

Anna Bzducha-Wróbel, Mieczysław Obiedziński

ZMIANY ZAWARTOŚCI CLA W UKŁADACH SERÓW MODELOWYCH Z DODATKIEM *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* I *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS**

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Obiedziński*

*W pracy zaprezentowano wyniki badań nad wpływem probiotycznych pałeczek *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 i *Lactobacillus acidophilus* La-5 na zawartość kwasu linolowego o wiązaniach skoniugowanych (CLA) w tłuszczu serów modelowych poddawanych ośmiotygodniowemu dojrzewaniu w temperaturze 14°C. W końcowym okresie dojrzewania w modelach probiotycznych stwierdzono wzrost ilości CLA o ok. 150 mg/100 g tłuszczu. Obserwowano istotne statystycznie ujemne korelacje między wzrostem zawartości CLA a zawartością kwasu linolowego, linolenowego i elaidynowego.*

Hasła kluczowe: kwas linolowy o wiązaniach skoniugowanych, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, sery modelowe.

Key words: conjugated linoleic acid, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, cheese models.

Izomery kwasu linolowego o wiązaniach sprzężonych (CLA) to grupa związków stanowiących izomery pozycyjne i geometryczne kwasu oktadekadienowego. W cząsteczkach tych kwasów wiązania podwójne skoniugowane, czyli oddzielone w łańcuchu węglowym jednym wiązaniem pojedynczym, zlokalizowane są najczęściej przy węglach w pozycjach od 6,8 do 13, 15 i mogą przyjmować konfigurację *cis*, *cis*; *trans*, *trans*; *trans*, *cis* lub *cis*, *trans* (1). Jednym z głównych izomerów CLA jest kwas żwaczowy (C18:2 *cis*-9, *trans*-11), zidentyfikowany po raz pierwszy jako pośredni produkt biohydrogenacji przeprowadzanej przez bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens* (2). Wyniki badań wskazują, że na drodze biohydrogenacji biosyntezę CLA przeprowadzać mogą również szczepy z grupy bakterii mlekowych, m.in. z rodzaju *Lactobacillus* czy *Lactococcus* oraz *Bifidobacterium*. Kwas linolowy (18:2 *cis*-9, *cis*-12) izomeryzowany jest do kwasu żwaczowego (18:2 *cis*-9, *trans*-11) przez enzym izomerazę kwasu linolowego (EC 5.2.1.5) na szlaku przemian do kwasu stearynowego (3, 4). Liczne izomery CLA występują naturalnie w tłuszczu zwierząt przeżuwających, w ich tkance mięśniowej oraz mleku, a także w niektórych olejach roślinnych, jak olej kukurydziany, oliwa z oliwek, tłuszcz kokosowy, olej z pestek

* Praca zrealizowana w ramach grantu badawczego promotorskiego Nr NN 312 150 634 przyznanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2008–2009.

winogron, jednak w tych ostatnich zawartość CLA jest niewielka – poniżej 0,01% (5, 6). W tłuszczu mlecznym średnia zawartość CLA, jako kwas 18:2 *cis*-9, *trans*-11, waha się w granicach 300–600 mg/100 g tłuszczu (7). Lin (8) podaje, że dla serów dojrzewających typowe było wyższe stężenie CLA (ok. 8,8 mg CLA/1 g tłuszczu) w porównaniu z mlekiem nieprzetworzonym – poniżej 1,0 mg CLA/1 g tłuszczu. Zlatanos i in. (9) porównywali zawartość CLA w różnych serach dojrzewających i ustalili, że mieściła się ona w przedziale 450–950 mg CLA/100 g tłuszczu, zaś Fritsche i Steihart (10) wskazali, że średnie zawartości CLA w serach zawierały się w granicach 0,4–1,7% całkowitej puli kwasów tłuszczowych, przy średniej zawartości 0,84%. Zawartość CLA w przetworach mlecznych pozwala na zapewnienie tylko ok. 25% najmniejszej dawki wykazującej działanie prozdrowotne, tj. przeciwnowotworowe, przeciwmiażdżycowe, immunomodulacyjne, przeciwcukrzycowe i inne (11). Określanie zdolności biosyntezy CLA przez bakterie mlekowe stosowane w technologii żywności jako kultury starterowe lub probiotyczne może służyć selekcji odpowiednich drobnoustrojów do opracowywania produktów funkcjonalnych o naturalnie zwiększonej zawartości składników prozdrowotnych (CLA).

Celem pracy było zbadanie wpływu probiotycznych pałeczek *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 i *Lactobacillus acidophilus* La-5 na zawartość CLA w tłuszczu serów modelowych poddawanych ośmiotygodniowemu dojrzewaniu w temperaturze 14°C.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły modele serów dojrzewających. Modele wytwarzano z zastosowaniem kultury starterowej procesu fermentacji (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R-603) oraz dodatkiem bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Ch. Hansen). Wykorzystano zmodyfikowaną procedurę Crespo i in. (12). Do jałowych butelek Schotta zawierających 250 cm³ sterylnej wody destylowanej, naważano 158 g śmietanki UHT (30% tłuszczu) i 157 g odtłuszczonego proszku mlecznego. Następnie dodawano NaCl (4 g) i cytrynian sodu (1,75 g). Butelki z matrycą serową umieszczano w łaźni wodnej (Cabrolab Electronic, Polska) i poddawano ogrzewaniu do temperatury 31°C. Następnie matrycę serową zaszczepiano bakteriami, przy czym do modeli kontrolnych dodawano tylko szczepionkę R-603. Zaszczepioną gęstwą serową termostowano (31°C/30 min), po czym dodawano preparat koagulujący (1:13000, Marzyme, Chr. Hansen) w ilości 1 cm³ i dokładnie mieszano. Po wytworzeniu skrzepu serowego (ok. 40 min od dodania podpuszczki) gęstwą cięto i dogrzewano (36°C/25 min). Kolejne dogrzewanie prowadzono w temperaturze 41°C przez 50 min. Tak przygotowane sery modelowe poddawano dojrzewaniu przez 8 tygodni w temperaturze 14°C w chłodziarce z kontrolowaną temperaturą (Elekrolux). Masa sera modelowego wynosiła ok. 580 g. Modele wykonywano w dwóch seriach. Próbkę do analiz mikrobiologicznych oraz fizykochemicznych pobierano w czasie 0 (zaraz po wytworzeniu serów) oraz w 2, 4, 6, 8 tygodniu dojrzewania. Próbkę przeznaczoną do analizy estrów metylowych kwasów tłuszczowych przechowywano w temperaturze –21°C do czasu analizy.

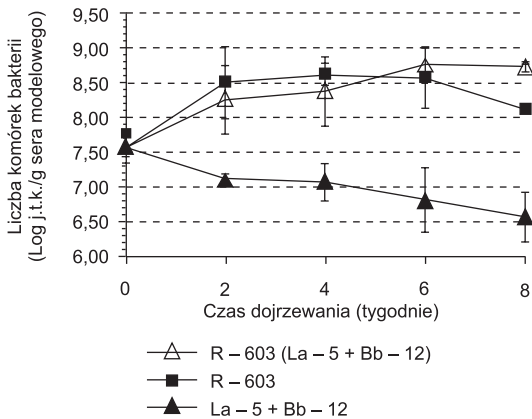
W celu oznaczenia liczby komórek pałeczek beztlenowych (*Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) posiew wykonywano na podłoże MRS – agar, po czym płytki inkubowano w warunkach beztlenowych (42°C/72 h). Warunki beztlenowe uzyskiwano stosując słoje do hodowli beztlenowych oraz wkłady Anaerocult® A (Merck, Niemcy). Oznaczenie liczby komórek paciorkowców mlekowych wykonywano na podłożu M17 – agar prowadząc inkubację płytek z posiewami w warunkach tlenowych (30°C/72 h). Wynik końcowy (średnia z czterech powtórzeń) podawano jako logarytm jednostek tworzących kolonię przypadających na 1 g sera modelowego (log j.t.k./1 g sera modelowego).

Do analizy składu kwasów tłuszczowych tłuszcz ekstrahowano metodą *Folcha* (13), zmodyfikowaną pod względem ilości pobieranej próbki oraz ilości stosowanych rozpuszczalników organicznych. Pobierano ok. 1,0 g próbki, 12 cm³ mieszaniny chloroform: metanol w stosunku 2:1 oraz 0,5 cm³ roztworu standardu wewnętrznego (triacylglicerol kwasu heneikozanowego – TAG C21:0, czystość ≥ 99%, Nu – Chek – Prep., USA, 5 mg/cm³). Po ekstrakcji warstwę chloroformową zbierano, sączono przez bezwodny siarczan sodu, następnie chloroform odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Do pozostałego tłuszczu dodawano 3 cm³ heksanu i dodawano 0,1 cm³ KOH w metanolu (2 M) dokładnie mieszając. Reakcję estryfikacji prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 min w termostacie. Z tak przygotowanej próbki, po uprzednim rozcieńczeniu 4 cm³ heksanu, pobierano 0,2 cm³ i uzupełniano heksanem do objętości 1,5 cm³. Następnie próbki poddawano analizie chromatograficznej (nastrzyk 1 µl). Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME – fatty acid methyl ester, w tym CLA – 18:2 *cis*-9, *trans*-11) oznaczano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem masowym (GC/MS – QP2010, Shimadzu). Rozdział chromatograficzny estrów metylowych kwasów tłuszczowych prowadzono na kolumnie polarnej BPX 90 (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm), SGE Incorporated. Obliczenia ilościowe FAME wykonywano względem standardu wewnętrznego uwzględniając współczynniki korekcyjne oraz przeliczeniowe FAME na triacylglicerole kwasów tłuszczowych. Analizy wykonywano w trzech powtórzeniach w każdej serii badań. Wyniki badań poddawano analizie statystycznej przy wykorzystaniu pakietu statystycznego STATISTICA V.8. przeprowadzając analizę korelacji oraz jednoczynnikową analizę wariancji. Do porównań posłużono się testem HSD *Tukeya*.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zgodnie z procedurą wytwarzania serów modelowych do wszystkich układów dodawano bakterie starterowe z rodzaju *Lc. lactis* R-603 (Ch. Hansen). Po wprowadzeniu szczepionki R-603 wszystkie warianty modeli zawierały ok. 7,4 cyklu logarytmicznego komórek bakterii z rodzaju *Lactococcus*. W ciągu dwóch pierwszych tygodni dojrzewania w 14°C następowało istotnie statystycznie namnażanie się kultury starterowej (ryc. 1). W modelach zaszczepionych tylko starterem R-603 liczba komórek paciorkowców mlekowych wzrosła w tym okresie o ok. 1,0 cykl logarytmiczny, zaś w układach z pałeczkami mlekowymi i bifidobakteriami o ok. 0,7 cykła logarytmicznego. W kolejnych tygodniach dojrzewania modeli z bakteriami

Lactobacillus i *Bifodobacterium* bakterie starterowe nadal się namnażały, tak, że po szóstym tygodniu przyrost był rzędu 1,2 cyklu log w porównaniu z czasem zerowym. (ryc. 1). W modelach serów kontrolnych tendencja była odwrotna, bowiem po czterech tygodniach przechowywania zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie się liczby *Lc. lactis*. Redukcja komórek R-603 osiągnęła poziom 0,5 cyklu w ostatnim dniu dojrzewania.



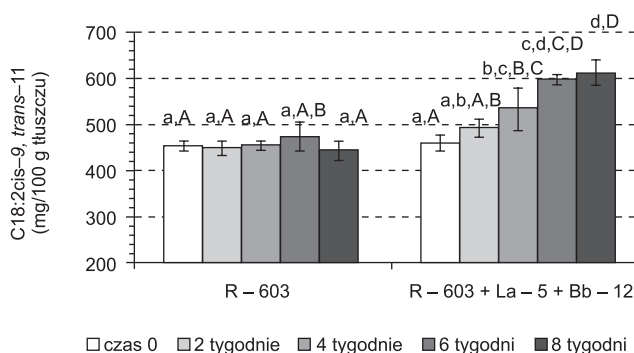
Ryc. 1. Zmiany liczby komórek tlenowych paciorkowców mlekowych w układach serów modelowych kontrolnych (R-603) oraz z dodatkiem *Lb. acidophilus* i *Bif. animalis* subsp. *lactis* R-603 (La-5 + Bb-12), a także zmiany liczby pałeczek probiotycznych w układach z dodatkiem tych bakterii (La-5 + Bb-12).

Fig. 1. Changes at the number of cells of aerobic Lactococcus and probiotic bacteria in models of control cheeses (R-603) and with the addition of *Lb. acidophilus* i *Bif. animalis* subsp. *lactis* R-603 + La-5 + Bb-12, as also changes in probiotic number in models with the addition of probiotic bacteria (La-5 + Bb-12).

W przypadku bakterii probiotycznych w modelach z dodatkiem pałeczek *Lactobacillus acidophilus* oraz *Bifodobacterium animalis* subsp. *lactis* obserwowano powolne, istotne statystycznie zmniejszanie się liczby żywych komórek tych mikroorganizmów w czasie dojrzewania. Po dwóch pierwszych tygodniach populacja bakterii zmniejszyła się o ok. 0,5 log j.t.k./g z początkowego poziomu ok. 7,6 cykła log. W ósmym tygodniu liczba komórek pałeczek beztlenowych uległa redukcji do ok. 6,6 cykła log (ryc. 1).

W układach kontrolnych nie stwierdzano istotnych zmian zawartości CLA. W całym okresie dojrzewania kształtowała się ona na poziomie średnio 454 ± 19 mg/100 g tłuszczu (ryc. 2). W tłuszczu modeli z dodatkiem *Bifodobacterium* oraz *Lb. acidophilus* odnotowano wzrost zawartości CLA. Różnica między końcowym a początkowym udziałem CLA w tłuszczu tych modeli wyniosła ok. 150 mg/100 g tłuszczu. (ryc. 2). W modelach probiotycznych występowały ujemne istotne korelacje między wzrostem ilości CLA a zawartością kwasu linolowego C18:2 *cis*-9, *cis*-12 ($r = -0,517$) oraz kwasem elaidynowym ($r = -0,660$). Również obniżanie się ilości kwasu linolenowego korelowało silnie ze wzrostem masy CLA ($r = -0,729$). Jak podają *Fritsche* i *Steinhart* (10) pierwszym etapem izomeryzacji kwasu linolowego jest jego przekształcenie do CLA *cis*-9, *trans*-11 lub *trans*-9 *cis*-11 lub do oby-

dwu izomerów. Produktami pośrednimi przemian katalizowanych przez izomerazę związaną z błoną komórkową bakterii mogą być kwas wakcenyowy i elaidynowy. Akalin i in. (14) stwierdzali, że również zestryfikowane formy kwasu linolowego stanowiły substraty syntezy CLA prowadzonej przez bakterie *Lb. acidophilus* La-5 oraz *Bif. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 w jogurtach. W wyniku metabolizmu tych bakterii zawartość izomeru 18:2 *cis*-9, *trans*-11 w badanych produktach ulegała prawie trzykrotnemu zwiększeniu. Fritsche i in. (6) podają, że w wytworzonym przez nich serach Emmental z dodatkiem szczepów probiotycznych ilość CLA nieznacznie wzrastała. Także w badaniach wykonanych przez Van Nieuwenhove i in. (15) w serach z dodatkiem bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* uzyskiwano wzrost zawartości CLA w czasie dojrzewania.



Ryc. 2. Zmiany zawartości kwasu linolowego o wiązaniach skoniugowanych w modelach kontrolnych (R-603) oraz probiotycznych (R-603 + La-5 + Bb-12) w czasie dojrzewania serów modelowych. Objasnienia: a, b, ... – te same litery przy wartościach średnich danego sera modelowego oznaczają brak statystycznie istotnych różnic ($\alpha = 0,05$); A, B, ... – te same litery przy wartościach średnich modeli serów kontrolnych i probiotycznych oznaczają brak statystycznie istotnych różnic między modelami ($\alpha = 0,05$).

Fig. 2. Changes in conjugated linoleic fatty acid content in control (R-603) and probiotic models (R-603 + La-5 + Bb-12) during ripening of cheese models. Explanatory notes: a, b – the same letters at average values for model cheese indicate lack of the statistical significant differences ($\alpha = 0,05$). A, B, ... – the same letters at average values for control and probiotic model cheeses indicate lack of the statistical significant differences between models ($\alpha = 0,05$).

WNIOSKI

Uzyskane wyniki badań wykazały, że bakterie *Lactobacillus acidophilus* La-5 oraz *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 istotnie wpływały na zwiększenie zawartości kwasu linolowego o wiązaniach skoniugowanych w tłuszczu serów modelowych, która była niższa w układach kontrolnych. Udział kwasu linolowego o wiązaniach sprzężonych był silnie ujemnie skorelowany ze zmianami zawartości izomerów *trans* kwasów tłuszczowych oraz kwasów nienasyconych. Przypuszczalnie kwasy te stanowiły substraty przemian do CLA. Badane szczepy bakterii mogą potencjalnie przyczyniać się do naturalnego zwiększania składników prozdrowotnych (CLA) w przetworach mlecznych.

A. Bzducha-Wróbel, M. Obiedziński

CHANGES IN CLA CONCENTRATION IN CHEESE MODELS WITH THE ADDITION OF *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* AND *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Summary

The study presents the results of investigation under the influence of probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* on conjugated linoleic acid (CLA) content in the fat of models of cheeses subjected to ripening during 8 weeks at 14°C. At the end of ripening time the increase in CLA concentration was observed in probiotic models (about 150 mg/100 g of fat). The statistically important negative correlations were noticed between changes in CLA content and linoleic, linolenic and elaidic acid fatty acid concentration.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bear-Rogers J.*: Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem., 2001; 73: 685-744. – 2. *Bessa R.J.B., Santo-Silva J., Ribeiro J.M.R., Portugal A.V.*: Reticulo – rumen bihydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. Livestock Prod. Sci., 2000; 63: 201-211. – 3. *Bauman D.E., Baumgard L.H., Corl B.A., Griinari J.M.*: Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Proceeding of the American Society of Animal Science, 1999; 1-15. – 4. *Kim Y.J., Liu R.H.*: Influence of conjugated linoleic content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. Jour. Food Sci., 2002; 67(5): 1731-1737. – 5. *Shantha N.C., Decker E.A., Ustunol Z.*: Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. JAOCS, 1992; 69 (5): 425-428. – 6. *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. – 7. *Janeczek W., Kupczyński R.*: Czynniki decydujące o zawartości sprzężonego kwasu linolowego (CLA) w tłuszczu mleka krów, Acta Sci. Pol., Med. Veterinaria, 2006; 5(1): 65-82. – 8. *Lin T.Y.*: Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. Food Chem., 2000; 69: 27-31. – 9. *Zlatanov S., Lascaridis K. Feist C., Sagredos A.*: CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. Food Chem., 2002; 78: 471-477. – 10. *Fritsche J., Steinhart H.*: Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. Z Lebensm Unters Forsch A, 1998; 2006: 77-82.
11. *Przybojewska B., Rafalski H.*: Kwasy tłuszczowe występujące w mleku a zdrowie człowieka. Sprężony kwas linolowy CLA (cz. 2). Przegl. Mlecz., 2003; 5: 173-175. – 12. *Crespo P., Kneubühler H., Bising W., Schindler M., Fröhlich-Wyder M. T., Bachmann H.P.*: Method for the characterization and evaluation of cultures for the use in semi – hard cheese. IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterization and Technology, March 21-25, 2004; 115. – 13. *Folch J., Lees M., Stanley G.G.S.*: A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem., 1957; 226: 497-509. – 14. *Akalin A. S., Tokugoglu O., Gönc S., Aycan S.*: Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. Int. Dairy Jour., 2007; 17 (9): 1089-1095. – 15. *Van Nieuwenhove C.P., Oliszewski R., González S.N., Pérez Chaia A.B.*: CLA conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. Letters Appl. Microbiol., 2007; 44: 467-474.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159 C.