



Wiązanie cholesterolu przez kultury starterowe mezofilnych paciorkowców mlekowych

Małgorzata Ziarno, Ewa Sękuł, Monika Makowska

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności,
Wydział Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Warszawa

The assimilation of cholesterol by starter cultures of mesophilic lactococci

Summary

The aim of this work was the determination of the ability of four commercial starter cultures of mesophilic lactococci to cholesterol assimilation during 24-hours-long culture in MRS broth medium at 30°C. The tested starter cultures showed various ability to assimilate cholesterol from culture medium varying from $10,4 \pm 1,56\%$ to $29,8 \pm 5,22\%$. The results of this study proved the existence of significant differences in cholesterol assimilation ability between commercial starter cultures of mesophilic lactococci, and also even between individual repetitions for the same culture. The best cholesterol-assimilating starter culture of mesophilic lactococci was used for the production of sour cream, that was stored at 5-6°C for 14 days and tested in respect of microbiological (number of lactococci) and physicochemical properties (pH, titrable acidity, fat acidity, cholesterol content). During the 14-day refrigerating storage, the number of lactococci and pH did not change. Titrable acidity and fat acidity increased negligibly. After the 14-day refrigerating storage, the decrease of the cholesterol content was observed. The decrease of cholesterol content in sour cream was over 35% in comparison with cholesterol content in sweet cream used for sour cream production and stored for 14 days at the same conditions as sour cream.

Adres do korespondencji

Małgorzata Ziarno,
Katedra Biotechnologii,
Mikrobiologii i Oceny
Żywności,
Wydział Technologii
Żywności,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159 c,
02-787 Warszawa;
e-mail:
ziarno@alpha.sggw.waw.pl

Key words:

cholesterol, dairy starter cultures, assimilation, lactic acid bacteria.

1. Wstęp

Zdolność redukcji poziomu cholesterolu w żywności oraz w żywych organizmach, jest jedną z prozdrowotnych właściwości, przypisywanych niektórym bakteriom fermentacji mlekowej. Od lat 70. ubiegłego stulecia prowadzone są badania, dotyczące wpływu spożywania produktów fermentowanych lub zawierających dodatki bakterii fermentacji mlekowej, na obniżenie stężenia cholesterolu we krwi u ludzi i zwierząt (1-6). Z kolei, na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* dowiedziono, że niektóre bakterie mlekowe aktywnie usuwają cholesterol z modelowych podłoży hodowlanych. Pojawiły się przypuszczenia, że podobna redukcja ilości cholesterolu może mieć miejsce w produktach mleczarskich, fermentowanych z udziałem bakterii fermentacji mlekowej, które tym samym mogą *in vivo* wywierać opisany efekt hipocholesterolemiczny. Jako najbardziej prawdopodobny mechanizm takiego oddziaływania bakterii fermentacji mlekowej podaje się wiązanie cholesterolu do komórek (asymilację do ściany komórkowej lub przyłączanie do błony komórkowej) w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Inne mechanizmy, jak obniżanie poziomu cholesterolu na skutek jego wytrącania (koprecypitacji) z wolnymi kwasami żółciowymi, bądź w wyniku wytworzenia pewnych substancji, które mogą wywierać wpływ na poziom lipidów we krwi (np. krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych lub egzopolisacharydów), czy też dekoniugacji kwasów żółciowych, dzięki aktywności wytwarzanej przez niektóre bakterie mlekowe hydrolazy soli żółci (BSH, ang. *bile salt hydrolase*), w dalszym ciągu pozostają w strefie hipotez naukowych, wymagających potwierdzenia w doświadczeniach *in vivo* (7-13).

Większość badań nad wiązaniem cholesterolu przez bakterie fermentacji mlekowej dotyczy głównie szczepów probiotycznych, gdyż to one znajdują się w wąskim kręgu zainteresowań mikrobiologów, biotechnologów żywności, a także zakładów farmaceutycznych. W wielu badaniach *in vitro* wskazuje się, że zdolność wiązania posiadają również „tradycyjne” bakterie mlekowe, mezofilne i termofilne, wchodzące w skład kultur starterowych stosowanych do produkcji fermentowanych artykułów spożywczych. Jednakże, jak dotąd nie wszystkie kultury starterowe bakterii fermentacji mlekowej, stosowane w mleczarstwie, zostały pod tym kątem przebadane.

Celem pracy było określenie zdolności mezofilnych paciorkowców mlekowych, będących składnikami przemysłowych kultur starterowych stosowanych w mleczarstwie, do wiązania cholesterolu w podłożu hodowlanym oraz redukcji jego poziomu w fermentowanej śmietanie.

2. Materiały i metodyka

2.1. Kultury starterowe i ich hodowla

Do badań zastosowano komercyjne wielogatunkowe kultury starterowe paciorkowców mlekowych, używane w przemyśle mleczarskim do produkcji śmietany i twarogów. Były to liofilizowane kultury starterowe typu DVS (ang. *direct-vat-set*), służące do bezpośredniego zaszczepiania mleka przerobowego bakteriami fermentacji mlekowej. Wszystkie szczepionki zawierały w swoim składzie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* i *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Według deklaracji producentów, kultury starterowe różniły się między sobą aktywnością kwaszącą i aromatyzującą, wynikającą z różnych proporcji w liczebności wymienionych w składzie paciorkowców mlekowych. Kulturami starterowymi nr 1, 2 i 3 były odpowiednio szczepionki CHN-11, CHN-19 i FL-DAN uzyskano z firmy Chr. Hansen Poland, zaś kulturą starterową nr 4 – szczepionka PROBAT 505 otrzymana z firmy Wisby Poland.

Do ożywiania i namnażania bakterii, obecnych w badanych szczepionkach, użyto bulionu MRS (Merck). Hodowle kultur prowadzono w temperaturze 30°C przez 24 godziny, a następnie przeszczepiano do świeżej porcji podłoża płynnego MRS i ponownie hodowano w 30°C przez 24 godziny, po czym, stosowano do badań.

2.2. Przygotowanie roztworu cholesterolu

Cholesterol w formie proszku, o czystości chemicznej > 99% (Sigma-Aldrich) rozpuszczano na gorąco w roztworze 99% etanolu i Tweenu 80, wymieszanych w proporcji 3:1. Uzyskany w ten sposób roztwór miał stężenie 3,0 g cholesterolu /1 dm³. Sterylnie odmierzoną porcję roztworu dodawano do wyjałowionego podłoża płynnego MRS w takiej ilości, aby końcowe stężenie cholesterolu wynosiło 1,0 g ± 0,2 g /1 dm³ podłoża. Na potrzeby każdego doświadczenia przyrządzano świeżą jednolitą partię bulionu MRS o znanym stężeniu cholesterolu.

2.3. Oznaczenie liczby mezofilnych paciorkowców mlekowych

Liczbę mezofilnych paciorkowców mlekowych oznaczano metodą płytkową z użyciem podłoża M17 Agar (Merck). Płytki z posiewami inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godz.

2.4. Określenie zdolności do wiązania cholesterolu w podłożu płynnym MRS

Zdolność kultur starterowych do wiązania cholesterolu określano jako ubytek w jego stężeniu w bulionie MRS po zakończonej 24-godzinnej hodowli w temperaturze 30°C. Stężenie cholesterolu oznaczano za pomocą diagnostycznego testu enzymatycznego Cholésterol RTU® (BioMérieux). Pomiar absorbancji wykonano przy użyciu spektrofotometru SmartSpecTM 3000 (Bio-Rad) i długości fali $\lambda = 500$ nm. Przed przystąpieniem do oznaczania stopnia wiązania cholesterolu zawartość próbek wirowano w ultrawirówce (12 000 × g, 10 min, 4°C) w celu wydzielenia biomasy komórek bakterii i uzyskania klarownego płynu pochodowlanego. Procentową wartość wiązania cholesterolu obliczano stosując następującą formułę:

$$D = 100 - \frac{A - B}{C} \cdot 100[\%],$$

gdzie: A – stężenie cholesterolu w podłożu MRS zawierającym zawiesinę komórek bakteryjnych i dodatek roztworu cholesterolu, po 24 godz. inkubacji; B – stężenie cholesterolu w podłożu płynnym MRS zawierającym tylko zawiesinę komórek bakteryjnych, po 24 godz. inkubacji; C – stężenie cholesterolu w podłożu MRS zawierającym tylko dodatek roztworu cholesterolu, po 24 godz. inkubacji; D – wartość wiązania cholesterolu (%). Doświadczenie wykonano w pięciu niezależnych powtórzeniach, dla każdej kultury starterowej, a uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe.

2.5. Produkcja śmietany w warunkach laboratoryjnych

Produkcję śmietany w warunkach laboratoryjnych prowadzono w porcjach po 200 cm³. Śmietankę (o 12% zawartości tłuszczu), podgrzaną do temperatury 25°C, do której dodawano 0,5 g mezofilnej kultury starterowej rozprowadzonej w 5 cm³ resterylizowanego mleka UHT, ukwaszano w temperaturze 23°C przez 20 godz. Gotowy produkt schłodzono do 5-6°C i przechowywano przez 14 dni. W podobnych warunkach przechowywano śmietankę, z której otrzymano śmietanę. Produkcję śmietany wykonano w jednym powtórzeniu.

2.6. Analiza śmietany i śmietanki

Podczas chłodniczego przechowywania, oba produkty poddawano analizie fizykochemicznej (pomiar pH, kwasowości miareczkowej, kwasowości tłuszczu, metodami ogólnie przyjętymi) oraz mikrobiologicznej (liczba mezofilnych paciorkowców tlenowych). Analizy dokonywano w 0, 7 i 14 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych (5-6°C).

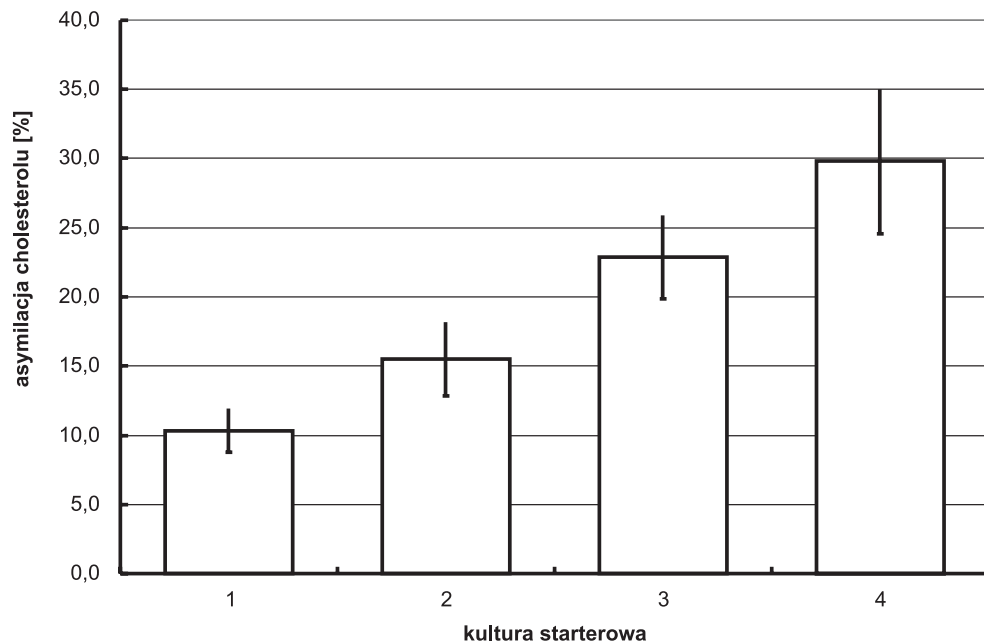
W 14 dniu przechowywania dokonano również oznaczenia zawartości cholesterolu. Zawartość cholesterolu w próbkach śmietanki i śmietany oznaczono zgodnie z metodyką opisaną przez Fletouris i wsp. (14). Wydzielenie frakcji lipidowej z próbek dokonano metodą bezpośredniego zmydlania lipidów w badanych próbkach za pomocą metanolowego roztworu KOH, w temperaturze 80°C /15 min i następnie ekstrakcją n-heksanem (Merck). Do analizy chromatograficznej użyto chromatografu gazowego model GC-17A (Shimadzu) wyposażonego w kolumnę niepolarną (długość i średnica wewnętrzna kolumny kapilarnej wykonanej z topionej krzemionki odpowiednio 15 m i 0,32 mm, warstwa fazy 1,0 μm), autoinjector AOC-20S, detektor płomieniowo-jonizujący (FID), autosampler model AOC-20 oraz oprogramowanie Class VP. Parametry rozdziału w chromatografii gazowej były następujące: temperatura pieca 285°C, temperatura dozownika i detektora 300°C. Szybkość przepływu helu 1 cm³/min, wodoru 50 cm³/min, powietrza 300 cm³/min. Objętość próbki podawana na kolumnę wynosiła 1 cm³, zaś stosunek podziału 1:20. Czas retencji dla cholesterolu wynosił około 8,2 min. Jako wzorca wewnętrznego użyto 5α-cholestanu (Sigma-Aldrich), natomiast cholesterolu (Sigma-Aldrich) jako wzorca zewnętrznego.

2.7. Analiza statystyczna

Wyniki oznaczeń liczby mezofilnych paciorkowców mlekowych w podłożu płynnym MRS, zawierającym i nie zawierającym dodatku roztworu cholesterolu, były analizowane z wykorzystaniem programu Statgraphics 4.0 Plus. Celem analizy było stwierdzenie wpływu dodatku roztworu cholesterolu na liczbę paciorkowców mlekowych w podłożu płynnym.

3. Wyniki

Badania przeprowadzone w pierwszym etapie pracy miały na celu określenie zdolności wybranych kultur mezofilnych paciorkowców mlekowych do usuwania cholesterolu podczas hodowli prowadzonej w płynnym podłożu MRS w warunkach optymalnych dla ich rozwoju. Zdolność do wiązania cholesterolu zbadano u paciorkowców mlekowych wchodzących w skład komercyjnych wielogatunkowych kultur starterowych przeznaczonych do produkcji takich wyrobów mleczarskich, jak śmietana, twarogi, sery podpuszczkowe i masło. Wyniki pomiaru stężenia cholesterolu w podłożach po przeprowadzonej hodowli posłużyły do obliczenia procentu usuniętego cholesterolu przez każdą z badanych kultur (rys.). Badane kultury starterowe wykazały się różną zdolnością do usuwania cholesterolu z podłoża hodowlanego. Najwięcej cholesterolu ubyło w podłożu hodowlanym zawierającym dodatek paciorkowców mlekowych kultury starterowej nr 4, dla których średni procent wiąza-



Rys. Wiązanie cholesterolu przez kultury starterowe mezofilnych paciorkowców mlekowych stosowanych w mleczarstwie. Prezentowane wyniki są średnią wartością z 5 powtórzeń \pm odchylenie standardowe.

nia cholesterolu wyniósł $29,8\% \pm 5,22\%$, przy czym rozrzut między wartościami wiązania cholesterolu określonymi w poszczególnych powtórzeniach mieścił się w granicach od 22,2 do 36,9%. Dla porównania, bakterie z kultury starterowej nr 1 wiązały najmniej cholesterolu – średnio $10,4\% \pm 1,56\%$ pierwotnej jego ilości.

Równocześnie sprawdzono, wpływ dodatku roztworu cholesterolu na rozwój bakterii z badanych kultur starterowych. Liczba paciorkowców mlekowych w prowadzonych hodowlach mieściła się w zakresie od $7,7 \log$ do $9,0 \log$ j.t.k./ cm^3 (tab. 1). Nie zaobserwowano jednak statystycznie istotnych różnic (dla $P < 0,05$) w liczebności populacji paciorkowców mlekowych pomiędzy hodowlami prowadzonymi z dodatkiem i bez dodatku roztworu cholesterolu (tab. 1). Stwierdzone różnice dotyczyły liczebności bakterii w hodowlach badanych poszczególnych kultur starterowych oraz w powtórzeniach doświadczeń.

Tabela 1

Liczba mezofilnych laktokoków mlekowych w hodowli przemysłowych kultur starterowych w podłożu MRS bez dodatku i z dodatkiem cholesterolu

Kultura starterowa	Liczba paciorkowców mlekowych [log j.t.k. / cm ³]	
	MRS bez dodatku r-ru cholesterolu	MRS z dodatkiem r-ru cholesterolu
1	8,4 ± 0,29 a	8,3 ± 0,42 a
2	8,4 ± 0,37 a	8,2 ± 0,40 a
3	8,5 ± 0,23 a	8,2 ± 0,35 a
4	8,3 ± 0,39 a	8,2 ± 0,44 a

a, b, c, ... te same litery w jednym wierszu oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy (dla poziomu istotności 0,05), ± odchylenie standardowe.

W następnym etapie pracy, do otrzymania śmietany w warunkach laboratoryjnych wykorzystano kulturę starterową nr 4, która charakteryzowała się największą zdolnością do usuwania cholesterolu z podłoża hodowlanego. Wyprodukowaną śmietanę przechowywano w warunkach chłodniczych przez 14 dni i w tym czasie poddawano analizie fizykochemicznej i mikrobiologicznej. Podczas dwutygodniowego przechowywania nie stwierdzono istotnych zmian kwasowości czynnej śmietany, która wynosiła 4,6-4,4 jednostek pH (tab. 2). Natomiast po 7 i 14 dniach zaobserwowano przyrost wartości kwasowości potencjalnej, z początkowej 29,1 °SH do odpowiednio 31,0 °SH i 34,5 °SH w 14 dniu (tab. 2). Stwierdzono także, że podczas 14-dniowego przechowywania śmietany w warunkach chłodniczych wartość kwasowości tłuszczu wzrosła w stosunku do wartości bezpośrednio po ukwaszeniu o 0,14 stopni kwasowości (tab. 2). Pod względem mikrobiologicznym nie odnotowano znaczącej zmiany w liczebności mezofilnych paciorkowców mlekowych; ich liczba wynosiła 7,7 log j.t.k. /1 g produktu, bezpośrednio po wyprodukowaniu śmietany i 7,6 log j.t.k. /1 g produktu, po 14 dniach przechowywania w 5-6°C.

W przypadku śmietanki, nie zaobserwowano żadnych widocznych zmian badanych cech fizykochemicznych (kwasowości czynnej, potencjalnej i kwasowości tłuszczu). Przez cały okres przechowywania śmietanki, kwasowość czynna wynosiła 6,6, natomiast kwasowość potencjalna 5,8 °SH. Również wartość kwasowości tłuszczu w śmietance nie ulegała zmianie i stale wynosiła 0,95 °kw (tab. 2).

Stwierdzono znaczną różnicę w zawartości cholesterolu w śmietanie i śmietance, z której otrzymano śmietanę. Zawartość cholesterolu w śmietance wykorzystanej do otrzymania śmietany wynosiła początkowo 38,8 mg ± 0,42 mg w 100 g, i po 14 dniach przechowywania nie uległa istotnej zmianie (tab. 2). Natomiast fermentowana śmietana, po 14-dniowym przechowywaniu w warunkach chłodniczych zawierała tylko 24,9 mg cholesterolu w 100 g.

Tabela 2

Wybrane cechy fizykochemiczne i mikrobiologiczne słodkiej śmietanki oraz śmietany fermentowanej przez kulturę nr 4

Badana cecha	Śmietanka			Śmietana fermentowana przez kulturę nr 4		
	czas przechowywania w 5-6°C [dzień]			czas przechowywania w 5-6°C [dzień]		
	0	7	14	0	7	14
kwasowość czynna, pH	6,6	6,6	6,6	4,6	4,5	4,4
kwasowość potencjalna [°SH]	5,8	5,8	5,8	29,1	31,0	34,5
kwasowość tłuszczu [°kw]	0,95	0,95	0,95	1,30	1,36	1,44
liczba mezofilnych paciorkowców mlekowych [log j.t.k. / 1 g produktu]	–	–	–	7,7	7,6	7,6
zawartość cholesterolu [mg /100 g]	38,8 ±0,42	–	38,5	–	–	24,9

– nie oznaczono; ± odchylenie standardowe.

4. Dyskusja

Jedną z prozdrowotnych właściwości bakterii fermentacji mlekowej, nie do końca poznaną i zbadaną, jest zdolność do obniżania poziomu cholesterolu w wyrobach mleczarskich i żywych organizmach. Od ponad trzydziestu lat w licznie przeprowadzonych badaniach *in vivo* na zwierzętach i ludziach wskazuje się na obniżanie poziomu cholesterolu we krwi, jednak doniesienia te są często krytykowane ze względu na błędy metodyczne, techniczne oraz brak powtarzalności. W badaniach *in vitro* udowodniono, że komórki bakteryjne są zdolne do wiązania cząsteczek cholesterolu polegającego na przyłączaniu cząsteczek tej substancji do ściany lub błony komórkowej bakterii. Jednak, badając zdolność bakterii do wiązania cholesterolu z podłoża hodowlanego, w pierwszej kolejności należało określić, czy obecność tego związku nie zmienia dynamiki rozwoju tych drobnoustrojów. Przeprowadzone w pracy porównanie wzrostu mezofilnych paciorkowców mlekowych w podłożu płynnym z dodatkiem i bez dodatku cholesterolu, dowiodło braku statystycznie istotnego wpływu tego związku na dynamikę wzrostu mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących wpływu cholesterolu na wzrost mezofilnych laktokoków, co utrudnia dyskusję uzyskanych wyników. Wyjątkiem są badania Kimoto i wsp. (15), którzy zaobserwowali, że obecność cholesterolu stymulowała w pewnym stopniu wzrost komórek szczepu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7, co wykazali mierząc gęstość optyczną hodowli przy długości fali świetlnej wynoszącej 620 nm. Należy jednak za-

znaczyć, że badacze ci stosowali podłoże płynne GM17-THIO zawierające dodatkowo 0,2% taurocholalanu sodu, który mógł wpłynąć na uzyskane wyniki.

Z danych literaturowych wynika, że zdolność do obniżania poziomu cholesterolu w warunkach *in vitro* wykazują nie tylko szczepy o udokumentowanych badaniach cechach probiotycznych, ale również niektóre „tradycyjne” bakterie mlekowe stosowane w produkcji serów, śmietany, masła czy mlecznych napojów fermentowanych, takich jak: zsiadłe mleko, maślanka, jogurt i kefir. Zdolność redukcji poziomu cholesterolu w warunkach *in vitro* wykazano dla wielu bakterii fermentacji mlekowej, głównie termofilnych z rodzaju *Lactobacillus* (1,5,8,11,13,16-20). Inne rodzaje, dla których zaobserwowano podobną właściwość, to np. *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* (9,15,16,18,21,22). Mechanizmy takiego oddziaływania bakterii fermentacji mlekowej na poziom cholesterolu nie są do końca poznane, chociaż wiadomo, że bakterie mlekowe nie są zdolne do metabolizowania cholesterolu, a jedynie mogą go wiązać do ściany lub błony komórkowej (11,12,15,18). W przeprowadzonych badaniach laboratoryjnych wskazuje się, że za przyłączanie cząsteczek cholesterolu do ściany komórkowej bakterii fermentacji mlekowej odpowiedzialny jest obecny w niej peptydoglikan, który u różnych bakterii fermentacji mlekowej ma inny skład (9).

W pracy zbadano zdolność do wiązania cholesterolu przez mezofilne paciorkowce mlekowe, stanowiące mikroflorę komercyjnych mleczarskich kultur starterowych. Stanowi to o nowatorstwie tej pracy, gdyż w dostępnej literaturze niewiele jest wyników badań, w których wykorzystywano odpowiednio skomponowane, jeśli chodzi o skład jakościowy i ilościowy, komercyjne kultury starterowe mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Rezultaty badań dowodzą zdolności badanych kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej do usuwania cholesterolu w podłożu hodowlanych podczas 24-godzinnej hodowli w optymalnej temperaturze wzrostu. W skład wszystkich tych kultur starterowych wchodziły następujące gatunki paciorkowców mlekowych: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *diacetylactis* oraz *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*. Warto zaznaczyć, że badane szczepionki charakteryzowały się jednak różnym stopniem usuwania cholesterolu z podłoża hodowlanego. W przypadku kultury nr 3 i 4 średnia wartość wiązania cholesterolu wyniosła odpowiednio $22,9\% \pm 3,03\%$ i $29,8\% \pm 5,22\%$, natomiast dla kultur nr 1 i 2 – w żadnym powtórzeniu nie przekroczyła 19%. Także obliczone odchylenia standardowe dla wyników poszczególnych kultur starterowych świadczą o zmiennej zdolności do wiązania cholesterolu.

Na podstawie wyników badań innych autorów także dowodzi się różnic w wartościach wiązania cholesterolu (niejednokrotnie bardzo znaczących) między poszczególnymi kulturami różnych gatunków bakterii fermentacji mlekowej, a często nawet między szczepami w obrębie tego samego gatunku (1,10,16,20-24). Jednak w większości cytowanych badań dotyczy to bakterii termofilnych, a bardzo często również szczepów probiotycznych. Buck i Gilliland (17) przebadali 17 szczepów *Lactobacillus acidophilus* pochodzenia jelitowego i zaobserwowali różnice w wartości wiązania

cholesterolu wynoszące od 20,5 $\mu\text{g} / 1 \text{ cm}^3$ podłoża MRS-THIO z dodatkiem oxgallu do 83,3 $\mu\text{g} / 1 \text{ cm}^3$. Podobne wyniki doświadczeń nad wiązaniem cholesterolu przez *L. acidophilus* uzyskali Walker i Gilliland (8) oraz Rasic i wsp. (16). Analogicznych obserwacji, odnośnie do różnic w wiązaniu pomiędzy szczepami *L. acidophilus*, dokonali Gopal i wsp. (10). W ich badaniach, 6 szczepów *L. acidophilus* wiązało od 15 do 55% cholesterolu z podłoża MRS-THIO z oxgallem. Także Tahri i wsp. (18) zaobserwowali całkowicie różną zdolność do wiązania cholesterolu u dwóch szczepów *Bifidobacterium breve*, dla szczepu *B. breve* ATCC 15700 – 50%, natomiast dla *B. breve* ATCC 15698 jedynie 9%. Również Dambekodi i Gilliland (22) dowiedli znaczących różnic w wiązaniu cholesterolu pomiędzy szczepami *B. longum*.

Hosono i Tono-Oka (9) stwierdzili, że wiązanie cholesterolu do ścian komórkowych bakterii fermentacji mlekowej różniło się znacznie w zależności od gatunku i szczepu oraz zasugerowali, że te różnice w ilości związanego cholesterolu są spowodowane chemicznymi i strukturalnymi właściwościami peptydoglikanu obecnego w ścianach komórkowych tych bakterii. Bakteryjne ściany komórkowe różnią się m.in. składem sacharydów i kwasów tłuszczowych. Spekuluje się, że od tych różnic zależy zdolność np. do adhezji bakterii do nabłonka jelit oraz zdolność do wiązania cholesterolu do ściany komórkowej bakterii. Z tego wynika także inny równie istotny wniosek: ściany komórkowe nawet martwych bakterii fermentacji mlekowej wykazują pewną zdolność do wiązania cholesterolu, co już potwierdzono w badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro*, przy czym ilość cholesterolu usuniętego przez żywe komórki jest znacznie wyższa niż tego, który został przyłączony do martwych komórek (15).

Wyniki wiązania cholesterolu uzyskane w pracy dla mezofilnych paciorkowców mlekowych są zatem potwierdzeniem danych literaturowych dotyczących wiązania cholesterolu przez inne rodzaje, gatunki i szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Prawdopodobnie wiązanie cholesterolu przez bakterie mlekowe może zachodzić podczas prowadzenia fermentacji mlekowej (ukwaszania), dzięki czemu może następować wiązanie części cholesterolu zawartego w produkcie. Już na początku lat 90. ubiegłego stulecia w ośrodkach naukowych krajowych i zagranicznych wykazano, że pewne kultury mezofilnych i termofilnych pałeczek i paciorkowców mlekowych mogą obniżać poziom cholesterolu w mleku. Ponieważ w mleku cholesterol zlokalizowany jest głównie w osłonkach fosfolipidowo-białkowych kuleczek tłuszczowych, należy oczekiwać, że bakterie obniżające poziom cholesterolu wykazują jednocześnie pewne właściwości lipolityczne. Wewnątrzkomórkowe lipazy są często produkowane przez pałeczki fermentacji mlekowej, a ich aktywność jest wyższa niż u paciorkowców mlekowych.

Zdolność do obniżania zawartości cholesterolu przez bakterie mlekowe podczas wyrobu mlecznych napojów fermentowanych, potwierdzono w badaniach przeprowadzonych przez Juskiewicza i Panfil-Kuncewicz (26). Badacze ci analizowali stopień redukcji zawartości cholesterolu przez komercyjne kultury starterowe bakterii termofilnych w mleku o początkowej zawartości tłuszczu 4 i 8%. Były to dwugatun-

kowe kultury starterowe zawierające *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* oraz *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a także kultury jogurtowe zawierające mikroflorę dodatkową: *B. bifidum* i *L. acidophilus*. Autorzy ci stwierdzili, że najwyższą zdolnością do wiązania cholesterolu wykazała się jedna, tradycyjna kultura jogurtowa, dla której wartość usuwania wyniosła 22,2% w produkcie o 4% zawartości tłuszczu oraz 19,8% w jogurcie o zawartości tłuszczu 8%.

Również w tej pracy zaobserwowano zjawisko obniżenia zawartości cholesterolu po fermentacji śmietanki przez mezofilną kulturę starterową, która w warunkach *in vitro* odznaczała się wysoką zdolnością do usuwania cholesterolu z podłoża hodowlanego. W śmietanie przechowywanej przez 14 dni odnotowano ponad 35% obniżenie zawartości cholesterolu, w porównaniu do jego poziomu w śmietance, która stanowiła próbkę kontrolną (tab. 2). Wydaje się, że takie odniesienie do śmietanki przechowywanej w takich samych warunkach, daje możliwość uwzględnienia wszelkich przemian niemikrobiologicznych cholesterolu, zachodzących w produkcie i niezwiązanych z obecnością oraz aktywnością bakterii fermentacji mlekowej, takich jak np. utlenianie cholesterolu (27,28).

Na podstawie wykonanej analizy fizykochemicznej przechowywanej śmietany ujawniono w naszych badaniach zachodzenie w niej przemian zgodnych z oczekiwaniami i danymi literaturowymi, tj. powolne obniżanie wartości pH, wzrost kwasowości miareczkowej oraz wzrost kwasowości tłuszczu (29-31). Wystąpienie tych zmian w śmietanie i ich brak w śmietance potwierdza, że są one konsekwencją procesu fermentacji, obecnością żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej i aktywnością ich enzymów, w tym enzymów lipolitycznych.

Zdaniem Juskiwicz i Panfil-Kuncewicz (26), istnieje zależność pomiędzy zdolnością mikroorganizmów do lipolizy tłuszczu i możliwością obniżania przez nie poziomu cholesterolu. Bakterie wykazujące silne właściwości lipolityczne posiadają dużą zdolność do redukcji poziomu cholesterolu w gotowym produkcie. W piśmiennictwie podaje się, że hydroliza tłuszczu, z jednoczesnym obniżeniem poziomu cholesterolu, jest obserwowana szczególnie w produktach zawierających probiotyczne szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Wiadomo, że kwasy tłuszczowe uwolnione podczas lipolizy zwiększają ogólną kwasowość tłuszczu mlecznego, a wykładnikiem właściwości lipolitycznych może być kwasowość tłuszczu, wyrażana np. w stopniach kwasowości. Kisza i wsp. (32) wykazali możliwość redukcji zawartości cholesterolu w maśle otrzymanym ze śmietany ukwaszonej z użyciem różnych bakterii fermentacji mlekowej i szczepów probiotycznych. Stwierdzili obniżenie zawartości cholesterolu o 9% w maśle otrzymanym ze śmietany ukwaszonej przez *L. acidophilus* 336, podczas gdy inny szczep *L. acidophilus* zredukował zawartość cholesterolu o 1,5%, podobnie jak tradycyjne mezofilne kultury maślarskie (1,7%). Natomiast hodowla mieszana mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej i *L. acidophilus* obniżała poziom cholesterolu średnio o 6,2%. Zależność między redukcją zawartości cholesterolu i rodzajem użytych kultur bakteryjnych wykazali również Kisza i Juskiwicz (32), badając przemiany cholesterolu podczas wyrobu wybranych rodzajów serów, w tym serów dojrzewających i twarogowych.

W licznych badaniach potwierdzono, że niektóre drobnoustroje, które przekształcają cholesterol, posiadają jednocześnie zdolności lipolityczne. Wiele drobnoustrojów wytwarza enzymy rozkładające cholesterol do innych związków, np. reduktazę cholesterolową lub oksydazę cholesterolową (34-38). Pewne jest jednak, że bakterie mlekowe nie potrafią metabolizować cholesterolu, chociaż są prowadzone badania nad wprowadzeniem genów kodujących aktywność takich enzymów do komórek bakterii fermentacji mlekowej (36,38-41).

Można zatem przypuszczać, że związek pomiędzy zdolnością do redukcji poziomu cholesterolu w produktach mlecznych i właściwościami lipolitycznymi bakterii fermentacji mlekowej wynika jedynie z faktu szybkiego uwolnienia cholesterolu z otoczek fosfolipidowo-białkowych przez bakteryjne enzymy lipolityczne. Rozwój bakterii fermentacji mlekowej, jak się wydaje, sprzyja jedynie chemicznym przemianom cholesterolu w produktach spożywczych, co nie ma związku z jego wiązaniem przez komórki bakteryjne. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia w dalszych badaniach.

Na razie nie udało się również wykazać związku pomiędzy wiązaniem cholesterolu przez bakterie mlekowe i stwierdzaną *in vitro* redukcją poziomu cholesterolu w niektórych fermentowanych produktach mleczarskich. Całkowite wyjaśnienie i poznanie tego zjawiska, pozwoli w przyszłości na wykorzystanie zachodzącego mechanizmu do produkcji artykułów żywnościowych o obniżonej zawartości cholesterolu na drodze biologicznej.

5. Podsumowanie

Ważnym spostrzeżeniem w tej pracy jest wykazanie zdolności do wiązania cholesterolu przez kultury starterowe mezofilnych paciorkowców mlekowych, stosowanych w praktyce przemysłowej do produkcji fermentowanych artykułów mleczarskich.

Potwierdzono także, że istnieją pewne różnice w tej zdolności między poszczególnymi kulturami starterowymi mezofilnych paciorkowców mlekowych.

Podobnie, jak w przypadku termofilnych bakterii fermentacji mlekowej, mezofilne paciorkowce mlekowe wykazują stopień wiązania cholesterolu zmienny nawet między powtórzeniami doświadczenia dla tej samej kultury.

Potencjalnie prozdrowotna zdolność mezofilnych kultur bakterii fermentacji mlekowej do wiązania cholesterolu z podłoża hodowlanego, wymaga dalszych badań. Można przypuszczać, że podobne wiązanie cholesterolu zachodzi podczas fermentacji mleka. Wiązanie cholesterolu przez bakterie fermentacji mlekowej, zachodząca w produkcie fermentowanym lub w jelicie cienkim (po spożyciu produktu), może sprzyjać redukcji ilości cholesterolu pokarmowego biodostępnego dla organizmu gospodarza i tym samym wpływać na poziom cholesterolu we krwi (1,9,13). Nie wiadomo jednak, czy to wiązanie cholesterolu do komórek bakteryjnych jest na tyle

trwałe, by przetrwać w warunkach panujących w układzie pokarmowym człowieka, np. przy wysokiej kwasowości lub w obecności enzymów trawiennych.

Literatura

1. Gilliland S. E., Nelson C. R., Maxwell C., (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 377-381.
2. de Rodas B., Gilliland S. E., Maxwell C. V., (1996), *J. Dairy Sci.*, 79, 2121-2128.
3. Anderson J. W., Gilliland S. E., (1999), *J. Am. Coll. Nutr.*, 18, 43-50.
4. St-Onge M. P., Farnworth E. R., Jones P. J. H., (2000), *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 674-681.
5. Hosono A., Otani H., Yasui H., Watanuki M., (2002), *Anim. Sci. J.*, 73, 241-256.
6. Kiebling G., Schneider J., Jahreis G., (2002), *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56, 843-849.
7. Klaver F. A. M., van der Meer R., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1120-1124.
8. Walker D. R., Gilliland S. E., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 956-961.
9. Hosono A., Tono-Oka T., (1995), *Milchwissenschaft*, 50, 556-560.
10. Gopal A., Shah N. P., Rogiński H., (1996), *Milchwissenschaft*, 51, 619-623.
11. Noh D. O., Kim S. H., Gilliland S. E., (1997), *J. Dairy Sci.*, 80, 3107-3113.
12. Usman B., Hosono A., (1999), *Milchwissenschaft*, 54, 495-498.
13. Lin M. Y., Chen T. W., (2000), *J. Food Drug Anal.*, 8, 97-102.
14. Fletouris D. J., Botsoglou N. A., Psomas I. E., Mantis A. I., (1998), *J. Dairy Sci.*, 81, 2833-2840.
15. Kimoto H., Ohmono S., Okamoto T., (2002), *J. Dairy Sci.*, 85, 3182-3188.
16. Rasic J. L., Vujicic I. F., Skringer M., Vulic M., (1992), *Biotechnol. Lett.*, 14, 39-44.
17. Buck L. M., Gilliland S. E., (1994), *J. Dairy Sci.*, 77, 2925-2933.
18. Tahri K., Grill J. P., Schneider F., (1996), *Curr. Microbiol.*, 33, 187-193.
19. Brashears M. M., Gilliland S. E., Buck L. M., (1998), *J. Dairy Sci.*, 81, 2103-2110.
20. Grill J. P., Cayuela C., Antoine J. M., Schneider F., (2000), *Let. Appl. Microbiol.*, 31, 154-156.
21. Taranto M. P., Gonzales de Llano D., Rodriguez A., de Ruiz Holgado P. A., de Valdez F. G., (1996), *Milchwissenschaft*, 51, 383-385.
22. Dambekodi P. C., Gilliland S. E., (1998), *J. Dairy Sci.*, 81, 1818-1824.
23. Gilliland S. E., Walker D. K., (1989), *J. Dairy Sci.*, 73, 905-911.
24. Pereira D. I. A., Gibson G. R., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4689-4693.
25. Usman B., Hosono A., (1999), *J. Dairy Sci.*, 82, 243-248.
26. Juszkiewicz M., Panfil-Kuncewicz H., (2003), *Milchwissenschaft*, 58, 370-373.
27. Maerker G., (1987), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64, 388-392.
28. Smith L. L., (1996), *Lipids*, 31, 453-487.
29. Salji J. P., Ismail A. A., (1983), *J. Food Sci.*, 48, 258-261.
30. Cais-Sokolińska D., Pikul J., (2001), *Chłodnictwo*, 36, 42-45.
31. Żbikowski Z., (1981), *Zeszyty Nauk. ART w Olsztynie. Technol. Żywn.*, 16, 3-7.
32. Kiszka J., Staniewski B., Juśkiewicz M., Rosiński P., (1996), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 5, 46, 19-28.
33. Kiszka J., Juśkiewicz M., (1998), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 7, 48, 251-258.
34. Boudreau A., Arul J., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 1772-1781.
35. Sanders M. E., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 1819-1828.
36. Fujishiro K., Uchida H., Shimokawa K., Nakano M., Sano F., Ohta T., Kayahara N., Aisaka K., Uwajima T., (2002), *FEMS Microbiol. Lett.*, 215, 243-248.
37. Lv C., Tang Y., Wang L., Ji W., Chen Y., Yang S., Wang W., (2002), *Food Chem.*, 77, 457-463.
38. Smith M., Sullivan C., Goodman N., (1991), *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2158-2162.
39. Kiatpapan P., Yamashita M., Kawarachi N., Yasuda T., Murooka Y., (2001), *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 459-465.
40. Somkuti G. A., Solaiman D. K. Y., Johnson T. L., Steinberg D. H., (1991), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 13, 238-245.
41. Somkuti G. A., Solaiman D. K. Y., Steinberg D. H., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 330-334.