

SCREENING OF LACTIC ACID MICROORGANISMS FOR DETERMINING THE NITRITE REDUCING ACTIVITY

S. Danylenko

Institute of Food Resources of National Academy of Agrarian Sciences

Key words: <i>Flora</i> <i>Lactic acid bacteria</i> <i>Raw meat</i> <i>Nitrite reducing activity</i> <i>Screening</i>	ABSTRACT A screening of lactic acid microorganisms for determining the nitrite reducing activity was conducted. Six promising strains of LAB were determined. The dynamics of nitrite reduction while cultivating LAB in a medium with the addition of nitrite salt in concentration which is twice higher than the concentration in the recipe of fermented sausages was investigated in the laboratory.
Article history: Received 09.07.2014 Received in revised form 18.07.2014 Accepted 09.08.2014	
Corresponding author: S. Danylenko E-mail: svet1973@gmail.com	

СКРИНІНГ МОЛОЧНОКИСЛИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА НІТРИТРЕДУКУВАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ

С.Г. Даниленко

Інститут продовольчих ресурсів

У статті проведено скринінг молочнокислих мікроорганізмів за нітритредукувальною активністю. Отримано шість перспективних штамів МКБ. У лабораторних умовах досліджено динаміку зниження нітритру за культивування у середовищі МРС з додаванням нітритної солі концентрацією, яка вдвічі перевищує концентрацію за рецептурою на ферментовані ковбаси.

Ключові слова: *мікрофлора, молочнокислі бактерії, м'ясна сировина, нітритредукуюча активність, скринінг.*

Нітрити і нітрати здавна використовують у виробництві ферментованих м'ясних продуктів: з одного боку, вони позитивно впливають на колір, смак і аромат, стійкість за зберігання, з іншого — у кислому середовищі можуть бути попередниками утворення канцерогенних сполук, нітрозамінів. Відсутність речовин, які функціонально здатні замінити використання останніх, спонукає до пошуку культур з високою нітритредуктазною активністю [1,2].

Водночас при виробництві м'ясних продуктів нітрит є важливим з точки зору безпеки продукту. У США і Канаді, дозволено вносити у м'ясну сировину нітрит

натрію у кількості не більше 20 мг %, за винятком беконних виробів, для яких його концентрація обмежується 12 мг %. За вимогами безпеки залишковий вміст нітриту в готових м'ясних виробках не повинен перевищувати 12,5 мг %, для консервованих м'ясних продуктів — 5 мг % [3]. В Україні цей показник для сирокочених і сиров'ялених ковбас складає 3—5 мг % [4].

Альтернативою можуть виступати бактеріальні препарати, які здатні знижувати рівень нітритів. Залучення до складу бактеріальних препаратів денітрифікуючих мікроорганізмів дозволяє досягти низьких залишкових концентрацій нітритів, навіть у разі високої початкової концентрації цього інгредієнту. Додавання таких мікроорганізмів сприяє повнішому відновленню нітритів, забезпечує стабільні смако-ароматичні показники продукції, характерне забарвлення, запобігає псуванню м'ясопродуктів і зменшує утворення нітритоамінів [5].

Мета дослідження: вилучення з природних джерел молочнокислих мікроорганізмів з високим рівнем нітритредукувальної активності, що є перспективним для промислового використання.

Об'єкти досліджень: штами молочнокислих мікроорганізмів, виділені з ферментованих продуктів і з колекції промислових штамів відділу біотехнології Інституту продовольчих ресурсів.

Методи досліджень. Нітритредукувальну активність культур визначали якісно за допомогою реактиву Гріса [6] та кількісно — за інтенсивністю забарвлення, яке утворювалось за взаємодії нітриту з сульфаніламідом і N-(1-нафтил)-етилендіаміндігидрохлоридом у безбілковому фільтраті [7].

Джерелом виділення молочнокислих бактерій слугували ферментовані м'ясні продукти непромислового виробництва: цільном'язеві із свинини (сирокочені та сиров'ялені балики) та з телятини (сиров'ялена бастурма), ковбасні (сирокочена ковбаса із свинини).

20 г зразка, вирізаного із середини сиров'яленого або сирокоченого м'ясного виробу, подрібнювали та змішували з 80 см³ стерильного фізіологічного розчину. Отриману суспензію залишали за кімнатної температури на 15—20 хв, після чого готували десятикратні розведення. Задля визначення наявності/відсутності певних груп мікроорганізмів робили посів з відповідних розведень за традиційною схемою [8].

Вилучення молочнокислих бактерій (МКБ) здійснювали у кілька послідовних етапів. На першій стадії отримували нагромаджувальні культури, висіваючи зразки у п'яти різних за складом селективних поживних середовищ (табл.) та культивуючи їх за температури 30 °С.

Згідно з літературними даними [9,10], такий підхід має високий ступінь вибіркової та сприяє вилученню й нагромадженню молочнокислих стрептококів і лактобацил.

За такою схемою було отримано всього 98 ізолятів мікроорганізмів, які представлені коками, диплококами та ланцюжками різної довжини й окремими ниткоподібними, тоненькими, вигнутими паличками різної довжини (0,7—1,1 мкм) і товщини (0,1—0,6 мкм), що інколи утворювали ланцюжки.

Таблиця. Склад поживних середовищ для нагромаджувальних культур, вміст компонентів у %

Компонент	Поживні середовища				
	1	2	3	4	5
М'ясна вода	94,95	94,95	74,50	-	-
NaCl	3,00	3,00	0,50	-	-
Лактоза	0,50	0,50	2,00	-	-
Глюкоза	-	-	-	2,50	-
Цукроза	0,50	0,50	-	-	-
Пептон	1,00	-	6,50	-	-
Дріждж. автолізат	-	-	5,00	10,00	-
Аскорбінова кислота	0,05	-	-	-	-
Цитрат Na	-	1,00	2,00	-	-
Ацетат Na	-	-	5,00	-	-
MgSO ₄	-	-	0,20	-	-
MnSO ₄	-	-	0,05	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	2,00	-	-
Твін-80	-	-	0,001	-	-
Вода	-	-	-	87,5	90
Молоко знежирене	-	-	-	-	10
pH	6,0	7,2	6,0	7,0	6,8

Отримані чисті культури було перевірено на наявність нітритредукувальної активності.

Реакція на нітрати з реактивом Грісса заснована на утворенні в кислому середовищі за наявності нітритів і ароматичних амінів (сульфофенолової кислоти і α -нафтиламіна) нітритсполуки, які зафарбовуються в червоно-рожевий колір. Для проведення реакції до краплі реактиву Грісса додавали краплю культуральної рідини. Відсутність появи червоного забарвлення свідчила про наявність нітритредукувальної активності.

За отриманими результатами було встановлено, що нітритредуючою активністю володіли лише 14 % досліджених штамів, з яких було відібрано 8 штамів мікроорганізмів.

Наступним етапом дослідження було проведення ідентифікації перс пективних штамів, яку проводили за комплексом культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних ознак відповідно до ключів, наведених у визначнику Бергі [11].

Усі вилучені молочнокислі коки та палички були грампозитивними та каталазонегативними. Молочнокислі коки зброджували глюкозу за гомоферментативним типом бродіння, оскільки вони утворювали лише молочну кислоту. Паличкоподібні ізоляти представлені як гомоферметативними — 93,6 %, так і гетероферментативними — 6,4 % культурами. Встановлено, що відібрані штами належали до видів *Lactobacillus casei*; *L. rhamnosus*; *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei* та *Lactococcus lactis*.

Також проведене кількісне визначення нітритредукувальної активності. Досліджували динаміку розкладання нітриту натрію вказаними штамми. Для цього у середовище MPC додавали 200 мг/дм³ NaNO₂. У це середовище

вносили 5 % лактобактерій і культивували за температури (35±2) °С впродовж 12 діб. Контролем було середовище без мікроорганізмів. Слід зауважити, що концентрація нітриту вдвічі перевищувала концентрацію за рецептурою на ферментовані ковбаси [12].

Зміна концентрації нітриту під час культивування чистих МКБ показана на рис.1. У контролі вміст нітритів залишався постійним упродовж всього експерименту (крива К). На 12 добу культивування дослідні культури зменшували вміст нітриту від 50 % до 76 % від початкового вмісту нітриту.

Найвища нітритредукувальна активність притаманна штамам *L. plantarum* і *L. paracasei*, які знижували вміст нітриту на 76 % та 74,5% відповідно і на кінець культивування залишкова концентрація була на рівні 50 мг/дм³. Найменшу нітритредукувальну активність спостерігали для штаму *Lc. lactis*, який знижував концентрацію нітриту лише на 50 %. На кінець культивування штам *L. casei* знизив вміст нітриту з 200 мг/дм³ до 66,5 мг/дм³, дещо вища вона була у *L. fermentum* — 75 мг/дм³

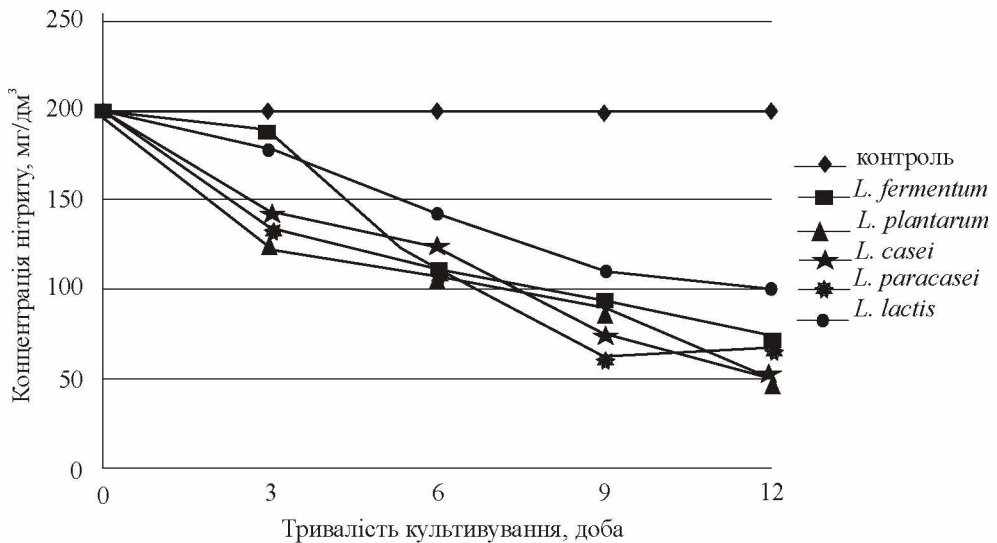


Рис. 1. Динаміка зміни концентрації нітриту натрію культурами МКБ

Цю функцію можна істотно підвищити, поєднуючи штами з різним рівнем активності відновлення нітритів, здатними забезпечити синергічний ефект. Для цього було створено 4 різні варіанти двокомпонентних композицій штамів і досліджено їх нітритредукувальну активність. Співвідношенням між окремими штамми склали 1:1. Склад композицій такий:

- *L. fermentum* *L. Plantarum*.
- *L. plantarum*+*L. Casei*.
- *L. casei*+*L. Paracasei*.
- *L. plantarum*+*L. Paracasei*.

Зміна концентрації нітриту під час культивування композицій МКБ представлено на рис.2.

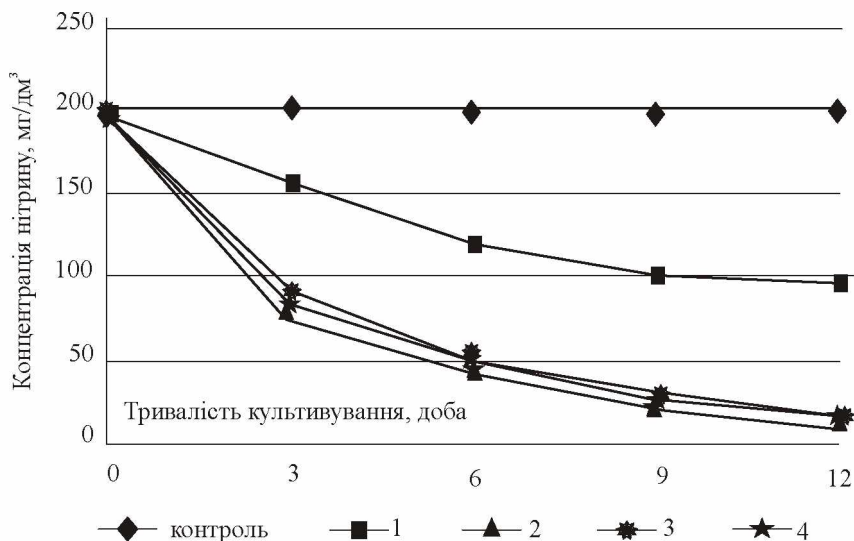


Рис. 2. Зміна концентрації нітриту під час культивування композицій

Встановлено, що всі композиції активніше знижувати вміст нітриту порівняно з монокультурами. Композиції знижували вміст нітриту відповідно на 86 %, 91 %, 93 % і 94 % від початкового. На кінець ферментації залишковий вміст нітриту у всіх варіантах знаходився в межах від 12 до 28 мг/дм³. Водночас при застосуванні композиції 1 активізації відновлення нітритів не спостерігали. Концентрація нітриту натрію в культуральній рідині була вищою, ніж у культуральній рідині кожної із монокультур. Таке явище можна пояснити несумісністю штамів, що входять до складу композиції.

Аналіз динаміки зміни концентрації показав, що у перші три доби культивування концентрація нітриту стрімко знижувалася майже однаково для всіх композицій — зі 105 мг/дм³ до 82 мг/дм³. Надалі концентрація нітриту зменшувалася, але повільніше. Найактивнішою за цим параметром була композиція 4.

У результаті встановлено, що композиції молочнокислих бактерій активніше відновлювали нітрит порівняно з монокультурами. Це можна пояснити тим, що композиції молочнокислих мікроорганізмів володіють сильнішим синергетичним ефектом. Отримані дані узгоджувались із даними, наведеними у [13].

Висновки

Результати досліджень показали, що молочнокислі бактерії активно розвиваються у середовищі МРС з додаванням нітритної солі концентрацією, яка вдвічі перевищує концентрацію за рецептурою на ферментовані ковбаси. Композиції штамів молочнокислих мікроорганізмів більш інтенсивніше знижують рівень нітриту, ніж монокультури.

Література

1. Лори Р.А. Наука о мясе / Р.А. Лори; пер. с англ. [под ред. В.М. Горбатова]. — М.: Пищевая промышленность, 1973. — 198 с.

2. Marco A., Navarro J.L., Flores M. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage / A. Marco // Meat Science. — 2006. — Vol. 73, № 4. — P. 660—673.

3. Минаев М.Ю., Костенко Ю.Г., Солодовникова Г.И. Использование денитрифицирующих микроорганизмов при производстве сырокопченых и сыровяленых мясных продуктов // Мясная индустрия. — 2004. — № 9. — С. 33—35.

4. Національний стандарт України. Ковбаси сиров'ялені та сиров'ялені. Загальні технічні умови. ДСТУ 4427:2005 — [Чинний від 2005 — 30 — 06]. — К., 2006. — 18 с. (Держспоживстандарт України).

5. Kruger G., Schiefer G. Untersuchungen zum Nitrit- und Nitratgehalt ausgewählter Wursterzeugnisse // Fleisch, Leipzig. — 1982. — Vol. 36, № 8. — S. 153—155.

6. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. — М.: Изд-во Московского университета, 1976. — 307 с.

7. Журавская Н.К., Алехина Л.Т., Отряшенкова Л.М. Исследование и контроль мяса и мясopодуктов. — М.: Агропромиздат, 1985. — 296 с.

8. Колбасные изделия и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа: ГОСТ 9958—81. — М.: ИПК Издательство стандартов, 2002. — 14с.

9. Rovira A., Nieto J.C., Rodriguez A. et al. Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages // Microbiologia. — 1997. — Vol. 13, № 2. — P. 201—208.

10. Rantsiou K., Drosinos E. H., Gialitaki M. et al. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy // Food Microbiology. — 2005. — Vol. 22, № 1. — P. 19—28.

11. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. V. 2 / Ed. P.H.A. Sneath. — Baltimore: Williams a. Wilkins Co, 1986. — 1434 p.

12. Сборник технологических инструкций по производству полукопченых, варено-копченых, сырокопченых колбас. — ГосАгропром СССР: ВНИКИМП. — М., 1987. — 90 с.

13. Dodds K.L., Collins-Thompson D.L. Nitrite tolerance and nitrite reduction in lactic acid bacteria associated with cured meat products // Int. J. Food Microbiol. — 1984. — Vol. 1, № 3. — P. 163—170.

СКРИНИНГ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО НИТРИТРЕДУЦИРОВАННОЙ АКТИВНОСТИ

С.Г. Даниленко

Институт продовольственных ресурсов

В статье проведен скрининг молочнокислых микроорганизмов за нитритредуцирующей активностью. Получено шесть перспективных штаммов МКБ. В лабораторных условиях исследована динамика снижения нитрита при культивировании в среде МРС с добавлением азотистой соли, концентрация которой вдвое превышает концентрацию за рецептурой на ферментированные колбасы.

Ключевые слова: микрофлора, молочнокислые бактерии, мясное сырье, нитритредуцирующая активность, скрининг.