

ANNA BZDUCHA, MIECZYSLAW W. OBIEDZIŃSKI

## LICZEBNOŚĆ PAŁECZEK Z RODZAJU *LACTOBACILLUS* I *BIFIDOBACTERIUM* W ORAZ ICH WPŁYW NA ZAWARTOŚĆ SKONIUGOWANEGO KWASU LINOLOWEGO W MODELOWYCH SERACH DOJRZEWAJĄCYCH

### Streszczenie

W pracy określono wpływ probiotycznych pałeczek *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium lactis* na zawartość CLA w modelowych serach dojrzewających. W okresie dojrzewania serów oznaczano również liczbę żywych komórek badanych mikroorganizmów.

Wytworzone sery modelowe charakteryzowały się ponad 23% zawartością tłuszczu w suchej masie i ok. 58% zawartością wody, wobec czego zakwalifikowano je do grupy serów półtłustych miękkich. We wszystkich próbach serów świeżych zawartość CLA wynosiła ok. 700 mg/100 g tłuszczu. Liczba żywych komórek bakterii probiotycznych w serach dojrzewających w temp. 6°C przez 8 tygodni utrzymywała się na poziomie  $10^7$ – $10^8$  jtk/g, spełniając wymaganie minimum terapeutycznego. W zastosowanych warunkach dojrzewania nie stwierdzono wpływu wybranych bakterii probiotycznych na zawartość CLA w serach modelowych.

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, modelowe sery dojrzewające, kwas linolowy o wiązaniach sprzężonych (CLA)

### Wprowadzenie

Potencjalny prozdrowotny efekt spożywania produktów mleczarskich z dodatkiem bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* jest czynnikiem rozwoju badań nad żywnością funkcjonalną, zawierającą żywe mikroorganizmy o działaniu probiotycznym. W ostatnich latach w mleczarstwie obserwuje się zainteresowanie zastosowaniem mikroorganizmów probiotycznych w technologii serów dojrzewających. Wyniki badań nad serami dojrzewającymi z dodatkiem probiotycznych kultur niestarterowych wskazują, że przeżywalność tych mikroorganizmów może pozostawać na wyso-

kim poziomie podczas długiego okresu dojrzewania serów, tzn. spełnia warunek FAO/WHO i IDF/FIL odnośnie minimum terapeutycznego [3, 5]. Minimum terapeutyczne określa najmniejszą dopuszczalną liczbę żywych komórek bakterii na poziomie  $10^6$ – $10^7$  w gramie lub mililitrze produktu podczas całego okresu przydatności do spożycia [6, 10].

Lipidy mleka zawierają składniki wykazujące działanie m.in. przeciwnowotworowe. Takie właściwości przypisuje się m.in. grupie izomerów pozycyjnych i geometrycznych kwasu linolowego o wiązaniach sprzężonych (z ang. conjugated linoleic acid-CLA), kwasowi izopentadekanowemu (kwas 13-metylotetradekanowy), masłowemu oraz sfingolipidom [20, 22]. Najbardziej aktywnemu biologicznie izomerowi CLA, którym jest kwas 18:2 cis9, trans11, przypisuje się ponadto działanie immunomodulacyjne, przeciwcukrzycowe, a także przeciwmiażdżycowe. To ostatnie związane jest m.in. ze zmniejszeniem poziomu cholesterolu całkowitego we krwi, frakcji LDL cholesterolu oraz triacylogliceroli, co wpływa jednocześnie na regulację ciśnienia krwi. Izomer 18:2 trans10, cis12 wpływa natomiast na gospodarkę lipidową organizmu, wspomagając redukcję masy ciała, a tym samym przeciwdziałając otyłości [8, 14, 15, 18].

W produktach mleczarskich izomerem stanowiącym ponad 80% izomerów CLA tłuszczu mlekowego jest kwas 18:2 cis-9, trans-11. Jego występowanie to wynik działalności mikroflory żwacza zwierząt przeżuwających, która przeprowadza enzymatyczną izomeryzację kwasu linolowego (KL). Jest to pierwszy etap na drodze biohydrogenacji do kwasu stearynowego. Dodatkowo CLA powstaje w wyniku desaturacji kwasu wakcenenowego (18:1, trans-11) w gruczołach mlecznych. Według ostatnich badań, zdolność konwersji kwasu linolowego do CLA mogą wykazywać również niektóre szczepy bakterii mlekowych (LAB) stosowane jako kultury starterowe, a także szczepy probiotyczne LAB. Większość autorów wskazuje, że kwas linolowy może być wykorzystywany we wspomnianych przemianach przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* czy *Bifidobacterium* tylko jako wolny kwas tłuszczowy, jednak prace innych autorów wskazują, że zawartość CLA ulegała zwiększeniu również wówczas, gdy w podłożu wzrostowym źródłem LA były formy zestryfikowane tego kwasu, głównie w acyloglicerolach, np. w tłuszczu mlecznym czy oleju słonecznikowym [1, 5, 21].

Celem pracy było określenie wpływu probiotycznych pałeczek *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium lactis* na zawartość CLA w czasie dojrzewania serów modelowych, a także określenie zmian liczby tych mikroorganizmów podczas dojrzewania serów.

### **Materiał i metody badań**

W badaniach stosowano następujące szczepy bakterii: *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Chr. Hansen), *Lactobacillus casei* DN-114001 (Danone), *Bifidobacterium lactis*

Bb-12 (Chr. Hansen) oraz bakterie starterowe procesu fermentacji: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-603 (Chr. Hansen).

Materiał badawczy stanowiły sery modelowe, do których oprócz kultur starterowych procesu fermentacji (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) zastosowano podczas wytwarzania dodatek bakterii probiotycznych w różnych kombinacjach (tab. 1), otrzymując osiem serów modelowych.

Tabela 1

Kombinacja mikroorganizmów w serach modelowych.  
The combination of micro-organisms in model cheeses.

Symbol sera modelowego Letter mark of a model cheese	Kombinacje mikroorganizmów w serach modelowych Combinations of micro-organisms in model cheeses
A (model kontrolny) A (control model)	R603
B	R603 + DN-114001
C	R603 + Bb-12
D	R603 + DN-114001 + Bb-12
E	R603 + LA5
F	R603 + LA5 + DN-114001
G	R603 + LA5 + Bb-12
H	R603 + LA5 + DN-114001 + Bb-12

Sery modelowe wytwarzano z zachowaniem warunków sterylnych. Do szklanych butelek Shotta o pojemności 1 l naważano śmietankę UHT (30% tłuszczu), odtłuszczonego proszku mlecznego i dodawano 250 ml uprzednio wysterylizowanej wody. Zarówno śmietankę, jak i mleko w proszku, dodawano w ilości ok. 28% wagowych. Następnie dodawano NaCl (2%) i cytrynian sodu (0,3%). Końcowa masa sera modelowego wynosiła ok. 600 g. Masę serową poddawano ogrzewaniu do temp. 31°C, zaszczipiano kulturami bakterii (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) na poziomie ok.  $10^8$  jtk/g sera modelowego oraz na poziomie ok.  $10^7$  jtk/g sera modelowego w przypadku bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Następnie termostatowano ją w temp. 31°C w łaźni wodnej (Cabrolab Electronic, Polska) przez 30 min, po czym dodawano podpuszczkę (1:13000, Marzyme, Chr. Hansen). Po wytworzeniu się skrzepu serowego masę cięto, dogrzewano do ok. 41°C i termostatowano w łaźni wodnej ok. 30 min. Tak przygotowane sery modelowe poddawano dojrzewaniu przez 8 tygodni w temp. 6°C w chłodziarce z kontrolowaną temperaturą (Elektrolux). Próbkę do analiz mikrobiologicznych, fizykochemicznych oraz analizy estrów metylowych kwasów tłuszczowych pobierano z częstotliwością co dwa tygodnie (2., 4., 6. i 8. tydzień) od momentu wytworzenia serów (próba 0). Próbkę przeznaczoną do analizy estrów metylowych kwasów tłuszczowych przechowywano w temperaturze -21°C do czasu analizy.

Analizy składu estrów metylowych kwasów tłuszczowych wykonywano w serach modelowych z kolejnych okresów dojrzewania w trzech powtórzeniach. Ekstrakcję tłuszczu wykonywano według zmodyfikowanej procedury podanej przez Christie [4]. Tłuszcz ekstrahowano z próbek za pomocą mieszaniny chloroform : metanol (2 : 1 v/v) oraz dodawano nasycony roztwór KCl – odczynniki firmy POCH o czystości analitycznej. Przed ekstrakcją dodawano 500 µg standardu wewnętrznego (triacyloglicerol kwasu heneicosanowego, Nu-Chek Prep, Inc., T-175), w celu wykonania przeliczeń ilościowych [mg/100g tłuszczu] w odniesieniu do CLA po rozdiale chromatograficznym. Po odparowaniu chloroformu w strumieniu azotu tłuszcz rozpuszczano w heksanie (POCH, cz.d.a.). Następnie stosowano transestryfikację kwasów tłuszczowych (nie estryfikowano wolnych kwasów tłuszczowych) za pomocą 0,5 M KOH w metanolu (30 min w temp. 37°C). Estry metylowe kwasów tłuszczowych (w tym CLA - 18:2 cis9, trans11) oznaczano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC/MS-QP2010, Shimadzu) przy użyciu kolumny polarnej SP-2560 (100 m x 0,2 µm x 0,25 mm) firmy Supelco. Zastosowano bezdzielnikowy tryb nastrzyku próbki w następujących warunkach chromatografowania: temp. dozownika 240°C, temp. początkowa kolumny 40°C, izoterma 12 min, wzrost temperatury o 10°C/min do 160°C, izoterma 20 min, następnie wzrost temp. pieca o 4°C/min do 180°C - izoterma 20 min, po czym zastosowano wzrost temperatury o 6°C/min do 230°C (izoterma 15 min). Gazem nośnym był hel o przepływie 1,10 cm<sup>3</sup>/min. Stosowano następujące warunki pracy spektrometru masowego: temp. źródła jonów 200°C, temp. linii łączącej GC z MS 200°C, jonizacja elektronami o energii 70eV, napięcie detektora 1,13 kV, zakres przemieszczania filtra kwadrupolowego 50–500 m/z. Identyfikację CLA (18:2 cis-9, trans-11) prowadzono porównując spektrum masowe oraz czas retencji ze standardem tego izomeru (UC-60-A, Nu-Chek Prep., Inc.). Obliczenia ilościowe CLA wykonywano względem powierzchni piku standardu wewnętrznego (sw) według wzoru: CLA [mg/100g tłuszczu] = [(powierzchnia<sub>CLA</sub> × powierzchnia<sub>sw</sub><sup>-1</sup>) × (masa sw [mg] × masa<sub>sw</sub><sup>-1</sup>) × WK<sub>CLA</sub> × 100] × (1,04 × % tłuszczu)<sup>-1</sup>, gdzie 1,04 - współczynnik przeliczeniowy estru metylowego kwasu heneikozanowego na wolny kwas heneikozanowy, a WK – współczynnik korekcji dla CLA wyznaczony doświadczalnie względem kwasu heneikozanowego (rozdział chromatograficzny związków standardowych) na podstawie zależności: WK<sub>CLA</sub> = (powierzchnia<sub>sw</sub> × powierzchnia<sub>CLA</sub><sup>-1</sup>) × (masa<sub>CLA</sub> × masa<sub>sw</sub><sup>-1</sup>).

Zawartość CLA w serach modelowych z 2., 4., 6. i 8. tygodnia dojrzewania i o określonej kombinacji bakterii (tab. 1) porównywano z zawartością CLA z czasu zerowego (kontrolnego) w serach modelowych o tej samej kombinacji mikroorganizmów.

Oznaczenie azotu ogółem (metoda Kjeldahla), zawartości tłuszczu ogółem (metoda butyrometryczna) oraz obliczenie zawartości tłuszczu w suchej masie, analizę za-

wartości wody i suchej masy (suszenie w temp. 102°C) oraz pomiary pH (metoda potencjometryczna, pehametr typu LPH33OT, TOCUSSEL) prowadzono według zaleceń PN-73/A-86232 [9].

Liczbę paciorkowców mlekowych oznaczano metodą płytkową w hodowli na pożywce agarowej M17 o pH 7,2 (Merck). Inkubację tlenową prowadzono w temp. 30±1°C przez 72 h. Oznaczenie liczby pałeczek mlekowych wykonywano metodą płytkową (posiew metodą kropelkową). Hodowlę beztlenową prowadzono z wkładami do wytwarzania atmosfery beztlenowej w słoju do hodowli beztlenowej (Anaerocult, Merck) na pożywce MRS-Agar o pH 5,4 (Biomerioux). Inkubację prowadzono w temp. 42°C/72 h. Analizy mikrobiologiczne wykonywano w dwóch powtórzeniach. Wyniki podawano jako log jtk/1 g sera modelowego.

Analizy statystycznej istotności różnic dokonano przy zastosowaniu analizy wariancji ( $\alpha = 0,05$ ) w programie Statgraphics 4.1.

## Wyniki i dyskusja

Wytworzone sery modelowe charakteryzowały się ponad 23% zawartością tłuszczu w suchej masie i ok. 58% zawartością wody, co jest charakterystyczne dla serów półtwardych miękkich. Zawartość białka ogółem wynosiła ok. 11%. Po wytworzeniu serów modelowych (próba 0) pH kształtowało się na poziomie ok. 6,5–6,4 jednostek pH odpowiednio w serze kontrolnym i serach modelowych z dodatkiem bakterii probiotycznych. Podczas dojrzewania pH ulegało obniżeniu skutkiem przebiegu procesu fermentacji i produkcji kwasów organicznych. W ósmym tygodniu pH serów z dodatkiem tylko bakterii *Lactococcus lactis* (model A) było na poziomie ok. 5,7, zaś serów modelowych z dodatkiem *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* osiągało wartość ok. 5,3 (model B, D i E) oraz ok. 5,45 a w pozostałych serach modelowych (C, F, G i H) – tab. 2.

Liczba żywych komórek mezofilnych paciorkowców tlenowych po wytworzeniu serów modelowych była na podobnym poziomie we wszystkich modelach i wynosiła ok.  $10^8$  jtk/g (rys. 1). W czasie dojrzewania obserwowano wzrost liczby komórek tych bakterii o ok. 1 cykl log w serach modelowych A, B i C, osiągając w ósmym tygodniu dojrzewania ok. 8,8 cykli log. W modelach E i D zaobserwowano wzrost liczby paciorkowców mlekowych na poziomie 0,7 cyklu log, zaś najmniejszy wzrost liczby mikroorganizmów starterowych odnotowano w modelu H (dodatek trzech szczepów probiotycznych), w którym w całym okresie dojrzewania liczba R-603 wynosiła ok.  $10^8$  jtk/g.

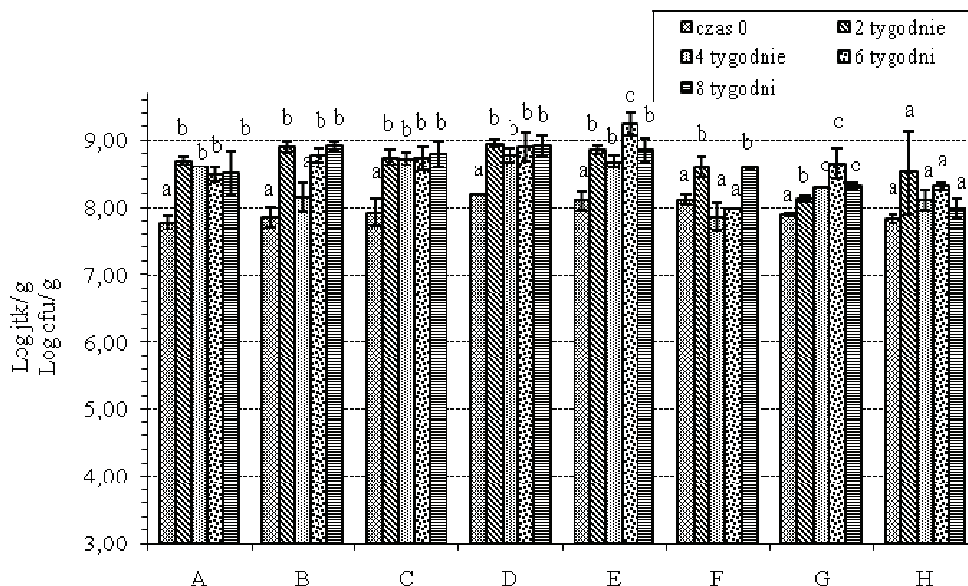
W przypadku pałeczek mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* inoculum wynosiło ok.  $10^7$  jtk/g (rys. 2). W modelu B, w którym zastosowano szczepionkę *Lb. casei*, w drugim tygodniu dojrzewania wykazano zmniejszenie liczby tych bakterii z 7,6 (próba 0) do ok. 6,6 cykli log, po czym obserwowano powolny wzrost liczby komórek do ok. 7,2 cykli log. W przypadku modelu C, z dodatkiem *Bifidobacterium*

*lactis*, w całym okresie dojrzewania serów modelowych stwierdzono powolne zmniejszanie się liczby żywych komórek z początkowej  $10^7$  jtk/g do ok.  $10^6$  jtk/g. Jak podaje Boylston i wsp. [2], zdolność przeżywania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w serach jest zależna od szczepu, aktywności bakterii kwasu mlekowego użytych podczas produkcji sera, składu chemicznego matrycy serowej oraz warunków procesu technologicznego i dojrzewania. Mleko nie jest podłożem dostarczającym wszystkich niezbędnych składników do rozwoju bifidobakterii. Podobną zależność stałego zmniejszania się liczby pałeczek probiotycznych zaobserwowano w modelu z dodatkiem Bb-12 i La-5 (z ok. 8 do ok. 7,5 cykli log), jednak nadal spełniały one warunek produktu probiotycznego. W modelu D (*Lb. casei* i Bb-12) oraz w modelu E (*Lb. acidophilus*) liczba żywych komórek bakterii utrzymywała się w całym okresie dojrzewania na podobnym poziomie (ok.  $10^7$  jtk/g). W modelu H, w którym zastosowano inoculum wszystkich badanych pałeczek mlekowych, bakterie wykazywały niewielką dynamikę wzrostu (przyrost z ok. 7,5 do ok. 8 cykli log). Największy wzrost liczby żywych komórek (z ponad  $10^7$  jtk/g do ponad  $10^8$  jtk/g) zaznaczył się w modelu F, w którym obecne były pałeczki obu gatunków z rodzaju *Lactobacillus*. Wyniki badań m.in. Phillipsa i wsp. [16] wskazują na dobrą przeżywalność bakterii probiotycznych, tj. na poziomie  $10^6$ – $10^7$  jtk/g sera po 32 tygodniach dojrzewania. Może to wynikać z faktu, że sery dojrzewające charakteryzują się wyższym pH oraz większą zawartością tłuszczu w porównaniu z innymi produktami fermentowanymi. Stanowi to ochronę dla komórek bakterii, również podczas pasażu przez przewód pokarmowy człowieka.

Tabela 2

Wartości pH serów modelowych dojrzewających w temperaturze 6°C.  
The pH values of model cheeses ripening at a 6°C temperature.

Czas dojrzewania [tygodnie] Ripening time [weeks]	Sery modelowe / Model cheeses*			
	A x ± s	B x ± s	C x ± s	D x ± s
0	6,50±0,02	6,40±0,05	6,40±0,04	6,38±0,00
2	5,82±0,01	5,56±0,00	5,63±0,03	5,43±0,01
4	5,75±0,01	5,36±0,01	5,49±0,00	5,30±0,01
6	5,53±0,01	5,19±0,01	5,39±0,01	5,18±0,00
8	5,67±0,00	5,33±0,02	5,47±0,01	5,31±0,00
	E x ± s	F x ± s	G x ± s	H x ± s
0	6,37±0,06	6,32±0,08	6,39±0,00	6,33±0,02
2	5,59±0,01	5,55±0,04	5,76±0,01	5,61±0,01
4	5,45±0,04	5,54±0,01	5,55±0,02	5,51±0,03
6	5,32±0,03	5,48±0,04	5,40±0,02	5,47±0,02
8	5,37±0,01	5,46±0,01	5,45±0,01	5,49±0,02



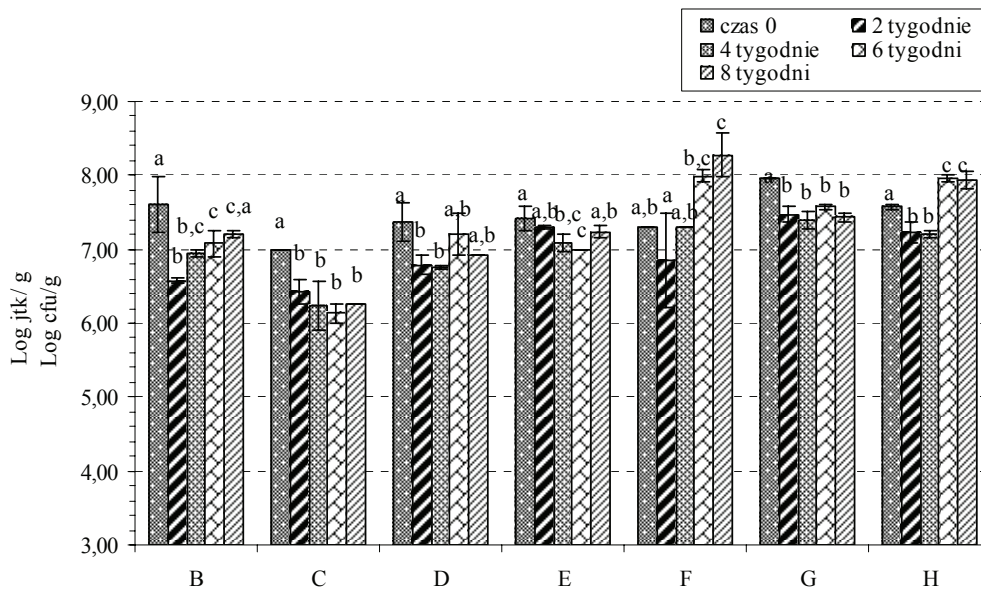
Rys. 1. Zmiany liczby mezofilnych paciorkowców tlenowych w czasie dojrzewania serów modelowych w temp. 6°C.

Fig. 1. Changes in the count of mesophilic aerobic coccus during the ripening of model cheeses at a 6°C temperature.

Wyniki badań wskazują, że biosyntezę CLA przeprowadzać mogą mikroorganizmy z grupy bakterii mlekowych, m.in. z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, przy czym zdolność tę przypisuje się nie wszystkim szczepom. Celem pracy Alonso, Cuesta i Gillilanda [1] było określenie zdolności szczepów *Lactobacillus acidophilus* (L1, O16) i *Lactobacillus casei* (E5, E10), wyizolowanych z przewodu pokarmowego człowieka, do produkcji wolnego kwasu linolowego. Wszystkie analizowane szczepy bakterii potrafiły wykorzystywać wolny kwas linolowy w kierunku syntezy CLA. Również liczne szczepy z rodzaju *Bifidobacterium* wykazywały zdolność biosyntezy CLA [5, 11]. Tłuszcz mleczny, składający się w ponad 97% z triacylogliceroli, potrafiło wykorzystywać do produkcji CLA pięć szczepów, w tym m. in. *Propionibacterium* oraz kultury jogurtowe, *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus* i *Salivarius* subsp. *thermophilus*. Niezhydrolizowany olej sojowy wykorzystywały do biosyntezy tylko szczepy *Lb. plantarum* L2-1, *Lb. rhamnosus* oraz *Bifidobacterium bifidum* 420 [21].

We wszystkich serach modelowych zawartość CLA w próbach 0 (po wytworzeniu sera) wynosiła ok. 700 mg/100 g tłuszczu (tab. 3). Jak podaje Jiang i wsp. [9] zawartość CLA w serach typu cheddar produkowanych z wykorzystaniem różnych szczepów *Lactococcus lactis* wynosiła od 500 do 700 mg/100 g tłuszczu. Różnice ilościowe zawartości izomerów mogły wynikać z różnic zawartości CLA w mleku stoso-

wanym do wyrobu serów, odmiennych warunków produkcji, zastosowanych kultur starterowych, a także warunków oraz długości okresu dojrzewania serów. Autorzy Ci nie zauważyli jednak istotnego wpływu warunków produkcji serów oraz rodzaju zastosowanych mikroorganizmów na zawartość CLA w szwedzkich serach dojrzewających. Zwiększone stężenie kwasu C18:2 cis-9, trans-11 stwierdzili natomiast w serach dojrzewających Shantha i wsp. [19], którzy podają, że zawartość tych izomerów prawdopodobnie ulega podwyższeniu pod wpływem różnych czynników procesu technologicznego. Wyższe stężenie kwasów o wiązaniach skoniugowanych zaobserwowano w serach dojrzewających (ok. 8,8 mg CLA/g tłuszczu) w porównaniu z nieprzetworzonym mlekiem – poniżej 1 mg CLA/1 g tłuszczu [11]. Fritshe i wsp. [7] podają, że w wytworzonym przez nich serze Emmenthal z dodatkiem szczepów probiotycznych ilość CLA nieznacznie wzrosła. W niniejszej pracy w badanych serach modelowych nie stwierdzono istotnych zmian zawartości CLA w czasie ośmiotygodniowego dojrzewania w temp. przechowywania wynoszącej 6°C. Badania te uwzględniają jedynie analizę kwasów tłuszczowych występujących w tłuszczu mlekowym w formie zestyfikowanej (gł. jako triacyloglicerole), co może wskazywać, że zastosowane szczepy bakterii nie wykorzystują nienasyconych kwasów tłuszczowych w postaci zestyfikowanej



Rys. 2. Zmiany liczby beztlenowych pałeczek mlekowych w czasie dojrzewania serów modelowych w temperaturze 6°C.

Fig. 2. Changes in the count of anaerobic lactic rods during the ripening of model cheeses at a 6°C temperature.



Tabela 3

Zawartość CLA (18:2 *cis*-9, *trans*-11) w tłuszczu serów modelowych dojrzewających w temperaturze 6°C [mg CLA/100 g tłuszczu].

The CLA (18:2 *cis*-9, *trans*-11) content in the fat of model cheeses ripening at a 6°C temperature; [mg CLA/100 g of fat].

Czas dojrzewania [tygodnie] Ripening time [weeks]	Sery modelowe / Model cheeses*			
	A x ± s	B x ± s	C x ± s	D x ± s
0	753,63 ± 62,55a	754,67 ± 0,37a,b	713,96 ± 30,00a	713,96 ± 20,00a
2	742,95 ± 48,51a	753,27 ± 8,07a,b	716,51 ± 18,57a	668,53 ± 26,12b
4	755,92 ± 11,07a	755,34 ± 43,58a,b	691,83 ± 25,69a	673,32 ± 19,74b
6	741,45 ± 10,00a	767,29 ± 12,00b	702,01 ± 4,63a	686,76 ± 19,36a,b
8	740,22 ± 11,33a	712,19 ± 39,82a	701,47 ± 1,43a	692,88 ± 18,72a,b
	E x ± s	F x ± s	G x ± s	H x ± s
0	673,16 ± 13,83a	694,56 ± 14,07a	688,34 ± 9,35a	698,89 ± 16,70a
2	683,18 ± 10,83a	687,30 ± 13,11a,b	696,28 ± 11,63a	680,97 ± 20,00a
4	688,91 ± 7,60a	694,46 ± 2,00a	694,53 ± 34,54a	692,71 ± 19,21a
6	686,00 ± 38,47a	664,43 ± 24,22b	696,79 ± 30,00a	689,73 ± 12,89a
8	683,95 ± 7,09a	700,59 ± 5,00a	688,15 ± 56,43a	689,11 ± 13,16a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

x - wartość średnia / mean value; s- odchylenie standardowe / standard deviation; a, b, c, d - te same litery przy wartościach średnich danego modelu sera oznaczają brak statystycznie istotnych różnic ( $p > 0,05$ ) / a, b, c, d – the same letters at the mean values of a given model cheese show that no statistically significant differences occur ( $p > 0.05$ ); \* objaśnienia symboli podano w tab. 1. / Letter marks were explained in Tab. 1.

do biosyntezy CLA. Lipazy bakterii kwasu mlekowego to enzymy wewnątrzkomórkowe, dlatego możliwe wydaje się, że przebieg biosyntezy izomerów CLA wymaga zwiększenia powierzchni reakcji między składnikami tłuszczu a enzymami bakteryjnymi, np. w wyniku lizy komórek bakteryjnych. Na tym etapie badań i w zastosowanych warunkach dojrzewania nie zauważono wpływu wybranych bakterii probiotycznych na zawartość CLA w badanych serach modelowych, jednak w celu zweryfikowania tych wyników należy przeprowadzić dodatkowe analizy, m. in. składu wolnych kwasów tłuszczowych, bowiem jak wspomniano we wprowadzeniu, są one uznawane za główny substrat w procesie biosyntezy CLA. Ewentualne zmiany zawartości CLA mogły zajść we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych.

## Wnioski

1. Wytworzone sery modelowe charakteryzowały się ponad 23% zawartością tłuszczu w suchej masie i ok. 58% zawartością wody, co klasyfikuje je do grupy serów półtłustych miękkich.
2. Podczas dojrzewania serów modelowych w temp. 6°C liczba komórek *Lactococcus lactis* w 8. tygodniu dojrzewania serów utrzymywała się w granicach od  $10^8$  do  $10^9$  jtk/g sera.
3. Liczba żywych komórek bakterii probiotycznych w modelach dojrzewających w temp. 6°C przez 8 tygodni była na poziomie  $10^7$ – $10^8$  jtk/g, spełniając wymaganie minimum terapeutycznego.
4. We wszystkich serach modelowych zawartość CLA w próbach serów świeżych wynosiła ok. 700 mg/100 g tłuszczu.
5. We wszystkich badanych serach modelowych nie stwierdzono istotnych zmian zawartości CLA w czasie ośmiotygodniowego dojrzewania w temp. przechowywania 6°C.
6. Na tym etapie badań i w zastosowanych warunkach dojrzewania nie stwierdzono wpływu wybranych bakterii probiotycznych na zawartość CLA w badanych serach modelowych, jednak w celu zweryfikowania tych wyników należy przeprowadzić dodatkowe analizy, m. in. składu wolnych kwasów tłuszczowych.

Praca była prezentowana podczas XII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Lublin, 23–24 maja 2007 r.

## Literatura

- [1] Alonso L., Cuesta E.P., Gilliland S.E.: Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. J. Dairy Sci., 2003, **86**, 1941-1946.
- [2] Boylston T.D., Vinderola C.G., Ghoddusi H.B., Reinheimer J.A.: Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. Int Dairy J., 2004, **14**, 375-387.
- [3] Cichosz G.: Probiotyczne pałeczki mlekowe - zastosowanie w serowarstwie. Przegl. Mlecz., 2006, **10**, 4-8.
- [4] Christie W.W.: Preparation of lipid extracts from tissues. Advances in Lipid Methodology - Two (ed. Christie W.W.), Oily Press, Dundee, 1993, pp. 195-213.
- [5] Coakley R.P., Ross R.P., Nordgren M., Fitzgerald G., Devery R., Stanton C.: Conjugated linoleic acid biosynthesis by human - derived *Bifidobacterium* species. J. Appl. Microbiol., 2003, **94**, 138-145.
- [6] Defecińska A., Libudzisz Z.: Bakterie fermentacji mlekowej – wpływ na funkcje życiowe człowieka. Przegl. Mlecz., 2000, **8**, 247-251.
- [7] Fritsche J., Rickert R., Steinhart H., Yurawecz M.P., Mossoba M.M., Sehat N., Roach J.A.G., Kramer J.K.G., Ku Y.: Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in foods and dietary intake. Fett/ Lipid, 1999, **101** (8), 272-276.
- [8] Gnädig S., Rickert R., Sébédio J.L., Steinhart H.: Conjugated linoleic acid (CLA): physiological effects and production. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2001, **103**, 56-61.

- [9] Jiang J., Björck L., Fondén R.: Conjugated linoleic acid in Swedish dairy products with special reference to the manufacture of hard cheeses. *Int Dairy Jour.*, 1997, **7**, 863-867.
- [10] Krajewska-Kamińska E., Śmietana Z., Bohniewicz K.: Bakterie probiotyczne w produkcji żywności. *Przem. Spoż.*, 2007, **5**, 36-41.
- [11] Lin T.Y.: Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. *Food Chem*, 2000, **69**, 27-31.
- [12] Mc Brearty S., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Wallace J.M., Stanton C.: Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on cheddar cheese quality. *Int Dairy J.*, 2001, **11**, 599-610.
- [13] Moneta J.: Fermentowane produkty mleczne suplementowane bakteriami probiotycznymi. *Przegl. Mlecz.*, 2006, **1**, 4-8.
- [14] Nagao K., Yanagita T.: Conjugated linoleic acids in food and their health benefits. *J Biosci. Bioenginn.*, 2005, **100**, 152-157.
- [15] Pariza M.W., Park Y., Cook M.E.: The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 2001, **40**, 283-298.
- [16] Phillips M., Kailasapathy K., Tran L.: Viability of commercial probiotic cultures (*Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus*) in cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, **108**, 276-280.
- [17] PN-73/A-86232: Mleko. Przetwory mleczarskie. Sery. Metody badań.
- [18] Przybojewska B., Rfalski H.: Kwasy tłuszczowe występujące w mleku a zdrowie człowieka. Sprzężony kwas linolowy CLA (cz. 2). *Przegl. Mlecz.*, 2003, **5**, 173-175.
- [19] Shantha N.C., Decker E.A., Ustunol Z.: Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *JAOCS*, 1992, **69** (5), 425-428.
- [20] Wahle K.W.J., Heys S.D., Rotondo D.: Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*, 2004, **43**, 553-587.
- [21] Xu S., Boylston T.D., Glatz B.A.: Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. *JAOCS*, 2004, **81** (6), 590-595.
- [22] Żegarska Z.: Składniki tłuszczu mlekowego o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. *Przegl. Mlecz*, 2005, **6**, 4-6.

**THE COUNT OF LACTOBACILLUS AND BIFIDOBACTERIUM RODS AND THEIR EFFECT ON THE CONTENT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID IN THE MODEL RIPENING CHEESES**

S u m m a r y

In this paper, the effect of probiotic rods: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium lactis* on the content of CLA in the model ripening cheeses was determined. During the ripening period of cheeses, the count of living cells of the micro-organisms studied was determined, too.

The model cheeses produced were characterized by a fat content amounting to over 23% in dry mass and by a water content of about 58%; thus, they were categorized as semi-fat, soft cheeses. In all the samples of fresh cheeses, the content of CLA was about 700 mg per 100 g fat. In the cheeses ripening at a temperature of 6°C during a period of 8 weeks, the count of living probiotic cells remained at the same level of  $10^7$ – $10^8$  CFU/g and met the requirement of therapeutic minimum. Under the ripening conditions applied, no effect of the selected probiotic bacteria on the CLA content in the model ripening cheeses was found.

**Key words:** *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, model ripening cheeses, conjugated linoleic acid (CLA) ☒