

**Diss. Nr. 4630**

**Konzentration und Konfiguration  
der Milchsäure  
im reifenden Emmentalerkäse**

**ABHANDLUNG**

zur Erlangung  
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften  
der

**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH**

vorgelegt von

**CHRISTIAN STEFFEN**

dipl. Ing.-Agr. ETH  
geboren am 8. Juli 1942  
von Trub (Kt. Bern)

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. E. Zollikofer, Referent  
Prof. Dr. J. Neukom, Korreferent

Juris Druck + Verlag Zürich  
1971

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Milchsäuregärung und dem Lactatabbau im Emmentalerkäse.

Es werden bestehende und neue Methoden zur Bestimmung der Milchsäurekonzentration und deren Konfiguration überprüft. Ein chemisches Verfahren für den Gesamtmilchsäurenachweis und je eine enzymatische Methode zur Ermittlung des L(+)- bzw. D(-)-Lactates sind auf Grund eingehender Untersuchungen an milchsäurehaltigen Lösungen, Milch- und Käseproben ausgewählt worden. Die drei Nachweisverfahren eignen sich für Serienbestimmungen im Laboratorium. Der mittlere Fehler jeder Methode liegt unter 3 %.

Die Milchsäureproduktion und -Konfiguration wird an Stämmen von *Sc. thermophilus*, *Lb. helveticus* und *Lb. lactis* untersucht.

Die bekannte Tatsache, dass die Streptokokken weniger Milchsäure bilden als die Lactobacillen, kann bestätigt werden. Die drei thermophilen Milchsäurebakterienarten zeigen auch deutliche Unterschiede in der Konfiguration der Milchsäure:

- *Sc. thermophilus*-Stämme bilden fast ausschliesslich L(+)-Lactat
- *Lb. lactis*-Stämme produzieren über 90 % D(-)-Lactat
- *Lb. helveticus*-Stämme bilden beide Milchsäureisomere. Der L(+)-Lactatanteil an der Gesamtmilchsäure beträgt ca. 2/3.

Variationen in der Zusammensetzung des Nährmediums, in der Bebrütungs-temperatur, im pH-Wert des Nährsubstrates und in der Inkubationsdauer beeinflussen das Verhältnis von L(+)- zu D(-)-Lactat kaum. Einzig bei den *Lb. helveticus*-Stämmen verschiebt sich das Verhältnis mit zunehmender Inkubationszeit zugunsten des D(-)-Isomers.

In 100 Käsen aus 33 Käsereien werden nach 24 Stunden Milchsäurekonzentrationen zwischen 66 und 189 (Mittelwert 137)  $\mu\text{Mol/g}$  gefunden. Der L(+)-Lactatanteil an der Gesamtmilchsäure variiert zwischen 23 und 93 %. Nach einer 3-monatigen Reifung weisen dieselben Käse durchschnittlich 52  $\mu\text{Mol}$  Milchsäure/g auf, wobei der Variationsbereich relativ gross ist.

An 15 Emmentalerkäsen mit normaler Fabrikation wird der Einfluss der Rohkulturen auf den Milchsäuregehalt verfolgt. Es zeigt sich, dass ca. 90 % der Milchsäure innerhalb der ersten 24 Stunden gebildet werden. Bis zum Abschluss

der Milchsäuregärung nach 10 bis 30 Tagen entstehen durchschnittlich 133  $\mu\text{Mol}$  Milchsäure/g (Variationsbereich 120 bis 160  $\mu\text{Mol/g}$ ). Die Milchsäureabnahme beginnt nach ca. 30 Tagen. Bis zum 60. Tag werden ungefähr 60 % und bis zum 140. Tag rund 80 % der maximalen Milchsäuremenge abgebaut.

Mit Stammgemischen der drei thermophilen Milchsäurebakterienarten haben wir je 2 Käse hergestellt.

In den *Sc. thermophilus*-Käsen wird innerhalb der ersten 4 Stunden ein intensiver Milchsäureanstieg gemessen. Der maximale Milchsäuregehalt von 70  $\mu\text{Mol}$  nach 10 Tagen ist bereits am 40. Tag vollständig abgebaut. In den *Lactobacillen*-Käsen ist die Milchsäureproduktion um 4 bis 8 Stunden verzögert. Nach einem Tag ist nur die Hälfte der maximalen Milchsäuremenge von ca. 170  $\mu\text{Mol/g}$  erreicht. Einen schleppenden Lactatabbau (30 % nach 60- und 65 % nach 140 Tagen) weisen besonders die *Lb. lactis*-Käse auf.

Der Hauptanteil der Milchsäure in den *Sc. thermophilus*-Käsen ist L(+)-Lactat. In den *Lb. helveticus*-Käsen sind beide Isomere in äquivalenter Menge nachweisbar und in den *Lb. lactis*-Käsen überwiegt die D(-)-Milchsäure. Daraus geht hervor, dass durch eine gezielte Auswahl der Milchsäurebakterienstämme die Lactatkonfiguration im Käse beeinflusst werden kann.

## Summary

Lactic acid formation and degradation of lactate in Emmental cheese have been studied.

An examination of existing and new methods for the determination of lactic acid concentration and configuration was carried out. Based on detailed investigations with lactic acid containing solutions, milk- and cheese samples, a chemical process for the determination of total lactic acid, as well as two enzymatic methods for the specification of L(+) and D(-) lactate were chosen. These three methods are applicable for laboratory analysis in series. The average error of each method is under 3%.

Lactic acid formation and configuration have been studied with *Sc. thermophilus*-, *Lb. helveticus*- and *Lb. lactis* strains.

The known fact, that streptococci form less lactic acid than lactobacilli, was confirmed. Distinct differences in lactic acid configuration could be observed between the three thermophilic lactic acid bacteria species.

- *Sc. thermophilus* strains nearly always form L(+) lactate.
- *Lb. lactis* strains produce over 90% D(-) lactate.
- *Lb. helveticus* strains produce both lactic acid isomers. Two third of the total lactic acid was found to be L(+) lactate.

Variations in the composition of the medium, of the incubation temperature, the pH value of the medium and the incubation time, have practically no influence on the ratio L(+)/D(-) lactate. Only *Lb. helveticus* strains could be influenced by an increased incubation time to produce more D(-) isomers.

Lactic acid concentration after 24 hours was established in 100 cheese loafs from 33 different cheese factories, and values between 66 and 189  $\mu\text{Mol/g}$  (average 137  $\mu\text{Mol/g}$ ) were found. The L(+)lactate part in total lactic acid varied between 23% and 93%. After three months ripening the same cheese loafs contained an average of 52  $\mu\text{Mol/g}$  lactic acid, the range of variations being relatively large.

The influence of starter cultures on the lactic acid content was studied with 15 Emmental cheese loafs. 90% of the lactic acid was formed during the first 24 hours. Up to the conclusion of lactic acid formation, after 10 - 30 days, an average of 133  $\mu\text{Mol/g}$  lactic acid are produced (variation range 120-160  $\mu\text{Mol/g}$ ). Diminution of lactic acid starts after 30 days. Till the 60th day about 60%, and up to the 140th day around 80% of the maximal total lactic acid content were degraded.

Cheese, manufactured with starter cultures consisting of *Str. thermophilus* only, showed an intensive lactic acid increase during the first 4 hours. The maximal lactic acid content, however, amounts to only 70  $\mu\text{Mol/g}$  after 10 days. Complete degradation has taken place on the 40th day.

On the other hand, lactic acid formation is retarded when the starter culture consists of lactobacilli only, whereas, the maximal quantity of lactic rises up to about 170  $\mu\text{Mol/g}$ . This kind of cheese shows a tardy lactate degradation.

In cheese, manufactured with *Str. thermophilus* starter only, mostly L(+) lactate was found. When the starter culture consisted of *Lb. helveticus* only, both isomers could be detected in equivalent quantities. In *Lb. lactis* starter cheese, D(-)lactic acid was predominating.

It is, therefore, possible to influence lactate configuration in cheese through the choice of lactic acid bacteria strains.

## RESUME

La fermentation lactique et la décomposition du lactate dans les fromages d'Emmental font l'objet de la présente étude.

Des méthodes éprouvées et nouvelles pour déterminer la concentration de l'acide lactique et sa configuration ont été vérifiées. En se basant sur des expériences approfondies faites avec des solutions contenant de l'acide lactique, des échantillons de lait et de fromage, notre choix s'est porté sur un procédé chimique permettant de déceler la totalité de l'acide lactique et sur deux méthodes enzymatiques, l'une pour la recherche du lactate L(+) et l'autre pour celle du lactate D(-). Les trois procédés se prêtent aux dosages de laboratoire en séries. L'erreur moyenne de chaque méthode est inférieure à 3%.

La production et la conformation de l'acide lactique est examinée à l'aide de souches de *Sc.thermophilus*, *Lb.helveticus* et *Lb.lactis*.

Déjà connu, le fait acquis que les streptocoques forment des quantités moins élevées d'acide lactique que les lactobacilles peut être confirmé. De plus, la configuration de l'acide lactique des trois espèces de bactéries lactiques thermophiles révèle également des différences notables:

- Les souches de *Sc.thermophilus* forment presque exclusivement du lactate L(+)
- Les souches de *Lb.lactis* engendrent plus de 90% de lactate D(-)
- Les souches de *Lb.helveticus* donnent naissance aux deux isomères de l'acide lactique. Le lactate L(+) constitue environ les 2/3 de la totalité de l'acide lactique.

Des variations de la composition du milieu nutritif, de la température d'incubation, de la valeur pH du substrat nutritif et de la durée d'incubation n'exercent qu'une influence insignifiante sur le rapport entre le lactate L(+) et D(-). C'est seulement dans les souches de *Lb.helveticus* que sous l'influence de l'augmentation de la durée d'incubation la proportion se déplace en faveur de l'isomère D(-).

100 fromages provenant de 33 exploitations ont été examinés: des concentrations d'acide lactique entre 66 et 189  $\mu\text{Mol/g}$  (valeur moyenne 137) y furent décelées. La proportion du lactat L(+) de l'acide lactique total varie entre 23 et 93%. Après une maturation de 3 mois, ces mêmes fromages accusent en moyenne 52  $\mu\text{Mol/g}$  d'acide lactique, le taux de variabilité étant relativement grand.

L'influence qu'exercent les levains sur la teneur en acide lactique a été poursuivie dans 15 fromages d'Emmental fabriqués à des conditions normales.

Il est prouvé qu'environ 90% de l'acide lactique est formé au cours des 24 premières heures. Jusqu'à la fin du processus de la fermentation lactique, c'est-à-dire après 10 à 30 jours, sont produits en moyenne 133  $\mu\text{Mol/g}$  d'acide lactique (variabilité = 120 à 160  $\mu\text{Mol/g}$ ). Après environ 30 jours, l'acide lactique commence à diminuer. 60% environ de la quantité maximale de l'acide lactique est décomposée jusqu'au 60<sup>ème</sup> jour et 80% net jusqu'au 140<sup>ème</sup>.

Nous avons procédé à la fabrication de 2 fromages avec chacun des mélanges de souches contenant trois espèces de bactéries lactiques thermophiles.

Au cours des 4 premières heures, on a pu constater une augmentation intensive de l'acide lactique dans les fromages à teneur de *Sc. thermophilus*. La teneur maximale en acide lactique de 70  $\mu\text{Mol/g}$ , atteinte après 10 jours, est entièrement décomposée le 40<sup>ème</sup> jour déjà.

Dans les fromages à teneur de lactobacillies, la production d'acide lactique est retardée de 4 à 8 heures. Après 1 jour la moitié seulement de la quantité maximale d'acide lactique (environ 170  $\mu\text{Mol/g}$ ) est atteinte. La décomposition du lactate est différée surtout dans les fromages à teneur de *Lb. lactis* (30% près 60- et 65% après 140 jours).

Dans les fromages à teneur de *Sc. thermophilus*, le lactate L(+) constitue la quote-part essentielle de l'acide lactique. Les deux isomères ont été décelés en quantité équivalente dans les fromages à teneur de *Lb. helveticus*, tandis que dans ceux à teneur de *Lb. lactis* prédomine l'acid lactique D(-). Donc par une sélection dirigée des souches de bactéries lactique, la configuration du lactat peut être influencée.