

ПОТЕНЦІЙНА ГЕНЕТИЧНА ДІЯ ЗРАЗКІВ КОВБАСНИХ ВИРОБІВ НА ТЕСТ-ОРГАНІЗМИ

О.М. Дуган, Д.Л. Ткачова

Національний технічний університет України "КПІ" (Київ)

Вступ

Консервування м'яса і м'ясопродуктів з метою попередження або гальмування мікробіологічного зараження цих продуктів досягається за допомогою фізичних (високі і низькі температури, іонізуюче і ультрафіолетове випромінювання), хімічних (використання консервантів); фізико-хімічних (посол, копчення) і біохімічних (направлене використання мікрофлори) способів [6].

Метою сучасних способів обробки м'ясопродуктів є отримання стійкості при зберіганні з високими показниками якості. Це може досягатися комбінацією декількох факторів, наприклад, копчення м'ясопродуктів, де сполучаються консервуюча дія зневоднення і бактерицидних речовин коптільного диму [9].

Коптільний дим - це аерозоль, дисперсійним середовищем якого є парогазова суміш, що складається з повітря, газоподібних продуктів горіння, парів коптільних речовин і водяних парів. Дисперсійна фаза представлена частками рідких і твердих речовин - продуктів неповного згорання деревини. Основна маса коптільних речовин зосереджена у дисперсійній фазі. У димі присутні частки попелу і сажі, які є небажаними домішками. У складі коптільного диму знайдені наступні класи органічних сполук: органічні кислоти (оцтова, пропіонова, масляна, валеріанова, мурашина), альдегіди і кетони, спирти, феноли та їхні ефіри, аміни, поліциклічні ароматичні вуглеводні тощо [6].

За даними [2], загальна кількість речовин, присутніх у димі, оцінюється у 5-10 тисяч, з яких ідентифіковано біля 500 індивідуальних компонентів, тому кінцеву токсиколого-гігієнічну оцінку копченню надати неможливо. Основним токсичним компонентом диму є добре відомий канцероген - бенз(а)пірен

та інші поліциклічні сполуки. Гранично допустима концентрація (ГДК) бенз(а)пірену складає 1 мкг/кг їстівної частини копченого продукту. Вважається, що при холодному копченні на продукті осаджується менше бенз(а)пірену, ніж при гарячому. Особливо високий вміст бенз(а)пірену спостерігається при чорному копченні [9]. Факторами, що впливають на склад копченого продукту, є вид деревини, методи прямого і непрямого (із застосуванням коптільних середовищ) копчення, різні температури копчення, тип димогенератора, доступність кисню, час копчення та ін. [6].

Треба зауважити, що ФАО/ВООЗ підкреслює необхідність проведення досліджень мутагенності хімічних препаратів, що використовуються в якості харчових добавок. Продукція, приготована з використанням коптільних середовищ (які у Європі визнані харчовими добавками), досить добре досліджена з токсикологічних позицій. Однак, через те, що коптільні препарати містять такі мутагенні речовини, як феноли, формальдегід, оцтову кислоту та ін., вкрай необхідним є проведення досліджень мутагенної активності як коптільних середовищ, так і ковбасної продукції з метою заміни (при необхідності) генетично небезпечних компонентів, що містяться у цих препаратах, чи зміни технології копчення [2].

Матеріали і методи дослідження

Зразки для вивчення потенційної мутагенної дії були приготовані з наступних видів сировкопчених ковбасних виробів.

1. **"Зерниста" (СК 11-3)**. Довжина батону - 25 см; чорно-коричневого кольору, однорідний, щільний, на зрізі червоного кольору з великими вкрапленнями шпику, із запахом копченостей. Неорганічна фракція - темно-коричневі кристали з різким запахом гарі; у ДМСО утворює розчин темно-коричневого кольору. Органічна фракція - жовто-коричнева карамелеподібна маса із запахом шоколаду; у ДМСО утворює розчин темно-коричневого кольору.

2. **"Брауншвейгська" (СК 12-Б)**. Довжина батону - 22 см; червоно-коричневого кольору, однорідний, щільний, на зрізі червоного кольору з вкрапленнями шпику, із запахом ковба-

си. Неорганічна фракція - буро-чорні кристали з різким запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин чорно-коричневого кольору. Органічна фракція - темно-жовта карамелеподібна маса з приємним запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин темно-коричневого кольору.

3. **"Пікантна" (СК 13-П).** Довжина батону - 25 см; коричневого кольору, однорідний, щільний, на зрізі коричневого кольору з вкрапленнями шпикку, із запахом ковбаси. Неорганічна фракція - світло-коричневі кристали з нерізким запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин жовто-коричневого кольору. Органічна фракція - карамелеподібна маса жовто-коричневого кольору з нерізким запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин оранжево-коричневого кольору.

4. **"Різдяна" (СК 14-Р).** Довжина батону - 25 см; темно-коричневого кольору, нерівна поверхня за рахунок шпикку, щільний, на зрізі коричневого кольору з великими вкрапленнями шпикку, із запахом ковбаси. Неорганічна фракція - світло-коричневі кристали із запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин світло-коричневого кольору. Органічна фракція - джемоподібна маса жовто-коричневого кольору із запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин оранжево-коричневого кольору.

5. **"Московська" (СК 15-М).** Довжина батону - 25 см; червоно-коричневого кольору з нерівною поверхнею за рахунок шпикку, щільний, на зрізі червоного кольору з вкрапленнями шпикку, із запахом в'яленого м'яса. Неорганічна фракція - чорно-коричневі дрібнозернисті кристали з різким запахом гарі; у ДМСО утворює розчин темно-коричневого кольору. Органічна фракція - джемоподібна буро-чорна маса з різким запахом гарі; у ДМСО утворює розчин чорно-бурого кольору.

Отримання екстрактів. Ковбасні вироби - складні гетерогенні системи, які включають, окрім природних компонентів, контамінанти та речовини, що вносяться із технологічними цілями. Ймовірними контамінантами обраних нами копчених ковбасних виробів можуть бути - поліциклічні ароматичні вуглеводні, N-нітрозаміни, гетероциклічні аміни, нітрати, нітрити та важкі метали [16,17]. У деяких дослідженнях [21] застосо-

вуються складні, багатостадійні і дорогі методи екстракції, які, здебільшого, спрямовані на отримання одного з вищезазначених класів сполук, а не загальних екстрактів харчових продуктів. Для оцінки загальної мутагенної активності зразків харчових продуктів у ряді робіт [11,14,19] запропонований порівняно простий метод екстракції потенційно мутагенних сполук етиловим чи метиловим спиртом з наступним ліофільним сушінням зразків.

У нашій роботі ми застосували наступну схему екстракції. На першому етапі за загальними рекомендаціями [1,20] наважку ковбаси гомогенізували і поміщали в апарат Сокслета. Екстракцію проводили 96%-ним етиловим спиртом при нагріванні. Час екстракції визначали за зміною забарвлення розчину спирту, який у середньому становив чотири години.

На другому етапі екстракт охолоджували, при цьому осаджувався шар жиру. Для відокремлення жиру від екстракту, останній декантували. Після розділення спиртовий розчин упарювали у вакуумі водоструминного насосу на роторному випарнику.

Третій етап - розчинення сухого залишку у мінімальному об'ємі ізопропілового спирту і його кип'ятіння протягом 1,5-2 годин. Після охолодження спиртового розчину у вигляді осаду випадає неорганічна частина екстракту, яку відфільтровували і промивали 2 рази ізопропіловим спиртом. Фільтрат упарювали досуха у вакуумі водоструминного насосу на роторному випарнику, в результаті отримували органічну фракцію екстракту.

На останньому етапі обидві фракції - органічну і неорганічну, висушували і зберігали у темному скляному посуді при температурі +2 - +4°C. Для аналізу органічної і неорганічної фракцій у тесті Еймса сухі залишки розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО) за рекомендаціями [8]. Досліджували зразки, розведені у співвідношеннях - 1:0; 1:1; 1:4; 1:9; 1:14. Експериментальні дослідження потенційної генетичної дії екстрактів здійснювали згідно Методичних рекомендацій [5,8,9,10]. Оцінку потенційної генетичної активності зразків, що досліджувались здійснювали згідно [10].

Відбір, підготовку проб і атомно-абсорбційний аналіз для визначення вмісту важких металів у зразках ковбасних ви-

робів проводили з використанням рекомендацій нормативно-технічної документації (ГОСТ 9792-73, ГОСТ 30178-96).

Отримані результати та їх обговорення

Експериментальні дані з потенційної сумарної мутагенної дії зразків органічної і неорганічної фракцій ковбас представлені на рисунках 1-4. Хімічний аналіз усіх зразків на наявність в них гістидину показав негативний результат (аналіз був проведений для виключення можливості збільшення кількості ревертантних колоній за рахунок вивільнення амінокислоти гістидину у процесі приготування зразків).

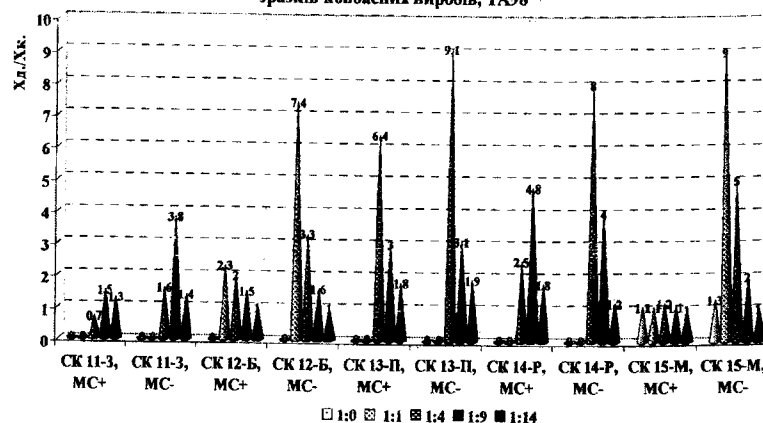
Мутагенність зразків неорганічної фракції (рис. 1-2) обумовлена в основному вмістом в ковбасах важких металів, таких, як Ni, Cd, Cu, Fe(II) і Zn, концентрація яких або перевищувала ГДК (Ni, Cd), або була майже на рівні ГДК. Однак, згідно отриманих нами експериментальних даних, генетична активність неорганічної фракції була виявлена на обох тест-штамах як в присутності системи метаболічної активації (варіант дослідження МС+), так і у її відсутності (варіант дослідження МС-), що свідчить про наявність в досліджуваних зразках, крім перелічених нами важких металів, хімічних сполук, ідентифікація яких утруднена, але специфічна біологічна дія їх (у нашому випадку - мутагенна) виявляється в умовах експерименту. Тому, на нашу думку, біологічні тести для встановлення генетичної активності складних сумішей (в даному випадку - екстрактів ковбасних виробів) можуть успішно замінити громіздкі і дорогі фізико-хімічні дослідження. Ця ідея вперше була оприлюднена в роботах [3,4,8].

З п'яти досліджуваних неорганічних фракцій на тест-штамі *S. typhimurium* TA98 (рис. 1) генетична активність була виявлена у всіх зразках, причому більш виражені ефекти спостерігали у варіантах дослідів без метаболічної активації (перевищення контрольних значень (д./к.) - спонтанного фону мутування тест-штамів - складало 3,8; 9,6; 9,1; 8,0 і 9,0 відповідно для зразків СК 11-3, СК 12-Б, СК 13-П, СК 14-Р і СК 15-М), що можна пояснити доволі високим (перевищення ГДК в 1,5-5 разів) вмістом в них таких важких металів, як Ni і Cd.

Однією з важливих переваг застосування методики Еймса

для генетичних досліджень є можливість виявляти не тільки потенційну мутагенну й канцерогенну активність індивідуальних забруднень доквілля та їх сумішей, а й можливу бактерицидну і бактериостатичну їхню дію. Як показали наші дослідження, нерозведені і деякі розведені вдвічі зразки ковбасних виробів виявилися токсичними для тест-штамів, тобто, вірогідно зразки, що досліджуються містять хімічні речовини, які володіють також і бактерицидним ефектом. Таким чином, можна припустити, що: а) мутагенний ефект екранується токсичністю зразка; б) мутагенність зразка може бути більш сильною. Наявність мутагенної активності зразків, розведених у 5 і більше разів, а також ступінь прояву ефектів і залежність ефектів від кратності розведення свідчить про їхній дійсний потужний мутагенний потенціал.

Рис. 1 Потенціальна генетична активність неорганічної фракції зразків ковбасних виробів, TA98



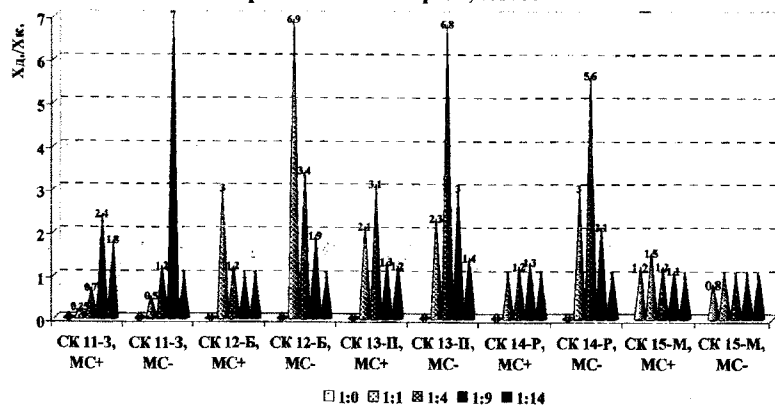
Примітки: д. - середня кількість ревертантних колоній у дослідному варіанті; к. - середня кількість ревертантних колоній у контролі; д./к. - кратність перевищення кількості ревертантів в досліді відносно контролю; МС+ - варіант дослідження з метаболічною активацією; МС- - варіант дослідження без метаболічної активації.

Таким чином, виходячи з представлених експериментальних даних щодо потенційної генетичної дії неорганічної фракції зразків ковбасних виробів відносно тест-штаму TA98 можна зробити попередній висновок, що всі перелічені види ковбас

місять хімічні речовини, здатні індукувати генні мутації за типом зсуву рамки зчитування генетичного коду.

Ефекти досліджуваних зразків на тест-штамі *S. typhimurium* TA100 (рис. 2) виявилися аналогічними ефектам на штамі TA98 з незначними розбіжностями: зразки СК 15-М були інертними відносно штаму TA100, тоді як на штамі TA98 у варіантах без активації спостерігали залежний від кратності розведення ефект. Більшу активність виявили зразки ковбаси СК 11-3 на штамі TA100 в обох варіантах дослідження. Токсичними для тест-організмів були тільки нерозведені зразки. Таким чином зрозуміло, що у зразках ковбас, що досліджувались, містяться хімічні речовини здатні індукувати генні мутації за типом заміни пар нуклеотидних основ і речовини з бактерицидною дією.

Рис. 2 Потенційна генетична активність неорганічної фракції зразків ковбасних виробів, TA 100

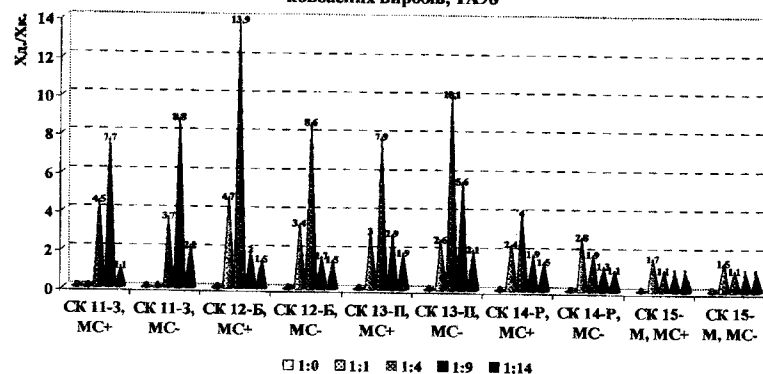


Більш різноманітну картину прояву мутагенних ефектів спостерігали при тестуванні органічної фракції зразків (рис. 3,4). По-перше, на тест-штамі TA98 (рис. 3) деякі зразки - СК 12-Б, МС+ і СК 13-П, МС- показали мутагенний ефект середньої сили (за нашою класифікацією) [5], що свідчить про наявність в ковбасах хімічних речовин, більш активних в генетичному відношенні (або великої кількості речовин, ефект яких сумується); по-друге, високий ступінь активності зразків у варіантах з метаболічною активацією є доказом того, що в них містяться

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

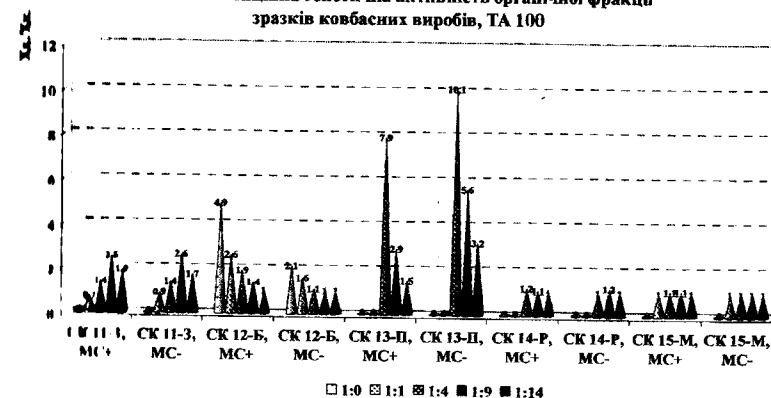
речовини, ефекти яких обумовлені їхніми можливими метаболітами, у той час, як ефекти у варіантах без активації обумовлюються первинною хімічною структурою речовин.

Рис. 3 Потенційна генетична активність органічної фракції зразків ковбасних виробів, TA98



Максимальний ефект був зафіксований для зразків СК 12-Б у варіантах з активацією (перевищення контрольних значень у 13,9 разів) з явною залежністю ефекту від кратності розведення і з наявністю токсичної дії на тест-організми. У варіантах без активації зразки ковбаси СК 13-П також виявили мутагенні ефекти середньої сили. Решта зразків ковбас показали слабкі ефекти, за виключенням СК15-М, зразки яких є індиферентними відносно індукції генних мутацій на *S. typhimurium* в обох варіантах дослідів (МС+ і МС-).

Рис. 4 Потенційна генетична активність органічної фракції зразків ковбасних виробів, TA 100



Еволюційні аспекти сучасної біології та медичної генетики

Найменш чутливим до дії мутагенних агентів зразків, що досліджуються, є тест-штам *S. typhimurium* TA100 (рис. 4). Так, тільки п'ятикратно розведений зразок СК 13-П у варіанті без метаболічної активації показав здатність індукувати ефекти середньої сили. Два зразки (СК 14-Р і СК 15-М) не володіли генетичною активністю і решта два - слабкою активністю.

Висновки

Таким чином, отримані нами експериментальні дані щодо потенційної мутагенної і канцерогенної дії зразків п'яти видів сирокочених ковбас свідчать про наявність у ковбасах хімічних речовин, з одного боку, здатних індукувати генні мутації за різними механізмами дії, з другого - прямої і непрямой дії, а також речовин з токсичними властивостями відносно тест-організмів. Цими речовинами можуть бути важкі метали, мутагенна дія яких описана в роботах [18], гетероциклічні аміни, поліциклічні ароматичні вуглеводи, харчові добавки, нітрати, нітрити, N-нітрозосполуки [17]. Ці речовини додаються у ковбасні вироби для покращення смакових властивостей або зовнішнього вигляду продукту, або утворюються у процесі виготовлення ковбас. Так чи інакше, але величезна кількість цих сполук потрапляє в організм людини і може здійснювати значний генетичний тиск на спадковий апарат. Ідентифікувати всі без винятку хімічні речовини, що містяться у ковбасних виробках і встановити їхню потенційну мутагенну/канцерогенну небезпеку неможливо. Тому застосування експрес-методів для відносно дешевого і достатньо надійного виявлення генетичної активності суміші речовин, що містяться в термічно оброблених м'ясо- і рибопродуктах з метою: 1) запобігання або обмеження потрапляння їх в кінцевий продукт, 2) зміни технологічних підходів до виготовлення цих продуктів, 3) заміни барвників, наповнювачів і консервантів на більш безпечні аналоги - є виправданим і логічним.

Перспективи подальших досліджень. Наявність потенційної генетичної активності в зразках цих продуктів є підставою для спроби оцінити генетичну небезпеку використання означених видів ковбас для людини.

Література

1. Берлин А. Я. *Техника лабораторной работы в органической химии* / Берлин А. Я. - М.: Гос. науч.-технич. изд-во хим. лит-ры, 1952. - 297 с.
2. Булдаков А.С. *Пищевые добавки : справочник* / Булдаков А.С. - СПб.: Ut, 1996. - 240 с.
3. *Методические рекомендации по экспериментальной оценке суммарной мутагенной активности загрязнений воздуха и воды.* - Москва, 1990. - 25 с.
4. Дуган А. М. *Salmonella typhimurium как тест-система для выявления мутагенной активности загрязнителей окружающей среды* / А. М. Дуган // *Цитология и генетика.* - 1994. - Т. 28, № 3. - С. 32 - 35.
5. Дуган А.М. *Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса* / А.М.Дуган, В.С.Журков, С.К.Абилев // *Цитология и генетика.* - 1990. - Т. 24. - С. 41-45.
6. Мезенова О. Я. *Технология, экология и оценка качества копченых продуктов* / О.Я.Мезенова, Н.И.Ким. - СПб.: ГИОРД, 2009. - 488 с.
7. *Методические рекомендации по применению теста Эймса Salmonella/микросомы: МЗ СССР.* - М., 1983. - 27 с.
8. *Методические указания по экспериментальной оценке суммарной мутагенной активности загрязнений воздуха и воды* / В. В. Соколовский, В. С. Журков, Ю. А. Рахманин, А. М. Дуган. - М.: [s. n.], 1990. - 26 с.
9. Перкель Т. П. *Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов: учебное пособие* / Т.П.Перкель. - Кемерово, Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2004. - 100 с.
10. *Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на Salmonella : методические указания* / Л.М.Фонштейн, Л.М.Калинина, Г.Н.Полухина [и др.]. - М., 1977. - 52 с.
11. Aeschbacher H. U. *Liquid preincubation mutagenicity test for food* / H.U.Aeschbacher, U.Wolleb, L. Porchet // *J. Food Safety.* - 1987. - Vol. 8. - P. 167-177.

12. Ames B. N. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection / B. N. Ames, W. E. Durston, E. Yamasaki [e. a.] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1973. - Vol. 70. - P. 2281-2285.

13. Ames B. N. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome test / B. N. Ames, Y. McCann, E. Yamasaki // *Mutat. Res.* - 1975 - Vol. 31. - P. 347 - 364.

14. Antioxidative and antimutagenic activities of 70% ethanol extract from masou salmon (*Oncorhynchus masou*) / Oh Hyun-Taek, Kim Soo-Hyun, Choi Hyun-Jin [e. a.] // *Toxicol. in Vitro.* - 2008. - Vol. - P. 1484-1488.

15. A standardized procedure for quantification of the Ames salmonella/mammalian microsome mutagenicity test / W. L. Yr. Belser, S. D. Shaffer, R. D. Bliss [e. a.] // *Environm. Mutagen.* - 1981. - Vol. 3. - P. 123 - 139.

16. Goldman R. Food mutagens / R. Goldman, P. G. Shields // *J. Nutr. Suppl.* - 2003. - Vol. 133. - P. 965S - 973S.

17. Jagerstad M. Genotoxicity of heat-processed foods / M. Jagerstad, K. Skog // *Mutat. Res.* - 2005. - Vol. 574. - P. 156-172.

18. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination / L. Jarup // *Br. Med. Bul.* - 2003. - Vol. 68. - P. 167-182.

19. Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated *Tuber aestivum* black truffle: a preliminary study / F. Fratianni, A. Di Luccia, R. Coppola [e. a.] // *Food Chemistry.* - 2007. - Vol. 102. - P. 471-474.

20. Nolle L. M. L. Handbook of food analysis / Nolle L. M. L. - N.-Y.: CRC Press, 2004. - 860 p.

21. Ridgway K. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods / K. Ridgway, S. P. D. Lalljie, R. M. Smith // *J. Chromat.* - 2007. - Vol. 1153, Is. 1-2. - P. 36 - 53.

Резюме

Дуган О.М., Ткачова Д.Л. Потенційна генетична дія зразків ковбасних виробів на тест-організми.

За допомогою тесту Еймса з метаболічною активацією визначена потенційна генетична дія неорганічної та органічної фракцій п'яти зразків сировкопчених ковбас. Отримані експериментальні дані свідчать про наявність у ковбасах хімічних речовин, з одного боку, здатних індукувати генні мутації за різними механізмами дії, з другого - прямої і непрямой дії, а також речовин з токсичними властивостями відносно тест-організмів.

Ключові слова: мутагени, важкі метали, ковбасні вироби, *S. typhimurium* TA98, TA100, генні мутації.

Резюме

Дуган А.М., Ткачева Д.Л. Потенциальное генетическое действие образцов колбасных изделий на тест-организмы.

При помощи теста Эймса с метаболической активацией определена потенциальная генетическая активность неорганической и органической фракций пяти образцов сырокопченых колбас. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии в колбасах химических веществ, с одной стороны, способных индуцировать генные мутации с разными механизмами действия, с другой - прямого и непрямого действия, а также веществ с токсичными свойствами относительно тест-организмов.

Ключевые слова: мутагены, тяжелые металлы, колбасные изделия, *S. typhimurium* TA98, TA100.

Summary

Dugan O.M., Tkachova D.L. Potential genetic effects of sausage samples on the test organisms.

The organic and non-organic fractions of the five smoked sausage samples have been tested by means of Ames Salmonella/microsome assay for the potential genetic activity evaluation. Experimental data have shown existence of direct and non direct mutagens, bactericidal substances and the chemical substances which are able to induce gene mutations with the different mechanisms of action.

Key words: mutagens, heavy metals, sausages, *S. typhimurium* TA98, TA100.

Рецензент: д.біол.н., проф. С.М. Смірнов