

NIKOLA ŚMIGIELSKA, ANNA SZOSLAND-FALTYN,
BEATA BARTODZIEJSKA

WPLYW STARTOWEJ KULTURY KOMERCYJNEJ I ŚRODOWISKOWEJ NA JAKOŚĆ SERÓW PODPUSZCZKOWYCH NIEDOJRZEWAJĄCYCH WYTWARZANYCH Z KROWIEGO NIEPASTERYZOWANEGO MLEKA

Streszczenie

Wprowadzenie. Na polskim rynku wyrobów serowarskich dominują produkty wytwarzane z pasteryzowanego mleka z dodatkiem kultur komercyjnych, w których skład wchodzi drobnooustroje o genetycznie potwierdzonej przynależności gatunkowej. Obecne trendy żywieniowe są ukierunkowane na wzbogacanie diety w produkty naturalne, zawierające mikroorganizmy charakterystyczne dla danego środowiska. Zatem istnieje potrzeba poszukiwania sposobów polepszenia jakości serów z mleka surowego, charakteryzujących się niepowtarzalnym smakiem i aromatem oraz dużą różnorodnością bakterii kwasu mlekowego pochodzących z danego regionu. Celem badań było określenie jakości niedojrzewających serów podpuszczkowych, wytwarzanych z surowego mleka krowiego z dodatkiem dwóch kultur startowych: komercyjnej oraz środowiskowej. Badanie mikrobiologiczne przeprowadzono w kierunku: oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej, liczby *Escherichia coli*, oraz obecności patogenów: *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp., a także w kierunku obecności enterotoksyny gronkowcowej.

Wyniki i wnioski. Jakość mikrobiologiczna mleka surowego spełniała wymagania ogólnej liczby drobnoustrojów zawarte w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady nr 853/2004, Rozporządzeniu Komisji nr 2073/2005 (z późn. zm.). W serach wyprodukowanych przy użyciu kultury środowiskowej liczba mezofilnych bakterii kwasu mlekowego była istotnie wyższa niż w serach powstałych z użyciem bakteryjnej kultury komercyjnej. W żadnym z wyrobów nie wykryto obecności patogenów ani enterotoksyny gronkowcowej. Podczas analizy sensorycznej serów przeprowadzonej bezpośrednio po produkcji stwierdzono, że były one bardzo zbliżone do siebie pod względem ogólnej akceptowalności. Po 14 dniach przechowywania serów stwierdzono różnice w jakości sensorycznej na korzyść produktów powstałych przy użyciu środowiskowej kultury startowej. Wszystkie przebadane próbki serów spełniały wymagania dotyczące bezpieczeństwa mikrobiologicznego.

Słowa kluczowe: sery podpuszczkowe, kultury startowe, bakterie kwasu mlekowego (LAB), mleko niepasteryzowane

Mgr N. Śmigielska, dr inż. A. Szosland-Faltn, ORCID: 0000-0002-5004-8059, dr B. Bartodziejska, ORCID: 0000-0002-5492-5514, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego – Państwowy Instytut badawczy in. Prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, Zakład Jakości Żywności, al. Marszałka J. Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź; Kontakt: nikola.smigielska@ibprs.pl

Wprowadzenie

Już w czasach starożytnych bardzo popularnym sposobem utrwalania żywności było jej fermentowanie. Proces ten stosowany był m.in. do mięsa, ryb, nabiału, warzyw oraz roślin strączkowych nie tylko w celu konserwacji produktów, ale również polepszenia ich smaku i tekstury. Obecnie konsumpcja sfermentowanych wyrobów jest dodatkowo powiązana z wieloma korzyściami zdrowotnymi [7, 5]. Spośród szerokiego wachlarza korzyści prozdrowotnych związanych ze spożywaniem produktów fermentowanych możemy wyróżnić m.in. działanie immunomodulujące, przeciwalergiczne, antydepresyjne, zapobieganie otyłości a także zmniejszanie ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych [13, 14]. Na polskim rynku fermentowanych produktów mlecznych dominują sery wytwarzane z pasteryzowanego mleka z dodatkiem wystandaryzowanych kultur bakteryjnych, komercyjnie dostępnych, o bardzo małej różnorodności.

Obecne trendy żywieniowe ukierunkowane są na wzbogacenie diety w produkty regionalne, wytwarzane metodami tradycyjnymi. Należą do nich m.in. wyroby serowarskie powstałe z mleka niepasteryzowanego, zawierające środowiskowe szczepy bakterii kwasu mlekowego (LAB). Dzikie drobnoustroje fermentujące żywność charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną i fenotypową oraz są one typowe dla poszczególnych nisz ekologicznych [10, 25]. Spożywanie serów bogatych w mikroorganizmy autochtoniczne może mieć wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego [2, 4, 11]. Dodatek kultur startowych wpływa na proces powstawania sera, począwszy od inicjacji fermentacji aż po ich dojrzewanie, kształtując tym jakość produktu końcowego. Sery z mleka surowego zawierające drobnoustroje środowiskowe mogą posiadać cenne właściwości prozdrowotne oraz charakteryzują się niepowtarzalnym smakiem [9]. Utrata różnorodności pod względem smaku, aromatu, wartości odżywczych oraz wyglądu mlecznych produktów fermentowanych, spowodowana stosowaniem komercyjnych kultur startowych, motywuje do poszukiwania nowych, różnorodnych szczepów bakteryjnych fermentujących żywność [10, 25]. Dodatkowo wykazano, że spożywanie niepasteryzowanego mleka może chronić przed wystąpieniem alergii oraz astmy [26, 27]. Badania przeprowadzone na terenie południowo-zachodniej Polski przez Sozańską i wsp. [26, 27] udowodniły, że konsumpcja mleka niepasteryzowanego we wczesnym okresie życia może zapobiegać wystąpieniu alergii, astmy oraz podobnych schorzeń. Zatem istnieje potrzeba poszukiwania sposobów polepszenia jakości i bezpieczeństwa serów wytwarzanych z niepasteryzowanego mleka, mających korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Bardzo ważnym zagadnieniem jest zwiększenie różnorodności szczepów bakterii kwasu mlekowego wykorzystywanych jako kultury startowe do przemysłowej produkcji wyrobów mleczarskich. Jest to możliwe poprzez izolację i identyfikację lokalnych szczepów środowiskowych LAB (Lactic Acid Bacteria).

Celem pracy było określenie jakości serów podpuszczkowych niedojrzewających wytwarzanych z krowiego niepasteryzowanego mleka z dodatkiem dwóch szczepionek: kultury dostępnej komercyjnie oraz kultury bakteryjnej środowiskowej, jaką była serwatka kwasowa.

Material i metody badań

Materiał badawczy stanowiły sery wyprodukowane metodą tradycyjną w gospodarstwie położonym w województwie śląskim, prowadzącym działalność w ramach Rolniczego Handlu Detalicznego (RHD). Mleko pochodziło od stada składającego się z 24 krów rasy montbeliarde. W okresie pobierania mleka na potrzeby badań stado pobierało pożywienie na pastwisku (lato). Dodatkowo krowy otrzymywały sruć pszenno-owsianą wzbogaconą o kredę pastewną oraz miały dostęp do lizawek solnych. Mleko z udoju porannego zostało bezpośrednio przepompowane do zbiornika schładzającego, gdzie osiągnęło temperaturę 4 °C. Po upływie 10 godzin mleko przelano do pojemników fermentacyjnych i rozpoczęto produkcję. Na potrzeby doświadczenia wytworzono sery podpuszczkowe niedojrzewające w dwóch wariantach. W celu wyprodukowania pierwszego z nich niepasteryzowane mleko w ilości 50 l zaszczepiono kwaśną serwatką (0,2 l) powstałą przy produkcji sera kwasowego z surowego mleka, pochodzącego z udoju porannego poprzedniego dnia. Gęstość inokulum LAB w serwatce kwasowej wynosiła $8,3 \pm 0,05 \log \text{ jtk/cm}^3$. W serwatce kwasowej zidentyfikowano biochemicznie m.in.: *Levilactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaeibacillus rhamnosus*.

Z kolei drugi rodzaj sera wyprodukowano poprzez zaszczepienie surowego mleka (50 l) kwaśnym mlekiem w ilości 0,2 l, powstałym przy użyciu kultury komercyjnej w formie liofilizatu (Kultury bakterii do twarogu; Browin sp. z o. o.). Do pasteryzowanego mleka dodano kulturę bakteryjną przygotowaną zgodnie z instrukcją producenta i pozostawiono na 20 godzin w celu ukwaszenia. Gęstość inokulum kwaśnego mleka wynosiła $8,86 \pm 0,01 \log \text{ jtk/cm}^3$ i zawierała następujące drobnoustroje: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Zarówno ser ukwaszony kulturą startową środowiskową, jak i ser z dodatkiem kultury komercyjnej wytworzono z zastosowaniem tej samej technologii. Mleko z kulturami bakteryjnymi: środowiskową i komercyjną ogrzano do 41 °C i pozostawiono na 15 minut, a następnie dodano podpuszczkę w ilości 2,2 cm³ podpuszczki na 1 l mleka (Podpuszczka naturalna Beaugel 50 o mocy 1:1000, firmy COQUARD Etablissements, Francja). Podpuszczka była przechowywana w temperaturze $3^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ i odmierzana w cylindrze miarowym. Roztwory dokładnie wymieszano i zostawiono na 40 minut w celu wytworzenia się skrzepu. Przy użyciu harfy serowarskiej powstały skrzep pokrojono. Po

upływie godziny, gdy skrzep opadł, odlano serwatkę znad skrzepu. Po usunięciu serwatki na powierzchnię wlano gorącą wodę o temperaturze 62,4 °C w ilości 7 l wody na 30 l mleka i rozpoczęto ręczne wygniatanie sera. Powstałe produkty przelano na sita wstępne, pozwalające na odsączenie serwatki. Następnie ser umieszczono na regale ociekowym w sitku końcowym, formującym produkt. Z każdego rodzaju produkcji powstało łącznie 6 kg sera (trzy krążki po 2 kg każdy). Sery przetransportowano do pomieszczenia chłodniczego o temperaturze 5 ÷ 6 °C. Po upływie czterech godzin sery wyjęto z sit, natarto solą w ilości 50 gramów na 1 kilogram sera i ponownie umieszczono na regale ociekowym. Nadmiar soli usuwano pod bieżącą, zimną wodą po około 9 godzinach. Sery zapakowano próżniowo i przekazano do badań, które przeprowadzono bezpośrednio po produkcji (badanie wstępne) oraz po upływie 14 dni, przechowując sery w temperaturze 3° ± 2 °C.

Badanie mikrobiologiczne

Mleko użyte do produkcji serów oraz sery podpuszczkowe zostały zbadane mikrobiologicznie. Wykorzystano metody zgodne z obowiązującymi normami ISO w kierunku: oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów wykorzystując podłoże PCA [(Oxoid, Wielka Brytania) 30 °C ± 1 °C / 72 h], liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej z wykorzystaniem podłoża MRS [(Merck, Niemcy) 30 °C ± 1 °C / 72 h], liczby *Escherichia coli* z wykorzystaniem podłoża TBX [(Oxoid, Wielka Brytania) 44 °C ± 1 °C / 24 h] a także w kierunku obecności patogenów: *Listeria monocytogenes* przy użyciu pożywek: Half Fraser (30 °C ± 1 °C / 24 h), Fraser (37 °C ± 1 °C / 24 h) oraz ALOA (37 °C ± 1 °C / 48 h) (Graso, Polska) oraz *Salmonella* spp. stosując pożywki: MKTT (37 °C ± 1 °C / 24 h), Rambach (37 °C ± 1 °C / 24 h) (Merck, Niemcy) i podłoża RVS (41,5 °C ± 1 °C / 24 h) i XLD (37 °C ± 1 °C / 24 h) (Oxoid, Wielka Brytania) [17, 18, 19, 20]. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone w warunkach tlenowych, w trzech powtórzeniach, a jako wynik przyjęto średnią z trzech powtórzeń wyrażoną w log₁₀ jtk/g dla analiz ilościowych. Obecność enterotoksyn gronkowcowych sprawdzano przy użyciu przesiewowej metody immunoenzymatycznej VIDAS SET 2 (bioMérieux, Francja). Identyfikację biochemiczną drobnoustrojów w kulturze startowej środowiskowej wykonano przy pomocy testu diagnostycznego API 50 CH oraz podłoża API 50 CHL (bioMérieux, Francja) przeznaczonego do identyfikacji mikroorganizmów z rodzaju *Lactobacillus* oraz rodzajów pokrewnych, pozwalającego na ocenę zdolności fermentacji mlekowej 49 węglowodanów. Przeprowadzono identyfikację 80 pojedynczych kolonii.

Pomiar aktywności wody

W powstałych serach określano aktywność wody (a_w) przy użyciu aparatu Aqua-Lab 4TE firmy METER Group w temp. $25 \pm 0,2$ °C. Pomiarów dokonywano w trzech powtórzeniach.

Pomiar wartości pH

Pomiar wartości pH badanych serów wykonano przy pomocy pH-metru Elmetron CX-505 (Zabrze, Polska) metodą potencjometryczną w trzech powtórzeniach. Wskazania pH-metru zaokrąglono do 0,1.

Analiza sensoryczna

W celu uzyskania profilu sensorycznego serów wyprodukowanych przy użyciu kultury komercyjnej oraz środowiskowej zastosowano metodę QDA (ang. *Quantitative Descriptive Analysis*). Badane cechy obejmowały: dwa wyróżniki zapachu: śmietanowy/mleczny, obcy; cztery wyróżniki smaku: śmietanowy/ mleczny, kwaśny, słony, obcy; dwa wyróżniki konsystencji: twardość i sprężystość oraz jakość ogólną próbek. Ocenę przeprowadzono dla dwóch rodzajów sera, w trzech powtórzeniach. Intensywność wyróżników zaznaczano na skali graficznej, przedstawiającej 10-centymetrowy odcinek, bez podziałki, zakończony skrajnymi liniami brzegowymi. Dla wyróżników zapachu i smaku zastosowano oznaczenia skrajne takie jak niewyczuwalny (0) – bardzo intensywny (10), natomiast dla wyróżników konsystencji oraz jakości ogólnej określenia te były zależne od badanej cechy (od 0 do 10). Analizy dokonał 12-osobowy zespół odpowiednio przeszkolonych panelistów. Uzyskane wyniki uśredniono i zaprezentowano w postaci diagramów radarowych.

Analiza statystyczna

Do opracowania wyników badań wykorzystano program Microsoft Excel 2016. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach, pobierając każdorazowo próbkę z odrębnej sztuki sera tej samej partii, a otrzymane wyniki porównano testem T dla prób niezależnych, analizując wyniki między serami wyprodukowanymi przy użyciu dwóch różnych kultur startowych podczas analizy początkowej, a następnie po 14 dniach przechowywania, przy $p\text{-value} \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań jakości mikrobiologicznej mleka użytego do produkcji serów przedstawiono w tab. 1. Podczas analizy mikrobiologicznej mleka określono ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę bakterii kwasu mlekowego oraz liczbę *Escherichia coli*. W analizowanym mleku nie wykryto obecności patogenów: *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes* oraz enterotoksyny gronkowcowej. Niepasteryzowane mleko przezna-

czone do produkcji serów spełniało wymagania zawarte w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady nr 853/2004 oraz Rozporządzeniu Komisji nr 2073/2005 (z późn. zm.) [21, 22] dotyczące ogólnej liczby drobnoustrojów.

Tabela 1. Wyniki oceny jakości mikrobiologicznej mleka
Table 1. Results of the microbiological quality assessment of milk

Parametr mikrobiologiczny Microbiological parameter	Wynik / Result
	Mleko / Milk
Ogólna liczba drobnoustrojów Total count of bacteria	5,0 ± 0,02
Liczba bakterii kwasu mlekowego Count of Lactic Acid Bacteria	4,9 ± 0,01
Liczba <i>E. coli</i> Count of <i>E. coli</i>	1,7 ± 0,01
Obecność enterotoksyny gronkowcowej w 25 g Presence of staphylococcal enterotoxin in 25 g	nie wykryto / not detected
Obecność <i>Salmonella</i> spp. w 25 g Presence of <i>Salmonella</i> spp. in 25 g	nie wykryto / not detected
Obecność <i>Listeria monocytogenes</i> w 25 g Presence of <i>Listeria monocytogenes</i> in 25 g	nie wykryto / not detected

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations

Analizę mikrobiologiczną serów (tab. 2) przeprowadzono analogicznie do badania mleka, określając ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej oraz liczbę *Escherichia coli* bezpośrednio po produkcji oraz po 14 dniach przechowywania. Ogólna liczba drobnoustrojów w przebadanych serach kształtowała się na poziomie od $7,6 \pm 0,03$ log jtk/g do $9,0 \pm 0,01$ log jtk/g przez cały okres przechowywania. Z kolei liczba *E. coli* w przebadanych serach kształtowały się na poziomie wynoszącym od $2,1 \pm 0,01$ log jtk/g do $2,9 \pm 0,01$ log jtk/g w całym okresie przechowywania. Porównując wyniki mikrobiologiczne dwóch wariantów serów, uzyskane podczas analizy początkowej, zaobserwowano różnice istotne statystycznie w liczbie bakterii kwasu mlekowego. Wyniki uzyskane podczas analizy przeprowadzonej po 14 dniach przechowywania również wykazały różnice istotne statystycznie w liczbie bakterii kwasu mlekowego między dwoma rodzajami serów. W badanych serach nie wykryto obecności *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* oraz enterotoksyny gronkowcowej. Do najczęściej izolowanych z serwatki kwasowej gatunków LAB należały: *Levilactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Wymienione drobnoustroje stanowiły tylko część całej populacji bakterii kwasu

mlekowego obecnych w kulturze środowiskowej, jednak występowały najczęściej wśród przebadanych izolatów. W badaniu przeprowadzonym przez Rzepkowską i wsp. [23] również wyizolowano *L. plantarum* z serwatki ekologicznej. Z kolei podczas analizy polskich serów górskich – oscypków, tak jak w badaniach własnych, zidentyfikowano *L. lactis* subsp. *lactis* oraz *L. plantarum* [1].

Tabela 2. Wyniki oceny jakości mikrobiologicznej serów

Table 2. Results of the microbiological quality assessment of cheeses

Parametr mikrobiologiczny Microbiological parameter	Czas przechowywania [dni] / Storage period [days]	
	0	14
Ogólna liczba drobnoustrojów [\log_{10} jtk/g] / Total count of bacteria [\log_{10} cfu/g]		
KŚ	7,6 ± 0,03	9,0 ± 0,01
KK	7,6 ± 0,02	9,0 ± 0,01
Różnice istotne statystycznie Statistically significant differences *	Brak różnic / No differences	
Liczba bakterii kwasu mlekowego [\log_{10} jtk/g] / Count of Lactic Acid Bacteria [\log_{10} cfu/g]		
KŚ	7,9 ± 0,01	8,8 ± 0,01
KK	7,7 ± 0,02	7,9 ± 0,01
Różnice istotne statystycznie Statistically significant differences *	KŚ : KK (0); KŚ : KK (14)	
Liczba <i>E. coli</i> [\log_{10} jtk/g] / Count of <i>E. coli</i> [cfu \log_{10} /g]		
KŚ	2,9 ± 0,01	2,1 ± 0,18
KK	2,8 ± 0,01	2,1 ± 0,01
Różnice istotne statystycznie Statistically significant differences *	Brak różnic / No differences	
Obecność enterotoksyny gronkowcowej w 25 g / Presence of staphylococcal enterotoxin in 25 g		
KŚ	nie wykryto / not detected	nie wykryto / not detected
KK	nie wykryto / not detected	nie wykryto / not detected
Obecność <i>Salmonella</i> spp. w 25 g / Presence of <i>Salmonella</i> spp. in 25 g		
KŚ	nie wykryto / not detected	nie wykryto / not detected
KK	nie wykryto / not detected	nie wykryto / not detected
Obecność <i>Listeria monocytogenes</i> w 25 g / Presence of <i>Listeria monocytogenes</i> in 25 g		
KŚ	nie wykryto / not detected	nie wykryto / not detected
KK	nie wykryto / not detected	nie wykryto / not detected

Objaśnienia / Explanatory notes:

KŚ – ser wyprodukowany przy użyciu kultury środowiskowej / cheese produced using environmental culture; KK – ser wyprodukowany przy użyciu kultury komercyjnej / cheese produced using commercial culture

W tabeli przedstawiono wartości średnie \pm odchylenia standardowe; * - różnice statystycznie istotne (p -value $\leq 0,05$) / Table shows mean values \pm standard deviations; * - statistically significant differences (p -value $\leq 0,05$)

Aktywność wody (a_w) w powstałych serach oznaczono bezpośrednio po produkcji oraz po 14 dniach przechowywania (tab. 3). Wartości aktywności wody różniły się istotnie statystycznie między serami wyprodukowanymi przy użyciu dwóch różnych kultur, zarówno porównując wyniki analizy początkowej, jak i po 14 dniach przechowywania. Parametr ten jest głównym czynnikiem ograniczającym oraz zapobiegającym wzrostowi drobnoustrojów. W wielu przypadkach jest zasadniczym elementem wpływającym na stabilność żywności poprzez modulowanie reakcji mikroorganizmów. Wartości a_w poniżej 0,61 zapewniają stabilność produktów, ograniczając rozwój wszystkich drobnoustrojów. Wzrost kilku rodzajów pleśni możliwy jest już w produktach przekraczających wartość 0,61. Optymalny wzrost bakterii, zapewnia a_w w zakresie $0,91 \div 1,00$, w którym to mieszczą się wyniki prezentowanych badań. Aktywność wody w powstałych serach kształtowała się na bardzo wysokim poziomie, umożliwiającym dobry wzrost drobnoustrojów, jednak niezapewniającym stabilności produktów [28, 29]. W badaniach serów z niepasteryzowanego mleka, przeprowadzonych na terenie Szwajcarii [24] wartości aktywności wody mieściły się w przedziale $0,94 \div 0,99$. Aktywność wody w tym przedziale sprzyja swobodnemu wzrostowi drobnoustrojów i jest bardzo zbliżona do wyników badań własnych. W badaniu Łepeckiej i wsp. [12] określono wartości a_w ekologicznych serów kwasowo-podpuszczkowych, które również mieściły się w zakresie $0,91 \div 1,00$, gwarantującym dobry wzrost wszystkich drobnoustrojów, co jest spójne z wynikami badań własnych.

Tabela 3. Wyniki aktywności wody ocenianych serów
Table 3. Water activity results of evaluated cheeses

Aktywność wody / Water activity		
Wariant sera / Type of cheese	Czas przechowywania [dni] / Storage period [days]	
	0	14
KŚ	$0,966 \pm 0,03$	$0,964 \pm 0,04$
KK	$0,970 \pm 0,03$	$0,973 \pm 0,03$
Różnice istotne statystycznie * Statistically significant differences	KŚ : KK (0); KŚ : KK (14)	

Objaśnienia jak pod tab. 2 / Explanatory notes as in Tab. 2

W tabeli przedstawiono wartości średnie \pm odchylenia standardowe; * - różnice statystycznie istotne (p -value $\leq 0,05$) / Table shows mean values \pm standard deviations; * - statistically significant differences (p -value $\leq 0,05$)

Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji nr 2073/2005 (z późn. zm.) [22], mając na względzie bezpieczeństwo mikrobiologiczne pod względem obecności *Listeria monocytogenes*, badano również pH serów. Wartość pH w badanych produktach oznaczono bezpośrednio po produkcji oraz po 14 dniach przechowywania (tab. 4). Porównując wyniki analizy początkowej zaobserwowano, że wartości pH różniły się istotnie statystycznie między serami wyprodukowanymi przy użyciu dwóch różnych kultur. Uzyskane wartości pH mogą sprzyjać wzrostowi *Listeria monocytogenes*, jednakże, jak wykazano w prezentowanych badaniach, w żadnej z próbek nie wykryto tego patogenu.

Tabela 4. Wyniki wartości pH ocenianych serów
Table 4. pH values results of evaluated cheeses

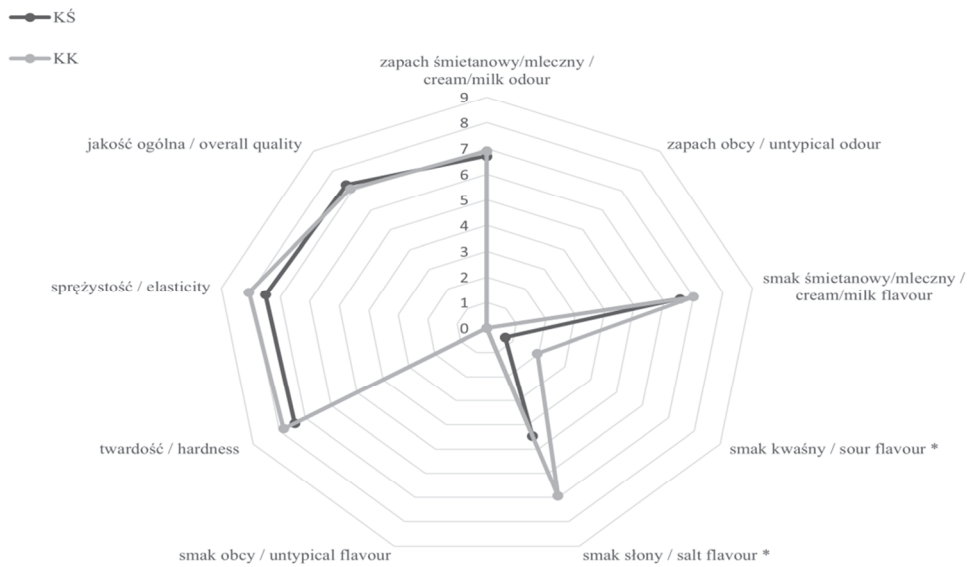
Wartości pH / pH values		
Wariant sera Type of cheese	Czas przechowywania [dni] / Storage period [days]	
	0	14
KŚ	5,1 ± 0,01	6,1 ± 0,00
KK	6,0 ± 0,00	6,0 ± 0,01
Różnice istotne statystycznie * Statistically significant differences	KŚ : KK (0)	

Objaśnienia jak pod tab. 2 / Explanatory notes as in Tab. 2

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe; * - różnice statystycznie istotne (p-value ≤ 0,05) / Table shows mean values ± standard deviations; * - statistically significant differences (p-value ≤ 0.05)

Profil sensoryczny badanych serów uzyskano poprzez analizę ośmiu wyróżników sensorycznych dla dwóch próbek sera, a otrzymane wyniki zaprezentowano w postaci diagramów radarowych. Na rysunku 1 przedstawiono wyniki analizy sensorycznej przeprowadzonej bezpośrednio po produkcji, natomiast na rysunku 2 zaprezentowano wyniki po 14 dniach przechowywania.

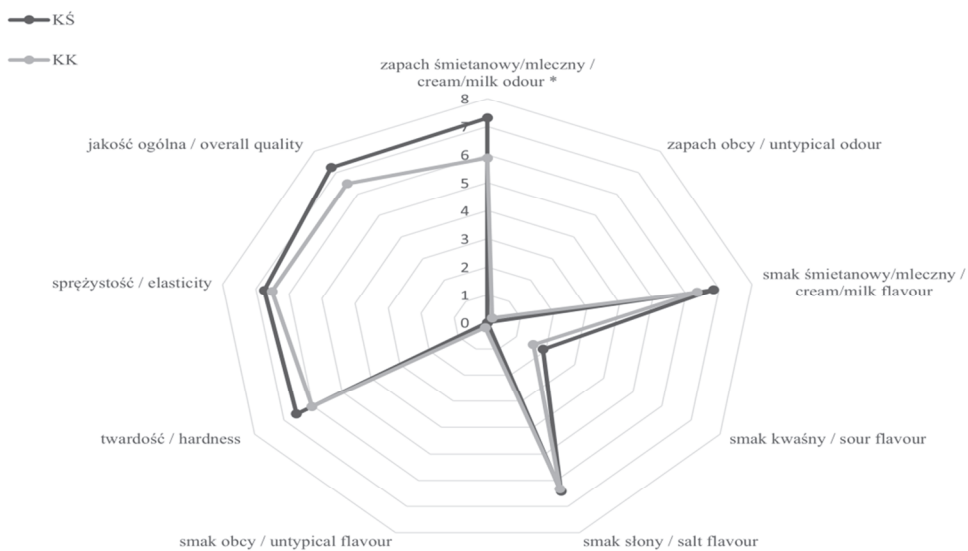
Analizując wyniki oceny sensorycznej, stwierdzono, iż przebadane próbki świeżych serów niezależnie od zastosowanej kultury startowej były bardzo zbliżone do siebie pod względem ogólnej akceptowalności. Ser wyprodukowany z użyciem kultury startowej środowiskowej charakteryzował się niższą intensywnością smaku kwaśnego oraz słonego niż ser powstały z użyciem kultury komercyjnej – były to różnice istotne statystycznie. Ser wyprodukowany z użyciem kultury komercyjnej charakteryzował się wyższą sprężystością oraz twardością, jednak nie były to różnice statystycznie istotne. W profilu sensorycznym serów po 14 dniach przechowywania zaobserwowano kilka



Rys. 1. Profil sensoryczny serów bezpośrednio po produkcji

Fig. 1. Sensory profile of cheeses immediately after production.

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

* - różnice statystycznie istotne (p -value $\leq 0,05$) / * - statistically significant differences (p -value ≤ 0.05)

Rys. 2. Profil sensoryczny serów po 14 dniach przechowywania

Fig. 2. Sensory profile of cheeses after 14 days of storage.

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

* - różnice statystycznie istotne (p -value $\leq 0,05$) / * - statistically significant differences (p -value ≤ 0.05)

różnic. Ser powstały z zastosowaniem kultury środowiskowej charakteryzował się większą twardością i wyższą oceną jakości ogólnej. Wykazano również większą intensywność zapachu śmietanowego/mlecznego w serze wyprodukowanym z dodatkiem kultury startowej środowiskowej, co było statystycznie istotne.

Jak wynika z literatury, sery z mleka surowego są uważane za produkty posiadające bardziej intensywny smak oraz zapach niż sery z mleka pasteryzowanego. Obróbka termiczna mleka inaktywuje enzymy takie jak proteazy i lipazy oraz naturalnie występującą mikrobiotę mleka, które odgrywają bardzo ważną rolę w poprawie jakości sensorycznej serów [6, 30]. Jak potwierdzono w badaniach naukowych, zastosowanie kultury startowej środowiskowej umożliwia utrzymanie charakterystycznej dla danego regionu mikrobioty serów, a także poprzez obecność dużej liczby bakterii kwasu mlekowego, może zapobiegać procesowi psucia serów z niepasteryzowanego mleka i rozwojowi gatunków potencjalnie patogennych [4, 8].

Liczba bakterii kwasu mlekowego w wyprodukowanych serach była na bardzo wysokim poziomie, średnio $8,2 \pm 0,53 \log \text{ jtk/g}$ (tab. 2). W serze świeżym, powstałym przy użyciu kultury środowiskowej, liczba LAB była istotnie wyższa niż w serze wyprodukowanym przy użyciu kultury komercyjnej. Porównując wyniki z tymi otrzymanymi podczas analizy po 14 dniach, zaobserwowano istotnie wyższą liczbę LAB w serze wyprodukowanym z użyciem startowej kultury środowiskowej. Zależność tę zaobserwowano również w badaniu przeprowadzonym przez Pappę i wsp. [16], polegającym na analizie sera popularnego na Bałkanach – Kashkaval. Autorzy określili liczbę LAB w dwóch rodzajach produktów: ser z mleka surowego oraz ser z mleka pasteryzowanego z dodatkiem kultury startowej. Ser z mleka niepasteryzowanego bez dodatku kultur startowych charakteryzował się liczbą LAB na poziomie $6,5 \pm 0,03 \log \text{ jtk/g}$, natomiast w produkcie z mleka pasteryzowanego z dodatkiem kultury startowej liczba LAB była niższa aż o dwa rzędy logarytmiczne ($4,5 \pm 0,05 \log \text{ jtk/g}$). Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez Łepecką i wsp. [12] liczba mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej była na poziomie $8,64 \pm 0,21 \log \text{ jtk/g}$ dla sera kwasowo-podpuszczkowego wyprodukowanego z niepasteryzowanego mleka z dodatkiem kultury startowej środowiskowej, co jest wartością zbliżoną do wyników badań własnych. W tym badaniu również nie wykryto obecności patogenów *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Mormile i wsp. [15] na serach włoskich powstałych z surowego mleka owczego liczba bakterii kwasu mlekowego wahała się od 6 do $8 \log \text{ jtk/cm}^3$ przez cały okres przechowywania, oscylując tym samym na wysokim poziomie, jednak niższym niż wyniki uzyskane w prezentowanym badaniu.

Podsumowując, sery wyprodukowane z niepasteryzowanego mleka z dodatkiem startowej kultury środowiskowej były bezpieczne mikrobiologicznie i zapewniały wy-

soką liczbę bakterii kwasu mlekowego. Badane sery wpisują się w obecne trendy spożywania produktów naturalnych.

Wnioski

1. Wyprodukowane sery podpuszczkowe niedojrzewające charakteryzowały się dobrą jakością mikrobiologiczną. W przebadanych serach nie wykryto obecności patogenów ani enterotoksyny gronkowcowej, co potwierdza ich bezpieczeństwo zdrowotne. Produkty powstałe z dodatkiem kultury środowiskowej utrzymywały wyższą liczbę LAB przez cały okres przechowywania niż wyroby powstałe z wykorzystaniem kultury komercyjnej.
2. Przeprowadzona ocena sensoryczna wykazała, że powstałe sery świeże charakteryzowały się dobrą jakością i były bardzo zbliżone do siebie pod względem ogólnej akceptowalności, natomiast po 14 dniach przechowywania zaobserwowano różnice w jakości sensorycznej między wyprodukowanymi serami, na korzyść produktów powstałych przy użyciu startowej kultury środowiskowej.

Badania zostały sfinansowane w ramach działania „Współpraca” nr projektu 00021.DDD.6509.00044.2019.12 „Sery zagrodowe”.

Literatura

- [1] Alegria A., Szczesny P., Mayo B., Bardowski J., Kowalczyk M.: Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and -Independent Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78 (6), 1890-1898.
- [2] Braun-Fahrlander C., von Mutius E. Can farm milk consumption prevent allergic diseases? *Clin. Exp. Allergy*, 2011, 41(1), 29-35.
- [3] Carafa I., Clementi F., Tuohy K., Franciosi E.: Microbial evolution of traditional mountain cheese and characterization of early fermentation cocci for selection of autochthonous dairy starter strains. *Food Microbiol.*, 2016, 53 (Pt B), 94-103.
- [4] Carafa I., Stocco G., Franceschi P., Summer A., Tuohy K.M., Bittante G., Franciosi E.: Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter and non-starter cultures for the production of Traditional Mountain cheese. *Food Res. Int.*, 2019, 115, 209-218.
- [5] Castellone V., Bancalari E., Rubert J., Gatti M., Neviani E., Bottari B.: Eating Fermented: Health Benefits of LAB-Fermented Foods. *Foods*, 2021, 10(11), 2639.
- [6] Coelho M.C., Malcata F.X., Silva C.C.G.: Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods*, 2022, 11(15), 2276.
- [7] Dimidi E., Cox S.R., Rossi M., Whelan K.: Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 2019, 11(8), 1806.
- [8] Gaglio R., Todaro M., Settanni L.: Improvement of Raw Milk Cheese Hygiene through the Selection of Starter and Non-Starter Lactic Acid Bacteria: The Successful Case of PDO Pecorino Siciliano Cheese. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, 18(4), 1834.

- [9] Gantzias C., Lappa I.K., Aerts M., Georgalaki M., Manolopoulou E., Papadimitriou K., De Brandt E., Tsakalidou E., Vandamme P.: MALDI-TOF MS profiling of non-starter lactic acid bacteria from artisanal cheeses of the Greek island of Naxos. *Int. J. Food Microbiol.*, 2020, 16, 323, 108586.
- [10] Gatti M., Bottari B., Lazzi C., Neviani E., Mucchetti G. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *J. Dairy Sci.*, 2014, 97(2), 573-91.
- [11] Gomaa E.Z.: Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(12), 2019-2040.
- [12] Łepecka A., Okoń A., Szymański P., Zielińska D., Kajak-Siemaszko K., Jaworska D., Neffe-Skocińska K., Sionek B., Trzaskowska M., Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J.: The Use of Unique, Environmental Lactic Acid Bacteria Strains in the Traditional Production of Organic Cheeses from Unpasteurized Cow's Milk. *Molecules*, 2022, 27(3), 1097.
- [13] Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Folligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J., Hutkins R.: Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2017, 44, 94-102.
- [14] Mathur H., Beresford T.P., Cotter P.D.: Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*, 2020, 12(6), 1679.
- [15] Mormile A., Barile M., Mercogliano R., Johansson P., Björkroth K.J., Aponte M., Murru N.: Dynamics of lactic acid bacteria in "Pecorino di Tramonti"—a ewe's milk cheese—with particular emphasis on enterococci: a preliminary study. *Ann. Microbiol.*, 2016, 66, 179–185.
- [16] Pappa E.C., Kondyli E., Samelis J.: Microbiological and biochemical characteristics of Kashkaval cheese produced using pasteurised or raw milk. *Int. Dairy J.*, 2019, 89, 60-67.
- [17] PN-EN ISO 11290-1:2017:07. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp. Część 1: Metoda wykrywania.
- [18] PN-EN ISO 6579-1:2017-04/A1:2020-09. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania, oznaczania liczby i serotypowania *Salmonella*. Część 1: Wykrywanie *Salmonella* spp.
- [19] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 stopni C.
- [20] PN-ISO 16649-2:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2: Metoda płytkowa w temperaturze 44 stopni C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo beta-D-glukuronidu.
- [21] Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Dz.U. L 139 z 30.4.2004, s. 1. 55–205 z późn. zm.
- [22] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz.U. L 338 z 22.12.2005, s. 1. 1–26 z późn. zm.
- [23] Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D. Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2017, 52 (9), 1983-1994
- [24] Serrano N.S., Zweifel C., Corti S., Stephan R.: Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in raw milk cheeses and raw meat products marketed at farm level in Switzerland. *Ital. J. Food Saf.*, 2018, 7(2), 7337.
- [25] Smid E.J., Hugenholz J. Functional genomics for food fermentation processes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2010, 1, 497-519.

- [26] Sozańska B., Pearce N., Dudek K., Cullinan P.: Consumption of unpasteurized milk and its effects on atopy and asthma in children and adult inhabitants in rural Poland. *Allergy*, 2013, 68 (5), 644-50.
- [27] Sozańska B., Sikorska-Szaflik H.: Diet Modifications in Primary Prevention of Asthma. Where Do We Stand? *Nutrients*, 2021, 13 (1), 173.
- [28] Tapia M.S., Alzamora S.M., Chirife J. Effects of water activity (a_w) on microbial stability as a hurdle in food preservation. In.: *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Barbosa-Cánovas G.V., Fontana A.J. Jr., Schimdt, S.J., Labuza, T.P. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2020, pp. 323–355.
- [29] Vesterlund S., Salminen K., Salminen S.: Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 157 (2), 319-21.
- [30] Yoon Y., Lee S., Choi K.: Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 2016, 63, 201-215.

EFFECT OF COMMERCIAL AND ENVIRONMENTAL STARTER CULTURE ON THE QUALITY OF UNRIPENED RENNET CHEESE MADE FROM UNPASTEURIZED COW'S MILK

S u m m a r y

Background. The Polish cheese market is dominated by products made from pasteurized milk with commercial culture comprising microorganisms with genetically confirmed species affiliation. Current nutritional trends are focused on enriching the diet with natural products containing microorganisms characteristic of a given environment. Therefore, there is a need to look for ways to improve the quality of raw milk cheeses, which are characterized by a unique taste and aroma, as well as a large variety of lactic acid bacteria from a region. The aim of the study was to determine the quality of unripened rennet cheeses made from unpasteurized milk with two starter cultures: commercial and environmental. A microbiological analysis was carried out in order to: determine the total number of microorganisms, the number of mesophilic lactic acid bacteria, *Escherichia coli* and the presence of pathogens: *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. and staphylococcal enterotoxin.

Results and conclusion. The microbiological quality of raw milk met the requirements for the total number of microorganisms laid down in the Regulation of the European Parliament and of the Council No. 853/2004, the Commission Regulation No. 2073/2005 (as amended). In cheeses produced using the environmental culture, the number of mesophilic LAB was significantly higher than in the other type of cheese. No pathogens or staphylococcal enterotoxin were detected in any of the products. During a sensory analysis of cheeses after production, it was found that they were very similar to each other in terms of overall acceptability. After 14 days of cheese storage, differences in sensory quality were found in favor of the products made using the environmental starter culture. All tested cheese samples met the requirements for microbiological safety.

Key words: rennet cheese, starter cultures, lactic acid bacteria (LAB), unpasteurized milk 