

GRAŻYNA CICHOSZ, JERZY SZPENDOWSKI, MAŁGORZATA KOSEK

PRZYDATNOŚĆ TECHNOLOGICZNA ZAKWASÓW MEZOFILNYCH PACIORKOWCÓW MLEKOWYCH W ZALEŻNOŚCI OD WARUNKÓW PROPAGACJI

Streszczenie

Oceniono przydatność technologiczną zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych namnażanych w mleku odtłuszczonym oraz w dwóch różnych podłożach wzrostowych w temp. 24 i 30°C. Badano wpływ rodzaju podłoża oraz temperatury inkubacji na liczebność bakterii fermentacji mlekowej z uwzględnieniem udziału szczepów fermentujących cytryniany.

Przydatność technologiczną zakwasów oceniano dwuetapowo. Porównano zawartość diacetylu i CO₂ w mleku ukwaszonym do pH 5,2, przy zastosowaniu badanych zakwasów. Zakwasy namnażane w temp. 24°C zastosowano w technologii sera gouda. Sery po 4 i 6 tygodniach dojrzewania poddano ocenie sensorycznej.

Zastosowanie podłoży wzrostowych umożliwiło – zwłaszcza przy inkubacji w temp. 24°C – otrzymanie zakwasów o większej liczebności bakterii fermentacji mlekowej oraz większym odsetku szczepów fermentujących cytryniany, a w konsekwencji większej aktywności aromato- i gazotwórczej. Sery wyprodukowane z zastosowaniem zakwasów z badanych podłoży charakteryzowały się korzystniejszym smakiem i zapachem (wyraźnie orzechowy) oraz zdecydowanie lepszym oczkowaniem niż sery wyprodukowane z zakwasem namnażanym w mleku odtłuszczonym.

Słowa kluczowe: zakwasy mezofilne, szczepy fermentujące cytryniany, diacetyl, CO₂, jakość sensoryczna, ser gouda.

Wstęp

W kształtowaniu cech sensorycznych produktów mleczarskich, takich jak: sery podpuszczkowe i twarogowe, masło, śmietana oraz napoje fermentowane szczególną rolę odgrywają kultury *Lactobacillus lactis ssp. lactis var. diacetylactis* i *Leuconostoc sp.*, fermentujące oprócz laktozy również cytryniany z wytworzeniem diacetylu, acetoniny, aldehydu octowego i CO₂ [7, 15]. Podczas propagacji w mleku szczepy fermentu-

jące cytryniany charakteryzują się zróżnicowanymi szybkościami wzrostu i zmienną aktywnością biochemiczną.

Szczepy *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* metabolizują cytryniany do szczawianu i octanu. Powstały szczawian pod wpływem dehydrogenazy szczawianowej ulega przemianie w pirogronian, który po dekarboksylacji tworzy tzw. aktywny aldehyd tj. kompleks aldehyd octowy – TPP. Aktywny aldehyd po reakcji z acetylo-CoA przekształcany jest do diacetylu. Enzymy rozszczepiające cytryniany mogą działać dopiero po obniżeniu pH do wartości 5,5, stąd maksymalna synteza diacetylu i acetoiny ma miejsce podczas fazy logarytmicznego wzrostu bakterii. Dzięki represji syntezy reduktazy diacetylu i acetoiny cytrynianem, wymienione związki karbonylowe kumulowane są w środowisku, osiągając maksymalny poziom bezpośrednio przed wykorzystaniem cytrynianów, po czym następuje szybka redukcja diacetylu, a u większości szczepów także acetoiny [6, 20].

W odróżnieniu od kultur *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* szczepy *Leuconostoc* sp. metabolizują cytryniany z opóźnieniem. W hodowlach prowadzonych w środowisku o wartości pH ok. 7,0 nie kumulują diacetylu i acetoiny, produkują natomiast octan. Po zakwaszeniu środowiska do pH poniżej 5,5 większość szczepów z rodzaju *Leuconostoc* sp. syntetyzuje zarówno diacetyl, jak też acetoinę, przy czym stężenie acetoiny w hodowlach bakterii mlekowych wykorzystujących cytryniany jest zawsze wyższe od poziomu diacetylu. Prawdopodobnie wynika to z uwarunkowań energetycznych tj. ograniczonej zdolności bakterii do syntezy acetylo-CoA, związku uczestniczącego wyłącznie w tworzeniu diacetylu [19, 21].

Maksymalne stężenie diacetylu i acetoiny w hodowlach kultur *Leuconostoc* sp. obserwuje się przy pH 4,3. Jednakże acetoina oraz 2,3-butandiol syntetyzowany zarówno przez szczepy *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*, jak i *Leuconostoc* sp. – nie stanowią komponentów aromatu produktów mleczarskich. Intensywność aromatu, tj. stężenie przede wszystkim diacetylu zależy w pewnym stopniu od dostępu tlenu [3].

W formowaniu cech sensorycznych istotna jest również proporcja diacetylu i aldehydu octowego – optimum występuje przy 4-krotnie wyższym stężeniu diacetylu niż aldehydu octowego. Dzięki redukcji aldehydu octowego do etanolu bakterie z rodzaju *Leuconostoc* skutecznie zapobiegają kumulowaniu aldehydu w produktach mleczarskich [17, 23]. Wzrost zawartości diacetylu w zakwasach można osiągnąć poprzez podwyższenie zawartości s.m. do ok. 12–15% [11]. Zwiększona zawartość s.m. jest równoznaczna z większą koncentracją cytrynianów, stymulujących wzrost i aktywność biochemiczną szczepów syntetyzujących związki aromatu.

Hugenholtz i wsp. [8] dowiedli, że szczepy *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* mogą rosnąć w podłożu z cytrynianem jako jedynym źródłem energii. Maksymalną szybkość wzrostu obserwowano przy pH 6,2 do 5,5 i koncentracji cytrynianów ok. 20 mM – co odpowiada optimum działania permeazy cytrynianowej. Mechanizm genero-

wania energii z cytrynianów przez *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* jest elektrochemiczny, jednak ATP formowany jest powoli i w minimalnych ilościach w odróżnieniu od energii generowanej z laktozy [19].

W badaniach Libudzisz i wsp. [16] udowodniono, że szybkość wzrostu kultur *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* w podłożu APLC i EPLC wynosiła od 0,39 do 0,60·h⁻¹ w hodowlach bez neutralizacji. Większość badanych szczepów wyraźnie reagowała większą dynamiką wzrostu w hodowlach neutralizowanych (0,74 do 0,92·h⁻¹), co świadczy o dużej wrażliwości na końcowy produkt metabolizmu, jakim jest kwas mlekowy.

Porównując szybkość wzrostu w podłożach APLC i EPLC [12] z rezultatami badań Hugenoltza i wsp.[8], w których jedynym źródłem węgla był cytrynian, można stwierdzić, że kultury *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* charakteryzują się wysokim powinowactwem do laktozy. Dowodem tego jest kilkakrotnie wyższa dynamika wzrostu w podłożach zawierających laktozę, w porównaniu z szybkością wzrostu w obecności wyłącznie cytrynianów.

Przedstawione powyżej różnice w składzie produktów fermentacji laktozy i cytrynianów są bardzo często powodem braku stabilności cech biochemicznych zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych. Natomiast zróżnicowane szybkości wzrostu homo- i heterofermentatywnych paciorkowców mlekowych są przyczyną braku stabilności międzyszczepowej zakwasów mleczarskich [2, 7, 16].

Brak stabilności cech biochemicznych mezofilnych paciorkowców mlekowych uwarunkowany jest genetycznie, bowiem poza DNA chromosomalnym, kodującym prawie 90% informacji genetycznej, geny bardzo często zlokalizowane są w DNA plazmidowym [14]. Istotne z technologicznego punktu widzenia cechy genetyczne mezofilnych paciorkowców mlekowych są kodowane w DNA plazmidowym, nie chromosomalnym, stąd często spotykany w praktyce brak stabilności zdolności fermentacji laktozy i galaktozy, aktywności aromatotwórczej i peptydolitycznej, fagoporności oraz zdolności syntezy i oporności na bakteriocyny [14]. Mutacje prowadzące do powstania Lac⁻ i Prt⁻ szczepów mogą mieć miejsce podczas pasażowania kultur w mleku, zwłaszcza przy nieprzestrzeganiu reżimów temperatury. Również w długotrwałych hodowlach ciągłych i półciągłych komórki bakterii są nieuchronnie przedmiotem mutacji [12].

W związku z powyższym za celowe uznano podjęcie badań nad zastosowaniem do propagacji zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych podłoży zawierających niezbędne składniki pokarmowe: jako źródło węgla zarówno laktozę, jak i cytryniany stymulujące wzrost szczepów *L. Lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* i *Leuconostoc* sp., a także sole buforujące, neutralizujące kwas mlekowy [22].

Celem podjętych badań było:

- określenie wpływu dwóch podłoży (różnych producentów) oraz temperatury inku-

- bacji na liczbę bakterii mlekowych oraz odsetek szczepów fermentujących cytryniany,
- porównanie aktywności gazotwórczej (ilości CO₂) otrzymanych zakwasów,
 - porównanie stabilności biochemicznej zakwasów namnażanych w podłożach oraz mleku odtłuszczonym bezpośrednio po inkubacji oraz po 24 h przechowywania w temp. 4°C,
 - ocena przydatności technologicznej zakwasów poprzez porównanie liczby bakterii mlekowych z uwzględnieniem szczepów fermentujących cytryniany, ilości diacetylu i CO₂ w mleku kotłowym ukwaszonym do pH 5,2,
 - porównanie jakości sensorycznej sera gouda wyprodukowanego z zakwasami namnażanymi w podłożach i mleku regenerowanym.

Material i metody badań

W doświadczeniu zastosowano skoncentrowaną, głęboko mrożoną szczepionkę mezofilnych paciorkowców mlekowych (86805) typu BD. Badaną szczepionkę namnażano w dwóch podłożach o różnej zawartości soli buforujących (produkcji Marschall oraz Systems Bio-industrie) oraz w regenerowanym mleku odtłuszczonym. Podłoża regenerowano do zawartości 6% s.m., pasteryzowano w temp. 95°C przez 30 min. Również odtłuszczone mleko regenerowane do zawartości 10% s. m., pasteryzowano jw.

Mleko regenerowane oraz podłoża zaszczipiano inokulum w ilości 0,01%, a następnie inkubowano w temp. 24 i 30°C do osiągnięcia odpowiedniej kwasowości, tj. pH 5,2 – w podłożu A, pH 4,8 – w podłożu B oraz pH 4,6 – w mleku.

Otrzymane zakwasy poddano ocenie pod względem: liczby bakterii mlekowych oraz udziału szczepów fermentujących cytryniany [9]; aktywności aromatotwórczej – oznaczanie zawartości diacetylu metodą Piena [4]; stabilności biochemicznej poprzez porównanie aktywności zakwasów bezpośrednio po inkubacji oraz po 24 h przechowywania w temp. 4°C [2]; przydatności technologicznej w wyrobie serów typu holenderskiego.

W oznaczeniach mikrobiologicznych stosowano podłoże Nickelsa-Leesmenta [9]. Analizy wykonywano w trzech powtórzeniach z 3 rozcieńczeń.

W ocenie stabilności biochemicznej zakwasów zastosowano zmodyfikowaną metodę Ellikera [2]. Do dwóch części mleka pasteryzowanego o temp. 30°C dodawano jedną część badanego zakwasu. Bezpośrednio po zaszczipieniu oraz po 2 h inkubacji w temp. 30°C oznaczano kwasowość. Przyrosty kwasowości przeliczano na 100 cm³ i wyrażano w °SH.

Oceniając przydatność technologiczną zakwasów prowadzono ukwaszanie (w temp. 30°C) mleka pasteryzowanego do uzyskania pH 5,2 (podobnie jak w przypadku

serów typu holenderskiego). Stosowano 1% dodatek zakwasu do mleka.

W ukwaszonym mleku oznaczano: liczbę bakterii mlekowych; liczbę szczepów fermentujących cytryniany (metody jw.); zawartość diacetylu (metodą jw.); zawartość CO₂ z wykorzystaniem rurek dyfuzyjnych (prod. Dragerwerk Aktiengesellschaft).

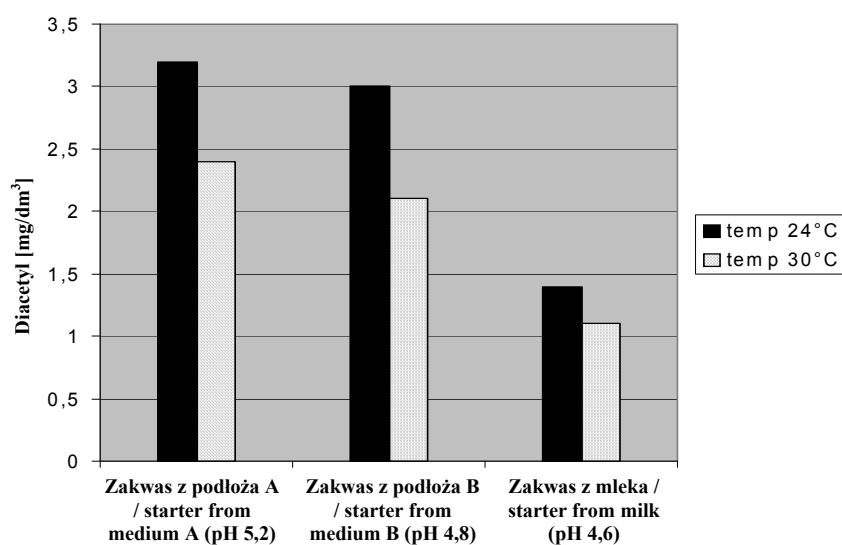
Zakwasy namnażane w temp. 24°C zastosowano w technologii sera gouda. Sery produkowano w warunkach przemysłowych zgodnie z instrukcją technologiczną, stosując 1% dodatek zakwasu. Po 4 i 6 tygodniach dojrzewania sery poddawano ocenie sensorycznej z uwzględnieniem następujących wyróżników jakości: wygląd zewnętrzny, barwa, konsystencja, oczkowanie, smak i zapach. Ocena sensoryczną serów, metodą opisową wg IDF Standard 99C [10], przeprowadził 6-osobowy zespół.

Wyniki i dyskusja

Liczba bakterii fermentacji mlekowej (BFM) w badanych zakwasach zależna była od warunków namnażania. Największą liczbę BFM stwierdzono w zakwasach z podłożu namnażanych w temp. 30°C (tab. 1). Podczas inkubacji w temp. 24°C uzyskiwano zakwasy o mniejszej liczbie BFM, ale większym odsetku szczepów fermentujących cytryniany (39,6% w podłożu A oraz 34,1% w podłożu B), prawdopodobnie dzięki wydłużeniu – średnio o 2–2,5 h – czasu trwania fermentacji. Zdecydowanie najmniejszą liczbę bakterii mlekowych, a jednocześnie najmniejszy odsetek szczepów fermentujących cytryniany stwierdzono w zakwasach namnażanych w mleku. Czynnikiem ograniczającym wzrost BFM był deficyt odpowiednich substratów, a także kwas mlekowy. Podczas wzrostu w mleku, w momencie osiągnięcia pH 4,6 fermentacja mlekowa została zahamowana.

Poprzez związanie wytwarzanego kwasu mlekowego przez sole buforujące możliwe jest utrzymanie pH na odpowiednio wysokim poziomie tj. pH 5,2 w podłożu A oraz pH 4,8 w podłożu B, a tym samym wzrost BFM do liczniejszej populacji. Konsekwencją składu chemicznego podłożu, tj. dodatku cytrynianów i odpowiednich stymulatorów wzrostu była także zdecydowanie większa liczba szczepów fermentujących cytryniany. Odzwierciedleniem zmiennych proporcji między szczepami fermentującymi cytryniany a pozostałymi szczepami była zróżnicowana zawartość diacetylu w badanych zakwasach. Zaobserwowano wyraźną zależność zawartości diacetylu od liczby szczepów fermentujących cytryniany (rys. 1). Największą zawartością diacetylu charakteryzowały się zakwasy namnażane w podłożu A. Najmniejszą z kolei zawartość diacetylu (mniejszą niż 50% średniej ze wszystkich zakwasów z podłożu) stwierdzono w zakwasach namnażanych w mleku. Jednocześnie w zakwasach inkubowanych w temp. 24°C stwierdzono większą ilość diacetylu. Podczas inkubacji w optymalnej temperaturze wzrostu bakterii, tj. 30°C, ma miejsce redukcja diacetylu (optimum temperatury działania reduktazy acetoiny) [13, 16].

Równie istotne, jak w zakwasach, są proporcje między szczepami fermentującymi i niefermentującymi cytryniany w mleku kotłowym z ich dodatkiem. W mleku z dodatkiem zakwasów namnażanych w podłożach stwierdzono większą liczbę bakterii mlekowych ogółem niż w mleku z dodatkiem zakwasów namnażanych w mleku. Zależność ta dotyczyła zarówno zakwasów namnażanych w temp. 24, jak i 30°C (tab. 1). Dodatek zakwasu namnażanego w mleku w temp. 24°C zapewniał w mleku kotłowym liczbę BFM równą $8,2 \cdot 10^8$ jtk/cm³. Stosowanie pozostałych zakwasów zapewniało w mleku kotłowym liczbę bakterii mlekowych rzędu 10^9 jtk/cm³.



Rys. 1. Zawartość diacetylu w zakwasach otrzymanych w podłożach A i B oraz w mleku.

Fig. 1. Content of diacetyl in starters propagated in medium A, B and in milk.

Największy odsetek szczepów fermentujących cytryniany (26,8%) stwierdzono w mleku z dodatkiem zakwasu namnażanego w podłożu B w temp. 24°C. W mleku z dodatkiem zakwasów namnażanych w podłożu A odsetek szczepów fermentujących cytryniany był mniejszy i wynosił odpowiednio: 25 i 22%. Zdecydowanie najmniejszy odsetek szczepów fermentujących cytryniany stwierdzono w mleku z dodatkiem zakwasów, do propagacji których zastosowano mleko regenerowane. Konsekwencją inkubacji mleka po zaszczepieniu zakwasem w temp. 30°C oraz krótszego czasu ukwaszania (tylko do pH 5,2) była mniejsza liczba BFM oraz mniejszy odsetek szczepów fermentujących cytryniany w mleku kotłowym w porównaniu z odpowiednimi zakwasami (tab. 1).

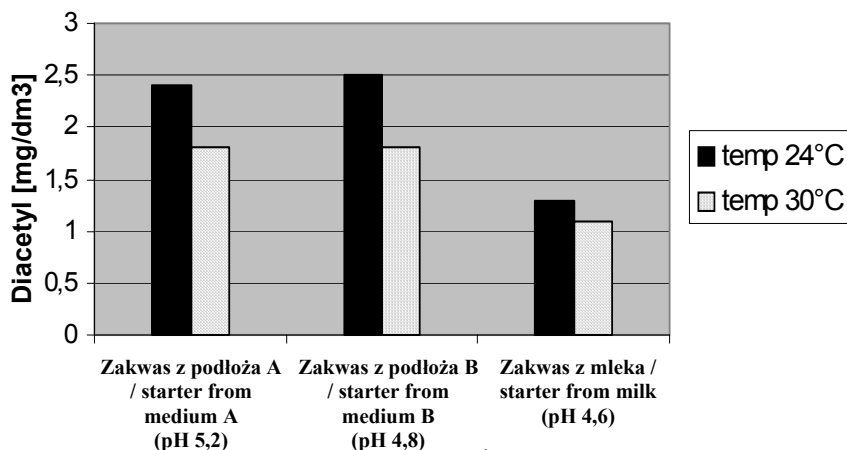
Podobnie, jak w badanych zakwasach (rys. 1), również w mleku kotłowym zaobserwowano wyraźną zależność zawartości diacetylu od liczby szczepów fermentują-

cych cytryniany. Największą zawartość diacetylu w mleku kotłowym zapewniały zakwasy namnażne w podłożu B, nieznacznie mniejszą – w podłożu A, najmniejszą zaś zakwasy namnażane w mleku w temp. 30°C. Stosowanie zakwasów namnażanych w podłożach A i B zapewnia w mleku kotłowym średnio o 60% większą zawartość diacetylu niż stosowanie zakwasów namnażanych w mleku (rys. 2).

T a b e l a 1

Wpływ warunków propagacji na liczbę bakterii fermentacji mlekowej oraz udział szczepów fermentujących cytryniany.
Effect of the propagation conditions on the number of lactic acid bacteria and the percentage of citrate-fermenting strains.

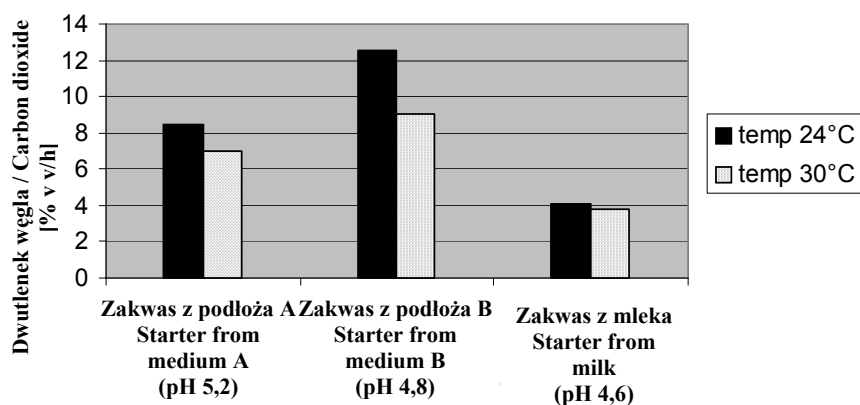
Podłoże – kwasowość zakwasu Medium – acidity of the starters [pH]	Temp. inkubacji Temp. of the incubation [°C]	Liczba bakterii w zakwasach [jtk/cm ³] Number of bacteria in the starter [cfu/cm ³]		Udział bakterii fermentujących cytryniany Per cent rate of the bacteria that ferment citrates [%]	Liczba bakterii w mleku [jtk/cm ³] Number of bacteria in the milk [cfu/cm ³]		Udział bakterii fermentujących cytryniany Share of the bacteria that ferment citrates [%]
		Ogółem Total	Fermentujących cytryniany Fermenting citrates		Ogółem Total	Fermentujących cytryniany Fermenting citrates	
A - 5,2	24	4,4x10 ⁹	1,5 x10 ⁹	34,1	1,4x10 ⁹	3,5 x10 ⁸	25,0
	30	5,6x10 ⁹	1,6 x10 ⁹	28,6	2,0 x10 ⁹	4,4 x10 ⁸	22,0
B - 4,8	24	5,8x10 ⁹	2,3 x10 ⁹	39,6	2,8 x10 ⁹	7,5 x10 ⁸	26,8
	30	6,9x10 ⁹	2,2 x10 ⁹	31,9	3,1 x10 ⁹	7,3 x10 ⁸	23,5
Mleko - 4,6	24	1,4x10 ⁹	2,9 x10 ⁸	20,7	8,2 x10 ⁸	7,7 x10 ⁷	9,4
	30	2,4x10 ⁹	4,1 x10 ⁸	17,1	1,2 x10 ⁹	9,7 x10 ⁷	8,1



Rys. 2. Zawartość diacetylu w mleku ukwaszonym do pH 5,2 – zakwasami pochodzącymi z podłoża A i B oraz z mleka.

Fig. 2. Content of diacetyl in the milk acidified to pH 5,2 using starters from the medium A and B, and from the milk.

W mleku kotłowym ukwaszonym do pH 5,2 przy zastosowaniu ocenianych wcześniej zakwasów oznaczano również zawartość CO₂. Zaobserwowano analogiczne, jak w przypadku diacetylu, zależności, tj. największą ilość CO₂ w mleku z zakwasami z podłoża B (niezależnie od temperatury propagacji zakwasu) i najmniejszą ilość CO₂ w mleku z zakwasami namnażanymi w mleku regenerowanym. (rys. 3).



Rys. 3. Zawartość CO₂ w mleku ukwaszonym do pH 5,2 zakwasami z podłoża A, B i z mleka.

Fig. 3. Content of carbon dioxide in the milk acidified to pH 5,2 using starters from the medium A and B, and from the milk.

Relatywnie wysoka zdolność syntezy diacetylu oraz wysoka aktywność gazotwórcza zakwasów namnażanych w podłożach koreluje z liczbą szczepów fermentujących cytryniany. Wskazuje także na prawdopodobnie wyższy odsetek szczepów *Leuconostoc* sp. w zakwasach z podłoży. W odróżnieniu od szczepów *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* kultury *Leuconostoc* sp. wytwarzają CO₂ w wyniku fermentacji zarówno cytrynianów, jak i laktozy [6, 18, 23].

Tabela 2

Wpływ warunków propagacji na stabilność biochemiczną zakwasów.
Effect of the propagation conditions on biochemical stability of starters.

Podłoże – kwasowość zakwasu Medium – acidity of the starter [pH]	Temperatura inkubacji Temperature of the incubation [°C]	Przyrosty kwasowości mleka z zakwasem Acidity Increments of the milk containing a starter [°SH]	
		Zakwas świeży Fresh starter	Zakwas przechowywany (24 h, temp. 4°C) Stored starter (24 h, temp. 4°C)
A – 5,2	24	10,5	10,5
	30	10,0	10,0
B – 4,8	24	11,0	11,0
	30	10,5	10,5
Mleko – 4,6	24	10,0	7,0
	30	9,5	6,5

Istotną, pod względem technologicznym, cechą zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych jest stabilność podczas (koniecznego niekiedy) przechowywania zakwasów. Badane zakwasy bezpośrednio po inkubacji charakteryzowały się bardzo wysoką aktywnością (10°SH), wyjątkiem był zakwas namnażany w mleku w temp. 30°C (9,0°SH), (tab. 2). Przyrost kwasowości mleka z zakwasem o 10°SH (zmodyfikowana próba Ellikera) wskazuje na bardzo dobrą jakość zakwasu [2]. Również po 24 h inkubacji aktywność zakwasów namnażanych w podłożach była bardzo wysoka i pozostawała na niezmiennym poziomie. Natomiast zakwas namnażany w mleku, mimo natychmiastowego schłodzenia do temp. 4°C (po osiągnięciu pH 4,6), charakteryzowały się znacznie niższą (o ponad 30%) aktywnością kwaszącą po 24 h przechowywania (tab. 2).

Sery wyprodukowane z zastosowaniem zakwasów z podłoży A i B każdorazowo charakteryzowały się korzystniejszym smakiem i zapachem (wyraźnie orzechowym) oraz zdecydowanie lepszym oczkowaniem niż sery wyprodukowane z zakwasem namnażanym w odtłuszczonym mleku regenerowanym. Poza tym, nie stwierdzono różnicowania w zakresie wyglądu, barwy ani konsystencji serów wyprodukowanych z zastosowaniem badanych zakwasów (tab. 3). Degradacja parakazeiny do niskocząsteczkowych peptydów i wolnych aminokwasów w większym stopniu zależna jest od

Tabela 3

Jakość sensoryczna serów gouda w zależności od warunków propagacji zakwasu.
Sensory quality of Gouda chesses depending on the starter propagation conditions.

Zakwas Starter	Czas dojrzewania [tyg] Time of ripening [weeks]	Wygląd zewnętrzny Finish and appearance	Barwa Colour	Struktura / Texture		Smakowitość / Flavour	
				Oczkowanie Eyes	Konsystencja Consistency	Zapach / Aro- ma	Smak / Taste
Podłoże A Medium A	4	kształt prostokątnych blo- ków, gładkie powierzchnie, bez defektów; shaped as rectangular blocks, smooth surface, no defects	naturalna, jednolita; uniform, natural	drobne, nieliczne, równomierne fine, not numerous, equally spread	lekko krucha slightly fragile	czysty, łagodny pure, mild	lekko kwaśny slightly acid
	6			typowe, kształtne $\phi=3$ mm; typical, regular $\phi=3$ mm	elastyczna, spręży- sta, prawidłowa elastic, tender, regular	typowy orze- chowy / typical nutty	czysty słodki pure sweet;
Podłoże B Medium B	4	kształt prostokątnych blo- ków, gładkie powierzchnie, bez defektów; shaped as rectangular blocks, smooth surface, no defects	naturalna, jednolita; uniform, natural	drobne, dosyć liczne, nieregul- larne/ fine, quite numerous, irregular	lekko krucha/ slightly fragile	czysty, łagod- ny/ pure mild	lekko kwaśny slightly acid
	6			typowe, kształtne $\phi = 3$ mm typical, regular $\phi = 3$ mm	elastyczna, spręży- sta, prawidłowa elastic, tender, regular	typowy orze- chowy / typical nutty	czysty słodki; pure sweet
Mleko Milk	4	kształt prostokątnych blo- ków, gładkie powierzchnie, bez defektów; shaped as rectangular blocks, smooth surface, no defects	naturalna, jednolita; uniform, natural	nieliczne, drobne, nieregularne not numerous, fine, irregular	lekko krucha slightly fragile	lekko kwaśny, nieczysty slightly acid, impure	kwaśny, nie- czysty / acid, impure
	6			nieliczne, drobne, nieregularne not numerous, small, irregular	elastyczna, spręży- sta, prawidłowa; elastic, tender, regular	łagodny, lekko przejrzały; mild, slightly overripened	lekko pikant- ny, nieczysty; slightly piqu- ant, impure

liczby nie pochodzących z zakwasu pałeczek mlekowych niż od liczby kultur zakwasu [5]. Jednakże oczkowanie oraz zapach serów typu holenderskiego determinowane są liczbą oraz aktywnością dodawanych z zakwasem szczepów fermentujących cytryniany. Można zatem stwierdzić, że orzechowy zapach oraz liczniejsze, bardziej kształtne oczka w badanych serach wyprodukowanych z zakwasami z podłoży były konsekwencją większego odsetka szczepów fermentujących cytryniany, a tym samym większej aktywności aromato- i gazotwórczej tych zakwasów.

Wnioski

1. Wszystkie badane czynniki (podłoże wzrostowe, temperatura inkubacji, końcowe pH) determinowały aktywność biochemiczną zakwasów.
2. Zastosowanie podłoży umożliwia otrzymywanie zakwasów o większej liczbie bakterii fermentacji mlekowej oraz większym odsetku szczepów fermentujących cytryniany w porównaniu z zakwasami namnażanymi w mleku.
3. Inkubacja zakwasów w temp 24°C zapewnia większy odsetek szczepów fermentujących cytryniany niż inkubacja w temp. 30°C.
4. Zakwasy namnażane w podłożach (w odróżnieniu od zakwasów namnażanych w mleku) charakteryzowały się wysoką i stabilną aktywnością kwaszącą podczas przechowywania.
5. Konsekwencją większej liczby szczepów fermentujących cytryniany była większa zawartość diacetylu w zakwasach z podłoży oraz większa zawartość zarówno diacetylu jak też CO₂ w mleku kotłowym po ukwaszeniu do pH 5,2,
6. Sery gouda wyprodukowane z zakwasami z podłoży charakteryzowały się znacznie lepszą jakością sensoryczną (zdecydowanie lepsze oczkowanie, wyraźny orzechowy zapach) niż sery, w których technologii zastosowano zakwas namnażany w mleku regenerowanym.

Literatura

- [1] Bacterial Nomenclature Up-To-Date. Information Centre for European Culture Collections (ICECC) 1993, Braunschweig.
- [2] Bielecka M., Derejska-Benedict K.: Wzrost i aktywność kultur zakwasów podczas prowadzenia na mleku świeżym. Mat. II Sesji Nauk. Postęp w technologii, technice i organizacji przemysłu mleczarskiego. Olsztyn 1984, s. 228-229.
- [3] Boumerdassi H., Monnet C., Desmazeaud M., Corrieu G.: Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen. J. Dairy Sci., 1997, **80**, 634-639.
- [4] Case R.A., Bradley R.L., Williams R.R.: Chemical and physical methods. In Standards Methods for the Examination of Dairy Products, ed.G.H. Richardson, American Public Health Association, Washington 1985, pp. 327-394.

- [5] Cichosz G., Zalecka A., Lenkiewicz M.: The influence of streptococci and lactobacilli on proteolysis in gouda cheese. *Milchwiss*, 2003, **58** (5/6), 297-300.
- [6] Cogan T., M., Jordan K., N.: Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2704-2709.
- [7] Hugenholtz J.: Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, **12**, 165-178.
- [8] Hugenholtz J., Perdon L., Abee T.: Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59** (12), 4216-4222.
- [9] IDF Standard 149: 1991. Lactic acid starters. Standard of identity.
- [10] IDF Standard 99C: 1997. Sensory evaluation of dairy products by scoring. Preference.
- [11] Kiszka J., Panfil-Kuncewicz H.: Charakterystyka zakwasów mleczarskich na mleku o podwyższonej zawartości suchej masy. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olst., Technologia Alimentorum.*, 1989, **23**, 15-24.
- [12] Kornacki K.: Nowe generacje kultur starterowych w rozwoju technologii żywności. *Biuletyn Informacyjny Biolacta-Textel*, 1997, **4**, 16-18.
- [13] Levata-Jovanovic M., Sandine W., E.: Citrate utilization and diacetyl production by various strain of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 1996, **79**, 1928-1935.
- [14] Libudzisz Z.: Genetyczne determinanty metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej. *Biotechnologia*, 1992, **2**, 66-79.
- [15] Libudzisz Z.: Tworzenie związków aromatu przez bakterie fermentacji mlekowej. W: *Bakterie fermentacji mlekowej*. Wyd. Politechniki Łódzkiej, 1998, s. 110-121.
- [16] Libudzisz Z., Galewska E.: Citrate metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* strains. *Die Nahrung*, 1991, **35** (6), 611-618.
- [17] Liu S.O., Asmundson R.V., Holland R., Crow V.I.: Acetaldehyde metabolism by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* under stress conditions. *Int. Dairy J.*, 1997, 175-183.
- [18] Martley F.G., Crow V.L.: Open texture in cheese: the contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *J. Dairy Res.*, 1996, **63**, 489-507.
- [19] Marty-Teyssat C., Posthuma C., Lolkema J.S., Schmitt P., Divies C., Konings W.N.: Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 2178-2185.
- [20] Monnet C., Schmitt P., Divies C.: Diacetyl production in milk by an a-acetolactic accumulating strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2916-2921.
- [21] Oberman H.: Klasyfikacja bakterii mlekowych. W: *Bakterie fermentacji mlekowej*. Wyd. Politechniki Łódzkiej, 1998, s. 7-25.
- [22] Rybka J., Fetliński A.: Podłoża do przygotowania zakwasów roboczych. *Przegl. Mlecz.*, 1995, **5**, 134-136.
- [23] Vedamuthu E.R.: The dairy *Leuconostoc* : use in dairy products. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2725-2730.

THE TECHNOLOGICAL USEFULNESS OF MESOPHILIC LACTIC STREPTOCOCCI STARTERS DEPENDING ON THE PROPAGATION CONDITIONS

S u m m a r y

The technological usefulness of mesophilic lactic streptococci starters propagated in skimmed milk and in two different growth media at 24 and 30°C was evaluated. The effect of medium type and incuba-

tion temperatures on the number of lactic acid bacteria were studied including the percentage rate of the citrate-fermenting bacteria.

The evaluation of the starters' technological usefulness comprised two phases. There were compared contents of diacetyl and of CO₂ in milk that was acidified to pH 5.2 using experimental starters. Starters that propagated at 24°C were used to produce Gouda cheese. After a 4 and 6 week ripening period, sensory properties of the cheese were evaluated.

Owing to the growth media used, it was possible, especially when the incubation took place at 24°C, to obtain starters with higher numbers of lactic acid bacteria, and a higher percentage of citrate-fermenting bacteria; consequently, the aroma- and gas-forming activity of the starters was higher, too. Cheeses produced with starters, which propagated on the experimental media, had a more advantageous flavour and smell (a clearly nutty smell) and a significantly better eye structure than cheeses produced with a starter propagated on skimmed milk.

Key words: mesophilic starters, citrate-fermenting strains, diacetyl, CO₂, sensory quality, Gouda cheese. ☒