

## ГЕНЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ НЕОРГАНІЧНОЇ ФРАКЦІЇ ЗРАЗКІВ КОВБАСНИХ ВИРОБІВ

Ткачова Д.Л., Дуган О.М., д-р біол. наук, професор  
Національний технічний університет України «КПІ», м. Київ

Представлені результати з визначення потенційної генетичної дії неорганічної фракції зразків сирокопчених 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.

*The non-organic fraction of the smoked sausage samples have been tested 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.*

Ключові слова: мутагенна активність, зсув рамки зчитування генетичного коду, заміна пар нуклеотидних основ, мутація, неорганічна фракція.

Копчення – традиційний спосіб обробки харчової сировини (здебільшого, м'ясної та рибної) продуктами неповного згорання деревини, що перебувають у стані диму, або бездимного коптильного середовища (коптильної рідини, гелі, солі тощо). Даний спосіб позитивно зарекомендував себе з давніх часів як метод, який дозволяє отримувати продукцію із специфічним кольором, ароматом і смаком, при цьому попереджуючи її мікробне псування та окисне прогіркання жирів [5,8].

Коптильний дим – це складна дисперсійна система аерозольного типу. Дисперсійним середовищем є парогазова суміш, яка складається з повітря, газоподібних продуктів горіння, парів коптильних речовин і водяних парів. Дисперсійна фаза представлена частками рідких і твердих речовин – продуктів неповного згорання деревини. Основна маса коптильних речовин зосереджена у дисперсійній фазі. У димі присутні частки попелу і сажі, які є небажаними домішками. У складі коптильного диму знайдені такі класи органічних сполук: органічні кислоти (оцтова, пропіонова, масляна, валеріанова, мурашина), альдегіди і кетони, спирти, феноли та їхні ефіри, аміни, поліциклічні ароматичні вуглеводні тощо [5].

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 становить 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 [8]. Факторами, що впливають на склад копченого продукту, є вид деревини, методи прямого і непрямой копчення, різні температури копчення, тип димогенератора, доступність кисню, час копчення та ін. [5].

Епідеміологічні дослідження вказують на кореляційні зв'язки між зростаючими випадками ракових захворювань шлунково-кишкового тракту і системним споживанням копчених продуктів [14].

За даними зарубіжних авторів [12,14-16,18], проведено ряд досліджень із визначення мутагенної активності конденсатів коптильного диму, коптильних препаратів і безпосередньо зразків різноманітних копчених продуктів разом з одночасним визначенням в них вмісту потенційних мутагенів/канцерогенів, таких як поліциклічні ароматичні вуглеводні, N-нітрозаміни і гетероциклічні аміни. Отримані дані у цих дослідженнях є неоднозначними і не дають у повній мірі відповіді про мутагенні/канцерогенні властивості копчених продуктів і коптильних препаратів.

Виходячи з вищесказаного, актуальним є подальше вивчення мутагенної активності м'ясопродуктів, зокрема, вироблених в Україні та отриманих різними способами копчення, визначення вмісту контамінантів і виявлення причин, що впливають на їхню варіабельність у цих продуктах.

Метою нашої роботи було вивчення потенційної мутагенної дії неорганічної фракції зразків ковбасних виробів з використанням найбільш поширеної методики Еймса на тест-організмах *Salmonella typhimurium* TA 98 (виявляє мутагени, які індукують мутації зсуву рамки зчитування генетичного коду) і TA 100 (виявляє мутагени, які індукують мутації заміни пар нуклеотидних основ).

**Матеріали і методи.** Зразки ковбас були приготовлені з таких видів сирокопчених ковбасних виробів:

1. «Зерниста» (СК 11-3). Довжина батона – 25 см; чорно-коричневого кольору, однорідний, щільний,

на зрізі червоного кольору з великими вкрапленнями шпику, із запахом копченостей. Неорганічна фракція – темно-коричневі кристали із різким запахом гару; у ДМСО утворює розчин темно-коричневого кольору.

2. «Брауншвейгська» (СК 12-Б). Довжина батона – 22 см; червоно-коричневого кольору, однорідний, щільний, на зрізі червоного кольору з вкрапленнями шпику, із запахом ковбаси. Неорганічна фракція – буро-чорні кристали з різким запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин чорно-коричневого кольору.

3. «Пікантна» (СК 13-П). Довжина батона – 25 см; коричневого кольору, однорідний, щільний, на зрізі коричневого кольору з вкрапленнями шпику, із запахом ковбаси. Неорганічна фракція – світло-коричневі кристали з нерізким запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин жовто-коричневого кольору.

4. «Різдяна» (СК 14-Р). Довжина батона – 25 см; темно-коричневого кольору, нерівна поверхня за рахунок шпику, щільний, на зрізі коричневого кольору із великими вкрапленнями шпику із запахом ковбаси. Неорганічна фракція – світло-коричневі кристали із запахом ковбаси; у ДМСО утворює розчин світло-коричневого кольору.

5. «Московська» (СК 15-М). Довжина батона – 25 см; червоно-коричневого кольору, нерівна поверхня за рахунок шпику, щільний, на зрізі червоного кольору з вкрапленнями шпику, із запахом в'яленого м'яса. Неорганічна фракція – чорно-коричневі дрібнозернисті кристали з різким запахом гару; у ДМСО утворює розчин темно-коричневого кольору.

**Отримання екстрактів.** Ковбасні вироби – складні гетерогенні системи, які включають, окрім природних компонентів, контамінанти та речовини, що вносяться із технологічними цілями.

У нашій роботі ми застосували таку схему екстракції. На першому етапі за загальними рекомендаціями [1,17] 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 декантовували. 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.

На останньому етапі неорганічну фракцію висушували і зберігали у темному скляному посуді при температурі (+2-4) °С. Сухий залишок розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО) [7]. Досліджували зразки, розведені у співвідношеннях – 1:0; 1:1; 1:4; 1:9, 1:14.

Експериментальні дослідження потенційної генетичної дії екстрактів здійснювали згідно з Методичними рекомендаціями [3,4,8,10,11,13]. Оцінку потенційної генетичної активності зразків, що досліджувались – згідно [9].

Відбір, підготовку проб і атомно-абсорбційний аналіз для визначення вмісту важких металів у зразках ковбасних виробів проводили з використанням рекомендацій нормативно-технічної документації (ГОСТ 9792-73, ГОСТ 30178-96).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Експериментальні дані з потенційної сумарної мутагенної дії зразків неорганічної фракції ковбас представлені на рисунках 1,2. Хімічний аналіз всіх 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 обумовлена, в основному, вмістом у 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 фракції була виявлена на обох тест-штамах *S. typhimurium* як у відсутності системи метаболічної активації (варіант дослідів МС-), так і у її присутності (варіант дослідів МС+), що свідчить про наявність у 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 коштовні фізико-хімічні дослідження. Ця ідея вперше була оприлюднена в роботах [3,4,9].

Із п'яти досліджуваних зразків на тест-штамі *S. typhimurium* ТА 98 (рис. 1) генетична активність була виявлена у всіх, причому більш виражені ефекти спостерігали у варіантах дослідів без метаболічної активації (перевищення контрольних значень ( $\bar{X}_d/\bar{X}_k$ )) – 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 3 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 довкілля і їхніх сумішей, а й можливу бактерицидну і бактериостатичну їхню дію. Як показали наші дослідження, незрозумілі і деякі розведені двічі 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 свідчать про дійсний їхній потужний мутагенний потенціал.

Рис. 1 Потенціальна генетична активність неорганічної фракції зразків ковбасних виробів, ТА98

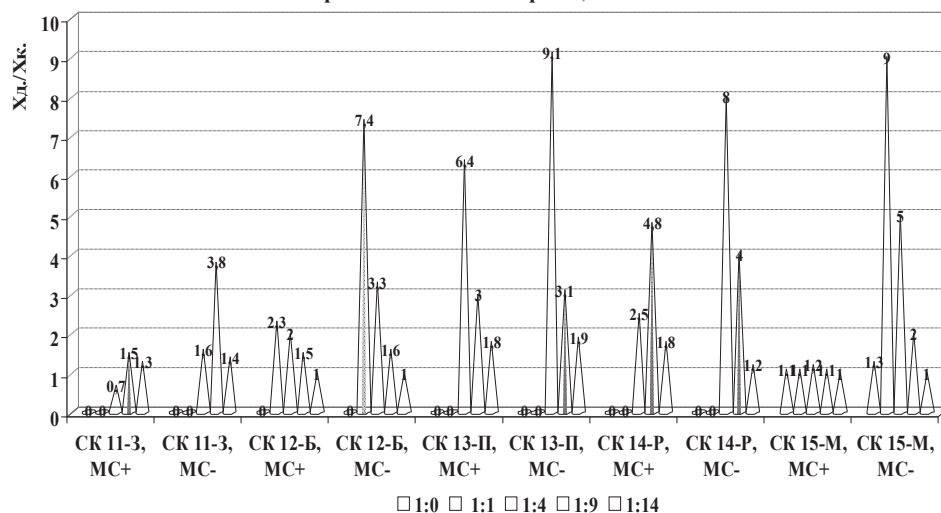
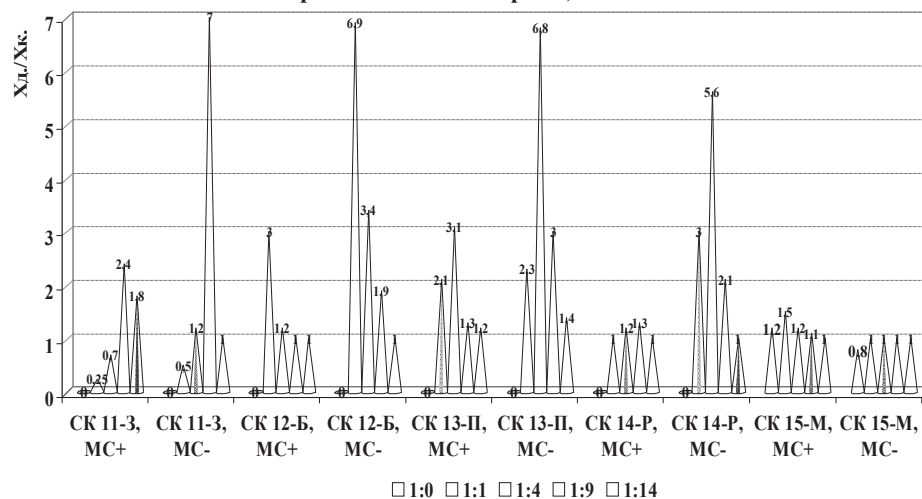


Рис. 2 Потенційна генетична активність неорганічної фракції зразків ковбасних виробів, ТА 100



Таким чином, виходячи з представлених експериментальних даних щодо потенційної генетичної дії неорганічної фракції зразків ковбасних виробів відносно тест-штаму *S. typhimurium* ТА 98, можна зробити попередній висновок, що всі перелічені види ковбас містять хімічні речовини, здатні індукувати генні мутації за типом зсуву рамки зчитування генетичного коду.

Ефекти досліджуваних зразків на тест-штамі *S. typhimurium* ТА 100 (рис. 2) виявилися аналогічними ефектам на ТА 98 з незначними розбіжностями: зразки СК 15-М були інертними відносно ТА 100, тоді як на ТА 98 у варіантах без активації спостерігали залежний від кратності розведення ефект. Більшу активність виявили зразки ковбаси СК 11-3 на тест-штамі ТА 100 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.

#### Висновки

Результати наших досліджень потенційної мутагенної дії неорганічної фракції сирокопчених ковбас показали:

1. Мутагенну дію неорганічної фракції на тест-організми, зумовлену, здебільшого, вмістом важких металів, особливо Cd та Ni;
2. Присутність у неорганічній фракції неідентифікованих сполук, які є непрямими мутагенами, оскільки для проявлення свого ефекту потребують системи метаболічної активації;
3. Присутність хімічних сполук, що входять до складу досліджуваної фракції і викликають генні мутації за типом заміни пар нуклеотидних основ і зсуву рамки читування генетичного коду;
4. Присутність хімічних сполук неорганічної фракції, які проявляють бактерицидний ефект, який може екранувати їхню більш потужну генотоксичну дію.

#### Література

1. Берлин А. Я. Техника лабораторной работы в органической химии. – М.: Гос. науч.-технич. изд-во хим. лит-ры, 1952. – 297 с.
2. Булдаков А.С. Пищевые добавки. Справочник. – СПб.: „Ut”, 1996. – 240 с.
3. Методические рекомендации по экспериментальной оценке суммарной мутагенной активности загрязнений воздуха и воды. – Москва, 1990. – 25 с.
4. Dugan A.M. Salmonella typhimurium as a test-system for detecting mutagenic activity of environmental pollutants//Cytologia i Genetica. – 1994. – Vol. 28, N3. – P. 32-35.
5. Мезенова О. Я., Ким Н. И. Технология, экология и оценка качества копченых продуктов. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 488 с.
6. Методические рекомендации по применению теста Эймса Salmonella/микросомы: МЗ СССР. – М., 1983. – 27 с.
7. 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.
8. Перкель Т. П. Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов: Учебное пособие/ Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2004. – 100 с.
9. Фонштейн Л.М., Калинина Л.М., Полухина Г.Н. и др. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на Salmonella (Методические указания). – М., 1977. – 52 с.
10. Ames B. N., Durston W. E. Yamasaki E. et al. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1973. - Vol.70. - P. 2281-2285.
11. Ames B.N., McCann Y., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome test// Mutat. Res. – 1975 – Vol. 31. – P. 347 – 364.
12. [Asita A.O.](#), [Matsui M.](#), [Nohmi T.](#) et al. Mutagenicity of wood smoke condensates in the Salmonella/microsome assay // [Mutat. Res.](#) – 1991. - Vol. 264, № 1. –P. 7-14.
13. Belser W. L. Yr., Shaffer S. D., Bliss R. D. et al. // A standardized procedure for quantification of the Ames salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. –Environm. Mutagen. – 1981. – Vol. 3. – P. 123 – 139.
14. Goldman R., Shields P. G. Food mutagens // J. Nutr. Suppl. – 2003. – Vol. 133. – P. 965S –973S.
15. [Gomaa E.A.](#), [Gray J.I.](#), [Rabie S.](#) et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings // [Food. Addit. Contam.](#) – 1993. – Vol. 10, № 5. – P. 503-521.
16. Jägerstad M., Skog K. Genotoxicity of heat-processed foods // Mutat. Res. – 2005. – Vol. 574. – P. 156–172
17. Nollet L. M. L. Handbook of food analysis. – N.-Y.: CRC Press, 2004. – 860 p.
18. Putnam K. P., Bombick D. W., Avalos J. T. and Doolittle D. J. Comparison of the cytotoxic and mutagenic potential of liquid smoke food flavourings, cigarette smoke condensate and wood smoke condensate // [Food Chem. Toxicol.](#) – 1999. – [Vol. 37](#), № 11. – P. 1113-1118.