

Joanna Żylińska^{1*}, Krzysztof Siemianowski², Krzysztof Bohdziewicz²,
Katarzyna Pawlikowska³, Piotr Kołakowski³, Jerzy Szpendowski², Jacek Bardowski¹

¹ Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5a

² Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, 10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 7

³ Danisco Poland, 61-315 Poznań, ul. Wybieg 6

Wpłynęło w marcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Technologia twarogów kwasowych. 3. Rola kultur starterowych w produkcji serów twarogowych. 4. Kultury starterowe w produkcji twarogu kwasowego. 4.1. Oporność na bakteriofagi. 4.2. Produkcja bakteriocyn. 4.3. Aktywność proteolityczna i lipolityczna. 4.4. Produkcja zewnątrzkomórkowych polisacharydów. 5. Podsumowanie

Starter cultures for acid curd – role and expectations

Abstract: Lactic acid bacteria are industrially important microbes used all over the world in a large variety of industrial food fermentations. Cheese, cottage cheese, especially acid curd cheese, are characteristic dairy products for some Central and Eastern European countries. For production of acid curd cheese, only two components are needed: milk and lactic acid bacteria starter cultures. Starter cultures determine in large extent the technological process, the quality of the resulting quark and its shelf life. The composition of quark acid bacteria cultures is constituted in majority by *Lactococcus* and *Leuconostoc* bacteria. Selection of strains and construction of cultures with balanced species and stable composition for acid curd production is still very complex and presents a difficult challenge for producers of dairy cultures.

1. Introduction. 2. Acid curd technology. 3. The role of starter cultures in the production of cottage cheese. 4. Starter cultures for acid curd. 4.1. Bacteriophage resistance. 4.2. Bacteriocin production. 4.3. Proteolytic and lipolytic activity. 4.4. Production of extracellular polysaccharides. 5. Summary

Słowa kluczowe: kultury starterowe, oczekiwania, rola, twarogi kwasowe

Key words: starter cultures, expectations, role, acid curd

1. Wstęp

Sery twarogowe są charakterystyczne dla asortymentu wyrobów mleczarskich w krajach Europy Środkowej i Wschodniej. Są też w tej części świata powszechnie znane, dostępne i cenione jako bogata grupa produktów, głównie niedojrzewających, określanych również jako „sery świeże” [4, 43]. Polski przemysł mleczarski przeznacza w skali rocznej na ich produkcję ok. 20% z całkowitej ilości mleka jakie trafia do skupów [44, 51]. W 2006 roku prawie 80% zakładów mleczarskich w Polsce deklarowało produkcję wyrobów zaliczanych do grupy serów twarogowych. Świadczy to o atrakcyjności i dużym zapotrzebowaniu rynku na tego rodzaju produkty [6]. Wielkość rocznej krajowej produkcji serów twarogowych ogółem w ostatnich latach utrzymuje się na poziomie powyżej 300 tys. ton i systematycznie wzrasta. Potwierdzeniem wspomnianej tendencji jest wzrost wielkości produkcji z 302,4 tys. ton w 2006 roku [47] do 371,0 tys. ton w 2010 roku [45]. Wartość ta stanowi historyczne maksimum ich krajowej produkcji. Spożycie serów twarogowych w Polsce od wielu lat wynosi powyżej 6 kg na osobę i wyraźnie przewyższa konsumpcję serów dojrzewających oraz topionych. Statystyczny Polak w 2010 roku spożył ich 6,60 kg, co odpo-

wiało 58,5% udziałowi w spożyciu serów ogółem [54]. Duża atrakcyjność tej grupy przetworów mlecznych wynika z długiej tradycji konsumpcji, ukształtowanych przyzwyczajęń żywieniowych oraz dobrej dostępności. Nie bez znaczenia są tu także: bogaty asortyment i stosunkowo niskie ceny [16]. Bardzo ważna w tym aspekcie jest również ich wysoka wartość odżywcza. Sery twarogowe stanowią w codziennej diecie cenne źródło pełnowartościowego białka, pewnych ilości lekkostrawnego tłuszczu, witamin (głównie z grupy B) oraz licznych składników mineralnych [21, 53, 58].

W zależności od zastosowanej metody koagulacji białek mleka w asortymencie serów twarogowych wyróżnia się produkty kwasowe i kwasowo-enzymatyczne, przy czym tradycyjny twaróg prasowany produkowany jest przy zastosowaniu koagulacji kwasowej. Twarogiem kwasowym zgodnie z definicją nazywamy: częściowo odwodniony skrzep mleka, chudego lub o znormalizowanej zawartości tłuszczu, koagulowanego w sposób pośredni (przy udziale bakterii fermentacji mlekowej) lub bezpośredni (przez zastosowanie dodatku kwasu, np. mlekowego, cytrynowego) [4, 17, 36, 38, 44, 53]. W przemysłowej produkcji serów twarogowych, w tym twarogów kwasowych, powszechnie zastosowanie znajduje pierwsza metoda, a najważniejszym

* Autor korespondencyjny: Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa; tel. 22 592 12 23; e-mail: zuczek@ibb.waw.pl

dotądkiem technologicznym, w zasadzie niezbędnym, są kultury starterowe zawierające bakterie fermentacji mlekowej. Odpowiedni ich dobór wywiera istotny wpływ na przebieg procesu produkcyjnego, ale warunkuje również kształtowanie pożądanych cech jakościowych i atrakcyjność produktu finalnego [4, 25, 43].

2. Technologia twarogów kwasowych

Przemysłowa produkcja twarogów kwasowych metodą tradycyjną, obejmuje takie czynności technologiczne jak: przygotowanie surowca do przerobu, zaprawianie i koagulacja, obróbka skrzepu, separacja masy twarogowej, formowanie i prasowanie, porcjowanie, chłodzenie oraz pakowanie [17, 36, 44, 52]. Jako surowiec do przemysłowej produkcji twarogów kwasowych metodą tradycyjną wykorzystywane jest najczęściej odpowiednio przygotowane mleko, ale niekiedy również maślanka lub jej mieszanina z mlekiem. Przygotowanie surowca obejmuje normalizację zawartości tłuszczu, pasteryzację oraz ochłodzenie do temperatury zaprawiania (20–35°C), co stanowi ostatnią czynność przed wprowadzeniem bakterii fermentacji mlekowej w postaci kultur starterowych [17, 36, 44].

W technologii tradycyjnych twarogów stosuje się koagulację kwasową i praktyczne zastosowanie może znajdować tu jej wariant długo- lub krótkotrwały. Metoda długotrwała przewiduje zaprawienie mleka o temperaturze 20–28°C kulturami starterowymi i pozostawienie w tych warunkach na 12–16 godzin w celu uzyskania skrzepu [36]. W metodzie krótkotrwałej do mleka o temperaturze 32–35°C wprowadza się zwiększoną ilość kultur starterowych, tak aby czas koagulacji wynosił 6–8 godzin [44, 53]. Powstanie kwasowego skrzepu mleka jest efektem wzrostu kwasowości. W następstwie ukwaszania przez bakterie kwasu mlekowego, do wartości pH 4, 6, która odpowiada punktowi izoelektrycznemu frakcji białek kazeinowych w temperaturze 20°C [17, 38, 44]. W tych warunkach zewnętrzny ładunek elektryczny tej frakcji białek jest bliski zera. Micele kazeiny tracą zdolność wiązania wody, i tym samym ochronną powłokę hydratacyjną, w następstwie czego ulegają agregacji. Powstaje wtedy żel, który w wolnych przestrzeniach struktury sieciowej zamyka fazę wodną mleka wraz z rozpuszczonymi w niej składnikami [38, 44]. Dojrzały skrzep kwasowy powinien charakteryzować się kwasowością miareczkową rzędu 30–34°SH (°SH to liczba ml 0,25 M roztworu NaOH zużytego do zobojętnienia 100 ml mleka wobec fenoloftaleiny. 1°SH odpowiada 0,0225% zawartości kwasu mlekowego), konsystencją delikatnej galarety, jednolitym wyglądem, bez pęknięć, szczelin oraz wydzielania serwatki, a przy załamaniu dawać przełom o gładkiej powierzchni ścianek [17, 36, 44].

Obróbka skrzepu obejmuje krojenie na prostopadłością oraz delikatne mieszanie, przy jednoczesnym podgrzewaniu, w czasie którego zachodzi stopniowe osuszanie powstałego ziarna twarogowego. Oddzielenie serwatki i ociekanie masy twarogowej może być realizowane przy wykorzystaniu tkanin filtracyjnych lub perforowanych form. Po wstępnym odwodnieniu masę twarogową poddaje się prasowaniu i ewentualnemu porcjowaniu. W opisany sposób produkuje się bardzo cenione przez krajowych konsumentów twarogi kwasowe chude, półtłuste i tłuste prasowane o zwartej strukturze, tzw. krajankę i klinki oraz samoprasowane o analogicznym lub innym kształcie, uzyskiwane przy wykorzystywaniu odpowiednich form [17, 36, 44, 52]. Sery twarogowe niedojrzewające powinny odznaczać się czystym, łagodnym, lekko kwaśnym smakiem i zapachem, jednolitą, zwartą strukturą i konsystencją, oraz jednolitą w całej masie barwą od białej do lekko kremowej [40]. Z kwasowej masy twarogowej mogą być również otrzymywane smarowne twarożki: naturalne lub z dodatkiem np. masła, śmietanki, przypraw, warzyw, owoców, oraz twarogi dojrzewające, które obecnie mają znaczenie wyłącznie regionalne [6, 36, 44, 53].

W klasycznych metodach produkcji serów twarogowych wraz z oddzieloną serwatką tracone jest do 60% składników suchej masy mleka przerobowego [3], w tym cenne odżywczo białka serwatkowe, którym przypisuje się również liczne właściwości prozdrowotne [32, 46]. Jednym z najważniejszych kierunków postępu w technologii twarogów jest dążenie do lepszego wykorzystania białek surowca w produkcie. W tym celu opracowano i wdrożono dotychczas metodę termiczno-wapniową, która polega na poddaniu wysokiej pasteryzacji mleka wzbogaconego w wapń. Wymieniona metoda pozwala na zwiększenie retencji związków azotowych białkowych mleka w serach twarogowych z ok. 75% do blisko 90% [51]. Podobne możliwości daje również metoda z wykorzystaniem transglutaminazy [5].

3. Rola kultur starterowych w produkcji serów twarogowych

Mikroflorę starterową w produkcji serów twarogowych stanowią wyłącznie bakterie kwasu mlekowego, których rola polega na [55]:

- 1) ukwaszaniu mleka i wytworzeniu skrzepu,
- 2) nadawaniu charakterystycznych cech smakowo-zapachowych,
- 3) wytwarzaniu lub nie dwutlenku węgla,
- 4) hamowaniu rozwoju niepożądanego mikroflory.

Mając na uwadze różnice w produkcji oraz właściwościach gotowych wyrobów w zależności od typu sera twarogowego, stosuje się kultury starterowe o odpowiedniej charakterystyce technologicznej (tabela I).

Tabela I

Charakterystyka technologiczna kultur startowych stosowanych w produkcji serów twarogowych [43]

Właściwości kultur	Ser twarogowy		
	kwasowy	kwasowo-enzymatyczny	ziarnisty (cottage cheese)
Skład szczepowy	mieszanina homo- i heterofermentatywnych szczepów	mieszanina homo- i heterofermentatywnych szczepów	mieszanina homo- i heterofermentatywnych szczepów
Szybkość ukwaszania	++ (+)	++	+++
Wytwarzanie gazu	+++	+(++)	-
Produkcja związków aromatotwórczych	++(++)	+(++)	-
Synereza skrzepu	+++	++	++
Stabilność pH	++(+)	++++	+

Legenda: - brak zdolności; + umiarkowana zdolność; ++ średnia zdolność; +++ wysoka zdolność; ++++ bardzo wysoka zdolność

Tabela II

Skład kultur startowych stosowanych w produkcji serów twarogowych

Bakterie kwasu mlekowego	Ser twarogowy		
	kwasowy	kwasowo-enzymatyczny	ziarnisty (cottage cheese)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	+/-	+/-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	+/-	+/-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	+	+	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+/-	+/-	+/-

Legenda: + niezbędne w produkcji; +/- wykorzystywane w zależności od rodzaju sera twarogowego lub stosowanej technologii w zakładzie; - nie mające zastosowania w produkcji danego typu sera twarogowego

Kompozycja szczepowa kultur starterowych do produkcji twarogu kwasowego powinna zapewniać odpowiednią szybkość ukwaszania mleka (czas koagulacji kwasowej), zdolność do tworzenia gazu w skrzepie i syntezę związków aromatotwórczych, a także wysoką podatność skrzepu na osuszanie (wydzielanie serwatki) oraz dobrą stabilność kwasowości czynnej po uzyskaniu pH ze strefy punktu izoelektrycznego frakcji białek kazeinowych (ograniczenie przekwaszania produktu). Zdolność do wytwarzania związków aromatotwórczych i gazu w skrzepie nie jest cechą oczekiwaną w przypadku kultur stosowanych przy produkcji twarogu typu cottage cheese (serek ziarnisty).

Kultury starterowe stosowane do produkcji różnych typów serów twarogowych różnią się między sobą składem mikroflory, zarówno pod względem przynależności rodzajowej, jak i gatunkowej (tabela II). Najmniej zróżnicowany skład mają kultury stosowane do produkcji twarogu ziarnistego. Kultury te zawierają homofermentatywne paciorkowce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris*, o wysokiej dynamice produkcji kwasu mlekowego, sporadycznie wspomagane dodatkiem *Streptococcus thermophilus* głównie w celu zwiększenia oporności fagowej. Skład

kultur wykorzystywanych przy produkcji serów twarogowych kwasowych i kwasowo-enzymatycznych jest bardziej zróżnicowany, gdyż poza homofermentatywnymi paciorkowcami mlekowymi zawierają one również szczepy z gatunku *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* i *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* zdolne do fermentacji cytrynianów. Funkcją paciorkowców mlekowych fermentujących cytryniany jest wytwarzanie CO₂ oraz związków odpowiadających za kształtowanie cech smakowo-zapachowych twarogów [25, 55].

4. Kultury starterowe w produkcji twarogu kwasowego

Oryginalność technologii produkcji twarogu kwasowego polega na otrzymaniu skrzepu z mleka w wyniku sterowanego procesu fermentacji, prowadzonego głównie przez mezofilne paciorkowce mlekowe wprowadzone w postaci kultur starterowych, bez udziału enzymów koagulujących i innych dodatków, a następnie poddaniu go obróbce obejmującej krojenie, dogrzewanie i osuszanie. Podczas obróbki ziarno

Tabela III
Handlowe kultury startowe przeznaczone do produkcji
twarogu kwasowego

Producent	Nazwa handlowa
Danisco/DuPont	PROBAT 322; PROBAT 505; PROBAT 801; PROBAT 802, Probat 222
Chr. Hansen	FLORA DANICA; CHN 11; CHN 19; CHN 22; XT 302; XT 303; XT 601; XT 602; XT 603; XC-X16
CSK Food Enrichment	G 500; G 600; G 700; G1000

twarogowe musi utrzymywać się na powierzchni lub tuż pod powierzchnią serwatki, co gwarantuje uzyskanie produktu o prawidłowej strukturze i konsystencji [43]. Atrakcyjność sensoryczna twarogu stanowi wypadkową jakości mleka, przebiegu procesu produkcyjnego oraz właściwości stosowanych kultur starterowych. Utrzymanie wzrostu popytu na twaróg kwasowy jest możliwe poprzez zwiększenie jego atrakcyjności w zakresie cech organoleptycznych, trwałości, opakowania oraz optymalizacji kosztów produkcji. Podążając za tymi wymaganiami coraz więcej zakładów mleczarskich udoskonala technikę i technologię produkcji twarogu kwasowego [43]. W procesie tym doceniana jest również rola kultur starterowych, których koszt stanowi zaledwie od 0,5 do 1,5% wartości przerabianego mleka, ale pomimo to niemal że w równym stopniu z nim decydują o końcowej jakości otrzymywanego twarogu.

Firmy biotechnologiczne oferują zakładom mleczarskim wiele kultur starterowych do produkcji twarogów kwasowych (tabela III). W kulturach tych homofermentatywne mezofilne paciorkowce mlekowe *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris*, stanowią od 50 do 85% składu bakterii, natomiast homofermentatywne *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i heterofermentatywne *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* i *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* od 15 do 50%. Udział bakterii z rodzaju *Leuconostoc* nie przekracza z reguły 10% ogólnej populacji kultury. Niektóre handlowe kultury do produkcji twarogu nie zawierają w ogóle w swoim składzie szczepów należących do rodzaju *Leuconostoc* (np. kultury G500, G600, G700 firmy CSK). Kultury do twarogu kwasowego

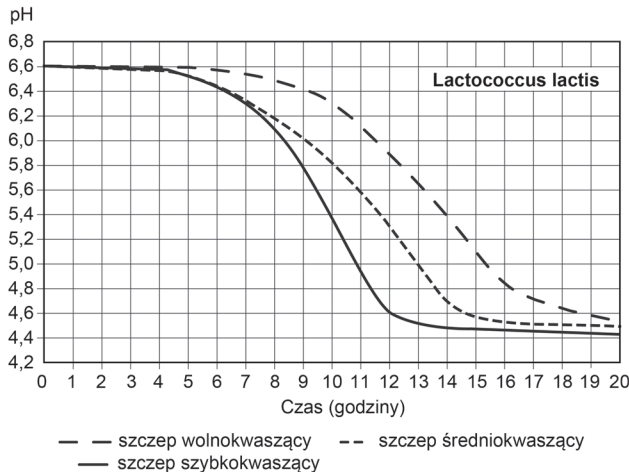
zawierające *Streptococcus thermophilus* mają marginalny udział w rynku.

Do produkcji twarogów kwasowych stosowane są zwykle kultury wieloszczepowe składające się z od kilkunastu do kilkudziesięciu szczepów o zdefiniowanym lub niezdefiniowanym składzie. W kulturach o zdefiniowanym składzie każdy gatunek bakterii reprezentowany jest przez kilka szczepów różniących się powinowactwem fagowym. Wrażliwość szczepów na częstotliwość i konsekwencje infekcji fagowych jest z reguły monitorowana przez producenta kultur we współpracy z zakładami mleczarskimi. W przypadku wysokiej częstotliwości infekcji fagowych danego szczepu w kulturze jest on zastępowany szczepem niewrażliwym. Takie podejście pozwala w sposób kontrolowany utrzymywać wysoką oporność i jakość kultur, bez konieczności zmiany ich nazwy. W odróżnieniu od wielu innych produktów mleczarskich w produkcji twarogu wciąż dużą popularnością cieszą się kultury o niezdefiniowanym składzie np. Flora Danica (Chr. Hansen), Probat 505 (Danisco/DuPont). Zasada komponowania tego typu kultur polega na wielokrotnym pasażowaniu w mleku często nawet kilkuset szczepów należących do różnych gatunków do momentu wytworzenia trwałych pożądaných w produkcji twarogu proporcji między poszczególnymi gatunkami. W konsekwencji końcowy skład kultury jest nieznan. Należy jednak pamiętać, że zarówno do komponowania kultur zdefiniowanych jak i niezdefiniowanych wybierane są szczepy o pożądaných cechach sensorycznych i technologicznych oraz braku wzajemnego antagonizmu. Kultury niezdefiniowane, z uwagi na ogromną liczbę szczepów, nawet w momencie dużego zagrożenia fagowego, pozwalają na wyprodukowanie twarogu o jakości akceptowalnej przez konsumenta.

W zależności od doboru proporcji w kulturze starterowej pomiędzy poszczególnymi gatunkami, a w obrębie gatunków szczepami bakterii fermentacji mlekowej istnieje możliwość sterowania w pewnym zakresie procesem technologicznym i kształtowania jakości twarogu. Wynika to z określonej roli technologicznej jaką spełniają poszczególne bakterie wchodzące w skład kultur starterowych do produkcji twarogu kwasowego (tabela IV). Wielkością udziału oraz odpowiednim

Tabela IV
Rola technologiczna poszczególnych bakterii wchodzących w skład kultur startowych do produkcji twarogu kwasowego [43]

Bakterie kwasu mlekowego	Rola w procesie produkcji twarogu
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Ukwaszanie mleka celem koagulacji
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Ukwaszanie mleka celem koagulacji, uzyskanie skrzepu o odpowiedniej strukturze i konsystencji
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Synteza związków kształtujących cechy smakowo-zapachowe, wytwarzanie CO ₂
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Synteza związków kształtujących cechy smakowo-zapachowe, redukcja aldehydu octowego do etanolu, wytwarzanie CO ₂



Rys. 1. Krzywe ukwaszania mleka przez wybrane szczepy *Lactococcus lactis*

doborem szczepów paciorkowców *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* w kulturze można regulować czas ukwaszania mleka (rys. 1). Do konstrukcji kultur twarogowych selekcjonuje się szczepy *L. lactis* o wysokiej i średniej dynamice ukwaszania, krótkiej fazie adaptacji w mleku, zdolności do wzrostu w dość szerokim zakresie temperatur (od 22 do 32°C) oraz minimalnej aktywności kwaszącej po osiągnięciu pH odpowiadającego punktowi izoelektrycznemu białek kazeinowych [43]. Aktualnie na rynku jest dostępny asortyment kultur do produkcji twarogu zdolnych do fermentacji mleka w szerokim zakresie czasowym w zależności od stosowanej w zakładzie technologii i organizacji pracy. Bardzo trudnym wyzwaniem jest uzyskanie kultur o wysokiej dynamice ukwaszania mleka przy jednoczesnym wytworzeniu dostatecznej ilości CO₂ i związków aromatotwórczych, których nagromadzenie w mleku wymaga stosunkowo długiego czasu fermentacji. Aktualnie granicą maksymalnego kompromisu są kultury do twarogu o czasie fermentacji mleka w granicach 9–10 godzin w temperaturze 29–30°C.

Za charakterystyczne cechy sensoryczne twarogu odpowiadają związki aromatotwórcze, syntetyzowane głównie przez szczepy *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* oraz w mniejszym stopniu *Leuconostoc mesenteroides* [25, 43, 57]. Brak aromatu jest częstym defektem twarogów. Podstawowym składnikiem aromatu twarogu jest diacetyl, a największą akceptacją konsumentów cieszą się produkty zawierające 1–2 mg diacetyl/kg [25]. Generalnie przyjmuje się, że szczepy *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* wytwarzają podczas namnażania w mleku do 10 mg diacetyl/l, natomiast *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* do ok. 5 mg diacetyl/l. Maksymalną zawartość diacetyl stwierdza się po 14–16 godzinach inkubacji w temperaturze 20–25°C, która jest optymalna dla syntezy tego związku [25, 43]. Wytworzony diacetyl nie pozostaje jednak

długo w środowisku i po 2–3 godzinach jego zawartość ulega zmniejszeniu w wyniku reakcji rozkładu katalizowanej przez reduktazę diacetyl do bezwonnej acetoiny, a w kolejnym etapie do 2,3-butandiolu [24]. Dlatego też stosowane w produkcji twarogu kwasowego szczepy powinny charakteryzować się niską aktywnością biosyntezy reduktazy diacetyl. Końcowa koncentracja diacetyl zależy również w dużym stopniu m.in. od jakości mikrobiologicznej mleka, zawartości cytrynianu, będącego jego prekursorem i szybkości ukwaszania. Mleko zawiera średnio 0,2% cytrynianu, jednakże w zależności od pory roku, zanieczyszczeń mikrobiologicznych i sposobu żywienia krów jego zawartość waha się w bardzo szerokich granicach od 0,04 do 0,4%. Stwierdzono, że wzrost zawartości cytrynianu w mleku z 0,19 do 0,5% powoduje zwiększenie produkcji diacetyl od 58 do 74%, zależnie od szczepu i nie wpływa na dynamikę produkcji kwasu mlekowego [25]. Ilość cytrynianu w mleku można zwiększyć poprzez jego bezpośredni dodatek wraz z kulturą starterową lub poprzez dodatek cytrynianów do mleka. Przykładowo w Afryce w celu poprawy cech organoleptycznych niektórych produktów mleczarskich do mleka przerobowego dodawany jest kwas cytrynowy lub sok z cytryny.

Metabolizm cytrynianu do diacetyl zachodzi przy udziale permeazy cytrynianowej, która zarówno w przypadku szczepów *L. lactis* jak i *Leuconostoc* spp. wykazuje najwyższą aktywność przy pH 5,5–6,0 [48]. Poniżej pH 5 aktywność permeazy jest bardzo spowolniona [18]. Dlatego też wolniejsze ukwaszanie mleka w procesie produkcji twarogu sprzyja pobieraniu cytrynianu ze środowiska, a przez to produkcji większej ilości diacetyl. Rolą permeazy jest transport cytrynianu do wnętrza komórki. Enzym ten kodowany jest przez gen *citP* zlokalizowany na plazmidach. Stwierdzono, że inkubacja mleka w temperaturze równej 28°C i wyższej znacznie zmniejsza ilość diacetyl głównie w wyniku jego przyspieszonej redukcji. Na poziom diacetyl wytworzonego w procesie produkcji twarogu wpływają też zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Wyjątkowo silne właściwości redukcji diacetyl posiadają bakterie z rodzaju *Pseudomonas* i bakterie z grupy coli. Istotnym składnikiem aromatu twarogu jest aldehyd octowy, którego obecność w niewielkim stężeniu wpływa pozytywnie na cechy sensoryczne twarogu, ale z kolei jego nadmiar jest bardzo niepożądany. W stężeniu powyżej 1 mg/kg nadaje on twarogom posmak określany jako „trawiasty” („green flavour”). Prawidłowe cechy organoleptyczne twarogu uzyskuje się, gdy stężenie aldehydu octowego jest około czterokrotnie niższe niż diacetyl [27]. Najwyższą zdolnością produkcji aldehydu octowego w produkcji twarogu charakteryzują się bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, w mniejszym stopniu *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* i *Leuconostoc* spp.

[26, 28]. Zawartość aldehydu octowego ulega obniżeniu w wyniku przemiany głównie do etanolu i octanu. Wysoką aktywnością utylizacji aldehydu octowego charakteryzują się bakterie z rodzaju *Leuconostoc* [28, 20].

Tak więc zdaniem autorów w kulturze do produkcji twarogu celowym jest udział tych bakterii nie tylko z uwagi na zdolność wytwarzania dużych ilości CO_2 i produkcji diacetylu. Należy jednak zaznaczyć, że szczepy zarówno z gatunku *Leuconostoc mesenteroides* jak i podgatunku *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* charakteryzują się bardzo wolną dynamiką ukwaszania mleka i nie odgrywają znaczącej roli w produkcji kwasu mlekowego w procesie wyrobu twarogów kwasowych.

Szczepy *L. lactis* subsp. *cremoris* decydują o zwiększeniu i strukturze skrzepu ukwaszonego mleka, a w konsekwencji o wydatku twarogu. Odgrywają one szczególnie ważną rolę w produkcji twarogów samoprasowanych. W produkcji fermentowanych napojów mlecznych od bakterii *L. lactis* subsp. *cremoris* oczekuje się dobrego wiązania wody w skrzepie i minimalizacji synerезy w trakcie ich chłodniczego przechowywania. Natomiast w produkcji twarogu kwasowego pożądane są szczepy o średnich i wysokich uzdolnieniach do uwalniania wody ze skrzepu podczas jego obróbki. Producenci twarogu kwasowego oczekują kultur o bardzo niskiej aktywności metabolicznej w warunkach chłodniczych. Aktywność bakterii mlekowych (ukwaszanie i proteoliza) w procesie przechowywania twarogów w istotny sposób limituje ich termin przydatności do spożycia.

Do produkcji twarogu stosowane są kultury skoncentrowane tzn. zawierające w jednym gramie minimum 1×10^{10} jtk (jednostki tworzące kolonie). W produkcji twarogu stosowane są kultury do bezpośredniego zaszczepiania mleka przerobowego DVI (Direct Vat Inoculation) i kultury BS (Bulk Starter) do produkcji zakwasu w zakładzie mleczarskim, który to zakwas następnie stosowany jest do inokulacji mleka przerobowego.

Szacuje się, że około 80% twarogu w Polsce produkuje się przy użyciu kultur DVI. Kultury DVI produkowane są głównie w dwóch formach: liofilizowanej i głęboko mrożonej (w oparach ciekłego azotu tj. w temperaturze około -100°C), w formie granulatu (doskonalej intensywnie w ostatnich dziesięciu latach). Formę mrożonego granulatu uzyskuje się nalewając płynną biomasę na sito, umieszczone nad oparami ciekłego azotu, o porowatości zapewniającej jej wypływ w postaci kropeł. Przed połączeniem się krople ulegają natychmiastowemu zamrożeniu tworząc formę granulatu. W produkcji kultur BS oprócz wymienionych metod wciąż stosowane są kultury, które rozlane do opakowań jednostkowych są bezpośrednio mrożone w ciekłym azocie w temperaturze -196°C . Kultury bakterii mlekowych w formie mrożonego granulatu są stosowane znacznie częściej niż w formie liofilizowanej



Rys. 2. Krzywe ukwaszania mleka przez kultury starterowe w postaci mrożonej i liofilizowanej

głównie z uwagi na szybszą około 20–30 minut fazę adaptacyjną (rys. 2) i związaną z tym optymalizację procesu ukwaszania i mniejsze ryzyko kontaminacji fagowej. Z reguły na tank zawierający 10 000 litrów mleka przerobowego dodaje się około 1 kg kultury mrożonej o koncentracji minimum 10^{10} jtk/g lub około 100 g kultury liofilizowanej o koncentracji minimum 5×10^{10} jtk/g tak aby na początku fermentacji uzyskać w mleku populację bakterii na poziomie nie niższym niż 10^6 jtk na ml [7]. Po uzyskaniu kwasowości czynnej na poziomie 32–34°SH (0,7–0,8% kwasu mlekowego), uzyskiwana gęstość w mleku fermentowanym przed krojeniem skrzepu koncentracja bakterii mlekowych wynosi z reguły powyżej 10^9 jtk/ml.

Kultury starterowe stosowane w mleczarstwie muszą spełniać określone wymagania dotyczące zanieczyszczeń mikrobiologicznych (tab. V) [International Dairy Federation 149A, [7].

Tabela V

Wymagania dotyczące zanieczyszczeń mikrobiologicznych kultur bakterii kwasu mlekowego dla przemysłu mleczarskiego zgodnie ze standardami IDF [International Dairy Federation 149A, Chr. Hansen Bulletin]

Rodzaj zanieczyszczeń	Forma kultur do bezpośredniego zaszczepiania mleka (DVI)	
	Mrożone	Liofilizowane
	jtk/g	
Bakterie z grupy coli	< 1	< 10
<i>Enterococcus</i>	< 10	< 10
Pleśnie	< 1	< 10
Ogólna liczba bakterii niemlekowych	< 500	< 500
Drożdże	< 1	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1	< 10
<i>Salmonella</i>	nieobecne w 25	nieobecne w 25
<i>Listeria</i>	nieobecne w 25	nieobecne w 25

Wysokie wymagania dotyczące zanieczyszczeń mikrobiologicznych kultur starterowych zmuszają ich producentów do wprowadzania wysokich standardów higieny produkcji coraz bardziej zbliżonych do obowiązujących w firmach farmaceutycznych. Jakość kultur starterowych zapewnia w pełni bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktów mleczarskich i nie stanowi krytycznego punktu kontrolnego w systemie HACCP w produkcji twarogów. Poza odpowiednim składem gatunkowym i szczepowym oraz niskim poziomem zanieczyszczeń mikrobiologicznych kolejną bardzo ważną cechą kultur startowych a w szczególności kultur do produkcji twarogu kwasowego jest ich bardzo wysoka oporność na bakteriofagi.

4.1. Oporność na bakteriofagi

Bakteriofagi w skrócie fagi, są wirusami atakującymi bakterie i powszechnie bytują w środowisku naturalnym. Infekcje fagowe są niezwykle niebezpieczne dla stabilności procesów biotechnologicznych z wykorzystaniem bakterii, ponieważ mogą powodować ogromne straty ekonomiczne w zakładach przemysłowych [41].

W przemyśle mleczarskim potencjalnym źródłem fagów wirulentnych wobec starterowych bakterii kwasu mlekowego są mleko, mleko w proszku, preparaty białek serwatkowych, wyposażenie linii produkcyjnych, sprzęt laboratoryjny, powietrze, personel oraz kultury starterowe zawierające lizogenne szczepy (fag w formie utajonej; DNA fagowy wbudowany w chromosom bakterii) [30, 50]. Szacuje się, że około dwie trzecie mleka przerobowego jest poddawane fermentacji z udziałem bakterii mlekowych z gatunku *Lactococcus lactis* i *Leuconostoc mesenteroides*. Pozostała część jest fermentowana przez bakterie z gatunku *Streptococcus thermophilus* i rodzaju *Lactobacillus*. Według danych szacunkowych od 0,1 do 10% procesów fermentacyjnych w zakładach mleczarskich jest zakłócanych infekcjami fagowymi [35].

Wśród technologii mleczarskich najbardziej na infekcje fagowe narażona jest produkcja serów, a w szczególności serów twarogowych. W polskim przemyśle mleczarskim nawet 60–70% zaburzeń technologicznych w procesie produkcji serów twarogowych może być następstwem infekcji fagowych [22]. Główną przyczyną ich występowania jest brak obiektywnych możliwości całkowitej eliminacji fagów w przetwórstwie mleka, których pierwotnym źródłem jest samo mleko. W dobie postępującej globalizacji produkcji, pomimo stopniowej poprawy jakości surowca i higieny produkcji, problem kontaminacji fagami wskazuje tendencję wzrostową szczególnie w produkcji serów dojrzewających i serów twarogowych [33, 49]. Produkcja napojów fermentowanych (jogurt, kefir, maślanka itp.), w odróżnieniu od serów dojrzewających i serów twa-

rogowych, prowadzona jest w zdecydowanie bardziej aseptycznych warunkach i z mleka poddanego często wysokiej obróbce termicznej. Mleko na sery dojrzewające i twarogi poddawane jest niskiej lub krótkotrwałej pasteryzacji, która nie zawsze prowadzi do całkowitej inaktywacji mikroflory mleka a w szczególności z reguły bardziej opornych na temperaturę niż bakterie bakteriofagów. Czas 10-krotnej redukcji fagów w temperaturze 75°C wynosi od 0,5 do 15,9 min. Infekcjom fagowym w produkcji twarogów sprzyja ponadto stosunkowo długi proces fermentacji mleka i obróbka skrzepu często prowadzona w otwartych wannach lub kotłach. Produktem ubocznym w produkcji twarogu jest serwatka, która jest bogatym źródłem starterowych bakterii mlekowych i ich wirulentnych fagów. Wzrost infekcji fagowych występuje też ze zwiększeniem wielkości przerobu mleka w zakładzie. Poza tym w produkcji twarogów kluczową rolę odgrywają bakterie starterowe z gatunku *Lactococcus lactis*, które wśród bakterii mlekowych obok *Streptococcus thermophilus* najczęściej ulegają infekcjom fagowym. Najmniej podatne na infekcje fagowe są bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Stosowane w mleczarstwie bakterie *Lactococcus* głównie ulegają infekcji przez trzy grupy bakteriofagów: 936, c2 i P335 [9, 34].

W technologii produkcji twarogów namnażanie się bakteriofagów może powodować:

- zmniejszenie zdolności kultur do produkcji kwasu mlekowego (opóźnienie procesu ukwaszania),
- rozwarstwienie skrzepu lub jego opadanie na dno wanny lub kotła co powoduje utrudnioną obróbkę,
- zmniejszenie wydajności twarogu,
- zwiększone ryzyko kontaminacji mikroflorą obcą, w tym również patogenną,
- preferowanie rozwoju mikroflory pozostałej po pasteryzacji (z reguły szkodliwej technologicznie),
- problemy z wydzielaniem serwatki (znaczne przedłużenie obróbki skrzepu),
- utratę cech sensorycznych (brak aromatu) [22].

Nie należy również zapominać, że infekcje fagowe oprócz strat ekonomicznych wywołują również ujemne skutki u pracowników produkcyjnych takie jak: stres, obniżenie motywacji i zaangażowania, poczucie winy, wydłużone i nieregularne godziny pracy [50].

Wysiłki producentów kultur starterowych w mleczarstwie i zakładów przetwórstwa mleka zmierzają do utrzymania fagów na poziomie gwarantującym bezpieczeństwo produkcji. Dotychczasowe sposoby walki z zakażeniami wirusowymi na poziomie zakładu produkcyjnego mają przede wszystkim charakter prewencyjny i zmierzają w kierunku coraz powszechniejszego stosowania kultur DVI bakterii mlekowych, rotacji fagowej kultur, kontroli mikrobiologicznej stosowanych surowców, mycia i dezynfekcji sprzętu oraz powierzchni produkcyjnych [23, 50]. Wysoka oporność fagowa kul-

tur twarogowych jest jednym z najbardziej oczekiwanych najtrudniejszym do zrealizowania wyzwaniem dla producentów kultur mleczarskich. Zakłady mleczarskie dla bezpieczeństwa produkcji i jakości twarogu potrzebują co najmniej trzech kultur starterowych o identycznych cechach technologicznych, o wysokiej oporności fagowej, różniących się powinowactwem fagowym. Kultury te powinny być stosowane naprzemiennie w wypracowanym doświadczalnie systemie rotacyjnym uwzględniającym kolejność i okresy ich używania.

Prace badawcze nad bakteriofagami głównie koncentrują się na poznaniu mechanizmów genetycznych zjadliwości fagów, stanowiących poważny problem w przemyśle mleczarskim [11, 49]. Duże nadzieje dla mleczarstwa upatruje się w odkrytym w 2007 roku u bakterii *Streptococcus thermophilus* obronnym systemie CRISP/Cas, który pozwala na sterowane nadawanie oporności fagowej bakteriom mlekowym [39].

U bakterii mlekowych występują również pozachromosomalne struktury zwane plazmidami, które odgrywają niezwykle istotną rolę w adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Wykazano, że plazmidowy DNA może kodować wiele cech, m.in.: zdolność do metabolizmu laktozy oraz innych disacharydów, metabolizm glukonianu, pentoz, biosyntezę bakteriocyn, oporność na antybiotyki i metale ciężkie, zdolność katabolizmu cytrynianu, mechanizmy oporności na bakteriofagi, aktywność dekstranosacharazy [8, 15]. Niektóre z tych cech mają istotne znaczenie technologiczne m.in. przy produkcji twarogu.

Rozwój badań nad genetyką bakterii mlekowych pozwolił na uzyskanie danych, które umożliwiły poznanie szlaków przemian metabolicznych laktozy, enzymatycznej hydrolizy kazeiny, katabolizmu cytrynianu prowadzącego do wytworzenia związków zapachowych, wpływających na właściwości organoleptyczne produktu spożywczego czy też produkcji bakteriocyn, oraz mechanizmów oporności bakterii na bakteriofagi. W wyniku tych badań udało się ustalić mechanizmy regulacyjne, które kontrolują ekspresję genów zaangażowanych w te zjawiska [1, 31].

4.2. Rola bakteriocyn

Również produkcja bakteriocyn przez bakterie jest związana z obecnością plazmidów w komórkach. Bakteriocyny są to niskocząsteczkowe związki chemiczne zbudowane z prostych peptydów lub kompleksów polipeptydów, wykazujące właściwości antybakteryjne, zazwyczaj wobec gatunków blisko spokrewnionych z producentem [19]. Produkowane są m.in. przez bakterie Gram-dodatnie, w tym bakterie mlekowe z rodzaju: *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc*. Synteza bakteriocyn zachodzi pod kontrolą genów zlokalizowanych na bakteryjnym chromosomie, na plazmidach lub na

transpozonach. Znacznie częściej operony bakteriocyn zlokalizowane są na plazmidach. Taka lokalizacja sprzyja wewnątrz- i międzygatunkowemu rozprzestrzenianiu się genów, kodujących bakteriocyny wśród bakterii fermentacji mlekowej. Produkcja bakteriocyn z jednej strony utrudnia konstruowanie kultur starterowych, ponieważ może dochodzić do wzajemnej inhibicji szczepów w obrębie kultur mieszanych. Z drugiej strony bakteriocyny mogą odgrywać niezmiernie pożądaną rolę w hamowaniu rozwoju mikroflory niepożądaną technologicznie i patogennej w procesie produkcji twarogu.

4.3. Aktywność proteolityczna i lipolityczna

Umiarkowana aktywność proteolityczna i lipolityczna bakterii starterowych skutkuje wysoką wydajnością twarogu, poprzez obniżenie stopnia retencji białka i tłuszczu do serwatki, i zapobieganiem zmianom smakowym w produkcie w procesie przechowywania.

Do produkcji twarogu powinny być selekcionowane szczepy bakterii mlekowych o bardzo niskiej aktywności proteolitycznej. Wysoka aktywność proteolityczna szczepów powoduje zmniejszony wydatek twarogu, związany z nadmiernym uwalnianiem białka do serwatki oraz może powodować niepożądane zmiany organoleptyczne twarogu np. gorzki smak, wyczuwalną proteolizę pod koniec okresu przydatności do spożycia. Bakterie mlekowe stosowane do produkcji twarogu z rodzaju *Lactococcus* i *Leuconostoc* z natury charakteryzują się bardzo ograniczoną aktywnością lipolityczną, dlatego też przy badaniach przesiewowych szczepów nie bada się z reguły ich aktywności lipolitycznej.

4.4. Produkcja zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS)

Niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Lactococcus* mają zdolność do biosyntezy zewnątrzkomórkowych polisacharydów. Polimery te lub szczepy je produkujące można wykorzystywać, jako naturalne zagęstniki produktów przemysłu mleczarskiego poprawiające ich cechy organoleptyczne, zwiększające lepkość i zabezpieczające produkt przed zjawiskiem synerazy. Niektóre polisacharydy mogą pozytywnie oddziaływać na zdrowie, ponieważ posiadają właściwości probiotyczne i antynowotworowe [14, 37]. Najważniejszą jednak funkcją, z punktu widzenia konsumenta, jest ich rola w tworzeniu cech organoleptycznych produktów mleczarskich. W mleczarstwie znalazły przede wszystkim zastosowanie szczepy bakterii mlekowych produkujące EPS o wysokiej lepkości, krótkiej strukturze i odporności na niskie pH. Ponadto EPS powinny charakteryzować się wysoką stabilnością na siły ścinające,

którym poddawane jest mleko fermentowane w procesie jego obróbki (krojenie i ogrzewanie skrzepu w przypadku serów lub wychładzania, pakowania i transportu w przypadku napojów fermentowanych). Ważną pożądaną cechą EPS powinna być też ich maksymalna zdolność do odbudowy zniszczonej struktury w wyniku stosowanych procesów w mleczarstwie. W produkcji twarogu kwasowego mogą znaleźć zastosowanie szczepy z rodzaju *Lactococcus* lub *S. thermophilus* produkujące EPS do zwiększenia retencji białek serwatkowych w skrzepie a tym samym wydatku twarogu oraz podwyższenia zawartości wody w twarogu i poprawę jego związłości. Zauważono, że egzopolisacharydy o ładunku neutralnym zbyt słabo oddziałują z kazeiną. Dlatego też należy mieć na uwadze obecność lub brak ładunku syntetyzowanych egzopolisacharydów (EPS), poziom otrzymanego zakwaszenia i interakcje z innymi szczepami podczas selekcji szczepów starterowych do produkcji serów twarogowych.

Istotny wpływ na właściwości EPS ma różnorodność komponentów, ich przestrzenny układ i ładunek. Egzopolisacharydy o ładunku neutralnym polepszają lepkość, ale nie elastyczność, w przypadku zaś EPS naładowanych ujemnie mamy do czynienia ze współdziałaniem z ładunkiem dodatnim kazeiny. Wszystkie wymienione cechy takie jak elastyczność i lepkość mogą zmieniać się w zależności od struktury i obecności EPS. Na uzyskanie odpowiedniej lepkości ma wpływ nie ilość egzopolisacharydów, ale właśnie ich struktura. Różne rodzaje bakterii kwasu mlekowego syntetyzują swoiste EPS, dzięki temu istnieje szeroka gama struktur tych biopolimerów, które determinują właściwości EPS a tym samym ewentualne zastosowanie. [42]. Wiadomo, że egzopolisacharydy o wysokiej masie cząsteczkowej odznaczają się wyższą lepkością. W przypadku niskiej masy molekularnej oznaczają się gorszą lepkością, ale obserwacje wskazują również, że krótsze polisacharydy są w stanie lepiej wchodzić w interakcje z białkami, co dalej prowadzi do wzrostu stabilności mieszaniny białko-EPS.

5. Podsumowanie

Sery twarogowe, a w szczególności twarogi kwasowe są charakterystyczne dla asortymentu wyrobów mleczarskich w niektórych krajach Europy Środkowej i Wschodniej. Sery twarogowe w żywieniu człowieka są źródłem pełnowartościowego białka, lekkostrawnego tłuszczu, witamin z grupy B oraz składników mineralnych. Spożycie serów twarogowych w Polsce przekracza wyraźnie konsumpcję serów dojrzewających i topionych.

Do produkcji twarogu kwasowego konieczne są tylko dwa składniki: mleko i kultury starterowe bakterii

mlekowych. Kultury starterowe determinują w znaczącym stopniu przebieg procesu technologicznego, jakość uzyskanego twarogu i termin jego przydatności do spożycia. W składzie kultur do twarogu kwasowego decydującą rolę odgrywają bakterie z rodzaju *Lactococcus* i *Leuconostoc*. Podstawowymi charakterystycznymi wyróżnikami kultur do produkcji twarogu kwasowego, w stosunku do innych kultur konstruowanych w oparciu o bakterie mlekowego z rodzaju *Lactococcus* i *Leuconostoc* (np. do napojów fermentowanych), jest ich: bardzo wysoka oporność i zróżnicowane powinowactwo fagowe; zdolność do tworzenia skrzepu podatnego na wydzielanie serwatki i obkurczanie się (synerezę); wysokiej aktywności wytwarzania związków kształtujących aromat (głównie diacetylu); odpowiedniej zdolności gazowania przez produkcję CO₂, zapewniającego utrzymanie ziarna na lub tuż pod powierzchnią serwatki podczas dogrzewania i mieszania skrzepu. Z kolei cechami wspólnymi kultur do produkcji napojów fermentowanych i twarogów kwasowych konstruowanych w oparciu o szczepy z rodzaju *Lactococcus* i *Leuconostoc* jest: zapewnienie stabilnej kwasowości skrzepu w zakresie pH 4,60–4,45; umiarkowane uzdolnienia proteolityczne i lipolityczne; uzyskanie czasu ukwaszania mleka w granicach 10–16 godzin; antagonistyczne właściwości do mikroflory szkodliwej technologicznie; mała wrażliwość na zmiany składu fizykochemicznego mleka i ograniczone uzdolnienia fermentacyjne w warunkach chłodniczego przechowywania produktów. Dodatkowymi oczekiwaniami producentów twarogu kwasowego wobec kultur jest zwiększenie jego wydatku poprzez ograniczenie przemieszczania składników mleka do serwatki między innymi poprzez zastosowanie szczepów produkujących EPS.

Reasumując, selekcja szczepów, a następnie konstruowanie kultur o zbalansowanym gatunkowo i stabilnym składzie w procesie wyrobu twarogów kwasowych jest wciąż bardzo złożonym i trudnym wyzwaniem dla producentów kultur mleczarskich.

Prace powstała dzięki udziałowi i finansowaniu grantów Narodowego Centrum Nauki NN 312 351539 oraz NN 312 688540

Piśmiennictwo

1. Aleksandrak-Piekarczyk T., Polak J., Jezierska B., Renault P., Bardowski J.: Genetic characterization of the CcpA-dependent, cellobiose-specific PTS system comprising CelB, PtcB and PtcA that transports lactose in *Lactococcus lactis* IL1403. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 186–194 (2011)
2. Badel S., Benardi T., Michaud P.: New perspectives for *Lactobacilli* exopolisacharides. *Biotechnology Advances*, **29**, 54–66. (2011)
3. Bednarski W.: Doskonalenie technologii oraz organizacji przetwarzania serwatki w Polsce. *Przem. Spoż.* **2**, 32–34 i 44 (2001)

4. Bohdziewicz K.: Twaróg – pierwszy świeży ser świata. *Przegl. Mlecz.* **2**, 4–8 (2009)
5. Bohdziewicz K.: Wpływ transglutaminazy na proces produkcji, wydatek oraz jakość twarogów. *Przegl. Mlecz.* **2**, 4–9 (2010)
6. Bohdziewicz K., Śmietana Z.: Twarogi – terażniejszość i przyszłość. *Kalejdoskop Mlecz.* **2**, 32–35 (2007)
7. Chr. Hansen Bulletin: Product range: Dairy cultures and enzymes, Copenhagen, Denmark, 2007
8. Davidson B.E., Kordias N., Dobos M., Hillier A.J.: Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, **70**, 161–183 (1996)
9. Deveau H., Labrie S.J., Chopin M.C., Moineau S.: Biodiversity and classification of *lactococcal* phages. *Appl. Environment. Microbiol.* **72**, 4338–4346 (2006)
10. Drider D, Bekal S, Prévost H.: Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Genet. Mol. Res.* **3**, 273–281 (2004)
11. Durmaz E., Klaenhammer T.R.: Genetic analysis of chromosomal regions of *Lactococcus lactis* acquired by recombinant lytic phages. *Appl. Environment. Microbiol.* **66**, 895–903 (2000)
12. Galle S., Schwab C., Anrendt E.K., Ganzle M.G.: Structural and rheological characterization of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiology*, **28**, 547–553 (2011)
13. Garcí'a-Quintañ's N., Magni C., de Mendoza, D., López P.: The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl. Environment. Microbiol.* **64**, 850–857 (1998)
14. Gibson G.R., Robertfroid M.B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutrition*, **124**, 1401–1412 (1995)
15. Górecki R.K., Koryszewska-Bagińska A., Gołębiewski M., Żylińska J., Grynberg M., Bardowski J.K.: Adaptative potential of the *Lactococcus lactis* IL594 strain encoded in its 7 plasmids. *PLoS ONE*, **6**, 1–12 (2011)
16. Górską-Warsewicz H.: Rozwój rynku produktów mleczarskich. *Przem. Spoż.* **10**, 20–23 (2005)
17. Holanowski A.: Twarogi i serki twarogowe. *Wyd. Spółdzielcze*, Warszawa, 1986
18. Hugenholtz J.: Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 165–178 (1993)
19. Hugenholtz J., Perdon L., Abee T.: Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4216–4222 (1993)
20. Keenan T.W., Lindsay R.C., Day E.A.: Acetaldehyde utilization by *Leuconostoc* species. *Appl. Microbiol.* **14**, 802–806 (1966)
21. Kłobukowski J., Cichon R.: Wartość odżywcza wybranych produktów mleczarskich. Część I. Wartość odżywcza twarogów. *Przem. Spoż.* **12**, 26–29 (1999)
22. Kołakowski P., Rybka J.: Przyczyny występowania zaburzeń procesów fermentacyjnych (Sposób zapobiegania infekcjom fagowym w przemyśle mleczarskim). *Biul. Inform. Rhodia Food Biolacta*, **25**, 8–11 (2001)
23. Kołakowski P., Rybka J., Fetliński A.: Przyczyny występowania zaburzeń procesów fermentacyjnych (Bakteriofagi w przemyśle mleczarskim). *Biul. Inform. Rhodia Food Biolacta*, **24**, 7–8, 13–14 (2001)
24. Levata-Jovanovic M., Sandine W.E.: Citrate utilisation and diacetyl production by various strains of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* **79**, 1928–1931 (1996)
25. Libudzisz Z.: Tworzenie związków aromatu przez bakterie fermentacji mlekowej Bakterie fermentacji mlekowej – klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie, Wyd. Politechniki Łódzkiej, 1998, s. 110–122
26. Libudzisz Z., Piątkiewicz A., Oberman H., Lubnauer M.: Heterogeneity of the physiological activity of *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. strains. *Acta Microbiol. Pol.* **42**, 181–192 (1993)
27. Lindsay R.C., Day E.A., Sandine W.E.: Green flavor defect in lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.* **48**, 863–869 (1965)
28. Liu S.Q., Asmundson R.V., Holland R., Crow V.L.: Acetaldehyde metabolism by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* under stress conditions. *Int. Dairy J.* **7**, 175–183 (1997)
29. Looijesteijn P.J., Trapet L., de Vries E., Abee T., Hugenholtz J.: Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 71–80 (2001)
30. Madera C., Monjardin C., Suarez J.E.: Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7365–7371 (2004)
31. Mahr K., Hillen W., Titgemeyer H.: Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the CcpA region. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 277–283 (2000)
32. Marshall K.: Therapeutic application of whey protein. *Altern. Med. Rev.* **9**, 136–156 (2004)
33. McIntyre K., Heap H.A., Davey G.P., Limsowtin G.K.Y.: The distribution of lactococcal bacteriophage in the environment of a cheese manufacturing plant. *Int. Dairy J.* **1**, 183–197 (1991)
34. Moineau S., Fortier J., Ackermann H.W., Pandian S.: Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Can. J. Microbiol.* **38**, 875–882 (1992)
35. Moineau S., Levesque C.: Control of bacteriophages in industrial fermentations Bacteriophages: Biology and Applications, Eds Kutter E., Sulakvelidze A., Boca Raton, USA: CRC Press, 285–296 (2005)
36. Obrusiewicz T.: Technologia mleczarstwa. Cz. 2. *Wyd. Szkolne i Pedagogiczne*, Warszawa, 1995
37. Oda M., Hasegawa H., Komatsu S., Kambe M., Tsuchiya F.: Antitumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1623–1625 (1983)
38. Oziemkowski P., Cais-Sokolińska D.: Kwas mlekowy w wybranych technologiach mleczarskich. *Przegl. Mlecz.* **11**, 276–279 (1994)
39. Plech M., Kołakowski P.: CRISPR/Cas – naturalny mechanizm obrony LAB przed fagami. *Przem. Spoż.* **66**, 38–41 (2012)
40. Mleko i przetwory mleczarskie. Sery twarogowe niedojrzewające. *PN-91/A-86300*
41. Rasololo E.A., St-Gelais D., LaPointe G., Roy D.: Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int. J. Food Microbiol.* **138**, 108–118 (2010)
42. Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P.: An overview of the functionality of the exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria; *Int. Dairy J.* **12**, 163–171(2002)
43. Rybka J., Kołakowski P., Fetliński A.: Wymagania dla kultur starterowych do produkcji tradycyjnego twarogu kwasowego. *Biul. Inform. Rhodia Food Biolacta*, **20**, 3–6 (2000)
44. Rymaszewski J., Śmietana Z.: Sery dojrzewające i sery twarogowe (w) Mleczarstwo – zagadnienia wybrane. Tom 2, red. S. Ziajka, *Wyd. ART, Olsztyn*, 1997, s. 151–209
45. Seremak-Bulge J.: Przetwórstwo mleka. *Rynek Mleka: stan i perspektywy*, **41**, 10–12 (2011)
46. Smithers G.W.: Whey and whey proteins-from, gutter-to-gold'. *Int. Dairy J.* **18**, 695–704 (2008)
47. Smoleński Z., Zdziarska T.: Przetwórstwo mleka. *Rynek Mleka: Stan i perspektywy*, **37**, 9–11 (2009)
48. Starrenburg M.J.C., Hugenholtz, J.: Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3535–3539 (1991)

49. Szczepańska A.K., Hejnowicz M.S., Kołakowski P., Bardowski J.: Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment. *Acta Biochim. Pol.* **54**, 151–158 (2007)
50. Szczepankowska A.K., Górecki R.K., Kołakowski P., Bardowski J.: Lactic acid bacteria resistance to bacteriophage and prevention techniques to lower phage contamination in dairy fermentation (w) *Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes*, ed. Marcelino Kongo, ISBN 978-953-51-0955-6, 2, 23–72 (2013) (<http://dx.doi.org/10.5772/51541>).
51. Szpendowski J., Śmietana Z., Płodzień T., Lewandowski K., Owczarzak A., Buczma E.: Technologia serów twarogowych o podwyższonej wartości odżywczej. *Przeł. Mlecz.* **1**, 4–9 (2007)
52. Śmietana Z., Derengiewicz W., Jankowski A., Wojdyński T.: Nowa technika i technologia produkcji twarogów. *Przeł. Mlecz.* **9**, 288–292 (1998)
53. Śmietana Z., Szpendowski J., Bohdziewicz K., Świgoń J.: Ogólne zasady produkcji twarogów i serków twarogowych. Część I. Metoda tradycyjna. *Przeł. Mlecz.* **1**, 7–9 (1994)
54. Świetlik K.: Spożycie mleka i jego przetworów. *Rynek Mleka: Stan i perspektywy*, **41**, 13–15 (2011)
55. Usajewicz I.: Mikrobiologia mleka i jego przetworów (w) *Mleczarstwo*. Tom 1, red. S. Ziajka, Wyd. UWM, Olsztyn, 2008, s. 152–204
56. Welman A.D., Maddox I.S.: Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges; *Trends in Biotechnol.* **21**, 269–274 (2003)
57. Walsh B., Cogan T.M.: Diacetyl, acetoin, and acetaldehyde production by mixed-species lactic starter cultures. *Appl. Microbiol.* **26**, 820–825 (1973)
58. Żelazna K., Popielarska A.: Mleko i produkty mleczarskie w żywieniu człowieka. *Przem. Spoż.* **10**, 26–31 (2003)