym mleku owczym mniejszą twardość żelu odnotowano dla prób z kolagenem wołowym w porównaniu do ich odpowiedników z hydrolizatem. Z kolei, analizując wyniki twardości mleka koziego stwierdzono, że jedynie w mleku kozim z dodatkiem hydrolizatu KLP3.0H i KLR3.0H istotnie zwiększyła jego twardość w porównaniu z kontrolnymi. W przypadku pozostałych grup nie wykazano istotnego wpływu na twardość żelu mleka koziego. Po 1 dniu przechowywania jedynie w jednym przypadku dodatek hydrolizatu obniżył sprężystość mleka OLA3.0H. Na sprężystość pozostałych prób mleka owczego i wszystkich grup mleka koziego nie miały wpływu rodzaj i dawka kolagenu w 1 dniu przechowywania. Po 21 dniach przechowywania w mleku kozimi owczym także nie stwierdzono tego wpływu z wyjątkiem mleka OLA1.5W, gdzie sprężystość żelu wzrosła, w porównaniu z grupą kontrolną.

We wszystkich grupach fermentowanego mleka liczba żywych komórek bakterii probiotycznych uzyskanych w całym okresie przechowywania była wyższa niż $8 \log \text{ jtkg}^{-1}$. Dodanie hydrolizatu i kolagenu wołowego do mleka koziego znacząco poprawiło przeżywalność bakterii oznaczoną w 21 dniu przechowywania mleka fermentowanego przez *L. casei* i *L. acidophilus*, w porównaniu do ich odpowiedników kontrolnych. W mleku owczym fermentowanym przez *L. acidophilus* i *L. casei* zaobserwowano lepszą przeżywalność bakterii podczas 21 dni przechowywania, a dawka kolagenu nie miała wpływu na wzrost i przeżywalność obu szczepów. Ponadto wykazano, że w mleku zawierającym hydrolizat panowały korzystne warunki wzrostu *L. casei* nawet podczas przechowywania chłodniczego.

Dodatek kolagenu do mleka owczego wzmocnił intensywność słodkiego smaku dzięki obecności słodkiej glicyny. Najbardziej intensywny mleczno-kremowy smak stwierdzono w mleku owczym z hydrolizatem fermentowanym przez *L. casei*. Jednakże dodatek kolagenu (wołowego, hydrolizatu) powodował lekki obcy smaki zapach owczego mleka fermentowanego. Intensywność smaku dodatku i obcego w mleku kozim była kształtowana w zależności od szczepu bakterii prowadzącego fermentację oraz od czasu przechowywania. Najważniejszym problemem związanym z wykorzystaniem mleka koziego do produkcji przetworów mlecznych jest jego kozi smak i zapach. Jednakże dodatek kolagenu nie zwiększał odczucia smaku koziego, lecz intensyfikował smak mleczno-kremowy i słodki.

Dokonano oceny wpływu rodzaju mleka i czasu przechowywania na cechy fizykochemiczne i organoleptyczne otrzymanego mleka fermentowanego.

We wszystkich grupach fermentowanego mleka stwierdzono, że czas przechowywania powodował wzrost kwasowości otrzymanego mleka fermentowanego. Ponadto stwierdzono wyższe wartości pH w 21 dniu przechowywania we wszystkich grupach kontrolnych fermentowanego mleka koziego w porównaniu z fermentowanym mlekiem owczym.

Z przeprowadzonej analizy wynika, że produkcję kwasu mlekowego przez bakterie probiotyczne kształtował czas przechowywania i rodzaj mleka co potwierdza również przeprowadzona analiza wariancji ANOVA ($p=0,0000$). We wszystkich próbach koziego mleka kontrolnego w pierwszym dniu przechowywania stwierdzono niższą zawartość kwasu mlekowego w porównaniu z mlekiem owczym. W 21 dniu przechowywania jedynie w próbach mleka koziego KLA, KLP i KLR wykazano niższą zawartość kwasu mlekowego w porównaniu z odpowiednikami w mleku owczym.

Na wskaźnik synerезy otrzymanego mleka wpływał rodzaj użytego mleka do badań. Wyższy stopień synerезy występował w fermentowanym mleku kozim w porównaniu do prób otrzymanych z mleka owczego. Największy stopień synerезy stwierdzono w mleku fermentowanym przez *L. acidophilus* zarówno dla mleka fermentowanego owczego jak i koziego w obu terminach badań. Z kolei czas przechowywania różnicował stopień synerезy w próbach OLC, OLP, OLR, gdzie stwierdzono mniejszy podciek serwatki, natomiast w próbach KLAi KLR, stwierdzono wzrost ilości wydzielanej serwatki. W pozostałych grupach nie stwierdzono istotnych różnic wynikających z wpływu czasu przechowywania na stopień synerезy.

Analiza wyników jasności L^* wykazała, że w 1 i 21 dniu przechowywania fermentowane mleko kozie charakteryzowało się ciemniejszą barwą w porównaniu z mlekiem owczym. Ponadto wydłużenie czasu przechowywania powodowało także pociemnienie barwy otrzymanego fermentowanego mleka owczego i koziego, co wskazuje na istotny wpływ rodzaju mleka i czasu przechowywania na jasność barwy L^* . Analizując składową barwę b^* z uwzględnieniem wpływu rodzaju mleka należy stwierdzić istotnie większy udział barwy żółtej w mleku owczym niż kozim w całym okresie badań. Natomiast wydłużenie czasu przechowywania z 1 do 21 dni skutkowało intensyfikacją barwy żółtej tylko w mleku owczym. Z kolei w mleku kozim wraz z czasem przechowywania zmniejszał się udział koloru żółtego. Mleko owcze charakteryzowało się głębszą i czystsza barwą, niż mleko kozie.

Dokonano analizy jak rodzaj mleka i czas przechowywania wpływają na wybrane składowe tekstury (twardość, kohezyjność i sprężystość). Analiza danych wskazuje, że twardość żelu mleka fermentowanego uzależniona jest od rodzaju mleka. W tym przypadku zawsze mleko owcze charakteryzowało się twardszym żelem niż kozie, co związane jest z zawartością suchej masy. Ponadto czas przechowywania nie wpłynął istotnie na twardość żelu mleka koziego. Odwrotną zależność stwierdzono dla mleka owczego, gdzie wydłużenie czasu przechowywania do 21 dni skutkowało istotnym wzrostem twardości żelu mleka fermentowanego. Większą siłą spójności pomiędzy cząsteczkami charakteryzuje się mleko kozie, z wyjątkiem grup OLC i KLC, gdzie

ustalono zależność odwrotną. Wraz z wydłużeniem czasu przechowywania kohezyność żelu mleka nie zmieniała się istotnie w przypadku mleka koziego, mleko owcze charakteryzuje się wyższymi wartościami sprężystości niż kozie. Czas przechowywania w większości przypadków zwiększał sprężystość żelu mleka fermentowanego, z wyjątkiem mleka KLC, gdzie odnotowano zmniejszenie sprężystości.

Rodzaj mleka użytego w badaniach wpływał głównie na smak mleka fermentowanego. Smak obcy był bardziej intensywny w kozim mleku fermentowanym. Czas przechowywania, przyczynił się w większości przypadków do zwiększenia intensywności smaku i zapachu kwaśnego oraz do zmniejszenia odczucia smaku słodkiego w obu rodzajach mleka.

W ostatnim etapie badań przeprowadzono trawienie *in vitro* w celu oznaczenia przeżywalności komórek bakterii probiotycznych w warunkach pasażu żołądkowo-jelitowego. Przeprowadzone badania wykazały najniższą przeżywalność dla szczepu *L. rhamnosus* podczas trawienia w warunkach panujących w modelowym układzie pokarmowym, gdzie wykazano również największą redukcję liczby żywych komórek. Korzystny wpływ na przeżywalność tego szczepu miał dodatek kolagenu wołowego, szczególnie w mleku kozim. Ponadto przeżywalność *L. rhamnosus* była zróżnicowana ze względu na rodzaj mleka. W mleku kozim wahała się od 45,29% w KLR do 64,23% w KLR3.0H, natomiast w mleku owczym od 41,05% w OLR3.0W do 48,49% w OLR1,5H. Mleko kozie również dawało warunki dla korzystniejszej przeżywalności komórek *L. paracasei* zwłaszcza po dodaniu hydrolizatu, w porównaniu z mlekiem owczym. Najkorzystniejszą przeżywalność w symulowanych warunkach trawienia *in vitro* w porównaniu z liczbą komórek przed trawieniem stwierdzono w mleku fermentowanym przez *L. casei* i *L. paracasei*. Wyniki wykazały, że w fazie jelita cienkiego mleka fermentowane przez *L. casei* i *L. paracasei* miały wyższą zawartość probiotyków niż $5 \log \text{ jtk g}^{-1}$, wykazując przeżywalność powyżej 50%. Natomiast szczepy *L. rhamnosus* i *L. acidophilus* oznaczono w liczbie komórek większej niż $4 \log \text{ jtk g}^{-1}$. Dodatek kolagenu i hydrolizatu do mleka owczego skutkowało zmniejszeniem przeżywalności *L. acidophilus*, natomiast wprowadzenie hydrolizatu do mleka koziego wzrostem przeżywalności tego szczepu. Dodatek kolagenu wołowego korzystnie wpływał na przeżywalność *L. casei* i *L. rhamnosus* w warunkach trawienia *in vitro*.

Słowa kluczowe: fermentowane mleko owcze, fermentowane mleko kozie, kolagen wołowy, hydrolizat kolagenu, probiotyk, *in vitro*, wskaźnik przeżywalności