

DOROTA ZARĘBA, MAŁGORZATA ZIARNO, MIECZYŚLAW OBIEDZIŃSKI,
ANNA BZDUCHA

PROFIL LOTNYCH ZWIĄZKÓW MODELI MLEKA NIEFERMENTOWANEGO I FERMENTOWANEGO PRZEZ BAKTERIE JOGURTOWE

Streszczenie

Przedmiotem badań było określenie zmian wynikających z aktywności bakterii (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) w modelowych próbkach jogurtu, w czasie chłodniczego przechowywania. Dokonano porównania profili lotnych związków wytwarzanych w mleku fermentowanym z udziałem kultury jogurtowej i w mleku niefermentowanym, ale zawierającym te bakterie. Wykazano intensywny wzrost zawartości wszystkich związków lotnych w czwartym tygodniu przechowywania mleka fermentowanego i niefermentowanego. Stwierdzono, że proces fermentacji ma istotne znaczenie do wytworzenia takich związków, jak: kwas masłowy, izowalerianowy, kapronowy i acetoina. Z kolei 2-heptanon, 2-pentanon, 2-butanon to związki, których obecność wynika w dużym stopniu z przemian autooksydacyjnych składników mleka zachodzących w trakcie przechowywania. Obecność alkoholi dowodzi aktywności enzymatycznej bakterii zależnej od pH środowiska. Można wnioskować, że pomiar poziomu takich związków, jak acetoina, kwas masłowy lub kwas propionowy może służyć do planowania i kontroli trwania procesu fermentacji i czasu przechowywania mlecznych produktów fermentowanych, zapewniając im stałą i pożądaną jakość smakowo-zapachową.

Słowa kluczowe: profil lotnych związków, SPME, bakterie jogurtowe, *Streptococcus*, *Lactobacillus*

Wprowadzenie

W procesie fermentacji, prowadzonej przez bakterie mlekowe, powstaje wiele związków wpływających na smak i zapach mlecznych napojów. Bakterie te rozkładają składniki mleka w wyniku prowadzonych procesów biochemicznych, wywołanych aktywnością enzymatyczną, która jest charakterystyczna dla poszczególnych gatunków mikroorganizmów. Wytwarzają one między innymi: kwas octowy, kwas masłowy, ketony, aldehydy, acetoinę, diacetyl i etanol. Substratami wymienionych i innych

Mgr inż. D. Zaręba, dr inż. M. Ziarno, prof. dr hab. M. Obiedziński, mgr inż. A. Bzducha, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

związków tworzących aromat produktów fermentowanych mogą być białka, tłuszcze, a przede wszystkim cukry [25].

Badania profilu związków tworzących aromat jogurtów są przedmiotem bardzo nielicznych publikacji naukowych. Większość badań dotyczy produktów długo dojrzewających, np. serów podpuszczkowych. W produktach długo dojrzewających, ze względu na długotrwałość procesu i wyższe stężenia lotnych związków, łatwiej jest je badać niż w napojach fermentowanych [23].

Celem pracy było porównanie profili zapachowych mleka z udziałem typowych bakterii jogurtowych po procesie fermentacji i bez procesu fermentacji. Wykazane różnice profilu związków lotnych w próbkach mogą być pomocne w monitoringu procesu fermentacji oraz w planowaniu okresu przydatności do spożycia, gwarantującego produkt pożądaný przez konsumenta, stały pod względem smakowo-zapachowym.

Material i metody badań

W badaniach użyto liofilizowanej kultury (Chr. Hansen), zawierającej typowo jogurtowe szczepy bakterii *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Str. thermophilus*. Naważkę 2 g liofilizatu rozpuszczano w 50 cm³ jałowego mleka, następnie tak przygotowaną kulturą zaszczipiano, w ilości 1 cm³, 150 cm³ mleka UHT. Pierwszą próbką było mleko UHT o zawartości 3,2 % tłuszczu. Drugą próbkę mleka zaszczipiano kulturą jogurtową i poddawano fermentacji w temp. 37 °C/18 h (model fermentowany), trzecią próbkę po zaszczipieniu kulturą jogurtową wstawiano do chłodziarki (6 °C) (wersja niefermentowana mleka). Próbkę poddaną fermentacji, po jej zakończeniu, także schładzano do 6 °C i przechowywano w tej temperaturze przez cały okres trwania doświadczenia (4 tygodnie).

Wszystkie próbki poddawano analizie chromatograficznej oraz mikrobiologicznej, a także kontrolowano zmianę pH w dniu zerowym, następnie po 2 i 4 tygodniach.

W celu przygotowania próbki do analizy chromatograficznej (SPME) naważkę 5 g próbki w szczelnie zamkniętym naczyniu umieszczano w temp. 30 °C przez 20 min, następnie przez 25 min prowadzono mikroekstrakcję do fazy stałej. Desorpcję związków z włókna typu DVB/CAR/PDMS – (diwinylobenzen/carboksen/polidimetylosiloksan), o grubości faz 30/50 µm, prowadzono przez 2 min. Do analizy użyto chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym GCMS-QP20105 (Shimadzu); temp. komory nastrzykowej 220 °C z kolumną kapilarną - spieczony kwarc z fazą stacjonarną ZB WAX o wymiarach: 30 m/0,25 µm/0,25 mm o początkowej temp. 40 °C, przez 2 min, szybkość wzrostu temp. 4 °C/min, temp. końcowa 220 °C, czas izotermi końcowej 5 min, z wykorzystaniem helu jako gazu nośnego z przepływem liniowym o prędkości 0,69 cm³/min, ustawienia detektora (temp. źródła jonów 190 °C, temp. linii łączącej GCMS 200 °C, jonizacja elektronowa o energii

70 eV, napięcie detektora 0,9 kV, zakres przemieszczania filtru kwadropulowego 40–300 m/z). Analizę chromatograficzną prowadzono przez 45 min.

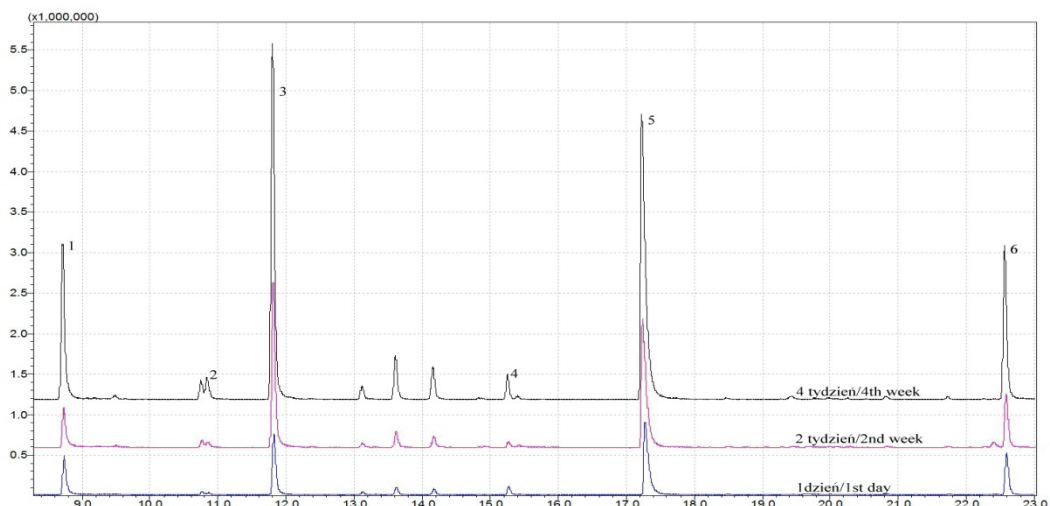
Oznaczanie liczby żywych komórek zastosowanych kultur bakteryjnych wykonywano metodą płytkową kropelkową, z wykorzystaniem podłoża agarowych M17 i MRS (Merck) [14]. Płytki z posiewami *Str. thermophilus* inkubowano tlenowo w temp. 37 °C przez 48 h. Płytki z posiewami bakterii beztlenowych (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) inkubowano w anaerostatach zapewniających warunki beztlenowe, w temp. 37 °C przez 48 h [18, 19]. Pomiaru pH dokonywano przy użyciu pehametru typu LPH330T (TOCUSSEL, Francja).

Wyniki i dyskusja

Według większości badaczy, prowadzących badania nad aromatem typowego jogurtu, głównym składnikiem tworzącym zapach jogurtu jest aldehyd octowy i diacetyl, w mniejszym stopniu również inne lotne związki takie, jak: kwas mrówkowy, octowy, propionowy, masłowy oraz związki karbonylowe (aceton, acetoina). Na pożądaną smakowo-zapachową jogurtu ma wpływ wzajemny stosunek tych związków, ich zawartość oraz proces produkcji i przede wszystkim rodzaj użytych bakterii fermentacji mlekowej [9, 12, 23, 24].

Na potrzeby badań, proces fermentacji w temp. 37 °C wydłużono do 18 h. Miało to na celu zintensyfikować proces fermentacji i wykazać jego wpływ na przechowywanie i trwałość mleka fermentowanego. Wydłużony czas fermentacji spowodował intensyfikację zmian biochemicznych (rys. 1, 2 i 3).

Chromatograficznie zidentyfikowano 14 lotnych związków: 2-butanon, etanol, 2-pentanon, 2-heptanon, amylol, acetoinę, 2-nonanon, kwas propionowy, kwas masłowy, kwas izowalerianowy, kwas kapronowy, alkohol laurylowy, kwas kaprylowy i kwas octowy. Wymienione wyżej kwasy były zidentyfikowane również w badaniach przeprowadzonych przez Beshkova i wsp. [5], i analogicznie, jak w niniejszej pracy, wykazano najwyższą zawartość kwasu octowego, następnie masłowego i kapronowego. Spośród wymienionych związków, w mleku bez dodatku LAB występują: 2-butanon, 2-pentanon, 2-heptanon, 2-nonanon, kwas masłowy, kwas kapronowy, alkohol laurylowy i kwas kaprylowy. Obecność tych związków w mleku może wynikać z przemian biochemicznych wywołanych rodzimymi enzymami mleka, procesami autooksydacyjnymi, jak również aktywnością mikrobiologiczną [4, 6, 7, 11]. Pozostałe związki (kwas izowalerionowy, kwas propionowy) są produktami fermentacji mikrobiologicznej, natomiast kwas izowalerianowy to produkt proteolizy [20]. Inne składniki mleka, jak np. kwas masłowy, kapronowy, kaprylowy oraz ketony mogą powstać w wyniku rozkładu kwasów tłuszczowych, jak również aminokwasów, uwalnianych z białek w efekcie aktywności enzymatycznej, a także termicznej obróbki mleka [5, 2].

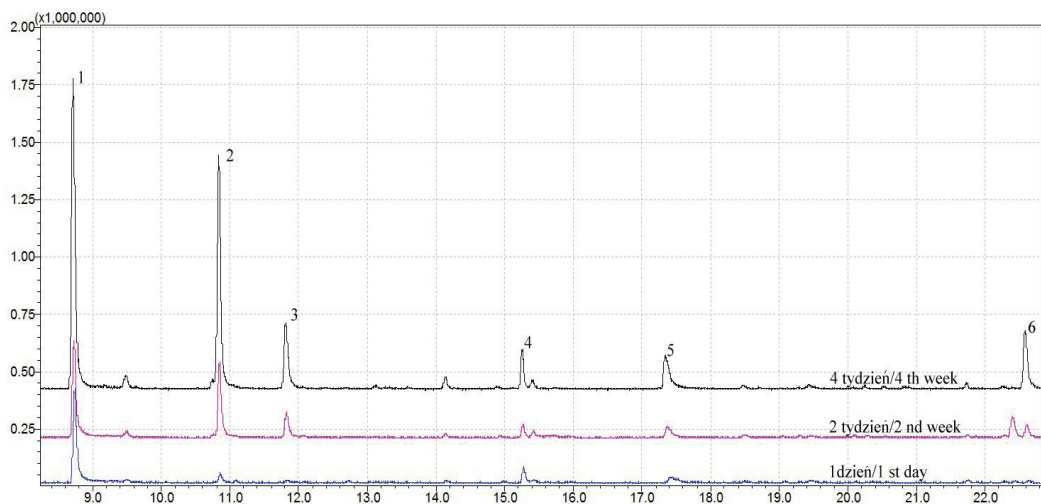


Objaśnienia: / Explanatory notes:

1) 2-heptanon, 2) amylol, 3) acetoina / acetoin, 4) 2-nonanon, 5) kwas octowy / acetic acid, 6) kwas masłowy / butyric acid.

Rys. 1. Fragment chromatogramu obrazujący różnice zawartości lotnych związków w modelu mleka fermentowanego, w ciągu czterech tygodni przechowywania.

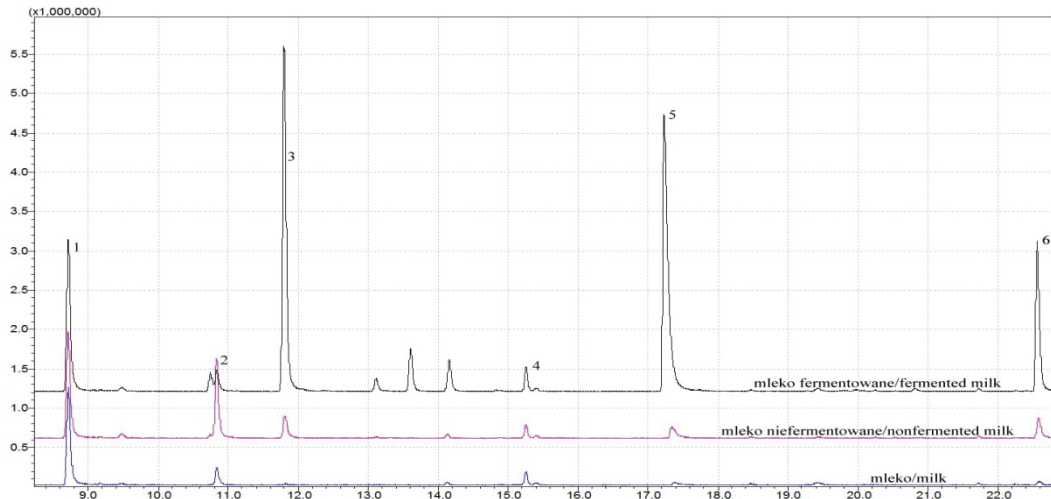
Fig. 1. A fragment of the chromatogram showing differences in the content of volatile substances in the model of fermented milk during the four week storage.



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes – see Fig. 1

Rys. 2. Fragment chromatogramu obrazujący różnice zawartości lotnych związków w modelu mleka niefermentowanego, w ciągu czterech tygodni przechowywania.

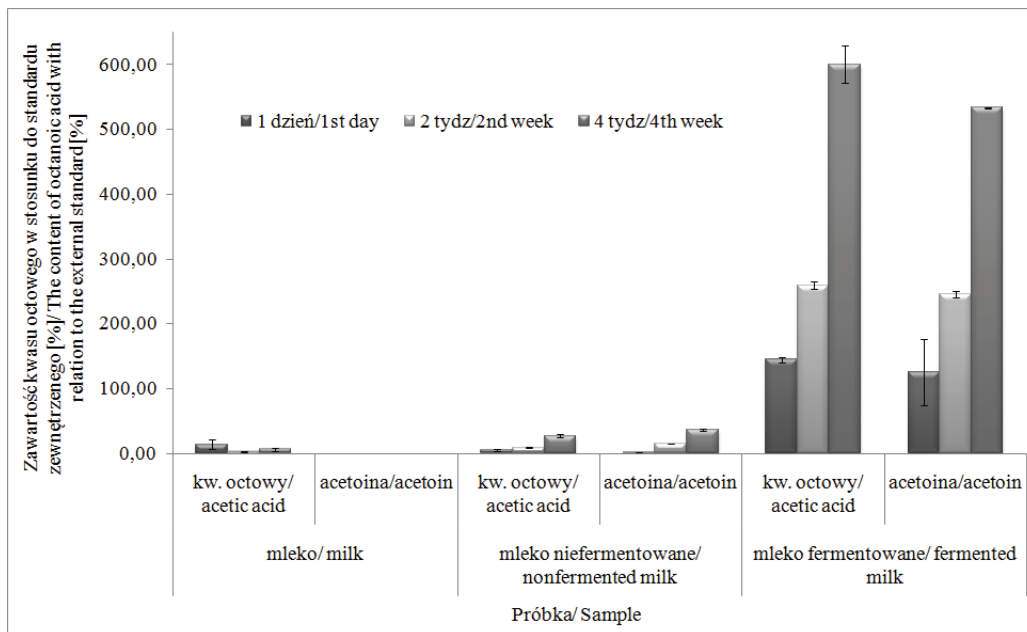
Fig. 2. A fragment of the chromatogram showing differences in the content of volatile substances in the model of fermented milk during the four week storage.



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes – see Fig. 1

Rys. 3. Fragment chromatogramu obrazujący różnice zawartości lotnych związków w modelach mleka, w czwartym tygodniu przechowywania.

Fig. 3. A fragment of the chromatogram showing differences of the content of volatile substances in models of of milk in the fourth week of storage.



Rys. 4. Zawartość kwasu octowego i acetoiny w ciągu czterotygodniowego przechowywania mleka modelowego.

Fig. 4. Contents of acetic acid and acetoin during the four week storage of model milk.

Porównując próbki stwierdzono istotny wpływ procesu fermentacji na zawartość kwasu octowego (rys. 3 i 4). Obecność kwasu octowego w próbce fermentowanej może wynikać z przekształcenia cukrów do kwasu octowego, który konkuruje w szlaku metabolicznym z produkcją aldehydu octowego. Acetylo-CoA jest substratem kwasu octowego w warunkach tlenowych, a w warunkach beztlenowych aldehydu octowego [8, 13, 21]. Podczas pobierania próbek do analiz mieszano je, co mogło przyczynić się do ich natlenienia, a to z kolei wpłynąć na powyżej opisane zmiany. W próbce niefermentowanej z udziałem kultury jogurtowej praktycznie nie wykazano obecności omanianego kwasu, co potwierdza istotny wpływ procesu fermentacji na powstawanie kwasu octowego. Akalin i wsp. [1] wykazali, że na poziom kwasu octowego, produkowanego przez bakterie fermentacji mlekowej, wpływa dodatek suchej masy mlecznej (m.in. zwiększenie zawartości laktozy) oraz liczba komórek bakteryjnych. W niniejszych badaniach największy przyrost kwasu octowego stwierdzono w czwartym tygodniu przechowywania, ok. dwukrotny w stosunku do drugiego tygodnia. Ten intensywny przyrost zawartości kwasu może być związany ze zmniejszeniem przeżywalności bakterii w tym okresie (tab. 1). Zmniejszenie liczby żywych komórek bakterii w drugim i czwartym tygodniu przechowywania mogło przyczynić się do uwolnienia β -galaktozydazy z komórek ulegających lizie i tym samym wpłynąć na wzrost poziomu kwasu octowego w tym okresie (tab. 1).

Tabela 1

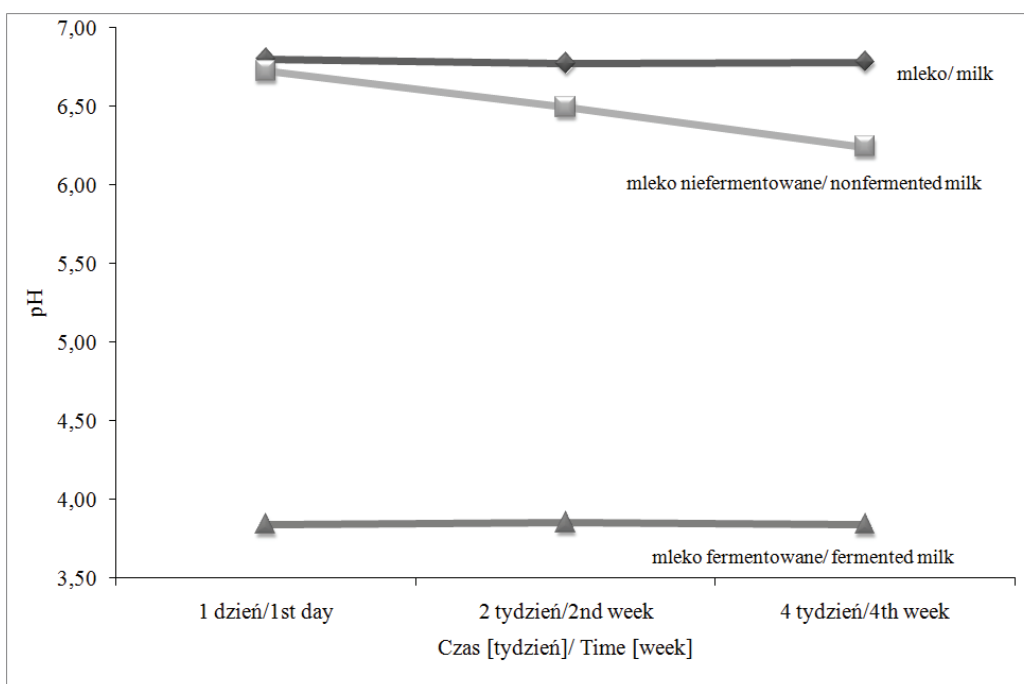
Przeżywalność bakterii w modelowych próbkach mleka [$\log \text{ jtk/cm}^3$].
Survival of bacteria in the model samples of milk [$\log \text{ CFU/cm}^3$].

Gatunek bakterii Species of Bacteria	Próbka Sample	1 dzień 1 st day	2 tydzień 2 nd week	4 tydzień 4 th week
<i>Lb. delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i>	mleko niefermentowane nonfermented milk	7,18	7,35	8,10
	mleko fermentowane fermented milk	9,06	8,74	8,60
<i>Str. thermophilus</i>	mleko niefermentowane nonfermented milk	7,44	7,72	8,35
	mleko fermentowane fermented milk	9,05	8,75	8,76

Fernandez-Murga i wsp. [8] wykazali wzrost aktywności β -galaktozydazy z uszkodzonych komórek bakterii, która prawdopodobnie wpłynęła na przyspieszenie rozkładu laktozy, a aktywność pozostałych żywych komórek przyczyniła się do wzrostu zawartości kwasu octowego.

Zawartość kwasu octowego nie wpłynęła bezpośrednio na pH próbki (rys. 5), gdyż kwas octowy ma wyższą stałą dysocjacji (pK_a równe 4,75) niż kwas mlekowy (pK_a równe 3,1). W związku z tym, kwas mlekowy wykazuje większy wpływ na obniżenie pH w porównaniu z kwasem octowym, a kwas octowy z tego samego powodu wykazuje większe właściwości bakteriostatyczne niż kwas mlekowy [22, 26].

Intensyfikacja przemian biochemicznych wywołana wydłużonym procesem fermentacji spowodowała ponadto wzrost zawartości acetoiny w mleku fermentowanym. Substratem do tworzenia acetoiny jest diacetyl, jeden z podstawowych i pożądanych składników w mlecznych napojach fermentowanych [3, 15, 17].



Rys. 5. Zmiany wartości pH w ciągu czterotygodniowego przechowywania mleka.

Fig. 5. Changes in the pH value during the four week storage of milk.

Proces fermentacji w temp. 37 °C, wydłużony do 18 h, przyspieszył redukcję diacetylu przy udziale reduktazy acetoiny. Warto zaznaczyć, że jest to reakcja nieodwracalna w przypadku bakterii fermentacji mlekowej [13, 17]. W niniejszych badaniach wykazano wyższy, i stopniowo rosnący w czasie przechowywania, poziom acetoiny w mleku fermentowanym w porównaniu z mlekiem niefermentowanym. Największy wzrost obserwowano po 2. tygodniu przechowywania (rys. 4). Bakterie jogurtowe, w których skład wchodzi *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, tworzą określone ilości charakterystycznych dla jogurtu związków, gdyż są do tego specjalnie

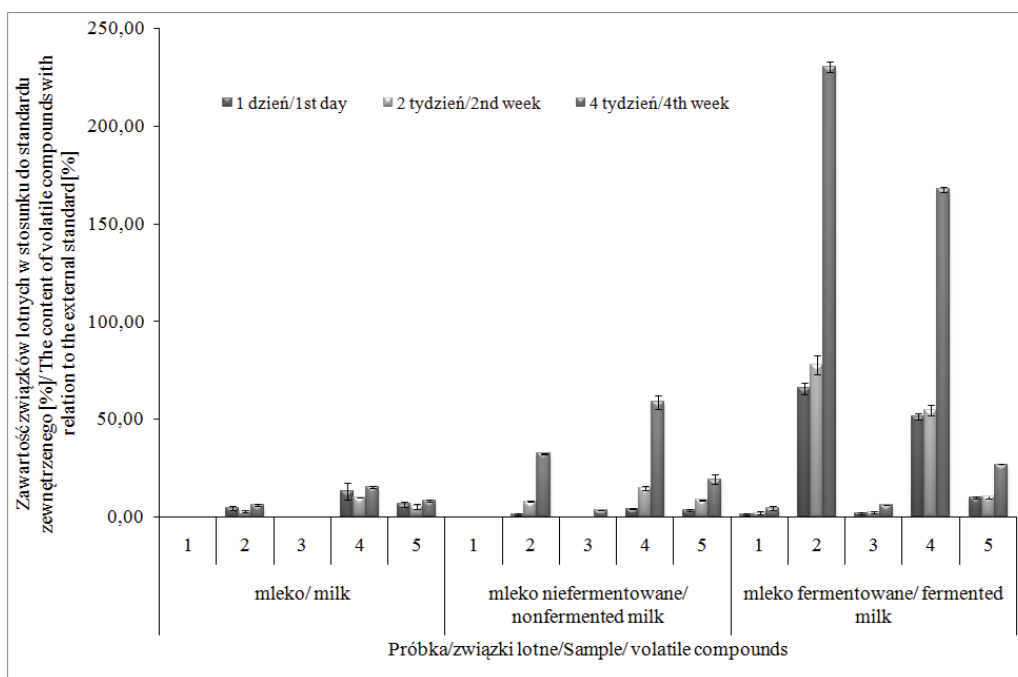
wyselekcjonowane, a ponadto wykazują współzależność symbiotyczną. Ilość wytwarzanych związków aromatycznych zależy od użytych szczepów w mieszance starterowej. W badaniach użyto kultury starterowej charakteryzującej się niskim wytwarzaniem aromatu. Istotne jest, że bakterie, które produkują acetoinę, jednocześnie mają enzym rozkładający ją do 2,3-butanodiolu, tzn. reduktazę acetoiny. Enzym ten jest także odpowiedzialny za przemianę diacetylu do acetoiny. Stworzenie warunków optymalnych dla tego enzymu, tzn. długa inkubacja w temp. wyższej niż 30 °C, przyczynia się do intensywnego rozkładu diacetylu [13, 21, 27]. To tłumaczy, dlaczego w uzyskanych wynikach stwierdzono wysoki poziom acetoiny oraz wskazuje, że kontrola poziomu acetoiny może być ważnym wskaźnikiem monitoringu prawidłowego procesu fermentacji mlekowej. W przypadku mleka niefermentowanego wzrost zawartości acetoiny jest zdecydowanie mniejszy, co wywołane jest prawdopodobnie brakiem procesu fermentacji odpowiedzialnego za produkcję substratu powstawania acetoiny, jakim jest diacetyl (rys. 3, 4).

Istotnymi składnikami wpływającymi na ogólną smakowość mlecznych napojów fermentowanych są lotne kwasy organiczne, takie jak: wcześniej opisany, kwas octowy oraz kwas masłowy, kapronowy, kaprylowy, isowalerianowy i propionowy. Na skutek fermentacji w mleku fermentowanym zaobserwowano ok. 15-krotny wzrost zawartości kwasu masłowego w stosunku do jego zawartości w mleku niefermentowanym (ale zawierającym kulturę jogurtową) i w mleku (rys. 1, 2, 6). Dopiero w 4. tygodniu przechowywania, we wszystkich mlekach stwierdzono podwojenie zawartości kwasu masłowego. Podobny wpływ czasu i procesu fermentacji wykazano w przypadku kwasu kapronowego (rys. 6). Znaczny wzrost zawartości kwasów masłowego i kapronowego w ostatnich dwóch tygodniach przechowywania może wpływać na niepożądane zmiany zapachu i smaku w kierunku wyczuwalnych cech produktu zjełczałego [15, 16]. Z kolei poziom kwasu kaprylowego w pierwszych dwóch tygodniach utrzymywał się na stałym poziomie. Dopiero wyniki uzyskane w czwartym tygodniu przechowywania wykazały nieznaczny wzrost zawartości omawianego kwasu w próbkach fermentowanych i niefermentowanych.

Beshkova i wsp. [5] dowiedli, że najintensywniejsza synteza lotnych kwasów tłuszczowych, takich jak: kwas octowy, masłowy i kapronowy, zachodzi w czasie fermentacji i w czasie przechowywania, co zostało potwierdzone w niniejszych badaniach. Zastosowany w doświadczeniu wydłużony okres przechowywania pozwolił wykazać istotny wpływ tego czynnika na poziom lotnych kwasów tłuszczowych, który ściśle wiąże się z utrzymaniem na pożądanym poziomie cech smakowo-zapachowych gotowego produktu.

Kolejnym stwierdzonym w badaniach kwasem jest kwas izowalerianowy, który jest przykładem produktu rozkładu białka. Bakterie fermentacji mlekowej wykazują niewielkie zdolności proteolityczne, spośród nich większą aktywność wykazują pa-

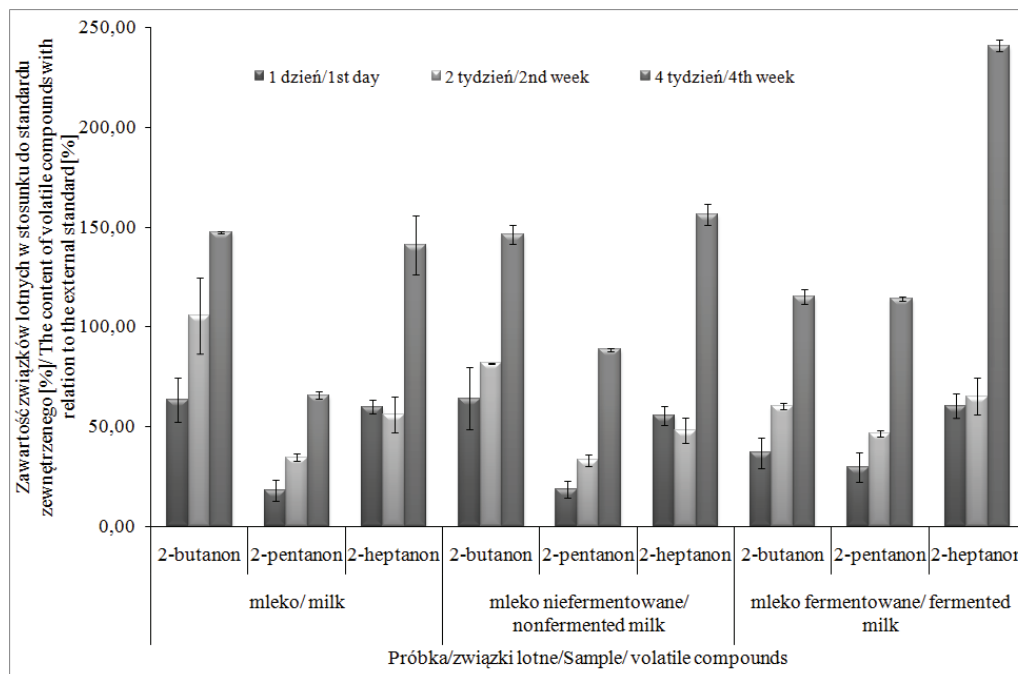
łeczki. W mleku fermentowanym obecność kwasu izowalerianowego wykryto już po procesie fermentacji, a ciągły wzrost jego poziomu w czasie chłodniczego przechowywania dowodzi o rozkładzie białek mleka. W drugim tygodniu kwas izowalerianowy obecny był także w mleku niefermentowanym, a jego zawartość stopniowo zwiększała się przez cały okres przechowywania. Najprawdopodobniej do intensyfikacji rozkładu białek przyczyniły się wewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne uwolnione podczas autolizy martwych komórek bakteryjnych, na co wskazuje zmniejszająca się populacja użytych bakterii (tab. 1). Mała zawartość tego kwasu może być wynikiem jego przemian do kwasu octowego (rys. 6) [4, 7]. Beshkova i wsp. [5] także stwierdzili niewielki udział kwasów izowalerianowego i propionowego w profilu kwasów lotnych wytwarzanych przez szczepy bakterii jogurtowych (*Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). W niniejszych badaniach obecność kwasu propionowego stwierdzono w mleku fermentowanym, już po procesie fermentacji, jego poziom nieznacznie wzrastał przez cały okres chłodniczego przechowywania, jednocześnie nie wykazano jego obecności w mleku niefermentowanym (rys. 6).



Objaśnienia: / Explanatory notes: 1) kwas propionowy / propanoic acid, 2) kwas masłowy / butanoic acid, 3) kw. izowalerianowy / isovaleric acid, 4) kwas kapronowy / caproic acid, 5 - kwas kaprylowy / caprylic acid.

Rys. 6. Profil lotnych kwasów organicznych w modelach mleka.

Fig. 6. The profile of volatile organic acids in the models of milk.



Rys. 7. Profil lotnych ketonów w modelach mleka.

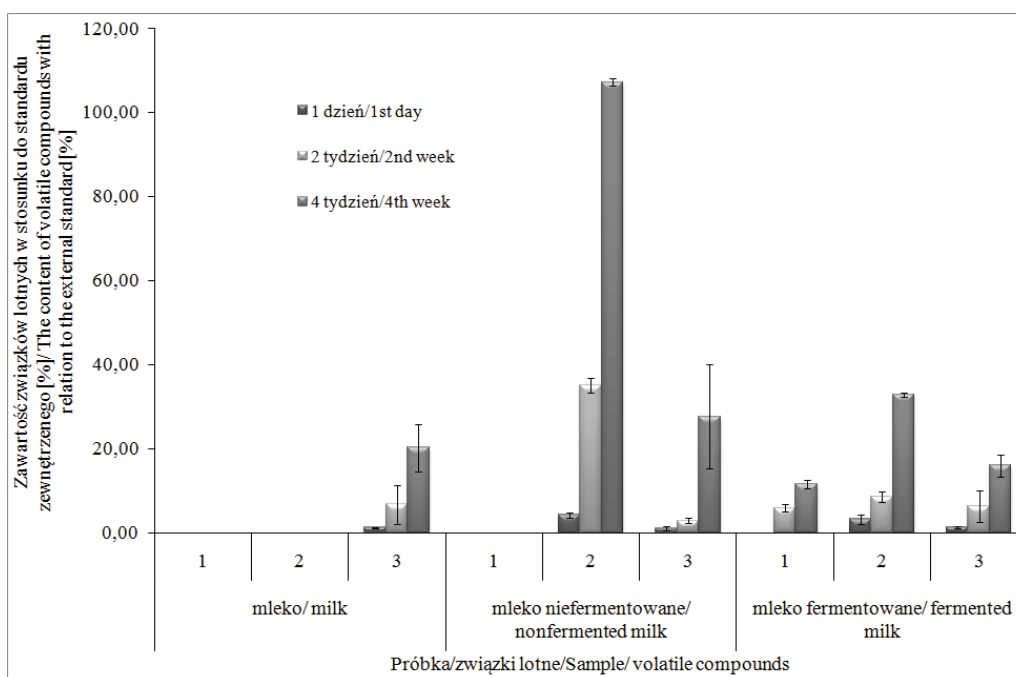
Fig. 7. The profile of volatile ketones in the models of milk.

Obok lotnych kwasów tłuszczowych, produktem rozkładu składników mleka są ketony. W badaniach wykazano obecność 2-butanonu, 2-pentanonu, 2-heptanonu i 2-nonanonu we wszystkich modelach mleka (rys. 7). Wyniki wskazują na stopniowy wzrost ich zawartości w czasie przechowywania próbek. Gardini i wsp. [9] wymieniają 2-butanon jako związek występujący w największej ilości w jogurtach, obok takich substancji, jak diacetyl i etanol (rys. 7). Podczas przechowywania wszystkich modeli mleka, średnio dwukrotnie zwiększyła się zawartość 2-butanonu, przy czym jego poziom był wyższy w próbce mleka i mleku niefermentowanym w porównaniu z mlekiem fermentowanym w ciągu czterech tygodni. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku pozostałych ketonów: 2-propanonu i 2-heptanonu, których poziom w dwóch pierwszych oznaczeniach (1. dzień i 2. tydzień), pomimo nieznacznego wzrostu, utrzymywał się na podobnym poziomie w mleku, mleku fermentowanym i niefermentowanym. Natomiast w czwartym tygodniu ketony dominowały w mleku fermentowanym, z czego w przypadku 2-heptanonu różnica ta wynosiła ok. 30 %.

Analogicznie, jak w przypadku wcześniej omawianych związków, najintensywniejszy przyrost zawartości ketonów zaobserwowano od 2. tygodnia przechowywania (rys. 1, 2 i 3). Można wnioskować, że na obecność ketonów istotny wpływ mają procesy autooksydacyjne, a tylko w nielicznych przypadkach, i w niewielkim stopniu, pro-

ces fermentacji. Jest niewiele opublikowanych badań dotyczących poziomu ketonów w tego rodzaju produktach. W badaniach przeprowadzonych przez Beshkova i wsp. [5] wykazano, że niektóre szczepy *Str. thermophilus* nie przyczyniały się do wzrostu obecności 2-butanonu, zaś inne szczepy *Str. thermophilus* jak i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* wykazywały taką zdolność.

Wśród zidentyfikowanych związków istotne znaczenie mają alkohole (etanol, amylol), które nie występują w świeżym mleku i najprawdopodobniej były produktami mikrobiologicznego rozkładu cukrów, kwasów tłuszczowych lub aminokwasów. Obecność etanolu stwierdzono tylko w mleku fermentowanym i to dopiero w drugim tygodniu przechowywania. Jego poziom wzrósł dwukrotnie w 4. tygodniu. Natomiast w całym okresie przechowywania nie stwierdzono obecności etanolu w mleku niefermentowanym (rys. 8). W przeciwieństwie do amylolu, którego obecność w obu próbkach z udziałem bakterii stwierdzono już w pierwszym dniu, za to już w drugim tygodniu wykazano różnice jego poziomu między mlekiem fermentowanym i niefermentowanym.



Objaśnienia: / Explanatory notes: 1) etanol / ethanol, 2) amylol, 3) alkohol laurylowy / dodecanol.

Rys. 8. Profil lotnych alkoholi w modelach mleka.

Fig. 8. The profile of volatile alcohols in the models of milk.

Poziom amylołu w mleku niefermentowanym był ok. 4-krotnie wyższy niż w mleku fermentowanym w drugim tygodniu i stale rósł, utrzymując prawie 4-krotną różnicę w stosunku do próbki mleka fermentowanego w całym okresie przechowywania (rys. 8). Badania przeprowadzone przez Helinck i wsp. [10] potwierdziły aktywność dehydrogenazy alkoholowej, dehydrogenazy glutaminowej i dehydrogenazy α -ketokwasowej bakterii *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. W wyniku aktywności tych enzymów następuje rozkład aminokwasów do takich związków, jak kwasy, aldehydy i alkohole. Może to tłumaczyć zwiększoną zawartość amylołu w próbce mleka niefermentowanego, zawierającego *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Podobne ilości nie są obserwowane w próbce fermentowanej, a przyczyną może być obniżone pH środowiska zmniejszające aktywność enzymów odpowiedzialnych za te przemiany. W mleku tym po czterech tygodniach przechowywania wartość pH wynosiła 3,84, natomiast w mleku niefermentowanym osiągnęła poziom 6,24 (rys. 5).

Obecność etanolu w opisywanych badaniach jest wynikiem wydłużonego procesu fermentacji i długiego okresu przechowywania, który sprzyjał częściowemu przekształceniu acetaldehydu do alkoholu etylowego lub sprzyjał przekształcaniu cukrów do kwasu octowego, który konkuruje w szlaku metabolicznym z acetaldehydem, co już opisano wcześniej [8, 13, 21]. Wykorzystanie słabo aromatyzującej kultury jogurtowej oraz wydłużenie czasu fermentacji i związanej z tym aktywności biochemicznej przyczyniło się prawdopodobnie do słabej produkcji i szybkiej przemiany acetaldehydu w badanym mleku fermentowanym. W wyniku tych niekorzystnych przemian powstają wady zapachowo-smakowe mlecznych produktów fermentowanych, na co najistotniejszy wpływ ma proces fermentacji, jak i zbyt długi czas chłodniczego przechowywania gotowego produktu.

Kolejnym alkoholem, obecnym także w mleku niezaszczepionym bakteriami był alkohol laurylowy. Jest on alkoholem tłuszczowym i naturalnym składnikiem mleka. Powstaje w wyniku przemian autooksydacyjnych kwasów tłuszczowych, ale w nadmiernych ilościach może wpływać na powstanie obcego kwiatowego zapachu i smaku [15]. Jak wykazano, w początkowym okresie przechowywania jego zawartość była bardzo mała we wszystkich próbkach, dopiero w czwartym tygodniu nieznacznie wzrosła w mleku, mleku fermentowanym i niefermentowanym. Poziom tego alkoholu we wszystkich modelach mleka, z dodatkiem, jak i bez dodatku bakterii, był porównywalny i prawdopodobnie był efektem autooksydacyjnych przemian składników mleka podczas przechowywania produktu (rys. 5).

Wnioski

1. Intensyfikacja mikrobiologicznych przemian składników mleka wystąpiła w modelu fermentowanym, w czwartym tygodniu jego przechowywania.

2. Proces fermentacji mleka wywarł istotny wpływ na zawartość w mleku fermentowanym takich związków, jak: kwas masłowy, izowalerianowy, kapronowy i acetoina.
3. Obecność w mleku fermentowanym, jak i niefermentowanym, znacznych ilości ketonów (2-heptanon, 2-pentanon, 2-butanon) może świadczyć o przemianach wynikających z przechowywania, związanych najprawdopodobniej z przemianami autooksydacyjnymi składników mleka.
4. Niewielkie zmiany zawartości związków lotnych w ciągu pierwszych dwóch tygodni przechowywania w stosunku do zmian między drugim a czwartym tygodniem przechowywania ogranicza okres przydatności do spożycia mlecznych produktów fermentowanych z udziałem żywych kultur bakterii do 14–21 dni.

Literatura

- [1] Akalin S.A., Fenderya S., Acbulut N.: Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *J. Food Sci. Technol.*, 2004, **39**, 613-621.
- [2] Ardo Y.: Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnol. Adv.*, 2006, **24**, 238-242.
- [3] Baj J., Markiewicz Z.: *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2006, s. 153-154, 170-173.
- [4] Baranowska M.: The content of volatile free fatty acids in milk cultured with yoghurt bacteria. *Pol. J. Natur. Sci.*, 2004, **2**, 13-21.
- [5] Beshkova D., Simova E., Frengova G., Simov Z.: Production of flavour compounds by yoghurt starter cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **20**, 180-186.
- [6] Cichosz G.: Czynniki determinujące cechy sensoryczne serów dojrzewających. *Proteoliza. Przegl. Mlecz.*, 1997, **9**, 270-276.
- [7] Cichosz G.: Czynniki determinujące cechy sensoryczne serów dojrzewających. *Lipoliza. Przegl. Mlecz.*, 1997, **10**, 325-329.
- [8] Fernandez Murga M., Ruiz Holgado A.P., Valdez G.F.: Survival rate and enzyme activities of *Lactobacillus acidophilus* following frozen storage. *Cryobiology*, 1998, **36**, 315-319.
- [9] Gardini F., Lanciotti R., Guerzoni M. E., Torriani S.: Evolution of aroma production and survival of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lb. acidophilus* in fermented milks. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 125-134.
- [10] Helinck S., Le Bars D., Moreau D., Yvom M.: Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70** (7), 3855-3861.
- [11] Kuncewicz A., Panfil-Kuncewicz H. Przemiany sacharydów pod wpływem bakterii fermentacji mlekowej. W: Libudzisz Z., Walczak P., Bardowski J.: *Bakterie fermentacji mlekowej. Klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie*. Politechnika Łódzka, Łódź 1998, s. 98-109.
- [12] Leroy F., De Vuyst L.: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tr. Food Sci. Technol.*, 2004, **15**, 67-78.
- [13] Libudzisz Z.: Tworzenie związków aromatu przez bakterie fermentacji mlekowej. W: Libudzisz Z., Walczak P., Bardowski J., *Bakterie fermentacji mlekowej. Klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie*. Politechnika Łódzka, Łódź 1998, s. 110-121.
- [14] Libudzisz Z., Kowal K.: *Mikrobiologia techniczna*. Politechnika Łódzka, Łódź 2000, t. I, s. 421 - 422.

- [15] Marsili R.: Flavours and off-flavours in dairy foods. In: Encyclopedia of dairy science, Roginski H. (red.) Academic Press, London 2003, pp. 1069-1073.
- [16] Mitek M., Słowiński M.: Wybrane zagadnienia z technologii żywności. Wyd. SGGW, Warszawa 2006, s. 362-371.
- [17] Molska I.: Zarys mikrobiologii mleczarskiej. PWRiL, Warszawa 1988, s. 14 -36.
- [18] PN-A-93/86034/02. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólne zasady badań.
- [19] PN-A-86034/15:1998. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólne zasady badań. Jogurt; oznaczenie liczby charakterystycznych drobnoustrojów.
- [20] Przybojewska B., Rafalski H.: Kwasy tłuszczowe występujące w mleku a zdrowie człowieka. Krótkołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe SCFA (cz.1). Przegl. Mlecz., 2003, **52**, (4), 148-152.
- [21] Robinson R. K.: Yoghurt, role of starter cultures. In: Encyclopedia of dairy science, Roginski H. (red.), Academic Press, London 2003, pp. 1059-1062.
- [22] Saarela M., Gunnar M.: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol., 2000, **84**, 197-215.
- [23] Smit G., Smit B. A., Engels W. J. M.: Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavours profiling of cheese products. FEMS Microbiol. Rev. 2005, **29**, 591-610.
- [24] Tamime A. Y., Robinson R. K.: Yoghurt - science and technology. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 1999.
- [25] Varnam H. A.: Milk and milk products. Aspen Publication, 2001, pp. 372-374.
- [26] Ziarno M.: Kultury ochronne w technologii mleczarskiej (cz. II). Przegl. Mlecz., 2006, **55**, (6), 8-10.
- [27] Żbikowski Z.: Nowoczesne trendy w technologii produkcji jogurtu. Przegl. Mlecz., 1997, **46**, (2) 66-69.

PROFILE OF VOLATILE COMPOUNDS PRODUCED IN MODELS OF NON-FERMENTED AND FERMENTED MILK WITH THE USE OF YOGHURT BACTERIA

S u m m a r y

The objective of the research was to determine changes resulting from the activity of bacteria (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) in model samples of yoghurt during their cooling storage. The profiles were compared of volatile compounds produced in the milk that was fermented by a yoghurt culture and in the milk that was not fermented, but contained those bacteria. The results obtained showed an intensive increase in the concentration of all the volatile compounds in the fermented and non-fermented milk samples in the fourth week of storage. The fermentation process was found to be highly vital for the production of such compounds as: butyric acid, isovaleric acid, capronic acid, and acetoin, whereas the compounds: 2-heptanon, 2-pentanon, and 2-butanon occurred mainly owing to the auto-oxidative transformations of milk components during the storage. The occurrence of alcohols proved the enzymatic activity of bacteria subject to the pH level of the environment. It can be concluded that measuring the levels of the compounds contained, such as acetoin, butyric acid, or propionic acid, can support the planning and control of the fermentation process duration period and of the storage time of fermented milk products, as can guarantee their constant and required sensory quality.

Key words: profile of volatile compounds, SPME, yoghurt bacteria, *Streptococcus*, *Lactobacillus* 