



A cheddar sajt szabad D-aszparaginsav, D-glutaminsav és D-alanin tartalmának alakulása a gyártás során

Vargáné Visi É., Csapó J.

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kémiai Intézet, Biokémiai és Élelmiszerkémiai Tanszék
Kaposvár, 7400 Guba Sándor u. 40.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérletünk célja az volt, hogy egy adott sajtgyártási technológiában több mintavételi pontot kialakítva megfigyeljük, növekszik-e a szabad D-aszparaginsav, D-glutaminsav és D-alanin egységnyi szárazanyag tartalomra vonatkoztatott mennyisége; módosul-e a D-aminosavak összetétele; illetve a D-enantiomerek aránya a szabad aminosav tartalom belül a sajtgyártás során. Továbbá megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a fenti D-aminosavak mennyiségében annak függvényében, hogy az „AM2”, vagy a „303” jelű *Lactococcus lactis subsp. cremoris* törzs tenyésztete adja a sajttej érlelése során alkalmazott starterkulturát alapját. Az érlelés első kilenc hetében csak a szabad D-alanin tartalom növekedett jelentősen, a D-aszparaginsav, és a D-glutaminsav tartalom nem. Az általunk vizsgált időszakban (0-9 hét) még nem nőtt meg jelentős mértékben azon lízissel összefüggő folyamatok intenzitása, melyek a D-glutaminsav (és a D-aszparaginsav) felszabadulásával járnak a bakteriális sejtfalból és a citoplazmából. A sajt préselése során az egységnyi szárazanyagra vonatkoztatott D-aszparaginsav tartalom mindkét alkalmazott törzskultúra, D-glutaminsav tartalom pedig a „303” jelű törzskultúra használatakor jelentősen nőtt. Ez valószínűleg nem a lízisnek, hanem valamely más folyamatnak tulajdonítható. Az érlelés során a szabad alanin tartalom belül a D-enantiomer aránya nem változott, azaz a D-alanin tartalom mennyiségének növekedése gyakorlatilag követte az L-alanin mennyiségének növekedését. Lehetséges, hogy a szabad D-alanin tartalom egy része a sajtésztaiban található szabad L-alaninból jött létre a bakteriális alanin racemáz hatására, amennyiben ez az enzim a baktériumsejten kívül is tud jelentékenyen működni. A *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 303 egysejtkultúrával gyártott sajtok mindegyik D-aminosavból jelentősen többet tartalmaztak, és a D-enantiomer aránya is nagyobb hányadot tett ki a teljes (L+D) szabad glutaminsav és az alanin tartalom belül, mint a *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2 szintenyésztettel gyártott sajtok. Elképzelhető, hogy a „303” jelű törzs adott gyártási körülmények között hajlamosabb a lízisre, mint az „AM2” jelű törzs, és így sejteiből több D-aminosav szabadul fel, illetve alakul ki enzimes úton. A három D-aminosav egymáshoz viszonyított arányában, a „D-aminosav mintázatban” azonban nem volt különbség a két törzs között.

(Kulcsszavak: cheddar sajt gyártás, D-aszparaginsav, D-glutaminsav, D-alanin, D-enantiomer)

ABSTRACT

Changes in the free D-aspartic acid D-glutamic acid and D-alanine content of cheddar during cheesemaking process

É. Vargáné Visi, J. Csapó

University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Institute of Chemistry
Department of Biochemistry and Food Chemistry, Kaposvár, H-7400 Guba Sándor u. 40.

*The purpose of our research was to determine the variation in free D-aspartic acid, free D-glutamic acid and free D-alanine content of dry matter; the variation in free D-amino-acid composition; and that of the ratio of free D-amino acid related to total (D+L) free amino acid during experimental cheddar cheesemaking processes with two different starter strains (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303 or *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2). Until the ninth week of ripening only the increase of free D-alanine content of dry matter was significant ($P < 0.05$). The intensity of processes which are connected with lysis and responsible for release of D-aspartic acid and D-glutamic acid from cell wall and cytoplasm do not seem to increase until this stage of ripening cheddar. The dry matter of curd contained significantly higher amount of D-aspartic acid after pressing than before pressing in case of both strains ($P < 0.05$); and more D-glutamic acid in case of strain '303'. Probably these differences cannot be attributed to lysis. During ripening the ratio of D-enantiomer within the free alanine content did not change that is the increase of D-alanine content followed the increase of L-alanine content. One might speculate that part of the free D-alanine content derived from the free L-alanine content of cheese due to the bacterial alanine racemase if this enzyme can operate outside of the bacterial cell wall. Cheeses from cheesemaking trials with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303 contained more D-amino acid ($P < 0.01$) and the ratio of D-enantiomer within the total (D+L) free glutamic acid and total free alanine was higher ($P < 0.01$) than in case of trials with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. It is possible that strain '303' is more susceptible to lysis than strain AM2 during this sort of Cheddar making protocol and therefore releases more D-amino acid from cells or/and releases enzymes form more D-amino acid. The ratio of the individual D-amino acid related to the total amount of D-amino acids (the D-amino acid composition) changed during ripening ($P < 0.001$) but there were no significant differences between the two strains.*

(Keywords: cheddar cheesemaking process, D-aspartic acid, D-glutamic acid, D-alanine, D-enantiomer)

BEVEZETÉS

Azok az élelmiszeripari nyersanyagok, melyek csíraszám alacsony, csak kevés D-aminosavat tartalmaznak (Man és Bada, 1987). A kérődzőktől származó alacsony csíraszámú (10^3 - 10^4 /cm³) nyerstej kis mennyiségben ugyan (0,001-0,1 mg/100 cm³), de tartalmaz D-aminosavakat (Brückner és Hausch, 1990a; Gandolfi és mtsai., 1992). Ezek részben a tejben található baktériumokból származnak, részben bendőmikroba eredetűek (Brückner és mtsai., 1992, Csapó és mtsai., 1995). A feldolgozási lépések akkor növelhetik számottevően a D-aminosavak mennyiségét, ha hőközléssel, lúgos kezeléssel (Friedman, 1991), vagy fermentációval járnak (Imai és mtsai., 1996). A tej pasztőrözése, és ultrapasztőrözése nem okozott jelentős D-aminosav arány növekedést a szabad és a fehérjében kötött aminosav-tartalmon belül (Brückner és Hausch, 1990a; Gandolfi és munkatársai, 1992). Ezzel szemben a fermentációs technológiával gyártott tejtermékek

szabad D-aminosav tartalma magasabb volt, mint a nyerstejé. A tejtermékek közül a sajtok tartalmazzák a legtöbb szabad D-aminosavat (10-250 mg/100 g). A sajtokban a D-aminosavak közül általában a D-alanin fordul elő a legnagyobb mennyiségben, és néhány kivételtől eltekintve a D-glutaminsav vagy a D-aszparaginsav szintén jelen van, együtt, vagy külön-külön (Brückner és Hausch, 1990a, 1990b; Brückner és mtsai., 1992).

Élesztővel és penészgombákkal szennyezett grapefruit, narancs és őszibaracklében még magas csíraszám értékeknél sem tudtak D-alanint kimutatni, szemben azokkal a gyümölcslevekekkel, melyek romlásában főként baktériumok játszottak szerepet (Gandolfi és mtsai., 1994). A baktériumok a káros romlási folyamatok, valamint a fermentációs technológiák alkalmazása során is növelhetik a termékek szabad D-aminosav tartalmát egyrészt sejtfaluk lízise miatt, másrészt a sejtfal bioszintézisében és lízisében résztvevő racemázok, és egyéb enzimek működése révén (Brückner és mtsai., 1992; Gandolfi és mtsai., 1994). A baktériumokban ugyanis racemázok és epimerázok is jelen vannak (Adams, 1972).

A sajtgyártás során a starterkultúrákban előforduló baktériumok általában Gram-pozitívak (*Lactobacillaceae* család, *Propionibacterium*, *Brevibacterium* nemzetség). A Gram-pozitív baktériumok sejtfala viszonylag homogén murein-teichonsav-poliszacharid réteg, mely a baktériumsejt szárazanyag-tartalmának legalább 50%-át teszi ki. Mind az alapvázat adó murein (peptidoglikán), mind a mátrixot alkotó szubsztituált teichonsavak is tartalmazzák D-aminosavakat (Schleifer és Kandler, 1972; Friedman, 1999). A sejtfalból a murein tetrapeptidjében megtalálható D-glutaminsavon és D-alaninon kívül még a következő aminosavakat tudták kimutatni: D-aszparaginsav, D-aszparagin, D-izo-aszparagin, D-glutamin, D-izoglutamin (Schleifer és Kandler, 1972; Tipper és Wright, 1979), D-lizin, D-ornitin, D-szerin, és D-prolin (Schleifer és Kandler, 1972; Bottazzi, 1988). A legtöbb fehérjealkotó L-aminosav D-enantiomerje szabad állapotban is megtalálható egyes baktériumsejtek citoplazmájában (Bhattacharyya és Banerjee, 1974). Két, a starterkultúrákban gyakran használt baktérium, a *Lactobacillus casei* és a *Lactobacillus acidophilus* hidrolizátuma egyaránt tartalmazott D-aszparaginsavat, D-glutaminsavat, és D-alanint. Az előbbiben D-leucint, D-allo-izoleucint, D-valint, és D-szerint is ki tudtak mutatni (Brückner és munkatársai, 1992). A fermentált élelmiszerek gyártása során alkalmazott starterkultúrákban előforduló néhány baktériumnemzetség (*Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*) összetételének vizsgálata során a D-aszparaginsav és a D-alanin fordult elő a legnagyobb mennyiségben, és a D-glutaminsav is jelen volt számos esetben. Kevesebb, de még jelentős mennyiségű D-leucint, D-lizint, D-metionint, D-ornitint, D-fenilalanint, D-prolint, D-szerint, D-treonint és D-tirozint is ki tudtak mutatni egyes baktériumokból (Brückner és mtsai., 1993).

A fermentációs technológiáknál is érvényesülnek az új tápközegbe jutott egysejtű mikroorganizmusok sejtszám-növekedési törvényszerűségei, amely a (logaritmus) szaporodási görbével írható le. A sajtgyártás kezdetén a starterkultúrával való beoltást követően a maximális növekedési szakasz v. exponenciális (lineáris) szakasz, a sajt érése során a lassulási, az állandósult (stacioner), majd a pusztulási szakasz érvényesül (Scott, 1998). Az érés során a mikrobapopuláció sejtszámának növekedése lassul, majd a stacionárius szakaszban ugyanannyi sejt keletkezik, mind amennyi elpusztul, végül az élőcsíraszám lassan csökken (Lynch és mtsai., 1999). Az elpusztult sejtek száma a szaporodási görbe alapján számolható ki, ez az érték a sajtgyártás kezdetén alacsony, majd a sajt érlelése során gyorsan növekszik. Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a nem élő baktériumsejtek a sajtban létezhetnek többé-kevésbé intakt formában is, teljes sejtfallal, vagy *sphaeroplast* formában, mely esetben a sejtfal a lízis előrehaladottsági fokának megfelelően különböző mértékben felbomlott állapotban van. A lízis folyamatának intenzitására az intracelluláris enzimek aktivitásából lehet következtetni (Wilkinson és mtsai., 1995).

Gandolfi és mtsai. (1992) nyerstej minták 4°C-on történő tárolása során azt tapasztalták, hogy a D-alanin mennyisége a tejben a pszichrotrof mikrobák elszaporodásakor a szaporodási görbe stacioner szakaszában kezdett el emelkedni, és ez folytatódott egészen a hét napos tárolás végéig. Későbbi közleményükben (Gandolfi és mtsai., 1994) sterilizált, majd *Lactobacillus plantarum*mal beoltott grapefruit és körteleveknél szintén a stacioner, illetve a lassuló-stacioner szakaszban tapasztalták a D-alanin tartalom növekedését. A sajtgyártásban a mikrobaszaporodás lassuló, illetve stacioner fázisa az érlelés műveletének idejére esik. Amennyiben hasonló, D-alanin-termelő folyamat a sajtgyártás során is lezajlik, ennek elméletileg az érlelés ideje alatt kellene bekövetkeznie, mint ahogy Brückner és Hausch (1990b) tapasztalta is kecsketejből készült sajt érlelésekor, mikor a D-alanin tartalom 1,1 mg/100 g-ról 10,4 mg/100 g-ra nőtt két hónapos, és 30,7 mg/100 g-ra 12 hónapos érlelés során. A fenti szerzők korábbi közleményükben késztermékek D-aminosav tartalmát vizsgálták, és a parmezán magasabb D-aminosav tartalmát az ementálihoz képest a parmezán magasabb szárazanyag-tartalmának és hosszabb érlelési idejének tulajdonították (Brückner és Hausch, 1990a).

A sajtokban és a starterkultúrák hidrolizátumában leggyakrabban előforduló két másik D-aminosavról: a D-aszparaginsavról és a D-glutaminsavról annyit tudunk, hogy (D/D+L)*100 arányuk a nyerstej tárolása során nem mutatott a D-alaninhoz hasonló növekedést (Gandolfi és mtsai., 1992).

Amennyiben kereskedelmi forgalomban beszerzett sajtfeleségek D-aminosav tartalmát hasonlítjuk össze, eltérő alapanyagból, eltérő technológiai lépések sorozatán át előállított termékeket hasonlítunk össze. Az egyes sajtok alapanyagául szolgáló sajttekők D-aminosav tartalmában lévő eltérések valószínűleg nincsenek nagy hatással a késztermékek között mért D-aminosav-tartalom különbségekre, mivel a nyerstej D-aminosav tartalma legalább két nagyságrenddel kisebb (0,001-0,1 mg/100 cm³), mint a kész sajtoké (10-250 mg/100 g). A D-aminosav-tartalomban mért különbséget azonban nem indokolhatjuk azzal, hogy a gyártók egy adott gyártási műveletet (pl. érlelés) eltérő módon valósították meg, mivel nem zárható ki, hogy más műveletek során is keletkezhetnek D-aminosavak, és a különböző sajtok gyártása során nem csak egy műveletet valósítanak meg eltérő módon. Amennyiben célunk az egyes műveletek D-aminosav-tartalomra gyakorolt hatásának vizsgálata, nem elég a késztermékek vizsgálata, hanem gyártásközi mintavételre van szükség. Ha a D-aminosavak mennyiségének változását annak folyamatában kívánjuk vizsgálni, kísérleti sajtgyártásra van szükség, ahol a pontos műveleti paraméterek rögzíthetők, és a műveletek előtti és utáni mintavételek megoldhatók. Tudomásunk szerint ilyen vizsgálat még nem történt. Így célul tűztük ki, hogy egy adott sajtgyártási technológiában több mintavételi pontot kialakítva megfigyeljük, növekszik-e a szabad D-aszparaginsav, D-glutaminsav és D-alanin egységnyi szárazanyagra vonatkoztatott mennyisége (I.); módosul-e a D-aminosavak összetétele (II.); illetve a D-enantiomerek aránya a szabad aminosav tartalmon belül (III.) a sajtgyártás során, különös tekintettel az érlelésre. Továbbá megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a fenti D-aminosavak mennyiségében annak függvényében, hogy az „AM2”, vagy a „303” jelű *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* törzs tenyésztete adja-e a sajttej érlelése során alkalmazott starterkultúra alapját.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Szintenyészetek és kultúrákészítés

A fagyasztott állapotú törzskultúrák (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303, és *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2) a Corki Egyetem Mikrobiológiai Tanszékének gyűjteményéből származtak (Cork, Írország).

Az anyakultúra teje porlasztva szárított tejporból visszaállított (10%, w/v) sovány tejportej volt, melyet a beoltás előtt autoklávban sterilizáltunk (121°C, 10 min). A tömegkultúra teje hőkezelt (95°C, 30 min) nyerstej volt. A kultúrákészítés első napján a kultúratejet 1% törzskultúrával oltottuk be, majd egy éjszakán át 30°C-on szaporítottuk. Másnap az így kapott anyakultúra 1%-nyi mennyiségével végeztük el az átoltást, melyet újabb éjszakán át tartó inkubálás követett (30°C). Ezt a kultúrát a harmadik napon 2%-os mennyiségben a kultúratejként használt nyerstejhez adtuk és 21°C-on egy éjszakán át szaporítottuk, majd az így kapott üzemi kultúrát használtuk fel a sajttej beoltásához az érlelés során.

Sajtgyártás

Összesen hat sajtgyártási folyamatot végeztünk el. Ebből három esetben a beoltáshoz a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303 egytörzstenyészetet, további háromban a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 egytörzstenyészetet alkalmaztuk. A kétféle sajtgyártás csak a starterkultúrák minőségében tért el egymástól, minden egyéb gyártási körülmény azonos volt.

A sajtgyártás a Corki Egyetem Kísérleti üzemében történt (Cork, Írország). A sajtgyártás alapanyagául szolgáló nyerstej Cork környéki farmokról származó tehének elegyteje volt. Minden egyes sajtgyártási folyamathoz 100 l tejet használtunk fel. A tejet pasztőröztük (72°C, 15 s), a kazein-tejzsír arányt 0,7-1,0-re állítottuk be, majd 2% (v/v) egytörzstenysézzel (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303, vagy *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 tenyészetével) oltottuk be. Ezt követően a sajtgyártás a standard cheddar sajtgyártási technológiának megfelelően történt (Scott, 1998). Az érlelés után - a beoltást követően kb. 1 óra múlva, mikor a sajttej savtartalma 0,20-0,22% volt - következett az oltóenzim (6 cm³) hozzáadása. Mikor az alvadék állaga megfelelő volt (a sajt kád falától elvált és porcelánszerűen törött), az alvadék felvágása, majd aprítása következett a gél szinerezésének gyorsítása érdekében. Ezt követően az alvadék kavarása, az ún. elősajtolás és az utómelegítés (0,2°C/min 40°C-ig) került sorra. A kád felmelegítése után a savó-alvadékrög keveréket további intenzív mozgásban tartottuk. Mikor az alvadék kellően szilárd, és savtartalma megfelelő volt (0,20-0,24%, pH=6,05-6,10), leüleptítettük, majd megkezdődött a savó leeresztése. Ezt követte az alvadék különleges kezelése, a cheddarozás, ami kimondottan erre a sajtra jellemző művelet. A savó nagy részének eltávolítása után a sajt kád közepén csatornát képeztünk, hogy onnan is elszivároghjon a savó. Az alvadékokat a kád szélére tornyoztuk fel, s mikor már jól összetömörült, 15 cm széles táblákra vágtuk fel. A táblákat forgattuk, majd egymásra halmoztuk őket. Eközben az alvadékokat enyhén melegítettük a sajt kád köpenyébe vezetett 28-35°C-os vízzel. A baktériumok a cheddarozás alatt intenzíven szaporodtak, a pH 5,3 alá csökkent (pH=5,2). Az alvadék állaga az egymásra rétegzés következtében előálló prészhatásra megnyúlt, és a cheddarozás végére a főtt csirkemellhez hasonló szerkezetű volt. A kidolgozott alvadékokat ezt követően ujjnyi nagyságú csíkokra aprítottuk, majd az alvadékokat sóztuk (2%), blokkformába tettük, és 75 kPa nyomással 16 órán át préseltük. A préselés után a sajtokat vákuumzárással műanyag fóliába csomagoltuk. Az érlelés során a tárolási hőmérséklet 8°C volt.

Mintavétel

Minden egyes sajtgyártási folyamatban öt gyártási fázisban vettünk mintát. Először az aprítás és a sózás után, a formázás és a préselés előtt (0. nap); majd másnap a préselés után (1. nap). A három további mintát az érlelés során vettük, a gyártás napjától számított hetedik napon; a 28. napon; illetve kilenc hét után (63. nap). A mintát aprítottuk, liofileztük, majd -24°C-on tároltuk az analízis megkezdéséig.

Mintaelőkészítés

A sajtminták kémiai analízise a Kaposvári Egyetem Kémiai Intézetének Biokémiai és Élelmiszerkémiai Tanszékén történt.

A fagyasztva szárított sajtminákat először lisztfinomságúra aprítottuk (Microculatti daráló), majd 100 cm³-es Erlenmeyer lombikba bemértünk 5 g mintát és hozzáadtunk 20 cm³ 0,1 M sósavoldatot. A szuszpenziót három órán át mágneses keverővel kevertettük, majd egy éjszakán át a hűtőszekrényben állni hagytuk (5°C-on). Másnap reggel a szuszpenziót felráztuk, majd centrifugáltuk (500 g, 10 perc). A felülúszóhoz vele azonos térfogatú 25%-os (w/v) triklórecetsav oldatot adtunk, az oldatot 30 percig állni hagytuk, majd a csapadékot elválasztottuk a folyadékfázistól (500 g, 10 perc). A felülúszóból 4 cm³-t 10 cm³-es mérőlombikba mértünk és 4 M-os NaOH-dal a pH-t 7-re állítottuk be, majd a lombikot desztillált vízzel jelre töltöttük. A fehérjementesített vizes kivonatot az analízis megkezdéséig fagyasztva tároltuk (-24°C), és közvetlenül az analízis előtt 0,45 µm-es hidrophil membránszűrőn átszűrtük.

A reagensek p.a. minőségűek voltak.

Származékképzés és analízis

Az analízis előtt a D- és L-aminosavakból OPA (o-ftálaldehid) és TATG (1-tio-β-D-glükóztetraacetát) reagensekkel diasztereomer párokat képeztünk *Einarsson és msai* (1987) módszere alapján. Az OPA és a TATG reagenseket a Sigmától (St. Louis, MO, USA) szereztük be. Az elválasztást Superspher 60 típusú, RP-8e állófázisú oszlopon (125 mm×4 mm i.d.) végeztük (MERCK, Darmstadt, Németország); a kolonnatermosztát hőmérséklete 40°C volt. A mozgó fázis összetételének változása az elválasztás során az *1. táblázat*ban látható, az áramlási sebesség 1 cm³/min volt. A „HPLC gradient grade” minőségű acetonitrilt és a metanolt a MERCK-től (Darmstadt, Németország) szereztük be. A detektálás során a diasztereomerek fluoreszcens jelét mértük (λ_{ex}: 325 nm, λ_{em}: 420 nm). A származékképzésre és az analízisre MERCK-Hitachi gyártmányú nagyhatékonyságú folyadékromatográfot alkalmaztunk, amely a következő modulokból állt: L-7250 programozható mintaadagoló és származékképző egység, L-7100 szivattyú, L-7350 oszloptermosztát, L-7480 fluoreszcens detektor, és AIA adatátalakító egység. Az adatgyűjtést és feldolgozást a „D-7000 HPLC System Manager” (HSM) program segítségével végeztük.

1. táblázat

Az aszparaginsav, a glutaminsav és az alanin enantiomerek OPA-TATG-származékainak elválasztására alkalmazott gradiensprogram

Idő (min) (1)	Metanol (v/v%) (2)	Foszfátpuffer (v/v%) (50 mM) (3)	Acetonitril (v/v%) (4)
0	28	72	0
10	28	72	0
40	28	55	17
45	24	36	40
65	24	36	40

Table 1: HPLC gradient program for the separation of the OPA-TATG derivatives of the enantiomers of glutamic acid, aspartic acid and alanine

Time(1), Methanol(2), Phosphate buffer(3), Acetonitril(4)

Az adatok statisztikai értékelése

A gyártási fázisoknak (és a gyártási folyamatnak) a D-aminosavak abszolút mennyiségére gyakorolt hatását az alkalmazott törzsek esetében külön-külön is elemeztük, egytényezős varianciaanalízissel. A gyártási folyamatoknál azt vizsgáltuk, hogy az azonos körülmények között végzett három egymást követő gyártás a várakozásoknak megfelelően azonos D-aminosav tartalmat eredményezett-e. Amennyiben a gyártási folyamatok szignifikáns hatást gyakoroltak a változókra, *Martin* (1998) módszerén alapulva blokkelrendezést alkalmaztunk, egy faktor (a gyártási fázis) tanulmányozására. A gyártási fázisok hatását úgy elemeztük, hogy a gyártási folyamatokat blokkoknak tekintettük, és ezáltal jelentősen sikerült csökkentenünk a hibavariációt. A gyártási fázis és a törzshatás vizsgálatára kéttényezős varianciaanalízist alkalmaztunk mind az aminosavak abszolút mennyisége, mind a százalékos mutatók esetében. A középértékek összehasonlítását Student-Newman-Keuls-tesztel valósítottuk meg. A számításokat az SPSS 10.0 (1999) statisztikai programmal végeztük.

EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

Az eredmények értékelése során három változót elemeztünk: a szabad D-aminosavak abszolút mennyiségét (mg/100 g), a D-aminosav összetételt [(D-aminosav/ΣD-aminosav)*100] és a D-enantiomer arányát adott szabad aminosav mennyiségén belül [(D/D+L)*100]. A gyártási folyamat (A); a gyártási fázis (B); és a starterkultúra (C) volt az a tényező, melynek a változókra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A gyártási fázis, a starterkultúra (és a gyártási folyamat) hatása a szabad D-aminosav tartalomra

A gyártási fázisoknak (és a gyártási folyamatnak) a D-aminosavak abszolút mennyiségére gyakorolt hatását a két különböző egytörzstenyészet használatakor külön-külön is megvizsgáltuk. A *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303 egytörzstenyészetével gyártott sajtokban a három egymást követő gyártási folyamat nem eredményezett szignifikáns eltérést ($P>0,05$) a D-aszparaginsav, a D-glutaminsav, és a D-alanin tartalomban. A D-aminosavak mennyiségét nem befolyásolta az, hogy egymás után hányadik sajtgyártási folyamatban készült a sajt. Ez azt jelenti, hogy a három ismétlés során ténylegesen nem volt különbség olyan technológiai paraméterben, mely a mért változókra jelentős hatással van. A különböző gyártási fázisban vett minták közül legalább kettőben szignifikáns különbség volt az átlagos (N=3) D-aszparaginsav ($P<0,05$), D-glutaminsav ($P<0,01$), és D-alanin tartalomban ($P<0,05$). A D-aszparaginsav és a D-glutaminsav tartalom jelentősen több volt a préselés után, mint a préselés előtt (2. A. táblázat), viszont ezt követően, az érlelés során gyakorlatilag nem változott. A D-alanin tartalom mennyisége fokozatosan emelkedett, egészen az utolsó mintavételi pontig, az érlelés kilencedik hetéig. A préselés előtti alvadék D-alanin tartalma szignifikánsan kisebb volt, mint az egy hónapig érlelt sajté. A préselés utáni sajt D-alanin tartalma szignifikánsan kisebb volt, mint a kilenc hétig érlelt sajté.

A *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 egytörzstenyészetével gyártott sajtok esetében a gyártási folyamatok között jelentős eltérés volt a vizsgált három D-aminosav szintjében ($P<0,01$), a harmadik gyártás során mindhárom D-aminosav mennyisége szignifikánsan magasabb volt, mint az első és a második gyártásnál. A gyártási fázisok között nem volt kimutatható különbség ($P>0,05$). Ennek az oka az volt, hogy az előző, „303” jelű törzs elemzéséhez képest megnövekedett a becsült hibavariancia (MS_E) a harmadik gyártási folyamat kiugró értékei miatt. A hibavariancia csökkentése érdekében

a három gyártási folyamatot blokkoknak tekintettük, a tanulmányozni kívánt faktor a gyártási fázis volt (Martin, 1998). E modell alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a D-aszparaginsav ($P < 0,05$) és a D-alanin ($P < 0,01$) mennyisége jelentősen különbözött legalább két gyártási fázis között, míg a D-glutaminsav tartalom nem különbözött jelentősen a gyártási fázisok között ($0,05 < P < 0,1$).

A D-aszparaginsav tartalom a préselés előtti és utáni fázisban különbözött csupán, és az érlelés során nem változott, mint a „303” jelű törzs esetében (2. B. táblázat). A D-alanin tartalom emelkedési tendenciája hasonló volt, mint a „303” jelű törzs esetében: több D-alanin volt az egy hétig érlelt sajtokban, mint az érlelés előtt (a préselés után); és magasabb volt a D-alanin szintje kilenc hetes érlelés után, mint egy hónapos érlelés után.

2. táblázat

A cheddar sajtok szabad D-aszparaginsav, D-glutaminsav és D-alanin tartalmának alakulása a sajtgyártás során, két különböző egytörzstenyészet használatakor

A. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303

Átlag (N=3) (mg/100 g szárazanyag)	Sajtgyártás kezdetétől eltelt idő (nap) (2)				
	0	1	7	28	63
	Gyártási fázis (3)				
(1)	Préselés előtt (4)	Préselés után (5)	Érlelés (6)	Érlelés(6)	Érlelés(6)
D-Asp	0,98 ^a	1,89 ^b	2,17 ^b	2,21 ^b	2,37 ^b
D-Glu	4,11 ^a	6,01 ^b	6,60 ^b	6,44 ^b	6,39 ^b
D-Ala	1,83 ^a	2,44 ^{ab}	3,12 ^{abc}	3,78 ^{bc}	4,48 ^c

B. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2

Átlag (N=3) (mg/100 g szárazanyag)	Sajtgyártás kezdetétől eltelt idő (nap)				
	0	1	7	28	63
	Gyártási fázis				
	Préselés előtt	Préselés után	Érlelés	Érlelés	Érlelés
D-Asp	0,59 ^a	1,07 ^b	1,38 ^b	1,47 ^b	1,48 ^b
D-Glu	2,69	3,57	4,27	4,21	4,08
D-Ala	1,01 ^a	1,23 ^a	1,73 ^b	1,97 ^b	2,31 ^c

^{abc} Azok az egy sorban lévő átlagok, ahol egy vagy több index közös, nem különböznek. (Averages in one row with common superscript do not differ.) Az index hiánya azt jelzi, hogy a varianciaanalízis nem mutatott szignifikáns különbséget a csoportok között, így a középértékek páronkénti összehasonlítását nem végeztük el. (Absence of superscript means that there were no significant differences among groups.)

Table 2: The free D-aspartic acid, D-glutamic acid and D-alanine content of cheddar during processing with the use of two different starter strains

Average of D-amino acid content (mg/100 g dry matter)(1), Time interval from the beginning of processing(2), Stage of processing(3), Before pressing(4), After pressing(5), Ripening (6)

A két különböző egytörzstenyészet használatával végzett sajtgyártási folyamatokat együttesen vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a gyártási folyamatoknak a D-aminosavak abszolút mennyiségére gyakorolt hatása nem volt szignifikáns ($P > 0,05$).

A különböző gyártási fázisokban vett minták legalább két esetben különböztek a D-aszparaginsav és a D-alanin tartalomban, azonban nem volt szignifikáns különbség a D-glutaminsav ($P = 0,273$) és a teljes D-aminosav tartalomban ($P = 0,063$) (3. táblázat). A két különböző starterkultúrával készített sajt között jelentős különbség volt a D-aszparaginsav, a D-glutaminsav, és a D-alanin tartalomban, és a vizsgált D-aminosavak összegében is.

3. táblázat

A gyártási fázis és a starterkultúra hatása a D-aszparaginsav, D-glutaminsav, és D-alanin tartalomra a cheddar sajt gyártása során

Tényezők (1)	D-aminosavak mennyisége (mg/100 g) (2)			
	D-Asp	D-Glu	D-Ala	D-Asp+D-Glu+D-Ala
Gyártási fázis (B) (3)	*	NS	**	NS
Starterkultúra (C) (4)	**	**	***	**
B X C	NS	NS	NS	NS

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Table 3: The influence of processing steps and applied different starter strains on the D-aspartic acid D-glutamic acid and D-alanine content of cheddar during processing

Traits(1), D-amino acid concentration (variables)(mg/100 g)(2), Processing steps(3), Starter strains(4)

A különböző gyártási fázisokban mért D-aszparaginsav tartalom elemzése a két különböző starterkultúrával készített sajtok együttes vizsgálatakor hasonló eredményt adott, mint amelyet mindkét törzsnél külön-külön is tapasztaltunk: a D-aszparaginsav mennyisége nagyobb volt a préselést követő érés első hete után, mint a préselés előtt ($P < 0,05$); viszont ezt követően, az érlelés során (7-63 nap) gyakorlatilag nem változott. A D-glutaminsav mennyisége a gyártás során gyakorlatilag nem változott. Bár a „303” törzsnél a préselésnél emelkedést tapasztaltunk, nem kaptunk szignifikánsan nagyobb értékeket az „AM2” törzsnél, és az együttes elemzéskor is az utóbbi tendencia érvényesült. A D-alanin tartalom fokozatos növekedése azonos tendenciát mutatott mindkét törzsnél, és így az együttes elemzésben is: a préselés előtt kisebb volt a D-alanin tartalom, mint a 28 napos érlelés után; és 63 napos érlelés után több volt, mint a préselés után, azaz az érlelés megkezdése előtt ($P < 0,05$).

A gyártási fázis, a starterkultúra (és a gyártási folyamat) hatása a szabad D-aminosav összetételre

Szabad D-aminosav összetétel alatt jelen esetben azt értjük, hogy a szabad D-aszparaginsav, D-glutaminsav, és D-alanin mennyisége a vizsgált szabad D-aminosavak összegének hány százalékát teszi ki.

A hat gyártási folyamat között nem volt jelentős eltérés a szabad D-aminosavak összetételében ($P > 0,05$). A gyártási fázisok D-aminosav-összetétele szignifikánsan különbözött egymástól (4. táblázat), tehát a gyártás folyamata során a termék D-aminosav „mintázata” változott. A starterkultúra választás nem gyakorolt jelentős hatást

a D-aszparaginsav, a D-glutaminsav, és a D-alanin D-aminosav tartalom belüli arányára ($P > 0,05$), tehát a két starterkultúra használatától függően nem különbözött jelentősen a D-aminosav összetétel.

4. táblázat

A gyártási fázis és a starterkultúra hatása a D-aminosav-összetételre a cheddar sajt gyártása során (D-aminosav-összetétel: a D-aszparaginsav, a D-glutaminsav, és a D-alanin mennyisége a vizsgált D-aminosavak összegének hány százalékát teszi ki)

Tényezők (1)	Aminosav-összetétel (2)		
	D-aminosav/ Σ D-aminosav (%) (3)		
	D-Asp	D-Glu	D-Ala
Gyártási fázis (B) (4)	***	***	**
Starterkultúra (C) (5)	NS	NS	NS
B X C	NS	NS	NS

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Table 4: The influence of processing steps and applied different starter strains on the D-amino acid composition of cheddar during processing (D-amino acid composition means the percentage ratio of D-aspartic acid, D-glutamic acid and D-alanine within the sum of all of these amino acids)

Traits(1), D-amino acid composition (variables)(2), D-amino acid/ Σ D-amino acid(3), Processing steps(4), Starter strains(5)

5. táblázat

A D-aminosav-összetétel alakulása a cheddar sajt gyártása során (D-aminosav/ Σ D-aminosav (%))

Átlag (N=6) (%) (1)	Sajtgyártás kezdetétől eltelt idő (nap) (2)				
	0	1	7	28	63
	Gyártási fázis (3)				
	Préselés előtt (4)	Préselés után (5)	Érlelés (6)	Érlelés	Érlelés
D-Asp/ Σ D-aminosav	13,9 ^a	18,1 ^b	18,3 ^b	18,5 ^b	18,2 ^b
D-Glu/ Σ D-aminosav	62,0 ^c	59,0 ^c	56,6 ^{bc}	52,6 ^{ab}	49,6 ^a
D-Ala/ Σ D-aminosav	24,2 ^{ab}	22,9 ^a	25,1 ^{ab}	28,8 ^{bc}	32,1 ^c

^{abc} Azok az egy sorban lévő átlagok, ahol egy vagy több index közös, nem különböznek. (Averages in one row with common supercript do not differ.)

Table 5: Changes in D-amino acid composition during processing cheddar cheese (D-amino acid / Σ D-amino acid (%))

Average of D-amino acid composition (D-amino acid/ Σ D-amino acid (%))(1), Time interval from the beginning of processing(2), Stage of processing(3), Before pressing(4), After pressing(5), Ripening(6)

A D-aszparaginsav aránya a teljes D-aminosav tartalomon belül nagyobb hányadot tett ki a préselés után, mint a préselés előtt, és ezt követően már nem változott (5. táblázat). A D-glutaminsav aránya a préselés során, valamint a préselés és az érlelés első hete között nem változott, de az érlelés 7. napján magasabb volt, mint az érlelés 63. napján. A D-alanin aránya magasabb volt az érlelés 63. napján, mint az érlelés 7. napján. Az érlelés során a D-aminosav összetétel tehát úgy alakult, hogy változatlan D-aszparaginsav arány mellett a D-alanin arány nőtt, a D-glutaminsav aránya pedig csökkent a D-aminosav tartalomon belül.

A gyártási fázis, a starterkultúra (és a gyártási folyamat) hatása a szabad aminosav tartalomon belül a D-enantiomer arányának alakulására

Adott szabad aminosav esetében a D-enantiomer arányát a $(D/D+L)*100$ százalékos aránnyal fejeztük ki.

A gyártási folyamatok között nem volt jelentős különbség a D-enantiomerek arányában a szabad aszparaginsav, glutaminsav, és alanin tartalomon belül ($P>0,05$). A gyártási fázisok hatása szignifikáns volt a glutaminsav és az alanin esetében (6. táblázat). A starterkultúrák között is jelentős különbséget találtunk a D-enantiomerek arányában a szabad glutaminsav és a szabad alanin tartalomon belül.

6. táblázat

A gyártási fázis és a starterkultúra hatása a D-enantiomer arányára adott szabad aminosav tartalomon belül

Tényezők (1)	D-enantiomer aránya adott szabad aminosavban (2)		
	D-aminosav/D+L-aminosav (%) (3)		
	Asp	Glu	Ala
Gyártási fázis (B) (4)	- ^a	***	**
Starterkultúra (C) (5)	- ^a	***	***
B X C	- ^a	**	NS

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ^aAz aszparaginsav $(D/D+L)*100$ aránya a csoportvarianciák inhomogenitása miatt ($P < 0,001$) varianciaanalízissel nem értékelhető. Az adatok transzformálása sem volt eredményes. (*The influence of processing steps and strains on the $(D/D+L)*100$ ratio of D-aspartic acid can not be evaluated with analysis of variance due to the inhomogeneity of variances among groups which cannot be eliminated with transformation of data.*)

Table 6: The influence of processing steps and applied different starter strains on the ratio of D-enantiomer within the free amino acid content

Traits(1), Tre ratio of the D-enantiomer within the free amino acid content (variables)(2), D-amino acid/D+L-amino acid(3), Processing steps(4), Starter strains(5)

A glutaminsavban a D-enantiomer aránya jelentősen magasabb volt az érlelés hetedik napján, mint a préselés előtt és után. Az érlelés 28. napján magasabb volt a D-glutaminsav aránya, mint az érlelés hetedik napján (7. táblázat). A D-glutaminsav abszolút mennyisége nem növekedett jelentősen (3. táblázat), viszont a $(D/D+L)*100$ arány szignifikánsan nőtt az érlelés során, mivel az L-glutaminsav abszolút mennyisége csökkent.

Az alanin esetében csak a préselés előtti és utáni minták D-enantiomer-arányában volt különbség, az érés során a D-alanin aránya a szabad alanin tartalom belül változatlan maradt. Az éréskor a szabad D-alanin abszolút mennyiségének növekedésével azonos arányban nőtt a szabad L-alanin tartalom.

A starterkultúra választás szignifikáns hatást gyakorolt a D-enantiomer-arányra a glutaminsav és az alanin esetében (6. táblázat). A „303” törzssel gyártott sajtok szabad glutaminsav és alanin tartalmán belül a D-enantiomer nagyobb hányadot tett ki, mint az „AM2” törzsnél. Ezen D-aminosavak abszolút mennyisége is több volt a „303” törzsnél, mint az „AM2” törzsnél (2. és 3. táblázat). A szabad L-aminosavak mennyisége nem volt a D-aminosav tartalommal arányosan magasabb a „303” törzsben.

7. táblázat

A D-enantiomerek arányának változása a szabad aminosav tartalom belül a cheddar sajt gyártása során ((D/D+L)*100)

Átlag (N=6) (%) (1)	Sajtgyártás kezdetétől eltelt idő (nap) (2)				
	0	1	7	28	63
	Gyártási fázis (3)				
	Préselés előtt (4)	Préselés után (5)	Érlelés (6)	Érlelés	Érlelés
Asp	28,2*	35,8*	38,5*	38,3*	36,4*
Glu	24,9 ^a	26,4 ^a	51,6 ^b	82,2 ^c	81,0 ^c
Ala	54,0 ^b	46,6 ^a	48,0 ^a	45,4 ^a	43,5 ^a

^{abc} Azok az egy sorban lévő átlagok, ahol egy vagy több index közös, nem különböznek. (Averages in one row with common superscript do not differ.); *Az aszparaginsav aránya a csoportvarianciák inhomogenitása miatt (P<0,001) varianciaanalízissel nem értékelhető. Így az átlagokat sem lehet összehasonlítani. (The influence of processing steps on the (D/D+L)*100 ratio of D-aspartic acid can not be evaluated with analysis of variance due to the inhomogeneity of variance among groups. This means that averages cannot be compared.)

Table 7: The changes of the ratio of the D-enantiomer within the free amino acid content during processing cheddar ((D/D+L)*100)

Average of D-enantiomer ratio ((D/D+L)*100)(1), Time interval from the beginning of processing(2), Stages of processing(3), Before pressing(4), After pressing(5), Ripening(6)

KÖVETKEZTETÉSEK

Ha a starterkultúra eredetű baktériumok csíraszám változását vizsgáljuk az idő függvényében, a préselés alatt élénk mikrobatevékenység folyik, és elméletileg a populáció növekedése ilyenkor még a logaritmus szakaszban van, az elpusztult baktériumsejtek száma csekély (Scott, 1998), így elvileg a *sphaeroplast* állapotban lévő starter eredetű baktériumok száma sem jelentős. Kísérletünk során azonban a sajt szárazanyagának D-aszparaginsav tartalma mindkét törzskultúra, D-glutaminsav tartalma pedig a „303” jelű törzskultúra használatakor jelentősen nőtt a préselésnél. A sajtgyártás során bakteriofág-fertőzés nem volt, így lízist sem okozhatott. Nem zárható ki, hogy a préseléskor kialakuló erőhatások valamilyen szinten elősegítették egyes sejtek

lízisét, de ennek kicsi a valószínűsége, mivel a préselés során alkalmazott nyomás négy nagyságrenddel kisebb volt, mint amely a nyerstej csíraszám-csökkentéséhez szükséges (Mészáros és mtsai., 2002).

A D-alanin mennyiségének fokozatos emelkedését Brücker és Hausch (1990b) is tapasztalta kecskesajt érlelése során. Az abszolút értékben mért emelkedést ők azonban nagyobbra mérték: két hónapos érlelés során tízszeres koncentráció növekedést tapasztaltak, míg jelen esetben a cheddar sajtnál kilenc hét alatt csak körülbelül két és félszeresére nőtt a D-alanin tartalom. Nyerstej tárolásakor, illetve gyümölcsle alapú fermentumokban is jelentős D-alanin tartalom növekedést tapasztaltak a mikrobaszaporodás stacioner szakaszában (Gandolfi és mtsai., 1992, 1994). A cheddar sajt érlelésének általunk vizsgált szakaszában a D-alanin mennyiségének növekedésében közrejátszhat az, hogy az érési idő előrehaladtával egyre több az elpusztult baktériumsejt a sajtból, melyek egy része lízist szenved, így a sejtfalból (és a citoplazmából) egyes D-aminosavak kijuthatnak a sejtől.

Annak ellenére, hogy a D-aszparaginsav és a D-glutaminsav is megtalálható a sejtfalban (Schleifer és Kandler, 1972; Tipper és Wright, 1979), koncentrációjuk nem változott szignifikánsan az érlelés 9. hetéig a cheddar sajt gyártása során. Gandolfi és mtsai. (1992) nyerstej 4°C-on történő tárolása során egy hét alatt nem tapasztaltak növekedést sem a szabad D-aszparaginsav sem a szabad D-glutaminsav tartalomban. A 12 hónapig érlelt kecskesajt azonban jelentősen több D-glutaminsavat tartalmazott, mint a két hónapig érlelt (Brücker és Hausch, 1990b). Valószínűleg az általunk vizsgált érlelési időszakban (0-9 hét) még nem voltak jelentősek azok a lízissel összefüggő folyamatok, melyek a D-glutaminsav (és esetleg a D-aszparaginsav) felszabadulásával járhatnak a bakteriális sejtfalból és a citoplazmából.

Ha a szabad alanin tartalomról vizsgáljuk a D-enantiomer részarányát, azt tapasztaljuk, hogy az érlelés során ez az arány nem változik, annak ellenére, hogy sajtgyártás során az érés mélységének a növekedésével a szabad L-alanin mennyisége nő, mivel a proteázok és peptidázok hatására a kazeinből képződött peptidok kisebb peptidokra és szabad aminosavakra bomlanak le (Wilkinson és mtsai., 1995; Lynch és mtsai., 1999). A D-aminosavak mennyiségének növekedése gyakorlatilag követi az L-aminosavak mennyiségének növekedését. Elképzelhető, hogy a szabad D-alanin tartalom egy része a sajtésztaiban található szabad L-alaninból jött létre az alanin racemáz hatására, amennyiben ez az enzim a baktériumsejten kívül is képes jelentékenyen működni. Amennyiben képes, az L-D átalakulási folyamat felerősödhet az érés során. Ennek két oka lehet. Egyrészt a citoplazmában található alanin racemáz felszabadulhat a lízist szenvedett sejtekből, és a lízis intenzívebbé válásával aktivitása nőhet. Másrészt az érés mélységének és a szabad aminosavak mennyiségének növekedésével a sejtől kiszabadult bakteriális eredetű racemáz egyre több szubsztrátra lelhet.

A *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303 egysejtkultúrával gyártott sajtok mindegyik D-aminosavból jelentősen többet tartalmaztak, és a D-enantiomer aránya is nagyobb hányadot tett ki a teljes (L+D) szabad glutaminsav és az alanin tartalomról, mint a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 egysejtkultúrával gyártott sajtok. Valószínűleg ennek az volt az oka, hogy az előbbi kultúra használatánál a D-aminosav-termelés intenzívebb volt. Nem zárható ki, hogy a „303” jelű törzs adott gyártási körülmények között hajlamosabb a lízisre, mint az „AM2” jelű törzs, és így sejteiből több D-aminosav szabadul fel, illetve alakul ki enzimes úton. A baktériumtörzsek között a lízisre való hajlandóságban jelentős különbség lehet. Csak az intacelluláris enzimek aktivitásának a mérésével (Wilkinson és mtsai., 1995) lehetne megbizonyosodni arról, hogy a cheddar sajt gyártása során tényleg különbözik-e ez a két törzs a lízis

szempontjából. A szabad D-aminosav-összetételben azonban nem volt különbség annak függvényében, hogy a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303, vagy a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 törzset alkalmaztuk a sajtgyártás során.

IRODALOM

- Adams, E. (1972). Racemases and epimerases. The enzymes. Boyer, P.D., Ed.; Academic Press, New York, 6. 479.
- Bhattacharyya, S.R., Banerjee, A.B. (1974). Folia Microbiol., 19. 43-50.
- Botazzi, V. (1988). Biochimie, 70. 303-315.
- Brückner, H., Hausch, M. (1990a). D-amino acids in dairy products: detection, origin and nutritional aspects. I. Milk, fermented milk, fresh cheese and acid curd cheese. Milchwissenschaft, 6. 357-360.
- Brückner, H., Hausch, M. (1990b). D-amino acids in dairy products: detection, origin and nutritional aspects. II. Ripened cheeses. Milchwissenschaft, 7. 421-425.
- Brückner, H., Jaek, P., Langer, M., Godel, H. (1992). Liquid chromatographic determination of D-amino acids in cheese and cow milk. Implication of starter cultures, amino acid racemases, and rumen microorganisms on formation, and nutritional considerations. Amino acids, 2. 271-287.
- Brückner, H., Becker, D., Lüpke, M. (1993). Chirality of amino acids of microorganisms used in food biotechnology. Chirality, 5. 385-392.
- Csapó J., Csapó-Kiss Zs., Stefler J., Martin, T.G., Némethy S. (1995). Influence of mastitis on D-amino acid content of milk. J. Dairy Sci., 78. 2375-2381.
- Gandolfi, I., Palla, G., Delprato, L., De Nisco, F., Marchelli, R., Salvadori, C. (1992). D-amino acids in milk as related to heat treatments and bacterial activity. J. of Food Sci., 2. 377-379.
- Gandolfi, I., Palla, G., Marchelli, R., Dossena, A., Puelli, S., Salvadori, C. (1994). D-alanine in fruit juices: a molecular marker of bacterial activity, heat treatments and shelf-life. J. of Food Sci., 1. 152-154.
- Einarsson, S., Folestad S., Josefsson, B. (1987). Separation of amino acid enantiomers using precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and 2,3,4,6,-tetra-O-acetyl-1-thio- β -glucopyranoside. J. Liquid Chrom., 10. 1589.
- Friedman, M. (1991). Formation, nutritional value, and safety of D-amino acids. In Nutritional and toxicological consequences of food processing. Friedman, M. Ed. Plenum Press, New York, 447-481.
- Friedman, M. (1999). Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. J. Agric. Food Chem., 47. 3457-3479.
- Imai, K., Fukushima, T., Santa, T., Homma, H., Hamase, K., Sakai, K., Kato, M. (1996). Analytical chemistry and biochemistry of D-amino acids. Biomedical Chromatography, 10. 303-312.
- Man, E.H., Bada, J.L. (1987). Dietary D-amino acids. Ann. Rev. Nutr., 7. 209-225.
- Mészáros L., Koncz K.-né, Farkas J., Pásztorné Huszár K., Helt R., Lechner N. (2002). A nyerstej pasztörözése nagy hidrosztatikus nyomással. XIV. Élelmiszertudományi Konferencia kiadványa. Budapest, 13.
- Lynch, C.M., Muir, D.D., Banks, J.M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (1999). Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. J. Dairy Sci., 82. 1618-1628.
- Martin, T.G. (1998). Statistical procedures for agricultural research. Egyetemi jegyzet, kiadták a PATE-ÁTK nyomdájában, 53-55.

- Scott, R. (1998). Bacteriology in relation to cheesemaking. In Cheesemaking practice; Scott, R., Ed. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, 66-68.
- Schleifer, K.H., Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bact. Rev.*, 4. 407-477.
- Tipper, D.J., Wright, A.(1979). The structure and biosynthesis of bacterial cell walls. In *The bacteria*, Sokatch, J.R., Ornston, L.N., Eds. Academic Press, New York, 7. 291-426.
- Wilkinson, M.G., Guinee, T.P., O'Callaghan, D.M., Fox, P.F. (1995). Effect of cooking temperature on the autolysis of starter, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2, and the maturation of Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, 7. 376-380.

Levelezési cím (*corresponding author*):

Vargáné Visi Éva

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar

7401 Kaposvár, Pf. 16.

University of Kaposvár, Faculty of Animal Sciences

H-7401 Kaposvár, P.O.Box 16.

Tel.: 36-82-314-155, Fax: 36-82-320-175

e-mail: visi@mail.atk.u-kaposvar.hu