

Einfluss von Temperatur und *S. thermophilus* auf die Herstellung von Joghurt mit milder Geschmackscharakteristik

Von C. Möller, W. Bockelmann und K.J. Heller

Institut für Mikrobiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Standort Kiel, Postfach 60 69, D-24124 Kiel

1. Einleitung

Joghurt wird durch Fermentation mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus* hergestellt (1, 2). Stämme dieser beiden Milchsäurebakterienspezies zeigen beim gemeinsamen Wachstum in Milch das Phänomen der „Protosymbiose“. Mit diesem Begriff wird die Stimulation des Wachstums beider Organismen in Milch beschrieben, die das Resultat des gegenseitigen Zurverfügungstellens von Stoffwechselprodukten beschreibt (3, 4, 5, 6). *S. thermophilus* als die sauerstofftoleranterere Spezies beginnt normalerweise mit dem Wachstum. Die aus den Lactosestoffwechsel stammenden Produkte Formiat und Pyruvat stimulieren das Wachstum von *Lb. bulgaricus* ebenso wie das aus dem Harnstoffabbau stammende CO₂, welches den Sauerstoff-Partialdruck in der Milch verringert (7, 8). Im Gegenzug stellt *Lb. bulgaricus* Aminosäuren und Peptide aufgrund seiner höheren proteolytischen Aktivität dem proteolytisch meist inaktiven *Streptococcus thermophilus* zur Verfügung (9). Als Faustregel lässt sich festhalten, dass *Lb. bulgaricus* etwa bei einem pH-Wert von 5,2 zu wachsen beginnt, während *S. thermophilus* ab einem pH-Wert von 4,4 das Wachstum einstellt. Für das Erreichen niedriger pH-Werte, die im Zusammenhang mit höherer proteolytischer Aktivität zur Bildung von Bitterpeptiden führen kann, wird daher vorwiegend *Lb. bulgaricus* verantwortlich gemacht. Nach Renz und Puhani (10) ist es insbesondere die extrazelluläre Proteinaseaktivität von *Lb. bulgaricus*, welche zur Bildung von Bitterkeit in Joghurt mit niedrigen pH-Werten führt.

Wir haben in den vergangenen Jahren verschiedene Arbeiten zur Herstellung milden Joghurts veröffentlicht. Dabei handelte es sich zum einen um die Isolierung verschiedener *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Mutanten (11, 12, 13) und zum anderen um den Einsatz eines *S. thermophilus* Stammes (14, 15), der durch ein Hitzeschock-Gen in die Lage versetzt war, bei höheren als den üblichen Temperaturen zu fermentieren. In dieser Arbeit beschreiben wir die Charakterisierung zweier *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Mutanten – die Mutanten pH-S64 (11) und pH-P11 (12, 13), die aus einem Screening auf pH-Sensitivität der Säuerung bzw. aus einem solchen auf pH-Sensitivität der Proteolyse hervorgegangen sind – hinsichtlich technologisch wichtiger Parameter, wie Nachsäuerung, Keimzahlen, Sensorik. Dabei wird vor allem der Einfluss verschiedener *S. thermophilus* Stämme sowie unterschiedlicher Fermentationstemperaturen auf diese Parameter untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Bakterienstämme stammten aus der Kultursammlung des Institutes für Mikrobiologie der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel. Sie wurden ursprünglich aus Joghurt isoliert oder von Kulturenherstellern bezogen. Es wurde der Stamm *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 92063 eingesetzt sowie die 12 *Streptococcus thermophilus* Stämme 90188, 90193, 90199, 90200, 90205, 90216, 90230, 90236, 90250, 90337, 90343, 90347, 90350, 90351, 90396 und 90397.

Verwendete Kultivierungsmedien waren M17-Agar nach Terzaghi and Sandine (16), sowie Rogosa- und MRS-Agar, die wie von Möller et al. (11) beschrieben hergestellt wurden.

Zur Konservierung wurden die Stämme als Reinkulturen in Lackmusmilch bei 4°C gelagert und alle 3-4 Monate überimpft. Zusätzlich wurden 0.5 ml von Übernacht-Reinkulturen in Mikrobank™ -Kryogefäßen bei -80°C gelagert.

Die Vorkultivierung erfolgte über Nacht (16 h) in tyndallisierter Magermilch bei 42°C mit fünfmaligem Überimpfen pro Woche.

2.2 Joghurt Fermentation und Bestimmung technologisch wichtiger Parameter

Es wurde stichfester Joghurt produziert. UHT Milch wurde in der geschlossenen Verpackung auf 50°C erhitzt, mit 4 % (v/v) Starterkultur (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *S. thermophilus* jeweils 2 %) angeimpft, und in 500 ml Portionen in sterile, 500 ml-Schraubdeckel-Glasgefäße gefüllt. Inkubation erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen bis zum pH 4.4. Die pH-Werte wurden in parallelen Kulturen aufgezeichnet, wie unter *Säuerungsverhalten* beschrieben. Bei ca. pH 4.4 wurde die Säuerung durch Kühlung auf Eis unterbrochen und die Gefäße danach bei 8°C gelagert. Für jede Starterkultur wurden mindestens zwei Glasgefäße parallel angesetzt, um zumindest direkt nach der Fermentation und nach 4 Wochen Lagerung die benötigten Analysen mit frischen, ungeöffneten Proben durchführen zu können.

Säuerungsverhalten: Säuerungskurven über 24h wurden mit Hilfe eines 8-Kanal pH-Meters (Ingenieurbüro Messelektronik Chemnitz) erstellt. Hierzu wurden 50 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml H-Vollmilch gefüllt, 4%ig angeimpft und bei entsprechender Temperatur im Wasserbad inkubiert. Die Messintervalle betragen 15 min.

Parallel zu Joghurtfermentationen wurde das Säuerungsverhalten in Reagenzgläsern, gefüllt mit 7 ml H-Vollmilch und 4%ig angeimpft, bei entsprechender Temperatur im Wasserbad verfolgt. Mit einer Mikroelektrode wurden die pH-Werte nach vorherigem Vortexen alle 15-30 min gemessen.

Nachsäuerungsverhalten: Nach der Joghurtfermentation wurden die Gefäße bei pH 4,4 (gemessen in parallelen Kulturen; s.o.) im Eisbad abgekühlt und für ca. 4 Wochen bei 8°C gelagert. Danach wurde erneut der pH-Wert gemessen und die Differenz zu pH 4,4 als Wert für die Nachsäuerung berechnet.

Keimzahlbestimmung: Lebendkeimzahlen wurden durch Oberflächenausstrich auf folgenden Agarmedien bestimmt: M17-Agar für *S. thermophilus* und Rogosa- bzw. MRS-Agar für *L. bulgaricus*.

Die Verdünnungsreihe der Joghurtproben erfolgte in Ringerlösung in dezimalen Schritten. 100 µl der einzelnen Verdünnungsstufen wurden ausplattiert und 48 h unter aeroben (M17) und anaeroben (Rogosa, MRS) Bedingungen bei 42°C inkubiert.

Bestimmung der titrierbaren Säure (Milchsäure): Titrierbare Säure wurde entsprechend dem International IDF Standard 150:1991 (17) bestimmt. 10 g Joghurt wurden in ein 50 ml Becherglas gefüllt, mit 10 ml bi-distilliertem Wasser gemischt und mit 0.1 N NaOH titriert, bis pH 8.3 erreicht wurde. Die titrierbare Säure, ausgedrückt als Milchsäure pro 100 g Joghurt, entspricht: $V \times 0.9 / m$, wobei V das Volumen der benötigten NaOH Menge in ml angibt, m für die Menge der zu testenden Probe in g steht, und 0.9 der Konversionsfaktor für Milchsäure ist.

Acetaldehyd-Bestimmung: 40 g Joghurt wurden in einen 100-ml Meßzylinder mit Schliffstopfen abgewogen. Es wurden 4 ml 20 %ige Zitronensäure zugegeben. Das Volumen wurde mit bi-distilliertem Wasser auf 50 ml eingestellt. Nach kräftigem Schütteln wurden 2 ml in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 4°C und 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. 1,5 ml des Überstandes wurden in ein neues Gefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Mindestens 130 ml Überstand wurden mittels der kommerziellen Test-Kombination "Acetaldehyde, No. 668613" von Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), entsprechend der beiliegenden Anleitung auf den Gehalt an Acetaldehyd getestet. Der Test beruht auf der quantitativen Oxidation des Acetaldehyd zu Essigsäure in Gegenwart von Aldehyde-Dehydrogenase und NAD⁺. Die Menge des bei dieser Reaktion gebildeten NADH+H⁺ ist direkt proportional der Menge an oxidiertem Acetaldehyde und wird durch Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt.

2.3 Sensorik

Die sensorische Prüfung der Joghurts erfolgte in der Regel am Tag nach der Herstellung und nach 4 Wochen Lagerung bei 8°C durch eine Sensorikgruppe an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Kiel. Der Beurteilung der Joghurts lagen die deutschen DLG-Richtlinien (Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft, Frankfurt a. M.) zugrunde. In die Bewertung einbezogen wurden Geruch, Geschmack sowie die Konsistenz. Für die Intensitäten wurde 1 für sehr schwach, 2 für schwach, 3 für deutlich, 4 für stark und 5 für sehr stark vergeben.

3. Ergebnisse und Diskussion

Der *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Wildtyp Stamm 92063 wurde zu Isolierung der beiden Mutanten pH-S64 und pH-P11 eingesetzt. Nach chemischer Mutagenese mit MNNG, wurde pH-S64 aus einem Screening auf Stämme mit pH-sensitiver Säuerung und pH-P11 aus einem solchen auf Stämme mit pH-sensitiver Proteolyse isoliert. Um weitere Informationen bezüglich der technologischen Eignung der Mutanten zu erhalten, wurden beide mit unterschiedlichen *S. thermophilus* Stämmen zur Joghurtherstellung eingesetzt. Die Mutante pH-P11 wurde darüber hinaus in weiteren Joghurtfermentationen mit verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen bei verschiedenen Fermentationstemperaturen getestet.

3.1 Einfluss von *S. thermophilus* auf die Joghurtfermentation mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Wildtyp, pH-S64 und pH-P11

Alle Joghurtfermentationen wurden bei 42°C in 500 ml Schraubdeckelgläsern durchgeführt. H-Milch wurde mit jeweils 2 % (v/v) Übernachtskulturen von *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *S. thermophilus* beimpft. Bei pH 4,4 (gemessen in parallel angesetzten Fermentationen in Reagenzgläsern) wurden die Kulturen in Eiswasser gekühlt und danach bei 8°C gelagert. Folgende Parameter wurden gemessen:

1. Die Dauer der Säuerung bis zum Erreichen des pH 4,4;
2. der nach 24-stündiger Fermentation erreichte pH-Wert in den parallel angesetzten Kulturen;
3. die *Lactobacillus* Zellzahl nach 24-stündiger Fermentation in den parallel angesetzten Kulturen;
4. die *Lactobacillus* Zellzahl nach 4-wöchiger Lagerung bei 8°C;
5. die während der 4-wöchigen Lagerung aufgetretene Nachsäuerung (Differenz zwischen pH 4,4 und dem pH-Wert nach 4 Wochen).

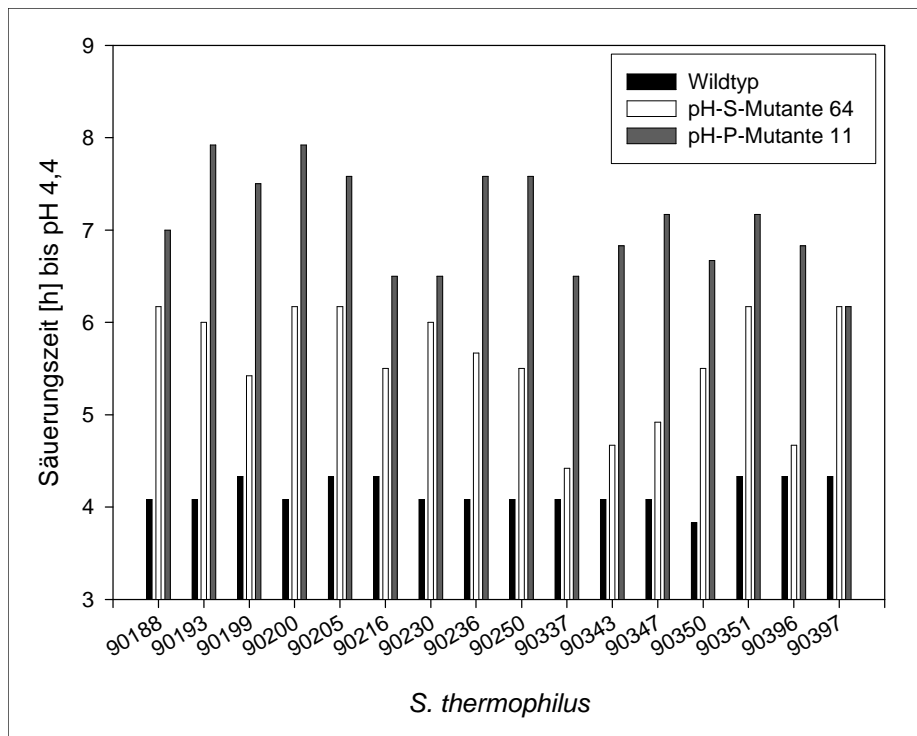


Abb. 1: Dauer der Fermentation bis zum Erreichen des pH-Wertes 4,4. Die Fermentationen wurden mit den drei *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Stämmen Wildtyp (92063), pH-S64 und pH-P11, jeweils in Kombination mit den auf der X-Achse angegebenen *S. thermophilus* Stämmen, bei 42°C in UHT-Milch wie in Material und Methoden angegeben durchgeführt.

Abb. 1 zeigt, dass *S. thermophilus* sich unterschiedlich stark auf die Fermentationsdauer bis pH 4,4 auswirkt. Bei der Fermentation zusammen mit dem *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Wildtyp ist praktisch kein Einfluss von *S. thermophilus* festzustellen: die Dauer der Säuerung liegt grundsätzlich bei ca. 4 h und schwankt lediglich um maximal 30 min. Bei den beiden Mutanten ist der Einfluss von *S. thermophilus* wesentlich größer: die Fermentationsdauer schwankt für pH-S64 zwischen 4,4 und 6,2 und für pH-P11 zwischen 6,2 und nahezu 8 Stunden (s. hierzu auch Abb. 5). Dabei bleibt festzuhalten, dass sich die unterschiedlichen *S. thermophilus* Stämme bei den beiden Mutanten

unterschiedlich auswirken. So zeigt Stamm 90397 mit beiden Mutanten eine Fermentationsdauer von etwas über 6 Stunden, während Stamm 90393 mit pH-S64 eine Fermentationsdauer von ca. 4,6 und mit pH-P11 eine solche von ca. 7 Stunden zeigt. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass beide Mutanten offensichtlich nicht in der Lage sind, eine ähnlich schnelle Säuerung wie der Wildtyp durchzuführen, unabhängig vom *S. thermophilus* Partner.

Beim Vergleich der pH-Werte, die nach 24-stündiger Fermentation erreicht wurden, zeigt sich, dass sich der Wildtyp eindeutig von den beiden Mutanten abhebt, die sich im Durchschnitt kaum voneinander unterscheiden (Abb. 2; s. dazu auch Abb. 6). Bei allen drei Stämmen war der Einfluss von *S. thermophilus* aber erheblich. Die beobachtete enge Ballung der Werte für den Wildtyp um pH 3,6 spiegelt vermutlich die physiologische pH-Grenze wider, bis zu der überhaupt noch Stoffwechsel möglich ist. Insgesamt weist pH-S64 die größte Schwankungsbreite auf (Abb. 6).

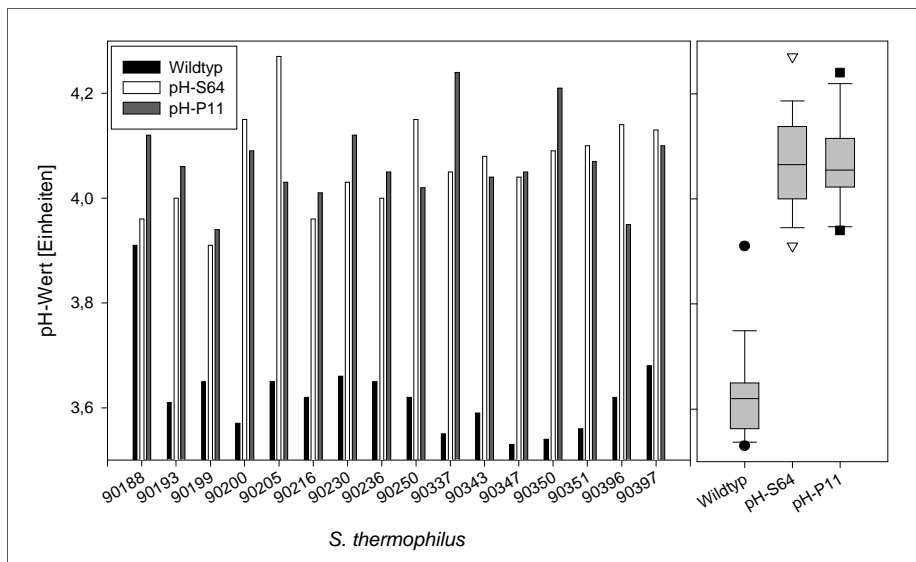


Abb. 2: pH-Wert nach 24-stündiger Fermentation. Beschreibung s. Abb. 1: Die rechte Abbildung fasst die Werte für die drei *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Stämme zusammen. Die Symbole geben den gesamten Datenbereich an, die außerhalb der Box liegenden waagerechten Striche kennzeichnen 10. und 90. Perzentil, die Unter- und Obergrenzen der Box 25. und 75. Perzentil. Die waagerechte Linie in der Box markiert den Medianwert.

Ein wesentlicher Aspekt, der bei der Bewertung der technologischen Eignung der Mutanten eine Rolle gespielt hat, war die *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Zellzahl bei Ablauf des Haltbarkeitsdatums, da davon auszugehen ist, dass in zukünftigen internationalen Standards für Joghurt eine Mindestzellzahl von 10^6 pro ml für beide Starterspezies festgeschrieben werden wird, bei einer Gesamtzellzahl von mindestens 10^7 pro ml. Bisher wurde häufig versucht, durch Verringerung der *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Zellzahlen, dessen negativen Effekt bei der Entstehung von Bitteraroma zu verringern oder gar auszuschalten. Dieses führte dazu, dass die Zellzahlen für *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* häufig unter 10^4 pro ml lagen (eigene Untersuchungen). Abb. 3 zeigt, dass beide Mutanten am ersten Tag nach der Fermentation deutlich niedrigere Zellzahlen aufwiesen als der Wildtyp. Während die Zahlen für den Wildtyp zwischen 5×10^8 und

2 x 10⁹ pro ml lagen, lagen sie für pH-P11 zwischen 9 x 10⁷ und 2 x 10⁸. Die größte Spannweite wies pH-S64 auf mit Zahlen zwischen 8 x 10⁷ und 1 x 10⁹. Auch hier war kein systematischer Zusammenhang zwischen *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Zellzahl und *S. thermophilus* Stamm zu erkennen. So lagen bei Fermentation mit *S. thermophilus* 90205 die Zellzahlen für Wildtyp und Mutante pH-S64 zwar jeweils im höchsten, für die Mutante pH-P11 jedoch im unteren Bereich der Werte. In Bezug auf die Stabilität während 4-wöchiger Lagerung erwies sich der Wildtyp am stabilsten, im Durchschnitt verringerten sich die Werte um 70-90 %. Lediglich der mit *S. thermophilus* 90200 hergestellte Joghurt zeigte keinerlei Abnahme der *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Zellzahlen. Der gleiche *S. thermophilus* Stamm führte jedoch bei pH-P11 zur stärksten Abnahme der Zellzahl während der Lagerung. pH-P11 erwies sich insgesamt als instabiler Stamm mit Abnahmen zwischen 80 und 98 %. Die größte Spannweite wies auch hier wiederum pH-S64 auf. Bei dieser Mutante wurden Abnahmen zwischen 50 und nahezu 99 % beobachtet. Festzuhalten bleibt aber, dass die *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Zellzahlen aller Joghurts nach 4 Wochen immer noch deutlich oberhalb 10⁶ pro ml lagen.

Die Nachsäuerung beschreibt die Abnahme des pH-Wertes vom Zeitpunkt der Kühlung (pH 4,4) bis zum Ende der Kühllagerung. Sie sollte möglichst gering sein und nicht dazu führen, dass der pH-Wert unter 4,0 sinkt. Der Wildtyp zeigte in Bezug auf diese Eigenschaft ein relativ einheitliches Verhalten: die Werte für die Nachsäuerung lagen allesamt zwischen 0,45 und 0,5 pH-Einheiten (Abb. 4). Dieser sehr enge Bereich der Nachsäuerung ist möglicherweise auch wieder darauf zurückzuführen, dass die Werte das physiologisch maximal mögliche darstellen, zumindest für diesen Wildtyp. Aus den Nachsäuerungswerten ergibt sich, dass unter den gewählten Produktionsbedingungen die pH-Werte sämtlicher mit dem Wildtyp hergestellter Joghurts am Ende der Kühllagerung pH 4,0 unterschreiten. Demgegenüber bleiben die pH-Werte der Joghurts, die mit den beiden Mutanten hergestellt werden, oberhalb pH 4,0. Beide Mutanten zeigten jedoch eine sehr große Schwankungsbreite der Nachsäuerung, wobei die Nachsäuerung für pH-P11 im Mittel der Werte niedriger als für pH-S64 ausfiel (Abb. 4).

Bei dem Versuch, Abhängigkeiten der verschiedenen gemessenen Parameter von einander zu finden, zeigte sich sehr bald, dass dieses zwar über Wildtyp und die beiden Mutanten hinweg möglich war, aber nur in Ausnahmefällen für einen der drei Stämme alleine. Abb. 5 zeigt ein Beispiel. Dargestellt ist die Säuerungszeit bis pH 4,4 gegen die Nachsäuerung. Die Regressionsgerade für die Gesamtmenge der Werte (durchgezogene Linie) zeigt eine deutliche Abnahme der Nachsäuerung mit zunehmender Säuerungszeit. Von den drei *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zeigt lediglich pH-S64 ein ähnliches Verhalten (gestrichelte Linie). Weder die Werte für den Wildtyp (dicke graue Linie) noch pH-P11 (gepunktete Linie) zeigen eine der Nachsäuerung von der Säuerungszeit oder umgekehrt. Die Daten für pH-P11 streuen dabei dermaßen stark, dass die leichte Neigung der Regressionsgeraden wohl eher als zufällig interpretiert werden muss. Für alle anderen Datenpaare ergaben sich ähnliche, wenig aussagekräftige Ergebnisse. Ein letztes Beispiel: Eine Abhängigkeit der Nachsäuerung von der nach der Fermentation erreichten Zellzahl erscheint sinnvoll. Tatsächlich zeigte der Wildtyp, der die höchsten Zellzahlen erreichte, auch die höchste Nachsäuerung beim Vergleich aller drei *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Stämme. Für jeden der drei Stämme alleine war jedoch keinerlei Zusammenhang zwischen Zellzahl und Nachsäuerung erkennbar.

Daraus folgt, dass eine systematische Auswahl von *S. thermophilus* Stämmen, die besonders gut mit einem bestimmten *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Stamm harmonieren, kaum möglich ist. Es müssen in der Tat die verschiedenen Merkmale der unterschiedlichen Stammkombinationen einzeln miteinander verglichen und gegeneinander abgewogen werden.

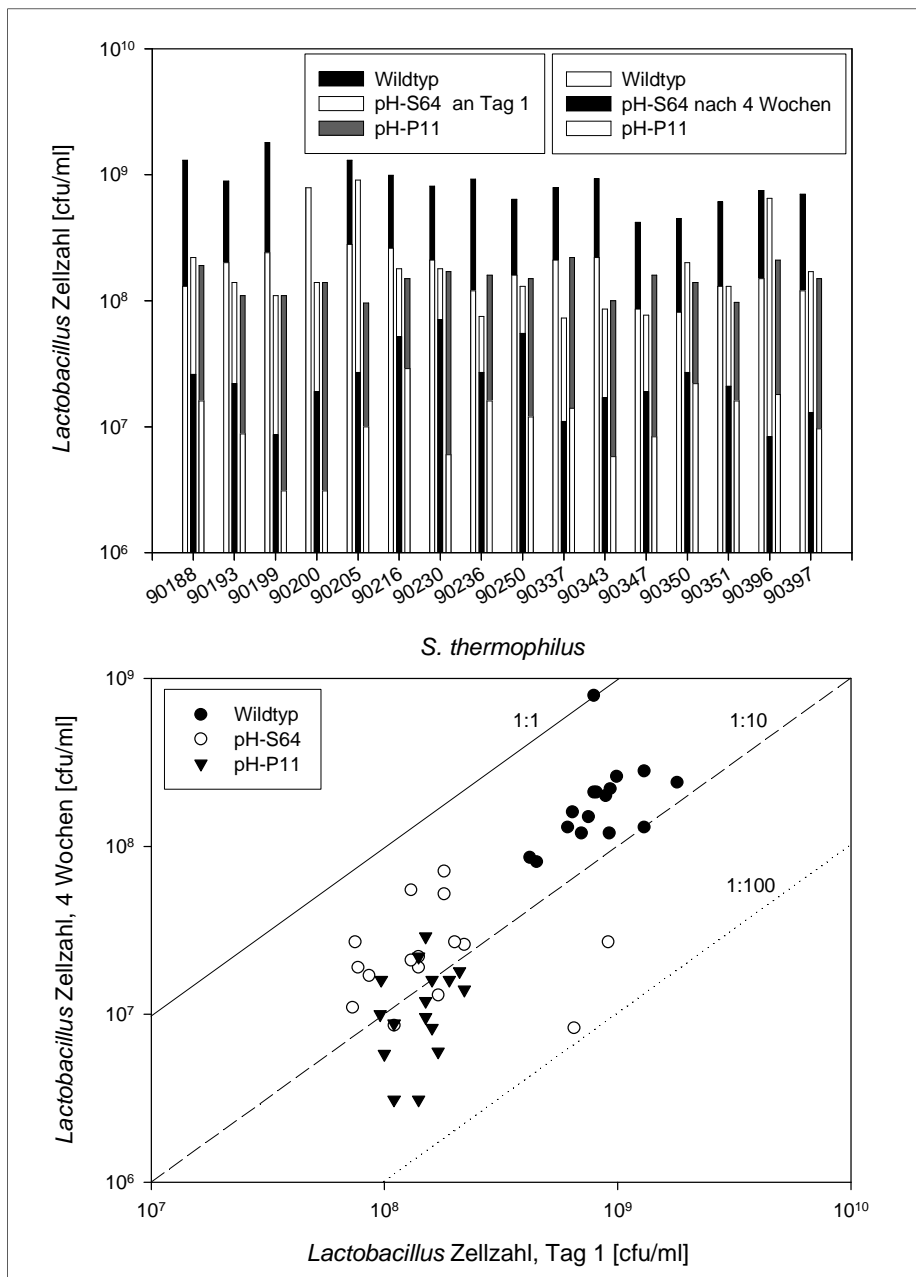


Abb. 3: *Lactobacillus* Lebendzellzahl nach einem Tag und nach 4 Wochen nach der Fermentation. (a) Die Balken der 4-wöchigen Werte sind vor die der Werte nach einem Tag gestellt. (b) Gegenüberstellung der Lebendzellzahlen nach einem Tag und nach 4 Wochen. Die durchgezogene Linie kennzeichnet Abnahme um 0% während der 4 Wochen Kühl-lagerung, die gestrichelte Linie Abnahme um 90% und die gepunktete Linie Abnahme um 99%.

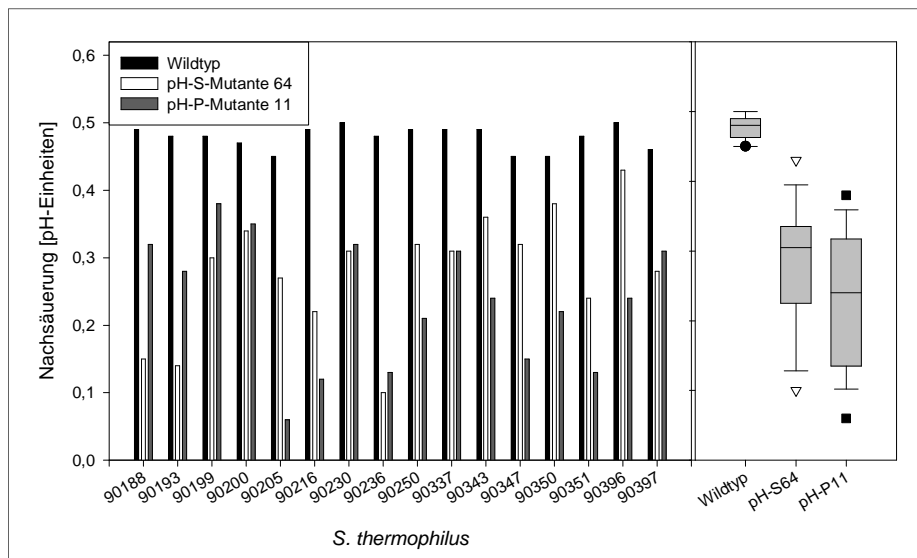


Abb. 4: Nachsäuerung nach 4-wöchiger Kühllagerung, bezogen auf pH 4,4 direkt nach der Fermentation. Zur Beschreibung der rechten Abbildung siehe Legende Abb. 2

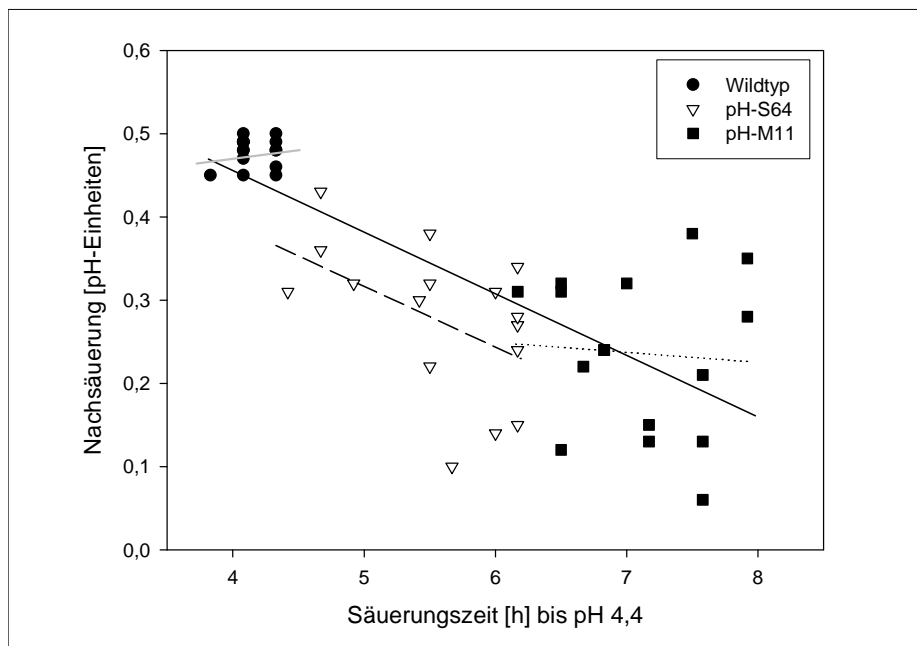


Abb. 5: Gegenüberstellung von Fermentationsdauer und Nachsäuerung. Die durchgezogene Linie gibt die Regressionsgerade für sämtliche gezeigten Werte an, die graue Linie die für die Werte des Wildtyps, die gestrichelte die für die Werte der pH-S64 Mutante, und die gepunktete die für die Werte der pH-P11 Mutante.

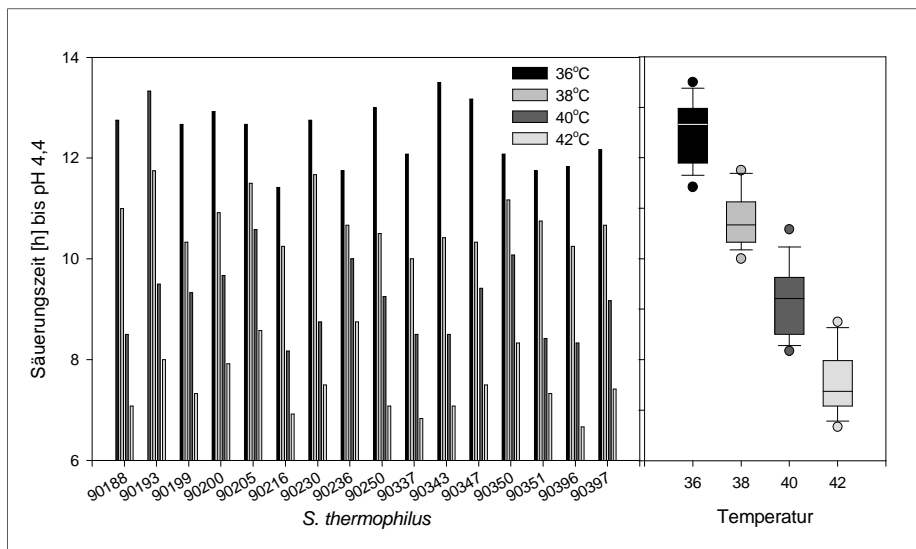


Abb. 6: Dauer der Joghurtfermentationen mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11 Mutante in Abhängigkeit von verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen und der Temperatur. Zur Beschreibung der rechten Abbildung siehe Legende Abb. 2.

Für die folgenden Versuche wurde die pH-P11 Mutante weiter untersucht, da sie insgesamt eine niedrigere Nachsäuerung zeigte als pH-S64.

3.2 Joghurtfermentation mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Kombination mit verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen und bei unterschiedlichen Temperaturen

In den folgenden Versuchen wurden die Fermentationseigenschaften der pH-P-11 Mutante in Kombination mit verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen genauer untersucht. Dabei wurden in Absprache mit dem Projekt-begleitenden Ausschuss bei den vier verschiedenen Temperaturen (36, 38, 40 und 42°C) fermentiert, die am häufigsten in der Industrie Anwendung finden. Fermentiert wurde wieder bis pH 4,4. Danach wurden die Joghurts auf 8°C abgekühlt und bei dieser Temperatur für 4 Wochen gelagert.

Der Parameter „Fermentationsdauer bis pH 4,4“ zeigte die erwartete Abhängigkeit von der Temperatur: bei Erhöhung der Temperatur von 36 auf 42°C verkürzte sich die Fermentationszeit um etwa 5 von über 12 auf unter 8 Stunden (Abb. 6). Die geringste Differenz wurde für den *S. thermophilus* Stamm 90236 mit exakt 3 (von 11,5 auf 8,75) und die größte für den Stamm 90343 mit nahezu 5,5 Stunden (von 13,5 auf 7,1) beobachtet.

Die *Lactobacillus* Zellzahlen (bestimmt für die Hälfte der Stämme) wurden kaum durch die Fermentationstemperatur beeinflusst: sie lagen nach Abschluss der Fermentation bei ca 10⁹/ml (Abb. 7). Die geringste Varianz wiesen die Werte für 42°C auf. Der während der Lagerung beobachtete Rückgang der Zellzahlen fiel überwiegend bei den bei 36°C und 42°C fermentierten Proben am geringsten aus. Auffallend war der insgesamt geringe Rückgang der *Lactobacillus* Keimzahlen bei den mit *S. thermophilus* 90216 und 90205 fermentierten Proben.

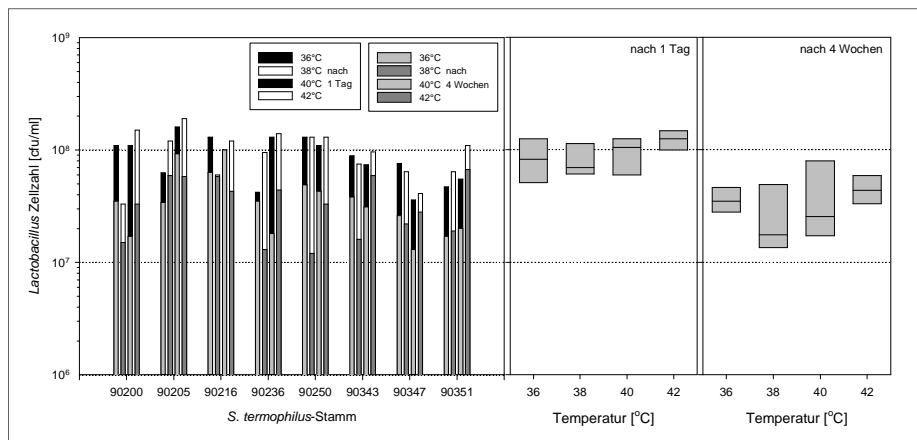


Abb. 7: Entwicklung der Lebendzellzahl von *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11 nach Joghurtfermentationen mit verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen und bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Balken für die Werte nach 4-wöchiger Lagerung sind vor die Balken der Werte nach einem Tag gestellt. Die rechten Abbildungen geben die Verteilung der Werte für die unterschiedlichen Temperaturen nach einem Tag und nach 4 Wochen an. Die unteren und oberen Linien der Kästchen kennzeichnen 25. und 75. Perzentile. Die waagerechten Linien innerhalb der Kästchen markieren die Medianwerte.

Ein etwas anderes Bild ergab sich für die *S. thermophilus* Zellzahlen (Abb. 8, ebenfalls nur für die Hälfte der Stämme bestimmt). Sie lagen nach Fermentation bei 36 und 42°C bei nahezu 10^9 cfu/ml. Im Verlauf der 4-wöchigen Kühlagerung erwiesen sich die Zellen aus der Fermentation bei 36°C als die stabilsten. Interessanterweise erwiesen sich auch hier die *S. thermophilus* Stämme 90216 und 90205 als die stabilsten. Dieses könnte darauf hindeuten, dass das Überleben der Gesamtkultur entweder wesentlich durch den *S. thermophilus* Stamm determiniert wird, oder durch ein hochspezifisches Zusammenspiel zwischen *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *S. thermophilus*.

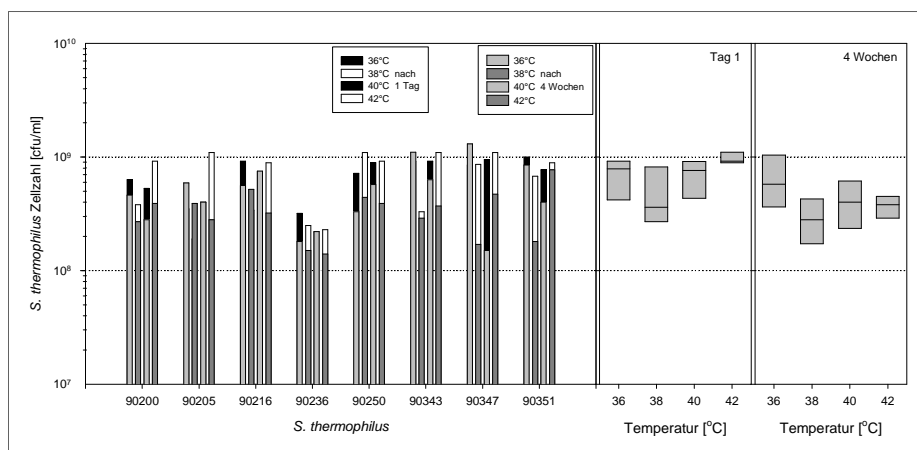


Abb. 8: Entwicklung der Lebendzellzahl von *S. thermophilus* nach Joghurtfermentationen mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Mutante pH-P11 bei unterschiedlichen Temperaturen. Zur Beschreibung der beiden rechten Abbildungen siehe Legende Abb. 7.

Das Ausmaß der Nachsäuerung war weniger von der Temperatur als vielmehr vom verwendeten *S. thermophilus* Stamm abhängig (Abb. 9): Es zeigten sich erstens starke Schwankungen innerhalb einer Temperatur, und zweitens große Überlappungen zwischen den verschiedenen Temperaturen. Die geringsten Nachsäuerungen wurden in den Fermentationen mit den Stämmen 90216 und 90347 beobachtet.

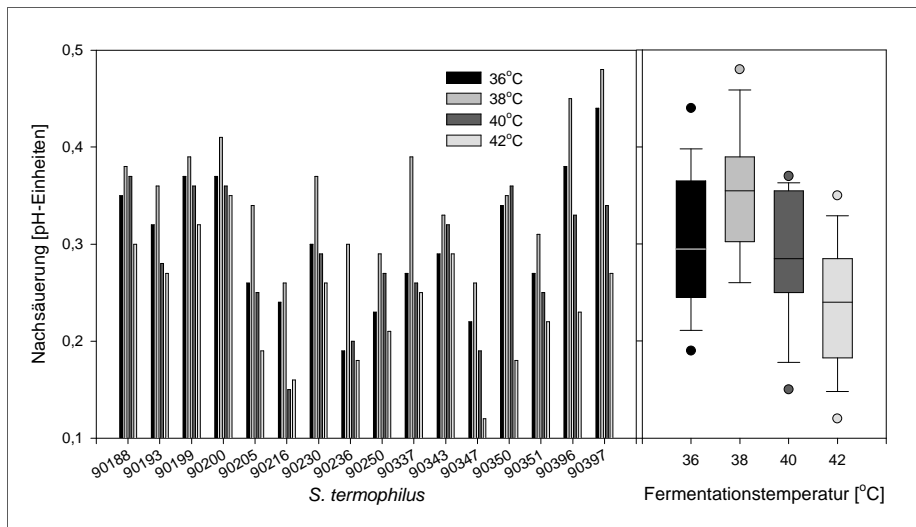


Abb. 9: Nachsäuerung nach 4-wöchiger Kühlung, bezogen auf pH 4,4 direkt nach der Fermentation. Die Joghurts wurden mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pHp-11

Mit dem Merkmal „titrierbare Säure“ werden sämtliche Säurearten und damit nicht nur die Milchsäure, im Joghurt bestimmt. Die Daten in Abb. 10 (für die Hälfte der Stämme bestimmt) zeigen, dass die Gesamtsäure nach der Fermentation relativ wenig schwankt. Dieses ist verständlich, da alle Fermentationen bei pH 4,4 durch Abkühlung beendet wurden. Während der Kühlung nahm die Säure jedoch überwiegend bei den Joghurts zu, die bei 36°C fermentiert wurden. Joghurts die mit dem Stamm 90216 fermentiert wurden, zeichneten sich – zumindest bei den höheren Temperaturen – durch besonders geringen Säuregehalt aus.

Acetaldehyd gilt als das Aroma, welches besonders typisch für Joghurt ist. Kurz nach Beendigung der Fermentation (Abb. 11) wurden relativ stark schwankende Acetaldehyd-gehalte zwischen 1 bis 13 mg/ml gemessen. Nach 4 Wochen hatte sich der Acetaldehyd-gehalt in allen Joghurts auf ca. 5 mg/kg eingestellt. Dieses scheint darauf hinzuweisen, dass der Acetaldehyd-gehalt im wesentlichen durch den *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Stamm determiniert wird, und dass der *S. thermophilus* Stamm ebenso wie die Temperatur praktisch keinen Einfluss auf diesen Parameter hat.

Die Bestimmung der sensorischen Eigenschaften der beschriebenen Joghurts sind in Abb. 12 (ein Tag nach der Fermentation) und Abb. 13 (4 Wochen nach der Fermentation) zusammengefasst.

Eine Zunahme der Säure während der Lagerung war kaum zu verzeichnen. Insgesamt schien die Säure eher bei niedrigen Fermentationstemperaturen stärker ausgeprägt zu sein, was die Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtsäure zu bestätigen scheint.

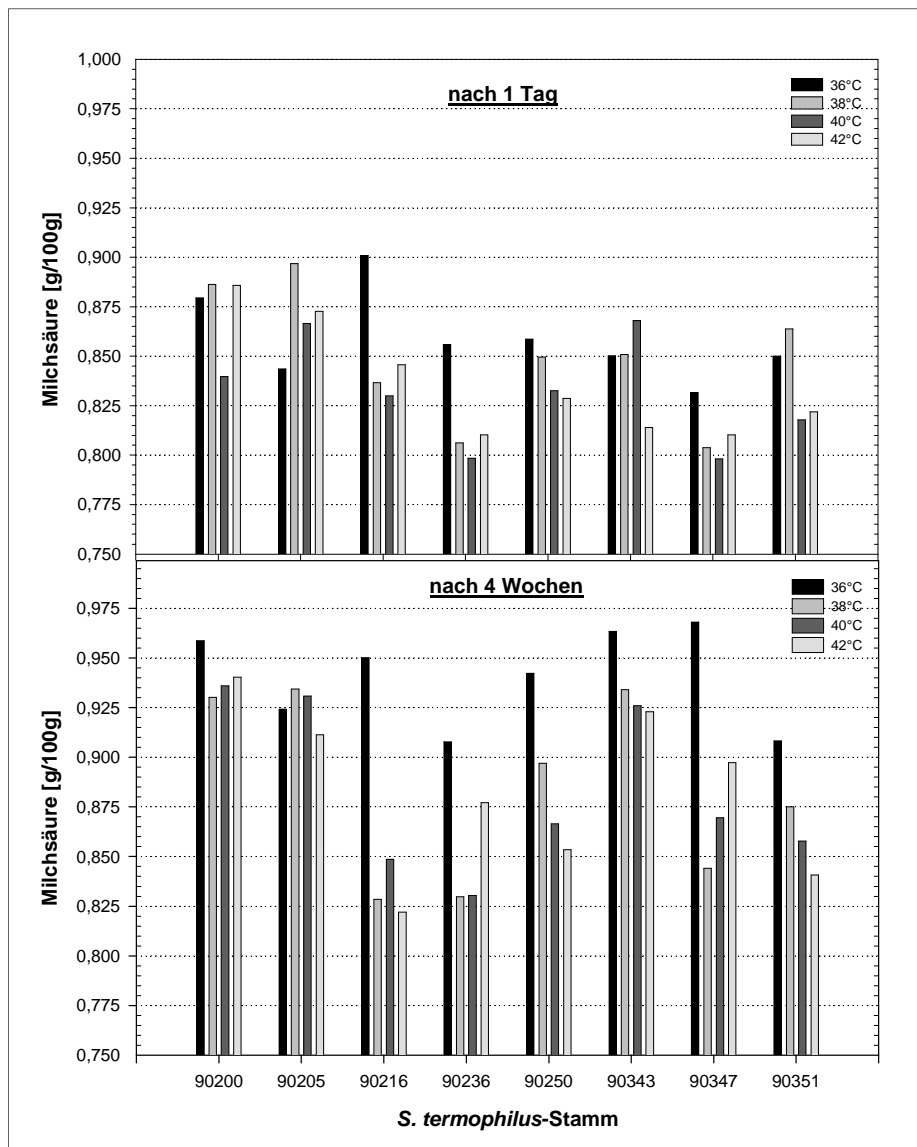


Abb. 10: Milchsäuregehalte von Joghurts fermentiert mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11 und verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen bei unterschiedlichen Temperaturen.

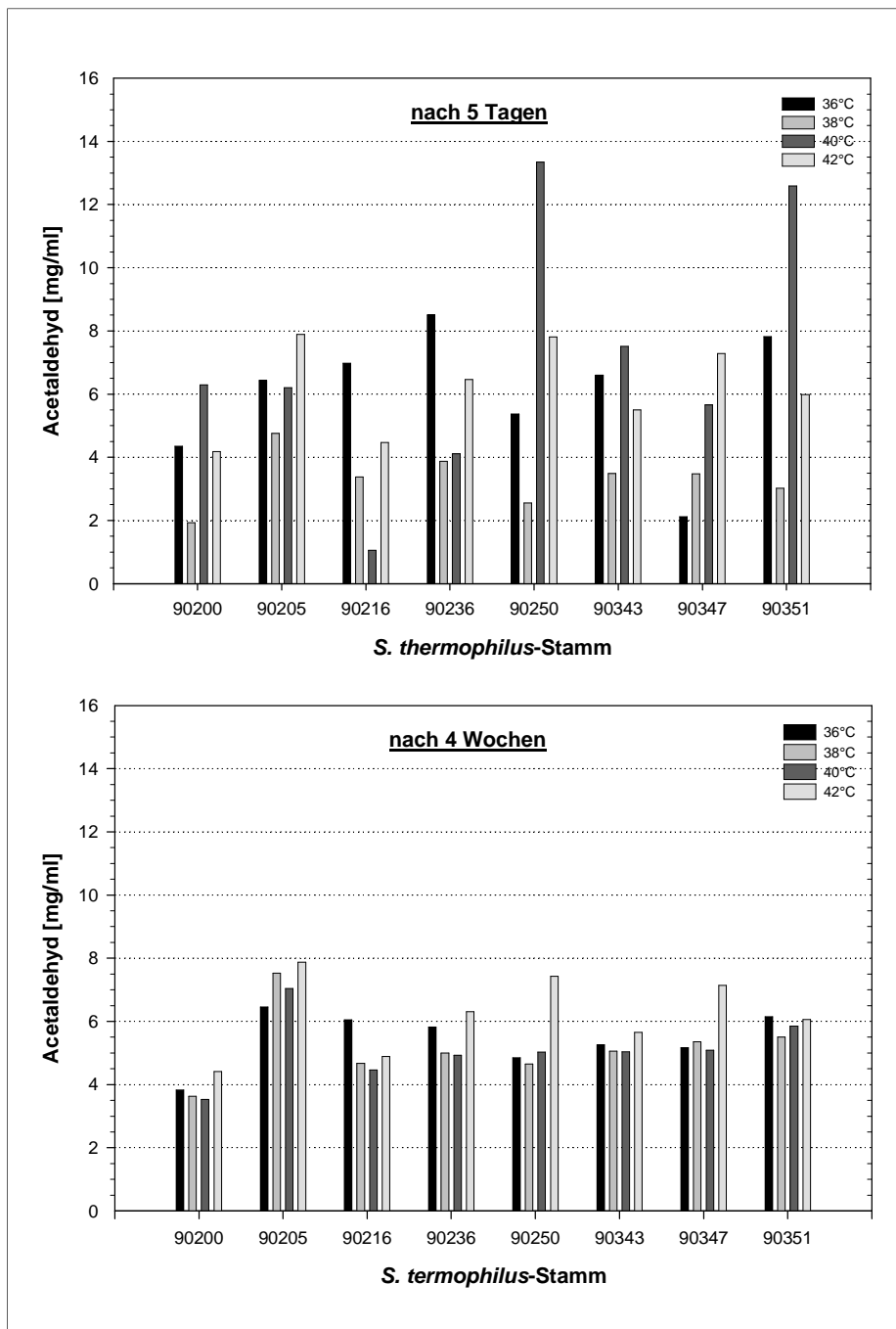


Abb. 11: Acetaldehydgehalte von Joghurts fermentiert mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11 und verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen bei unterschiedlichen Temperaturen.

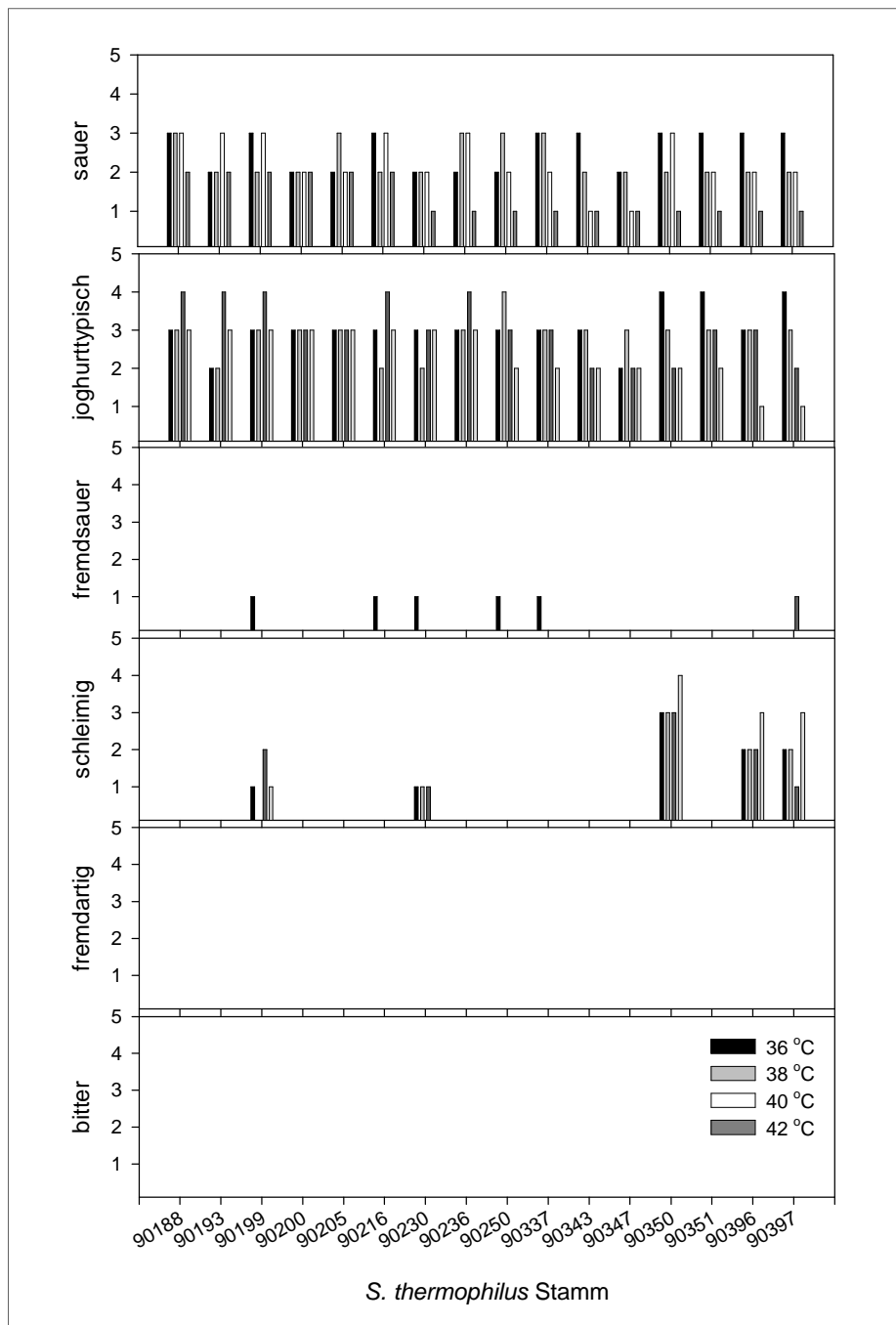


Abb. 12: Sensorische Eigenschaften von Joghurts, einen Tag nach Fermentation mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11 und verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen bei unterschiedlichen Temperaturen.

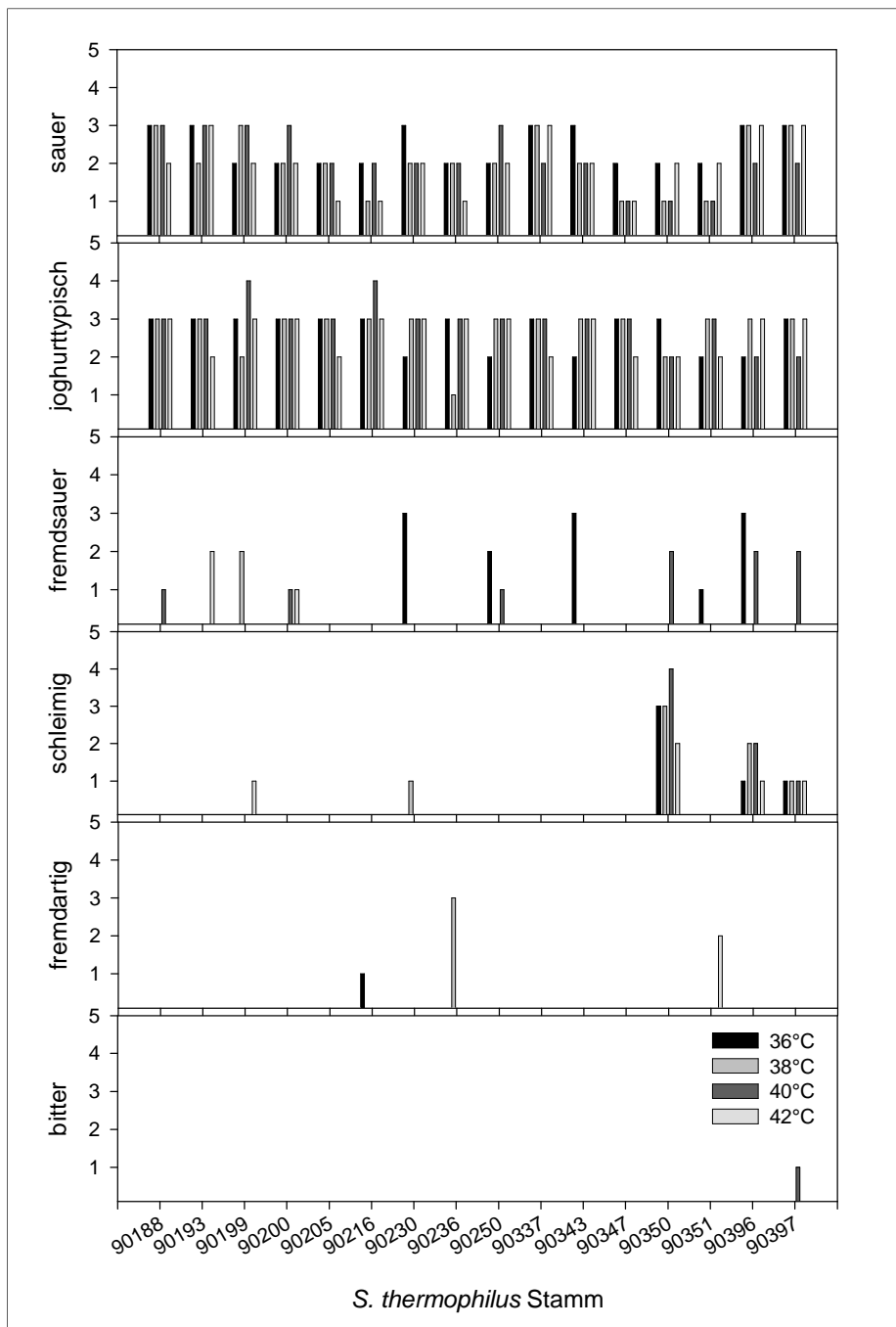


Abb. 13: Sensorische Eigenschaften von Joghurts, 4 Wochen nach Fermentation mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11 und verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen bei unterschiedlichen Temperaturen und Kühlung bei 8°C.

Bei der Bewertung des Joghurt-typischen Geschmacks zeigte sich, dass dieser im Prinzip bei allen Temperaturen und allen Stammkombinationen deutlich ausgeprägt war. Eine Zu- oder Abnahme der Ausprägung mit zunehmender Lagerung wurde kaum beobachtet. Dieses stimmt mit den gemessenen Acetaldehydgehalten nur bedingt dann überein, wenn man die Gleichförmigkeit der Bewertung „joghurtypisch“ und die gemessenen Gehalte an Acetaldehyd nach 4 Wochen Lagerung betrachtet. Für die Werte kurz nach der Fermentation scheint diese Übereinstimmung nicht gegeben, da die Acetaldehydgehalte sehr stark schwanken, nicht aber das Merkmal „joghurtypisch“. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass Acetaldehydgehalte und sensorische Bewertung nicht exakt zum gleichen Zeitpunkt erfolgten. Unabhängig davon scheint das beim Merkmal „joghurtypisch“ hauptsächlich durch den verwendeten *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Stamm bestimmt zu sein.

Der Abbau der Laktose durch die Joghurtkultur führt neben Laktat auch zur Bildung von Citrat und Acetat. Normalerweise sind über 50 % der gebildeten Säure Milchsäure. Durch das unterschiedliche Zusammenspiel der Lactobazillen und Streptokokken sowie durch weitere ungeklärte Faktoren kann es zu einer Verschiebung des Säurespektrums und damit zur Ausprägung des Merkmals „fremdsauer“ kommen. In den meisten Fällen entsprach „fremdsauer“ dem Eindruck „Zitronensäure“. Eine Zunahme des fremdsäuren Geschmacks war im Verlauf der Lagerung zu beobachten, die Temperatur schien ohne besondere Bedeutung für dieses Geschmacksmerkmal zu sein. Da das Merkmal aber nur sporadisch auftrat, ergibt sich keine eindeutige Zuordnung, ob *S. thermophilus* oder *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* für dieses Merkmal verantwortlich ist.

Das Merkmal „schleimig“ als eher textur- denn als geschmackbeschreibendes zeigt, dass vor allem der *S. thermophilus* Stamm 90350 durch Exopolysaccharidproduktion für dieses Merkmal verantwortlich zeichnet.

Das Geschmacksmerkmal „fremdartig“ wurde nur in äußerst wenigen Fällen registriert, und zwar ausschließlich bei 4-wöchig gelagerten Proben. Möglicherweise war hierfür eine bakterielle Kontamination verantwortlich. Auf eine weitergehende Untersuchung wurde verzichtet.

Sehr schwach bitterer Geschmack wurde lediglich einmal festgestellt, und zwar in einer 4-wöchigen Probe, fermentiert bei 40°C. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelte es sich um einen „Ausreisser“, da in keinem anderen mit der *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Mutante pH-P-11 fermentierten Joghurt jemals Bitterkeit festgestellt wurde.

4. Schlussfolgerungen

Die *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11 Mutante hat sich als ein Stamm erwiesen, mit dem sich reproduzierbar in unterschiedlichen Kombinationen mit verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen ein Joghurt mit mildem Geschmack produzieren lässt. Dieser Joghurt lässt sich mit hohen *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Zellzahlen produzieren, da der Stamm eine relativ geringe proteolytische Aktivität aufweist (12, 13) und in keiner Weise zur Bildung von Bitteraroma neigt. In Verbindung mit der im Vergleich zum Wildtyp erhöhten β -Galaktosidaseaktivität in Gegenwart von Laktose (13) weist dieser Stamm somit ein besonderes Potenzial für die Produktion eines sehr gut verträglichen Joghurt für Personen mit Laktosemaldigestion auf. Als Fermentationstemperatur bietet sich – unter Berücksichtigung aller Aspekte – am ehesten 42°C an, sowohl wegen der vergleichsweise kurzen Fermentationszeit, wegen der guten Lagerstabilität der Produkte im Hinblick auf die Zellzahlen, als auch unter dem Aspekt, dass die gewählten Fermentations-

temperatur kaum signifikante Unterschiede gezeigt haben. Als besonders gut mit pH-P11 harmonisierende *S. thermophilus* Stämme erwiesen sich – unter Würdigung aller Aspekte – die Stämme 90216 und 90351.

Danksagungen

Wir danken Bettina Höhn und Corinna Konradowitz für hervorragende technische Unterstützung.

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie/AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) gefördert. Projekt-Nr.: **AiF-FV 11795 N** und **13116 N**.

5. Literatur

- (1) Mareschi, J.P., Cueff, A.: Essential characteristics of yogurt and its regulation around the world; In Yogurt: nutritional and health properties, (Ed. R.C. Chandan) National Yogurt Association, Virginia, USA, pp. 11-28 (1989)
- (2) Vedamuthu, E.R.: The yogurt story - past, present and future. I. Dairy, Food and Environm. Sanitation **11** 202-203 (1991)
- (3) Zourari, A., Accolas, J.P., Desmazeaud, M.J.: Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. Lait **72** 1-34 (1992)
- (4) Cogan, T. M.: History and Taxonomy of Starter Cultures; In Dairy Starter Cultures. (Eds. T.M. Cogan and J.-P. Accolas). VCH Publishers, Inc., New York, pp. 1-19 (1996)
- (5) El-Abbassy, M.Z., Sitohy, M.: Metabolic interaction between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in single and mixed starter yoghurts. Nahrung/Food **37** 53-58 (1993)
- (6) Monnet, V., Condon, T. M., Gripon, J. C.: Metabolism of starter cultures; In Dairy Starter Cultures. (Eds. T.M. Cogan and J.-P. Accolas). VCH Publishers, Inc., New York, pp. 47-99 (1996)
- (7) Galesloot, T.D., Hassing, F., Veringa, H.A.: Symbiosis in yoghurt (I). Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk Dairy J. **22** 50-63 (1968)
- (8) Driessen, F.M., Kingma, F., Stadhouders, J.: Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk Dairy J. **36** 135-144 (1982)
- (9) Bautista, W. S., Dahiya, R. S., Speck, M. L.: Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. J. Dairy Res. **33** 299-307 (1966)
- (10) Renz, U., Puhan, Z.: Beitrag zur Kenntnis von Faktoren, die Bitterkeit im Joghurt begünstigen. Milchwissenschaft **30** 265-271 (1975)
- (11) Möller, C., Bockelmann, W., Heller, K.J.: Isolierung von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Mutanten zur Herstellung eines Joghurts mit milder Geschmackscharakteristik. Kieler Milchw. Forsch. **53** (2) 167-185 (2001)
- (12) Heller, K.J., Möller, C., Bockelmann, W.: *Lactobacillus bulgaricus*-Kulturen zur Herstellung eines Joghurts mit mildem Geschmack. Deutsche Milchwirtschaft **11** 422-424 (2004)
- (13) Möller, C., Bockelmann, W., Ammann, A., Heller, K.J.: Production of yoghurt with mild taste by a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mutant with altered proteolytic properties. Biotechnol. J. **2** (4) (in press)
- (14) El Demerdash, H.A.M., Oxmann, J., Heller, K.J., Geis, A.: Yoghurt fermentation at elevated temperatures by strains of *Streptococcus thermophilus* expressing a small heat-shock protein: Application of a two-plasmid system for constructing food-grade strains of *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. J. **1** (4) 398-404 (2006)

- (15) Geis, A., Oxmann, J., Heller, K.J.: Optimierung von Joghurtkulturen: Zwei-Plasmide-System zur genetischen Veränderung von *Streptococcus thermophilus*. *dmz Deutsche Molkerei Zeitung* **16** 28-30 (2006)
- (16) Terzaghi, B.E., Sandine, W.E.: Improved medium for streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29** 807-813 (1975)
- (17) International IDF Standard **150** 1991. Yoghurt: Determination of titratable acidity. Potentiometric method, International Dairy Federation, Brussels, 1991

6. Zusammenfassung

Möller, C., Bockelmann, W., Heller, K.J.: **Einfluss von Temperatur und *S. thermophilus* auf die Herstellung von Joghurt mit milder Geschmackscharakteristik**. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **58** (3) 145-164 (2006)

26 Mikrobiologie (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, Joghurt, Fermentationstemperatur)

Die beiden, aus früheren Screenings hervorgegangenen *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Mutanten pH-S64 und pH-P11, sowie der Wildtyp 92063 wurden hinsichtlich der Parameter Säuerungsdauer bis pH 4,4, pH-Wert nach 24-stündiger Fermentation, *Lactobacillus* Zellkonzentration nach einem Tag und nach 4-wöchiger Kühlung, Nachsäuerung während der Kühlung miteinander in Joghurtfermentationen bei 42°C mit verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen verglichen. Beide Mutanten zeigten gegenüber den Zeiten von ca. 4-4,5 Stunden des Wildtyps deutlich verlängerte Fermentationszeiten von 4,5-6,5 (pH-S64) bzw. 6-8 Stunden (pH-P11). Nach 24-stündiger Fermentation lagen die pH-Werte für die Mutanten mit 3,9-4,3 deutlich oberhalb derer für den Wildtyp mit ca. 3,6. Die Zellzahlen des Wildtyps lagen sowohl nach einem Tag als auch nach 4-wöchiger Lagerung deutlich über denen der Mutanten. Die Abnahme der Lebendzellzahl fiel für die Mutante pH-P11 am deutlichsten aus, blieb aber oberhalb von 10⁶ cfu/ml. pH-P11 zeigte insgesamt die geringste Nachsäuerung. Mit dieser Mutante wurden Joghurts bei Temperaturen zwischen 36 und 42°C mit verschiedenen *S. thermophilus* Stämmen produziert. Neben den bereits genannten Parametern wurden zusätzlich die Gesamtsäure und der Acetaldehydgehalt nach einem Tag und nach 4-wöchiger Lagerung bestimmt, sowie die produzierten Joghurts sensorisch bewertet. Dabei zeigte sich, dass die Fermentationsdauer bis pH 4,4 mit abnehmender Temperatur stark zunahm, während die Nachsäuerung bei 38°C am stärksten und bei 42°C am geringsten war. Dieser Parameter war stärker durch den *S. thermophilus* Stamm als durch die Temperatur bestimmt. Weder der Gehalt an Säure noch der an Acetaldehyd zeigt eine signifikante Abhängigkeit von der Fermentationstemperatur. Allerdings schien der Gesamtsäuregehalt während der Kühlung bei 36°C überproportional zuzunehmen. Die Lebenszellzahlen sowohl für *Lactobacillus* als auch für *Streptococcus* wurden praktisch nicht durch die Fermentationstemperatur beeinflusst, und auch die Stabilität während der Kühlung schien eher durch den jeweiligen verwendeten *S. thermophilus* Stamm determiniert. Die sensorische Bewertung der Joghurts ergab überwiegend joghurttypische, wenig saure, milde Produkte mit nur selten beobachteten Fehlparfums. Das Fehlparfum „Bitterkeit“ wurde lediglich einmal in 64 getesteten Joghurts beobachtet, und in diesem Fall auch nur als „sehr schwach“ eingeschätzt. Von den getesteten Bedingungen wurden folgende als optimal für die Produktion eines milden Joghurts erkannt: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11, *S. thermophilus* 90216 oder 90351 und Fermentation bei 42°C.

Summary

Möller, C., Bockelmann, W., Heller, K.J.: **Impact of temperature and *S. thermophilus* on the manufacture of a yogurt with mild taste**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **58** (3) 145-164 (2006)

26 Microbiology (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, yogurt, fermentation temperature)

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* wild type 92063 and mutants pH-S64 and pH-P11 obtained from it in earlier screenings were compared in yogurt fermentations at 42°C degrees with different *S. thermophilus* strains regarding the parameters duration of acidification up to pH 4.4, pH value after 24 h fermentation, *Lactobacillus* cell concentration after one day and after a 4-week cold storage, and post acidification during cold storage. Both mutants showed clearly extended fermentation times of 4.5 to 6.5 (pH-S64) and/or 6 to 8 h (pH-P11) when compared to those of the wild type (approx. 4 to 4.5 h). After 24 h of fermentation the pH values for the mutants with 3.9 to 4.3 were clearly above those of the wild type with approx. 3.6. The cell counts of the wild type were both after one day and after 4-week storage over those of the mutants. The reduction of the number of colony forming units was most obvious for the mutants pH-P11, it remained however above 10⁶ cfu/ml. pH-P11 showed altogether the lowest post-acidification. With this mutant yogurt was manufactured at temperatures between 36 and 42°C with different *S. thermophilus* strains. Beside the already specified parameters the total acidity and the acetaldehyde content were determined after one day and after a 4-week storage, and the manufactured yogurts were sensorily evaluated. Fermentation time up to pH 4.4 strongly increased with decreasing temperature, while the post-acidification was highest at 38°C and lowest at 42°C. This parameter was determined more strongly by the *S. thermophilus* strain than by the temperature. Neither the content of acid nor of acetaldehyde showed a significant dependence on the fermentation temperature. However, the increase of the total acid content seemed disproportionately high during cold storage at 36°C. The numbers of colony forming units both for *Lactobacillus* and for *Streptococcus* were practically not influenced by the fermentation temperature, and also stability during cold storage seemed more or less determined by the *S. thermophilus* strains used. Sensory evaluation of the yogurts resulted mainly in yogurt-typical, low acid, mild products with rarely observed off-flavours. The off-flavour "bitterness" was observed only once in 64 tested yoghurts, and was estimated in this case as "very weak". The following of the tested conditions were recognized as optimal for the manufacture of a mild yoghurt: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11, *S. thermophilus* 90216 or 90351, and fermentation at 42°C.

Résumé

Möller, C., Bockelmann, W., Heller, K.J.: **L'influence de la température et de *S. thermophilus* sur la fabrication de "yaourt doux"**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **58** (3) 145-164 (2006)

26 Microbiologie (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, yaourt, température de fermentation)

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* wildtype 92063 et leurs mutants pH-S64 et pH-P11, obtenus dans des screenings antérieurs, étaient comparés dans des fermentations de

yaourt à une température de 42°C avec différentes souches de *S. thermophilus* sur les paramètres suivants: durée d'acidification jusqu'à un pH de 4,4, valeur pH après 24 h de fermentation, concentration cellulaire de *Lactobacillus* après un jour et après un stockage froid de 4 semaines, acidification postérieure pendant le stockage froid. Par rapport au temps enregistré de 4 à 4,5 h pour le mutant sauvage (wild type), les deux mutants en question avaient des temps de fermentation clairement prolongés de 4,5- à 5 (pH-S64), voire de 6 à 8 h (pH-P11). Après une fermentation de 24 h, les pH pour les mutants étaient avec 3,9 à 4,3 clairement au-dessus de ceux du mutant sauvage avec environ 3,6. Après un jour et aussi après un stockage de 4 semaines, les dénombrements de cellules du mutant sauvage se situaient clairement au-dessus de celui des mutants. La réduction des UFC (unités formant colonies) était la plus visible pour le mutant pH-P11, mais restait au-dessus de 10⁶ UFC/ml. Pour pH-P11 l'acidification postérieure était minimale. Avec ce mutant, on a produit des yaourts à des températures entre 36 et 42°C avec différentes souches de *S. thermophilus*. À part les paramètres déjà spécifiés, l'acidité totale et la teneur en acétaldéhyde ont été déterminées après un jour et après 4 semaines de stockage. De même, les yaourts produits étaient évalués sensoriellement. Il s'est avéré que la durée de fermentation jusqu'au pH 4,4 s'est fortement prolongée avec la température en baisse, tandis que l'acidification postérieure était la plus forte à 38°C et la plus faible à 42°C. Ce paramètre a été davantage déterminé par *S. thermophilus* comme souche que par la température. Ni la teneur en acide ni celle en acétaldéhyde ne montrent une dépendance significative de la température de fermentation. Toutefois, la teneur totale en acide a semblé augmenter de façon supérieure à la proportionnelle pendant le stockage froid à 36°C. Les UFC pour *Lactobacillus* et pour *Streptococcus* n'ont pratiquement pas été influencées par les températures de fermentation, et également la stabilité pendant le stockage froid semblait plutôt être déterminée par la souche *S. thermophilus* utilisée. L'évaluation sensorielle du yaourt a principalement engendré des produits doux, peu aigres et rarement avec des saveurs étrangères. La saveur étrangère „amertume“ a été observée seulement une fois dans 64 yaourts testés, et dans ce cas estimée comme „très faible“. Parmi les conditions testées, les conditions suivantes ont été reconnues comme optimales pour la production d'un yaourt doux: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pH-P11, *S. thermophilus* 90216 ou 90351 et la fermentation à 42°C.