

Введение В связи с дефицитом в питании человека белка животного происхождения, а также с целью расширения ассортимента полноценных мясных продуктов с функциональными и пробиотическими свойствами актуальна и своевременна разработка рецептур мясных изделий с использованием биомодифицированного вторичного мясного сырья. Анализ положения дел мясной отрасли показывает слабое вовлечение в производство пищевых и кормовых продуктов крупнотоннажного коллагенсодержащего сырья, характеризующегося невысокими технологическими свойствами, но имеющего относительно высокую биологическую ценность. Несмотря на высокое содержание незаменимых аминокислот, в исходном виде это сырье представляет собой лишь потенциальный источник белка ввиду слабой способности к гидролизу со стороны пищеварительных ферментов (низкая перевариваемость и усвоение), а также невыраженных функциональных свойств (низкая эмульгирующая способность, жесткость и т.д.) [1]. Наиболее эффективным способом улучшения свойств вторичного мясного сырья является использование ферментативной активности микроорганизмов. Анализ научной литературы свидетельствует о преимуществах микробного протеолиза в отношении труднодоступных белков. В соответствии с этим ведутся изыскания по разработке оптимальных способов трансформации свойств нативного коллагенсодержащего сырья с целью последующего его использования в качестве легкоусвояемого белкового композита в рецептурах мясных изделий. Ранее было изучено положительное влияние экзогенной ферментации лактобактериями на изменение ряда функционально-технологических показателей субпродуктов II категории (говяжий рубец, легкое и селезенка) [2,3]. В последние годы в связи с ухудшением экологической обстановки в сфере прикладных исследований в пищевой биотехнологии наметилась устойчивая тенденция по разработке пробиотических продуктов лечебно-профилактического назначения, содержащих живые клетки бифидобактерий. Технологическое действие данных микроорганизмов связано с образованием специфических биологически активных компонентов. В частности, в продуктах в большом количестве накапливаются аминокислоты, органические кислоты (молочная, уксусная и др.), бактериоцины, ферменты, витамины группы В (В1, В2, В6, В12), витамин К, фолиевая кислота, летучие жирные кислоты, спирты, антибиотические субстанции, подавляющие рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [4]. В связи с этим большой интерес представляет исследование влияния бифидобактерий на свойства говяжьих субпродуктов и изучение возможности их применения для экзогенной ферментативной обработки малоценного мясного сырья. Экспериментальная часть Для экзогенной ферментации использовали лиофилизированную микробную массу бактерий *Bifidobacterium bifidum* из состава бактериального препарата Бифидумбактерин. Они лиофилизированы в среде культивирования с

добавлением защитной сахарозо-желатиновой или сахарозо-желатиномолочной среды. Полученный таким образом препарат представляет собой кристаллическую или пористую массу желтовато-бежевого или беловато-серого цвета со специфическим запахом. Для проведения экзогенной ферментации сначала готовили жидкую закваску бактерий, для чего лиофилизированную закваску вносили в стерилизованную питательную среду на основе молочной сыворотки из расчета 1 г закваски на 1 л среды, перемешивали и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. Объектами исследования являлись говяжьи субпродукты 2 категории (легкое, рубец, селезенка), которые перед микробной ферментацией промывали, зачищали и жиловали. Затем к ним добавляли жидкие закваски в следующих вариантах. 1. 200 г субпродукта + 40 мл сыворотки (контроль) (гидромодуль 5:1); 2. 200 г субпродукта + 20 мл закваски + 20 мл сыворотки (гидромодуль 5:1); 3. 200 г субпродукта + 40 мл закваски (гидромодуль 5:1); 4. 200 г субпродукта + 100 мл закваски (гидромодуль 2:1). Подготовленные смеси выдерживали в течение 96 часов при температуре 0 + 4°C. Для количественного определения бифидобактерий использовали модифицированную среду Блаурокка следующего состава (г/л): глюкоза – 5.0, натрия хлорид – 5.0, крахмал растворимый – 1.0, пептон – 23.0, L-цистеин гидрохлорид – 0.3, агар-агар – 15.0, вода дистиллированная – 1 л. Бифидобактерии культивировали в анаэробных условиях, в толще агаризованной среды. Для создания анаэробных условий среду наливали в крышку чашки Петри и сразу же на поверхность среды ставили дно чашки, так, что бы между средой и дном не было воздуха. Щель между краями дна и крышки, где среда соприкасается с воздухом, заливали стерильным парафином. Для выявления и подсчета различных групп микроорганизмов (КМАФАнМ) навеску субпродуктов предварительно помещали в стерильную фарфоровую ступку, и растирали со стерильным песком в течение 5 минут фарфоровым пестиком. Затем вносили стерильный физиологический раствор (концентрация NaCl 0.9%) в соотношении 10 мл на 1 г образца. Последующие разведения (10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴ и т. д.) делали в колбах объемом 250 мл с 45 мл стерильного физраствора. Из каждого разведения по 1 мл вносили в стерильные чашки Петри, которые затем заливали расплавленным и охлажденным до 45-50°C МПА (глубинный посев). Затем чашки помещали в термостат при 30°C. Выросшие колонии подсчитывали на третьи сутки. С учетом разведений определяли число клеток в 1 г продукта. Наличие бактерий группы кишечной палочки (БГКП) определяли на среде Эндо. Для этого 0.1 мл суспензии вносили на поверхность среды Эндо [5]. Присутствие протей определяли методом Шукевича. Для этого из приготовленной суспензии стерильной пастеровской пипеткой набирали 1- 2 капли исследуемого материала и, не прикасаясь к поверхности скошенного агара, вносили в конденсационную воду скошенного свежеприготовленным мясо-пептонного агара в биологических пробирках. Посевы инкубировали в

термостате при 37°C в течение 14–18 ч. Присутствие протей характеризуется сплошным нежным вуалеобразным ростом на поверхности агара. При микрокопировании хорошо заметны полиморфные, подвижные, окрашенные по Граму отрицательно палочки. Присутствие клостридий определяли путем посева 2–3 мл суспензии в среду Китт – Тароцци [6]. Среду перед посевом прогревали в кипящей водяной бане в течение 20 – 30 мин для удаления кислорода, затем быстро охлаждали. После посева часть пробирок вновь прогревали при 80°C в течение 20 мин для уничтожения вегетативных клеток. Посевы заливали тонким слоем вазелинового масла для создания анаэробных условий, помещали в термостат при 37°C и просматривали сначала через сутки, а затем каждые 2 дня до 8 суток. Выделение бактерий рода *Salmonella* производили на среде Левина – слабоселективной дифференциально-диагностической среде для выделения энтеробактерий. Посев производили поверхностно. Чашки инкубировали в термостате при 30°C в течение 48 часов. Для определения протеолитической активности у бифидобактерий по отношению к коллагенсодержащему субстрату в образцах определяли соотношение различных фракций белка, отличающихся растворимостью (водорастворимых, солерастворимых и щелочерастворимых). Подготовку и разделение фракций проводили согласно методике [7]. За концентрацию общего белка принимали сумму концентраций солерастворимых, водорастворимых и щелочерастворимых фракций белка, определяемых биуретовым методом. Влагосвязывающую способность (ВСС) субпродуктов в процессе ферментации определяли с помощью метода прессования согласно методике [7]. В образцах определяли титруемую кислотность, выражаемую в градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$), согласно методике [8]. Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе “Excel 7.0.”. В работе все эксперименты были проведены не менее чем в трех повторностях. Группу данных считали однородной, если среднеквадратическое отклонение σ в ней не превышало 13%. Различия между группами определяли по критерию Стьюдента при уровне вероятности $P0.05$. Результаты и их обсуждение

На основании оценки микробного сообщества и определении содержания санитарно-показательных микроорганизмов в исследуемых субпродуктах (легкое, селезенка и рубец), проведенной в ранее опубликованных работах [2,3] говяжий рубец был выбран в качестве объекта экзогенной ферментации в связи с наибольшей степенью его обсеменения. Опираясь на эти данные, в настоящей работе для оценки влияния бифидобактерий на микрофлору субпродуктов в качестве объекта исследований также был выбран говяжий рубец. Для экзогенной ферментации использовались клетки бифидобактерий *B. bifidum* в экспоненциальной фазе роста. Для определения требуемого промежутка времени были построены кривые роста бактерий на стерильной молочной сыворотке. Как видно из рисунка 1, при культивировании *B. bifidum* лаг-фаза составляет 15 часов и экспоненциальная фаза роста находится в промежутке

времени от 15 до 30 часов, а максимальная удельная скорость роста составляет 0.13ч⁻¹. а Рис. 1 – Рост *B. bifidum* на среде с молочной сывороткой: а – динамика роста; б – удельная скорость роста Для микробной ферментации использовалась 24 часовая культура *B. Bifidum*, которую вносили в первых трех вышеописанных вариантах. Как видно из рисунка 2, внесение закваски *B. Bifidum* привело к увеличению КМАФАнМ, в зависимости от количества внесенной закваски. Следует отметить, что в исследованном рубце обнаруживались лактобактерии и бифидобактерии в небольших количествах. Однако уже к исходу первых суток ферментации лактобактерии не высевались, в то время как бифидобактерии обнаруживались на протяжении всего времени эксперимента. Б Начиная с первых суток инкубирования отмечалось увеличение КМАФАнМ как в контрольном, так и в опытных образцах. Параллельно с увеличением КМАФАнМ возрастало количество бифидобактерий в опытных вариантах. На протяжении всего времени эксперимента происходило увеличение общего количества микроорганизмов. Сравнивая эти результаты с аналогичными, ранее полученными по молочнокислым бактериям *Lactobacillus plantarum* можно заметить, что при молочнокислой ферментации достоверно снижалось общее количество санитарно-показательной микрофлоры, что говорит о снижении общей обсемененности под действием лактобактерий. Под действием же бифидобактерий общее количество микроорганизмов в контрольном и опытных образцах достоверно не отличалось. В связи с этим есть основания говорить о том, что бифидобактерии обладают менее выраженным антагонистическим действием на микрофлору рубца и практически не уменьшают его обсемененность. Рис. 2 – Изменение микробной обсемененности рубца под действием закваски *B. Bifidum*: а – КМАФАнМ; б – бифидобактерии, 1,2,3 – номера вариантов Антагонистические свойства изученных видов бактерий, вызывающие подавление патогенной микрофлоры, проявляются в том числе и в увеличении кислотности среды в процессе ферментации, в связи с чем возник интерес к изучению динамики изменения кислотности. Культивирование производили на среде на основе молоке, имеющей более низкую буферную емкость по сравнению со средой на сыворотке. Как видно из рисунка 3, кислотность среды при выращивании бифидобактерий ниже, чем у лактобацилл, на 13-45 % на протяжении всего периода культивирования. Далее оценивали влияние бифидобактерий *B. bifidum* на санитарно – показательную микрофлору исследованных субпродуктов. Так как при первоначальных исследованиях говяжьих субпродуктов представители родов *Salmonella* и *Clostridium* не обнаруживались, в дальнейшей работе оценивалось влияние микробной ферментации на колиформные микроорганизмы (Бактерии группы кишечной палочки БГКП) и *Proteus vulgaris*. Данные представлены в табл.1. Рис. 3 – Изменение кислотности среды в процессе культивирования *Lactobacillus plantarum* 8P – АЗ (а) и *B. bifidum* (б) на среде на основе молока Таблица 1 –

Влияние *L. Plantarum* и *B. Bifidum* на санитарно – показательные микроорганизмы рубца Вре-мя, сут Варианты БГКП *Proteus vulgaris* *L. planta-rum* *B. bifi-dum* *L. planta-rum* *B. bifi-dum* 0 Конт-роль +++ +++ + + Вар. 1 +++ +++ + + Вар. 2 +++ +++ + + 1 Конт-роль +++ +++ + + Вар. 1 - ++ +++ + + Вар. 2 - - - +++ + + 2 Конт-роль +++ +++ + + Вар. 1 - ++ +++ + + Вар. 2 - - - - ++ + + 3 Конт-роль +++ +++ + + Вар. 1 - - + - ++ + + Вар. 2 - - - - ++ - + 4 Конт-роль +++ +++ + + Вар. 1 - - + - ++ + + Вар. 2 - - - - - - +

Как видно из данных, в нативных субпродуктах определялись БГКП и протей во всех вариантах. Ферментация с *B. bifidum* приводило к снижению БГКП в варианте 2 лишь со вторых суток и приводило к их исчезновению к четвертым суткам. В 1 варианте, где содержание закваски в два раза ниже, отмечалось лишь их незначительное уменьшение. Обработка рубца микроорганизмами *B. bifidum* не оказало влияния на бактерий рода *Proteus*. Сравнивая полученные результаты с ранее опубликованными данными по обработке рубца молочнокислыми бактериями *Lactobacillus plantarum* 8P – АЗ, где было установлено, что обработка лактобактериями приводила к полному подавлению роста бактерий группы кишечной палочки во всех опытных образцах и незначительно снижала количество протей, можно заключить, что бифидобактерии проявляют меньшую антагонистическую активность в отношении общей микробной обсемененности и патогенных микроорганизмов. Возможно, это связано с меньшей кислотностью ферментационной среды и менее выраженным накоплением молочной кислоты (рис. 3). Кроме высокой микробной обсемененности, субпродукты 2 категории имеют несбалансированный аминокислотный состав белка с преобладанием труднодоступных пищеварительным ферментам щелочерастворимых белков стромы. Это также является препятствием для широкого применения субпродуктов в пищевых целях. Поэтому следующим этапом работы было предусмотрено изучение динамики различных фракций белка в процессе экзогенной ферментации субпродуктов бактериями *B. bifidum*. Изменение фракционного состава белков в процессе их микробной ферментации (на примере рубца) представлено на рис. 4. Гидромодуль составлял 5:1. Рис. 4 – Влияние *B. Bifidum* на фракционный состав белка рубца (РВ-водорастворимая фракция, РС-солерастворимая фракция, РЩ-щелочерастворимая фракция) Как видно из гистограммы, в течение четырех суток ферментации у рубца происходят определенные изменения фракционного состава: фракция водорастворимых белков увеличилась на $(19 \pm 3) \%$ при одновременном снижении доли щелочерастворимых. Полученные результаты в сравнении с ранее изученной ферментативной активностью молочнокислых бактерий *L. plantarum* свидетельствуют об относительно низкой ферментативной активности бифидобактерий по сравнению с молочнокислыми бактериями. Поскольку из изученных субпродуктов рубец обладал наиболее низкой влагосвязывающей способностью, именно на его примере изучали изменение ВСС в процессе

микробной ферментации, результаты представлены на рисунке 5. Рис. 5 – Динамика изменения ВСС рубца под действием *B. bifidum* Представленные на диаграмме данные свидетельствуют о повышении ВСС во всех вариантах, кроме варианта 4 (гидромодуль 2:1), где выявлено снижение данного показателя со вторых суток обработки. Заключение Бифидобактерии *B. bifidum* обладают существенно меньшим антагонистическим действием и слабой протеолитической активностью в сравнении с лактобациллами *L. plantarum*. Задача получения белкового композита с высокими функционально-технологическими показателями и пробиотическими свойствами может быть решена при комбинации бифидобактерий с молочнокислыми бактериями.