

MAREK ALJEWICZ, GRAŻYNA CICHOSZ, ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM,
MARZENA DANOWSKA-OZIEWICZ, WIOLETTA ŁUKASZUK-KĘPKA

PRZEŻYWALNOŚĆ *LACTOBACILLUS PARACASEI* LPC-37 W SERACH DOJRZEWAJĄCYCH TYPU SZWAJCARSKIEGO

Streszczenie

Przedmiotem badań były sery typu szwajcarskiego wyprodukowane z zastosowaniem probiotycznej kultury *Lactobacillus paracasei* LPC-37. Konsekwencją podobnego składu chemicznego badanych serów było niewielkie zróżnicowanie aktywności wody. Po 4 i 6 tygodniach dojrzewania stwierdzono większy spadek aktywności wody niż po 2 tygodniach. Z porównania liczby pałeczek mlekowych w serach o różnym stopniu dojrzałości wynika, że najbardziej intensywny ich wzrost miał miejsce podczas pierwszych dwóch tygodni dojrzewania. Statystycznie istotną zależność pomiędzy liczbą pałeczek *Lactobacillus* a aktywnością wody stwierdzono tylko w serach po pierwszym miesiącu przechowywania ($r = 0,86$).

Słowa kluczowe: ser szwajcarski, aktywność wody, *Lactobacillus*, przeżywalność

Wprowadzenie

Opracowania różnych autorów [3, 5, 15] dowodzą, że sery dojrzewające mogą być dobrym źródłem probiotycznych szczepów bakterii mlekowych. Przeżywalność kultur probiotycznych w serach dojrzewających, w porównaniu z innymi, bardziej zakwaszonymi produktami mleczarskimi, jest większa – dodatkowo w znacznie dłuższym czasie [6, 12].

Prozdrowotne właściwości produktu zależą jednak od liczby bakterii probiotycznych, która nie może być mniejsza niż 1 milion komórek/g [18]. Przeżywalność probiotycznych szczepów bakterii mlekowych w serach typu holenderskiego jest dosyć wysoka ze względu na powolną migrację soli do wnętrza sera [7]. O dobrej tolerancji soli świadczy przeżywalność kultur probiotycznych – na poziomie 10^7 - 10^8 jtk/g w serze cheddar [11].

Mgr inż. M. Aljewicz, prof. dr hab. G. Cichosz, mgr inż. W. Łukaszuk-Kępka, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, prof. dr hab. Ł. Łaniewska-Trokenheim, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, dr inż. M. Danowska-Oziewicz, Katedra Żywienia Człowieka, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko Mazurski, ul. Heweliusza 1, 10-724 Olsztyn

Istotnym parametrem determinującym przebieg procesów mikrobiologicznych i biochemicznych jest aktywność wody zależna od zawartości wody (dokładnie wody wolnej) oraz ilości związków rozpuszczalnych. W początkowym okresie dojrzewania głównym czynnikiem obniżającym aktywność wody jest solenie sera. Istotny wpływ na aktywność wody wywiera również proteoliza i peptydoliza. Substancje o niskiej masie cząsteczkowej pochodzące z hydrolizy kazeiny, a także tłuszczu mlekowego, podobnie jak NaCl wpływają na obniżenie aktywności wody [17].

Z powyższych względów podjęto badania, których celem było określenie przeżywalności pałeczek mlekowych *Lactobacillus paracasei* LPC-37 w zależności od aktywności wody podczas dojrzewania oraz magazynowania sera typu szwajcarskiego.

Material i metody badań

Ser typu szwajcarskiego (z 6 cykli produkcyjnych, każdy z 11 000 l mleka) wyprodukowany został w warunkach przemysłowych zgodnie z obowiązującą instrukcją technologiczną. Do wyrobu sera zastosowano mleko klasy extra, termizowane, magazynowane w temp. 4 °C, poddane baktofugacji, ultrafiltracji oraz pasteryzacji w 72,5 °C przez 15 s. Do mleka kotłowego dodawano: zakwas roboczy z podłoża buforowego, chlorek wapnia, farbę serowarską, lizozym oraz podpuszczkę (Chymax firmy Ch. Hansen). Probiotyczny szczep *Lactobacillus paracasei* LPC-37 firmy Danisco oraz bakterie propionowe PS-4 firmy Ch. Hansen dodawano jednocześnie z zakwasem roboczym.

W serach bezpośrednio po wyrobie, tj. po soleniu, a także podczas dojrzewania (po 2, 4 i 6 tygodniach) oznaczano: zawartość wody, tłuszczu i NaCl, kwasowość czynną (pH), aktywność wody (Aparat Novasina AWC 200) w temp. 20 °C [1], liczbę pałeczek mlekowych *Lactobacillus*. Ponadto w serach po 1 i 2 miesiącach magazynowania (w warunkach chłodniczych) oznaczano aktywność wody oraz liczbę pałeczek *Lactobacillus*.

Liczbę pałeczek *Lactobacillus* oznaczano metodą powierzchniową na podłożu MRS-agar wg De Man, Rogosa i Sharpe (Merck) w temp. 30 °C; inkubacja przez 48 h w warunkach beztlenowych z zastosowaniem Anaerokult® (Merck). Przygotowanie próbek i oznaczenia mikrobiologiczne wykonywano zgodnie z normą PN-EN ISO 8261:2002 [14].

Do wstępnej identyfikacji wyizolowanych z sera szczepów *Lactobacillus* zastosowano testy API 50 CH (bioMerieux). Wyniki potwierdzono z wykorzystaniem programu APIWEB.

Do obliczeń wykorzystano statystyki podstawowe: średnia (\bar{x}), odchylenie standardowe (σ). Istotność różnic między wartościami średnimi wybranych parametrów testowano testem t-Studenta, a do analizy poszczególnych zależności wykorzystano

analizę korelacji, przy poziomie istotności ($\alpha < 0,05$). Obliczenia wykonano z wykorzystaniem programu Statistica 8 oraz Microsoft Exel 2007.

Wyniki i dyskusja

Badane sery tylko nieznacznie różniły się pod względem zawartości wody (39,85 - 40,95 %) i tłuszczu (46,86 - 47,52 % s.m.). Ze względu na obecność bakterii propionowych zawartość soli w serach była stosunkowo mała – 1,25 % i identyczna we wszystkich wyrobach. Zmiany kwasowości podczas dojrzewania były typowe dla sera półtwardego (tab. 1).

Tabela 1

Skład chemiczny oraz kwasowość sera typu szwajcarskiego podczas dojrzewania.

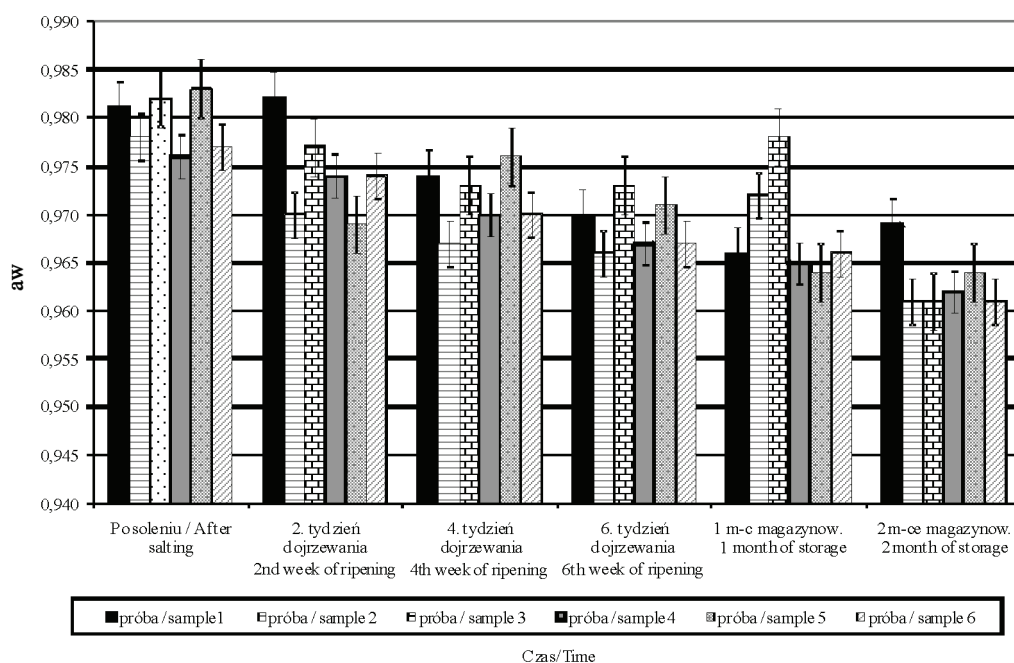
Chemical composition of Swiss-type cheeses and the acidity cheese during their ripening.

Nr próby Sample number	Parametry / Parameters							
	Zawartość wody [%] Water content [%]	Zawartość tłuszczu [%] Fat content [%]	Zawartość tłuszczu [% s.m.] Fat content [% d.m.]	NaCl [%]	pH			
					po soleniu after salting	po 2 tyg. dojrzew. after 2 weeks of ripening	po 4 tyg. dojrzew. after 4 weeks of ripening	po 6 tyg. dojrzew. after 6 weeks of ripening
1	40,95	27,94	47,34	1,25	5,22	5,08	5,27	5,50
2	40,49	28,24	47,45	1,25	5,24	5,17	5,31	5,48
3	40,56	28,25	47,52	1,25	5,23	5,18	5,24	5,54
4	39,85	28,47	47,33	1,25	5,23	5,17	5,24	5,52
5	40,70	28,13	47,44	1,25	5,23	5,11	5,20	5,54
6	40,66	27,81	46,86	1,25	5,22	5,17	5,22	5,40

Konsekwencją podobnego składu chemicznego było niewielkie zróżnicowanie aktywności wody (tab.1, rys.1). Aktywność ta w serach z poszczególnych cykli produkcyjnych bezpośrednio po wyrobie tj. po soleniu była bardzo zbliżona. Wartość średnia z 3 pomiarów była najniższa w przypadku próby 4. i wynosiła 0,976, najwyższą natomiast osiągnęła próba 5. ($a_w = 0,983$). Po 2 tygodniach dojrzewania, w porównaniu z odpowiednimi próbkami po soleniu, aktywność wody zmieniła się nieznacznie: w dwóch próbach wzrosła o 0,001, w pozostałych zmalała. Najniższą aktywnością wody $a_w = 0,969$ charakteryzowała się próba 5., najwyższą natomiast próba 1. ($a_w = 0,982$). Po 4 tygodniach dojrzewania we wszystkich badanych serach stwierdzono

większy spadek aktywności wody niż po 2 tygodniach. W kolejnym etapie dojrzewania spadek aktywności wody był podobny (rys.1).

Podczas dojrzewania sera stwierdzono stopniowe obniżanie się aktywności wody. W początkowym etapie obniżenie a_w było konsekwencją migracji NaCl od skórki do wnętrza sera. Większy spadek aktywności wody po 4 i 6 tygodniach dojrzewania był konsekwencją intensyfikacji proteolizy. Wytworzone przez podpuszczkę wysokocząsteczkowe peptydy degradowane były przez enzymy bakteryjne do niskocząsteczkowych peptydów i wolnych aminokwasów, co wynika ze specyficzności substratowej peptydaz. Rozpuszczalne w fazie wodnej sera związki azotowe były przyczyną malejącej aktywności wody [4, 10].



Rys. 1. Zmiany aktywności wody w zależności od okresu dojrzewania i magazynowania sera typu szwajcarskiego. Na wykresie przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe badanych prób ($n = 3$).

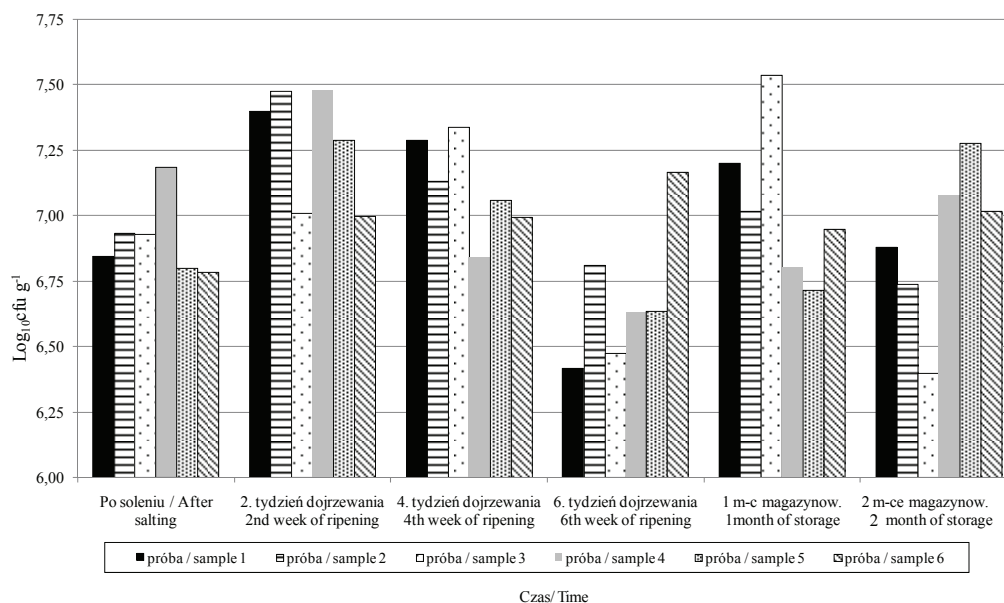
Fig. 1. Changes in water activity depending on the period of ripening and storing the Swiss-type cheeses. In the diagram, mean values \pm standard deviation ref. to the cheese samples analysed are presented ($n = 3$).

Badane sery charakteryzowały się zdecydowanie wyższą aktywnością wody niż sery holenderskie i szwajcarskie oceniane przez innych autorów. W serach holenderskich stwierdzono a_w w zakresie 0,913 - 0,937, przy czym ser edamski charakteryzował się wyższą a_w (0,932 - 0,937) niż ser gouda (0,913 - 0,916) [17]. Produkowane aktualnie sery dojrzewające, ze względu na radykalną poprawę jakości surowca oraz stoso-

waną powszechnie baktofugację, zawierają (z reguły) więcej wody. Z porównania różnego typu serów dojrzewających wynika, że większa zawartość wody w serze skutkuje wyższą aktywnością wody. Reguła ta nie potwierdza się w przypadku sera cheddar, ze względu na wysoką kwasowość oraz solenie w całej masie [8, 19].

Wysoka aktywność wody w badanych serach była także konsekwencją formowania i prasowania serów w dużych formach, a następnie krojenia każdego sera na 6 równych kawałków. Umożliwiało to skrócenie czasu solenia. Jednak powierzchnie sera pozbawione skórki wchłaniały znaczne ilości solanki co skutkowało wysoką aktywnością wody oraz intensyfikacją procesów mikrobiologicznych oraz biochemicznych, zachodzących podczas dojrzewania, a nawet magazynowania.

Podczas dojrzewania badanych serów stwierdzono wzrost pH (średnio) od 5,23 po soleniu do 5,50 po 6 tygodniach dojrzewania. Zmiany kwasowości były konsekwencją tzw. wtórnej fermentacji zachodzącej pod wpływem pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* [2].



Rys. 2. Przeżywalność pałeczek *Lactobacillus* podczas dojrzewania i magazynowania sera typu szwajcarskiego. Na wykresie przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe badanych prób ($n = 3$).

Fig. 2. Viability ($\text{Log}_{10}\text{cfu g}^{-1}$) of *Lactobacillus* in Swiss-type cheeses during their ripening and storage. In the diagram, mean values \pm standard deviation ref. to the cheese samples analysed are presented ($n = 3$).

Kultury probiotyczne, używając odpowiednie substraty, ograniczają wzrost nie pochodzących z zakwasu pałeczek mlekowych. Oprócz zastosowanych do produkcji

kultur *Lactobacillus paracasei* LPC-37, w badanych serach obecne były, podobnie jak we wszystkich innych serach dojrzewających, nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe (NSLAB - Nonstarter Lactic Acid Bacteria). Wyniki dotyczące liczebności pałeczek *Lactobacillus* dotyczą zatem zarówno kultur *Lactobacillus paracasei*, jak też NSLAB [2, 9].

Bezpośrednio po soleniu liczba pałeczek *Lactobacillus* w badanych serach była zbliżona: rzędu 10^6 do 10^7 jtk/g. Podczas pierwszych dwóch tygodni dojrzewania stwierdzono wzrost liczby pałeczek *Lactobacillus* o 1 cykl logarytmiczny w trzech serach oraz o 2 cykle w dwóch serach. W przypadku jednej próby liczba pałeczek mlekowych nie uległa zmianie, pozostając na poziomie 10^7 jtk/g (rys. 2). Po 4 tygodniach dojrzewania zróżnicowanie liczby pałeczek *Lactobacillus* było niewielkie, rzędu 10^6 jtk/g w jednym wyrobie oraz 10^7 jtk/g w pozostałych. W trzech serach liczebność *Lactobacillus* po 4 tygodniach dojrzewania była mniejsza o 1 cykl logarytmiczny niż w wyrobach po 2 tygodniach dojrzewania. Również po 6 tygodniach dojrzewania stwierdzono zmniejszenie liczby pałeczek mlekowych. Tylko w jednym serze liczba *Lactobacillus* po 6 tygodniach była taka sama jak po 4, ale niższa o 1 cykl logarytmiczny niż po soleniu oraz 2 tygodniach dojrzewania. Pozostałe wyroby po 6 tygodniach dojrzewania charakteryzowały się mniejszą o 1 cykl logarytmiczny liczbą pałeczek *Lactobacillus* niż po 4 tygodniach dojrzewania.

Wzrost pałeczek mlekowych w początkowym etapie dojrzewania możliwy był dzięki obecności niezbędnych substratów, tj. cytrynianów, kwasów organicznych, pozostałości cukrów. Po ich wyczerpaniu źródłem węgla mogły być mleczany. Większość pałeczek mlekowych zdolna jest do pobierania energii z utleniania mleczanów, jednak tylko w obecności tlenu [7, 9]. W badanych serach mleczany najprawdopodobniej zużyte zostały przez bakterie propionowe. Spadek liczby pałeczek *Lactobacillus* w ostatnim etapie dojrzewania sera spowodowany był autolizą bakterii ze względu na niedobory odpowiednich substratów, a także przemiany enzymatyczne prowadzące do destrukcji ścian komórkowych bakterii.

Wstępna identyfikacja szczepów *Lactobacillus*, wyizolowanych z sera po 6 tygodniach dojrzewania, za pomocą testów API, potwierdziła przynależność analizowanych 19 szczepów do gatunku *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, 1 szczepu do *Lactobacillus curvatus* ssp. *curvatus* oraz 1 szczepu do *Lactobacillus plantarum*. Z 19 badanych szczepów gatunku *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 12 potwierdzono zgodność co do gatunku w 99 % (wg programu APIWEB[®]). W przypadku pozostałych szczepów stwierdzono zgodność co do gatunku w 99,8 %.

Po 1. miesiącu magazynowania stwierdzono ponowny wzrost liczby pałeczek mlekowych w serach (rys. 2). Zamiast pałeczek *Lactobacillus*, które uległy autolizie miał miejsce wzrost innych szczepów. W badaniach McSweeney [9] w początkowych i końcowych etapach dojrzewania sera stwierdzono odmienne proporcje różnych

szczepów mezofilnych pałeczek *Lactobacillus*. Potwierdza to autolizę jednych i wzrost innych szczepów.

W celu określenia zależności ($\alpha < 0,05$) pomiędzy liczbą pałeczek mlekowych a aktywnością wody wykonano analizę statystyczną z zastosowaniem testu t Studenta. Wysoce istotną zależność pomiędzy liczebnością *Lactobacillus* a aktywnością wody stwierdzono w przypadku serów po 1 miesiącu przechowywania ($r = 0,86$). Natomiast średnią ujemną korelację stwierdzono po soleniu ($r = -0,56$) oraz po 6 tygodniach dojrzewania ($r = -0,55$).

Określenie przeżywalności wyłącznie kultur probiotycznych w serze podczas dojrzewania i magazynowania wymaga potwierdzenia przynależności gatunkowej technikami biologii molekularnej. Konwencjonalne metody identyfikacji drobnoustrojów, tylko na podstawie właściwości fizjologicznych i biochemicznych, są niewystarczające. Dlatego też, w kontynuacji badań wykorzystane zostaną nowoczesne narzędzia biologii molekularnej, jak analiza restrykcyjna zamplifikowanych fragmentów 16S lub 23S rRNA (z wykorzystaniem techniki łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR) czy fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) [16, 20].

Mikroflora wtórna, a zwłaszcza nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe, jest bardziej istotna w generowaniu smaku i zapachu sera niż kultury starterowe [4]. Zastąpienie nie pochodzących z zakwasu pałeczek mlekowych (NSLAB) kulturą probiotyczną umożliwia modyfikację cech sensorycznych [3, 6]. Wpływa jednocześnie na wzrost wartości biologicznej serów, której potwierdzeniem jest odpowiednio wysoka liczba probiotycznych bakterii mlekowych.

Wnioski

1. Najbardziej intensywny wzrost *Lactobacillus paracasei* LPC-37 wystąpił podczas pierwszych dwóch tygodni dojrzewania sera.
2. Statystycznie istotną zależność pomiędzy liczbą pałeczek *Lactobacillus* a aktywnością wody stwierdzono tylko w serach po pierwszym miesiącu magazynowania ($r = 0,86$).

Współautor pracy, mgr inż. M. Aljewicz, otrzymał stypendium współfinansowane przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Literatura

- [1] Alzamora S.M., Tapia M.S., Lopez-Malo A., Welti-Chanes. J.: The control of water activity. In: P. Zeuthen and L. Bøgh-Sørensen (Eds.): Food preservation techniques, CRC Press, Cambridge, England 2003, pp. 126-153.
- [2] Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M.: Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 2001, **11**, 259-274.

- [3] Bergamini C.V., Hynes E.R., & Zalazar C.A.: Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 2006, **16** (8), 856-866.
- [4] Cichosz G., Zalecka A., Lenkiewicz M.: The influence of streptococci and lactobacilli on proteolysis in Gouda cheese. *Milchwiss.* 2003, **58** (5/6), 297-300.
- [5] Cichosz G., Kłębukowska L., Cichosz A.J., Kornacki M.: The effect of *Lactobacillus* addition on proteolysis in Gouda cheese during ripening. *Milchwiss.* 2006, **61** (1), 49-52.
- [6] Cichosz G., Borejszo Z., Tomera K., Kornacki M.: Aroma compounds in Gouda cheese produced with addition of probiotic strains. *Pol. J. Natural Sci.* 2006, **21** (2), 987-997.
- [7] Fox P. F., Guinee T.P., Cogan T. M., McSweeney P.L.H.: *Microbiology of Cheese Ripening Fundamentals of Cheese Science An Aspen Publication Maryland 2000*, pp. 206-232.
- [8] Marcos A., Alcalá M., León F., Fernández-Salguero J., Esteban M.: Water activity and chemical composition of cheese. *J. Dairy Sci.* 1981, **64**, 622-626.
- [9] McSweeney P. L. H.: *Cheese problems solved* CRC Press, New York 2007.
- [10] Ong L., Henriksson A., Shah N.P.: Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *Int. Dairy J.* 2007, **17**, 67-78.
- [11] Ong L., Henriksson A., Shah N.P.: Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid *Int. Dairy J.* 2006, **16**, 446-456.
- [12] Ong L., Shah N.P.: Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles *LWT. Food Sci. Technol.* 2009, **42** (7), 1260-1268.
- [13] Phillips M., Kailasapathy K., Tran L.: Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L.rhamnosus*) in Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, **108**, 276-280.
- [14] PN-EN ISO 8261:2002. Mleko i przetwory mleczne. Główne wytyczne przygotowywania próbek, rozcieńczeń pierwszych i dziesiątych do badań mikrobiologicznych.
- [15] Ross R.P., Fitzgerald G., Collins K., Stanton C.: Cheese delivering biocultures- probiotic cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 2002, **57**, 71-78.
- [16] Roy D., Ward P., Vincent D., Mondou F.: Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Current Microbiology* 2000, **40**, 40-46.
- [17] Rüegg M., Blanc B.: Influence of water activity on the manufacture and aging of cheese, pp. 791-811. In: L. B. Rockland, G. F. Stewart (ed.), *Water activity: influences on food quality*. Academic Press, New York 1981.
- [18] Shah N.P.: Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.*, 2007, **17** (11), 1262-1277.
- [19] Świtka J., Medykowska K.: Wpływ aktywności wodnej na jakość i trwałość produktów mleczarskich. *Przegl. Mlecz.* 1983, **6**, 9-11.
- [20] Ward L.J.H., Timmnis M.J.: Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999, **29**, 90-92.

VIABILITY OF *LACTOBACILLUS PARACASEI* LPC-37 IN SWISS-TYPE CHEESES DURING THEIR RIPENING

Summary

The objective of this study and analysis were Swiss-type cheeses manufactured using a probiotic culture of *Lactobacillus paracasei* LPC-37. Owing to the similar chemical composition of the cheeses studied, the diversification of their water activity was slight. It was reported that after 4 and 6 weeks of ripening, the cheeses showed a higher decrease in water activity than after 2 weeks of ripening. When comparing the count of lactobacilli in the cheeses of a varying degree of ripeness, it is found that the most intensive growth of micro-organisms occurred during the first two weeks of ripening. A statistically significant dependence ($r=0.86$) between the number of *Lactobacillus* and water activity was found only in cheeses that have been stored for one month.

Key words: Swiss cheese, water activity, *Lactobacillus*, viability ☒