

NIKOLA MACIEJEWSKA, ANNA SZOSLAND-FALTYN,  
BEATA BARTODZIEJSKA

**PRZEŻYWALNOŚĆ ŚRODOWISKOWYCH BIFIDOBACTERIUM SPP.  
ORAZ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ W SERACH  
TWAROGOWYCH WYPRODUKOWANYCH Z UŻYCIEM KULTURY  
ŚRODOWISKOWEJ**

Streszczenie

**Wprowadzenie.** Skład ilościowy i jakościowy ludzkiej mikrobioty jelitowej zależy od wielu czynników. Wśród nich najczęściej wymieniane są determinanty genetyczne i środowiskowe. Ostatnie badania duży nacisk kładą na fakt, iż struktura populacji mikrobioty jelitowej różni się nie tylko regionalnie, ale i lokalnie. Jej prawidłowy układ warunkuje odpowiednie funkcjonowanie całego organizmu. W celu korzystnej kolonizacji jelit, można wdrożyć terapię probiotykami, które istotnie modulują skład mikrobioty jelitowej. Z uwagi na korelację różnorodności genetycznej bakterii kwasu mlekowego z ich miejscem występowania, istnieje potrzeba izolacji drobnoustrojów potencjalnie probiotycznych z otaczającego środowiska. W dostępnych na rynku preparatach zawierających bakterie probiotyczne, często spotykana jest zbyt mała liczba drobnoustrojów lub mniejsza liczba gatunków, niż jest to deklarowane na opakowaniu. Celem pracy było określenie przeżywalności środowiskowych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz bakterii fermentacji mlekowej, charakterystycznych dla gospodarstw w województwie świętokrzyskim, w serach twarogowych wyprodukowanych z niskopasteryzowanego mleka, przechowywanych w temperaturze  $3 \pm 2^\circ\text{C}$ , przez okres 14 dni. Analizy mikrobiologiczne przeprowadzono zgodnie z normami ISO.

**Wyniki i wnioski.** Sery twarogowe zapewniały wysoką liczbę drobnoustrojów z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz bakterii fermentacji mlekowej, spełniając wymagania postawione produktom probiotycznym. Środowiskowe bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* spp. charakteryzowały się bardzo dobrą przeżywalnością w wyprodukowanych serach, przewyższając po 14 dniach przechowywania swoją początkową liczbę. Twarogi były zbliżone do siebie pod względem ogólnej akceptowalności podczas analizy sensorycznej, w ciągu całego okresu przechowywania. Badane sery wpisują się w obecne trendy żywieniowe, ukierunkowane na wzbogacenie diety w produkty naturalne, zawierające mikroorganizmy charakterystyczne dla danego środowiska.

**Słowa kluczowe:** sery twarogowe, żywność funkcjonalna, bakterie kwasu mlekowego, *Bifidobacterium* spp.

---

Mgr N. Maciejewska, ORCID: 0009-0004-0996-7661, dr inż. A. Szosland-Faltyn, ORCID: 0000-0002-5004-8059, dr B. Bartodziejska, ORCID: 0000-0002-5492-5514, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego – Państwowy Instytut badawczy in. Prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, Zakład Jakości Żywności, al. Marszałka J. Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź; Kontakt: nikola.smigielska@ibpr.pl

## Wprowadzenie

Na przestrzeni wielu lat wykazano, że odległe geograficznie populacje drobnoustrojów wykazują wysoki stopień zróżnicowania. Różnorodność siedlisk mikroorganizmów prowadzi do ich specyficznej dla niszy ewolucji genetycznej, poprzez polimorfizm pojedynczych nukleotydów oraz modyfikacje strukturalne genomu, takie jak zmiany liczby i orientacji chromosomów (delecje, insercje, duplikacje, inwersje) oraz zmiany w lokalizacji chromosomów (translokacje) [2, 33, 35]. Aby zwiększyć przystosowanie bakterii do poszczególnych siedlisk, tracą one lub nabywają konkretne geny na drodze ewolucji [20].

Probiotyki od wielu lat są szeroko badane w celu wykorzystania ich w leczeniu oraz zapobieganiu wystąpienia chorób autoimmunologicznych, np. atopowego zapalenia skóry [30, 32]. W badaniach przeprowadzonych na populacji dzieci fińskich udowodniono wpływ suplementacji *Lactobacillus* GG (LGG) na zmniejszenie częstości występowania chorób atopowych. Doświadczenia te na przestrzeni lat zostały przeprowadzone kilkakrotnie z niewielkimi różnicami, jednak ogólna zasada była zachowana podczas każdego z nich. Probiotyk był podawany matkom w czasie trwania ciąży oraz podczas karmienia piersią, a po narodzinach dodatkowo był aplikowany również dzieciom. Wyniki wykazały, że przyjmowanie probiotyków w okresie pre- i postnatalnym znacznie zmniejszyło częstość występowania choroby atopowej u dzieci [14, 15, 16, 30]. Z kolei w badaniach przeprowadzonych w Niemczech, które zachowują schemat eksperymentu bardzo zbliżony do badań klinicznych fińskich, wykazano brak pozytywnego wpływu suplementacji LGG na zmniejszenie częstości występowania chorób atopowych. Co więcej, zaobserwowano statystycznie wyższe ryzyko wystąpienia zapalenia oskrzeli u grupy osób przyjmujących probiotyk w porównaniu z grupą noworodków przyjmujących placebo. Badania te poparły hipotezę wysuniętą przez autorów, że podatność na probiotyki może się różnić między poszczególnymi osobami z powodu różnic w podłożu genetycznym [18].

Wyraźny związek między różnorodnością genomową pałeczek kwasu mlekowego a ich gospodarzami oraz siedliskami, sugeruje, że adaptacja do konkretnej niszy środowiskowej intensyfikuje dywersyfikację i ewolucję wielu gatunków. Udowodniono, że szczepy bakterii probiotycznych, *Ligilactobacillus salivarius* (dawniej *Lactobacillus salivarius*) wyizolowane od różnych gospodarzy, ewoluują indywidualnie, w zależności od wielu czynników, tj. genotypu gospodarza lub czynników środowiskowych takich jak dieta charakterystyczna dla konkretnego regionu [20]. Wykazano podobne profile COG - klastrów genów o wspólnym pochodzeniu ewolucyjnym (z ang. Clusters of Orthologous Genes), u szczepów z rodzaju *Lactiplantibacillus plantarum* (dawniej *Lactobacillus plantarum*) wyizolowanych od ludzi oraz z produktów mlecznych, co może wynikać z łatwej wymiany bakterii między produktami mlecznymi a ludźmi [4]. Adaptacja do konkretnej niszy odgrywa kluczową rolę w zmianach genetycznych

drobnoustrojów, szczególnie tych związanych z metabolizmem, dlatego czynnik ten należy wziąć bezwzględnie pod uwagę podczas badania komercyjnych szczepów probiotycznych [17, 26]. Z uwagi na korelację bioróżnorodności genetycznej bakterii kwasu mlekowego z ich miejscem występowania oraz osobniczą podatność na korzystny wpływ probiotyków, różniącą się w zależności od obszaru geograficznego, istnieje potrzeba izolacji drobnoustrojów potencjalnie probiotycznych z otaczającego środowiska, w celu przyszłego wykorzystania tych izolatów [4, 17, 20, 26].

W dostępnych na polskim rynku preparatach zawierających bakterie probiotyczne często spotykana jest zbyt mała liczba drobnoustrojów lub mniejsza liczba gatunków, niż producent deklarował na opakowaniu. Bardzo często obserwuje się niską przeżywalność lub jej brak, zwłaszcza w przypadku bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp., w komercyjnych suplementach diety i preparatach medycznych [1, 3, 19, 22, 34]. Drobnoustroje te są beztlenowymi, nieruchliwymi, Gram-dodatnimi i nietworzącymi przetrwalników pałeczkami [5]. Bifidobakterie należą do jednego z głównych rodzajów bakterii w przewodzie pokarmowym człowieka, najliczniej występują u niemowląt i ich liczba maleje wraz z wiekiem człowieka. Obecność tych bakterii w przewodzie pokarmowym jest powiązana z wieloma korzyściami zdrowotnymi, np. takimi jak łagodzenie objawów u pacjentów z nietolerancją laktozy, zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków oraz wynikającej z zakażeń *Clostridium difficile*, łagodzenie objawów zespołu jelita drażliwego, czy też zmniejszanie częstości występowania egzemy. Wykazano, że drobnoustroje z rodzaju *Bifidobacterium* spp. mogą hamować rozwój patogenów poprzez wytwarzane metabolity, takie jak kwasy organiczne, peptydy przeciwbakteryjne, inhibitory quorum-sensing oraz poprzez immunomodulację [11]. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA z ang. short chain fatty acid), wytwarzane przez mikrobiotę jelitową na drodze fermentacji, mają istotny wpływ na zdrowie jelit, a ich nieodpowiednia ilość jest powiązana z wieloma schorzeniami. Suplementacja probiotykami z rodzaju *Bifidobacterium* spp. zwiększa ilość wydalanego octanu oraz propionianu, które są jednymi z głównych SCFA, wpływających na prawidłowe funkcjonowanie jelit [11, 21]. Przeprowadzono badania różnorodności mikrobioty jelitowej wśród różnych grup etnicznych na poziomie gatunków *Bifidobacterium* spp.. Podczas tych badań, stwierdzono znaczące różnice w wielkości i rozpowszechnieniu populacji drobnoustrojów z gatunku *B. catenulatum* pomiędzy mikrobiotą osób mieszkających w Belgii a mikrobiotą osób pochodzących z Japonii, mimo że ogólna wielkość populacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. w obydwu tych grupach była taka sama [13]. W badaniach przeprowadzonych pomiędzy różnymi populacjami europejskimi zaobserwowano u populacji włoskiej od dwu- do trzykrotnie wyższe proporcje bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. niż w populacjach niemieckiej, francuskiej i szwedzkiej. Przynależność geograficzna oraz różnice w diecie mię-

dzy różnymi populacjami, były związane z różnicami w składzie mikrobioty jelitowej [24].

Celem pracy było określenie przeżywalności środowiskowych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp., charakterystycznych dla województwa świętokrzyskiego, w serach twarogowych przechowywanych w temperaturze  $3 \pm 2$  °C przez okres 14 dni.

### **Material i metody badań**

Material badany stanowiły sery wyprodukowane w gminnej mleczarni na terenie województwa świętokrzyskiego. Na potrzeby doświadczenia wytworzono ser zaszczerpiony startową kulturą środowiskową, składającą się z pięciu gatunków bakterii kwasu mlekowego: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum* i *Levilactobacillus brevis* oraz drobnoustrojów z rodzaju *Bifidobacterium* spp., wyizolowanych z serów twarogowych z mleka niepasteryzowanego, powstałych na terenie województwa świętokrzyskiego, w tej samej mleczarni, która wyprodukowała twarogi na potrzeby prezentowanego badania. Bakterie kwasu mlekowego zostały zidentyfikowane przy pomocy API 50 CH, z użyciem podłoża 50 CHL (Biomerieux, Francja). Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz drobnoustroje kultury startowej przechowywano w temperaturze -80 °C, używając systemu do mrożenia drobnoustrojów – Protect Microorganism Preservation System (Technical Service Consultants Ltd, Wielka Brytania). Do hodowli drobnoustrojów użyto bulionu MRS (Merck, Niemcy), do którego dodano po jednym koraliku z fiolek z poszczególnymi drobnoustrojami i inkubowano w temperaturze 30 °C przez 48 godzin (hodowla wspólna). Następnie komórki bakteryjne przemyto trzykrotnie w PBS (Phosphate - buffered saline, pH 7,4, Sigma-Aldrich, USA), koraliki usunięto, a zawiesinę rozcieńczono w mleku mikrofiltrowanym, niskopasteryzowanym do otrzymania gęstości inokulum  $9,00 \log \text{ jtk/ cm}^3$ . Tak otrzymaną kulturę startową dodano do mleka o zawartości 2 % tłuszczu, mikrofiltrowanego (proces zastosowany w celu eliminacji drobnoustrojów, rozmiar porów na filtrze 0,45  $\mu\text{m}$ ), niskopasteryzowanego (pasteryzacja przez 30 min w 65 °C), w ilości 0,1  $\text{dm}^3$  na 20  $\text{dm}^3$  mleka. Mleko pozostawiono w temperaturze  $26 \pm 2$  °C aż do osiągnięcia pH 4,59. W kolejnym etapie skrzep ogrzano do  $45 \pm 2$  °C. Zakończono ogrzewanie twarogu, odsączono serwatkę, spuszczone gęstwę twarogową do prasy i poddano prasowaniu. Prasę wystawiono do chłodni ( $3 \pm 2$  °C) i pozostawiono na 2,5 h. Łącznie uzyskano 3,6 kg twarogu, po 300 g każdy. Po upływie wskazanego czasu sery pokrojono i zapakowano próżniowo w formie krajanki i przekazano do badań, które przeprowadzono bezpośrednio po produkcji oraz po upływie 7 i 14 dni, przechowując sery w temperaturze  $3 \pm 2$  °C.

### *Badanie mikrobiologiczne*

Przeżywalność bakterii środowiskowych z rodzaju *Bifidobacterium* spp. zbadano w warunkach beztlenowych (37 °C, 48h) przy użyciu podłoża TOS z suplementem MUP zgodnie z normą PN-ISO 29981:2012 [26]. Przeżywalność bakterii kwasu mlekowego została zbadana w warunkach tlenowych (30 °C, 72 h) przy użyciu podłoża de Man, Rogosa i Sharpe (MRS, Merck, Niemcy) zgodnie z normą PN-ISO 15214:2002 [25]. Wymienione analizy zostały wykonane w trzech powtórzeniach, a jako wynik przyjęto średnią z trzech powtórzeń, wyrażoną w  $\log_{10}$  jtk/cm<sup>3</sup>.

### *Pomiar aktywności wody*

W powstałych serach określano aktywność wody ( $a_w$ ), korzystając z aparatu AquaLab 4TE firmy METER Group w temp.  $25 \pm 0,2$  °C. Pomiarów dokonywano w trzech powtórzeniach.

### *Pomiar wartości pH*

Pomiar wartości pH badanych serów wykonano przy pomocy pH-metru Elmetron CX-505 (Zabrze, Polska) metodą potencjometryczną w trzech powtórzeniach. Wskazania pH-metru zaokrąglono do 0,1.

### *Analiza sensoryczna*

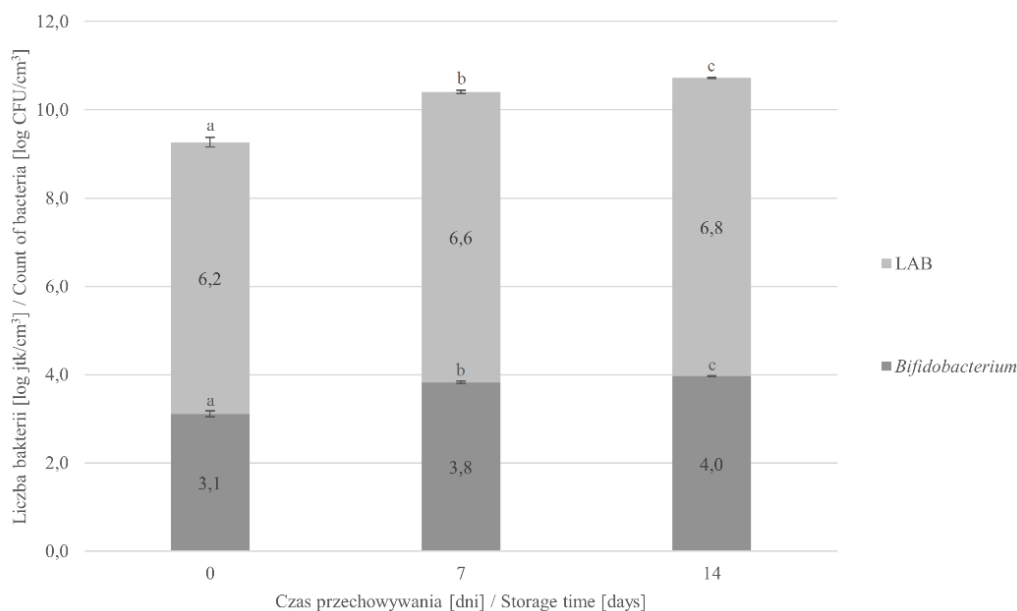
W celu uzyskania profilu sensorycznego wyprodukowanych serów, zastosowano metodę QDA (ang. *Quantitative Descriptive Analysis*). Badane cechy obejmowały: wyróżniki zapachu: twarogowy/śmietanowy/mleczny, obcy; wyróżniki smaku: twarogowy/śmietanowy/mleczny, kwaśny, obcy; wyróżniki konsystencji: wilgotność i grudkowatość oraz jakość ogólną próbek. Ocenę przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Intensywność wyróżników zaznaczano na skali, przedstawiającej 10-centymetrowy odcinek, bez podziałki, zakończony skrajnymi liniami brzegowymi. Dla wyróżników zapachu i smaku zastosowano oznaczenia skrajne, takie jak niewyczuwalny (0) – bardzo intensywny (10), natomiast dla wyróżników konsystencji (wilgotność, grudkowatość) oraz jakości ogólnej określenia te były zależne od badanej cechy (od 0 – gdy badana cecha nie była wyczuwalna do 10 – gdy badana cecha była odczuwana najintensywniej). Analizę przeprowadził 12-osobowy zespół w przedziale wiekowym 26 ÷ 60 lat, z odpowiednimi kwalifikacjami metodycznymi i doświadczeniem w przeprowadzaniu ocen metodą QDA dla fermentowanych wyrobów mlecznych. W badaniu brały udział zarówno kobiety jak i mężczyźni. Uzyskane wyniki uśredniono i zaprezentowano w postaci diagramu radarowego.

### Analiza statystyczna

Do opracowania wyników badań wykorzystano program Microsoft Excel 2016. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach, pobierając każdorazowo próbkę z odrębnej sztuki sera bezpośrednio po produkcji oraz po upływie 7 i 14 dni przechowywania. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi, przy  $\alpha = 0.05$ , weryfikowano testem Bonferroniego  $\alpha = 0.05/3 = 0.0167$ .

### Wyniki i dyskusja

Wyniki przeżywalności środowiskowych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz bakterii kwasu mlekowego (LAB – Lactic Acid Bacteria) przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Liczba bakterii środowiskowych z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz bakterii kwasu mlekowego podczas przechowywania serów

Fig. 1. Count of environmental bacteria of the genus *Bifidobacterium* spp. and lactic acid bacteria during cheese storage

Objaśnienia / Explanatory notes:

Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków)  $\pm$  odchylenia standardowe; a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się między sobą statystycznie istotnie / The figure shows mean values (bars)  $\pm$  standard deviations; a, b, c – mean values within each sample, which are marked with various letters, are statistically significantly different

Określono liczbę mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej, liczbę bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz sumarycznie wyznaczoną liczbę *Bifidobacterium* spp.

i LAB. Liczba bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. w serach twarogowych bezpośrednio po produkcji wynosiła  $3,1 \pm 0,07$  log jtk/g. Po 7 dniach przechowywania zaobserwowano wzrost liczby bifidobakterii do  $3,8 \pm 0,03$  log jtk/g, a po 14 dniach – ponowny wzrost do  $4,0 \pm 0,01$  log jtk/g. Zmiany te były istotne statystycznie. Analogicznie kształtowały się wyniki dotyczące liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej, wynosząc bezpośrednio po produkcji  $6,2 \pm 0,11$  log jtk/g, wzrastając do  $6,6 \pm 0,03$  log jtk/g po tygodniu przechowywania i do  $6,8 \pm 0,02$  log jtk/g po 14 dniach przechowywania. W tym wypadku również były to różnice statystycznie istotne. Zgodnie z zaleceniami Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), liczba bakterii probiotycznych w produkcie gwarantująca osiągnięcie efektu terapeutycznego jest na poziomie  $6 \div 7$  log jtk/g [8]. Liczba drobnoustrojów środowiskowych z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz bakterii kwasu mlekowego w serach twarogowych, przez cały okres przechowywania, przekraczała znacznie tę wartość, wynosząc  $9,3 \pm 0,18$  log jtk/g;  $10,4 \pm 0,06$  log jtk/g i  $10,7 \pm 0,03$  log jtk/g odpowiednio: bezpośrednio po produkcji oraz po upływie 7 i 14 dni przechowywania, jednak nie wszystkie drobnoustroje obecne w twarogach mogły mieć właściwości potencjalnie probiotyczne. Jak wynika z literatury, bifidobakterie charakteryzują się słabym wzrostem w fermentowanych produktach na bazie mleka, ze względu na wysoką wrażliwość tych drobnoustrojów na pH poniżej 4,6 [6]. W badaniu przeprowadzonym przez Dmytrów [6] określono, w serach twarogowych wzbogaconych bakteriami probiotycznymi komercyjnymi, ogólną liczbę LAB oraz liczbę bifidobakterii (*B. bifidum* BB 12). W przeciwieństwie do badań własnych, w czasie 21-dniowego przechowywania twarogów, stwierdzono sukcesywne zmniejszanie się liczby drobnoustrojów, jednak mieszczących się w limitach produktów o potencjalnych właściwościach probiotycznych. Zhang i wsp. [37] opracowali beztłuszczowy jogurt z koziego mleka przy użyciu poddanego obróbce cieplnej koncentratu białka serwatki (zamiennik tłuszczu) i pektyny (środek zagęszczający), z dodatkiem bakterii probiotycznych – *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. Szczepy pochodziły z kultury startowej dostępnej komercyjnie. Autorzy zaobserwowali stopniowy spadek liczebności *L. acidophilus*, która po 3 tygodniach przechowywania jogurtu w warunkach chłodniczych była poniżej wymaganej wartości dla produktów probiotycznych. Przeżywalność *Bifidobacterium* spp. w jogurcie kształtowała się na znacznie wyższym poziomie, niż *L. acidophilus*, spełniając wymagania dla produktów probiotycznych nawet po 10 tygodniach przechowywania. Tak długo utrzymującą się na wysokim poziomie liczbę bifidobakterii, można uzasadnić poprzez obecność w zastosowanej kulturze *Streptococcus thermophilus*, który ma wysoką zdolność do wykorzystania tlenu, co z kolei umożliwia wzrost ściśle beztlenowych pałeczek z rodzaju *Bifidobacterium* spp. [23]. W badaniu przeprowadzonym przez Hamdy i wsp. [10] sprawdzano przeżywalność kilku kultur startowych, zastosowanych w różnych

proporcjach (*S. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*) w niskotłuszczowym serze feta, a także ich wpływ na poprawę właściwości sera. Liczebność bifidobakterii w serze feta wzrastała stopniowo do 15. dnia przechowywania, w każdym zastosowanym wariantcie – kultury startowej, co jest spójne z wynikami badań własnych. Po 15 dniach przechowywania zaobserwowano spadek liczebności drobnoustrojów z rodzaju *Bifidobacterium* spp. w kilku wariantach sera aż do wartości poniżej tych wymaganych dla produktów probiotycznych. Dodatkowo ser z dodatkiem bifidobakterii uzyskał wyższe noty za smak i teksturę w porównaniu z serem zawierającym tylko dwa gatunki: *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*.

W prezentowanej pracy, w powstałych serach oznaczono aktywność wody ( $a_w$ ) bezpośrednio po produkcji oraz po 7 i 14 dniach przechowywania (tab. 1). Parametr ten jest jednym z głównych czynników ograniczających, a nawet zapobiegających wzrostowi drobnoustrojów w produktach spożywczych. Wartości aktywności wody w badanych twarogach kształtowały się przez cały okres przechowywania na bardzo zbliżonym poziomie, mieszcząc się w przedziale  $0,91 \div 1,00$ , zapewniającym optymalny wzrost bakterii. Wartości  $a_w$  poniżej 0,61, poprzez ograniczanie rozwoju bakterii, drożdży oraz pleśni, zapewniają stabilność produktów [31]. W badaniu Goduli i in. [9] sprawdzano trwałość przechowalniczą twarogów tradycyjnych i bezlaktozowych. Wartości aktywności wody w twarogach tradycyjnych w ciągu całego okresu przechowywania utrzymywały się na tym samym poziomie, zbliżonym do wyników badań własnych, wynoszącym 0,95. Porównywalne wartości aktywności wody zaobserwowano również w badaniu przeprowadzonym przez Pałachę i Makarewicz [25], określającym wartości  $a_w$  w wybranych grupach produktów spożywczych. W analizowanych przez autorów twarogach aktywność wody wynosiła  $0,996 \pm 0,001$  dla twarogu chudego oraz  $0,998 \pm 0,001$  dla twarogu śmietankowego, co również jest spójne z wynikami badań własnych.

W analizowanych serach twarogowych określono również pH. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian pH produktów w ciągu całego okresu przechowywania. Jak podaje Dmytrów [7], wartości kwasowości czynnej mieszczące się w zakresie  $4,4 \div 4,6$ , dowodzą poprawności procesu ukwaszania mleka oraz osiągnięcia punktu izoelektrycznego kazeiny, czyli momentu, gdy zewnętrzny ładunek elektryczny miceli wynosi zero i tworzy się żel kazeinowy o odpowiedniej zwięzłości. W badaniu Goduli i in. [9], pH twarogów tradycyjnych mieściło się w przedziale  $4,17 \pm 0,10 \div 4,33 \pm 0,03$ , co było wartościami niższymi od wyników badań własnych. Zastosowanie podobnego stopnia ukwaszenia w będących przedmiotem badań twarogach prawdopodobnie uniemożliwiłoby wzrost i przeżywalność *Bifidobacterium* spp., które są wrażliwe na pH poniżej 4,6 [7]. Z kolei w badaniach Dmytrów [6], sprawdzających wpływ probiotycznych bakterii kwasu mlekowego na stabilność przechowalniczą kwasowych serów twarogowych, zaobserwowano wartości pH na poziomie  $4,5 \div 4,6$ , które były



niższe od wyników badań własnych, a przyczyną wysokiego pH serów uzyskanego w wynikach prezentowanego badania, mogła być niska temperatura podczas ukwaszania mleka.

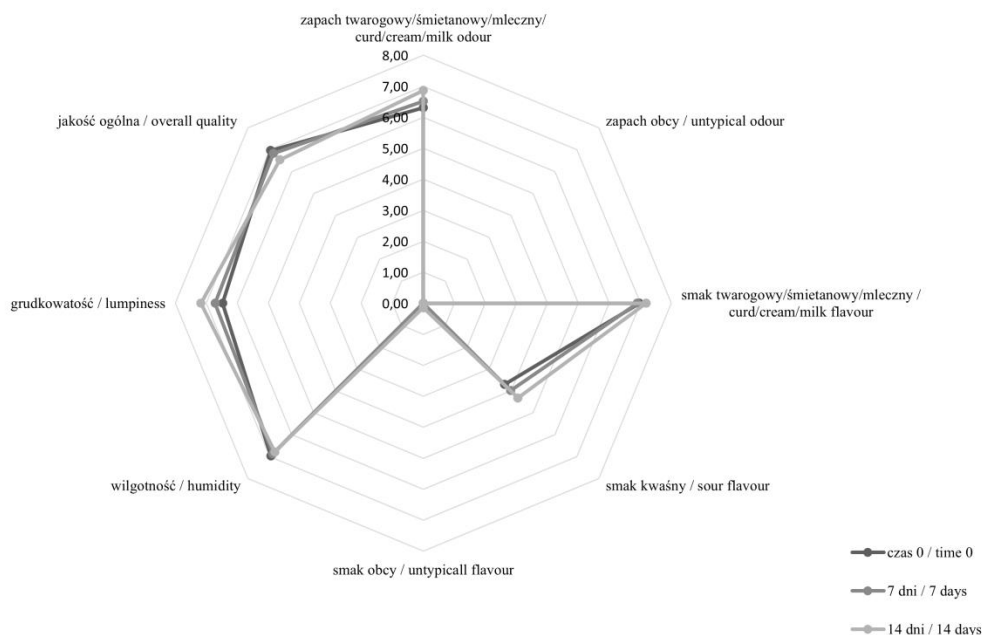
Tabela 1. Wyniki wartości pH ocenianych serów  
Table 1. pH values results of evaluated cheeses

Czas przechowywania [dni] / Storage period [days]	0	7	14
Wartości pH / pH values	4,8	4,8	4,7
Różnice istotne statystycznie / Statistically significant differences	Brak różnic / No differences		

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie / Table shows mean values

Profil sensoryczny badanych serów uzyskano poprzez analizę ośmiu wyróżników sensorycznych w skali od 1 do 10 bezpośrednio po produkcji oraz po upływie 7 i 14 dni przechowywania, a otrzymane wyniki zaprezentowano w postaci diagramu radarowego (rys. 2).



Rys. 2. Wykres radarowy intensywności wyróżników sensorycznych twarogów.

Fig. 2. Radar chart of intensity of sensory attributes of curd cheeses (twarogs).

Analizując wyniki oceny sensorycznej stwierdzono, iż przebadane próbki twarogów, niezależnie od czasu przechowywania były bardzo zbliżone pod względem jakości sensorycznej. Intensywność zapachu twarogowego oraz smaku kwaśnego, zwiększała się wraz z czasem przechowywania serów. Analogicznie kształtowały się zmiany odczuwalności wyróżnika konsystencji: grudkowatości. Zaobserwowano niewielkie obniżenie jakości ogólnej badanych serów po 14 dniach przechowywania, jednak nie były to wartości istotne statystycznie. Jak podaje literatura, dodatek bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. do serów zawierających standardowe kultury startowe może poprawiać ich smak i aromat [6, 10].

Podsumowując, sery twarogowe wyprodukowane z niskopasteryzowanego mleka z dodatkiem startowej kultury środowiskowej zawierającej bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* spp., zapewniały wysoką liczbę drobnoustrojów, spełniając wymagania stawiane produktom probiotycznym, jednak nie wszystkie drobnoustroje obecne w kulturze środowiskowej były potencjalnie prozdrowotne. Wysokie pH, aktywność wody oraz pakowanie próżniowe (warunki beztlenowe) niewątpliwie wpłynęły korzystnie na liczebność bifidobakterii w produkcji. Środowiskowe *Bifidobacterium* spp. charakteryzowały się bardzo dobrą przeżywalnością w serach twarogowych, przewyższając po 14 dniach przechowywania swoją początkową liczbę. Badane sery wpisują się w obecne trendy żywieniowe, ukierunkowane na wzbogacenie diety w produkty naturalne, sezonowe, zawierające mikroorganizmy charakterystyczne dla danego środowiska.

### **Wnioski**

1. W ciągu 14-dniowego okresu doświadczeń, sumaryczna liczba bakterii fermentacji mlekowej i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spp. w serach twarogowych była na wysokim poziomie, powyżej 9 log jtk/g.
2. Możliwe jest uzyskanie wysokiej przeżywalności drobnoustrojów i potencjalnej wartości prozdrowotnej twarogów, poprzez zastosowanie odpowiednich parametrów procesu produkcji i produktu (wysoka aktywność wody, wysokie pH oraz pakowanie próżniowe).
3. Sery twarogowe były zbliżone do siebie pod względem ogólnej akceptowalności podczas analizy sensorycznej, w ciągu całego okresu przechowywania.

*Badania zostały sfinansowane w ramach działania „Współpraca” nr projektu 00060.DDD.6509.00037.2019.13 „Spersonalizowane sery twarogowe”.*

### Literatura

- [1] Aldawsari F.S., Bin Helel B.S., Al Shehry Y.M., Alharbi Y.T., Abudahash M.A.: Probiotics and Their Quality-Related Concerns: Highlights From the Saudi Arabian Market. *Ther. Innov. Regul. Sci.*, 2020, 54(2), 365-369.
- [2] Barrick J.E., Yu D.S., Yoon S.H., Jeong H., Oh T.K., Schneider D., Lenski R.E., Kim J.F.: Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, 2009, 461(7268), 1243-1247.
- [3] Bogusławska-Wąs E., Piechowiak N., Dłubała A., Modrzejewka K.: Mikrobiologiczna analiza preparatów probiotycznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2022, 29, 3(132), 32-41.
- [4] Cen S., Yin R., Mao B., Zhao J., Zhang H., Zhai Q., Chen W.: Comparative genomics shows niche-specific variations of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from human, *Drosophila melanogaster*, vegetable and dairy sources. *Food Biosci.*, 2020, 35, #100581.
- [5] Chen J., Wang J., Zheng H.: Characterization of *Bifidobacterium apousia* sp. nov., *Bifidobacterium choladohabitans* sp. nov., and *Bifidobacterium polysaccharolyticum* sp. nov., three novel species of the genus *Bifidobacterium* from honey bee gut. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2021, 44(5), #126247.
- [6] Dmytrów I.: Wpływ probiotycznych bakterii kwasu mlekowego na stabilność przechowalniczą kwasowych serów twarogowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 5(102), 49-60.
- [7] Dmytrów I.: Wybrane czynniki technologiczne jako determinanty jakości sensorycznej i stabilności przechowalniczej serów twarogowych kwasowych. Rozprawa habilitacyjna. ZUT, Szczecin 2012.
- [8] FAO/WHO: Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. [online]. FAO/WHO. Rome 2006. Dostęp w Internecie [17.05.2023.]: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- [9] Godula K., Dmytrów I., Mituniewicz-Małek I., Mulawka E. Stabilność przechowalnicza twarogów tradycyjnych i bezlaktozowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2018, 25, 4(117), 140-149.
- [10] Hamdy A.M., Ahmed M.E., Mehta D., Elfaruk M.S., Hammam A.R.A., El-Derwy Y.M.A.: Enhancement of low-fat Feta cheese characteristics using probiotic bacteria. *Food Sci. Nutr.*, 2020, 9(1), 62-70.
- [11] Hemalatha R., Ouwehand A.C., Saarinen M.T., Prasad U.V., Swetha K., Bhaskar V.: Effect of probiotic supplementation on total lactobacilli, bifidobacteria and short chain fatty acids in 2–5-year-old children. *Microb. Ecol. Health Disease*, 2017, 28(1), #1298340.
- [12] Hidalgo-Cantabrana C., Delgado S., Ruiz L., Ruas-Madiedo P., Sánchez B., Margolles A.: Bifidobacteria and their health-promoting effects. *Microbiol. Spectrum*, 2017, 5(3), 1-19.
- [13] Ishikawa E., Matsuki T., Kubota H., Makino H., Sakai T., Oishi K., Kushiro A., Fujimoto J., Watanabe K., Watanuki M., Tanaka R.: Ethnic diversity of gut microbiota: species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus *Bifidobacterium* in healthy Belgian adults, and comparison with data from Japanese subjects. *J. Biosci. Bioeng.*, 2013, 116(2), 265-70.
- [14] Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E.: Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2001, 357(9262), 1076-1079.
- [15] Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Arvilommi H., Isolauri E.: Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2003, 361(9372), 1869-1871.
- [16] Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Isolauri E.: Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, 119(4), 1019-1021.

- [17] Kelleher P., Bottacini F., Mahony J., Kilcawley K.N., van Sinderen D.: Comparative and functional genomics of the *Lactococcus lactis* taxon; insights into evolution and niche adaptation. *BMC Genomics*, 2017, 18, #267.
- [18] Kopp M.V., Hennemuth I., Heinzmann A., Urbanek R.: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus* GG supplementation. *Pediatrics*, 2008, 121, 850-856.
- [19] Korona-Główniak I., Siwiec R., Luszczewska-Sierakowska I., Maciejewski R., Wrobel R., Malm A.: Microbiological evaluation of 10 commercial probiotic products available in Poland. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.*, 2019, 32, 121-124.
- [20] Lee J.Y., Han G.G., Kim E.B., Choi Y.J.: Comparative genomics of *Lactobacillus salivarius* strains focusing on their host adaptation. *Microbiol. Res.*, 2017, 205, 48-58.
- [21] Lee Y., Ba Z., Roberts R.F., Rogers C.J., Fleming J.A., Meng H., Furumoto E.J., Kris-Etherton P.M.: Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12® on the lipid/lipoprotein profile and short chain fatty acids in healthy young adults: a randomized controlled trial. *Nutr. J.*, 2017, 16, #39.
- [22] Lorbeg M.P., Golob M., Kramer M., Treven P., Bogovič Matijašič B.: Evaluation of Dietary Supplements Containing Viable Bacteria by Cultivation/MALDI-TOF Mass Spectrometry and PCR Identification. *Front. Microbiol.*, 2021, 12, #700138.
- [23] Lourens-Hattingh A., Viljoen B.C.: Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.*, 2001, 11, 1-17.
- [24] Mueller S., Saunier K., Hanisch C., Norin E., Alm L., Midtvedt T., Cresci A., Silvi S., Orpianesi C., Verdenelli M.C., Clavel T., Koebnick C., Zunft H.J., Doré J., Blaut M.: Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72 (2), 1027-33.
- [25] Pałacha Z., Makarewicz M. Aktywność wody wybranych grup produktów. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* 2011, 2, 24-29.
- [26] Pan Q., Cen S., Yu L., Tian F., Zhao J., Zhang H., Chen W., Zhai Q.: Niche-Specific Adaptive Evolution of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated From Human Feces and Paocai. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, 10, #615876.
- [27] PN-73/A-86232 Mleko i przetwory mleczarskie. Sery. Metody badań.
- [28] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 stopni C.
- [29] PN-ISO 29981:2012. Przetwory mleczne. Oznaczanie przypuszczalnych bifidobakterii. Metoda liczenia kolonii w temperaturze 37 stopni C.
- [30] Rautava S., Kalliomäki M., Isolauri E.: Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, 109 (1), 119-21.
- [31] Rusu E., Enache G., Cursaru R., Alexescu A., Radu R., Onila O., Cavallioti T., Rusu F., Posea M., Jinga M., Radulian G.: Prebiotics and probiotics in atopic dermatitis. *Exp. Ther. Med.*, 2019, 18(2), 926-931.
- [32] Tapia M.S., Alzamora S.M., Chirife J.: Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. In: *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Barbosa-Cánovas G.V., Fontana A.J. Jr., Schimdt, S.J., Labuza, T.P. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2020, pp. 323-355.
- [33] Umborowati M.A., Damayanti D., Anggraeni S., Endaryanto A., Surono I.S., Effendy I., Prakoeswa C.R.S.: The role of probiotics in the treatment of adult atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Health Popul. Nutr.*, 2022, 41(1), #37.

- [34] Wellenreuther M., Mérot C., Berdan E., Bernatchez L.: Going beyond SNPs: The role of structural genomic variants in adaptive evolution and species diversification. *Mol. Ecol.*, 2019, 28(6), 1203-1209.
- [35] Zawistowska-Rojek A., Zaręba T., Mrówka A., Tyski S.: Assessment of the Microbiological Status of Probiotic Products. *Pol. J. Mikrobiol.*, 2016, 65, 97-104.
- [36] Zhang J.: Positive selection, not negative selection, in the pseudogenization of *rcaA* in *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105 (42), #E69.
- [37] Zhang T., McCarthy J., Wang G., Liu Y., Guo M.: Physicochemical properties, microstructure, and probiotic survivability of nonfat goats' milk yogurt using heat-treated whey protein concentrate as fat replacer. *J. Food Sci.*, 2015, 80(4), M788-94.

### SURVIVABILITY OF ENVIRONMENTAL BIFIDOBACTERIUM SPP. AND LACTIC ACID BACTERIA IN CURD CHEESE (TVAROG) PRODUCED USING ENVIRONMENTAL CULTURE

#### S u m m a r y

**Background.** Qualitative and quantitative composition of human intestinal microbiota depends on many factors. Those which are the most often mentioned include genetic and environmental determinants. Recent studies suggest that the structure of intestinal microbiota population differs not only regionally but also locally. Its composition determines the proper functioning of the entire body. In order to favorably colonize the intestine, a probiotic therapy can be implemented, significantly modulating the composition of intestinal microbiota. Owing to a correlation between the genetic diversity of LAB and their location, there is a need to isolate potential probiotic bacteria from the surrounding environment. Dietary supplements and medicinal products containing probiotics available on the market often comprise too few microorganisms or a smaller number of species than declared on the packaging. The aim of the study was to determine the survival rate of environmental bacteria of the genus *Bifidobacterium* spp. and LAB, characteristic of farms in the Świętokrzyskie Province, in curd cheeses produced from low-pasteurized milk and stored at  $3 \pm 2$  °C for 14 days. Microbiological analyses were performed in accordance with ISO standards.

**Results and conclusions.** Curd cheeses ensured a high number of bacteria of the genus *Bifidobacterium* spp. and lactic acid bacteria meeting the requirements for probiotics. Environmental strains of *Bifidobacterium* spp. were characterized by good survivability in the tvarogs, exceeding their initial number after 14 days of storage. The curd cheeses were similar to each other in terms of overall acceptability during the sensory analysis throughout the entire storage period. The tested cheeses are in line with the current nutritional trends aimed at enriching the diet with natural products containing microorganisms characteristic of a given environment.

**Key words:** curd cheese (tvarog), functional food, lactic acid bacteria, *Bifidobacterium* spp. 