УДК 637.146.2

Рожанська О.М., к.б.н., **Боднарчук О.В.** (dnistranka@mail.ru), к.т.н.,
Король О.В., Чорна Н.А., Кігель Н.Ф., д.т.н. ©
Технологічний інститут молока та м'яса НААН, м. Київ

КОНСТРУЮВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ КОМПОЗИЦІЙ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КИСЛОВЕРШКОВОГО МАСЛА

Виділено, ідентифіковано та досліджено основні технологічні властивості штамів лактококів і за їх участю створено бактеріальні композиції, активність розвитку яких у знежиреному молоці та вершках визначено за температурних режимів, що застосовуються у технології кисловершкового масла. Встановлено оптимальні температури вирощування складових посівного матеріалу для заквашувальних композицій, показано здатність останніх до активного продукування смако-ароматичних сполук.

Ключові слова: *мезофільні молочнокислі бактерії, бактеріальні композиції, кислотність, чисельність клітин, вершки, кисловершкове масло, діацетил, леткі органічні кислоти, ефіри.*

Кисловершкове масло (КВМ) характеризується притаманним саме йому багатим смако-ароматичним букетом, обумовленим певним співвідношенням між такими продуктами життєдіяльності заквашувальних мікроорганізмів, як: діацетил, леткі органічні кислоти, ефіри та спирти. Наявність цих метаболітів молочнокислих бактерій у КВМ має не аби яке значення і для підвищення його функціональної цінності порівняно із іншими видами масла, і для забезпечення натуральності та подовження термінів придатності для споживання [1-3].

Проте у практиці вітчизняного маслоробства частка кисловершкового масла є надзвичайно мала і представлена лише марками "President" (група "Лакталіс") та "Преміум" (група "КОМО"), до того ж у його виробництві доводиться використовувати лише іноземні заквашувальні препарати. Причиною непопулярності КВМ серед виробників є не тільки складний та тривалий процес його виготовлення, але й назріла необхідність модернізації технології зазначеного продукту, яка серед іншого передбачає і розробку конкурентноздатних вітчизняних бактеріальних препаратів.

Враховуючи органолептичні характеристики КВМ, ключовими критеріями оцінки перспективності використання того чи іншого штаму як складової бактеріальних заквасок є продукуванням ним молочної кислоти у кількості, достатній для забезпечення бажаного рівня титрованої кислотності у плазмі, та/або активний синтез смако-ароматичних сполук [4].

Тому пошук та відбір штамів молочнокислих мікроорганізмів за цими властивостями та конструювання на їхній основі заквашувальних культур для

© Рожанська О.М., Боднарчук О.В., Король О.В., Чорна Н.А., Кігель Н.Ф., 2011

застосування у виробництві кисловершкового масла є надзвичайно актуальним питанням та потребує нагального вирішення.

Метою роботи було створити за участю селекціонованих штамів лактококів бактеріальні композиції, здатні до активного функціонування у вершках за умов, визначених технологією даного продукту, і надання останньому необхідних промислово-цінних якостей.

Матеріали та методи досліджень.

Ідентифікацію досліджуваних штамів проводили за їх морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями згідно визначника Берджі. Ліполітичну активність визначали дифузійним методом лунок з використанням індикаторного середовища з твіном 80 [5]. Загальну кількість молочнокислих бактерій та ароматутворювальних лактококів визначали стандартним методом висіву десятикратних розведень згідно з ГОСТ 10444.11-89. Титровану кислотність кисломолочних згустків та сквашених вершків визначали за ГОСТ 3624-92. Активну кислотність (pH) – потенціометрично. Здатність до продукуваня смако-ароматичних речовин монокультурами молочнокислих бактерій та їх композиціями у знежиреному молоці та вершках оцінювали за кількістю діацетилу – за методом Залашко та Макаріної, летких органічних кислот – після дистиляції з водяною парою та ефірів – за допомогою лужного гідролізу [6].

У роботі використовували вершки з м.ч. жиру 35 %, пастеризовані за температури (92±2)°С. Дозрівання вершків проводили за літньою технологією за наступних температурних умов:

4 год. витримки при 21 ºС + 4 год. при 13 ºС + 6 год. при 8 ºС

Результати досліджень. Після ретельного аналізу основних технологічних, біохімічних та органолептичних показників 54 штамів лактококів з колекції виробничих культур ТІММ та виділених з некомерційних кисломолочних продуктів було відібрано 13 представників роду *Lactococcus*, які належать до підвидів *lactis*, *cremoris* та *diacetilactis* (*L. dl*.). На цьому етапі відбору перевага насамперед надавалася культурам з високими показниками молокозсідальної активності та енергії кислотоутворення у молоці. Обов'язковою умовою була також їхня фагорезистентність.

Як відомо, при виробництві КВМ застосовують диференційовані температурні режими підготування вершків до збивання, які відповідають сезонній специфіці хімічного складу молочного жиру. Зазвичай, визрівання вершків відбувається за низьких температур, які сприяють ліпшій його кристалізації, і є важливим чинником забезпечення якісної консистенції готового продукту. У зв'язку з цим ще одним критерієм відбору культур була їхня здатність до психрофілії, тобто інтенсивного росту і високої біохімічної активності за температури набагато нижчої за оптимальну (30°С) для цих видів молочнокислих бактерій, але обумовленою сферою їх майбутнього практичного застосування. Встановлено, що відібрані культури утворювали молочні згустки у відновленому знежиреному молоці через 18 год. вирощування за температури 21 °С при використанні 5 % і навіть 3 % посівного матеріалу.

Відомо, що гідролітичне розщеплення молочного жиру може призвести до згіркнення продукту. Хоча бактерії, які здійснюють молочнокисле бродіння, характеризуються низьким рівнем ліполітичної активності, проте вони можуть посилювати активність ліпази нативної мікрофлори вершків, що залишилася після їх пастеризації. Встановлено, що усі включені до подальшої роботи штами не виявляють ліполітичної активності, про що свідчила відсутність зон лізису твіну 80 на сьому добу їх вирощування чашковим методом за температур 25 °С та 30 °С.

За участю відібраних за вказаними критеріями штамів лактококів шляхом довільного їх об'єднання було створено 9 трикомпонентних заквашувальних композицій із різним співвідношенням між кислото- та ароматутворювачами в інокуляті. Усі варіанти було проаналізовано за активністю їх розвитку та утворення смако-ароматичних речовин у вершках при внесенні у кількості 3 % і вирощування за літньою технологією виготовлення масла. Контролем слугували вершки, піддані лише фізичному дозріванню (табл. 1).

Таблиця 1.

Характеристика бактеріальних композицій для виробництва кисловершкового масла

Заквашувальні композиції	Приріст чисельності клітин у дозрілих вершках, разів		Вміст діацетилу, мг/100 г	Вміст летких органічних кислот, мкекв/100 г
	МКБ	*L. diacetilactis*		
1	5,25	14	0,23	166,50
2	10,69	20,99	0,37	200,50
3	12,33	27,67	0,34	283,05
5	24,15	18,32	0,42	316,35
5а	25,76	44,44	0,52	383,03
7	15, 00	43,05	0,45	283,05
8	42,46	30,69	0,47	333,21
8а	24,72	12,74	0,53	249,75
10	14,86	7,14	0,5	227,77
Контроль			0,09	73,26

Як свідчать дані, представлені у табл. 1, різниця у чисельності клітин *L. diacetilactis* у сквашених вершках, в залежності від складу заквасок коливалась у межах 13,6%, а показників загальної чисельності - менше 6%, що можна пояснити кращою пристосованістю використаних штамів кислотоутворювальних лактококів до розвитку у вершках за обраних температур, ніж *L. diacetilactis.*

Встановлено, що найвищий рівень діацетилу (0,45-0,53 мг/100 г) продукують за обраних умов бактеріальні композиції №№ 7, 8, 5а та 8а, хоча частка ароматоутворювальних лактококів при заквашуванні ними становила 33 %. Найактивнішою щодо утворення летких органічних кислот виявилася композиція №8, яка продукувала їх близько 333,21 мкекв/100 г. Проте остаточним критерієм оцінки перспективності використання досліджуваних бактеріальних композицій для виготовлення КВМ слугували органолептичні якості сквашених ними вершків. Крім варіантів №5, 5а, 8, 8а та 10, які мали характерний смак і аромат КВМ, усі інші композиції надавали вершкам типового сметанного присмаку. В результаті за комплексом мікробіологічних, біохімічних та органолептичних характеристик до подальших досліджень залучено бактеріальні композиції №5а та 8, до складу яких входять штами *L. lactis* 1160,1161 і 1162, *L.cremoris* 1232 та *L. diacetilactis* 1353.

Важливим моментом будь-якої біотехнології є спосіб підготування посівного матеріалу, зокрема визначення оптимальної температури вирощування кожного штаму, який входить до складу заквасок, щоб забезпечити максимальну кількість клітин при заквашуванні сировини. З використанням 5% інокуляту досліджували упродовж 24 год. вирощування активність росту заквашувальних культур, залучених до композицій 5а та 8, у стерильному знежиреному молоці за різних температур.

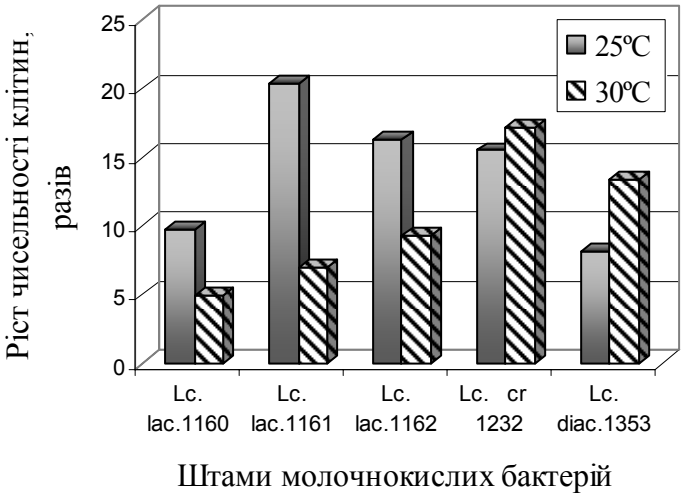

Рис. 1. Вплив температури вирощування на ріст складових заквашувальних композицій для кисловершкового масла

З представлених на рис. 1 результатів видно, що 3 кислотоутворювальні штами *L. lactis* краще ростуть при 25 ^{0}С, що й підтверджує їхню ліпшу стійкість до температурних режимів виготовлення КВМ. А *L.cremoris* 1232 та *L. diacetilactis* 1353 слід нарощувати за температури 30 ^{0}С, бо при зниженні температури культивування вони нагромаджують у 1,1 та 1,6 раза менше клітин, відповідно.

Оскільки усі складові обох заквасок є диплококами з діаметром клітин від 3 до 6 unit (встановлено за збільшення у 1000 разів у світловому мікроскопі) і довжиною ланцюжків 17-32 unit, а у агарі із гідролізованим молоком утворюють однотипові, подібні до човників, колонії довжиною 1,5-2,5 мм, контролювати наявність їх у виготовленому кисловершковому маслі або у сухих бактеріальних концентратах за морфологією або культуральними властивостями за винятком *L. diacetilactis*, який вирощують на селективному середовищі, неможливо. Тому необхідним було проведення досліджень, які б довели сумісність штамів за спільного вирощування у різних поживних середовищах. Співіснування складових бактеріальних композицій № 5а та 8 визначали за активністю продукування ними молочної кислоти у пастеризованому молоці та вершках як у монокультурі, так і попарних сполученнях за рівного співвідношення між штамами, дотримуючи тривалість вирощування і температурні умови, які передбачені літньою технологією виготовлення КВМ (табл. 2).

Таблиця 2

Кількість утвореної молочної кислоти складовими заквасок № 5а та 8 за вирощування у різних молочних основах, %

Штами і сполучення	Ріст у пастеризованому знежиреному молоці			Ріст у пастеризованих вершках		
	за 21^{0}С	за 13^{0}С	за 8^{0}С	за 21^{0}С	за 13^{0}С	за 8^{0}С
монокультури						
L.lactis 1160	0,41	0,50	0,56	0,32	0,36	0,45
L.lactis 1161	0,56	0,63	0,72	0,32	0,45	0,49
L.lactis 1162	0,40	0,49	0,52	0,34	0,44	0,50
L.cremoris 1232	0,39	0,62	0,63	0,32	0,36	0,52
L. dl. 1353	0,45	0,59	0,63	0,27	0,50	0,56
сполучення						
1160 + 1353	0,54	0,68	0,68	0,39	0,51	0,59
1161 + 1353	0,47	0,68	0,70	0,42	0,56	0,57
1162 + 1353	0,43	0,56	0,56	0,41	0,52	0,56
1232 + 1353	0,38	0,50	0,56	0,36	0,50	0,54
1232 + 1160	0,39	0,59	0,65	0,40	0,45	0,50
1161 + 1162	0,45	0,62	0,70	0,36	0,46	0,52

Як свідчать представлені у табл. 2 дані, як монокультури - компоненти досліджуваних заквасок, так і їх попарні сполучення активніше нагромаджують молочну кислоту у знежиреному пастеризованому молоці, ніж у пастеризованих вершках, причому на кінець вирощування штамова специфічність щодо кислотоутворення різкіше виявлялась саме у молоці. Різниця між кількістю молочної кислоти, нагромадженої активними і слабкими кислотоутворювачами становила 28,6%, а у вершках зменшувалась до 24,4%. У сполученнях ці коливання складали 25 і 18%, відповідно. Слід також відмітити, що за цим показником вдалими є поєднання більшості досліджених штамів (крім сполучення *L. lactis* 1162 та *L.cremoris* 1232 із *L. diacetilactis* 1353), в яких

вони або стимулюють біохімічну активність один одного, або вона знаходиться на рівні активнішого кислотоутворювача.

Для якісного підготування посівного матеріалу велике значення має не тільки температура культивування складових заквашувальних культур, а й вибір адекватного їхнім ростовим потребам поживного середовища, у зв'язку з чим розглядалась доцільність вирощування інокуляту у вершках на підставі біохімічної активності бактеріальних композицій в процесі ферментування пастеризованого знежиреного молока та вершків за температури 25 °С, максимально наближеної до початкової при визріванні вершків. Кількість посівного матеріалу у цьому досліді становила 3%. Результати представлено на рис. 2.

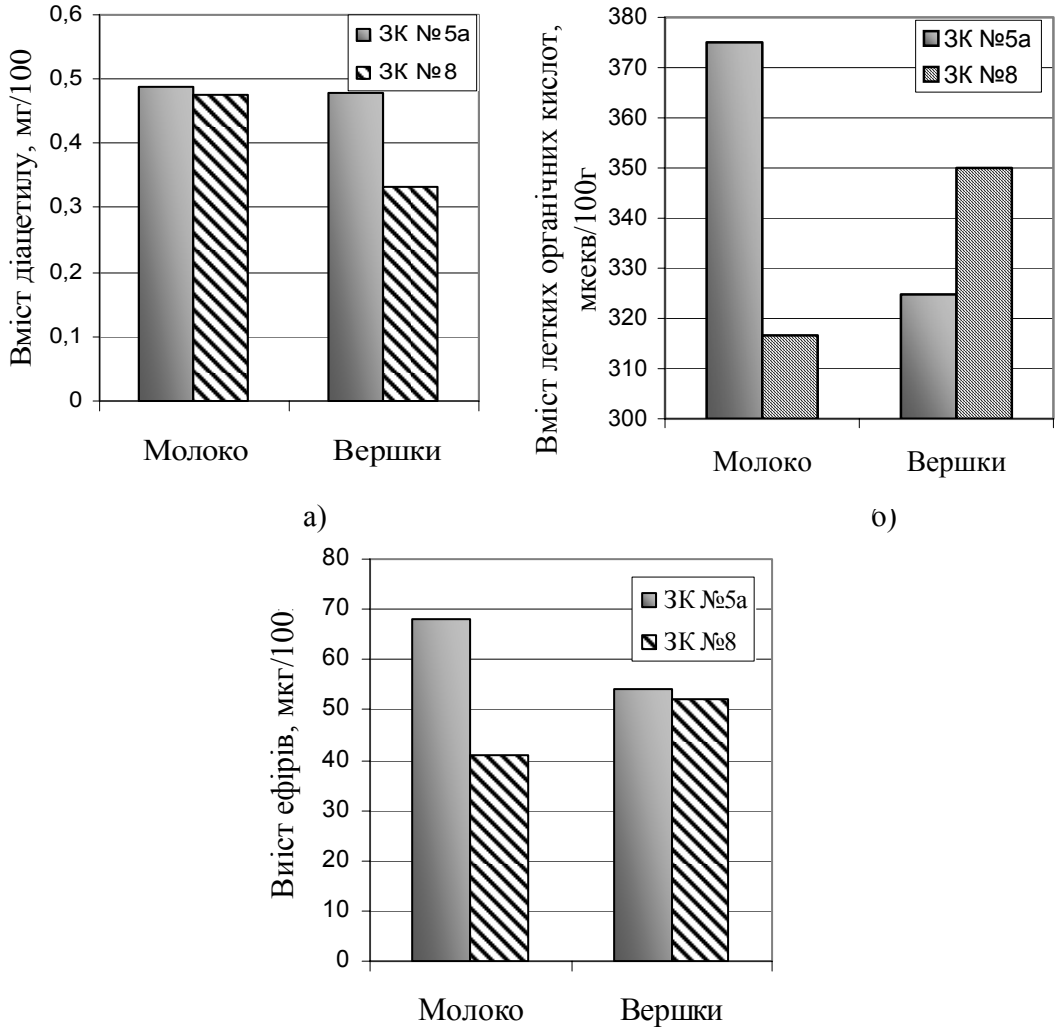

Рис. 2. Вплив складу поживного середовища на синтез закваскамидля КВМ: а) діацетилу, б) летких органічних кислот, в) ефірів

Представлені на рис. 2 результати біохімічних досліджень свідчать про специфічний відгук різних бактеріальних композицій на склад ферментованої ними сировини. Так, нагромадження діацетилу закваскою №5а не залежало від складу використаного поживного середовища, а от кількість синтезованих ефірів і особливо летких органічних кислот у вершках була помітно нижчою, ніж у знежиреному молоці. Функціонування у цих умовах бактеріальної композиції №8 являє собою повну протилежність, оскільки кількість летких кислот і ефірів у сквашених нею вершках збільшувалась у 1,1 і 1,3 разів, відповідно, але продукування діацетилу уповільнювалось. Загалом ці дані слід розцінювати як оптимістичний прогноз стосовно смако-ароматичних характеристик масла, виробленого за участю даних бактеріальних композицій.

Важливим аргументом на користь використання знежиреного молока для приготування інокуляту є також визначена у цьому експерименті молокозсідальна активність заквашувальних композицій в межах 10 год. та вища ростова активність в ньому. У закваскаx №5а та №8, виготовлених у знежиреному молоці, загальна чисельність клітин молочнокислих бактерій була відповідно у 22 та 10 разів більшою, а кількість клітин *L. diacetilactis* 1353 перевищувала їх чисельність у сквашених вершках у 5,5 та 1,8 раза.

Інтенсивніший розвиток у знежиреному молоці молочнокислої мікрофлори обумовлений вдалим співвідношенням в ньому поживних речовин. Висока масова частка жиру у вершках, обмежений вміст білків, азотистих сполук, вуглеводної фракції та стимуляторів росту робить їх менш сприятливим середовищем для росту, розвитку та життєдіяльності молочнокислої мікрофлори. Отож, можна вважати доведеною доцільність нарощування посівного матеріалу для виробництва заквашувальних культур для кисловершкового масла у знежиреному молоці.

Додатковим доказом перспективності сконструйованих бактеріальних композицій може стати активний розвиток цих заквасок за температурних режимів дозрівання вершків, визначених технологією кисловершкового масла (табл. 3).

Таблиця 3.

Розвиток заквашувальних мікроорганізмів в процесі сквашування вершків за літньою технологією виготовлення масла

БК	Чисельність, lg КУО/см^3	Поч. титр	Ріст чисельності клітин відносно початкового титру, разів			Зміни чисельності клітин при 8°С/13°С, разів
			21°С	13°С	8°С	
5а	загальна	6,74	6,46	6,46	1,95	< 3,31
	L. dl.	6,23	4,68	24,55	8,32	< 2,95
8	загальна	6,58	2,09	14,79	37,15	> 2,51
	L. dl.	6,26	3,55	15,49	20,42	> 1,31

Наведені у табл. 3 дані свідчать, що і кислото-, і ароматутворювальні штами лактококів, що входять до складу бактеріальної композиції № 8 ліпше

витримують різкі зміни температури культивування, оскільки навіть на кінець процесу сквашування вершків чисельність клітин, хоча і не дуже, але продовжувала зростати. Заквашувальна композиція, №5а, хоча і втрачала деяку кількість клітин на останній фазі визрівання вершків, проте її потенціал щодо синтезу діацетилу та ефірів вищий, ніж у закваски №8.

Таким чином, за сукупністю мікробіологічних та біохімічних показників найліпшими варіантами визнано заквашувальні композиції №5а та №8. Проведене дегустування зразків кисловершкового масла, вироблених з їхнім використанням, підтвердило високі органолептичні якості готового продукту. Відібрані композиції можна розглядати як ротаційні варіанти і на їх основі опрацьовувати технології бактеріальних препаратів прямого внесення для виробництва кисловершкового масла.

Висновки.

1. Відібрано до складу бактеріальних композицій для виготовлення кисловершкового масла 13 штамів *L. lactis, L. cremoris* та *L. diacetilactis* за критеріями фагостійкості, здатності до активного росту у знежиреному молоці і вершках за температури, нижчої за оптимальну, та відсутності ліполітичної активності.

2. Створено 9 трикомпонентних бактеріальних композицій та досліджено активність їх розвитку у вершках за різних температурних режимів сквашування, інтенсивність продукування ними ароматичних сполук та органолептичні характеристики вироблених зразків масла і визнано за комплексом одержаних даних кращими варіантами заквасок для КВМ бактеріальні композиції № 5а та 8.

3. Встановлено, що нарощування посівного матеріалу для нагромадження біомаси розроблюваних заквашувальних культур № 5а та № 8 слід проводити за таких режимів: температура культивування для штамів *L. lactis* – 25 ^{o}C, *L. cremoris* та *L. diacetilactis* – 30 ^{o}C; як поживне середовище для усіх складових композицій використовувати стерильне знежирене молоко.

4. Доведено за критеріями ростової та кислотоутворювальної активностей заквашувальних композицій № 5а та 8 відсутність взаємного пригнічення між їхніми складовими за спільного вирощування у пастеризованому молоці та вершках.

Література

1.Вышемирский Ф. А., Топникова Е. В., Павлова Т.А., Перфильев Г. Д., Матевосян Л. С. Исследования технологии кислосливочного масла // Сыроделие и маслоделие. – 2008. – №5. – С.45-46.

2. Mallia S., Escher F., Schlichtherle-Cerny H. Aroma-active compounds of butter: a review // European Food Research and Technology – 2008. – Vol. 226. – P. 315–325.

3.Macciola V., Candella G., Leonardis A.. Rapid gas-chromatographic method for the determination of diacetyl in milk, fermented milk and butter // Food control – 2008. – Vol. 19, № 9. – P. 873 – 878.

4. Samarzija D., Lukac Havranek J., Antunac N., Sikora S. Characteristics and Role of Mesophilic Lactic Cultures D. // Characteristics and Role of Mesophilic

Lactic Cultures Agriculturae Conspectus Scientificus – 2001. – Vol. 6, №2 – 2001. – P. 113-120

5. Уманский М.С., Боровкова Ю. А. Липолитическая активность молочнокислых и пропионовокислых бактерий // Молочная промышленность. – 1998. – №4. – С. 20-23.

6. Инихов Г.С., Брио Н.П. Методы анализа молока и молочных продуктов. – М.:»Пищев.пром.». – 1971. – С.132-133.

Summary

Selected, identified and investigated properties of mezofillic lactic acid bacteria and it is created starter composition on their basis, investigated activity of their development in fat free milk and creams at different temperature conditions which are used in the sour-cream butter making. Defined temperature for cultivation of inoculation for the starter compositions. Confirmed that the created starter compositions is capable for the active synthesis of taste and aromatic compounds.

Стаття надійшла до редакції 16.05.2011