

MARTA H. MIKŠ-KRAJNIK

## ROLA PACIORKOWCÓW MLEKOWYCH I PAŁECZEK PROPIONOWYCH W PROCESIE DOJRZEWANIA SERA TYPU SZWAJCARSKO-HOLENDERSKIEGO

### Streszczenie

Sery dojrzewające typu szwajcarsko-holenderskiego są serami produkowanymi z zastosowaniem paciorkowców fermentacji mlekowej: *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp. oraz pałeczek propionowych *Propionibacterium* spp. Kultury starterowe oraz środowisko sera dojrzewającego tworzą bardzo złożony, a jednocześnie dynamiczny układ. Procesy biotechnologiczne zachodzące w matrycy sera dojrzewającego w warunkach przemysłowych zależą głównie od stanu fizjologicznego zastosowanych drobnoustrojów. Metabolizm komórek bakterii nadaje kierunek prowadzonym w środowisku przemianom biochemicznym i enzymatycznym, kształtując tym samym pożądane cechy produktu.

**Słowa kluczowe:** *Lactococcus*, *Propionibacterium*, sery dojrzewające typu szwajcarsko-holenderskiego, metabolizm

### Wprowadzenie

Szczepy bakterii z rodzajów *Lactococcus* i *Propionibacterium* są komponentami szczepionek do serów typu szwajcarsko-holenderskiego, popularnych głównie na terenie Polski, oraz norweskiego sera Jarlsberg [24, 28]. Dodatkowym komponentem szczepionek często są również bakterie z rodzaju *Leuconostoc*. Większość publikacji w literaturze światowej traktuje o wzajemnych interakcjach międzyszczepowych w serze dojrzewającym typu szwajcarskiego i dotyczy rodzajów: *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Propionibacterium* [15, 26].

## Charakterystyka bakterii fermentacji mlekowej i propionowej

### **Bakterie fermentacji mlekowej *Lactococcus* spp.**

*Lactococcus* spp. to gramdodatnie paciorkowce nieruchliwe, nieprzetrwalnikujące, względnie beztlenowe, prowadzące homofermentację mlekową, należące do typu *Firmicutes*. Obecnie do rodzaju *Lactococcus* zaliczanych jest pięć gatunków: *L. garvieae*, *L. lactis* (podgatunki *lactis*, *cremoris*, *hordniae*), *L. piscium*, *L. plantarum* i *L. raffinolactis* [30]. Jednak w mleczarstwie zastosowanie znalazły: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*. Naturalnym środowiskiem występowania szczepów *L. lactis* subsp. *lactis* są rośliny zielone, natomiast pochodzenie szczepów *L. lactis* subsp. *cremoris* nie zostało dotychczas potwierdzone [3].

Szczepy *L. lactis* można różnicować biochemicznie na podstawie zdolności do syntezy amoniaku z argininy, zdolności do metabolizowania cytrynianów z wytworzeniem diacetylu oraz oporności na wyższe wartości temperatury i stężenia NaCl. Szczepy *L. lactis* subsp. *lactis* wzrastają w temp. 40 °C oraz przy stężeniu 4 % NaCl, a także hydrolizują argininę, natomiast *L. lactis* subsp. *cremoris* tych cech nie wykazują. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* metabolizuje cytryniany z wytworzeniem diacetylu i innych produktów [23]. Badania z zastosowaniem technik molekularnych: hybrydyzacji DNA-DNA, analizy genów sekwencji małej podjednostki rybosomu (SSU, ang. *small subunit*) rRNA oraz metody fingerprinting PCR dowiodły występowanie dwóch linii genetycznych [23].

### **Bakterie fermentacji propionowej *Propionibacterium* spp.**

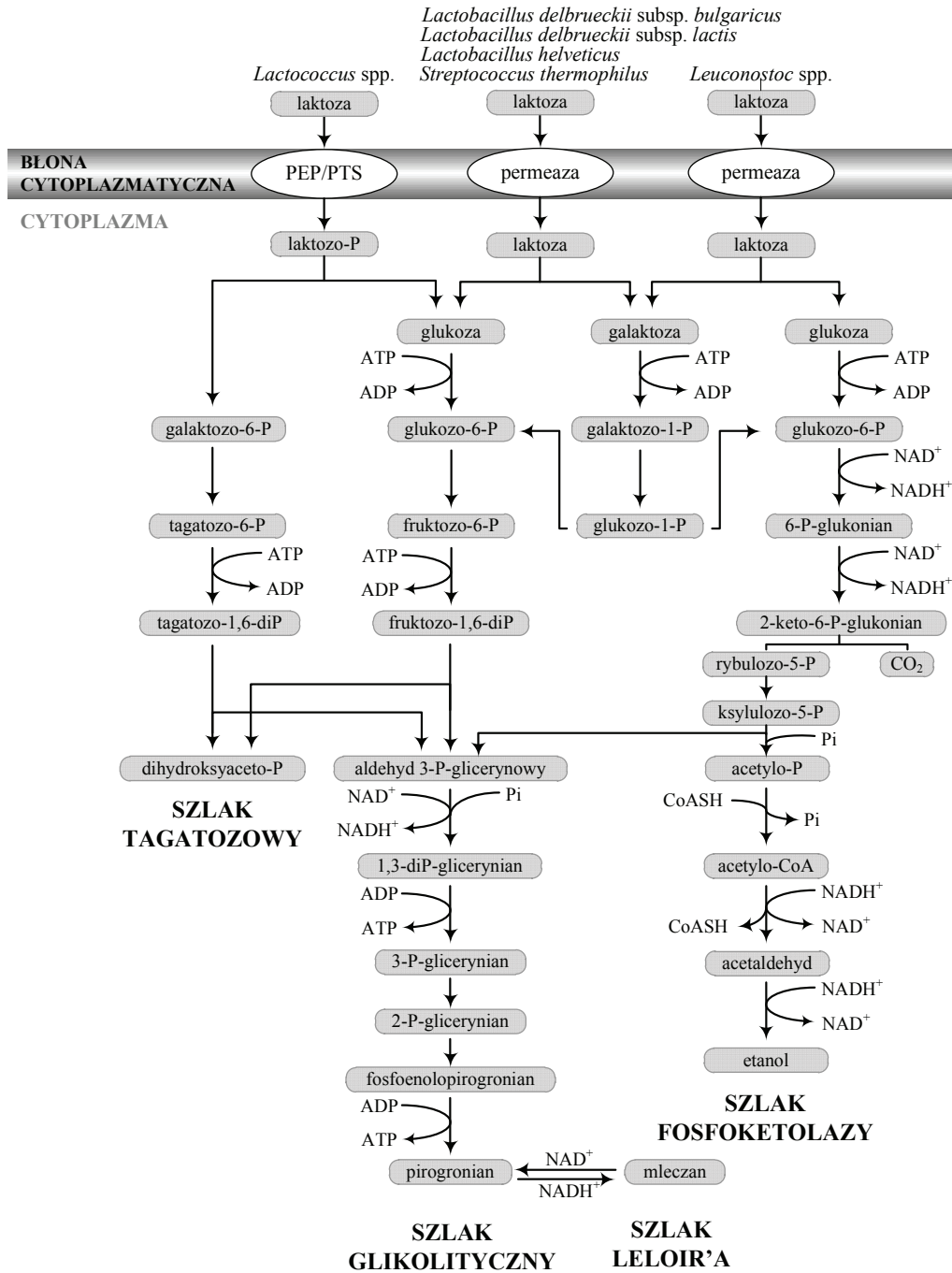
*Propionibacterium* spp. to gramdodatnie pleomorficzne pałeczki, niewykazujące zdolności ruchu, nieprzetrwalnikujące, beztlenowe lub względnie beztlenowe, katalazo-dodatnie, prowadzące fermentację propionową, należące do typu *Actinobacteria*. Rodzaj *Propionibacterium* składa się z przedstawicieli dwóch grup szczepów pochodzących z różnych środowisk. Pierwszą grupę tworzą szczepy zazwyczaj izolowane z ludzkiej skóry i potocznie nazywane jako „skórne” lub „grupa acnes” (*P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum*, *P. propionicum*, *P. acidifaciens*). Drugą grupę stanowią mikroorganizmy izolowane z mleka i produktów mlecznych, określane mianem grupy „klasycznej” lub „mlecznej”. Do grupy klasycznych bakterii propionowych zalicza się cztery gatunki: *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* i *P. thoenii* [21]. Ostatnio opisano również szczepy pochodzące z nowych biotopów: *P. cyclohexanicum*, *P. microaerophilum* i *P. australiense*, wyizolowane odpowiednio z zepsutego soku pomarańczowego [17], ze ścieków pochodzących z młyna do wyrobu oliwy z oliwek [16], z miejscowych zmian ziarninowych u bydła [5]. Analiza sekwencji genów 16S rRNA wykazała filogenetyczne pokrewieństwo szczepów *P. cyclohexanicum*

i *P. australiense* do *P. freudenreichii*, podczas gdy *P. microaerophilum* jest spokrewniony z *P. acidipropionici* [5, 16, 17]. Jednak żaden nowy gatunek nie został dotychczas wyizolowany z produktów mleczarskich.

### **Znaczenie bakterii fermentacji mlekowej i propionowej w procesie dojrzewania sera**

W pierwszych etapach produkcji serów typu szwajcarskiego i szwajcarsko-holenderskiego laktoza ulega przekształceniu w kwas mlekowy z udziałem kultur starterowych odpowiednio: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* i/lub *Lactobacillus bulgaricus* oraz *Lactococcus lactis* i *Leuconostoc mesenteroides* [18, 24]. Po procesie dogrzewania gęstwa serowa jest prasowana, a gotowe bloki sera solone w solance. Sery typu szwajcarskiego i szwajcarsko-holenderskiego w warunkach przemysłowych dojrzewają dwustopniowo, w temp. 10 - 14 °C w tzw. zimnej dojrzewalni (zazwyczaj przez 1 - 2 tygodnie), celem wyrównania stężenia soli w całej objętości bloku; następnie w tzw. ciepłej dojrzewalni w temperaturze 16 - 22 °C (sery szwajcarsko-holenderskie) lub 20 - 24 °C (sery szwajcarskie), do końca okresu dojrzewania (do około 2 miesięcy). W pierwszym etapie dojrzewania komórki bakterii fermentacji mlekowej ulegają stopniowej lizie, uwalniając enzymy wewnątrzkomórkowe, które wpływają na dalszy rozkład związków sera podczas procesu dojrzewania. Natomiast w drugim etapie bakterie fermentacji propionowej wytwarzają kwasy organiczne wpływające na smak sera oraz CO<sub>2</sub> powodujący charakterystyczne oczkowanie. Wzajemne interakcje międzyszczepowe *Propionibacterium* spp. i *Lactobacillus* spp. w serach dojrzewających typu szwajcarskiego mają charakter komensalizmu [3, 15]. Przyrost liczby bakterii *Propionibacterium* spp. w drugim etapie dojrzewania tłumaczony jest wykorzystaniem mleczanów syntetyzowanych przez pałeczki *Lactobacillus* spp. oraz stopniem ich aktywności proteolitycznej [22].

Bakterie gatunku *Lactococcus lactis* prowadzą homofermentację mlekową głównie poprzez szlak glikolityczny (rys. 1) z wytworzeniem produktu głównego kwasu L(+) mlekowego oraz śladowych ilości innych metabolitów lotnych: kwasu octowego, etanolu, CO<sub>2</sub> oraz czasem acetoiny [25]. Paciorkowce *Lactococcus lactis* metabolizują laktozę, której transport przez błonę cytoplazmatyczną odbywa się za pośrednictwem systemu PEP/PTS – fosfoenolopirogronian/fosfotransferaza. Na system PEP/PTS składają się dwie grupy białek. Pierwsza grupa białek związana jest z błoną cytoplazmatyczną komórki bakterii i zawiera: enzym I i niskocząsteczkowe, termostabilne białko HPr. Druga składa się z komponentów specyficznych wobec laktozy: umiejscowionego w cytoplazmie LacE i rozpuszczalnego w wodzie nośnika fosforu LacF. Nośniki umiejscowione w błonie cytoplazmatycznej łączą się z laktozą, przenoszą ją przez błonę, a następnie katalizują przeniesienie na nią grup fosforanowych z HPr. Równoległe grupa fosforanowa jest przekazywana przez enzym I do białka HPr.

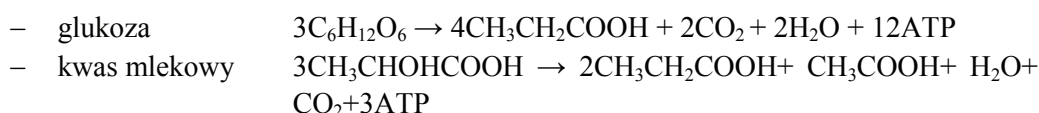


Rys. 1. Szlaki metaboliczne fermentacji mlekowej; za zgodą © John Wiley and Sons [25].

Fig. 1. Metabolic pathways of lactic acid fermentation; with permission of © John Wiley and Sons [25].

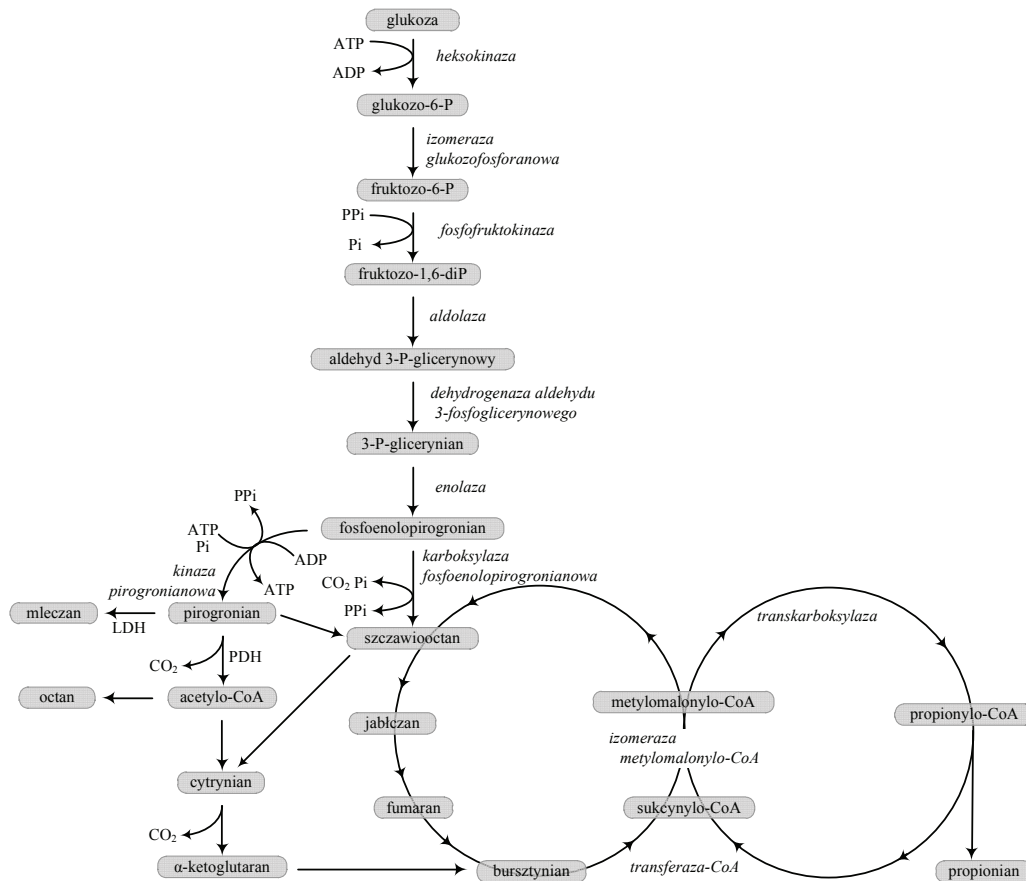
Szczepy podgatunku *lactis* (var. *diacetylactis*) mają dodatkowo plazmid *citP* kodujący enzym – permeazę cytrynianową P, odpowiedzialny za transport cytrynianów do wnętrza komórki [11]. W wyniku katabolizmu cytrynianów powstają diacetyl, acetoina, CO<sub>2</sub>. Bakterie *Lactococcus lactis* mają zdolność degradacji kazeiny dzięki, zakotwiczonej w błonie cytoplazmatycznej, proteinazie serynowej (PrtP) [6]. Powstałe w wyniku hydrolizy peptydy są następnie transportowane za pośrednictwem systemu transportu oligopeptydów (Opp). Obecność opisanych systemów i enzymów w komórce bakterii z rodzaju *Lactococcus* jest kluczowe dla ich wzrostu w mleku i serach dojrzewających [13].

Aktywność i rozwój bakterii fermentacji mlekowej obniża potencjał oksydoredukcyjny środowiska rozwojowego, stwarzając odpowiednie warunki rozwoju bakterii propionowych. Obniżony potencjał oksydoredukcyjny w serze zwiększa aktywność metaboliczną *Propionibacterium* spp., a w szczególności wpływa na udział syntetyzowanych przez nie kwasów octowego (C<sub>2</sub>) i propionowego (C<sub>3</sub>) [14]. Przebieg fermentacji propionowej można zapisać ogólnymi równaniami chemicznymi w zależności od substratu:



Teoretycznie *Propionibacterium* spp. syntetyzują z 1,5 mola glukozy lub 3 moli kwasu mlekowego: 2 mole kwasu propionowego (C<sub>3</sub>), 1 mol kwasu octowego (C<sub>2</sub>) i 1 mol CO<sub>2</sub>. Wyższy zysk energetyczny *Propionibacterium* spp. uzyskują w wyniku fermentacji cukrów prostych niż kwasu mlekowego. W komórce heksozy zostają włączone w szlak Embdena – Meyerhorfa – Parnasa (EMP) (rys. 2). Papoutsakis i Meyer [20] zasugerowali również możliwość przemian glukozy w szlaku heksozomonofosforanowym (HMP). W obydwu szlakach dochodzi do przekształcenia glukozy do pirogronianu, jednak w warunkach beztlenowych dominuje szlak EMP [22]. Wszystkie bakterie z rodzaju *Propionibacterium*, z wyjątkiem *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, charakteryzuje zdolność do hydrolizy laktozy determinowana obecnością enzymu β-D-galaktozydazy [22]. Jednakże u bakterii propionowych nie stwierdzono aktywności enzymu odpowiedzialnego za transport laktozy do wnętrza komórki – fosfo-β-D-galaktozydazy powiązanej z systemem fosfotransferazy (PTS) i aktywowanej przez fosfoenolopirogronian (PEP) – PEP/PTS. Cząsteczki laktozy są transportowane z udziałem permeazy laktozowej, a następnie włączane w przemiany metaboliczne komórki [22]. Jednakże stwierdzono, że bakterie *Propionibacterium freudenreichii*, w obecności sacharydów i mleczanów w pożywce, preferencyjnie metabolizują kwas mlekowy jako substrat fermentacji propionowej. Przyczyny tego zjawiska upatruje się w krótszym szlaku metabolicznym pozwalającym na przyswojenie kwasu mlekowego, dzięki aktywności enzymu – dehydrogenazy mleczanowej (LDH) [22]. Bakterie pro-

propionowe odgrywają kluczową rolę w procesie oczkowania i kształtowania cech smarkowo-zapachowych sera poprzez konwersję kwasu mlekowego do kwasów propionowego, octowego i CO<sub>2</sub> w przemianach zwanych fermentacją propionową.



Rys. 2. Szlaki metaboliczne fermentacji propionowej, cykl Wooda-Werkmana (LDH – dehydrogenaza mlekczanowa, ang. *lactate dehydrogenase*, PDH – dehydrogenaza pirogonianowa, ang. *pyruvate dehydrogenase*); za zgodą © EDP Sciences [22].

Fig. 2. Metabolic pathways of propionic acid fermentation, Wood-Werkman cycle (LDH – lactate dehydrogenase, PDH – pyruvate dehydrogenase); with permission of © EDP Sciences [22].

Aktywność metaboliczna bakterii z rodzajów *Lactococcus* i *Propionibacterium* w serze dojrzewającym typu szwajcarsko-holenderskiego nie ogranicza się jedynie do procesów fermentacyjnych. Ich wpływ na powstawanie związków o charakterze smarkowo-zapachowym w serach jest bardziej złożony. Ponadto, ostatnie badania dowodzą, że komórki bakterii z rodzajów *Lactococcus* i *Propionibacterium* niewykazujących

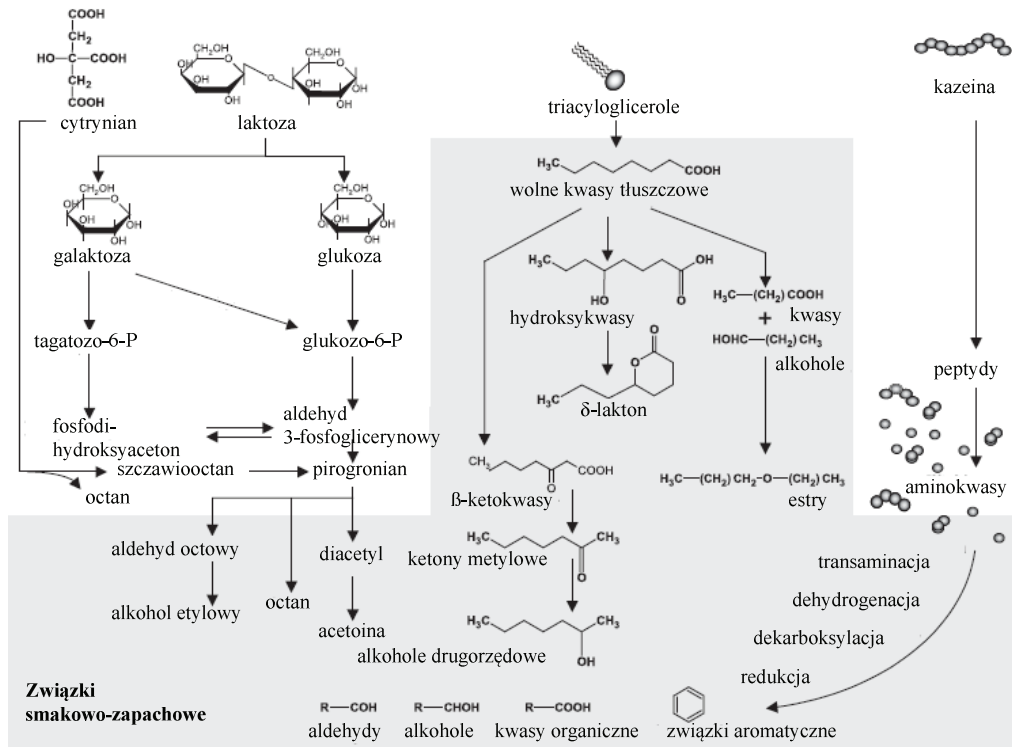
zdolności do wzrostu na podłożach syntetycznych, tzw. bakterie w stanie VBNC, (ang. *viable but not culturable*), przekierowują metabolizm na kataboliczne przemiany aminokwasów [8, 14].

### Lipoliza

Tłuszcz mleczny jest istotnym prekursorem w reakcjach prowadzących do powstania związków o charakterze smakowo-zapachowym (rys. 3). Z drugiej strony intensywna lipoliza jest wysoce niepożądana ze względu na możliwości powstania wad sensorycznych serów [7]. W serze dojrzewającym 98 % lipidów stanowią triacyloglicerole, które mogą być przekształcone na drodze oksydacji lub hydrolizy. Ze względu na niski potencjał oksydo-redukcyjny sera (-250 mV) oraz obecność naturalnych antyoksydantów (np. witaminy E) reakcja oksydacji ma mniejsze znaczenie [7]. Natomiast enzymatyczna hydroliza wiązań estrowych triacylogliceroli prowadząca do powstania glicerolu, mono- i diacylogliceroli oraz wolnych kwasów tłuszczowych ma istotne znaczenie w rozwoju cech smakowo-zapachowych sera [7, 18]. Wolne kwasy tłuszczowe są prekursorami wielu istotnych związków wpływających na smakowitość serów m.in. ketonów, laktonów, estrów, alkanów i alkoholi drugorzędowych. Z wolnych kwasów tłuszczowych w wyniku reakcji  $\beta$ -oksydacji i dekarboksylacji powstają ketony metylowe i drugorzędowe alkohole, natomiast w drodze estryfikacji hydroksykwasów – laktony (rys. 3). Kwasy tłuszczowe reagują również z alkoholami z wytworzeniem estrów, takich jak: maślan etylu, kapronian etylu, octan etylu, kapronian metylu [19]. W procesach tych udział biorą esterazy bakteryjne *Lactococcus* spp. [12] i *Propionibacterium* spp. [8].

W serach dojrzewających, potencjalnymi czynnikami o charakterze lipolitycznym są: podpuszczka, kultury starterowe, rodzime enzymy mleka oraz termostabilne lipazy bakterii psychrotrofowych. Podpuszczka pochodzenia zwierzęcego zawiera aktywne esterazy, specyficzne względem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych zestryfikowanych w pozycji *sn*-1 w triacyloglicerolach mleka. W mleku surowym występuje rodzima lipaza lipoproteinowa (LPL), która hydrolizuje wiązania estrowe, uwalniając średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe ( $C_6$ - $C_{12}$ ) z pozycji *sn*-1 i *sn*-3 triacylogliceroli [19].

Bakterie fermentacji mlekowej charakteryzuje bogaty wewnątrzkomórkowy system enzymów hydrolitycznych: lipaz i esteraz, które uwalniane są do matrycy sera po lizie komórek bakterii [28]. Optimum aktywności tych enzymów, w kierunku substratów zawierających krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, przypada przy pH 7,0 - 8,5 i temp. około 35 °C [7]. *Propionibacterium freudenreichii* charakteryzuje wyższa aktywność lipolityczna niż bakterie fermentacji mlekowej. Bakterie *Propionibacterium* spp. zawierają lipazy wewnątrzkomórkowe o optimum aktywności przy pH 7,2 i temp. 47 °C, specyficzne w stosunku do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [8, 19].



Rys. 3. Uproszczony schemat szlaków biochemicznych prowadzących do powstania związków o charakterze smakowo-zapachowym w serze dojrzewającym (związki o charakterze smakowo-zapachowym przedstawiono na szarym tle); za zgodą © Elsevier [18].

Fig. 3. Simplified scheme of biochemical pathways leading to the formation of flavour compounds of ripened cheese (the grey surface indicates compounds with a flavour note); with permission of © Elsevier [18].

### Proteoliza i katabolizm aminokwasów

Największe znaczenie w kształtowaniu cech sensorycznych i reologicznych serów dojrzewających ma rozkład kazeiny, włączając frakcje  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazeiny, ze stopniowym uwalnianiem peptydów i aminokwasów. Podczas dojrzewania głównymi czynnikami katalizującymi proteolizę białek sera są proteiny i peptydazy różnego pochodzenia. Enzymy koagulujące dodawane w czasie produkcji np. podpuszczka, chymozyna (rennina, E.C. 3.4.23.4) oraz rodzime proteiny mleka np. plazmina (E.C. 3.4.21.7) wstępnie hydrolizują cząsteczki kazeiny. Jednak za główne źródło peptydaz w serach uważane są zewnątrzkomórkowo wydzielane enzymy zakotwiczone w błonach komórkowych kultur starterowych – proteiny CEP (ang. *cell envelope proteinase*, lactocepin, E.C. 3.4.21.96), które biorą udział w hydrolizie oligopeptydów do di-

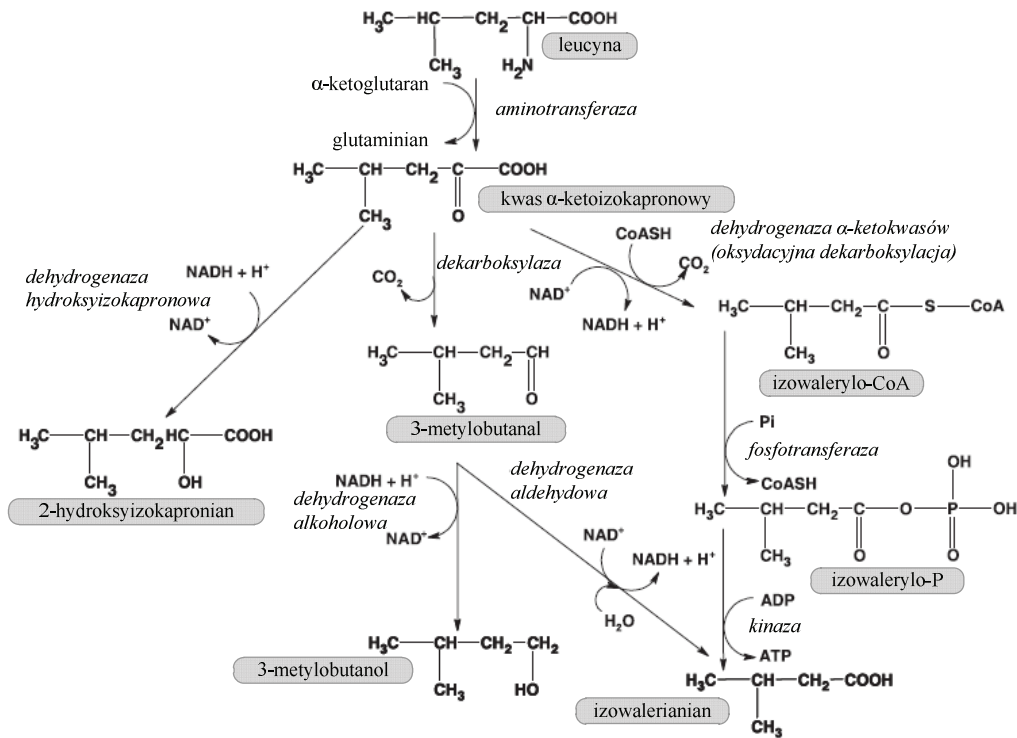


lub tripeptydów i wolnych aminokwasów. Najlepiej poznaną proteinazą CEP jest proteinaza serynowa PrtP *L. lactis* [6]. Za pośrednictwem systemu transportu aminokwasów, di- i tri-peptydów oraz oligopeptydów (Opp), peptydy niskocząsteczkowe oraz oligopeptydy (o długości od 4 do 18 aminokwasów) wnikają do wnętrza komórek bakterii. W cytoplazmie komórek peptydy rozkładane są do aminokwasów z udziałem wewnątrzkomórkowych peptydaz: endopeptydaz (PepO, PepF), aminopeptydaz (PepN, PepC, PepA, PCP), peptydaz prolinowych (PepX, PepI, PepR, PepQ, PepP), dipeptydaz (PepV, PepD, PepDA) i tripeptydaz (PepT). Aminokwasy mogą następnie ulegać reakcjom transaminacji, dehydrogenacji, redukcji i dekarboksylacji (rys. 3) z wytworzeniem: kwasów tłuszczowych, alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów, laktonów i innych związków.

Katabolizm rozgałęzionych aminokwasów zostaje zainicjowany w obecności enzymu aminotransferazy z wytworzeniem kwasów:  $\alpha$ -ketoizokapronowego,  $\alpha$ -keto- $\beta$ -metylowalerianowego i  $\alpha$ -ketoizowalerianowego, odpowiednio z leucyny, izoleucyny i waliny [18]. Dotychczas scharakteryzowano jedynie kilka aminotransferaz obecnych w komórkach bakterii z rodzaju *Lactococcus*. Szczep *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 wytwarzał aminotransferazę działającą na leucynę, izoleucynę, walinę, metioninę [29], natomiast szczepy *L. lactis* LM0230 oraz *L. lactis* subsp. *cremoris* B78 wytwarzały aminotransferazy katalizujące reakcję transaminacji leucyny, izoleucyny, waliny, metioniny oraz fenyloalaniny [10]. Trzecia aminotransferaza działająca jedynie na leucynę została wykryta w komórkach *L. lactis*. Enzym ten różnił się specyficznością od pozostałych aminotransferaz i był aktywny w stosunku do tryptofanu, tyrozyny, fenyloalaniny i metioniny [1]. Często nazywany jest on aminotransferazą aminokwasów aromatycznych. Aktywność aminotransferaz wykryto również wśród szczepów *Propionibacterium* spp. [27]. *P. freudenreichii* uczestniczy w syntezie rozgałęzionych związków w wyniku katabolizmu izoleucyny (2-metylobutanal, 2-metylobutanol i kwas 2-metylomasłowy) oraz katabolizmu leucyny (kwas 3-metylomasłowy) [26].

Szlaki biochemiczne odpowiedzialne za konwersję rozgałęzionych  $\alpha$ -ketokwasów przez bakterie fermentacji mlekowej zostały częściowo wyjaśnione (rys. 3). Składają się na nie trzy reakcje biochemiczne: oksydacyjna dekarboksylacja do kwasów karboksylowych, dekarboksylacja do aldehydów i redukcja do hydroksykwasów (rys. 4). Wszystkie powstające w tych szlakach związki, z wyjątkiem kwasów hydroksylowych, mają charakter zapachowy. Oksydacyjna dekarboksylacja rozgałęzionych aminokwasów rzadko występuje wśród bakterii fermentacji mlekowej i propionowej, jednak została opisana w odniesieniu do wybranych szczepów z rodzaju *Lactococcus* [1, 29] i *Propionibacterium* [27]. Niespotykana u *Lactococcus* jest również reakcja dekarboksylacji rozgałęzionych aminokwasów do aldehydów, ale zaobserwowano ten szlak u szczepów dzikich [2]. Powstające aldehydy mogą być następnie zredukowane do al-

koholi przez dehydrogenazę alkoholową lub utleniane do kwasów karboksylowych przez dehydrogenazę aldehydową (rys. 4).



Rys. 4. Katabolizm rozgałęzionych aminokwasów na przykładzie leucyny; za zgodą © Elsevier [18].

Fig. 4. Catabolism of branched-chain amino acids with leucine as an example; with permission of © Elsevier [18].

Fizjologiczne znaczenie degradacji rozgałęzionych aminokwasów u bakterii nie zostało do końca wyjaśnione. Prawdopodobnie szlak ten jest włączony w katabolizm ze względu na wytwarzanie energii komórkowej i utrzymywanie odpowiedniego stosunku  $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ . Według nowszych doniesień [8, 14], bakterie z rodzajów *Lactococcus* i *Propionibacterium*, będące w stanie VBNC, wywołanym głodem węglowodanowym, charakteryzuje występowanie innych szlaków katabolizmu leucyny niż hodowli w fazie logarytmicznej. Jako produkty końcowe rozkładu rozgałęzionych aminokwasów, w miejsce krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, powstają rozgałęzione kwasy tłuszczowe (głównie kwas 2-metylomasłowy).

Kwasy tłuszczowe powstające z rozgałęzionych aminokwasów (izowalerianowy, 2-metylomasłowy i izomasłowy) odpowiadają za przypominającą zepsute owoce słodką, zjełczałą, gnilną nutę zapachową [18, 27]. Wspomniane związki, w zależności od ich stężenia, mogą mieć niekorzystny wpływ na ogólny aromat sera dojrzewającego.

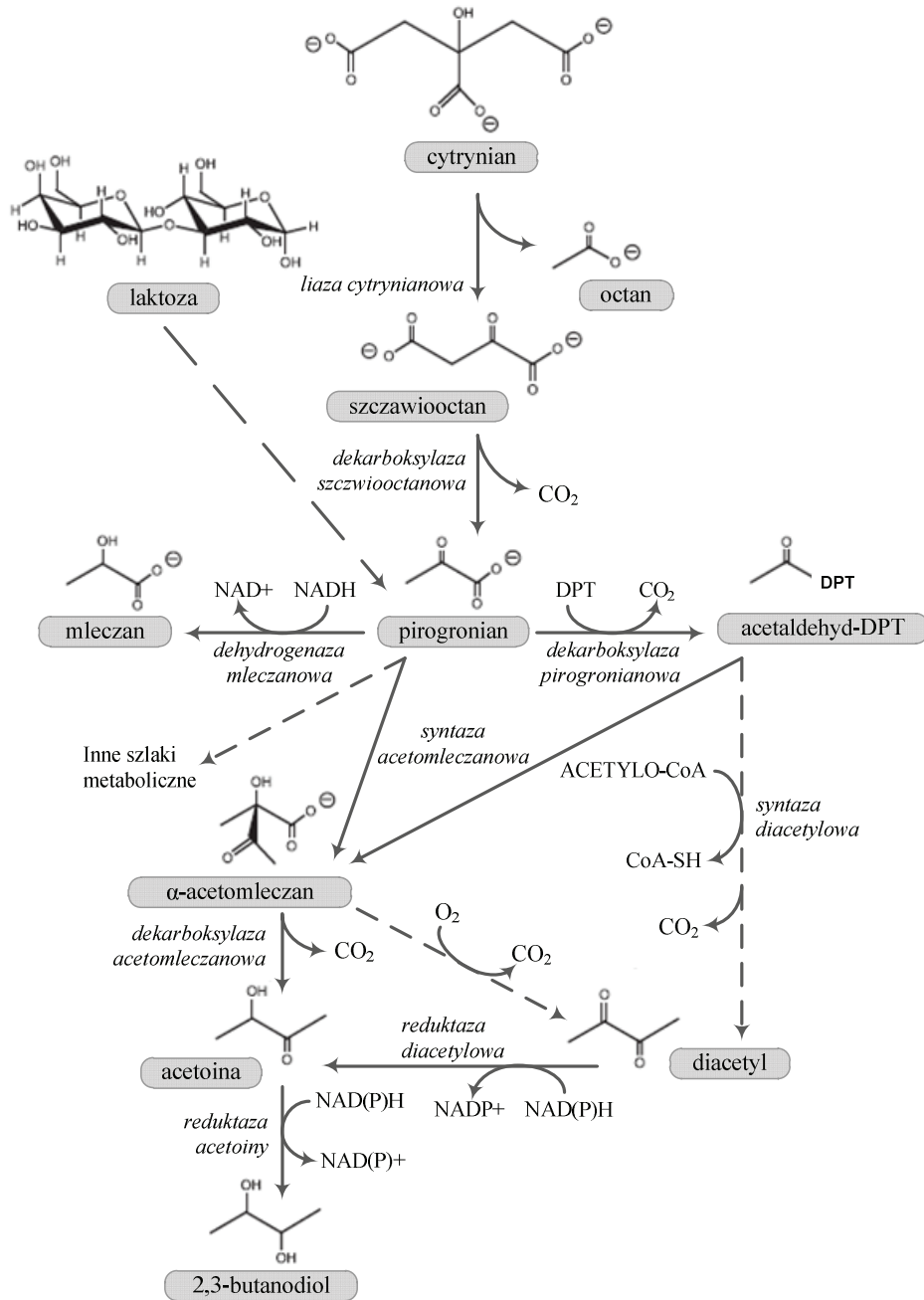
### Metabolizm cytrynianów

Mleko przeznaczone do produkcji sera zawiera ~1750 mg/l cytrynianów rozpuszczalnych w wodzie, z których większość jest tracona w procesie odcieku serwatki. Ich zawartość w gęstwie serowej (0,2 - 0,5 %) jest trzykrotnie większa niż w serwatce, prawdopodobnie dzięki koncentracji cytrynianów w formie koloidalnej [19]. Cytryniany są istotnym prekursorem wielu lotnych związków powstających w wyniku aktywności mezofilnych kultur starterowych (rys. 5).

Cytryniany są metabolizowane przez cytryniano-dodatnie ( $\text{Cit}^+$ ) szczepy paciorkowców fermentacji mlekowej, takie jak: *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, które mają zdolność transportu cytrynianów kodowaną plazmidowo, oraz *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* i *Leuconostoc lactis* [13]. Najnowsze badania sugerują, że zdolność niektórych szczepów *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* do metabolizowania cytrynianów wynika z przeniesienia plazmidów ze szczepów *Leuconostoc* spp. w czasie horyzontalnego transferu genów [9]. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* oraz *Leuconostoc* spp. prowadzą konwersję cytrynianu do szczawiooctanu i octanu pod wpływem enzymu liazy cytrynianowej (rys. 5), a następnie szczawiooctan ulega dekarboksylacji do pirogronianu, który jest kluczowym produktem pośrednim. Końcowymi produktami katabolizmu cytrynianów są diacetyl, acetoina i  $\text{CO}_2$ . Intensyfikację syntezy tych związków obserwuje się w hodowlach mieszanych bakterii fermentacji mlekowej oraz propionowej [24, 26].

Diacetyl (2,3-butanodion) i acetoina (3-hydrokso-2-butanon) to główne związki lotne w wielu fermentowanych produktach mleczarskich, włączając sery dojrzewające. Diacetyl charakteryzuje kremowy, maślany aromat, natomiast acetoina to związek bezwonny, łatwo utleniający się do diacetylu [13]. Obydwa związki są syntetyzowane przez bakterie z gatunków *Lactococcus* i *Leuconostoc* z pirogronianu. Acetoina powstaje bezpośrednio z pirogronianu przy udziale enzymu dekarboksylazy acetomleczanowej z wytworzeniem  $\alpha$ -acetomleczanu jako prekursora (rys. 5).

Natomiast tworzenie diacetylu przez bakterie fermentacji mlekowej ( $\text{Cit}^+$ ) następuje prawdopodobnie w dwóch szlakach metabolicznych. Synteza bezpośrednia, która zakłada, że diacetyl powstaje w wyniku dekarboksylacji pirogronianu z wytworzeniem kompleksu acetaldehyd-DPT (difosfotiamina) tzw. aktywnego acetaldehydu, a następnie reakcji tego kompleksu z acetylokoenzymem-A (acetylo-CoA). Drugi szlak syntezy diacetylu polega na oksydacyjnej dekarboksylacji  $\alpha$ -acetomleczanu [4, 13]. Syntaza acetomleczanowa, zaangażowana w pierwszym etapie biosyntezy (rys. 5) w reakcji konwersji pirogronianu do  $\alpha$ -acetomleczanu, wykazuje niskie powinowactwo w stosunku do pirogronianu ( $K_m = 50$  mmol/l), w porównaniu z dehydrogenazą mleczanową (LDH,  $K_m = 1$  mmol/l) i dehydrogenazą pirogronianową (PDH,  $K_m = 1$  mmol/l). Stąd syntaza acetomleczanowa jest najbardziej aktywna w warunkach akumulacji pirogronianu, obniżonej aktywności LDH i PDH lub zredukowanym zasobie NADH [4].



Rys. 5. Szlaki metaboliczne cytryniano-dodatnich ( $\text{Cit}^+$ ) szczepów paciorkowców fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactococcus* i *Leuconostoc*; za zgodą © John Wiley and Sons [19].

Fig. 5. Metabolic pathways of citrate positive ( $\text{Cit}^+$ ) strains of lactic acid bacteria of *Lactococcus* and *Leuconostoc* genera; with permission of © John Wiley and Sons [19].

W produktach mleczarskich poziom diacetylu systematycznie zmniejsza się w związku z nieodwracalną redukcją do acetoiny, związaną z aktywnością reduktazy diacetylu. Acetoina jest następnie odwracalnie redukowana do 2,3-butanediolu pod wpływem tego samego enzymu (rys. 5).

### Podsumowanie

Procesy biochemiczne i enzymatyczne prowadzące do powstania związków o charakterze smakowo-zapachowym w serze dojrzewającym typu szwajcarsko-holenderskiego są determinowane wieloma czynnikami. Istotną kwestią są niewątpliwie interakcje międzyszczepowe paciorkowców mlekowych i pałeczek propionowych. Ponadto, w ostatnich latach zaobserwowano, że stan fizjologiczny bakterii wchodzących w skład kultur starterowych determinuje ukierunkowanie prowadzonych przez nie przemian metabolicznych, a tym samym wpływa na proces dojrzewania i jakość finalną sera.

*Pracę zrealizowano w ramach własnego projektu badawczego MNiSzW N N312 484140.*

### Literatura

- [1] Ardö Y.: Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotech. Adv.*, 2006, **24**, 238-242.
- [2] Ayad E.H.E., Verheul A., de Jong C., Wouters J.T.M., Smit, G.: Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 725-735.
- [3] Bachmann H., Starrenburg M.J.C., Dijkstra A., Molenaar D., Kleerebezem M., Rademaker J.L.W., van Hylckama Vlieg J.E.T.: Regulatory phenotyping reveals important diversity within the species *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, **75** (17), 5687-5694.
- [4] Bars D.L., Yvon M.: Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, **104**, 171-177.
- [5] Bernard K.A., Shuttleworth L., Munro C., Forbes-Faulkner J.C., Pitt D., Norton J.H., Thomas A.D.: *Propionibacterium australiense* sp. nov. derived from granulomatous bovine lesions. *Anaerobe*, 2002, **8**, 41-47.
- [6] Caplice E., Fitzgerald G.F.: Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **50**, 131-149.
- [7] Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G.: Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.*, 2003, **13**, 841-866.
- [8] Dherbécourt J., Maillard M-B. Catheline D., Thierry A.: Production of branched-chain aroma compounds by *Propionibacterium freudenreichii*: links with the biosynthesis of membrane fatty acids. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, **105**, 997-985.
- [9] Drici H., Gilbert C., Kihal M., Atlan D.: Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *J. Appl. Microbiol.*, 2010, **108**, 647-657.
- [10] Engels W.J.M., Alting A.C., Arntz M.M.T.G., Gruppen H., Voragen A.G.J., Smit, G., Visser S.: Partial purification and characterization of two aminotransferases from *Lactococcus lactis* subsp.

- cremoris* B78 involved in the catabolism of methionine and branched-chain amino acids. *Int. Dairy J.*, 2000, **10**, 443-452.
- [11] García-Quintáns N., Christian M., de Mendoza D., López P.: The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 850-857.
- [12] Holland R., Liu S-Q., Crow V.L., Delabre M-L., Lubbers M., Bennett M., Norris G.: Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 711-718.
- [13] Hugenholtz J.: The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 466-475.
- [14] Irlinger F., Mounier J.: Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, **20**, 142-148.
- [15] Kerjean J-R., Condon S., Lodi R., Kalantzopoulos G., Chamba J-F., Suomalainen T., Cogan T., Moreau D.: Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria. *Food Res. Int.*, 2000, **33**, 281-287.
- [16] Koussémon M., Combet-Blanc Y., Patel B.K.C., Cayol J-L., Thomas P., Garcia J-L., Ollivier B.: *Propionibacterium microaerophilum* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, **51**, 1373-1382.
- [17] Kusano K., Yamada H., Niwa M., Yamasato K.: *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov. a new acid-tolerant  $\omega$ -cyclohexyl fatty acid-containing *Propionibacterium* isolated from spoiled orange juice. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47** (3), 825-831.
- [18] Marilley L., Casey M.G.: Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, **90**, 139-159.
- [19] McSweeney P.L.H.: Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, 2004, **57** (2/3), 127-144.
- [20] Papoutsakis E.T., Meyer C.L.: Fermentation equations for propionic-acid bacteria and production of assorted oxychemicals from various sugars. *Biotechnol. Bioeng.*, 1985, **27**, 67-80.
- [21] Paściak M., Mordarska H.: Rodzaj *Propionibacterium* – heterogenność taksonomiczna i biologiczna. *Postępy Mikrobiol.*, 1999, **38**, 245-256.
- [22] Piveteau P.: Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait*, 1999, **79**, 23-41.
- [23] Rademaker J.L.W., Herbet H., Starrenburg M.J.C., Naser S.M., Gevers D., Kelly W.J., Hugenholtz J., Swings J., van Hylckama Vlieg J.E.T.: Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73** (22), 7128-7137.
- [24] Rymaszewski J., Cichosz G., Kujawski M., Kornacki M., Wspólna hodowla stacjonarna bakterii fermentacji mlekowej i propionowej. *Acta Acad. Agricult. Techn. Olst.*, 1995, **27**, 51-60.
- [25] Singh T.K., Drake M.A., Cadwallader K.R.: Flavour of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 2003, **2**, 139-162.
- [26] Thierry A., Maillard M.-B., Hervé C., Richoux R., Lortal S.: Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chem.*, 2004, **87**, 439-446.
- [27] Thierry A., Maillard M.-B.: Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait*, 2002, **82**, 17-32.
- [28] Treimo J., Vegarud G., Langsrud T., Rudi K.: Use of DNA quantification to measure growth and autolysis of *Lactococcus* and *Propionibacterium* spp. in mixed populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72** (9), 6174-6182.
- [29] Yvon M., Rijnen L.: Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 185-201.
- [30] Ziarno M., Godlewska A.: Znaczenie i wykorzystanie bakterii rodzaju *Lactococcus* w mleczarstwie. *Med. Wet.*, 2008, **64** (1), 35-39.

**ROLE OF LACTIC ACID COCCI AND PROPIONIC ACID RODS IN SWISS-DUTCH TYPE CHEESE RIPENING PROCESS****S u m m a r y**

Swiss-Dutch type cheeses are produced with the use of lactic acid streptococci: *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., and propionic acid rods of *Propionibacterium* spp. Starter cultures and the environment of ripening cheese create a very complex and, at the same time, a dynamic system. Biotechnological processes occurring in the matrix of cheese ripening under the industrial conditions mainly depend on the physiological state of the micro-organisms applied. The metabolism of bacterial cells governs the biochemical and enzymatic changes occurring in the cheese environment, thus, it models the desirable characteristics of the product.

**Key words:** *Lactococcus*, *Propionibacterium*, ripened Swiss-Dutch type cheeses, metabolism ☒

**POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI  
ODDZIAŁ MAŁOPOLSKI**

**SEKCJA TECHNOLOGII OWOCÓW I WARZYW  
POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI**

oraz

**KATEDRA SUROWCÓW I PRZETWÓRSTWA  
OWOCOWO-WARZYWNEGO  
WYDZIAŁ TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI  
UNIwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie**

zapraszają na

**V OGÓLNOPOLSKĄ KONFERENCJĘ NAUKOWĄ  
TECHNOLOGÓW PRZETWÓRSTWA OWOCÓW I WARZYW**

nt.

**„Doskonalenie jakości żywności z owoców, warzyw i grzybów”**

**Kraków, 17-18 maj 2012**

**Informacje:**

**e-mail: [kow@ur.krakow.pl](mailto:kow@ur.krakow.pl)**