

БІОТЕХНОЛОГІЯ ДЕЛІКАТЕСНИХ М'ЯСНИХ ПРОДУКТІВ ІЗ СВИНИНИ ЗІ ЗНИЖЕНИМ ВМІСТОМ ХОЛЕСТЕРИНУ

С.В. Колотвіна, Н.Г. Машенцева, *доктори технічних наук*
Московський державний університет харчових виробництв

С.Д. Мельничук, Л.В. Баль-Прилипко, *доктори технічних наук*
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Досліджено здатність стартових культур, які використовуються для ферментації м'ясних продуктів, знижувати вміст холестерину внаслідок його ферментативної деструкції. Описані результати вимірювання вмісту холестерину в готовому продукті колориметричним методом Златкіс-Зака. Обґрунтовано доцільність використання бактеріальної композиції молочнокислих мікроорганізмів для виробництва сиров'ялених продуктів із свинини.

Ключові слова: *м'ясні продукти, молочнокислі мікроорганізми, холестерин, холестеринознижувальна здатність, денітрифікуюча здатність, бактеріальна композиція, деструкція холестерину.*

Споживання харчових продуктів, що містять велику кількість жиру тваринного походження, призводить до збільшення надлишкової маси тіла та ожиріння, поширеність яких за останні 8-9 років зросла з 19 % до 23 %, збільшуючи ризик розвитку цукрового діабету, захворювань серцево-судинної системи та інших хвороб. Максимальна добова норма надходження холестерину в організм людини становить 300 мг, тільки в м'ясі і м'ясних продуктах може міститися в середньому 60-73 мг/100 г продукту. У зв'язку з

цим отримання м'ясних продуктів з пониженим вмістом холестерину є актуальним і перспективним напрямом сучасної м'ясної промисловості.

Тривалий час вважалося, що основним шляхом перетворення холестерину в організмі є його окислення у процесах енергетичного обміну до жовчних кислот, але холестерин і його похідні можуть також використовуватися в процесах пластичного обміну мікроорганізмів шлунково-кишкового тракту.

Встановлено, що в процесі метаболізму мікроорганізмів відбувається відновлення холестерину до копростанола. Одночасно при його окисненні в невеликих кількостях утворюється продукт мікробної деградації - холестенон. І відновлення, і окислювання холестерину відбуваються під впливом ферментів мікроорганізмів, а копростанол і холестенон є головними продуктами його мікробної трансформації [1].

У літературних джерелах є відомості про здатність молочнокислих мікроорганізмів, які використовуються як заквасочні культури у виробництві кисломолочних продуктів, знижувати вміст холестерину в процесі виробництва продукту [13].

На основі літературного пошуку нами була поставлена **мета дослідження** – розробити біотехнології делікатесних м'ясних продуктів із свинини із зниженим вмістом холестерину за рахунок їх ферментації стартовими культурами молочнокислих мікроорганізмів.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проводили з листопада 2010 року до вересня 2011 року в умовах науково-дослідної лабораторії сучасних методів біотехнологічної експертизи харчових продуктів, за підтримки випробувального центру «Біотест» Московського державного університету харчових продуктів (МДУХП), кафедри біохімії і молекулярної медицини факультету фундаментальної медицини МДУ ім. М.В. Ломоносова та Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК.

Вміст холестерину in vitro визначали методом Златкіс-Зака [14], заснованим на реакції холестерину з FeCl_3 у присутності концентрованої
«Наукові доповіді НУБіП» 2013-3 (39) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2013_3/13ksv.pdf

сірчаної та крижаної оцтової кислот з утворенням комплексу жовтого кольору, *антагоністичну активність – методом перпендикулярних штрихів*. Для цього бактеріологічною петлею один з досліджуваних штамів висівали по діаметру чашки Петрі на щільне (агаризоване) середовище MRS, спеціально призначене для культивування молочнокислих мікроорганізмів, потім перпендикулярно йому - інші штами. Культивування проводили при 37 ° С протягом 24 год. У разі виявлення антагонізму у культур мікроорганізмів на перетині штрихів виділяється зона пригнічення росту [9].

Виділення ДНК проводили методом, заснованим на лізисі і відділенні геномної ДНК з протеїнів, полісахаридів і ліпідів за рахунок етапу фазового розподілу та зв'язування геномної ДНК із спеціальними колонками АхуПреп з подальшим очищенням і знесоленням [7].

ПЦР у режимі реального часу здійснювали на приладі Rotor-Gene 3000 [6], а *визначення масової концентрації холестерину* - методом високоефективної рідинної хроматографії на рідинному хроматографі KNAUER із спектрофотометричним детектором До-2501 (Німеччина) [11].

Масову частку білка виявляли на напівавтоматичному приладі Кьельтек методом заснованим на мінералізації органічних сполук біологічних об'єктів і визначенням загального азоту за кількістю утвореного аміаку [8], а *вологи* в готовому продукті - методом висушування до постійної маси при температурі 150 ° С [2].

Масову частку жиру визначали за методом Сокслета, за багаторазової екстракції жиру розчинником з підсушеною наважкою продукту і подальшим видаленням розчинника і висушуванням жиру до постійної маси [3].

Масову частку золи установлювали методом озолення з попереднім висушуванням [4], *хлориду натрію* - за допомогою методу Мора [5], а *вміст нітриту* - із застосуванням реактиву Грісса (*арбітражний метод*), який ґрунтується на вимірюванні інтенсивності забарвлення діаз`єднань, що утворюються в результаті взаємодії азотистої кислоти з нафтиламином та сульфаніловою кислотою у присутності оцтової кислоти [6].

Метод з'ясування *інтенсивності забарвлення* заснований на екстрагуванні нітрозогемохромогена і солянокислого гематину (пігментів м'яса) водним розчином ацетону і на отриманні при цьому екстракту з максимальною оптичною щільністю при довжині хвилі 540 мкм. Величина оптичної щільності, яка вимірюється фотоколориметром, пропорційна концентрації пігменту і є показником інтенсивності забарвлення і виражається відношенням відсотка змісту нітрозопігменту до загальної кількості пігменту [12].

Результати дослідження. Встановлено, що з 41 досліджуваного штаму холестеринзнижувальною здатністю не володіли всього 3 мікроорганізми, решта мікроорганізмів знижували холестерин від 2,8 % до 24,3 %, при цьому штам *Lactobacillus curvatus* 1 сприяв зменшенню вмісту холестерину в середовищі на 32 %.

Враховуючи отримані результати, а також технологічні властивості штамів, що володіють максимальною холестеринзнижувальною здатністю, обрали три з них: *Lactobacillus curvatus* 1 (32 %), *Pediococcus pentosaceus* 28 (22 %), *Staphylococcus carnosus* 108 (15,2 %), при цьому штам *Staphylococcus carnosus* 108 також характеризується денітрифікуючою здатністю, що дозволяє не тільки зменшити вміст холестерину, а й отримати продукт із стабільним забарвленням і пониженим вмістом залишкового нітриту натрію в готовому продукті за рахунок повнішого його відновлення до NO (рис.1).

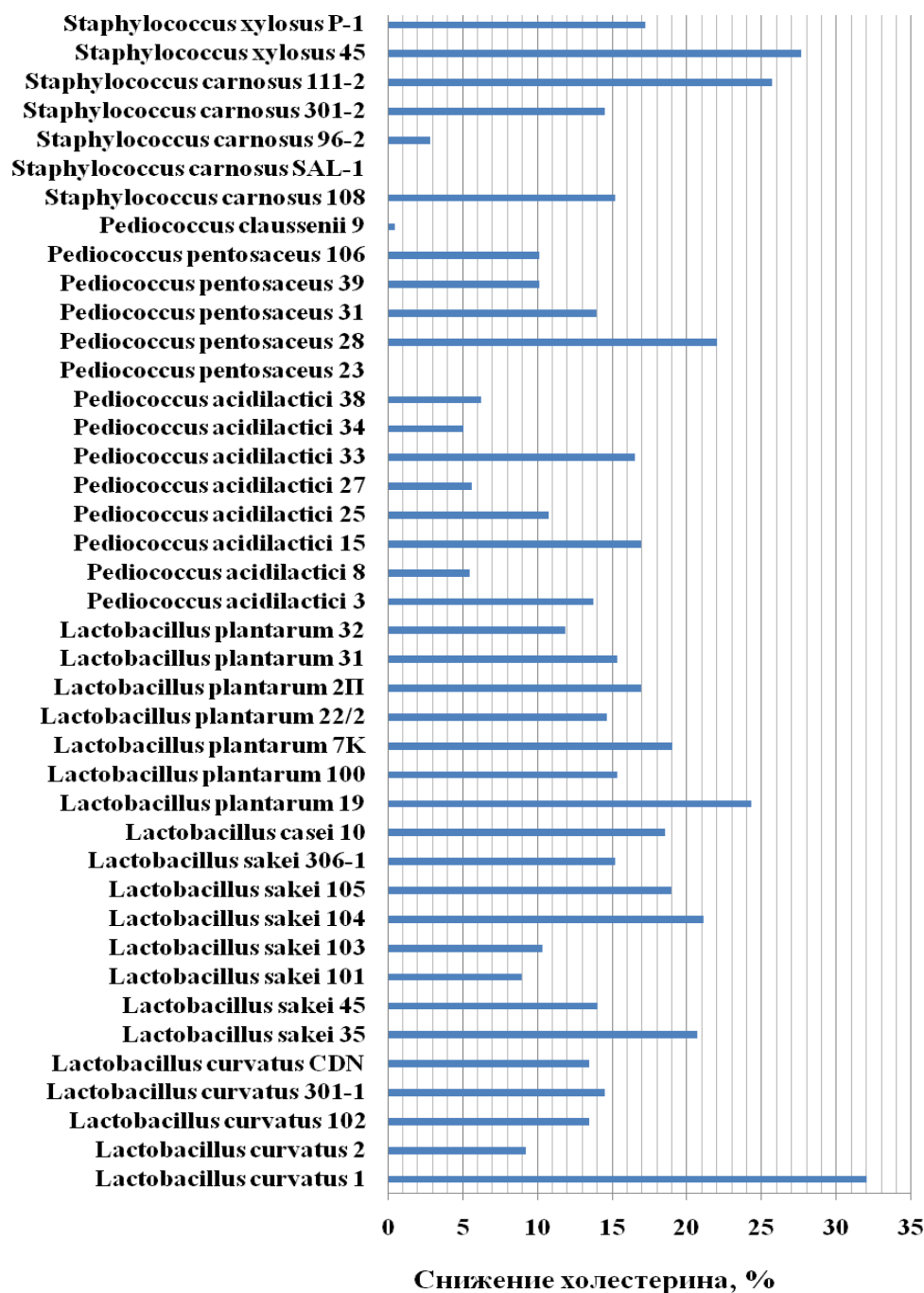


Рис. 1. Зниження холестерину стартовими культурами

Обрані штами згрупували в бактеріальну композицію. У цій роботі було прийняте співвідношення штамів 1:1:1 з урахуванням значущості технологічних властивостей кожного окремо відібраного штаму та їх здатності знижувати вміст холестерину.

Для мікроорганізмів, що входять до складу бактеріальної композиції, необхідно враховувати здатність культур співіснувати, не пригнічуючи ріст

одна одної. Для вивчення відсутності антагонізму між цими штамми використовували метод перпендикулярних штрихів (рис. 2).



Рис. 2. Спільне зростання штамів стартових культур: *Lactobacillus curvatus* 1 (B-8889), *Pediococcus pentosaceus* 28 (B-8888) і *Staphylococcus carnosus* 108 (B-8953)

За активним і рівномірним зростанням, відсутністю зон затримки росту мікроорганізмів в області їхнього зіткнення встановлена можливість спільного використання цих штамів у бактеріальній композиції.

Для дослідження впливу бактеріальної композиції на рівень вмісту холестерину були вироблені п'ять експериментальних зразків сиров'яленого м'ясного продукту із свинини:

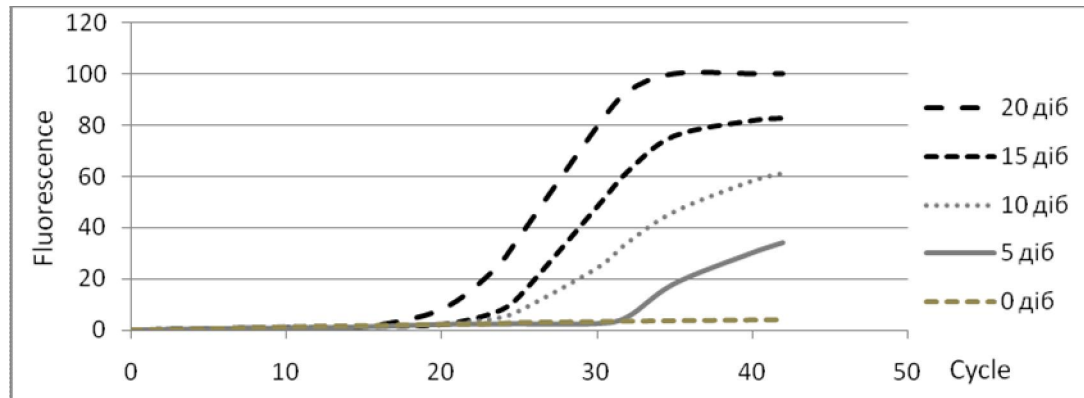
зразок № 1 не містив бактеріальні культури;

зразок № 2 містив культури імпортованих бакпрепаратів Бактоферм Т-SP (*Staphylococcus carnosus* і *Pediococcus pentosaceus*) і Бактоферм LL-1 (*Lactobacillus curvatus*) компанії «Християн Хансен», Данія. Ці бакпрепарати вносили в зразок № 2 у кількості 109 КУО / г у співвідношенні 2:1 (таким чином видовий склад внесених мікроорганізмів зразка № 2 відповідав видовому складу мікроорганізмів зразків № 3-5);

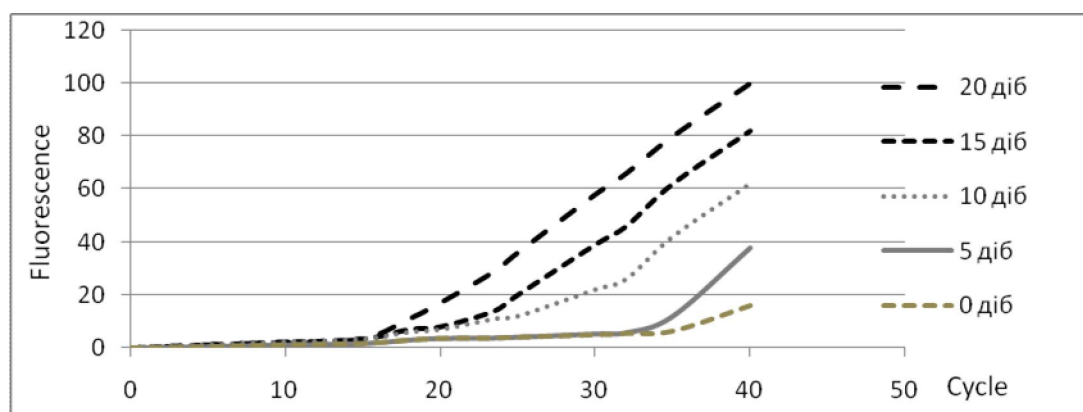
у зразки № 3-5 вносили отриману бактеріальну композицію (*Lactobacillus curvatus* 1, *Pediococcus pentosaceus* 28 і *Staphylococcus carnosus* 108) у кількості 109 КУО / г і співвідношенні 1:1:1. Відмінність між зразками полягала в тому, що для зразків № 4 і 5 була зменшена концентрація нітриту

натрію в розсолі з 0,075 % до відповідно 0,05 % і 0,03 %. Це пов'язано з тим, що до складу бактеріальної композиції входять денітрифікуючі штами *Staphylococcus carnosus* 108. Зниження концентрації нітриту натрію за умови більш повного його відновлення до NO дає змогу підвищити безпеку готового продукту.

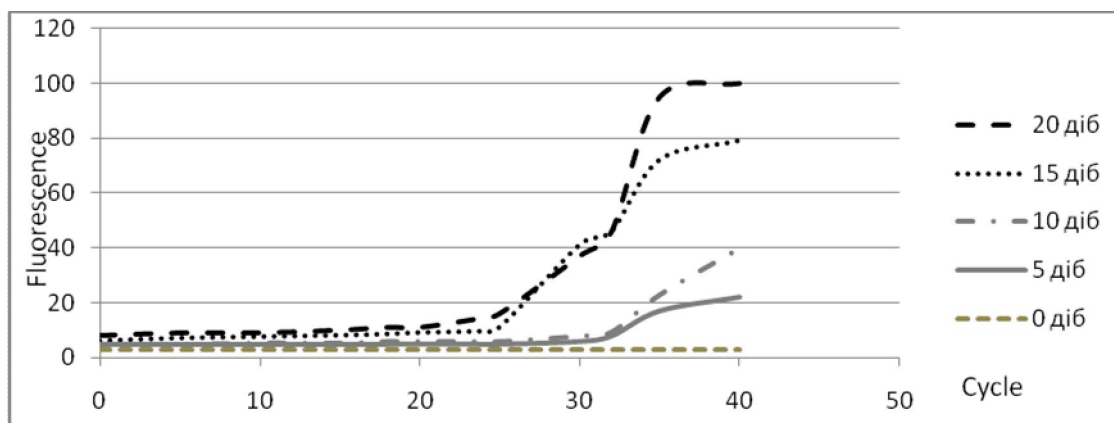
Під час проведення мікробіологічного аналізу протягом всього технологічного процесу санітарно-показової мікрофлори виявлено не було. Зразки м'ясного продукту відповідали вимогам СанПіН 2.3.2-1078.01. Для контролю розвитку стартових культур протягом всього технологічного процесу здійснювали їх моніторинг методом ПЛР-РВ з використанням видоспецифічних тест-систем для виключення ідентифікації небажаних близькоспоріднених молочнокислих мікроорганізмів, які можуть бути присутніми у вихідній сировині. У зразках № 2-5 виявлено стартові культури видів *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus carnosus* і *Pediococcus pentosaceus* (рис. 3 на прикладі зразка № 3).



А



В



С

Рис. 3. Результати дослідження методом ПЛР-РВ *Lactobacillus curvatus* (а), *Staphylococcus carnosus* (б), *Pediococcus pentosaceus* (в) у зразку № 3 від 0 до 20 діб сушіння

Присутність стартових культур видів *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus carnosus* і *Pediococcus pentosaceus* детектується на 5-ту добу сушіння, зростання кривих свідчить про наявність цих мікроорганізмів (див. рис.3). У процесі сушіння спостерігається поступовий розвиток стартових культур у продукті, що дозволяє простежити динаміку зростання мікроорганізмів і підтверджує ефективність аналізу ПЛР-РВ. Аналогічні дані одержані для зразків № 2, 4 і 5.

У зразку № 1 (без додавання стартових культур) при дослідженні методом ПЦР-РВ бактерії видів *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus carnosus* і *Pediococcus pentosaceus* не були ідентифіковані, це пояснюється тим, що зразок не містив цільову ДНК цих мікроорганізмів.

У зв'язку з тим, що основною функціональною властивістю є здатність знижувати рівень холестерину, що міститься у зразках № 3-5 бактеріальної композиції, в готових продуктах визначали вміст холестерину методом ВЕРХ. Аналіз зразків проводили з використанням хроматографічної системи фірми Knauer (Німеччина) із спектрофотометричним детектором К-2500 і програмним забезпеченням «Мультихром» (рис. 4).

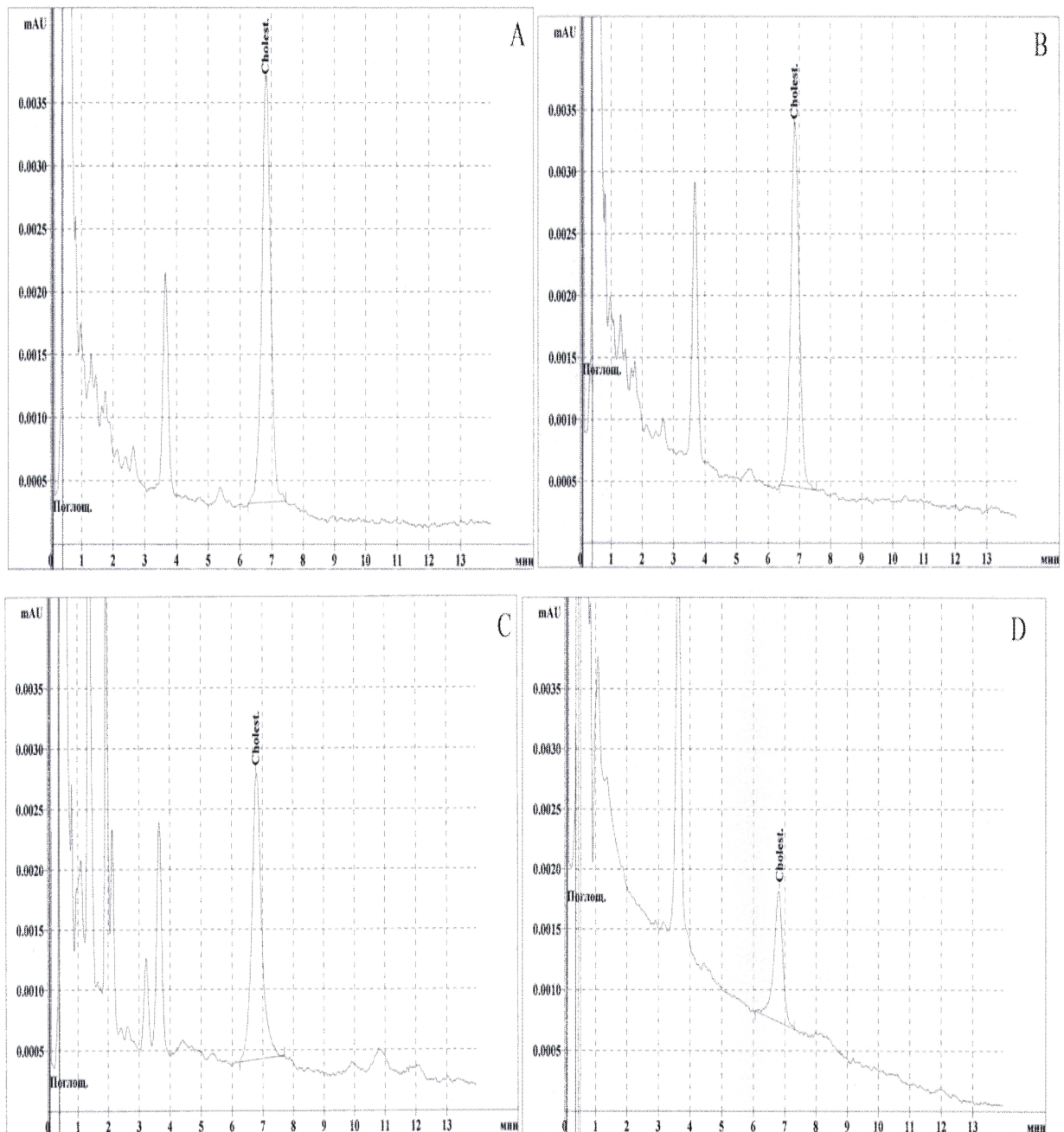


Рис. 4. Хроматограма холестерину, що міститься в: А - зразку № 1; В - зразку № 2; С - зразку № 3. D - стандарт (холестерин)

У зразку № 1 виявлено найбільшу кількість холестерину - 620,9 мг / кг. У зв'язку з тим, що на зразок № 1 не впливали стартові культури, ці результати прийняті за контроль.

У зразку № 2 з імпортними стартовими культурами вміст холестерину становив 547,9 мг / кг, що на 11,7% менше, ніж у зразка № 1. Для імпортних стартових культур вивчення здатності знижувати вміст холестерину *in vitro*

не входило в завдання цієї роботи, однак згідно з даними ВЕРХ очевидно, що введення бактеріальних препаратів Бактоферм Т-SP (*Staphylococcus carnosus* і *Pediococcus pentosaceus*) і Бактоферм LL-1 (*Lactobacillus curvatus*) сприяло зменшенню кількості холестерину в готовому продукті. Це можна пояснити тим, що ферментні системи препаратів мікроорганізмів, здатні активно деструктувати холестерин, який міститься у м'ясній сировині.

Для зразка № 3 з бактеріальною композицією із штамми, що володіють максимальними холестеринзнижувальними здібностями, кількість холестерину становила 487,8 мг / кг, що показує перевагу порівняно із зразками № 1 і 2. Так, у зразку № 3 рівень холестерину на 21,4 % нижчий, ніж у зразку № 1 без стартових культур і на 10,9 % нижчий, ніж у зразку № 2 з культурами імпортного виробництва. Ці дані підтверджують ефективність бактеріальної композиції і дозволяють позиціонувати досліджуваний продукт як продукт з функціональною спрямованістю.

За загальним хімічним складом підслідні зразки не мали принципових відмінностей (таблиця).

Фізико-хімічні показники готового продукту

Показник	Номери зразків				
	1	2	3	4	5
Масова частка, %:					
вологи	45,40 ±0,52	42,20 ±0,50	43,33 ±0,68	43,40 ±0,51	43,35 ±0,49
білка	30,40 ±0,41	30,75 ±0,42	30,10 ±0,44	29,90 ±0,43	30,11 ±0,40
жиру	16,65 ±0,45	19,25 ±0,44	18,69 ±0,49	18,95 ±0,47	18,99 ±0,46
золи, в т.ч.	6,1 ±0,10	6,4 ±0,09	6,3 ±0,09	6,3 ±0,08	6,3 ±0,10
хлористого натрію	3,50 ±0,17	3,40 ±0,16	3,28 ±0,15	3,30 ±0,17	3,27 ±0,16
нітриту натрію	0,0023 ±0,0002	0,0021 ±0,0002	0,0006 ±0,0002	0,0002 ±0,0002	Сліди
Кількість нітрозопігментів, %	81,4 ±0,09	82,2 ±0,09	88,5 ±0,08	83,6 ±0,08	80,7 ±0,08

Встановлено, що за рахунок введення в рецептуру штаму *Staphylococcus carnosus* 108, що володіє денітрифікуючою активністю, у зразку № 3 з традиційним рівнем введення в розсіл нітриту натрію, істотно знижувалася масова частка залишкового нітриту порівняно із зразками № 1 і № 2, при цьому спостерігали максимальний вміст нітрозопігментів. Незважаючи на зменшення кількості введення нітриту натрію у зразки № 4 і № 5, вміст нітрозопігментів у них не поступався перед контрольними зразками, одночасно у цих зразків значно знижувалася масова частка залишкового нітриту натрію.

Застосування бактеріальної композиції, що містить денітрифікуючий штам *Staphylococcus carnosus* 108, дозволяє знизити рівень введеного в розсіл нітриту натрію з 0,075 % до 0,03 %, при цьому якість продукту не погіршується порівняно з продуктом, отриманим без стартових культур. Крім того, за рахунок повного відновлення нітриту натрію виключається його надходження до організму людини, що підвищує безпечність готового продукту.

Висновки

На підставі виконаних досліджень обґрунтовано доцільність використання бактеріальної композиції (*Lactobacillus curvatus* 1, *Pediococcus pentosaceus* 28, *Staphylococcus carnosus* 108 у співвідношенні 1:1:1) для виробництва сиров'ялених продуктів із свинини. Ці результати можуть бути перенесені і на інші асортиментні групи ферментованих м'ясних продуктів.

Уведення бактеріальної композиції при виробництві м'ясного продукту сприяє зниженню вмісту в ньому холестерину на 21,4 %, а використання денітрифікуючого штаму *Staphylococcus carnosus* 108 дає змогу знизити вміст нітриту натрію в розсолі до 0,03 %.

Створення ферментованих м'ясних продуктів з пониженим рівнем холестерину, дозволить зменшити потенційну небезпеку для людей, що страждають серцево-судинними захворюваннями. Перспективними

компонентами для зниження рівня холестерину в м'ясних продуктах є молочнокислі мікроорганізми, які мають здатність використовувати холестерин у процесі свого метаболізму. Наявність у молочнокислих мікроорганізмів специфічних властивостей (формування смаку і аромату, запобігання мікробіологічному та окислювальному псуванню, надання продукту стабільного рожево-червоного забарвлення) дозволяє створити м'ясний продукт з необхідними якісними характеристиками. Застосування методу ПЛР у реальному часі для контролю наявної кількості санітарно-показової мікрофлори і стартових культур, дає змогу своєчасно і з високою точністю оцінити санітарно-гігієнічний стан м'ясних продуктів.

Список літератури

1. Буланов Ю.Б. Холестерин: <http://clubmir.narod.ru/shatalin/holesterin.html>
2. ГОСТ Р 51479-99 Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли влаги / Изд. Стандартиформ, 2006. – 6 с.
3. ГОСТ 23042-86 Мясо и мясные продукты. Методы определения жира / Изд. Стандартиформ, 2003. – 5 с.
4. ГОСТ Р 53642-2009 Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли общей золы / Изд. Стандартиформ, 2010. – 12 с.
5. ГОСТ 9957-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины и говядины. Методы определения содержания хлористого натрия / ИПК Издательство стандартов, 2001 – 4 с.
6. ГОСТ 8558.1-78 Продукты мясные. Методы определения нитрита / ИПК Изд. Стандартов, 2003. – 11 с.
7. Инструкция к набору реагентов «AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit» компании «Axygen Scientific, Inc.», - 2011. – Ver.:1. – 7 с.
8. Идентификация санитарно-показательной микрофлоры и стартовых культур в мясных изделиях методами ПЦР в реальном времени и ПЦР с электрофоретической детекцией: учебно-методическое пособие для «Наукові доповіді НУБіП» 2013-3 (39) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2013_3/13ksv.pdf

студентов направления подготовки уровня магистратуры 260200, 110500 / И.А. Рогов, Е.И. Титов, Н.Г. Машенцева [и др.]// М.: МГУПП, 2012. – 33 с.

9. Лысак В.В. Микробиология. Методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов / В.В. Лысак, Р. А. Желдакова. - Минск: БГУ, 2002. – 98 с.

10. Метод определения содержания белка на полуавтоматическом приборе Кьельтек / [Л.Ф. Митасева, С.К. Апраксина, С.М. Мухина, А.В. Стефанов] // Методические указания к выполнению лабораторных и научно-исследовательских работ, М.: МГУПБ, 2004. – 14 с.

11. Руководство Р 4.1.1672-03 Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище – М.: Минздрав России, 2003. – 239 с.

12. Физико-химический и бактериологический контроль в мясной промышленности / [М.Б. Коган, Л.С. Пожарская, В.П. Рындина, Е.М. Фрейдлин] - М.: Пищевая промышленность, – 1971. – 462 с.

13. Ziarno M. Cholesterol assimilation by commercial yoghurt starter cultures / M. Ziarno, E. Sekul, A. Lafraya Aguado // Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 2007. – Vol. 6(1). – P. 83–94.

14. Zlatkis A. A new method for the direct determination of serum cholesterol / A. Zlatkis, B. Zak, A.J. Boyle // J. Lab. Clin. Med., 1953. – Vol. 41. – P. 486–492.

**Биотехнология деликатесных мясных продуктов из свинины с
пониженным содержанием холестерина**

Колотвина С.В., Машенцева Н.Г., С.Д. Мельничук,

Л.В. Баль-Прилипка

Исследована способность стартовых культур, используемых для ферментации мясных продуктов, снижать содержание холестерина в результате его ферментативной деструкции. Описаны результаты «Наукові доповіді НУБіП» 2013-3 (39) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2013_3/13ksv.pdf

определения содержания холестерина в готовом продукте колориметрическим методом Златкис-Зака. Обоснована целесообразность использования бактериальной композиции молочнокислых микроорганизмов для производства сыровяленых продуктов из свинины.

Ключевые слова: мясные продукты, молочнокислые микроорганизмы, холестерин, холестеринопонижающая способность, денитрифицирующая способность, бактериальная композиция, деструкция холестерина.

Biotechnology of delicacy meat product from pork with low-cholesterol level

S.V. Kolotvina, N.G.Mashentseva,

S. D. Melnychuk, L.V. Bal-Prylypko

The ability of starter cultures used for fermentation of meat products to lower cholesterol level because of its enzymatic destruction is investigated in paper. We describe the results of measuring the cholesterol content in the finished product with the colorimetric method of Zlatkis-Zack. The appropriateness of lactic acid bacterial composition of microorganisms for the production of jerked products from pork is grounded.

Key words: meat products, lactic acid bacteria, cholesterol, cholesterol lower ability, denitrifying ability, bacterial composition, destruction of cholesterol.