Доклады Академии наук СССР
1955. Том 103, № 1

МИКРОБИОЛОГИЯ

М. В. ФЕДОРОВ и Л. А. КРУГЛОВА

К ВОПРОСУ О ХИМИЗМЕ ОБРАЗОВАНИЯ АЦЕТИЛМЕТИЛКАРБИНОЛА И ДИАЦЕТИЛА В КУЛЬТУРАХ ТИПИЧНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 1 IV 1955)

Химизм образования ароматических веществ в культурах типичных молочнокислых бактерий представляет научный интерес и имеет практическое значение, так как эти вещества определяют вкусовые качества кисломолочных продуктов. Среди этих веществ особый интерес представляет диацетил ($CH_3COCOCH_3$), который совместно с ацетилметилкарбинолом ($CH_3CHOHCOCH_3$) и эфирами придает простокваше особый аромат, повышающий ее вкусовые качества. Однако путь образования этих соединений до настоящего времени остается еще недостаточно ясным. Одни исследователи считают, что диацетил может образоваться в результате расщепления лактозы ([2]), другие исходят из предположения, что он образуется из лимонной кислоты ([1, 3] и др.), а третьи держатся мнения, что для образования этого продукта нужны как лактоза, так и лимонная кислота ([4–6] и др.).

Путь образования обоих соединений из лимонной кислоты рядом исследователей трактуется следующим образом:

1. CH_2COOH
   $C(OH)COOH \xrightarrow{-CO_2} CH_3COOH + CH_3COCOOH.$
   CH_2COOH
2. $CH_3COCOOH \rightarrow CH_3CHO + CO_2.$
3. $CH_3CHO + CH_3CHO \longrightarrow CH_3CHOHCOCH_3.$
4. $CH_3CHOHCOCH_3 \xrightarrow[+1/2O_2]{-2H} CH_3COCOCH_3 + H_2O.$

Однако последняя реакция мало вероятна, так как молекулярный кислород не используется этими бактериями. Гораздо вероятнее другой путь — путь мобилизации водорода, который может передаваться не молекулярному кислороду, а другим акцепторам водорода с менее высоким окислительным потенциалом. Участие же в этих процессах молекулярного кислорода или сильно затруднено или же вовсе исключено вследствие отсутствия в клетках молочнокислых бактерий ферментных систем, способных реагировать с этим акцептором. Указанный путь образования диацетила можно было бы представить следующим образом:

1. $CH_3C(=O)H + H-C(=O)-CH_3 \xrightarrow{-2H} CH_3COCOCH_3.$
2. $CH_3COCOOH + CH_3COCOOH \xrightarrow{-2CO_2;\ -2H} CH_3COCOCH_3.$

Нам этот путь представляется более вероятным не только по характеру окислительно-восстановительных условий в культурах молочных бактерий, но и потому, что Петте ([3]) показано отсутствие окислительных превращений ацетилметилкарбинола за счет использования молекулярного кислорода в культурах молочнокислых бактерий, вызывающих типичное молочнокислое брожение.

Из изложенного следует, что точных данных о путях образования диацетила в культурах молочнокислых бактерий нет, и решение вопроса требует новых экспериментальных исследований. Некоторые данные по этому вопросу были получены в ходе наших исследований и приводятся ниже.

Таблица 1

Влияние молочного сахара на продукцию диацетила и ацетилметилкарбинола Strept. diacetilactis (средние данные из двух параллельных опытов)

Лактоза в %	Начальн. кислотн.		Конечн. кислотн.		Диацетил + + ацетилметилкарбинол в мг/л
	в °Т	pH	в °Т	pH	
1	28	6,0	70	4,5	0,0
2	28	6,0	70	4,5	0,0

В наших опытах использовались культуры типичных молочнокислых бактерий типа Stept. diacetilactis (штаммы №№ 3 и 6). Для выяснения характера исходных продуктов, служащих материалом для образования диацетила и ацетилметилкарбинола, нами были поставлены опыты на питательной среде, состоящей из мясного бульона, к которому добавлялись 0,5% пептона и 1% (по объему) дрожжевого автолизата. В качестве энергетического материала в эту среду добавлялся или молочный сахар (1—2%) или же натриевая соль лимонной кислоты (в количестве) (0,3—1,45%, что соответствует 0,001—0,05 моля). Исходная кислотность в среде устанавливалась в пределах pH 6,5. Опыт ставился в колбах объемом 300—400 мл, в которых содержалось по 200 мл питательной среды. После стерилизации среда заражалась 1 мл двухдневной культуры соответствующих молочнокислых бактерий, выращенных на обезжиренном молоке, и выдерживалась в термостате при 30° в течение 24 часов. По окончании опыта она анализировалась.

Первый опыт был поставлен со Strept. diacetilactis № 6 и преследовал цель установить, может ли молочный сахар служить материалом для образования диацетила и ацетилметилкарбинола. В этом опыте к вышеуказанной питательной среде добавлялось 1 и 2% молочного сахара. Результаты приводятся в табл. 1.

Таблица 2

Влияние лимонной кислоты на продукцию диацетила и ацетилметилкарбинола Strept. diacetilactis (средние данные из двух параллельных опытов)

Лимон. к-та в мол.	Начальн. кислотн.		Конечная кислотн.		Диацетил + + ацетилметилкарбинол в мг/л
	в °Т	pH	в °Т	pH	
0,001	28	6,5	36	6,5	Следы
0,01	28	6,5	33	6,5	56,4
0,05	28	6,5	34	6,5	26,4

Несмотря на то, что культура Strept. diacetilactis № 6 хорошо развивалась в этой питательной среде и подкислила ее за счет накопления молочной кислоты до pH 4,5, ни диацетил, ни ацетилметилкарбинол в среде не были обнаружены. Повидимому, в ходе типичного молочнокислого брожения эти соединения не могут образоваться за счет расщепления молочного сахара. Поэтому следующие опыты с той же культурой молочнокислой бактерии были поставлены с добавлением в питательную среду не молочного сахара, а солей лимонной кислоты в концентрации от 0,001 до 0,05 *М*. Остальные условия культуры оставались теми же. Результаты этого опыта приводятся в табл. 2.

Из этих данных следует, что Strept. diacetilactis без наличия в среде лактозы хотя и развивается значительно хуже, но, используя лимонную

кислоту, все же дает значительное накопление в среде диацетила и ацетилметилкарбинола. Видимо, лимонная кислота, подвергаясь превращениям в культурах данного микроорганизма, может служить материалом для образования диацетила и ацетилметилкарбинола, придающих совместно с различными эфирами соответствующий аромат кисломолочным продуктам. Оптимальная концентрация лимоннокислой соли, благоприятствующая наиболее усиленной продукции диацетила, лежит между 0,01—0,03 *М*, что соответствует примерно 0,6—0,8% данного соединения в среде.

В следующем опыте было испытано влияние совместного внесения в среду лимоннокислого натрия и лактозы, поскольку в молоке обычно встречаются оба эти соединения вместе. Опыт ставился с тем же микроорганизмом и при тех же условиях; результаты его приводятся в табл. 3.

Таблица 3

Образование диацетила и ацетилметилкарбинола Strept. diacetilactis при развитии на среде, содержащей лактозу и лимонную кислоту (средние данные из двух параллельных опытов)

Лактоза в %	Лимон. к-та в мол.	Начальн. кислотн.		Конечн. кислотн.		Найдено диацетил + ацетоин в мг/л	Число клеток бактерии в млн.
		в °*T*	pH	в °*T*	pH		
0,0	0,05	28	6,5	32	6,5	145,2	63
0,0	0,04	28	6,5	31	6,5	163,2	62
0,0	0,03	28	6,5	30	6,5	183,0	88
0,0	0,02	28	6,5	32	6,5	189,0	128
0,0	0,01	28	6,5	30	6,5	112,8	45
1,0	0,01	28	6,5	56	5,5	19,2	286
1,0	0,0	28	6,5	54	5,5	0,0	161
0,0	0,0	28	6,5	44	6,5	0,0	31

В этом опыте параллельно с определением в среде количества диацетила + ацетилметилкарбинола производился и счет выросших клеток молочнокислого микроба в камере Тома.

Приведенные в таблице цифры показывают, что максимальная продукция диацетила + ацетилметилкарбинола обнаруживается в тех вариантах опыта с добавлением в среду лимонной кислоты, где наблюдается максимальный рост клеток молочнокислой бактерии. Очевидно, между ростом клеток и продукцией этих соединений имеется зависимость, указывающая на то, что они образуются в ходе расщепления лимонной кислоты. Однако при добавлении в среду лактозы вместе с лимонной кислотой образование диацетила резко снижается, хотя рост числа клеток бактерии сильно возрастает. Повидимому, при параллельном использовании лактозы и лимонной кислоты диацетил и ацетилметилкарбинол не могут образоваться в значительных количествах вследствие дальнейших превращений тех предшественников данных соединений, которые образуются на промежуточных этапах разложения лимонной кислоты. Так как в ходе молочнокислого брожения лактозы происходит энергичная мобилизация водорода, то вероятнее всего, что предшественники диацетила, а может быть и сам диацетил, служат акцепторами водорода и восстанавливаются в какие-то другие продукты, не учитываемые нашими анализами. Вследствие этого продукция диацетила в среде с лимонной кислотой и с лактозой сильно падает. При наличии же в среде только одной лактозы или же в среде без лактозы и лимонной кислоты образование диацетила вовсе не имеет места. Из этого опыта следует, что поскольку в присутствии лимонной кислоты наблюдается более сильный рост числа клеток молочнокислой бактерии, чем на одном мясопептонном бульоне, лимонная кислота действительно служит энергетическим материалом для данной бактерии. Очевидно, в клетках типичных молочнокислых бактерий, наряду с ферментными системами, участвующими в сбраживании углеводов, имеются и ферментные системы, расщепляющие лимонную кислоту. К таким ферментным системам следует отнести специфические дегидразы, отщепляю-

щие водород от пировиноградной кислоты или же уксусного альдегида при образовании из них диацетила.

Параллельное изучение других культур молочнокислых бактерий, используемых при производстве кисломолочных продуктов (Strept. diacetilactis №№ 3, 704, 13 dl), показало, что в среде, содержащей лимонную кислоту, они также образуют диацетил и ацетилметилкарбинол, хотя и с меньшей интенсивностью. При этом выявилась еще одна любопытная особенность. Те культуры молочных бактерий, которые менее интенсивно образуют диацетил + ацетилметилкарбинол, в большем количестве накапливают летучие кислоты. Видимо, между продукцией летучих кислот и диацетила также имеется зависимость. Вероятно, в этих культурах пировиноградная кислота подвергается окислительному декарбоксилированию и переходит в уксусную кислоту. Зависимость между продукцией диацетила и летучих кислот легко выясняется из данных табл. 4.

Таблица 4

Продукция диацетила и летучих кислот разными культурами молочнокислых бактерий при наличии в среде лимоннокислого натрия

Культуры молочнокислых бактерий	Мясопептонный бульон + 0,02 моля лимонной к-ты			Молоко		
	кислотность в °Т	летуч. кислоты в мл 0,1 н NaOH	диацетил + ацетоин в мг/л	кислотность в °Т	летуч. кислоты в мл 0,1 н. NaOH	диацетил + ацетоин в мг/л
Strept. diacetilactis № 3	30	22	24,6	112	24	54
№ 6	30	24	57,6	110	24	107,4
№ 704	26	32	следы	110	20	66
№ 13 dl	35	51	21	72	20	150,5

В этом случае была обнаружена значительная продукция диацетила + ацетилметилкарбинола в культурах на молоке, связанная, видимо, с тем, что в молоке содержалось значительное количество солей лимонной кислоты (0,2%), которые и служили источником для их образования. Так как наибольшая продукция этих соединений наблюдается, по нашим данным, при 0,6—0,8% лимонной кислоты в среде, то напрашивается вывод, что при приготовлении простокваши из молока с более высоким содержанием лимонной кислоты будет получаться и более высококачественная простокваша. Если же для ее приготовления берется молоко с низким содержанием лимонной кислоты, то обогащение его этим веществом путем искусственного внесения, вероятно, будет способствовать и получению более высококачественной простокваши. Помимо этого, при оценке молока в качестве сырья для получения высококачественных кисломолочных продуктов, наряду с определением в нем содержания белка, жира и углеводов, следует определять и содержание лимонной кислоты.

Из приведенных нами экспериментальных данных следует, что образование диацетила и ацетилметилкарбинола следует связывать с превращениями лимонной кислоты, а не лактозы. Путь же их образования, видимо, связан с расщеплением лимонной кислоты на уксусную и пировиноградную кислоту, которая или непосредственно или через предварительное образование уксусного альдегида подвергается дегидрированию и переходит в диацетил. Часть образующегося таким путем диацетила, вероятно, восстанавливается активным водородом до ацетилметилкарбинола. Поэтому оба эти продукта постоянно и сопровождают друг друга в кисломолочных продуктах.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
19 II 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Я. С. Зайковский, Химия и физика молока и молочных продуктов, М., 1950. [2] I. Krenn, D. Valik, Материалы XII международн. конгресса работн. молочн. дела, 1, ИЛ, 1951. [3] I. Pette, там же. [4] G. Tomka, там же. [5] M. Michaelian, B. Hammer, Iowa Agr. Exp. Stat. Res. Bull., 205 (1936); 179 (1936).