

Влияние на стартерна култура от млечнокисели бактерии и бифидобактерии върху аминокиселинния състав и остатъчното съдържание на нитрити във варено-пушени колбаси

Диана Инджелиева

Influence of starter culture of lactic acid bacteria and bifidobacteria on amino acid composition and the residual content of nitrites in boiled-smoked sausages: This article reviews the effects of starter cultures with lactic acid bacteria and bifidobacteria as a factor for increasing quality and intensification of production processes in durable boiled - smoked sausages, type of Burgas. The content of amino acid and residual nitrites was determined. The obtained results show that the starter cultures help to increase the content of free amino acids and enhance the taste and flavor of the sausage pieces. The usage of bifidobacteria in the manufacture of boiled -smoked sausages ensures efficient use of the nitrite in reactions with the formation of nitrozopigment. This allows the amount of the added nitrite to be decreased.

Key words: meat products, starter cultures, lactic acid bacteria, bifidobacteria

ВЪВЕДЕНИЕ

Едно от перспективните направления при производството на месни продукти е използването на микроорганизми, внесени под формата на стартерни култури. Те, посредством ензими образуват вещества, които подобряват качествените показатели на месните продукти [2,3,5]. При производството на колбаси важна роля играят биохимичните и микробиологичните процеси, протичащи в периода на тяхното приготвяне. Ходът на тези процеси зависи от развитието на полезните бактерии в пълнежната маса. В настоящия момент е натрупан достатъчно материал, относно използването на млечнокиселите бактерии от *Lactobacillus plantarum* в производството на колбаси и тяхната положителна роля върху протичането на биохимичните процеси [8,13,14]. Относително малко са данните от проучване на развитието на бифидобактериите в колбасната маса [10]. Поради това, изследването на ефекта от използване на бифидобактерии в производството на колбаси представлява определен интерес.

Един от критериите при избор на микроорганизми за стартерни култури е те да притежават умерена протеолитична и липолитична активност. Това води до образуването на свободни аминокиселини, летливи мастни киселини, карбонилни съединения и други вещества, които обуславят вкусовете и ароматични свойства на месните продукти.

Млечнокиселите бактерии имат слабо протеолитично действие върху миофибралните протеини [11]. Обаче някои щамове като *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei* активно допринасят за хидролизата на саркоплазматичните протеини [6,7,12] и за последващото разпадане на пептиди до аминокиселини. Известна пептидазна активност е забелязана при *L. sakei*, *L. curvatus* и *L. plantarum*, изолирани от колбаси [6,7]. Освен това, някои щамове на *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* притежават левцин и валин аминокептидази, които допринасят за катаболизма на протеини и пептиди, генериращи свободни аминокиселини – прекурсори на вкусовете съставки на крайния продукт [1,9].

Целта на настоящата работа е да се изследва влиянието на стартерни култури от млечнокисели бактерии и бифидобактерии върху аминокиселинния състав и остатъчното съдържание на нитрити във варено-пушени трайни колбаси.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В експерименталната работа са използвани чисти култури *Lactobacillus plantarum* (L_6) и *Bifidobacterium longum* (B_2). Щамовете са предоставени от частна лицензирана лаборатория за анализ и контрол на храни – Бургас. На основата на

предходни изследвания се установи, че двата щама отговарят на необходимите критерии за използването им като стартерни култури самостоятелно, а също и като комбинирана закваска.

В настоящото проучване използвахме два типа стартерни култури: монокултура *B. longum* (B_2) и комбинирана култура със съотношение *B. longum* (B_2) : *L. plantarum* (L_6) - 2:1. Активирането на сухия бактериален препарат се извършва в обезмаслено и стерилизирано при 121°C за 13 минути мляко, което се охлажда до 37°C. Закваската се внася в количество 0,1g на 1l. Заквасеното мляко се оставя в термостат при 37°C до достигане на киселинност 60-65°Т и уплътняване. Сместа се охлажда до 5°C.

За изследване влиянието на стартерните култури върху протичането на технологичния процес произведохме 10 kg моделен продукт на варено-пушен траен колбас „Бургас“. Суровините за 100 kg са: говеждо месо едносортно 20, телешко месо едносортно 20, свинско нетлъсто месо 10, свинско полутлъсто месо 50, готварска сол 2,000, натриев нитрит 0,010, аскорбинова киселина 0,050, натриев триполифосфат 0,100. За разлика от традиционната технология, според която месото от ЕПЖ се смела на волфмашина и заедно с осоляващите материали се оставя да зрее 2 - 3 дни при 2 – 3°C, в моделния продукт това се осъществява за 6 часа в процеса на подсушаване под влияние на стартерната култура. Говеждото и телешко едносортно месо се кутират по установената технология за получаване на прат за трайни варено-пушени колбаси. След това се прибавят осоляващите материали, свинското нетлъсто и полутлъсто месо до нарязването им с големина на частиците 4 mm. Накрая се добавя стартерната култура в количество 5 % от пълнежната маса и с концентрация 10 log (cfu / ml). Приготвя се и контролна проба без закваска. Готовата пълнежна маса се пълни на хидравлична машина плътно, без да се допускат въздушни празнини. След това колбасите се отцеждат и подсушават при 22° C за 6 часа и се подлагат на стандартна термична обработка, включваща обжарване, варене, опушване. Сушенето се провежда при 15 – 20°C и относителна влажност на въздуха 75-80% до понижаване на водното съдържание според изискванията на стандартите.

За определяне съдържанието свободните аминокиселини използвахме метода на Venson [4]. Около 10g от обезмаслената проба екстрахирахме с 80% C_2H_5OH при температура 4°C за 24h. Така полученият екстракт филтрувахме и филтратът изпарявахме до сухо с ротационен вакуумизпарител при температура на водна баня 40°C. Полученият сух остатък разтваряме с 50cm³ дестилирана вода и пропускахме през колона с йонообменна смола. Свободните аминокиселини се задържат от катионната форма на синтетичната смола Dawex 50x8 (100-200 mesh). Същите елюирахме от смолата с 2N NH_4OH . Полученият елюент изпарявахме до сухо с ротационен вакуумизпарител при температура на водна баня 40°C. Полученият сух остатък разтваряме в 0,125N HCl и анализирахме с помощта на аминокиселинатор тип AAA-881 (Mikrotechna, Praha) при дължина на голямата колона 60 cm, на малката - 5 cm с натриево-цитратен буфер с pH = 3,25; 4,25 и 5,28. От получените аминокрафи изчислявахме количеството на отделните аминокиселини в mg/100g сухо вещество.

За определяне съдържанието на остатъчни нитрити в готовия продукт използвахме течния хроматографски метод на Wootton et al. [15] при следните условия на течна хроматография: течен хроматограф „Серия 4“ –Perkin Elmer, USA ; колона – PE Analytical (C_{18}), дължина 25cm, Ø - 4,6mm, подвижна фаза 0,02M разтвор на K_2HPO_4 (pH = 3,2) с H_3PO_4 ; скорост 1cm³/min; детектор – спектрофотометричен $\lambda=214$ nm.

Данните за хемовите пигменти при производството на моделния колбас получихме въз основа на определяне общото количество пигменти и съдържанието на нитрозомиоглобин. Методът за определяне на общото количество пигменти се

основава на екстрахиране на пигменти от месни продукти с воден разтвор на ацетон и последващо измерване на оптичната плътност на екстракта [2]. За определяне устойчивостта на оцветяването приложихме метод, основан на измерване на оптичната плътност на екстракт от нитрозопигмент до и след излагане на продукта на светлина [2].

Статистическата обработка на получените данни е извършена чрез софтуерен продукт STATPLUS 2009.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Промяна в съдържанието на свободни аминокиселини в пълнежната маса в процеса на подсушаване

Данните от проучването за съдържанието на аминокиселини в пълнежната маса в процеса на подсушаване са представени в таблица 1. Те показват нарастване на количеството им във всички образци, като значителен ръст се наблюдава в опитните проби. В пробите с комбинирана стартерна култура увеличаването на общото съдържание на свободни аминокиселини възлиза на 29% от изходното съдържание (след добавяне на закваската), с *B. longum* (*B*₂) – 23%, а в контролата – едва 11%. В количествено отношение преобладават аминокиселините лизин, хистидин, глутаминова киселина, аланин.

Таблица 1. Динамика на изменението на свободни аминокиселини в процеса на подсушаване, (n=6)

Аминокиселини	Съдържание на аминокиселини в колбаса, mg%					
	След добавяне на стартерна култура			След подсушаване 6 h		
	Контр.	<i>B. longum</i>	<i>L. plantarum</i> <i>B. longum</i>	Контр.	<i>B. longum</i>	<i>L. plantarum</i> <i>B. longum</i>
Лизин	18,71±0,02	11,52±0,05	12,01±0,08	8,93±0,02	15,89±0,04	17,59±0,07
Хистидин	12,14±0,12	12,24±0,06	12,76±0,13	12,89±0,13	12,32±0,63	13,63±0,16
Аргинин	следи	0,46±0,13	0,61±0,67	следи	0,69±0,06	0,76±0,28
Аспарагинова	1,01±0,31	1,01±0,9	1,02±0,08	1,93±0,05	1,00±0,12	1,11±0,07
Треонин	9,61±0,05	9,63±0,65	10,13±0,43	10,15±0,31	9,63±0,42	10,13±0,14
Серин	3,82±0,25	3,84±0,09	4,05±0,17	3,89±0,48	3,84±0,54	4,05±0,09
Глутаминова	8,42±0,72	12,17±0,22	12,86±0,82	8,41±0,83	15,96±0,31	18,99±0,27
Пролин	2,42±0,44	2,92±0,71	3,24±0,55	2,83±0,08	3,26±0,24	3,25±0,6
Глицин	4,13±0,08	5,26±0,05	5,26±0,06	5,87±0,25	5,80±0,60	5,82±0,21
Аланин	11,92±0,27	12,11±0,43	12,20±0,23	11,91±0,23	13,23±0,22	13,36±0,7
Цистин	3,83±0,09	3,04±0,22	3,35±0,64	2,93±0,61	3,46±0,09	3,52±0,06
Валин	8,21±0,31	8,69±0,09	9,07±0,35	10,39±0,87	13,95±0,44	15,75±0,43
Метионин	1,93±0,08	2,84±0,56	2,84±0,72	3,22±0,73	5,77±0,71	6,89±0,89
Изолевцин	3,74±0,35	3,74±0,81	3,84±0,09	5,57±0,36	3,94±0,15	4,07±0,69
Левцин	4,52±0,06	4,82±0,41	4,83±0,27	4,73±0,48	6,79±0,23	7,76±0,45
Тирозин	следи	0,21±0,09	0,22±0,06	следи	0,94±0,07	0,98±0,08
Фенилаланин	2,42±0,13	2,52±0,52	2,64±0,08	2,60±0,09	2,86±0,11	2,95±0,11
Сума на свободните аминокиселини	85,81±0,08	97,02±0,86	101,10±0,41	95,25±0,89	119,33±0,52	130,42±0,85

Значителното повишаване на съдържанието на свободни аминокиселини в пълнежната маса със закваска, вероятно се дължи на хидролиза на белтъците под

въздействие на протеолитичните ензими на стартерните култури, а също така и от натрупването на свободни аминокиселини от жизнената дейност на тези микроорганизми. Известно е, че при култивирането на бифидобактерии се образуват свободни аминокиселини като лизин, аргинин, глутаминова киселина, валин, метионин, левцин, тирозин. Развитието на млечнокиселите *L. plantarum* също е съпроводено с образуване на значително количество свободни аминокиселини. По такъв начин използваните стартерни култури способстват за увеличаване съдържанието на свободни аминокиселини в пълнежната маса и подобряват вкуса и аромата на произведения варено-пушен колбас.

Влияние на стартерната култура върху количеството на добавен натриев нитрит, количеството на образувани нитрозопигменти и остатъчното съдържание на натриев нитрит.

Между канцерогените, замърсяващи хранителните продукти, онкологична опасност представляват N – нитрозосъединенията, които се синтезират в човешкия организъм от нитрита. Затова, понижаването на количеството нитрит, вложен в пълнежната маса за колбаси е важна задача пред специалистите в месната промишленост. В тази връзка проучихме влиянието на стартерните култури върху количеството на добавения нитрит. Розово-червеният цвят на колбасите се дължи на образуваните нитрозопигменти. Използването на нитрит при производството на колбаси има известни особености. Нитритите и азотистата киселина могат да бъдат както окислителни, така и редутори. Когато действа като окислител, азотистата киселина се превръща в NO и N, а като редутор – в NO и HNO. При излишък от азотиста киселина, азотният оксид може бързо да реагира с кислород. В този случай нитрозопигменти не се образуват, което може да е причина месото да не се оцвети вследствие излишъка на нитрит в системата.

Ефективността от използването на нитрит за цветообразуването при колбасите може да се получи чрез определяне на общото количество пигменти и съдържанието на нитрозопигмент.

Данните, получени от прочуване влиянието на стартерните култури върху образуването на нитрозопигмент и остатъчното съдържание на нитрит са представени в таблица 2.

Таблица 2. Влияние на стартерните култури върху остатъчното съдържание на натриев нитрит и образуването на нитрозопигменти, (n=6)

Проба колбас	Количество на добавения NaNO ₂ , mg%	Количество на остатъчния NaNO ₂ , mg%	Количество на нитрозопигмент, % от общия пигмент	Устойчивост на оцветяването, %
Контрола без стартерни култури	10,0	3,83	74,30	62,62
Опитна проба с <i>B. longum</i> (B ₂) и <i>L. plantarum</i> (L ₆)	10,0	3,01	79,82	82,51
	5,0	1,52	76,71	79,00
	4,0	1,29	74,90	78,17
	2,5	0,85	48,64	57,33
Опитна проба с <i>B. longum</i> (B ₂)	10,0	3,02	79,63	82,51
	5,0	1,54	76,44	78,90
	4,0	1,30	74,31	78,02
	2,5	0,88	48,60	57,34

Данните от таблица 2 показват, че най-малко количество остатъчен нитрит при наличие на устойчиво оцветяване се съдържа в колбаса с 4 mg% добавен нитрит (40% от традиционно приетата доза). Дозата от 2,5 mg% е недостатъчна за получаване на стабилно оцветяване, тъй като образувалият се нитрозопигмент е по-малко от 50% от общия пигмент. Известно е, че редуцията на нитрита и взаимодействието на получените продукти с миоглобина зависят от активната киселинност (pH) на средата, като реакциите протичат по-пълно и интензивно при ниски стойности на pH. Оптималният pH интервал за цветообразуване е 5,0 – 6,0. Както показаха проведените от нас по-рано изследвания, внесените стартерни култури, включващи бифидобактерии ускоряват понижаването на pH – стойностите. Така, след 6 часа подсушаване pH на пълнежната маса достига стойност 5,4. От това може да се направи извода, че като променят активната киселинност на месната маса в киселата област, бифидобактериите способстват за редуция на нитрита и образуване на нитрозосъединения. В същото време бързината и интензивността на образуване на нитрозопигмент зависят от количествата азотен окис, натрупващи се в месото. А това е възможно в условия на редуция. Литературните данни свидетелстват за висока редуцираща способност на бифидобактериите [10]. Тяхната ензимна система действа при отрицателен потенциал, затова при добавяне на бифидобактерии в месната маса, окислително-редукционният потенциал рязко се понижава, което създава условия за образуване на азотен окис.

Интензивността и характерът на оцветяването на колбаса се определят също и от наличието и количественото съотношение на различните форми на миоглобина. Значителното количество на MetMb пречи на образуването на нитрозо миоглобин, затова редуцията на MetMb в Mb има съществено значение. Редуцията на MetMb протича под действие на редуциращи съединения, най-ефективни от които са фосфоглицериновият алдехид и фруктозо-6-фосфат. Литературните данни показват, че бифидобактериите ферментират въглеродородите, при което като междинен продукт се образува фруктозо-6-фосфат. Така междинните метаболити от дейността на бифидобактериите, вероятно имат ролята на субстрат – донор на електрони в редуцията на MetMb в Mb.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Като обобщим получените резултати, можем да направим следните изводи:

- използваните стартерни култури способстват за увеличаване съдържанието на свободни аминокиселини в пълнежната маса и подобряват вкуса и аромата на произведения варено-пушен колбас.

- влагането на бифидобактерии при производството на варено-пушени трайни колбаси обезпечава ефективното използване на нитрита в реакции с образуване на нитрозопигмент. Това позволява да се понижи количеството на добавения нитрит до 40% (4 mg /100g месна маса) от традиционно приетото (10 mg /100g месна маса) и да се получи продукт със стабилен цвят.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Ammor S., Mayo B., Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Science, 2007, 76, 138-146.

[2] AOAC (1995): Meat and meat products. In: Cunniff P, ed. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., Washington, D. C. : AOAC International

[3] Arihara, K, Strategies for designing novel functional meat products. Meat Science, 2006, 74, 219 – 229.

[4] Benson, J. V. Jr., Gordon, M. J. and Paterson, J. A., Anal. Biochem., 1967, 18, 228.

[5] Buckenhüskes, H. J., Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12, 253-272.

[6] Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M., Oliver, G., & Toldrá, F., Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999a 65, 3540–3546.

[7] Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M., Oliver, G., & Toldrá, F., Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999b, 65, 578–584.

[8] Leroy, F., Verluuyten, J., Vuyst, L., Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106, 270 – 285.

[9] Montel, M. C., M. P. Seronine, R. Talor, and M. Hebraud., Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 837-839.

[10] Ruiz Moyanos, Martin A., Benito M.G., Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausage. *Meat Science*, 2008, 80, 715-721.

[11] Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M. C., Oliver, G., & Toldra, F., Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL 705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999a, 47, 3441–3448.

[12] Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M. C., Oliver, G., & Toldrá, F., Hydrolysis of muscle myofibrillar proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. *International Journal of Food Microbiology*, 1999b, 53, 115–125.

[13] Toldra, F., Biochemistry of fermented meat. In *Food biochemistry and food processing*, 2006, 641-658.

[14] Vuyst L.D., Falony G., Leroy F., Probiotics in fermented sausages. *Meat Science*, 2008, 80, 75-78.

[15] Wootton, M., Kok, S. H. And Buckle, K. A., Determination of nitrite and nitrate in meat and vegetable products by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, 1985, 36, 297.

За контакти:

Гл.ас.д-р Диана Инджелиева, Катедра “Организация и технология на туристическото обслужване”, Университет “Проф. д-р Ас. Златаров”- Колеж по туризъм, гр. Бургас тел: 0888624623, e-mail: dindjelieva@abv.bg

Докладът е рецензиран