

GRAŻYNA CICHOSZ, JERZY SZPENDOWSKI, ANDRZEJ J. CICHOSZ,
MARIUSZ KORNACKI

DEGRADACJA PARAKAZEINY W SERACH GOUDA WYPRODUKOWANYCH Z DODATKIEM KULTUR *LACTOBACILLUS*

Streszczenie

Dostępne w dojrzewających serach różnorodne substraty umożliwiają wzrost mikroflory wtórnej, głównie pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*. Pałeczki mlekowe, nie pochodzące z zakwasu, przeżywają pasteryzację mleka dzięki ochronnemu działaniu białka i tłuszczu i dosyć szybko się namnażają, zwłaszcza w mleku poddanym kilkukrotnej obróbce termicznej (termizacja, baktofugacja, ultrafiltracja, pasteryzacja).

Przedmiotem badań były sery Gouda z zastosowaniem zakwasów roboczych, namnażanych w podłożu buforowym. W serach doświadczalnych, oprócz kultur starterowych, zastosowano dodatek pałeczek mlekowych (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*). Sery poddawano analizie chemicznej bezpośrednio po soleniu. Podczas dojrzewania badano zmiany kwasowości, a także stopień degradacji parakazeiny.

Degradacja parakazeiny w wyrobach kontrolnych zachodziła pod wpływem podpuszczki, enzymów syntetyzowanych przez kultury starterowe oraz nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe. Natomiast w doświadczalnych serach Gouda, oprócz pałeczek mlekowych nie pochodzących z zakwasu, aktywne były również szczepy *Lactobacillus* dodane do mleka kotłowego.

Stosowanie pałeczek *Lactobacillus* w technologii sera Gouda pozostaje bez wpływu na kwasowość serów bezpośrednio po wytworzeniu, a także podczas dojrzewania. Stwierdzono znaczne zróżnicowanie zawartości wody w badanych serach: 40,6–42,6%. Porównanie dynamiki degradacji parakazeiny w serach kontrolnych i doświadczalnych możliwe było dzięki odniesieniu zawartości poszczególnych form związków azotowych do zawartości N-ogółem. W doświadczalnych serach Gouda, wyprodukowanych z zastosowaniem pałeczek *Lactobacillus*, stwierdzono większe przyrosty zawartości związków azotowych peptydowych, aminokwasowych i rozpuszczalnych (o prawie 2%) niż w wyrobach kontrolnych. Większa – w porównaniu z pozostałymi wyrobami doświadczalnymi – zawartość związków azotowych aminokwasowych i peptydowych w serach z *L. acidophilus* była konsekwencją wyższej – średnio o 1% – zawartości wody.

Słowa kluczowe: ser Gouda, pałeczki *Lactobacillus*, proteoliza, związki azotowe

Wstęp

W dojrzewających serach dostępne są różnorodne substraty umożliwiające wzrost mikroflory wtórnej, głównie pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* [10, 14, 17]. Niektóre szczepy pałeczek mlekowych przeżywają pasteryzację mleka dzięki ochronnemu działaniu białka i tłuszczu, czym tłumaczy się ich obecność w serach dojrzewających. Pałeczki *Lactobacillus* dość szybko namnażają się w mleku przetrzymywanym w temp. ok. 50°C, tj. podczas baktofugacji, ultrafiltracji oraz dogrzewania gęstwy serowej [19].

Obserwowany podczas dojrzewania serów wzrost pH jest konsekwencją tzw. wtórnej fermentacji zachodzącej pod wpływem pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*. W serze Gouda bakterie mlekowe nie pochodzące z zakwasów (NSLAB) mają korzystniejsze warunki wzrostu niż w serze Cheddar, ze względu na płukanie ziarna, a w konsekwencji wyższą zawartość wody i wyższe pH [12, 16]. Z tego powodu hydroliza parakazeiny w serach typu holenderskiego jest dość intensywna mimo krótkiego czasu dojrzewania.

W uwalnianiu niskocząsteczkowych produktów degradacji parakazeiny – istotnych w kompleksie substancji smakowo-zapachowych – decydującą rolę odgrywają enzymy bakteryjne. Proteinyzy kultur zakwasu hydrolizują β -kazeinę, natomiast peptydazy są aktywne dopiero po autolizie komórek. W odróżnieniu od enzymów syntetyzowanych przez kultury starterowe proteinyzy pałeczek mlekowych w różnym stopniu hydrolizują poszczególne frakcje kazeiny [2, 8, 13]. Szczepy pałeczek mlekowych syntetyzują proteinyzy wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe oraz związane ze ścianą komórkową. Poza tym, pałeczki mlekowe syntetyzują peptydazy o odmiennej, w porównaniu z mezofilnymi paciorkowcami, specyficzności substratowej. Oprócz aminopeptydaz, niektóre pałeczki *Lactobacillus* syntetyzują karboksy-, a także di- i tripeptydazy [11].

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu pałeczek *Lactobacillus* na przyrosty zawartości niskocząsteczkowych produktów degradacji parakazeiny podczas dojrzewania sera Gouda.

Materiał i metody badań

Przedmiotem badań były sery Gouda wyprodukowane z zastosowaniem zakwasów roboczych, Probat 505, namnażanych w podłożu buforowym w temp. 24°C do pH 5,2. W serach doświadczalnych, oprócz kultur starterowych, zastosowano dodatek wybranych szczepów pałeczek mlekowych *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* w postaci głęboko mrożonych koncentratów bakterii. Poziomą inokulację mleka kotłowego pałeczkami *Lactobacillus* był dwukrotnie mniejszy niż mezofilnymi paciorkowcami mlekowymi. Wszystkie kultury pochodziły z firmy Danisco Ingredients Poland.

Będące przedmiotem badań sery produkowano w warunkach przemysłowych (SM „Mlepol” w Grajewie, Zakład „Kurpianka” w Kolnie). Zgodnie z zakładową instrukcją technologiczną sery produkowano na linii ciągłej Cassomatic z mleka klasy

I i extra poddanego termizacji, baktofugacji i pasteryzacji, stosowano dodatek CaCl_2 i KNO_3 oraz preparat koagulujący Chymax.

Bezpośrednio po soleniu sery poddawano analizie chemicznej, oznaczając: kwasowość (pH), zawartość wody, zawartość tłuszczu i zawartość NaCl.

W serach po soleniu oraz po 4 i 6 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 znaczne zróżnicowanie zawartości wody w badanych serach: od 40,6 do 42,6% (tab. 1). Najmniejsze zróżnicowanie stwierdzono w serach wyprodukowanych z udziałem *L. casei* (0,1%), największe natomiast w serach z dodatkiem *L. acidophilus* (1,7%). Konsekwencją zróżnicowanej zawartości wody były różnice w zawartości tłuszczu i NaCl. Z kolei, skutkiem zróżnicowanego składu chemicznego były zmiany kwasowości – odmienne w poszczególnych serach. Spadek kwasowości podczas dojrzewania wyrobów kontrolnych był porównywalny.

Tabela 1

Skład chemiczny i kwasowość (pH) serów Gouda podczas dojrzewania.
Chemical composition and acidity (pH) of Gouda cheeses during ripening.

Symbol wyrobu Product code	Skład chemiczny po soleniu Chemical composition after brining			Kwasowość / Acidity (pH)				
	Zawartość wody Water content [%]	Tłuszcz w s.m. Fat in d.m. [%]	NaCl [%]	Po prasowaniu After pressing	Po soleniu After brining	Po 4 tygodniach After 4 weeks	Po 6 tygodniach After 6 weeks	
kontrolne	A	40,90	45,60	1,49	5,22	5,25	5,36	5,49
	B	41,10	46,80	1,40	5,18	5,28	5,40	5,45
	C	40,70	47,10	1,25	5,24	5,36	5,4	5,47
<i>L. casei</i>	D	40,90	47,30	1,17	5,15	5,30	5,42	5,50
	E	40,80	47,90	1,12	5,43	5,43	5,48	5,51
	F	40,80	46,50	1,46	5,51	5,42	5,45	5,58

c.d. Tab. 1

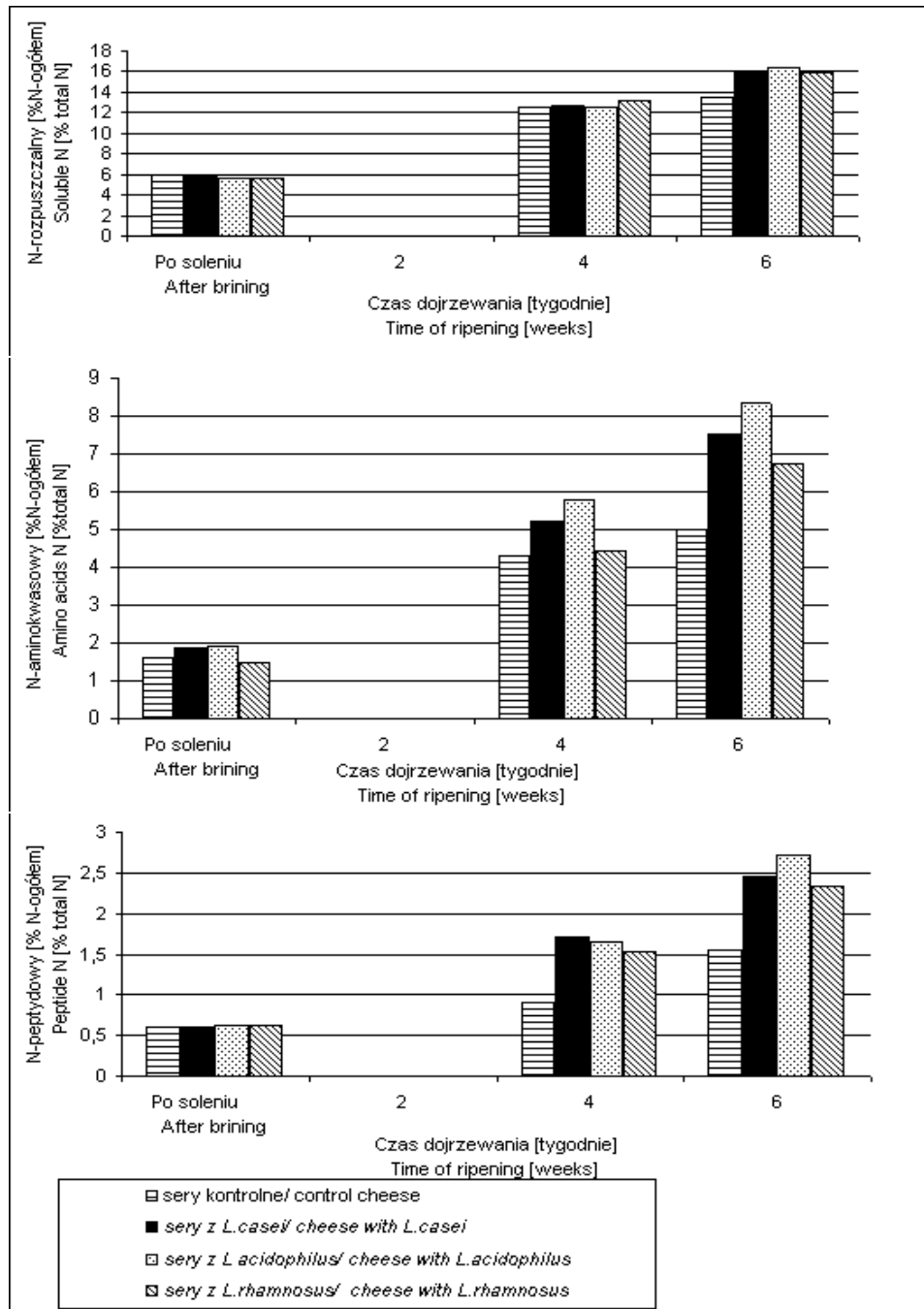
<i>L. acidophilus</i>	G	40,90	47,30	1,17	5,38	5,44	5,49	5,56
-----------------------	---	-------	-------	------	------	------	------	------

	H	42,00	45,70	1,31	5,38	5,42	5,43	5,45
	I	42,60	46,20	1,31	5,43	5,40	5,47	5,49
<i>L. rhamnosus</i>	J	41,40	46,30	1,46	5,44	5,39	5,46	5,52
	K	40,60	47,10	1,37	5,47	5,45	5,49	5,56
	L	40,80	46,40	1,22	5,53	5,33	5,38	5,42

Wyroby doświadczalne wyprodukowane z dodatkiem kultur *L. acidophilus* i *L. rhamnosus* charakteryzowały się podobną kwasowością po soleniu oraz po 6 tygodniach dojrzewania. Natomiast wyroby z udziałem *L. casei*, mimo znacznego zróżnicowania pH po prasowaniu, charakteryzowały się podobną kwasowością zarówno po 4, jak i po 6 tygodniach dojrzewania (tab. 1).

Porównanie dynamiki degradacji parakazeiny w serach kontrolnych i doświadczalnych możliwe było dzięki odniesieniu zawartości poszczególnych form związków azotowych do zawartości N-ogółem.

W serach kontrolnych bezpośrednio po soleniu związki azotowe rozpuszczalne stanowiły największy odsetek N-ogółem – średnio 5,93%. W wyrobach doświadczalnych z udziałem *L. casei*, *L. acidophilus* oraz *L. rhamnosus* N-rozpuszczalny stanowił odpowiednio: 5,74; 5,69 i 5,61% N-ogółem. Średnie przyrosty zawartości N-rozpuszczalnego po 4 tygodniach dojrzewania były najmniejsze w serach kontrolnych (212%), a największe w serach z dodatkiem *L. rhamnosus* (237,3%). Po 6 tygodniach dojrzewania w serach kontrolnych oraz doświadczalnych wyprodukowanych z udziałem *L. casei* i *L. rhamnosus* zawartość N-rozpuszczalnego wynosiła odpowiednio: 13,44; 16,07 oraz 15,84% N-ogółem. Najwyższą zawartość N-rozpuszczalnego: 16,37% N-ogółem stwierdzono w serach z *L. acidophilus* (rys. 1). Również zawartość N-aminokwasowego w odniesieniu do N-ogółem bezpośrednio po soleniu była wyższa w serach z *L. casei* i *L. acidophilus* niż w pozostałych. Po 4 tygodniach dojrzewania największą zawartość N-aminokwasowego stwierdzono w serach z *L. acidophilus* – 5,8% N-ogółem. W pozostałych wyrobach doświadczalnych zawartość N-aminokwasowego była znacznie niższa. Między 4. a 6. tygodniem dojrzewania stwierdzono większe tempo przyrostu zawartości N-aminokwasowego niż podczas pierwszych 4 tygodni. Największą zawartość związków azotowych aminokwasowych stwierdzono w serach wyprodukowanych z dodatkiem *L. acidophilus* (8,35% N-ogółem). W serach kontrolnych N-aminokwasowy stanowił 4,99% a w pozostałych doświadczalnych – 7,52 i 6,72% N-ogółem (rys. 1).



Rys. 1. Degradacja parakazeiny podczas dojrzewania sera Gouda (n = 3).

Fig. 1. Paracasein degradation during gouda cheese ripening (n = 3).

Bezpośrednio po wyrobie zawartość N-peptydowego była porównywalna we wszystkich serach (0,60-0,63% N-ogółem). Podczas dojrzewania stwierdzono jednak zróżnicowane przyrosty tej formy związków azotowych. W wyrobach kontrolnych

zawartość N-peptydowego po 4 tygodniach dojrzewania była najniższa (0,91% N-ogółem). Natomiast w wyrobach doświadczalnych wynosiła od 1,54 do 1,72% N-ogółem. Największe przyrosty zawartości N-peptydowego podczas 4 tygodni dojrzewania stwierdzono w serach z dodatkiem *L. casei* (285%) mniejsze (odpowiednio 260 i 246%) w serach z udziałem *L. acidophilus* i *L. rhamnosus*. Dynamika formowania N-peptydowego między 4. i 6. tygodniem dojrzewania badanych serów była większa niż w początkowym etapie. Między 4. i 6. tygodniem dojrzewania przyrost ilości związków azotowych peptydowych był nieznacznie mniejszy niż podczas pierwszych 4 tygodni dojrzewania. Największą zawartość N-peptydowego (2,72% N-ogółem) stwierdzono w serach wyprodukowanych z *L. acidophilus*. Najmniej N-peptydowego zawierały sery kontrolne (1,55% N-ogółem). Również procentowe przyrosty zawartości N-peptydowego podczas 6 tygodni dojrzewania były największe w serach z udziałem *L. acidophilus* (432,5%), najmniejsze w wyrobach kontrolnych (340%) (rys. 1).

Większa dynamika formowania N-aminokwasowego i N-peptydowego w ostatnim etapie dojrzewania sera Gouda była możliwa dzięki obecności wysokocząsteczkowych peptydów powstałych wskutek aktywności podpuszczki (N-rozpuszczalny) [15]. Analogiczne rezultaty uzyskiwali również inni autorzy, oceniając dynamikę dojrzewania sera Cheddar [7, 18]. Poza tym, w końcowych etapach dojrzewania miała miejsce autoliza zarówno kultur starterowych, jak też zastosowanych w wyrobie sera pałeczek *Lactobacillus*. Większy stopień autolizy stwierdzono w przypadku termofilnych pałeczek *L. acidophilus* niż pałeczek mezofilnych (*L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*) [4]. Jednocześnie z autolizą pałeczek *Lactobacillus* zastosowanych w technologii sera Gouda miał miejsce wzrost nie pochodzących z zakwasu bakterii mlekowych [NSLAB]. W serach wyprodukowanych z dodatkiem *L. acidophilus*, oprócz peptydaz uwolnionych po autolizie kultur zakwasu i pałeczek *Lactobacillus*, aktywne były także szczepy bakterii mlekowych nie pochodzących z zakwasu [NSLAB], co również miało wpływ na intensyfikację proteolizy podczas dojrzewania [4].

Konsekwencją zastosowania w wyrobie sera Gouda pałeczek *Lactobacillus* były zróżnicowane – praktycznie nieporównywalne – cechy sensoryczne sera [3]. Zatem stosując w technologii serów dojrzewających, oprócz kultur starterowych, dodatek wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus* można jednocześnie intensyfikować proteolizę oraz modyfikować cechy sensoryczne, zgodnie z preferencjami konsumentów [1, 5, 6].

Wnioski

1. Stosowanie pałeczek *Lactobacillus* w technologii sera Gouda pozostaje bez wpływu na kwasowość serów bezpośrednio po wyrobie, a także podczas dojrzewania.
2. W doświadczalnych serach Gouda wyprodukowanych z dodatkiem pałeczek *Lactobacillus* stwierdzono większe przyrosty zawartości związków azotowych

- peptydowych, aminokwasowych, a także rozpuszczalnych (o prawie 2%) niż w wyrobach kontrolnych.
3. Większa – w porównaniu z pozostałymi wyrobami doświadczalnymi – zawartość związków azotowych aminokwasowych i peptydowych w serach z udziałem *L. acidophilus* była konsekwencją wyższej zawartości wody – średnio o 1%.

Pracę zrealizowano w ramach grantu KBN 6P06T01321

Literatura

- [1] Beernink G., Northolt M.: Investigation of the proteolytic properties of *Lactobacilli* to obtain new cheese flavour. FEMS Microbiol., 1990, **B 19**.
- [2] Bromme M. C., Hickey M. W.: Proteinase activity of non – starter lactobacilli. Austr. J. Dairy Technol., 1990, **5**, 12-18.
- [3] Cichosz G., Tomera K., Kornacki M., Borejszo Z.: Wpływ kultur probiotycznych na jakość sensoryczną serów typu holenderskiego. Przegl. Mlecz., 2004, **1**, 10-15.
- [4] Cichosz G., Kłębukowska L., Cichosz A. J., Kornacki M.: The effect of *Lactobacillus* addition on proteolysis in Gouda cheese during ripening. Milchwiss. (w druku).
- [5] El Soda M.: The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. FEMS Microbiol. Rev., 1993, **12**, 239-252.
- [6] Exterkate F.A., Altig A. C.: The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acid in Gouda cheese. Int. Dairy J., 1995, **5**, 15-28.
- [7] Fox P.F., Law J., Sweeney P. Z. H., Wallace J.: Biochemistry of cheese ripening. Elsev. Appl. Sci., London, 1993, pp. 389-438.
- [8] Frey J. P., Marth E.H., Johnson E. M., Olson N. F.: Peptidases and proteases of *Lactobacilli* associated with cheese. Milchwiss., 1986, **41**, 622-624.
- [9] Heldrich K.: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Inc, Arlington, Virginia 1990.
- [10] Jordan K.N., T. Cogan M.: Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish cheddar cheese. Irish J. Agric. Food Res., 1993, **32**, 47-55.
- [11] Khalid N.M., Marth E.H.: *Lactobacilli* - Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A review. J.Dairy Sci., 1990, **73**, 2669-2684.
- [12] Lane C.N., Walsh E.M., Folkerstma B., Mc. Sweeney P.L., Fox P.F.: Effect of compositional and environmental factors on the growth of lactobacilli in Cheddar cheese. Bull. IDF, 1996, **317**, 34-43.
- [13] 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.
- [14] Martley F.G., Crow V.L.: Interactions between Non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. Int. Dairy J., 1993, **3**, 461-483.
- [15] Mc Sweeney P.L.H., Olson N.F., Fox P.F.: Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. J. Dairy Sci., 1992, **75 Suppl.**, 121.
- [16] Olson N.F.: The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. FEMS Microbiol.Rev., 1990, **87**, 131-148.
- [17] Peterson S. D., Marshall R. T.: Nonstarter *Lactobacilli* in cheddar cheese a review. J. Dairy Sci., 1990, **73**, 1395-1410.
- [18] Puchades R., Lemieux L., Simard R.E.: Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. J. Food Sci., 1989, **54**, 885-888.
- [19] Van der Berg G., Exterkate F.A.: Technological parameters involved in cheese ripening. Int. Dairy J., 1993, **3**, 458-507.

**PARACASEIN DEGRADATION IN GOUDA CHEESES PRODUCED WITH
LACTOBACILLUS CULTURE**

S u m m a r y

Ready to be utilised various substrates in ripening cheeses make possible growing of secondary microflora, especially lactobacilli strains. Due to protection effect of fat and protein Non-starter lactic acid bacteria survive pasteurisation of milk and start growing up quite quickly, especially in milk heat treated several times (termisation, bactofugation, ultrafiltration, pasteurisation).

The subject of examination was Gouda cheese, that was produced from milk after all the above mentioned heat treatments with use of working leaven multiplied in buffer base. During this experiment besides starter cultures addition of selected lactobacilli (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*) was used for experimental cheese production. Cheeses were exposed to chemical analysis immediately after salting. Changes of acidity and extend of paracasein degradation (soluble N, amino acid N and peptide N) was determined during the cheese ripening.

Paracasein degradation in control cheese took place under the influence of rennet, enzymes synthesised by starter cultures and non-starter lactic acid bacteria. However in the experimental Gouda cheese except non-starter lactic acid bacteria, *Lactobacillus* strains added to cheese milk were also active. Addition of lactobacilli for Gouda cheese production had no influence on cheese acidity immediately after manufacturing and during ripening. Considerable differences in water content (40.6 – 42.6%) were found. Comparison of paracasein degradation dynamics in control and experimental cheese was possible due to referring separate forms of nitrogen compounds content to total N content. Higher increases (about 2%) of peptide N, amino acid N and soluble N compounds content were determined in experimental cheese produced with *Lactobacillus* strains addition than in control ones. Higher, in comparison to the rest experimental cheeses, content of amino acid N and peptide N compounds in cheeses with *L. acidophilus* resulted of the higher (on average of 1%) content of water.

Key words: Gouda cheese, *Lactobacillus*, proteolysis, nitrogen compounds ☒