

Я.Ф. Жукова, канд. біол. наук, с.н.с.,
Ц.О. Король, канд. тех. наук, с.н.с.,
С.С. Петрищенко, аспірант,
Інститут продовольчих ресурсів
НААН України

ОСОБЛИВОСТІ НАКОПИЧЕННЯ ДІАЦЕТИЛУ ТА АЦЕТАЛЬДЕГІДУ УПРОДОВЖ ФЕРМЕНТУВАННЯ ВЕРШКІВ КУЛЬТУРАМИ *L. LACTIS* SSP. *LACTIS* BIOVAR. *DIACETYLLACTIS*

*Досліджено динаміку утворення ацетальдегіду, накопичення діацетилу та летких жирних кислот у вершках під впливом монокультур *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* методами капілярної газової хроматографії та спектрофотометрично. Одержані дані стануть підґрунтям при розробленні хімічних критеріїв кислomолочного аромату.*

Ключові слова: ароматичні сполуки, ацетальдегід, діацетил, вершки, молочнокислі бактерії.

*Исследована динамика образования ацетальдегида, накопления диацетила и летучих жирных кислот в сливках под влиянием монокультур *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* методами капиллярной газовой хроматографии и спектрофотометрически. Полученные данные станут основой при разработке химических критериев кислomолочного аромата.*

Ключевые слова: ароматические соединения, ацетальдегид, диацетил, сливки, молочнокислые бактерии.

*Dynamics of formation and accumulation of acetaldehyde, diacetyl and volatile fatty acids in cream under the influence of monocultures *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* methods capillary gas chromatography and spectrophotometry were investigated. The received data will be the basis for development of the chemical criteria of sour-milk flavor.*

Key words: aromatic compounds, acetaldehyde, diacetyl, cream, lactic acid bacteria.

На накопичення ароматичних сполук у продуктах, як правило, впливають біологічні і технологічні фактори. До біологічних факторів відносять заквашувальні культури, зокрема, молочнокислі бактерії, ферментні системи яких здатні утворювати широкий спектр метаболітів, чимало з яких є попередниками ароматичних сполук. Різноманітність відтінків кислomолочного аромату залежить від якісного та кількісного складу летких сполук та їх співвідношень, зокрема, діацетилу, ацетальдегіду, летких кислот, лактонів, тощо.

Найбільш широко у молочній промисловості використовуються для продукування діацетилу штами *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* та деякі штами роду *Leuconostoc* і *Weissella*.

Встановлено, що для ефективного синтезу діацетил-ацетоїну ароматоутворювальними молочнокислими бактеріями необхідна лимонна кислота, або її солі [1]. Також зроблено припущення, що синтез діацетил-ацетоїну є способом зменшення токсичних кількостей пірувату, що утворюються в результаті біохімічних перетворень. Формування продуктів метаболізму *Lactococcus lactis*, в тому числі ароматичних сполук, залежить від чотирьох ферментів: лактатдегідрогенази (ЛДГ), піруватформіат-ліази (ПФЛ), піруватдегідрогенази (ПДГ), ацетолактатсинтази (АцЛС) [2].

Тобто для інтенсифікації кислomолочного аромату ферментованих продуктів існують кілька способів. Перший спосіб – додавання до вихідного середовища субстратів цитрату і пірувату; другий – відбір штамів високих продуцентів діацетилу; третій – використання методів генної інженерії, через технологію рекомбінантних ДНК. Останній спосіб вимагає ґрунтовних досліджень шляхів метаболізму мікроорганізмів та їх ключових ферментів.

Метою даної роботи було дослідження накопичення ароматичних летких сполук, що утворюються при ферментуванні вершків культурами *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були вершки жирністю 32–36%, ферментовані культурами *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Вміст ароматичних сполук у вершках досліджували на газовому хроматографі “Кристаллюкс 4000М”, обладнаному капілярною колонкою FFAP довжиною 60 м з внутрішнім діаметром 0,25 мкм. Вміст діацетилу та ацетоїну визначали спектрофотометрично [3].

Результати досліджень. Дослідження накопичення діацетилу та ацетоїну упродовж ферментування різними штамами молочнокислих лактококів показало, що накопичення відбувалось в залежності від штамової специфічності.

Було зафіксовано, що у вихідній сировині вміст діацетилу та ацетоїну дорівнював 0,272 мг/100 г та 0,457 мг/100 г, відповідно (рис. 1). Досліджені штами *L. diacetylactis* збільшували вміст діацетилу та ацетоїну в 6,7–7,8 раза та у 20,2–24,5 раза, відповідно. Культури *L. diacetylactis* продукували діацетил доти, поки рН молочної сировини не знижувався до 5,1, після чого рівень цієї сполуки знижувався, за рахунок ферменту діацетилредуктази [4].

Відомо, що серед загальної кількості летких ароматичних сполук найбільша питома вага щодо формування аромату кисломолочних продуктів припадає не тільки на діацетил та ацетоїн, а й на ацетальдегід.

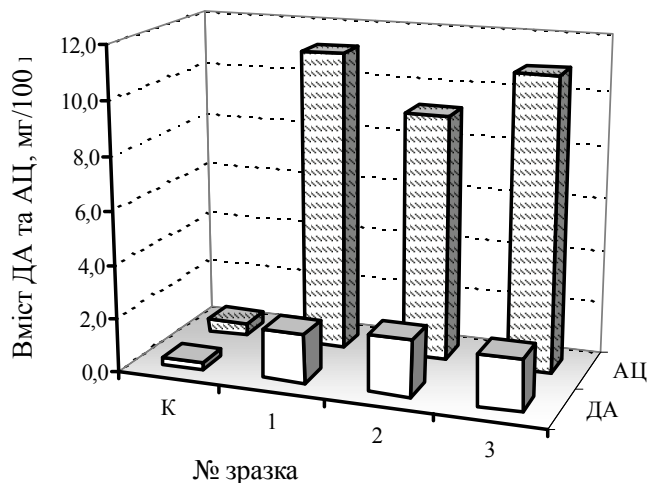


Рис. 1. Вміст діацетилу (ДА) та ацетоїну (АЦ) у вершках, ферментованих культурами *L. diacetylactis*

К – вихідна сировина – вершки, №1 – *L. diacetylactis* 1, №2 – *L. diacetylactis* 2, №3 – *L. diacetylactis* 9

Слід відзначити, що хоча ацетальдегід надає гострого, іноді “овочевого” запаху продуктам, якщо міститься у надмірній кількості, однак є необхідним компонентом аромату кисломолочних продуктів [5], крім того на гостроту сприйняття цієї сполуки впливає і масова частка жирової фази у продукті. Вважають, що аромат деяких ферментованих продуктів залежить від співвідношення діацетилу до ацетальдегіду [4, 6]. Відомо, що аромат кисловершкового масла вважають добрим, якщо співвідношення діацетил/ацетальдегід (ДА/А) становить близько 4:1. Втім продукування цих ароматичних сполук окремими штамами майже не вивчалось і таке співвідношення, за літературними даними, отримано при ферментуванні лише композицій молочнокислих бактерій [6].

Під час виконання роботи, було показано, що при ферментуванні вершків з масовою часткою 33 % жиру монокультурами *L. diacetylactis* не було досягнуто співвідношення діацетил/ацетальдегід 4:1. Варіювання цього співвідношення відбувалось від 2,9 до 3,2 (табл. 1).

Показано, що на 16 год. культивування вміст молочної кислоти був максимальним після ферментування вершків штамом *L. diacetylactis* 9, за участі культури *L. diacetylactis* 2 накопичення молочної кислоти було у 1,7 рази меншим. Водночас найвищий рівень діацетилю та ацетальдегіду серед ферментованих варіантів спостерігали з *L. diacetylactis* 2 (див. табл. 1).

Таблиця 1

Вміст молочної кислоти, діацетилю та ацетальдегіду у ферментованих вершках культурами *L. diacetylactis*

№ n/n	Найменування показників	№ зразка <i>L. diacetylactis</i>		
		1	2	9
1	Молочна кислота, мг/100 г	171,49	120,10	205,65
2	Діацетил, мг/100 г	1,839	2,127	1,910
3	Ацетальдегід, мг/100 г	0,570	0,721	0,626
4	Чисельність, КУО/1 см ³ на 16 год. культивування	$9,57 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^8$	$4,55 \cdot 10^8$

Оскільки ароматичні леткі сполуки є продуктами метаболізму і субстратом для подальших біохімічних перетворень, то їх концентрація змінюється з часом. Тому наступним етапом роботи було визначення вмісту ацетальдегіду упродовж ферментування вершків різними видами лактококів.

Показано, що максимальне накопичення ацетальдегіду для *L. cremoris* було зафіксовано на 12–14 год. культивування, після чого цей показник починав зменшуватись. Рівень ацетальдегіду при ферментуванні культурами *L. lactis* був значно менший, ніж з *L. cremoris* та *L. diacetylactis* і його максимальне значення спостерігалось на 10–12 год. культивування (рис. 2).

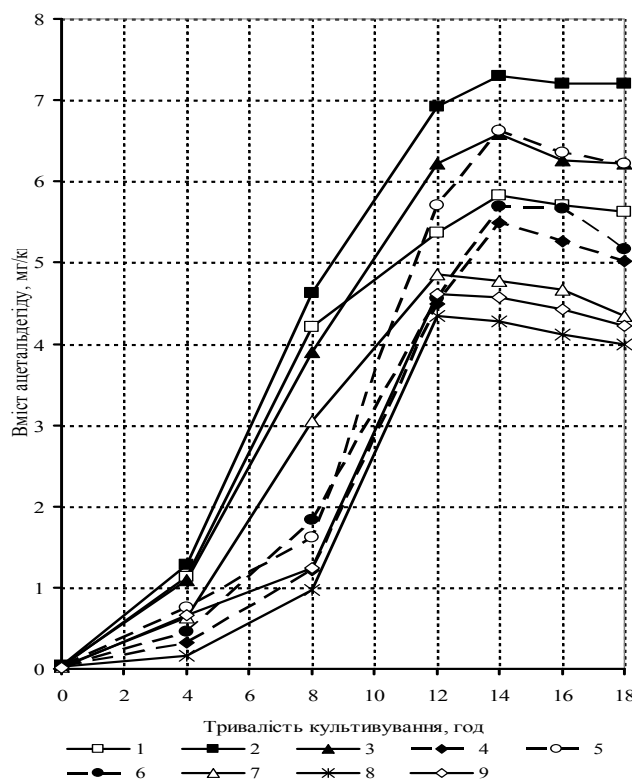


Рис. 2. Вміст ацетальдегіду у вершках, ферментованих різними лактококами упродовж 18 год культивування

№1 – *L. diacetylactis* 1, № 2 – *L. diacetylactis* 2, № 3 – *L. diacetylactis* 9, № 4 – *L. cremoris* 5, № 5 – *L. cremoris* 9, № 6 – *L. cremoris* 7, № 7 – *L. lactis* 3; № 8 – *L. lactis* 1, № 9 – *L. lactis* 2.

Таким чином, для визначення аромату ферментованих вершків, зокрема для врахування внесення в ароматичний букет ацетальдегіду, необхідно проводити дослідження його концентрації на 12–16 год. після внесення молочнокислих бактерій у молочне середовище.

Показано, що упродовж ферментування вершків загальний вміст летких жирних кислот суттєво збільшувався в культурах *L. diacetylactis* порівняно з контролем на кінець ферментування вершків становив від 0,193 до 0,306 мекв/100 г; у культурах *L. lactis* – 0,6–0,7 мекв/100 г; за участі *L. cremoris* варіював від 0,11 до 0,13 мекв/100 г. Цей факт можна пояснити різною активністю та видами ферментів, залучених до розщеплення білків, вуглеводів та жирів. Є думка, що лактококи *L. diacetylactis* та *L. cremoris* мають більш високу ліполітичну активність порівняно з *L. lactis*, що відбивається на загальному вмісті ЛЖК.

Збільшення загального вмісту ЛЖК при ферментуванні культур відбувається переважно за рахунок оцтової кислоти, меншою мірою, ізовалеріановою кислотою, оскільки зміна вмісту інших ЛЖК є незначною (табл. 2). За літературними даними для вироблення масла з приємним смаком і запахом вміст цих кислот у вершках не повинен перевищувати 30-40мг/кг; підвищення рівня загального вмісту ЛЖК може стати причиною погіршення аромату та смаку продукту.

Таблиця 2

Якісний та кількісний склад летких жирних кислот вершків, ферментованих культурами *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

№	Кислота	Контроль вершки		Вид лактобактерій					
				<i>L. diacetylactis</i> 1		<i>L. diacetylactis</i> 2		<i>L. diacetylactis</i> 9	
		% від заг. вмісту	мг/1кг	% від заг. вмісту	мг/1кг	% від заг. вмісту	мг/1кг	% від заг. вмісту	мг/1кг
1	Оцтова	37,07	4,20	37,62	12,35	32,69	12,49	33,35	12,82
2	Пропіонова	7,94	0,90	11,38	3,74	14,96	5,71	4,07	1,56
3	Ізомасляна	2,65	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	Масляна	21,89	2,48	20,63	6,78	23,17	8,85	25,59	9,84
5	Ізовалеріанова	6,44	0,73	18,12	5,95	17,98	6,87	17,09	6,57
6	Ізокапронова	0,18	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	Капронова	23,83	2,70	12,25	4,02	11,19	4,27	19,89	7,65
8	Гептанова	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Сума	100,00	11,33	100,00	32,84	100,00	38,19	100,00	38,44

Дані щодо вмісту окремих летких жирних кислот вказують на варіабельність фракцій окремих кислот в залежності від досліджуваних культур. Домінуючою кислотою були оцтова, масляна, ізовалеріанова та капронова кислоти. Відмінності у якісному та кількісному складі летких жирних кислот вказують на їх внесок в органолептику продукту.

Органолептична оцінка досліджуваних ферментованих вершків показала, що у варіантах, які мали співвідношення діацетил/ацетальдегід близько 3:1 був чистий солодкуватий кисломолочний аромат (табл. 3). Помітних органолептичних відхилень під час дегустації відзначено не було в жодному варіанті проб.

Показано, що культури *L. diacetylactis* надавали вершкам чистого кисломолочного аромату, в той час як варіанти, ферментовані *L. lactis* або *L. cremoris*, мали аромат більш насичений і кисломолочний. Це можна пояснити, зокрема, різним рівнем деяких сполук, зокрема летких жирних кислот, ацетальдегіду та відсутністю діацетилу у вершках, ферментованих *L. lactis* або *L. cremoris*.

Органолептична характеристика ферментованих вершків лактококами

№ п/п	Найменування зразків	Органолептична характеристика
1	<i>L. diacetylactis</i> 1	чистий кисломолочний, солодкуватий смак
2	<i>L. diacetylactis</i> 2	виражений кисломолочний, ніжний смак
3	<i>L. diacetylactis</i> 9	солодкувато-кислуватий аромат, ніжний смак
4	<i>L. cremoris</i> 5	кислуватий, сметанний аромат та смак
5	<i>L. cremoris</i> 9	кисломолочний вершковий
6	<i>L. cremoris</i> 7	виражений чистий кисломолочний смак
7	<i>L. lactis</i> 3	інтенсивний кисломолочний
8	<i>L. lactis</i> 1	кислуватий, приємний
9	<i>L. lactis</i> 2	приємний, помірно кислуватий

Висновки. При оцінюванні вмісту ароматичних сполук та розробленні хімічних критеріїв аромату необхідно враховувати тривалість ферментування та зберігання продуктів. Накопичення діацетилу та ацетоїну у ферментованих вершках відбувалось в залежності від штамової специфічності *L. diacetylactis*. Рівень ацетоїну був в 4-6 разів більший, ніж діацетилу.

Показано доцільність визначення вмісту ацетальдегіду у вершках на 12–16 год. після внесення молочнокислих бактерій. Максимальне накопичення ацетальдегіду для *L. cremoris* було зафіксовано на 12–14 год., а з *L. lactis* та *L. diacetylactis* на 10–12 год. культивування.

Показано, що культури *L. diacetylactis* надавали вершкам чистого ніжного кисломолочного аромату, в той час як варіанти, ферментовані *L. lactis* або *L. cremoris*, мали аромат більш насичений і кисломолочний, що можна пояснити, зокрема, різним рівнем летких жирних кислот, діацетилу, ацетоїну та ацетальдегіду.

Список літератури

1. Калинина Н.А., Ганина В.И., Суходелец В.В. Плазмидный состав и контроль ароматобразования у производственных штаммов лактококков. // Биотехнология. - 1994. - №8. - С. 7-10.
2. Starrenburg, Mario J.C., Hugenholtz, Jeroen. Citrate Fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – V.57, N12 – p. 3535-3540.
3. Залашко М., Макарьина Н. Определение количества диацетила и ацетоина в закваске и сливочном масле // Молочная промышленность. – 1962. - № 10. – С. 42-43.
4. Bottazzi Vittorio, Dellaglio Franco Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococci// Journal of Dairy Research. – 1967. – Vol. 34, № 2. – P. 109-113.
5. Lees G. J., Jago G. R. Formation of acetaldehyde from theonine by lactic acid bacteria// Journal of Dairy Research. – 1976. – Vol. 43, №1. – P. 75-83.
6. Lindsay R.C., Day E.A., Sandine W.E. Green flavor defect in lactic starter cultures// J. Dairy Sci. – 1965. – Vol. 48, № 7. – P. 863-869.