

ОСОБЕННОСТИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

**Пилипенко Л.Н., д-р техн. наук, профессор, Пилипенко И.В., канд. техн. наук, доцент,
Викуль С.И., канд. техн. наук, доцент, Гайдукевич Д.К., научный сотрудник
Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса**

Приведены данные по разработанным способам биотестирования растительных продуктов. Охарактеризованы группы потенциальных контаминантов пищевых продуктов в современных экологических условиях, а также методы и системы их диагностики.

The data on the methods developed by biological testing of plant products have been shown. Given group of potential contaminants of food products in today's environmentally-conditions. Described methods and systems for their diagnosis.

Ключевые слова: биотестирование, методические особенности, безопасность, растительные пищевые продукты.

В настоящее время, особенно в европейских странах, изменилось отношение потребителя к пищевой продукции в сторону ужесточения требований к ее безопасности.

Основные показатели безопасности пищевых продуктов должны соответствовать международным требованиям, регламентированным в Codex Alimentarius [1, 2]. Соблюдение этих требований обязательно, но средства достижения могут быть различными. В частности, в Директиве 93/43/СЕЕ предусмотрено внедрение на пищевых предприятиях системы автоматизированного контроля, основанного на идентификации параметров в критических точках, изложены основные принципы метода НАССР, позволяющего гарантировать безопасность продукции. Этот метод занимает ведущее место в мировой пищевой индустрии.

Ряд отечественных и большинство зарубежных пищевых предприятий уже внедрили или планируют внедрить в ближайшее время систему обеспечения безопасности пищевых продуктов НАССР. Это система анализа опасности по критическим точкам, гарантирующая контроль по всем стадиям производства пищевых продуктов.

Система НАССР разрабатывается и применяется для конкретного продукта, как уже производимого на определенных производственных линиях, так и для вновь разрабатываемого при специфической угрозе или группе угроз. Начальное, важное звено системы - анализ процесса производства продукта, анализ риска, оценка вероятности возникновения опасных ситуаций, определение критических точек контроля на участках, представляющих наибольшую опасность с точки зрения ухудшения качества или порчи продукта.

По данным американского Совета по качеству окружающей среды [3] ежегодно в мире синтезируется примерно четверть миллиона новых химических соединений, из которых от пятисот до тысячи начинают изготавливаться промышленностью. Значительная часть этих соединений в тех или иных количествах попадает в окружающую среду и накапливается в воде, почве, растительности, животных организмах, биотрансформируется в продовольственное сырье и продукты его переработки. Водные объекты, атмосфера, почвы в промышленных регионах представляют собой, по существу, химические реакторы, где при сопутствующем воздействии солнечного излучения, радиации, тепловых полей могут взаимодействовать многие тысячи соединений самой различной природы. В результате протекающих в этих условиях химических и биохимических реакций образуются новые соединения, зачастую обладающие выраженной негативной биологической активностью.

Возможные негативные последствия влияния антропогенного загрязнения на природные экосистемы и человека обычно оцениваются по результатам измерения содержания конкретных веществ в атмосфере, воде, почве. Критерием оценки степени опасности воздействия при этом является соответствие величин измеряемых концентраций нормированным показателям - предельно допустимым концентрациям (ПДК). В рамках ISO (Международная организация по стандартизации) и Госпотребстандарта Украины существуют санитарные правила и нормы, в которых указаны допустимые уровни (концентрации) в продуктах питания и продовольственном сырье тяжелых металлов, мышьяка, нитратов, пестицидов, радионуклидов, ряда таких относительно новых опасных веществ как акриламид, полициклические ароматические углеводороды, микробиологические нормативы, а также медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов [2, 4].

В основе системы контроля перечисленных химических показателей лежат методы и приборные средства, разработанные для аналитической химии и предназначенные для идентификации и количественного определения конкретных компонентов сложных смесей. Причем выделение определенных компонентов из одного и того же объекта требует использования самых различных методических приемов, сложных подготовительных процедур и, наконец, использования принципиально различной аппаратуры. Этот подход при контроле природных объектов, каковыми являются различные виды и сорта пищевого растительного сырья, встречает принципиальные трудности из-за чрезвычайно большого числа различных компонентов в объектах.

В связи с изложенным целесообразна разработка и совершенствование биологических методов для контроля качества на всех этапах от выращивания до производства пищевых продуктов. Поэтому целью работы явилось исследование и совершенствование биотестирования как интегрального метода предварительной оценки растительных продуктов для эффективного управления качеством продукции.

Методы биотестирования как методический прием определения влияния отдельных соединений либо их системы, которыми являются сырье и продукты питания, на используемые в качестве тест-культур биологические объекты в последние десятилетия приобрели особую актуальность. О перспективности и важности биотестирования можно судить по практически всемирному ареалу использования метода, а также по более 120 видам тест-культур, применяемых для проведения анализа. Тем не менее, сочное растительное сырье обладает исключительным сортовым и видовым разнообразием, переменными особенностями биохимического состава, физико-химических и структурно-механических свойств. В связи с этим применять непосредственно известные методы биотестирования невозможно.

При отборе биотестов использовали такие основные критерии, как: чувствительность к широкому спектру анализируемых веществ; индикативность к различным видам токсичности, например, цитотоксичности и генотоксичности; тест-организмы, материалы и оборудование для анализов должны быть всегда в наличии или легко получаемы; выполняемые анализы должны быть безопасны и не допускать дополнительного загрязнения окружающей среды.

Проведя анализ биологических методов с использованием различных тест-культур, была избрана *Styloichia mytilus* как наиболее индикативная и чувствительная к модельным растворам ряда токсических соединений – тяжелым металлам, широко применяемым в агротехнике плодоовощного сырья пестицидам. Стандартом предусмотрено ее использование для определения токсичности сухих продуктов. Поэтому на первом этапе исследований была необходима доработка условий эксперимента и совершенствование методики применительно к сочному растительному сырью. Проводили отработку отдельных этапов метода: приемы уменьшения влажности исходного сырья, режимы экстракции токсических веществ, исследовали полярные и неполярные экстрагенты, гидромодуль при экстракции и в процессе биотестирования образцов. Проведенные исследования позволили разработать приоритетный метод интегрального биотестирования с использованием *Styloichia mytilus*.

Сравнительная оценка токсического действия модельных растворов токсикантов на тест-культуры различного уровня структурной организации по усовершенствованной либо разработанной нами приоритетной методике биотестирования приведена в табл. 1.

Полученные результаты показывают, что лучшими тест-объектами являются 1-й и 3-й, так как индикация токсичности ими проявляется при концентрациях токсиканта, равных 0,5 ПДК и даже более низких.

Индикативность методов биотестирования образцов различных видов и сортов пищевых продуктов, а также на модельных опытах была представлена нами ранее [5].

На втором этапе изучали возможность детектирования микотоксинов биотестированием, так как аналитические сведения по этому вопросу практически отсутствуют. В качестве субстратов для исследования были избраны модельные растворы токсических веществ (патулин) и различные виды растительного сырья, подвергнутого спонтанным видам микробиологической порчи. Возбудителей порчи идентифицировали по существующим в микробиологии характеристическим свойствам – морфологическим и культуральным признакам. Результаты исследований представлены в таблице 2 отдельно для водорастворимой и липорастворимой фракций, содержащих продукты метаболизма возбудителей порчи изученных видов и сортов сочного растительного сырья. Полученные экспериментальные данные показали, что реакция тест-культуры начинается с концентрации 0,4 ПДК патулина.

Как следует из приведенных в таблице 2 данных, для липорастворимых фракций сырья в большинстве случаев характерна токсичность, тогда как в водорастворимых фракциях токсичность практически отсутствует. Это может свидетельствовать о присутствии в продуктах метаболизма обнаруженных микроорганизмов-возбудителей порчи сырья микотоксинов, характерной особенностью большинства из которых является нерастворимость в воде.

Таблица 1 – Влияние модельных растворов соли свинца (Pb(NO₃)₂) на тест-культуры *Styloichia mytilus*, *Daphnia magna S.*, *Allium cepa*

№ образца	Концентрация токсиканта, ПДК	Тест-культуры						Примечание
		<i>Styloichia mytilus</i>		<i>Daphnia magna S.</i>		<i>Allium cepa</i>		
		Количество просмотренных особей, шт.	Выживаемость, %	Количество просмотренных особей, шт.	Выживаемость, %	Количество просмотренных клеток, шт.	Количество аномальных клеток, %	
1	0,10	107	99,1	50	100,0	280	0,12	–
2	0,25	105	92,8	55	92,0	340	0,39	
3	0,50	98	50,3	65	78,6	270	1,12	
4	0,75	115	21,0	73	52,1	203	3,75	Наблюдается склеивание хромосом в метафазе.
5	1,00	120	4,7	62	41,3	169	8,27	
6	1,25	117	0	60	32,8	243	10,03	Наблюдается потеря хроматид в анафазе, образование гигантских клеток
7	1,50	98	0	65	23,0	242	12,98	
8	2,00	105	0	70	0	150	18,42	

Примечание. ПДК = 0,5 мг/дм³

Проведенный нами предварительный анализ исследуемых образцов показал, что концентрации в них тяжелых металлов (свинца, кадмия, меди) и основных пестицидов (изомеров ГХЦГ – гексахлорциклопексана, ДДТ – дихлордифенилтрихлорметилметана и др.) не превышают допустимых нормативов или практически отсутствуют.

Таблица 2 – Определение токсичности продуктов метаболизма возбудителей микробиологической порчи растительного сырья

Номер образца	Исследуемый материал	Микроорганизмы - возбудители порчи сырья	Количество <i>Styloichia mytilus</i> в начале экспозиции, шт.	Количество <i>Styloichia mytilus</i> через 1 час экспозиции, шт.	Выживаемость <i>Styloichia mytilus</i> , %	Степень токсичности
1	2	3	4	5	6	7
Липорастворимая фракция						
1	Огурцы (Одесский регион)	Микроорганизмы рода <i>Penicillium</i>	58	50	82,2	Не токсичны
2	Огурцы (Николаевская область)	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Colletotrichum</i> , <i>Aspergillus</i>	48	0	0	Токсичны
3	Яблоки	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Aureobasidium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>	59	13	22,0	Токсичны

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
4	Айва	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Aureobosidium</i> , <i>Pullularia</i> , <i>Aspergillus</i>	61	30	49,2	Токсична
5	Виноград	Микроорганизмы родов <i>Phoma</i> , <i>Penicillium</i>	58	28	48,2	Токсичный
6	Груши	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Candida</i> , <i>Pullularia</i>	64	25	39,1	Токсичны
7	Томаты	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Penicillium</i> , <i>Pullularia</i>	79	10	15,0	Токсичны
8	Баклажаны	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Penicillium</i> , <i>Pullularia</i>	105	12	11,4	Токсичны
9	Сыр	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Penicillium</i> , <i>Endomyces</i>	67	1	0	Токсичный
Водорастворимая фракция						
1	Огурцы (Одесский регион)	Микроорганизмы рода <i>Penicillium</i>	60	52	86,7	Не токсичны
2	Огурцы (Николаевская область)	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Colletotrichum</i> , <i>Aspergillus</i>	57	53	93,0	Не токсичны
3	Томаты	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Penicillium</i> , <i>Pullularia</i>	59	57	98,2	Не токсичны
4	Айва	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Aureo-bosidium</i> , <i>Aspergillus</i>	52	52	100,0	Не токсична
5	Яблоки	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Gloesporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichothecium</i>	48	31	64,5	Слаботоксичны

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
6	Груши	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Candida</i> , <i>Pullularia</i>	51	40	78,4	Слабо-токсичны
7	Виноград	Микроорганизмы родов <i>Phoma</i> , <i>Penicillium</i>	53	50	94,3	Не токсичный
8	Баклажаны	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Penicillium</i> , <i>Pullularia</i> .	122	113	92,6	Не токсичны
9	Сыр	Смешанные культуры микроорганизмов родов <i>Penicillium</i> , <i>Endomyces</i>	68	58	76,7	Слабо-токсичный

Аналогичные тенденции были обнаружены нами при изучении перечисленных образцов с применением тест-культуры *Daphnia magna Straus*.

Таким образом, химические методы оценки качества даже с использованием современной приборной базы из-за недостатка сведений о биологической составляющей анализируемых веществ не всегда дают необходимые результаты, не учитывают взаимодействия загрязняющих веществ, их трансформацию как в среде, так и в организме. С помощью биотестирования можно определить токсичность объекта, который по результатам химического анализа не содержит вредных примесей, и в тоже время обнаружение токсичного вещества не обязательно означает токсичности продукта согласно биологическим критериям. Поэтому целесообразно в биотестировании применение комплексного подхода (как на организменном, так и клеточном уровнях) для получения объективной характеристики качества пищевых продуктов, разработки стратегии различных регулирующих мер по снижению риска их контаминированности токсикантами и контаминантами.

Важнейшими условиями для адекватной предварительной токсиколого-гигиенической характеристики контаминированности пищевых продуктов опасными для человека загрязнителями являются использование биотестов и способов повышения эффективности их применения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что проведение биотестирования по разработанной методике позволяет идентифицировать наиболее важные по результатам ранжирования факторы риска в сочном растительном сырье.

Литература

1. Каталог стандартів, настанов та інших документів Кодексу Аліментаріус (CODEX ALIMENTARIUS) 2009 р.
2. Проекти Законів України «Про здійснення державного контролю безпечності харчових продуктів та кормів, здоров'я та благополуччя тварин», «Про новітні харчові продукти», наказ МОЗ України «Про затвердження мікробіологічних критеріїв для встановлення показників безпечності харчових продуктів». – Матеріали НККА (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION of UKRAINE). – 2012 р.
3. Блэкберн Клив де В. Микробиологическая порча пищевых продуктов// Пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.
4. Пилипенко Ю.Д., Пилипенко Л.М. Державні нормативні документи на сировину, напівфабрикати, матеріали та консервовану продукцію. Показники безпечності та якості / Методичні вказівки. Видання офіційне // Мінагрополітики України. – Київ, 2009, – 114 с.
5. Пилипенко Л.Н. и др. Обоснование и разработка методического обеспечения современных методов детектирования факторов риска опасности пищевых продуктов / А.В. Егорова, И.В. Пилипенко, С.И. Викуль, Д.К. Гайдукевич, Н.С. Пронькина // Матер. за УІІ Межд. научна практична конф. «Будущее изследвания-2011», 17-25 февруари 2011. – Т.13 «Экология. Селскостопанство. Ветеринарна наука»: София «БялГРАД-Ы» ООД. – 2011. – С. 67-76.