

Optimiranje sastava supstrata za dobivanje arome sira trapista (Optimization of Substrate Composition for the Obtaining of Trappist Cheese Flavour)

Jovica HARDI, dipl. inž., Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper

Prispjelo: 15. 5. 1987.

UDK: 637.352.82:637.057(045) = 862

Sažetak

Rad prikazuje mogućnost razvoja arome sira trapista na supstratima koji su formulirani kao model-sistemi i optimirani (na temelju prethodnih istraživanja) tako, da osiguravaju maksimalnu aktivnost startera. Šest varijanti sastava načinjeno je na temelju kazeina u prahu, mlijeka u prahu, ultrafiltracijom ugušćenog mlijeka, maslaca i vode.

Sve smjese, obogaćene oligo i mikroelementima i vitaminima, podvrgnute su nakon homogenizacije i sterilizacije fermentaciji s dva startera za industrijsku proizvodnju trapista. Aroma razvijena na pojedinim model-sistemima, pod utjecajem oba startera, analizirana je headspace metodom plinske kromatografije, a kromatografski profili arome, uz usporedbu efikasnosti startera, statistički su obrađeni.

Summary

The paper describes the possibility of development of trappist cheese flavour on substrates which were formulated as model-systems and optimized (based on the results of preliminary investigations) to provide for the maximal activity of starter cultures. Six different compositions were prepared using powdered casein, powdered milk, ultrafiltered concentrated milk, butter and water.

All compositions were fortified with oligo and microelements and vitamin components, homogenized, sterilized and subjected to fermentation with two starter cultures for the industrial production of trappist cheese. Flavour was developed using individual model systems and each starter culture has been analysed by headspace technique of gas chromatography, and the chromatographic aroma profiles were statistically analyzed to compare the effectiveness of two starter cultures.

Uvod

Stoljetna tradicija proizvodnje sira trapista na području Jugoslavije (Markušić, Vujičić, 1982) svrstava našu zemlju među tradicionalne proizvođače tog sira. Dugo čuvana »tajna« proizvodnog postupka do današnjih dana do-

Rad je u sažetom obliku ulomka eksperimentalnog dijela referiran na XXV Seminaru za mljekarstvu industriju u Lovranu.

živjela je niz promjena, dijelom zbog prilagođavanja zahtjevima potrošača, dijelom zbog prilagođavanja industrijskom načinu proizvodnje (Miletić, 1969). Naši današnji trapisti, iako razmjerno visoke kakvoće (Sabadoš, Rajšić, 1980) znatno se razlikuju od izvornog trapista »Fromage de la Trappe«. Različitosti u kakvoći naših današnjih trapista posljedice su velikih razlika u kakvoći sirovine i otežanih tehnološko-tehničkih uvjeta proizvodnje (Novaković, Hardi, 1984).

Poznato je da potrošači općenito cijene aromatične, zrele sireve, s jasno izraženim osobinama pojedine vrste sira. Dobivanje zrelih sireva s kvalitetnom aromom vezano je uz mnoge probleme, jer je njihova proizvodnja dugotrajna. Proces produženog zrenja, uz enzimatske reakcije koje se odvijaju progresivno za vrijeme skladištenja, razlog je visokoj cijeni koštanja sireva. Za mljekarsku industriju bilo bi od velike važnosti utvrditi mogućnost skraćivanja produženog procesa zrenja, uz postizavanje kvalitetnije arome dovoljno zrelog sira.

Aroma sireva

Aroma je jedan od najznačajnijih pokazatelja kakvoće namirnica, a od osobite je važnosti kod mlječnih proizvoda podložnih brzom kvarenju. Prema navodima nekih autora (Pozderović, 1984) kombinacija osjeta okusa i mirisa (engl. flavour) osnovni je izvor užitaka koje ljudi nalaze u hrani. U ustima i ždrijelu čovjeka nalazi se oko 9000 osjetnih tjelešaca, uz pomoć kojih on otkriva sve nijanse okusa. Stanice nosne sluznice osjetljive na mirisne podražaje hlapljivih tvari, mogu registrirati nekoliko stotina tisuća hlapljivih tvari.

U kemijskom pogledu aroma je smjesa većeg broja različitih hlapljivih spojeva (nižih masnih kiselina, alkohola, estera, etera, aldehida, ketona i ostalih spojeva) koji se u namirnicama nalaze u malim koncentracijama (npr. u voću i povrću do 50 ppm, u mlječnim proizvodima do 20 ppm i sl). Gotovo je nemoguće pouzdano utvrditi koji je sastojak arome nosilac tipične arome određenog sira, odnosno mlječnog proizvoda. Prema nekim autorima (Fenaroli, 1975) karakterističnu aromu ne čine samo intenzivno mirisni sastojci, već grupa spojeva u određenom omjeru.

Pojedini sirevi razlikuju se po mirisu i okusu zbog različitih koncentracija i međusobnih količinskih omjera sastojaka koji čine ukupnu aromu. U pravilu koncentracija nije mjerilo aromatične dominantnosti, tako da su vrlo često i minimalno zastupljeni spojevi nosioci karakteristične arome. Važno je naglasiti da svi sastojci tek kao cjelina daju karakterističnu aromu pojedinog sira, tj. promjenom omjera pojedinih sastojaka znatno se mijenja osjetilni dojam o aromi sira.

Osim koncentracije pojedinih hlapljivih sastojaka, za oblikovanje ukupne arome važan je i prag osjetljivosti pojedinih sastojaka. Utvrđeno je da spojevi prisutni u malim koncentracijama imaju veliki utjecaj na konačnu aromu, ponekad veći od spojeva prisutnih u najvišim koncentracijama. Zbog toga se učinak pojedinih sastojaka na aromu sira ne može procjenjivati samo na temelju podataka o količinskoj prisutnosti, već je potrebno poznavati i vrijednost praga osjetljivosti.

Uz hlapljive spojeve, na ukupnu aromu znatan utjecaj imaju teže hlapljivi i nehlapljivi spojevi. Parcijalni tlakovi hlapljivih spojeva u plinovitoj fazi, koja je u ravnoteži s čvrstim dijelom namirnice, ovise o koncentraciji tih spojeva u namirnici i o interakcijama s teže hlapljivim i nehlapljivim sastojcima. Pri tome značajan utjecaj imaju relativni omjeri vode i lipida prisutnih u namirnici.

Tablica 1. Sastojci arome sira (Fenaroli, 1975)
Table 1. Components of Cheese Flavour (Fenaroli, 1975)

Sastojak/Ingredient	Udio/Part (ppm)
1. acetaldehid	1,10
2. aceton	1,60
3. 1-butanol	0,70
4. 2-butanol	0,30
5. butanon	0,30
6. diacetil	0,80
7. dimetildisulfid	0,11
8. etanol	16,30
9. etilbutirat	0,60
10. 2-heptanon	0,45
11. 2-metilbutirat	0,42
12. metilkaproat	1,50
13. 2-pentanon	0,98
14. 1-propanol	2,90

Činijoci koji utječu na aromu sira

Svaki tip sira ima specifičnu aromu, ovisnu o aromi mlijeka upotrijebljenog za proizvodnju, različitim metodama koagulacije i proizvodnje (soljenje, termički režim, itd), tipu fermentacije, fermentacije, primijenjenim mikroorganizmima, zrenju, pa čak i o klimatskim uvjetima koji vladaju u mjestu proizvodnje.

U pojedinim etapama proizvodnje i zrenja sireva prisutne su slijedeće kemijske i enzimatske promjene:

Fermentacija laktoze u pirogroždanu kiselinu (piruvat), pri čemu su prisutni i drugi proizvodi, kao: 2-butanon i 2-butanol (porijeklom iz metabolizma acetatnih bakterija s bakterijama mliječne kiseline), octena i propionska kiselina nastale metabolizmom propionskih bakterija.

Hidroliza masti, koja se odvija pod utjecajem esteraza i lipaza bakterijskog porijekla, teče sve do masnih kiselina koje kao lako hlapljive sudjeluju u aromi; zatim do različitih proizvoda kao što su metilketoni, sekundarni alkoholi, alfa i delta-laktone.

Proteoliza. Bjelančevine se mogu razoriti Millardovom reakcijom na pirazin i furan, s proteolitičkim bakterijama do aminokiselina. Oslobođene aminokiseline mogu pretrpjeti različite promjene, većim dijelom enzimatskog karaktera: dekarboksilaciju u amine, dezaminaciju u kiseline, degradaciju Streckerovom pregradnjom u aldehide.

Sekundarne reakcije, koje se odvijaju između hlapljivih proizvoda usporredno s prethodno navedenim promjenama, svojim proizvodima znatno pridonose konačnoj aromi.

Prema C u e r u (1982), konačni izgled smjese hlapljivih proizvoda koji ulaze u sastav arome sira može biti:

Slobodne masne kiseline malih molekularnih masa: mravlja, octena, propionska, maslačna, izomaslačna, valerijanska, 2-metil i 3-metilmaslačna, kapronska i izokapronska kiselina;

Aldehidi nastali metabolizmom aminokiselina, kemijskim ili enzimatskim putem: formaldehid, acetaldehid, metional, 3-metilbutanal i fenilacetaldehid; zatim metilketoni nastali metabolizmom masnih kiselina: aceton, 2-butanon, 2-pentanon, 2-heksanon, 2-heptanon, 2-nonanon, 2-dekanon i 2-undekanon. Acetofenon, koji potječe iz Millardove reakcije prisutan je u znatnim količinama u mekim i tvrdim sirevima. Acetaldehid, diacetil i aceton su proizvodi laktolitičkih enzima, koji su u većoj količini prisutni u fermentiranom mlijeku. Od estera nalaz se etilacetat, prisutan gotovo u svim sirevima;

Amini nastaju metabolizmom odgovarajućih aminokiselina s bakterijama dekarboksilaze: putrescin, tiramin, kadaverin, triptamin i histamin (utvrđeni su u znatnim količinama u Cheddaru). Nedavno su mnogobrojni jednostavni amini identificirani u ruskom siru i mekim sirevima (metilamin, dimetilamin, trimetilamin, etilamin, n-propilamin i dr);

Aminokiseline. Budući da su i same malo aromatične, čini se da je njihov dodatak neophodan pri kompoziciji sastava zadovoljavajućih umjetnih aroma;

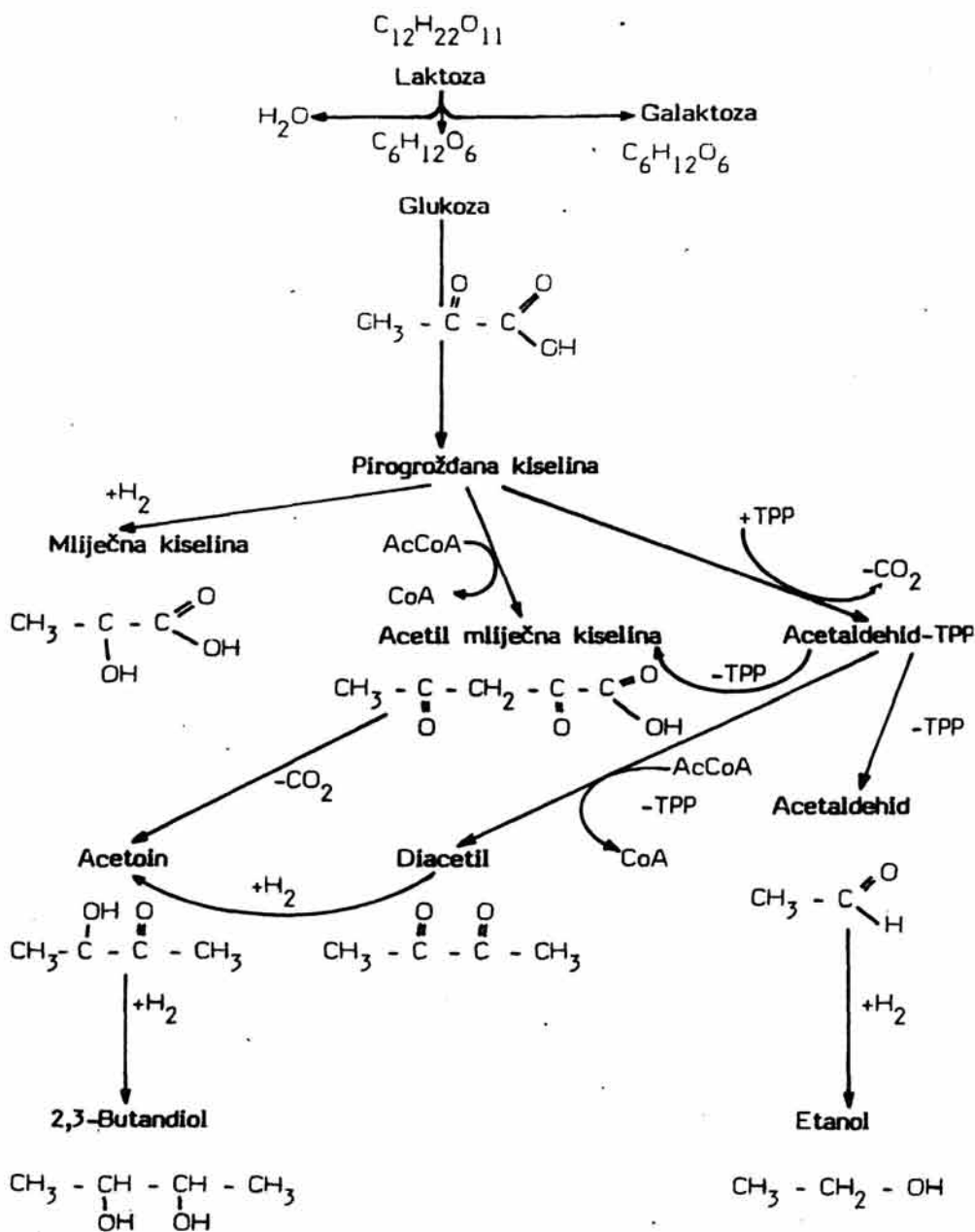
Alkoholi. Među primarnim alkoholima koji potječu iz metabolizma aminokiselina posredstvom aldehida, nalaze se: etanol, propanol, butanol, heksanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, te fenol i metanol, koji su u većim količinama dokazani u Camembertu, Cheddaru, Gruyeru i mekim sirevima. U mekim i tvrdim sirevima identificiran je fenol kao proizvod degradacije tirozina, a rezultat je metabolizma mikrokoka različitog porijekla;

Ostali identificirani proizvodi: heksan, oktan i toluen u Gruyeru, a benzen i toluen u Blueu. U nekim sirevima identificirani su alkil-pirazini, koji su najvjerojatnije rezultat Millardove reakcije u metabolizmu bakterija. Derivati klora, vjerojatno porijeklom iz pesticida identificirani su u Gruyeru.

Sumporni spojevi imaju važnu ulogu u aromi mliječnih proizvoda. Tioli su prisutni u obliku sumporovodika i metantiola. Imaju veliki značaj u aromi Cheddar sira, a nastaju kemijskom ili enzimatskom degradacijom sumpornih aminokiselina cisteina i metionina. Sumpor iz merkaptana, već prisutan u steriliziranom mlijeku, identificiran je u aromi Gruyera i Cheddara, a potječe iz metilmetionina. Disulfid iz merkaptana identificiran je u Cheddaru, Camembertu, mekim i tvrdim sirevima, putem proizvoda oksidacije metantiola i etantiola. Prije desetak godina identificirani su: 2,4-ditiopentan u Goudai, te Camembertu; 2,3,4-tritiopentan u Cheddaru, u mekim i tvrdim sirevima; 2,3,5-tritioheksan u Camembertu i jedan veći broj tioestera u mekim i tvrdim sirevima oblika: R-CO-S-Me, pri čemu je R = metil, etil, propil, izobutil i sek. butil.

Proizvodnja arome sireva

U svijetu postoje mnoge tvrtke koje se bave proizvodnjom »prirodnih aroma« sireva ili imitacijom arome sireva. U proizvodnom programu tih tvrtki obično se nalaze arome poznatih i po aromatičnosti cijenjenih sireva. (Parme-



Slika 1. Shema osnovnih kemijskih i enzimatskih promjena koje sudjeluju u formiranju arome sireva (Cuer, 1982)

Figure 1. A Scheme of Basic Chemical and Enzymatic Changes Which are Taking Part in Forming the Cheeses Flavour (Cuer, 1982)

san, Cheddar, Swiss, Blue cheese, Romano i dr). Od važnih proizvođača aroma i pigmentata za prehrambenu industriju, koji proizvode i arome sireva, mogu se istaknuti: Haarman & Reimer Gm, Dairyland, Kraft Inc., Pearvey Co., National Starch & Chemical Corp., Flavour Resources, Naarden International USA Inc.

Zbog velikog broja različitih sireva, imitacija arome predstavlja veliki problem, posebno kad se traže kompleksni učinci (okus i miris). Imitacije arome sireva u većini slučajeva odnose se samo na imitaciju mirisa, a za tu svrhu najčešće se upotrebljavaju ovi spojevi: butilbutirlaktat, izovalerijanska i kapronska kiselina, etilbutirat i metil n-amilketon (F e n a r o l i, 1975).

Za kompleksnije i funkcionalnije sastave aroma neophodna su opsežna istraživanja, koja uvijek počinju analizom sastava prirodne arome sireva.

U novije vrijeme proučavanjem arome sireva bavili su se mnogi istraživači u Francuskoj, Engleskoj, SAD, Njemačkoj, Italiji, Nizozemskoj, Japanu i drugdje.

Poznati su i objavljeni radovi, čiji je cilj bio primjena sintetizirane arome u praksi. Tako se npr. američki patent pod brojem 3.446.627 odnosi na proizvodnju arome Cheddar sira (ili sličnih, kao što su švicarski sir, Nonschatel ili Parmesan), temeljene na fermentaciji supstrata (bjelančevina — ugljikohidrati — punomasno mlijeko) uz pomoć *Streptococca*. Američki patent prijavljen pod brojem 3.720.520 odnosi se na proizvodnju arome plavog sira, dobivene razvojem *Penicilium roqueforti* u vodenoj otopini natrijevog kazeinata, uz povoljan omjer mliječne masti.

Drugi istraživači nastojali su proizvesti arome, pojačane dodavanjem kemijskih sastojaka karakterističnih za tražene arome. Jedan od tih postupaka predstavljen je u prijavi za francuski patent, objavljen pod brojem 2.207.665, koji opisuje postupak dobivanja arome sira talijanskog tipa, uz dodatak 2-feniletanola i metil-1-butanola namirnicama kojima se želi dodati aroma sira.

C h a m b o n i dr. (1981) došli su do važnih rezultata u vezi s proizvodnjom arome sireva, fermentacijom koncentrata bjelančevina različitim sojevima mikroorganizama.

Specifičnu aromu sira teško je rekonstituirati, jer ona često ovisi o sinergističkom učinku različitih sastojaka, koji se vrlo rijetko postiže sintezom. Utvrđeno je (C h a m b o n i dr. 1981) da na čistim podlogama (punomasno mlijeko, obrano mlijeko, kazein i sl) put fermentacije ne vodi do željenih rezultata, jer se proces teško usmjerava, a podloge su osjetljive na infekciju.

Ovaj rad prikazuje postupak i daje sastav podloge (model-sistema) za razvoj intenzivne arome sira trapista, koja osigurava apsolutnu reproducibilnost i visoki stupanj razvoja željene arome.

Materijal i metode rada

Podloge koje su upotrijebljene za razvoj arome načinjene su miješanjem kazeina u prahu, obranog mlijeka u prahu, ultrafiltracijom ugušćenog mlijeka, maslaca i vode. Sastojci su odabrani prema kemijskim sastavima tako, da u

smjesi zadovolje postavljene maksimalne vrijednosti sadržaja bjelančevina (48—72%) i mliječne masti (18—30%).

U radu se pratio razvoj arome na 6 podloga različitog sastava, koje su odabrane nakon prethodnih istraživanja provedenih na 16 podloga. Prethodna istraživanja provedena su na temelju faktorskog plana pokusa, u kome su sastavi pojedinih podloga varirani prema shemi prikazanoj na slici 2.

Sadržaj m.m. na ukupnu S.T. (%)		48	56	64	72
Milk Fatt Content per Total Dry Matter (%)	18	1	2	3	4
	22	5	6	7	8
	26	9	10	11	12
	30	13	14	15	16

Slika 2. Plan pripreme sastava podloga za prethodna istraživanja
Figure 2. Plan of Preparing the Composition of Substrates for Preliminary Research

Najveća količina arome razvijena je na supstratima prema kombinacijama 12, 11, 15 i 16. Zbog toga je novi plan pokusa proširen na dva dodatna model-sistema, koji su u ukupnoj suhoj tvari sadržavali 73 i 74% bjelančevina, prema shemi na slici 3.

		64	72	73	74
26	1	2	5	6	
30	3	4			

Slika 3. Plan pripreme sastava podloga za završna istraživanja
Figure 3. Plan of Preparing the Composition of Substrates for Final Research

Utvrđivanje udjela pojedinih sastojaka podloga obavljeno je uz pomoć IBM kompjutora, »spreadsheet« analizom. Prethodnim testovima utvrđeno je da se najviše arome razvija u rasponu količine suhe tvori podloge od 30 do 40%, pa je ta gornja granica zadržana kao osnovica svih sastava.

Sastojci svih 6 podloga prvo su dobro ručno izmiješani, a zatim homogenizirani ultramiješalicom do jednolične konzistencije. Nakon toga podloge su sterilizirane »flacking« postupkom (termički šok) na 120 °C u trajanju od 20 sekundi. Po završetku tih operacija, podlogama su dodane u količini od 0,1% sterilna otopina po Fordu i sterilna otopina minerala i vitamina u količini od 0,1% (Hardi, Novaković, 1987).

Tako pripremljene podloge nacijepljene su starter-kulturom za trapist u količini od 3%. Serije od po 6 podloga nacijepljene su s dva startera, čija je aktivnost uspoređena praćenjem razvoja arome »headspace« metodom plinske kromatografije. Jedan starter je iz naše mljekarske industrije (S₁), proizveden u mikrobiološkom laboratoriju sirane, a drugi je nabavljen izravno od tvrtke Cristian Hansen Laboratorium A/S Copenhagen (S₂).

Nacijepljene podloge (model-sistemi) zatvorene su u sterilne plastične čaše s nasadnim (nehermetičkim) poklopcima i držane u termostatu 3 dana na temperaturi od 28 °C. Nakon toga je obavljena headspace analiza razvijene arome na obje serije podloga. Svakih 12 sati sadržaji čaša su u sterilnim uvjetima dobro ručno izmiješani i čaše su vraćene u termostat. Slijedeća serija analiza obavljena je 6 dana nakon precijepivanja.

Za usporedbu količine razvijene arome na model-sistemima, obavljena je headspace analiza dva uzorka trapista naših proizvođača. Prvi uzorak bio je predstavnik niže kvalitetne grupe naših trapista, a drugi je pripadao kvalitetnoj grupi naših trapista.

Pojedini sastojci arome dobivene headspace analizom identificirani su na temelju retencionih vremena, čistih sastojaka i unutrašnjeg standarda, samo u pravcu kvalitativne identifikacije. Od ukupnog sastava arome, zbog otežane nabavke čistih sastojaka, identificirano je sa sigurnošću šest sastojaka lako hlapljivog dijela arome.

Uvjeti kromatografske analize:

- plinski kromatograf Perkin Elmer tip Sigma-3, s dodatkom za headspace analizu,
- FID detektor, vodik, zrak,
- staklena punjena kolona 15% Carbowax 20 M/Chromosorb WAW, DMSC 80/100 mesh, duljine 1,8 m, promjera 2 mm,
- inertni plin nosioc — dušik.

Uvjeti headspace analize:

- | | |
|---|---------------|
| — temperatura injektora i detektora | 150 °C |
| — temperatura kolone na početku i svršetku rada | 50 °C |
| — protok dušika | 10 ml/min |
| — brzina papira na pisaču | 5 mm/min |
| — količina uzorka za analizu | 1,000 g |
| — područje slabljenja signala (osjetljivost) | 4 × 1 i 8 × 1 |
| — vrijeme tlačenja uzorka dušikom | 4 min |
| — temperatura zagrijavanja uzorka | 50 °C |

Plan pokusa i statistička analiza:

Pokus je planiran i analiziran kao pokus s dva činioca. Prvi činilac bile su dvije različite starter-kulture (S_1 i S_2), a drugi udio bjelančevina u suhoj tvari bez masti supstrata, koji je imao 4 razine; postavljen je pokus s dva činioca (2×4). Za svaku kombinaciju činioca napravljene su po dvije replikacije (paralelno uzeti uzorci iz dvije posudice s istim sastavom) (Montgomery, 1976).

Rezultati pokusa analizirani su primjenom analize varijance za pokus s dva činioca, pri čemu su starter-kulture analizirane kao fiksni utjecaji, a različiti udjeli bjelančevina u suhoj tvari bez masti kao randomizirani utjecaji. Za sastojke arome, za koje je utvrđena statistički znatna varijabilnost uzrokovana jednim ili drugim činiocem, provedena je usporedba prosječnih vrijednosti pojedinih razina činioca primjenom »Duncanovog testa višestrukog raspona«, na razini statističke značajnosti 5% (Šimunović, Novaković, 1986).

(Nastavak u broju 9/87.)