

MAREK ALJEWICZ, GRAŻYNA CICHOSZ, MARIKA KOWALSKA

WPLYW DODATKU KULTUR PROBIOTYCZNYCH *LACTOBACILLUS* NA INTENSYFIKACJĘ PROTEOLIZY W SERACH TYPU HOLENDERSKIEGO

Streszczenie

Szansą na zwiększenie zainteresowania konsumentów serami dojrzewającymi jest wprowadzenie na rynek produktu innowacyjnego, który odznaczałby się akceptowanymi cechami sensorycznymi. Tę innowacyjność można osiągnąć np. przez zastosowanie bakterii probiotycznych, o potencjalnie prozdrowotnym działaniu na organizm człowieka, do produkcji serów dojrzewających.

Celem podjętych badań była ocena wpływu probiotycznych pałeczek *Lactobacillus rhamnosus* Howaru i *Lactobacillus acidophilus* Howaru na zakres (N-rozpuszczalny) oraz głębokość (N-peptydowy i N-aminokwasowy) proteolizy podczas dojrzewania sera edamskiego.

Konsekwencją zastosowania kultur probiotycznych był większy zakres (N-rozpuszczalny) oraz głębokość (N-aminokwasowy) dojrzewania, a tym samym znaczne zróżnicowanie cech sensorycznych serów doświadczalnych w porównaniu z wyrobami kontrolnymi. Zastosowanie w wyrobie sera edamskiego kultur probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* Howaru i *Lactobacillus rhamnosus* Howaru umożliwiło intensyfikację proteolizy czego dowodem są większe przyrosty zawartości N-rozpuszczalnego i N-aminokwasowego. Sery doświadczalne wyprodukowane z *Lb. acidophilus* charakteryzowały się największą zawartością N-rozpuszczalnego, N-peptydowego i N-aminokwasowego zwłaszcza po 6 tygodniach dojrzewania.

Słowa kluczowe: sery holenderskie, proteoliza, związki azotowe, probiotyki, *Lactobacillus acidophilus* Howaru, *Lactobacillus rhamnosus* Howaru

Wprowadzenie

Zainteresowanie konsumentów żywnością funkcjonalną, do której zalicza się m.in. wyroby probiotyczne, stale wzrasta [10]. Ze względu na skład chemiczny, mniejszą (w porównaniu z mlecznymi napojami fermentowanymi) kwasowość, temperaturę dojrzewania i magazynowania sery dojrzewające mogą stanowić dobre źródło kultur

Mgr inż. M. Aljewicz, prof. dr hab. G. Cichosz, mgr inż. M. Kowalska, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn

probiotycznych. Obecność wszystkich substratów (cytryniany, mleczany, kwasy organiczne i inne), zapewnia wzrost oraz wysoką przeżywalność (rzędu $10^8 - 10^7$ jtk/g produktu) kultur probiotycznych w znacznie dłuższym czasie niż w innych produktach mleczarskich [16]. Zastosowanie bakterii probiotycznych do produkcji serów dojrzewających skutkuje prozdrowotnym działaniem na organizm człowieka. Ponadto, umożliwia wyrób serów dojrzewających o zróżnicowanych cechach sensorycznych oraz skrócenie czasu dojrzewania [8, 17, 20].

Mimo pasteryzacji mleka w serach dojrzewających zawsze obecne są niepochozące z zakwasu bakterie mlekowe (NSLAB), głównie mezofilne pałeczki *Lactobacillus*. W odróżnieniu do kultur zakwasu (mezofile paciorkowce mlekowe) pałeczki *Lactobacillus* syntetyzują aktywne proteiny oraz peptydazy zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe, a także związane ze ścianą komórkową, zdolne do hydrolizy wszystkich frakcji kazeiny [12].

Oprócz aminopeptydaz syntetyzowanych przez mezofile paciorkowce mlekowe różne szczepy pałeczek *Lactobacillus* wytwarzają karboksy-, di- i tripeptydazy [7, 18, 19]. Wysokocząsteczkowe poli- i oligopeptydy powstające pod wpływem podpuszczki hydrolizowane są do niskocząsteczkowych peptydów i wolnych aminokwasów pod wpływem enzymów bakteryjnych. Powstałe wolne aminokwasy, a także produkty ich degradacji stanowią prekursorzy związków smakowo-zapachowych w serach dojrzewających [4, 13]. Znaczenie kultur starterowych w proteolizie i peptydolisie podczas dojrzewania sera jest marginalne, bowiem wewnątrzkomórkowe aminopeptydazy uwalniane są dopiero po autolizie komórek.

Z wcześniejszych badań realizowanych w Katedrze Mleczarstwa i Zarządzania Jakością wynika, że jakość sensoryczna serów typu holenderskiego jest w statystycznie istotnym stopniu zależna od liczby NSLAB [5]. Udowodniono również, że zastąpienie niepochozących z zakwasu pałeczek *Lactobacillus* kulturą probiotyczną wpływa na modyfikację cech sensorycznych [6].

Celem podjętych badań była ocena wpływu probiotycznych pałeczek *Lactobacillus rhamnosus* Howaru[®] i *Lactobacillus acidophilus* Howaru[®] na zakres (N-rozpuszczalny) oraz głębokość (N-peptydowy i N-aminokwasowy) proteolizy podczas dojrzewania sera edamskiego.

Material i metody badań

Sery typu holenderskiego (6 warów, każdy z 11 000 l mleka) wyprodukowano w warunkach przemysłowych zgodnie z obowiązującą instrukcją technologiczną. Do wyrobu sera zastosowano mleko klasy extra, termizowane, magazynowane w temp. 4 °C, poddane baktofugacji oraz pasteryzacji w 72,5 °C przez 15 s. Do mleka kotłowego dodawano: głęboko mrożone kultury serowarskie (Choozit classic 111, Danisco), chlorek wapnia, farbę serowarską, saletrę oraz podpuszczkę (Chymax, Ch. Hansen).

Wyroby kontrolne wyprodukowano z dodatkiem głęboko mrożonych kultur starterowych (Choozit classic 111). Natomiast w wyrobach doświadczalnych, oprócz kultur starterowych, zastosowano probiotyczną kulturę *Lactobacillus rhamnosus* Howaru® (2 wary) oraz *Lactobacillus acidophilus* Howaru® (2 wary) firmy Danisco.

Bezpośrednio po soleniu sery poddawano analizie chemicznej. Oznaczano: kwasowość (pH) i zawartości wody. W serach bezpośrednio po soleniu oraz po 2, 4, 6 i 10 tygodniach dojrzewania analizowano stopień degradacji parakazeiny, oznaczając zawartość: związków azotowych ogółem [9], związków azotowych rozpuszczalnych w pH 4,6 wg Sode Morgensena [9], związków azotowych peptydowych wg Boulanger i wsp. w roztworze związków azotowych niebiałkowych przygotowanym wg metody Schobera i wsp. [9] oraz związków azotowych aminokwasowych metodą Sirksa [9].

Wyniki i dyskusja

Stwierdzono zróżnicowanie zawartości wody w badanych serach: od 41,92 do 42,72 % (tab. 1). Najmniejsze zróżnicowanie stwierdzono w serach kontrolnych natomiast największe w serach z dodatkiem *Lb. rhamnosus* (0,39 %). Konsekwencją zróżnicowanej zawartości wody były zmiany liczby kultur probiotycznych oraz aktywność enzymów proteolitycznych.

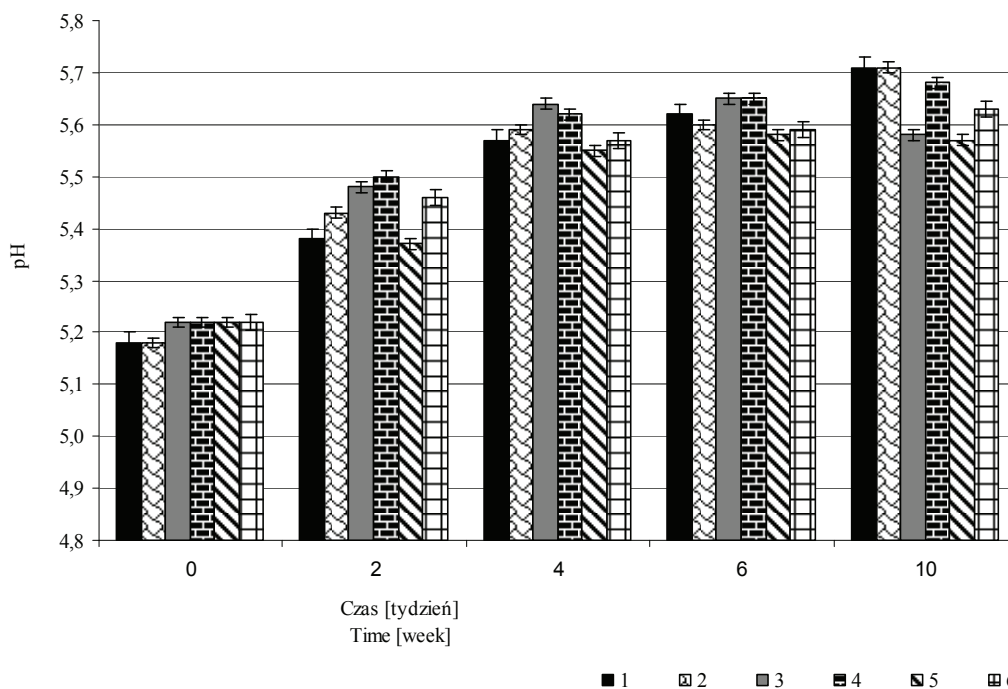
Tabela 1

Zawartość wody [%] w serach po soleniu (n = 3). Wyniki i odchylenie standardowe są statystycznie istotne ($\alpha < 0,05$).

Water content [%] in cheese after brining (n = 3). The results and standard deviation are statistically significant ($\alpha < 0.05$).

Produkt Product	Kod próby Sample code	Woda Water
Ser kontrolny Control cheese	1	42,36 ± 0,27
	2	42,61 ± 0,62
Ser z <i>Lb. acidophilus</i> Cheese with <i>Lb. acidophilus</i>	3	41,92 ± 0,43
	4	42,20 ± 0,20
Ser z <i>Lb. rhamnosus</i> Cheese with <i>Lb. rhamnosus</i>	5	42,72 ± 0,47
	6	42,33 ± 0,41

Wyroby kontrolne bezpośrednio po wyprodukowaniu charakteryzowały się nieznacznie większą (o 0,04) kwasowością niż doświadczalne. We wszystkich badanych serach po soleniu stwierdzono kwasowość poniżej pH 5,3. Zmiany kwasowości badanych serów podczas dojrzewania, świadczące o tzw. fermentacji wtórnej, były typowe dla serów holenderskich. Większe tempo fermentacji wtórnej, polegającej głównie na rozkładzie cytrynianów i mleczanów, stwierdzono po 2 i 4 tygodniach dojrzewania. Natomiast po 6 i 10 tygodniach dojrzewania spadek kwasowości serów był mniejszy. Po 10 tygodniach stwierdzono nieznacznie mniejszą kwasowość w serach kontrolnych (pH 5,7) niż doświadczalnych (pH ok. 5,6) (rys. 1). Dynamika fermentacji wtórnej zależna jest od liczby mikroflory wtórnej, a także od jej dostępu do odpowiednich substratów. Z tego powodu fermentacja wtórna bardziej intensywnie przebiegała w początkowych etapach procesu dojrzewania sera.

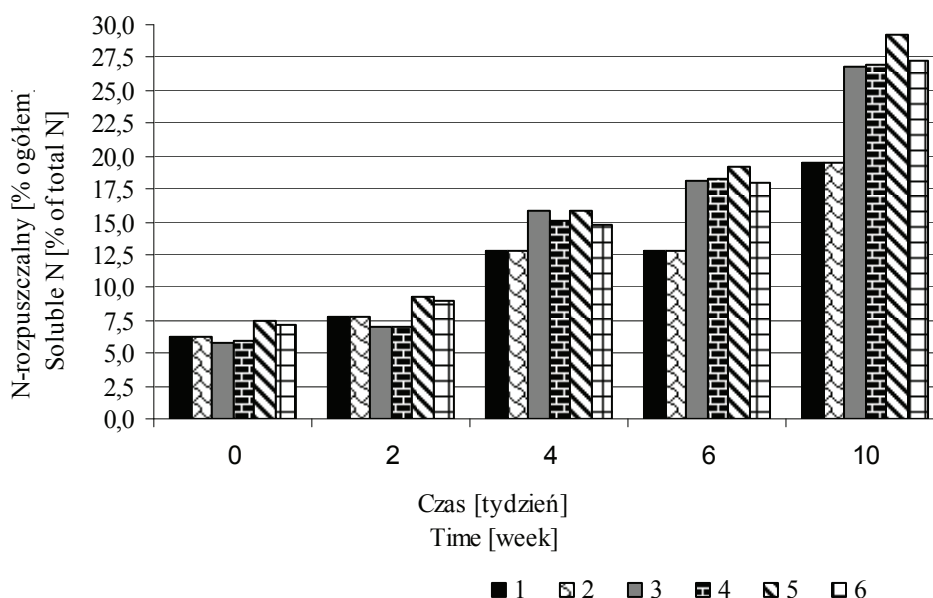


Objaśnienia / Explanatory notes:

1, 2 – ser kontrolny / control cheese; 3, 4 – ser z dodatkiem kultury probiotycznej *Lactobacillus acidophilus* Howaru / cheese with probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* Howaru added; 5, 6 – ser z dodatkiem kultury probiotycznej *Lactobacillus rhamnosus* Howaru / cheese with probiotic culture *Lactobacillus rhamnosus* Howaru added.

Rys. 1. Zmiany pH w serach po 0, 2, 4, 6 i 10 tygodniach dojrzewania, wyniki statystycznie istotne ($\alpha < 0,05$).

Fig. 1. Changes in pH values of cheeses the ripening process of which lasted 0, 2, 4, 6, 10 weeks; statistically significant results ($\alpha < 0.05$).



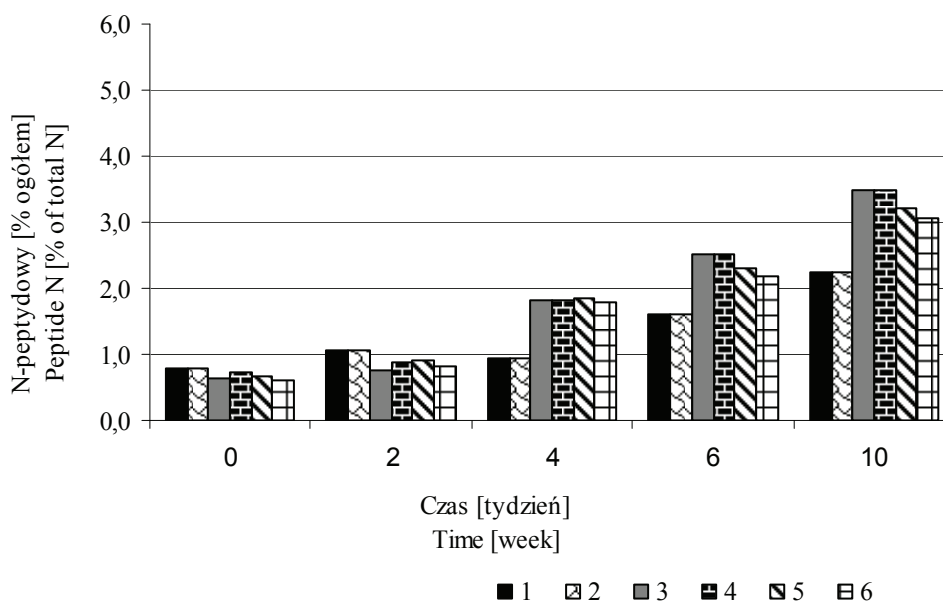
Rys. 2. Zmiany N-rozpuszczalnego [% ogółem] w serach podczas dojrzewania (n = 3). Wyniki statystycznie istotne ($\alpha < 0,05$).

Fig. 2. Changes in content of soluble N [% of total N] in cheeses during their ripening (n = 3). Statistically significant results ($\alpha < 0.05$).

W serach doświadczalnych (5 i 6) bezpośrednio po soleniu związki azotowe rozpuszczalne stanowiły największy odsetek azotu ogółem, średnio 7,34 %. W wyrobach kontrolnych stosunek N-rozpuszczalnego do N-ogółem wynosił 6,22 %, a w serach z dodatkiem *Lb. acidophilus* (3 i 4) 5,87 %. Po 10 tygodniach największy przyrost N-rozpuszczalnego stwierdzono w wyrobach z dodatkiem kultury *Lb. rhamnosus* (średnio - 28,22 %). Jest to wartość wyższa o 8,72 % w stosunku do serów kontrolnych – bez dodatku kultury probiotycznej (rys. 2).

Bezpośrednio po soleniu zawartość N-peptydowego była największa w serach kontrolnych i wynosiła średnio 0,78 %. Po 2 tygodniach dojrzewania stwierdzono niewielki wzrost N-peptydowego we wszystkich badanych serach, odpowiednio: średnio 0,28 % w serach 1 i 2 - 0,14 % w serach 2 i 3 oraz 0,24 % w serach 5 i 6. Po 4 tygodniach dojrzewania stwierdzono wzrost zawartości N-peptydowego w serach z dodatkiem kultur probiotycznych - średnio 0,98 % w serach 3 - 6 (rys. 3). Również po 6 i 10 tygodniach dojrzewania stwierdzono wyraźny wzrost N-peptydowego we wszystkich badanych serach, przy czym w serach kontrolnych każdorazowo zawartość N-peptydowego była znacznie mniejsza niż w doświadczalnych. Największą zawartość N-peptydowego (3,48 % po 10 tygodniach dojrzewania) stwierdzono w serach z do-

datkiem *Lb. acidophilus*. Procentowy przyrost N-peptydowego podczas 10 tygodni dojrzewania serów z dodatkiem *Lb. acidophilus* wynosił ok. 513 %, natomiast w wyrobach kontrolnych 288 %.



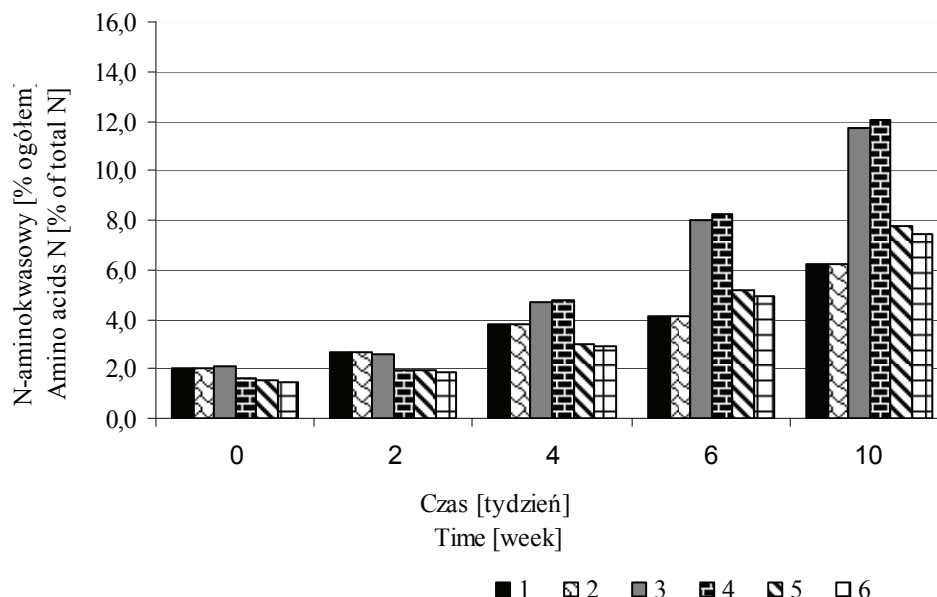
Rys. 3. Zmiany N- peptydowego [% ogółem] w serach podczas dojrzewania (n = 3). Wyniki statystycznie istotne ($\alpha < 0,05$).

Fig. 3. Changes in content of peptide N [% of total N] in cheeses during their ripening (n = 3). Statistically significant results ($\alpha < 0.05$).

W serach kontrolnych bezpośrednio po soleniu stwierdzono większą zawartość N-aminokwasowego (2,03 %) niż w doświadczalnych. Najmniejszą zawartość stwierdzono w serach z dodatkiem *Lb. rhamnosus* – średnio 1,46 %. Po 4 tygodniach dojrzewania stwierdzono intensywny wzrost N-aminokwasowego w serach z *Lb. acidophilus* (252 %) w porównaniu z serami kontrolnymi (189 %). Najmniejszą zawartość N-aminokwasowego stwierdzono w serach z *Lb. rhamnosus*. Pomiedzy 4 a 10 tygodniem stwierdzono znaczny przyrost zawartości N-aminokwasowego w serach z dodatkiem kultur probiotycznych: największy w serach z dodatkiem *Lb. acidophilus*. Najmniejszą zawartość N-aminokwasowego stwierdzono w serach kontrolnych (rys. 4).

Podczas wyrobu sera, w wyniku rozkładu β -kazeiny pod wpływem plazminy i enzymów bakteryjnych wytwarzane są wysokocząsteczkowe peptydy o charakterze hydrofobowym [1, 2]. Interakcje między nimi uniemożliwiają dalszą hydrolizę podczas dojrzewania. Proteoliza parakazeiny w początkowym stadium dojrzewania sera deter-

minowana jest przede wszystkim aktywnością podpuszczki [13], w mniejszym stopniu aktywnością proteinaz i peptydaz bakteryjnych.



Rys. 4. Zmiany N-aminokwasowego [% ogółem] w serach podczas dojrzewania (n = 3). Wyniki statystycznie istotne ($\alpha < 0,05$).

Fig. 4. Changes in content of amino acids N [% of total N] in cheeses during their ripening (n = 3). Statistically significant results ($\alpha < 0.05$).

Powstające pod wpływem podpuszczki poli- oraz oligopeptydy hydrolizowane są pod wpływem enzymów bakteryjnych do niskocząsteczkowych peptydów i wolnych aminokwasów. Ze względu na specyficzność substratową (zdolność hydrolizy wszystkich frakcji kazeiny), a także z powodu syntezy enzymów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych związanych z błoną komórkową znacznie większą aktywnością proteolityczną i peptydolityczną charakteryzuje się mikroflora wtórna głównie pałeczki *Lactobacillus*. Znaczenie kultur starterowych (mezofilnych paciorkowców mlekowych) w degradacji parakazeiny podczas dojrzewania sera jest znikome. Mezofilne paciorkowce mlekowe wytwarzają enzymy wewnątrz-komórkowe aktywne dopiero po autolizie bakterii. W ocenie procesów proteolizy sera uwzględnia się tzw. zakres dojrzewania (N-rozpuszczalny w % N-ogółem) oraz głębokość dojrzewania (zawartość N-aminokwasowego lub N-aminowego w % N-ogółem) [13]

Podczas dojrzewaniu badanych serów stwierdzono większe przyrosty zawartości N-peptydowego i N-aminokwasowego w serach doświadczalnych w porównaniu z kontrolnymi. Największą zawartość N-aminokwasowego stwierdzono w serach

z dodatkiem *Lb. acidophilus*. Było to konsekwencją wysokiej aktywności syntezowanych przez *Lb. acidophilus* proteinaz związanych ze ścianą komórkową oraz peptydaz (aminopeptydaz i dipeptydaz) [3, 7, 11]. Większa dynamika wytwarzania związków azotowych (N-aminokwasowych oraz N-peptydowych) w 10. tygodniu dojrzewania możliwa była dzięki obecności wysokocząsteczkowych peptydów powstałych w wyniku działalności enzymów koagulujących (N-rozpuszczalny) [6]. Jednocześnie wraz z autolizą dodanych kultur *Lactobacillus* w serze namnażały się NSLAB, co miało również wpływ na stopień intensyfikacji proteolizy. Podobne rezultaty uzyskano, oceniając dynamikę dojrzewania sera cheddar [13].

W badaniach dotyczących sera cheddar [15, 16], a także sera gouda [2, 3] dowiedziono, że zastosowanie kultur probiotycznych skutkuje intensyfikacją proteolizy oraz modyfikacją cech sensorycznych [14]. Konsekwencją zastosowania kultur probiotycznych był większy zakres (N-rozpuszczalny) oraz głębokość (N-aminokwasowy) proteolizy sera.

Wnioski

1. Zastosowanie do produkcji sera edamskiego kultur probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* Howaru i *Lactobacillus rhamnosus* Howaru umożliwia intensyfikację procesu proteolizy, czego dowodem są większe przyrosty zawartości N-rozpuszczalnego i N-aminokwasowego.
2. Sery doświadczone wyprodukowane z *Lb. acidophilus* Howaru charakteryzowały się największą zawartością N-rozpuszczalnego, N-peptydowego i N-aminokwasowego, zwłaszcza po 6 tygodniach dojrzewania.

Mgr inż. Marek Aljewicz otrzymał stypendium współfinansowane przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Literatura

- [1] Azarnia S., Lee B.H., Yaylayan V., Kilcawley K.N.: Proteolysis development in enzyme-modified Cheddar cheese using natural and recombinant enzymes of *Lactobacillus rhamnosus* S93. Food Chem., 2010, **120**, 174-178.
- [2] Bergamini C.V., Hynes E.R., Candioti M.C., Zalazar C.A.: Multivariate analysis of proteolysis patterns differentiated the impact of six strains of probiotic bacteria on a semi-hard cheese J. Dairy Sci., 2009, **92** (6), 2455-2467.
- [3] Bergamini C.V., Hynes E.R., Zalazar C.A.: Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese Int. Dairy J., 2006, **16**, 856-866.
- [4] Cagno R., Quintob M., Corsetti A., Minervina F.: Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. Int. Dairy J., 2006, **16**, 119-130.

- [5] Cichosz G., Zalecka A., Lenkiewicz M.: The influence of streptococci and lactobacilli on proteolysis in Gouda cheese. *Milchwiss.*, 2006, **5/6**, 297-300.
- [6] 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.
- [7] Cichosz G., Kornacki M., Giczeńska M., Konopka A.: Aktywność peptydazowa wybranych szczepów *Lactobacillus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **1 (46)**, 66-74.
- [8] Courtina P., Nardia M., Wegmann U., Joutsjokid V., Ogieb J.C., Gripona J.C., Palvad A., Henrich B., Monnet V.: Accelerating cheese proteolysis by enriching *Lactococcus lactis* proteolytic system with lactobacilli peptidases. *Int. Dairy J.*, 2002, **12**, 447-454.
- [9] Heldrich K.: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Inc, Arlington, Virginia 1990.
- [10] Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H., Salminen S.: Probiotics: effects on immunity. *Amer. J. Clin. Nutr.* 2001, **2**, 444-450.
- [11] Khalid N.M., Marth E.: Lactobacilli – their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A review. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 2669-2684.
- [12] Lane C.N., Fox P.F.: Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, 1996, **6**, 715-728.
- [13] McSweeney, P.L.H.: Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General Aspects 3rd ed. P.F. Fox, P.H.L. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, ed. Academic Press, San Diego, CA 2004, pp. 347-360.
- [14] Milesi M.M., Vinderola G., Sabbag N., Meinardi C.A., Hynes E.: Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. *Food Res. Int.*, 2009, **42**, 1186-1196.
- [15] Ong L., Henriksson A., Shah N.P.: Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. *Int. Dairy J.*, 2007, **17**, 937-945.
- [16] 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.
- [17] Ross, R.P., Fitzgerald G., Collins K., Stanton C.: Cheese delivering biocultures - Probiotic cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 2002, **57**, 71-78.
- [18] Savijoki, K., Ingmer H., Varmanen P.: Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **71**, 394-406.
- [19] Upadhyay V.K., McSweeney P.L.H., Magboul A.A.A., Fox P.F.: Proteolysis in Cheese during ripening Cheese. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General Aspects 3rd ed. P.F. Fox, P.H.L. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, ed. Academic Press, San Diego, CA 2004.
- [20] Watkinson, P., Coker C., Crawford R., Dodds C., Johnston K., McKenna A., White N.: Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 455-464.

**EFFECT OF PROBIOTIC CULTURES *LACTOBACILLUS* ADDITIVE
ON THE INTENSIFICATION OF PROTEOLYSIS IN DUTCH-TYPE CHEESES**

S u m m a r y

There is a chance to increase consumer interest in ripening cheeses by introducing an innovative product in the market that would be characterized by acceptable sensory features. Such innovativeness could be achieved, for example, by using probiotic bacteria with a potentially pro-health effect on human body in the production of ripening cheese.

The objective of the research undertaken was to assess the effect of probiotic cultures of *Lactobacillus rhamnosus* Howaru and *Lactobacillus acidophilus* Howaru on the range (soluble N) and depth (peptide N and amino acid N) of proteolysis during the ripening process of Edam cheese.

The application of the probiotic cultures resulted in the increase in the range (soluble N) and depth (amino-acid N) of the ripening process, therefore, the sensory features of cheeses analysed became significantly diversified compared to the control samples. Owing to the use of probiotic cultures of *Lactobacillus rhamnosus* Howaru and *Lactobacillus acidophilus* Howaru in the production of Edam cheese, it was possible to intensify proteolysis; this fact was confirmed by higher increases in the contents of soluble N and amino-acid N. The cheeses used in the experiment and manufactured using *Lactobacillus acidophilus* were characterized by the highest content of soluble N, peptide N, and amino acid N, especially when their ripening process lasted for 6 weeks.

Key words: Dutch cheese, proteolysis, nitrogen compounds, probiotics, *Lactobacillus acidophilus* Howaru, *Lactobacillus rhamnosus* Howaru ☒