

Optimiranje minimalne podloge za proizvodnju tvari arome fermentiranih mliječnih proizvoda

Nevenka Mazić, Rajka Božanić

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.146.3

Sažetak

U radu je optimirana minimalna podloga na bazi mlijeka i laktoze na kojoj bakterije mliječne kiseline mogu proizvesti maksimalnu količinu hlapivih aromatskih tvari karakterističnih za fermentirane mliječne proizvode. Za pripreme podloga korišten je kazein, tri-natrij-citrat, laktoza, mineralne tvari mlijeka, proteini sirutke i mlijeko s 1,5 % m. m. Glavna razlika pojedinih podloga bila je u količini citrata i proteina sirutke. Fermentacija je vođena pri sobnoj temperaturi do pH vrijednosti 5. Uzorci su senzorski ocijenjeni metodom kvantitativne deskriptivne analize. U svim podlogama željena pH-vrijednost, ovisno o količini citrata, postignuta je nakon 68 - 71 sati fermentacije. Fermentacija i nastanak aromatskih tvari bili su intenzivniji u podlogama koje su sadržavale proteine sirutke u usporedbi s podlogama koje su sadržavale samo kazein. Povećana količina citrata u podlogama pozitivno je djelovala na razvoj arome u supstratu. Citrat je povišio početnu pH-vrijednost podloge, ali i djelovao kao pufer tijekom fermentacije, zbog čega je bila moguća dulja fermentacija i veća sinteza aromatskih tvari. Pri pH vrijednosti oko 5, aroma karakteristična za fermentirane mliječne proizvode je bila najizraženija, a kiseli okus manje dominantan. Supstrat s 0,25% citrata i 0,1% proteina sirutke, pri pH-vrijednosti 5, imao je najbolje senzorske karakteristike.

Ključne riječi: aroma fermentiranih mlijeka, citrat, optimiranje podloge, proteini sirutke

Uvod

Povećati intenzitet arome u siru, jogurtu i drugim mliječnim proizvodima jedan je od glavnih interesa u mliječnoj industriji, budući da aroma velikim djelom određuje odabir proizvoda od strane konzumenta. Konkurencija na

tržištu zahtijeva stalni razvoj i unapređenje proizvoda, a razvoj arome je dugotrajan i skup proces koji ovisi o mnogim čimbenicima.

Dodatkom starter kulture mlijeku ili nekom drugom mediju pogodnom za rast bakterija, započinje fermentacija. Učinkovitost starter kulture ovisi o mediju u kojem bakterije rastu, vrsti bakterija mliječne kiseline koje čine starter kulturu, pH-vrijednosti sredine, temperaturi i vremenu fermentacije. Prilagodbom sastojaka medija u kojem rastu bakterije i drugih parametara tijekom fermentacije može se optimirati razvoj arome (Marshall, 1984.). Industrijska važnost bakterija mliječne kiseline uglavnom je zasnovana na svojstvu da fermentiraju ugljikohidrate i pretvaraju ih u mliječnu kiselinu, te druge komponente koje su nositelji arome (Sarantinopoulos i sur., 2001.). Tvari koje su nositelji arome fermentiranih mliječnih proizvoda veoma su raznolike, a uključuju kiseline, estere, aldehide, ketone, furane, fenolne spojeve, slobodne masne kiseline i druge tvari. Ti spojevi nastaju kao produkti razgradnje ugljikohidrata, citrata, amino-kiselina i masnih kiselina, u tri glavna katabolička puta: glikoliza, lipoliza i proteoliza. Tvari nositelji arome karakteristične za fermentirane mliječne proizvode su diacetil i acetoin (maslačna aroma), acetat i acetaldehid (jogurt aroma) (Marilley i sur., 2004.).

U procesu stvaranja arome uloga laktoze ograničena je na nastanak izraženog kiselog okusa, dok je proizvodnja aromatičnih tvari više vezana uz metabolizam citrata. Bitno je napomenuti kako nisu svi metabolički putevi jednaki za sve mikroorganizme koji fermentiraju, nego se razlikuju od vrste do vrste. Mnoge bakterije mliječne kiseline nisu u stanju koristiti citrat kao izvor ugljika, ali ga mogu fermentirati (na primjer *Str. lactis* subsp. *diacetylactis*) (Law, 1984.). U metabolizam citrata uključena su četiri glavna enzima: citrat liaza, acetolaktat sintaza, diacetil reduktaza i acetoin reduktaza, a krajnji produkti su diacetil, acetoin i acetolaktat (Marilley i Casey, 2004.). Budući da su aromatske tvari produkti metabolizma citrata, djelovanjem na metabolizam citrata može se utjecati i na proizvodnju aromatskih tvari. U nekoliko radova pokazano je kako se u mediju koji sadrži različite udjele glukoze (ili laktoze) i citrata, povećanjem udjela citrata povećala brzina rasta bakterija, a time i katabolizam citrata (Goupry i sur., 2003.; Sarantinopoulos i sur., 2001.).

Svrha ovog rada bila je sastaviti podlogu na bazi mlijeka i laktoze na kojoj bi rasle bakterije mliječne kiseline te proizvele maksimalnu količinu hlapivih aromatskih tvari karakterističnih za fermentirane mliječne proizvode. Tako proizveden supstrat s aromom fermentiranog mliječnog proizvoda

koncentrirao bi se i upotrijebio kao dodatak prehrambenim proizvodima (pretežito svježem siru) u svrhu poboljšanja senzorskih karakteristika proizvoda. Podloga za rast bakterija mliječne kulture treba služiti kao minimalna podloga, odnosno treba sadržavati samo osnovne sastojke za rast bakterija. Takva minimalna podloga sadrži soli, neke vitamine i mineralne tvari te izvor ugljika (kao što je glukoza/laktoza) i dušika (Ray, 2004.).

Materijal i metode rada

Podloge

Za pripreme podloga korišteni su sljedeći sastojci: kazein, tri-natrij-citrat, laktoza, mineralne tvari mlijeka (Lactoval®, DMV International, Nizozemska; sastav i fizikalno-kemijska svojstva prikazana su u tablici 1), proteini sirutke i mlijeko s 1,5 % m. m. Svi sastojci, izuzev mlijeka, bili su u obliku praha.

Tablica 1: Sastav (%) i karakteristike mineralnih tvari mlijeka Lactoval®, DMV International

Table 1: Composition (%) and characteristics of milk minerals Lactoval®, DMV International

Suha tvar Total solids	95,00	Sastav suhe tvari (%) Total solid composition (%)	
Voda Water	5,00	Ugljikohidrati (laktoza) Carbohydrates (lactose)	4,00
		Proteini / Proteins	3,00
Fizikalno-kemijska svojstva Physicochemical properties		Masti / Fat	<1,00
pH (10% otopina, 20°C)	6,5 - 7,5	Mineralne tvari mlijeka Milk minerals	78,50
pH (10% solution, 20°C)		Kalcij / Calcium	25,00
Veličina čestica Particle size	90% < 65 µm	Fosfor / Phosphorus	11,00
		Natrij / Sodium	1,00
		Kalij / Potassium	1,00
		Magnezij / Magnesium	0,90

Svi sastojci u prahu i 150 mL mlijeka dodani su u 1,5 L vode. Smjesa je pasterizirana u električnom grijaču (Thermomix™ 31, Vorwerk) pri 75 °C, te brzo ohlađena strujom hladne vode na sobnu temperaturu i prebačena u metalne posude za fermentaciju. Rađena su tri pokusa s po tri kombinacije sastojaka u smjesi (tablica 2). Citrat je dodan kao pufer kako se ne bi pH-vrijednost tijekom fermentacije prebrzo spustila. Na taj je način fermentacija

produljena i omogućen je nastanak veće količine aromatskih tvari (Goupry i sur., 2003.; Sarantinopoulos i sur., 2001.). Glavna razlika pojedinih podloga bila je u količini citrata, ali i u prisutnosti, odnosno odsutnosti, proteina sirutke. U tablici 2 nalazi se pregled vrijednosti sastojaka u podlogama.

Tablica 2: Sastav (%) korištenih podloga

Table 2: Composition (%) of used media

Sastojak podloge Media ingredient	Pokus 1 Trial 1			Pokus 2 Trial 2			Pokus 3 Trial 3		
	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
Kazein Casein	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3-Na-citrat 3-Na-citrate	0,25	0,5	1,0	0,15	0,25	0,25	0,05	0,15	0,25
Laktoza Lactose	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Mineralne tvari mlijeka Milk minerals	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Mlijeko (1,5% m. m.) Milk	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bakterijska kultura Bacterial culture	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Proteini sirutke Whey proteins	0,1	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1

Kultura

Korištena je komercijalna zaleđena mezofilna bakterijska kultura (CHOOZIT™ MH13, Danisco, Danska) prethodno čuvana u zamrzivaču na -60 °C. To je kultura sastavljena od bakterijskih vrsta *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.

Inkubacija i mjerenje pH

U pripremljene podloge dodano je 0,6 g / 1,5 L (0,04 %) komercijalne bakterijske kulture i podloge su inkubirane pri sobnoj temperaturi. Početne pH-vrijednosti varirale su s obzirom na količinu citrata (tablica 3). Kada je pH dostigao željenu vrijednost od 4,7 - 5,2, fermentacija je zaustavljena prebacivanjem metalnih posuda u hladnjak na 4°C.

Tablica 3: Početne pH-vrijednosti u ovisnosti o količini citrata

Table 3: Initial pH values depending on citrate amount

	Pokus 1 Trial 1			Pokus 2 Trial 2			Pokus 3 Trial 3		
	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
% 3-Na-citrat % 3-Na-citrate	0,25	0,50	1,00	0,15	0,25	0,25	0,05	0,15	0,25
pH	7,59	7,70	7,95	7,50	7,59	7,60	7,32	7,49	7,59

Senzorska analiza

Nakon završene fermentacije, supstrati su paralelno analizirani metodom kvantitativne deskriptivne analize i međusobno uspoređeni. Bilo je potrebno odabrati supstrat s najboljim senzorskim karakteristikama, koji bi se kasnije koncentrirao i koristio kao dodatak prehranbenim proizvodima. Ocjenjivane su karakteristike arome, mirisa, okusa i konzistencije. Panel grupu činilo je 5 senzorskih analitičara, a ocjenjivalo se na skali od 1 do 5, pri čemu su ocjene predstavljale intenzitet određene karakteristike (1 najmanji, a 5 najveći intenzitet). Najprije je razvijena terminologija koja je kasnije korištena. Panelistima su dani uzorci i od njih se tražilo da daju pojmove koji opisuju uzorke i način na koji se uzorci razlikuju, a zatim su supstratima dodijeljene ocjene po odabranim karakteristikama. Izabrani su sljedeći pojmovi za opis supstrata: aroma na fermentirane mliječne proizvode, kiselo, vodenasto i zrnata konzistencija.

Statistička obrada senzorskih ocjena

Pokusi u kojima su supstratima dodijeljene dobre senzorske ocjene (1-1, 2-1, 2-2, 2-3, 3-2, 3-3) su ponovljeni 2 puta, te je iz svih 15 ocjena (2 ponavljanja; 5 panelista) izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička obrada senzorskih ocjena obavljena je osnovnim statističkim metodama.

Koncentracija supstrata

Kako je konačni cilj bio proizvesti supstrat koji bi se koristio za obogaćivanje prehrambenih proizvoda, potrebno ga je prethodno maksimalno koncentrirati. Stoga, nakon što je senzorskom metodom odabran supstrat s najboljim senzorskim karakteristikama, on bi se ponovno pripremio u većoj količini i koncentrirao postupkom reverzne osmoze.

Rezultati i rasprava

U svim podlogama željena pH-vrijednost, ovisno o količini citrata, postignuta je nakon 68 do 71 sati fermentacije (tablica 4). Smanjenjem udjela citrata u podlogama, fermentacije su bile brže, jer je citrat povisio početnu pH-vrijednost podloge, te djelovao kao pufer tijekom fermentacije. U pokusu 1, u supstratima 1-2 i 1-3, zbog velike količine citrata (0,5 i 1%) vrijeme fermentacije je bilo predugo, te se pH-vrijednost tih podloga i nakon 4 dana nije spustila ispod 5,27. Obzirom da su se peti dan podloge 1-2 i 1-3 mikrobiološki pokvarile, nisu senzorski analizirane na okus. Zbog toga je u sljedećim pokusima količina citrata smanjena.

U pokusima 2-1 i 2-2 u podlogu nisu dodani proteini sirutke kako bi se vidio njihov utjecaj na tijek fermentacije i senzorska svojstva supstrata. Zaključeno je da je uz prisustvo proteina sirutke fermentacija bila brža i da je aroma na fermentirane mliječne proizvode bila intenzivnija u usporedbi sa supstratima identičnog sastava, ali bez proteina sirutke.

Tablica 4: Vrijeme fermentacije te početne i krajnje pH-vrijednosti

Table 4: Fermentation time and initial and final pH values

	Pokus 1 Trial 1			Pokus 2 Trial 2			Pokus 3 Trial 3		
	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
Početni pH Initial pH	7,59	7,7	7,95	7,50	7,59	7,60	7,32	7,49	7,59
Krajnji pH Final pH	4,82	5,27	5,61	4,8	5,22	5	4,52	4,79	5,02
Vrijeme fermentacije (h ^{min}) Fermentation time	70 ¹⁵	-	-	69 ¹⁵	69 ¹⁵	69 ¹⁵	68 ²⁰	68 ²⁰	68 ²⁰
pH nakon 5 dana pH after 5 days		5,13*	5,59*						

* podloge nisu senzorski analizirane na okus / media were not analyzed for taste

Razlog tome bi mogao biti to što su proteini sirutke manji, pa ih bakterije brže metaboliziraju i dušik je pristupačniji. Osim toga proteini sirutke se razgrađuju brže od kazeina na peptide i amino-kiseline koje su bakterijama neophodne za rast i razvoj (Marshall i Law, 1983.).

Senzorska je analiza pokazala da su senzorske karakteristike supstrata bile najbolje pri pH-vrijednosti oko 5 u podlozi s 0,25% citrata. Srednje ocjene pojedinih karakteristika supstrata navedene su u tablici 5. Supstrati s nižom pH-vrijednosti imali su izražen kiseli okus i bili su vodenasti, a supstrati s višom pH-vrijednosti nisu imali dovoljno izraženu aromu na fermentirane mliječne proizvode. Također se pokazalo da što je supstrat kiseliji, slabija mu je aroma na fermentirane mliječne proizvode. Pri koncentraciji citrata od 0,25%, aroma u supstratu je bila najintenzivnija. Iz rezultata pokusa vidi se kako je povećana koncentracija citrata povoljno djelovala na aromu supstrata, što se može objasniti tezom da citrat ubrzava metabolizam bakterija i sintezu aromatskih tvari (diacetil, acetoin, acetaldehyd...). Navedeno pozitivno djelovanje citrata i objašnjenje je u skladu s prijašnjim radovima (Sarantopoulos i sur., 2001.; Goupry i sur., 2003.) u kojima je praćen metabolizam glukoze i citrata u podlogama s različitim koncentracijama citrata, i pokazano kako se povećanjem koncentracije citrata ubrzao metabolizam bakterija, a time i količina metaboličkih produkata. Stoga je poželjna veća koncentracija citrata, ali ipak ne prevelika radi održavanja odgovarajuće pH-vrijednosti.

Tablica 5: Srednje ocjene (\pm standardna devijacija) senzorske analize supstrata

Table 5: Average sensory scores (\pm standard deviation) of substrates

Senzorska karakteristika Sensory characteristic	Aroma na fermentirane mliječne proizvode Aroma on fermented dairy products	Kiseli okus Sour taste	Vodenasta aroma Aqueous aroma	Zrnasta konzistencija Granular consistency	
Pokus 1 Trial 1	1-1	3,50 \pm 0,27	4,00 \pm 0,19	3,00 \pm 0,23	2,00 \pm 0,14
	1-2*	-	-	-	5,00
	1-3*	-	-	-	5,00
Pokus 2 Trial 2	2-1	2,50 \pm 0,39	4,50 \pm 0,35	4,00 \pm 0,18	2,00 \pm 0,27
	2-2	3,00 \pm 0,33	4,00 \pm 0,13	2,00 \pm 0,23	2,00 \pm 0,23
	2-3	3,75 \pm 0,13	4,25 \pm 0,37	1,50 \pm 0,27	2,50 \pm 0,29
Pokus 3 Trial 3	3-1*	2,00	3,00	5,00	1,50
	3-2	2,00 \pm 0,23	3,00 \pm 0,19	5,00 \pm 0,18	2,00 \pm 0,23
	3-3	4,00 \pm 0,33	2,50 \pm 0,33	1,50 \pm 0,27	2,50 \pm 0,27

* pokus nije ponavljan pa nije napravljena statistička obrada rezultata

* trial is not repeated therefore statistic analysis is not conducted

Budući je svrha ovog rada bila proizvesti supstrat s intenzivnom aromom na fermentirane mliječne proizvode, koji bi se koristio kao dodatak u proizvodnji sira, pozitivnom se smatrala aroma na fermentirane mliječne proizvode, a negativnom vodenasta i slaba aroma, te izražena kiselost supstrata. Zbog kasnije koncentracije tvari arome postupkom reverzne osmoze, zrnata konzistencija je bila također nepoželjna zbog mogućeg začepjenja membrana. Zrnata je konzistencija bila posebno izražena u supstratima 1-2 i 1-3 koji su imali veći udio citrata i time veću suhu tvar. Supstrat 3-3 imao je najbolje senzorske karakteristike te je odabran za buduće pokuse.

Zaključci

Fermentacija i razvoj aromatskih tvari bili su intenzivniji u podlogama koje su sadržavale proteine sirutke u usporedbi s podlogama koje su sadržavale samo kazein. Povećana količina citrata u podlogama pozitivno je djelovala na razvoj arome u supstratu. Citrat je povišio početnu pH-vrijednost podloge, ali i djelovao kao pufer tijekom fermentacije, zbog čega je bila moguća dulja fermentacija i sinteza aromatskih tvari. Pri pH vrijednosti oko 5, aroma karakteristična za fermentirane mliječne proizvode bila je najizraženija, a kiseli okus manje dominantan. Supstrat s 0,25% citrata i 0,1% proteina sirutke, pri pH-vrijednosti 5, imao je najbolje senzorske karakteristike pa je preporučan za buduće pokuse koncentriranja.

Sljedeći korak u proizvodnji supstrata bio bi priprava velike količine podloge po optimalnoj recepturi, fermentacija pri jednakim uvjetima, te konačno, koncentracija supstrata. Koncentracijom supstrata trebala bi se postići koncentracija arome i taj bi se koncentrat koristio kao dodatak svježem siru. Pri tome je potrebno postići maksimalni udio suhe tvari koncentrata kako bi se, i nakon dodatka koncentrata, uz što veći utjecaj arome održala odgovarajuća suha tvar sira.

OPTIMISATION OF MINIMAL MEDIA FOR PRODUCTION OF AROMA COMPOUNDS TYPICAL FOR FERMENTED MILK PRODUCTS

Summary

The aim of this research was to optimize the composition of minimal growth media containing lactose and milk, in which lactic acid bacteria (LAB)

would produce the maximum amount of volatile aroma compounds typical for fermented milk products. Ingredients used for the preparation of media were casein, tri-sodium-citrate, lactose, milk minerals, whey proteins and milk with 1.5% fat. The several prepared media differed mainly in the amount of citrate and whey proteins. Fermentation was carried out at room temperature until the media reached pH value of 5. Samples were evaluated for sensory characteristics using quantitative descriptive analysis (QDA). In all media the target pH was reached after 68-71 hours of fermentation, depending on citrate level. Fermentation and the production of aroma compounds were more intensive in media that contained whey proteins compared to media with only casein. Increased citrate level had a positive influence on the aroma production. Citrate increased the initial pH of the media and acted as a buffer during fermentation, which lead to longer fermentation and prolonged production of aroma compounds. At pH around 5, the desired cultured aroma was the most intensive, whereas sour taste was less dominant. The substrate with 0.25% citrate and 0.1% whey proteins, at pH 5, was rated as best regarding its sensory characteristics.

Key words: fermented milk aroma, citrate, media optimization, whey proteins

Literatura

- GOUPRY, S., GENTIL, E., AKOKA S., ROBINS, R.J. (2003): Co-fermentation of glucose and citrate by *Lactococcus lactis* diacetylactis: quantification of the relative metabolic rates by isotopic analysis at natural abundance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 489-497.
- LAW, B.A. (1984): Flavour development in cheeses. U: *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk* (Davies, F.L. i Law, B.A., ured.), Elsevier Applied Science Publisers, London, str. 187-205.
- MARILLEY, L., AMPUERO, S., ZESIGER, T., CASEY, M.G. (2004): Screening of aroma-producing lactic acid bacteria with an electronic nose. *International Dairy Journal*, 14, 849-856.
- MARILLEY, L., CASEY, M.G. (2004): Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139-159.
- MARSHALL, V.M.E. (1984): Flavour development in fermented milks. U: *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk* (Davies, F.L. i Law, B.A., ured.), Elsevier Applied Science Publishers, London.

MARSHALL, V.M.E., LAW, B.A. (1983): The physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. U: *Advances in the Microbiology of Cheese and Fermented Milk* (Davies, F. L. i Law, B. A., ured.), Elsevier, New York, str. 67-98.

RAY, B. (2004): *Fundamental Food Microbiology*. 3. Izd., CRC Press, Boca Raton.

SARANTINOPOULOS, P., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU E. (2001): Citrate Metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5482–5487.

Adrese autora - Author's addresses:

Nevenka Mazić
Prof. dr. sc. Rajka Božanić

Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda
Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Pierottijeva 6, Zagreb

Prispjelo - Received: 21.03.2008.

Prihvaćeno - Accepted: 18.07.2008.