

MARTA POKORA, JOANNA NIEDBALSKA, MAREK SZOŁTYSIK

WPLYW ENZYMÓW DROŻDŻY *YARROWIA LIPOLYTICA* NA WYBRANE CECHY JAKOŚCIOWE DOJRZEWAJĄCYCH SERÓW NISKOTŁUSZCZOWYCH

Streszczenie

W pracy podjęto próbę poprawy cech sensorycznych dojrzewających serów niskotłuszczowych przez dodatek preparatu enzymatycznego proteolityczno-lipolitycznego otrzymanego z drożdży *Yarrowia lipolytica*. Sery o zmniejszonej do 30 % zawartości tłuszczu w suchej masie produkowano z mleka, do którego wprowadzono drożdżowy preparat enzymatyczny. Sery wytwarzano w dwóch wariantach: o standardowej (1,5 %) i podwyższonej zawartości NaCl (3,3 %). Podczas 8-tygodniowego procesu dojrzewania serów analizowano ich podstawowy skład chemiczny oraz poziom degradacji białek i tłuszczów. Wykazano, że wprowadzenie do serów preparatu enzymatycznego wpłynęło na intensyfikację przemian degradacyjnych białek i tłuszczów, w porównaniu z serami kontrolnymi. Poziom tych przemian był wyższy w serach o standardowej zawartości chlorku sodu (1,5 %) niż w serach o 3,3 % jego stężeniu. Wprowadzenie enzymów drożdżowych przyczyniło się również do znacznego nagromadzenia drobnocząsteczkowych związków azotowych oraz wolnych kwasów tłuszczowych. Wykazano również, że hydrolazy drożdżowe dodane do serów istotnie wzbogaciły ich skład w lotne związki zapachowe, co zostało potwierdzone w analizie chromatograficznej i ocenie sensorycznej.

Słowa kluczowe: sery niskotłuszczowe, proteazy, lipazy, *Yarrowia lipolytica*, dojrzewanie serów

Wprowadzenie

Sery dojrzewające niskotłuszczowe, ze względu na obniżoną wartość kaloryczną, są dla wielu konsumentów bardziej atrakcyjnymi produktami niż sery pełnotłuste. Jednak zmniejszona zawartość tłuszczu, który jest nośnikiem smaku i zapachu, jest często przyczyną obniżenia ich jakości [17, 18, 20].

Cechy sensoryczne serów kształtowane są w wyniku zachodzących podczas dojrzewania przemian biochemicznych laktozy, cytrynianów, białek i tłuszczu [6, 23]. Intensywność i głębokość tych przemian zależy od enzymatycznej aktywności zarów-

Mgr inż. M. Pokora, mgr J. Niedbalska, dr inż. M. Szoltysik, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław

no kultur starterowych oraz mikroflory niestarterowej, jak i aktywności enzymów koagulujących, enzymów rodzimych mleka oraz enzymów egzogennych wprowadzanych w trakcie produkcji [6, 10, 29]. Na skład powstających związków smakowo-zapachowych wpływa ponadto dostępność substratu, obecność związków regulatorowych i wybranych kofaktorów. Zmiany podstawowego składu fizykochemicznego serów dojrzewających, jakie mają miejsce przy zmniejszeniu zawartości tłuszczu, powodują zakłócenie zrównoważonego profilu smakowo-zapachowego i tekstury, czego przejawem są ubogie cechy sensoryczne i obniżone właściwości funkcjonalne serów [12, 21]. Wzmocnienie lub odtworzenie intensywnego smaku i zapachu tych produktów można osiągnąć przez modyfikację technologii, zwłaszcza stosowanie egzogennych enzymów pochodzenia mikrobiologicznego, głównie proteaz i lipaz [2, 12]. Ich źródłem mogą być drożdże *Yarrowia lipolytica*. Gatunek ten powszechnie występujący w serach jako mikroflora niestarterowa zdolny jest do syntezy pozakomórkowych enzymów, zarówno proteolitycznych aktywnych w środowisku kwaśnym i zasadowym, jak i lipolitycznych, które uczestniczą w procesach degradacyjnych białek i tłuszczów podczas dojrzewania serów [9, 27, 28].

Celem podjętych badań była próba poprawy cech sensorycznych serów niskotłuszczowych przez dodatek preparatu enzymatycznego otrzymanego z drożdży *Yarrowia lipolytica*.

Material i metody badań

Preparat zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych i lipolitycznych otrzymano z hodowli węgłnej drożdży *Yarrowia lipolytica* prowadzonej wg zastrzeżonej metody (zgłoszonej do opatentowania). Płyn pohodowlany po odwirowaniu biomasy drożdżowej poddano ultrafiltracji w dializatorze firmy Frasenius Medival Care przy wykorzystaniu membrany polisulfonowej o nominalnym punkcie odcięcia $18 \cdot 10^3$ Da.

Modelowe sery niskotłuszczowe typu holenderskiego o zawartości tłuszczu 30 % w suchej masie produkowano w warunkach laboratoryjnych z mleka mikrofiltrowanego, poddanego niskiej pasteryzacji (75 °C, 15 s) wg procedury podanej przez Szołtysika i wsp. [25]. Przy produkcji serów doświadczalnych do mleka serowarskiego wprowadzano preparat enzymatyczny w dawce odpowiadającej 1600 U/l aktywności proteolitycznej oraz 420 U/l aktywności lipolitycznej. Próbę kontrolną stanowiły sery otrzymywane bez dodatku preparatu. Produkty po uformowaniu poddawano prasowaniu, a następnie soleniu w solance o stężeniu NaCl 18 %. Poziom nasolenia serów wynosił: 1,5 i 3,3 % chlorku sodu. Proces dojrzewania serów prowadzono przez 8 tygodni w temp. 15 °C, przy wilgotności względnej powietrza 85 %. Okresowo (w czasie 0 tj. następnego dnia po wyprodukowaniu, po 4 i 8 tyg.) dokonywano analizy podstawowego składu chemicznego oraz oceny stopnia procesów proteolizy i lipolizy.

Analiza mikrobiologiczna serów obejmowała oznaczenie ogólnej liczby ziarniaków mlekowych, pałeczek mlekowych oraz drożdży i pleśni. Oznaczenie ogólnej liczby drożdży wykonywano na podłożu OGY agar, o składzie [$\text{g}\times\text{l}^{-1}$]: ekstrakt drożdżowy (Difco) - 5; glukoza - 20; agar (Difco) - 15; chlorowodorek oksytetracykliny (Merck) - 0,1. Płytki inkubowano 3 dni w temp. 30 °C. Oznaczenie liczby pałeczek mlekowych [$\text{g}\times\text{l}^{-1}$] wykonywano na podłożu MRS agar o składzie: suche podłoże MRS (Merck) - 52,2, agar - 15,0, cykloheksymid - 0,1, pH 5,4. Oznaczenie liczby ziarniaków mlekowych wykonywano na podłożu M17 o składzie [$\text{g}\times\text{l}^{-1}$]: suche podłoże M17 (Merck) - 42,5 g, agar - 15,0, cykloheksymid - 0,1. Płytki inkubowano 2 - 5 dni w temp. 30 °C.

Poziom proteolizy w serze oceniano oznaczając zawartość: azotu rozpuszczalnego w wodzie (WSN) wg Kuchroo i Fox [15], wolnych grup aminowych przy użyciu kwasu trinitrobenzenosulfonowego (TNBS, Sigma) wg zmodyfikowanej metody Kuchroo i wsp. [16], zarówno we frakcji rozpuszczalnej w wodzie, jak i wydzielonej z niej wg Jarret i wsp. [14] frakcji rozpuszczalnej w kwasie fosfowolframowym (PTA, Fluka). Stopień zaawansowania przemian proteolitycznych oznaczano także metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym wg Andrews [1].

Zmiany lipolityczne oceniano oznaczając zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), wydzielonych z sera wg Deeth i wsp. [7], metodą chromatografii gazowej w aparacie firmy Agilent Technologies, zaopatrzonym w detektor masowy (GC/MS). Rozdział prowadzono w warunkach: kolumna firmy Agilent HP-88 100 m \times 250 $\mu\text{m}\times$ 0,25 μm , temp. kolumny 70 °C (5 min) do 240 °C (4 °C/min), gaz nośny hel.

Analiza lotnych związków

Związki zapachowe ekstrahowano z wodnego homogenatu sera (1:1 m/v) metodą mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Rozdział prowadzono metodą GC/MS, stosując następujące warunki: kolumna 60 m \times 250 $\mu\text{m}\times$ 0,25 μm , temp. kolumny 40 °C (5 min) do 240 °C (4 °C/min), gaz nośny – hel (20 cm³/s), split 1 : 1. Identyfikację związków lotnych wykonywano na podstawie analizy porównawczej widm masowych z komercyjną biblioteką widm NIST.

Ocenę sensoryczną wyprodukowanych serów prowadzono po zakończeniu dojrzewania. Obejmowała ona wyróżniki jakościowe, takie jak: zapach, smak, słoność, i konsystencja. Ocenę wykonał 10-osobowy zespół w skali 5-punktowej.

Wyniki, przedstawione jako średnie z trzech powtórzeń, poddano analizie statystycznej przy wykorzystaniu dwukierunkowej analizy wariancji. Obliczenia wykonano w programie Statistica v. 6.0.

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono podstawowy skład chemiczny badanych dojrzewających serów niskotłuszczowych: doświadczalnych i kontrolnych. Początkowa zawartość suchej masy w serach, o mniejszej i większej zawartości soli, wynosiła odpowiednio ok. 47 i 49 %. W czasie dojrzewania notowano wzrost udziału poszczególnych składników suchej masy, jednak różnice te były statystycznie nieistotne. Obserwowane zmiany były konsekwencją utraty wody na skutek jej wycieku i odparowania w trakcie dojrzewania [3]. Wykazano także różnice w wartości pH serów podczas dojrzewania. W serach kontrolnych po zakończeniu dojrzewania notowano pH na poziomie 5,41-5,62, podczas gdy w serach doświadczalnych 6,42- 6,51.

Tabela 1

Podstawowy skład chemiczny i pH dojrzewających serów niskotłuszczowych, wyprodukowanych z dodatkiem preparatu enzymatycznego z drożdży *Yarrowia lipolytica* ($\bar{X} \pm SD$).

Basic chemical composition and pH of low-fat cheeses produced with the additives of enzymatic preparations obtained from the *Yarrowia lipolytica* yeast ($\bar{X} \pm SD$).

Ser - % NaCl Cheese - %NaCl	Czas [tyg.] Time [weeks]	Sucha masa, Dry matter [%]	Tłuszcz Fat [%]	Białko, Protein [%]	pH
Kontrolny 1,5 Control 1,5	0	47,00 ± 0,32	29,80 ± 0,28	28,67 ± 0,17	4,78 ± 0,14
	4	48,45 ± 0,14	31,00 ± 0,00	29,31 ± 0,35	5,31 ± 0,12
	8	49,91 ± 0,19	32,10 ± 0,08	29,49 ± 0,16	5,62 ± 0,05
Doświadczalny 1,5 Experimental 1,5	0	47,30 ± 0,12	29,60 ± 0,16	28,95 ± 0,17	4,88 ± 0,08
	4	49,90 ± 0,15	30,10 ± 0,14	30,44 ± 0,18	5,93 ± 0,11
	8	51,41 ± 0,16	31,10 ± 0,17	30,82 ± 0,14	6,51 ± 0,08
Kontrolny 3,3 Control 3,3	0	49,00 ± 0,21	28,60 ± 0,18	28,52 ± 0,39	4,75 ± 0,03
	4	50,23 ± 0,18	28,90 ± 0,21	29,21 ± 0,19	5,23 ± 0,12
	8	51,81 ± 0,11	30,90 ± 0,12	29,46 ± 0,21	5,41 ± 0,08
Doświadczalny 3,3 Experimental 3,3	0	48,99 ± 0,18	28,39 ± 0,09	28,81 ± 0,16	4,78 ± 0,12
	4	51,07 ± 0,20	28,59 ± 0,05	30,36 ± 0,15	5,87 ± 0,13
	8	52,96 ± 0,14	30,21 ± 0,10	30,67 ± 0,12	6,42 ± 0,10

Objaśnienie: / Explanatory note:

($\bar{X} \pm SD$) – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation.

Podczas dojrzewania serów monitorowano zmiany liczby wybranych grup drobnoustrojów (tab. 2). Stwierdzono zmniejszenie liczby zarówno ziarniaków wprowadzonych jako kultury starterowe, jak i pałeczek mlekowych. Populacja ziarniaków

mlekowych zmniejszyła się w serach niezależnie od stopnia nasolenia. W serach doświadczalnych nastąpiła zmiana z wyjściowego poziomu 10^8 jtk/g do 10^5 jtk/g w ostatnim tygodniu dojrzewania. Jednocześnie w serach kontrolnych stwierdzono spadek liczby tych mikroorganizmów o jeden rząd logarytmiczny. Początkowa liczba pałeczek mlekowych kształtowała się na zbliżonym poziomie, jednak w serach o podwyższonej zawartości NaCl (3,3 %) była ona niższa o jeden rząd logarytmiczny niż w serach o standardowym nasoleniu.

Tabela 2

Liczba wybranych grup drobnoustrojów w serach, podczas dojrzewania ($\bar{x} \pm SD$).

Changes in the counts of selected groups of micro-organisms in cheeses during the ripening ($\bar{x} \pm SD$).

Ser - % NaCl Cheese - %NaCl	Czas [tyg.] Time [weeks]	Liczba pałeczek mlekowych [jtk/g] Lactobacilli count [cfu/g]	Liczba ziarniaków mlekowych [jtk/g] Lactococci count [cfu/g]	Liczba drożdży [jtk/g] Yeast count [cfu/g]
Kontrolny 1,5 Control 1,5	0	$2,11 \cdot 10^5 \pm 0,11$	$1,47 \cdot 10^8 \pm 0,15$	0
	4	$1,78 \cdot 10^5 \pm 0,16$	$6,10 \cdot 10^7 \pm 0,09$	0
	8	$1,04 \cdot 10^3 \pm 0,14$	$1,30 \cdot 10^7 \pm 0,12$	$3,70 \cdot 10^3 \pm 0,23$
Doświadczalny 1,5 Experimental 1,5	0	$8,86 \cdot 10^6 \pm 0,16$	$1,60 \cdot 10^8 \pm 0,11$	0
	4	$2,86 \cdot 10^5 \pm 0,20$	$1,50 \cdot 10^7 \pm 0,16$	0
	8	$4,30 \cdot 10^4 \pm 0,21$	$3,00 \cdot 10^5 \pm 0,15$	$1,90 \cdot 10^3 \pm 0,15$
Kontrolny 3,3 Control 3,3	0	$1,47 \cdot 10^5 \pm 0,09$	$2,11 \cdot 10^8 \pm 0,18$	0
	4	$1,30 \cdot 10^5 \pm 0,24$	$1,78 \cdot 10^7 \pm 0,13$	0
	8	$6,10 \cdot 10^3 \pm 0,20$	$1,04 \cdot 10^6 \pm 0,35$	$3,40 \cdot 10^3 \pm 0,41$
Doświadczalny 3,3 Experimental 3,3	0	$1,20 \cdot 10^5 \pm 0,12$	$1,14 \cdot 10^8 \pm 0,14$	0
	4	$1,00 \cdot 10^4 \pm 0,11$	$5,40 \cdot 10^6 \pm 0,15$	0
	8	$7,80 \cdot 10^3 \pm 0,13$	$8,50 \cdot 10^5 \pm 0,09$	$2,10 \cdot 10^3 \pm 0,12$

Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

Pod koniec dojrzewania we wszystkich badanych serach obserwowano redukcję ogólnej liczby pałeczek mlekowych sięgającą 2 rzędów logarytmicznych. Ferreira i Vilijoen [9] oraz Czajgucka i wsp. [5], badając sery, do których wprowadzono kultury wspomagające w postaci drożdży *Yarrowia lipolytica*, nie stwierdzili negatywnego ich wpływu na wzrost bakterii fermentacji mlekowej.

We wszystkich analizowanych serach w ostatnim okresie dojrzewania stwierdzono pojawienie się mikroflory drożdżowej. Jej liczba osiągnęła poziom 10^3 jtk/g. Drożdż-

dże należą do mikroflory dzikiej, naturalnie występującej w serach. Ich liczba w serach półtwardych i twardych zawiera się na ogół w przedziale 10^4 - 10^6 jtk/g [30].

Proces proteolizy kontrolowano poprzez oznaczenie zawartości rozpuszczalnych związków azotowych (WSN), wolnych grup aminowych we frakcji rozpuszczalnej w wodzie oraz w kwasie fosfowolframowym, a także na podstawie rozdziału białek w żelu poliakrylamidowym.

Tabela 3

Zawartość azotu rozpuszczalnego (WSN) oraz wolnych grup aminowych – we frakcji rozpuszczalnej w wodzie i PTA – w serach, podczas dojrzewania ($\bar{x} \pm SD$).

Content of water-soluble nitrogen (WSN) and free amino groups - in a fraction soluble in water and in PTA - in cheeses, during the ripening ($\bar{x} \pm SD$).

Ser - % NaCl Cheese - %NaCl	Czas [tyg.] Time [weeks]	WSN [%N ogólnego] WSN [% of total WSN]	Wolne grupy aminowe Free amino groups [μ M Gly/100 g]	
			we frakcji rozpuszczalnej w wodzie (A) in fraction soluble in water (A)	we frakcji rozpuszczalnej w PTA (B) in fraction soluble in PTA (B)
Kontrolny 1,5 Control 1,5	0	3,14 \pm 0,32	804 \pm 0,12	0
	4	9,21 \pm 0,19	3458 \pm 0,23	1391 \pm 0,28
	8	14,75 \pm 0,26	5483 \pm 0,18	2468 \pm 0,15
Doświadczalny 1,5 Experimental 1,5	0	9,48 \pm 0,10	3976 \pm 0,10	0
	4	36,83 \pm 0,17	12023 \pm 0,18	6891 \pm 0,14
	8	41,28 \pm 0,14	14831 \pm 0,20	8801 \pm 0,21
Kontrolny 3,3 Control 3,3	0	2,81 \pm 0,25	724 \pm 0,34	0
	4	8,92 \pm 0,18	3323 \pm 0,27	1310 \pm 0,11
	8	14,98 \pm 0,23	5374 \pm 0,14	2324 \pm 0,29
Doświadczalny 3,3 Experimental 3,3	0	9,22 \pm 0,11	3202 \pm 0,14	0
	4	30,16 \pm 0,16	9633 \pm 0,16	5748 \pm 0,13
	8	35,97 \pm 0,09	11882 \pm 0,17	7341 \pm 0,11

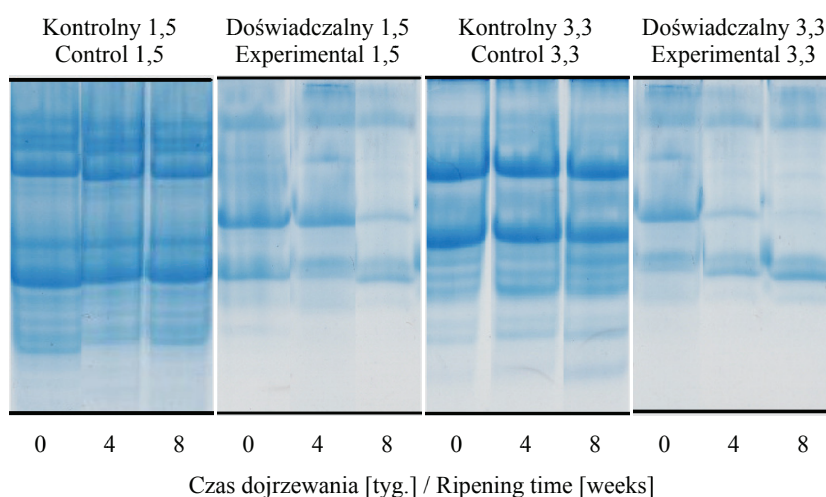
Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

W serach produkowanych z udziałem enzymatycznego preparatu drożdżowego stwierdzono wyższy stopień degradacji białek (tab. 3). W ostatnim tygodniu dojrzewania zawartość WSN wynosiła 41,28 % w produktach o standardowej zawartości chloru sodu (1,5 %), podczas gdy w serach o wyższym stopniu nasolenia (3,3 %) - 35,97 %. W serach kontrolnych zawartość WSN zawierała się w przedziale 14,75 - 14,98 % i była mniejsza średnio o 58 - 64 % w stosunku do prób doświadczalnych.

W serach doświadczalnych zaobserwowano również najwyższe tempo uwalniania wolnych grup aminowych (WGA) we frakcji rozpuszczalnej w wodzie oraz we frakcji rozpuszczalnej w kwasie fosfowolframowym (PTA). Najwyższy poziom WGA we frakcji rozpuszczalnej w wodzie – 14831 $\mu\text{M Gly}/100\text{ g}$ oznaczono w produktach o nasoleniu 1,5 % NaCl. W serach o stężeniu NaCl równym 3,3 % wartość ta była niższa i wynosiła 11882 $\mu\text{M Gly}/100\text{ g}$ sera. Udział wolnych grup aminowych we frakcji rozpuszczalnej w PTA wynosił w tych serach odpowiednio 8801 i 7341 $\mu\text{M Gly}/100\text{ g}$. W dojrzałych produktach otrzymanych bez udziału preparatu enzymatycznego zawartość WGA we frakcji rozpuszczalnej w PTA była na poziomie 2324 – 2468 $\mu\text{M Gly}/100\text{ g}$ sera.

Zaawansowanie zmian degradacyjnych w parakazeinianie świadczy o aktywności preparatu zewnątrzkomórkowych enzymów użytego w produkcji serów doświadczalnych. Uzyskane wyniki są zbieżne z doniesieniami Czajguckiej i wsp. [5], którzy potwierdzają wysoki stopień proteolizy białek pod wpływem enzymów *Yarrowia lipolytica*. Różnice w głębokości zmian degradacyjnych białek badanych serów wynikają najprawdopodobniej z różnej zawartości chlorku sodu. Wzrost koncentracji NaCl powoduje obniżenie aktywności wody, a tym samym wpływa hamująco na procesy biochemiczne zachodzące podczas dojrzewania serów [24, 30].

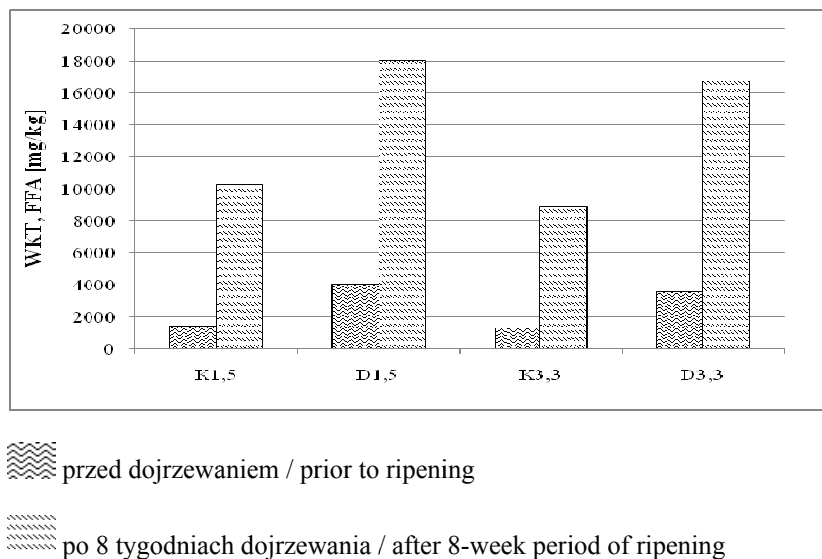
Przedstawione na rys. 1. rozdziały uzyskane metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym potwierdziły głębszy rozkład białek w serach dojrzewających przy udziale drożdżowego preparatu enzymatycznego. W dojrzałych produktach stwierdzono niemal całkowitą degradację frakcji α_{s1} - i β kazeiny. W serach kontrolnych podczas 8 tygodni dojrzewania nie stwierdzono wyraźnych zmian degradacyjnych kazeiny.



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny białek serów podczas dojrzewania (1,5 i 3,3 % NaCl).

Fig. 1. Electrophoretic separation of proteins in cheeses during the ripening (1,5 and 3,3 % NaCl).

W serach doświadczalnych obserwowano także wyższe tempo uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych (WKT). W dojrzałych produktach otrzymanych z udziałem preparatu proteolityczno-lipolitycznego z drożdży *Yarrowia lipolytica* notowano od 16669 do 18027 mg/kg WKT, co stanowiło prawie dwukrotnie wyższą koncentrację tych związków niż w serach kontrolnych (8843 - 10222 mg/kg) (rys. 2).



Rys. 2. Zawartość WKT ogółem w serach bezpośrednio po wyprodukowaniu oraz po 8 tygodniach dojrzewania (K - ser kontrolny, D - ser doświadczalny)

Fig. 2. Content of total FFA in cheeses directly after the production and after 8-week period of ripening (K – control cheese; D – experimental cheese).

W analizowanych serach stwierdzono również zróżnicowanie poziomu uwalniania poszczególnych kwasów tłuszczowych (tab. 4). Najwięcej krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, jak masłowy i kapronowy, w głównej mierze decydujących o intensywności i akceptowalności cech zapachowych serów niskotłuszczowych [19], było w serze doświadczalnym o standardowej zawartości NaCl (1,5 %). Po ośmiu tygodniach dojrzewania zawartość kwasu masłowego wynosiła w nim 794 mg/kg, a kapronowego 563 mg/kg. W serach o 3,3 % koncentracji chlorku sodu oznaczono te kwasy na poziomie, odpowiednio 657 i 503 mg/kg. W równolegle produkowanych serach kontrolnych ich zawartość była ok. 2-krotnie mniejsza.

Wprowadzenie do serów preparatu enzymatycznego przyczyniło się do uwalniania z triacylogliceroli znacznych ilości długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, takich jak palmitynowy, stearynowy i oleinowy. W porównaniu z serami kontrolnymi ich zawartość była od 1,5 do 2,5 razy większa. Nagromadzone w wyniku hydrolizy

triacylogliceroli WKT oraz liczne związki powstające w wyniku ich katabolizmu, jak: metyloketony, estry, alkohole bezpośrednio przyczyniają się kształtowania cech sensorycznych serów dojrzewających [4, 8, 19].

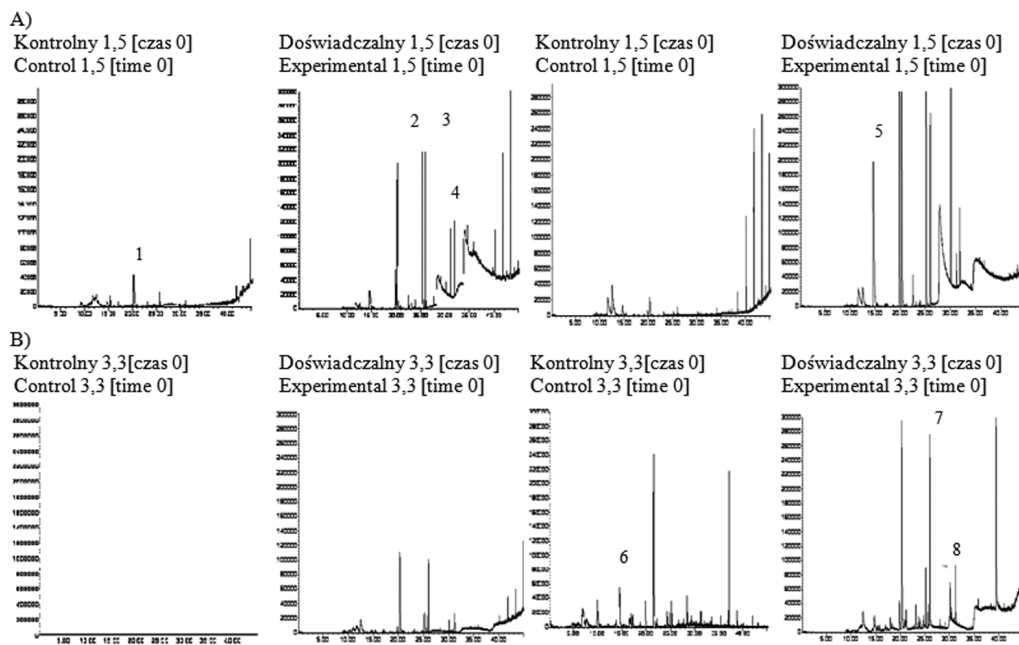
Tabela 4

Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) w serach, podczas dojrzewania ($\bar{x} \pm SD$).
Content of free fatty acids (FFA) in cheeses during the ripening ($\bar{x} \pm SD$).

Ser - % NaCl Cheese - % NaCl	Czas [tyg.]	Kontrolny 3,3 Control 3,3	Kontrolny 1,5 Control 1,5	Doświadczalny 3,3 Experimental 3,3	Doświadczalny 1,5 Experimental 1,5
C ₄	0	54 ± 0,13	39 ± 0,37	75 ± 0,23	94 ± 0,12
	8	348 ± 0,33	453 ± 0,04	657 ± 0,14	794 ± 0,21
C ₆	0	36 ± 0,11	27 ± 0,24	94 ± 0,10	134 ± 0,17
	8	235 ± 0,08	284 ± 0,34	503 ± 0,18	563 ± 0,16
C ₈	0	67 ± 0,22	41 ± 0,17	72 ± 0,03	154 ± 0,03
	8	198 ± 0,11	231 ± 0,08	594 ± 0,04	696 ± 0,24
C ₁₀	0	98 ± 0,17	72 ± 0,19	145 ± 0,24	173 ± 0,19
	8	376 ± 0,24	435 ± 0,21	896 ± 0,11	2745 ± 0,1
C ₁₂	0	56 ± 0,11	64 ± 0,09	98 ± 0,06	134 ± 0,21
	8	589 ± 0,20	643 ± 0,16	2245 ± 0,17	2637 ± 0,18
C ₁₄	0	124 ± 0,17	146 ± 0,24	453 ± 0,20	684 ± 0,24
	8	1456 ± 0,14	1642 ± 0,11	3245 ± 0,23	2543 ± 0,18
C ₁₆	0	298 ± 0,18	398 ± 0,15	765 ± 0,19	865 ± 0,07
	8	1785 ± 0,23	1952 ± 0,20	2174 ± 0,21	2876 ± 0,16
C _{18:0}	0	136 ± 0,22	154 ± 0,21	976 ± 0,24	673 ± 0,11
	8	1126 ± 0,29	1236 ± 0,37	3657 ± 0,28	3565 ± 0,16
C _{18:1}	0	298 ± 0,24	311 ± 0,08	673 ± 0,16	956 ± 0,15
	8	2356 ± 0,18	2783 ± 0,17	3371 ± 0,1	3562 ± 0,21
C _{18:2}	0	76 ± 0,09	95 ± 0,05	187 ± 0,2	134 ± 0,13
	8	374 ± 0,12	563 ± 0,06	845 ± 0,2	785 ± 0,09

Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

Profil smakowo-zapachowy serów określono na podstawie analizy lotnych związków zapachowych. W badanych serach zidentyfikowano związki z grupy: ketonów, alkoholi i kwasów karboksylowych (rys. 3).



1: 2-heptanon / 2-heptanone; 2: kwas kaprylowy / caprylic acid; 3: 2-nonanon / 2-nonanone; 4: kwas kaprynowy / capric acid; 5: kwas masłowy / butyric acid; 6: 4-metyloheksanon / metyl hexanone; 7: 2-undekanon / 2-undecanone; 8: 1-nonanol / 1-nonanol.

Rys. 3. Rozdział chromatograficzny lotnych związków zapachowych serów o standardowej (A) i podwyższonej (B) zawartości NaCl

Fig. 3. Chromatographic profiles of volatile aromatic compounds of cheeses having standard (A) and increased (B) content of NaCl

Wykazano, że w serach doświadczalnych, do których wprowadzono preparat enzymatyczny, stężenie lotnych związków zapachowych wyrażone jako wysokość sygnałów uzyskanych w rozdziale chromatograficznym było największe (rys. 3). W składzie analizowanych związków dominowały kwasy karboksylowe i ketony, których w serach o standardowym i podwyższonym poziomie nasolenia udział wynosił odpowiednio: 78,13 i 21,66 % oraz 30,57 i 62,98 %. Wśród kwasów karboksylowych występowały kwasy: masłowy, kapronowy oraz kaprylowy i kaprynowy, a wśród ketonów: 2-heptanon, 2-nonanon i 2-undekanon. W równolegle produkowanych serach kontrolnych związki te nie były identyfikowane bądź ich zawartość była statystycznie nieistotna.

W ocenie sensorycznej wykazano, że sery wyprodukowane z dodatkiem preparatu enzymatycznego uzyskały wyższe noty pod względem cech smakowo-zapachowych niż konsystencji (tab. 5). Sery doświadczalne o zawartości chlorku sodu 3,3 % były

oceniane wyżej niż sery o standardowym nasoleniu. Niższa ocena tych ostatnich wynikała z gorzkiego posmaku będącego konsekwencją najprawdopodobniej zbyt daleko posuniętych procesów degradacji białek. Sery kontrolne otrzymały niższe oceny za poszczególne wyróżniki jakościowe. Uzyskane wyniki są zbliżone z wynikami Hulin-Bertaud i wsp. [13], według których modyfikacja technologii serów niskotłuszczowych poprzez wprowadzenie enzymów egzogennych pozwala na odtworzenie pełnego aromatu typowego dla ich pełnotłustych odpowiedników, a tym samym podniesienie jakości i pożądalności konsumenckiej.

Tabela 5

Ocena sensoryczna serów po 8 tygodniach dojrzewania ($\bar{X} \pm SD$).

Sensory assessment of cheeses after 8- weeks period of ripening ($\bar{X} \pm SD$).

Ser - % NaCl Cheese - % NaCl	Cecha [pkt] Parametr/points					Ogółem Total
	Zapach Aroma	Smak Taste	Słoność Saltness	Konsystencja Consistence	Tekstura Texture	
Kontrolny 1,5 Control 1,5	4,0±0,48	2,9±0,57	4,5±0,46	2,4±0,33	2,6±0,31	16,4
Doświadczalny 1,5 Experimental 1,5	4,5±0,46	3,4±0,54	4,4±0,53	2,7±0,48	3,3±0,46	18,3
Kontrolny 3,3 Control 3,3	4,5±0,50	3,7±0,55	3,1±0,54	3,6±0,40	3,3±0,50	18,2
Doświadczalny 3,3 Experimental 3,3	4,9±0,40	4,8±0,53	3,0±0,30	3,9±0,49	3,6±0,54	20,0

Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

Wnioski

1. Preparat proteolityczno-lipolityczny z drożdży *Yarrowia lipolytica* może być wykorzystany w produkcji serów niskotłuszczowych w celu poprawy ich cech sensorycznych.
2. Wprowadzenie preparatu enzymatycznego uzyskanego z drożdży *Yarrowia lipolytica* do serów niskotłuszczowych przyczyniło się do intensyfikacji przemian biochemicznych zachodzących podczas ich dojrzewania.
3. Poziom nasolenia serów wywarł istotny wpływ na przemiany hydrolityczne białek i tłuszczu.

Praca wykonana w ramach projektu MNiSzW Nr N N312213036

Literatura

- [1] Andrews, A.T.: Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.*, 1983, **50**, 45-55.
- [2] Azarnia, S., Robert, N., Lee, B.-H.: Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. *Crit. Rev. Biotech.*, 2006, **26**, 121-143.
- [3] Berthold A., Pluta A., Kielak J.: Zmiany wybranych cech fizykochemicznych, reologicznych i sensorycznych w czasie dojrzewania sera typu holenderskiego o różnej zawartości tłuszczu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2 (47)**, 255-261.
- [4] Collins Y.F., McSweeney P.L., Wilkinson M.G.: Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.*, 2003, **13**, 841-866.
- [5] Czajgucka A., Szołtyś M., Juszczak P., Żelazko M., Połaska X., Dąbrowska A., Wojtatowicz M., Chrzanowska J.: Wzrost i aktywność hydrolityczna szczepów drożdży pochodzących z sera w mleku. *Acta Scient. Polon., Biotechnol.*, 2007, **6 (4)**, 3-13.
- [6] Deetae P., Bonnarne P., Spinnler H.E., Helinck S.: Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **76**, 1161-1171.
- [7] Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., Snow A.J.: A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *J. Dairy Sci. Technol.*, 1983, **18**, 230-233.
- [8] Delgado F.J., Gonzalez-Crespo J., Ladero L., Cava R., Ramirez R.: Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (PDO 'Torta del Casar') during ripening. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 2009, **44**, 1721-1728.
- [9] Ferreira A.D., Viljoen B.C.: Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **86**, 131-140.
- [10] Forde A., Fitzgerald G.F.: Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 484-489.
- [11] Guerzoni M., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardin F., Suzzi G.: Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **69**, 79-89.
- [12] Hassan A.N., Awad S., Mistry V.V.: Reduced fat process cheese made from young reduced fat cheddar cheese manufactured with exopolysaccharide-producing cultures. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**, 3604-3612.
- [13] Hulin-Bertaud S., Kilcawley K.N., Wilkinson M.G., Delahunty C.M.: Sensory and compositional relationships between commercial cheddar-flavored enzyme-modified cheeses and natural cheddar. *J. Food Sci.*, 2000, **65 (6)**, 1076-1082.
- [14] Jarret W.D., Aston J.W., Dullely J.R.: A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 1982, **6**, 55-58
- [15] Kuchroo C.N., Fox P.F.: Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwiss.*, 1982, **37**, 331-335.
- [16] Kuchroo C.N., Rahilly J., Fox P.F.: Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzene sulphonic acid. *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 1983, **7**, 129-133.
- [17] Liu H., Xu X.M., Guo S.D.: Comparison of full-fat and low-fat cheese analogues with or without pectin gel through microstructure, texture, rheology, thermal and sensory analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2008, **43**, 1581-1592.
- [18] McSweeney P.L.H., Sousa M.J.: Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 2000, **80**, 293-324.
- [19] Noronha N., Cronin D., O'Riordan D., O'Sullivan M.: Flavouring reduced fat high fibre cheese products with enzyme modified cheeses (EMCs). *Food Chem.*, 2008, **110**, 973-978.

- [20] Ritvanen T., Lampolahti S., Lilleberg L., Tupasela T., Isoniemi M., Appelbye U., Lyytikäinen T., Eerola S., Uusi-Rauva E.: Sensory evaluation, chemical composition and consumer acceptance of full fat and reduced fat cheeses in the Finnish market. *Food Qual. Pref.*, 2005, **16**, 479-492.
- [21] Rogers N.R., Drake M.A., Daubert C.R., McMahon D.J., Bletsch T.K., Foegeding E.A.: The effect of aging on low-fat, reduced-fat, and full-fat Cheddar cheese texture. *J. Dairy Sci.*, 2009, **92**, 4756-4772.
- [22] Roostita R., Fleet G.H.: Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **31**, 205-219.
- [23] Smit G., Smit A.B., Wim J. Engels M.: Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, **29**, 591-610.
- [24] Sousa M.J., Ardo Y., McSweeney P.L.H.: Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 327-345.
- [25] Szoltyś M., Pokora M., Sławska E., Niedbalska J., Dąbrowska A., Połomska X., Wojtatowicz M., Chrzanowska J.: Pośrednie wykorzystanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do poprawy cech sensorycznych serów niskotłuszczowych. *Acta Scient. Polon., Biotechnol.*, 2009, **8 (2)**, 5-17.
- [26] Vakhlu J., Kour A.: Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *J. Biotechnol.* 2006, **9 (1)**, 69-85.
- [27] van den Tempel T., Jakobsen M.: The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.*, 2000, **10**, 263-270.
- [28] Wilkinsom M.G., Kilcawley K.N.: Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 817-830.
- [29] Wiśniewska K., Rejs A., Jarmul I., Iwańczak M.: Ripening of rennet cheeses with different content of salt. *Natural Sci.*, 1999, **3**, 95-107.
- [30] Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczyk P., Skiba A., Gdula A.: Identification and biochemical characteristics of yeast mikroflora of Rokpol cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **69**, 135-140.

EFFECT OF *YARROWIA LIPOLYTICA* ENZYMES ON SELECTED QUALITATIVE FEATURES OF RIPENING, LOW-FAT CHEESES

Summary

In the research, it was attempted to improve sensory features of ripening, low-fat cheeses by adding an enzymatic, proteolytic-lipolytic preparation obtained from *Yarrowia lipolytica* yeast. The cheeses with an amount of fat in dry mass reduced to a level of 30 % were produced from milk with the enzymatic yeast preparation added. Two variants of cheeses were produced: with a standard content of NaCl (1.5 %) and with an increased content of NaCl (3.3 %). During an 8-week period of ripening, the basic chemical composition of the cheeses was analysed as was the biodegradation level of proteins and fats. It was proved that with the enzymatic preparation added to the cheeses under production, the degradation processes of proteins and fats were intensified compared to the control cheeses. The level of biodegradation processes was higher in the cheeses having a standard content of NaCl (1.5 %) than in the cheeses with a 3.3 % concentration of NaCl. The yeast enzymes added contributed to a considerable accumulation of low-molecular-weight nitrogen compounds and free fatty acids. Moreover, it was shown that the yeast hydrolases added to the cheeses significantly enriched them with volatile aromatic compounds, and this fact was confirmed during a chromatographic analysis and, also, by a sensory assessment.

Key words: low-fat cheeses, proteases, lipases, *Yarrowia lipolytica*, ripening process of cheeses 