

УДК 575.224.4:579.253.4:637.524

МУТАГЕННІ ТА ТОКСИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КОМПОНЕНТІВ ДЕЯКИХ ЗРАЗКІВ КОВБАСНИХ ВИРОБІВ У ТЕСТІ ЕЙМСА

Д.Л. ТКАЧОВА, О.М. ДУГАН

Національний технічний університет України "КПІ"
Україна, 03056, м. Київ, пр-т Перемоги, 37, корпус 4,
факультет біотехнології і біотехніки
e-mail: biotech@ntu-kpi.kiev.ua

За допомогою тесту Еймса з метаболічною активацією та без неї визначено потенційну мутагенну дію неорганічної та органічної фракцій п'яти зразків сирокопчених ковбас. Отримані експериментальні дані свідчать про наявність у ковбасах хімічних речовин прямої і непрямой мутагенної дії, здатних індукувати генні мутації за різними механізмами, а також речовин із токсичними властивостями відносно тест-організмів.

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

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 та 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 згоряння 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 такі 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 істотної частини копченого продукту. Вважається, що при холодному копченні на продукті осаджується менше бенз(а)пірену, ніж при га-

© Д.Л. ТКАЧОВА, О.М. ДУГАН, 2009

рячому. 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 коптильних 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 як харчові добавки. Продукція, приготована з використанням коптильних середовищ (які у Європі визнані харчовими добавками), досить добре досліджена з токсикологічних позицій. Однак, через те, що коптильні препарати містять такі мутагенні речовини, як феноли, формальдегід, оцтову кислоту та ін., вкрай необхідним є проведення досліджень мутагенної активності як коптильних 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

Зразки для вивчення потенційної мутагенної дії були приготовані з наступних видів сирокопчених ковбасних виробів:

1. **“Зерниста” (СК 11-3).** Довжина батону – 25 см; чорно-коричневого кольору, однорідний, щільний, на зрізі червоного кольору з великими вкрапленнями шпикку, 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 шпикку, із запахом ковбаси. 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 виробы – складні гетерогенні системи, які включають, окрім природних компонентів, контамінанты 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] застосовуються 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 із наступним ліофільним сушінням зразків.

У нашій роботі ми застосували таку 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 декантовували. Після розділення спиртовий розчин упарювали у вакуумі водоструминного насосу на роторному випарнику.

Третій етап – розчинення сухого залишку в 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 °С.

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

Результати та обговорення

Експериментальні дані з потенційної сумарної мутагенної дії зразків органічної і неорганічної фракцій ковбас наведено на рис. 1–4. Хімічний аналіз усіх зразків на наявність в них гістидину показав негативний результат (аналіз проведено 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 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 неорганічної фракції була виявлена на обох тест-штамах як у присутності системи метаболічної активації (варіант досліду МС+), так і у її відсутності (варіант досліду 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 (у 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) генетичну активність було виявлено в усіх зразках, 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 докільця та їхніх сумішей, а й можливу бактерицидну і бактериостатичну їхню дію. Як показали наші досліді, нерозведені і деякі розведені вдвічі зразки ковбасних виробів виявилися токсичними для тест-штамів, тобто, вірогідно зразки, що досліджуються містять хімічні речовини, які мають також і бактерицидний ефект. Таким чином, можна припустити, що: а) мутагенний ефект

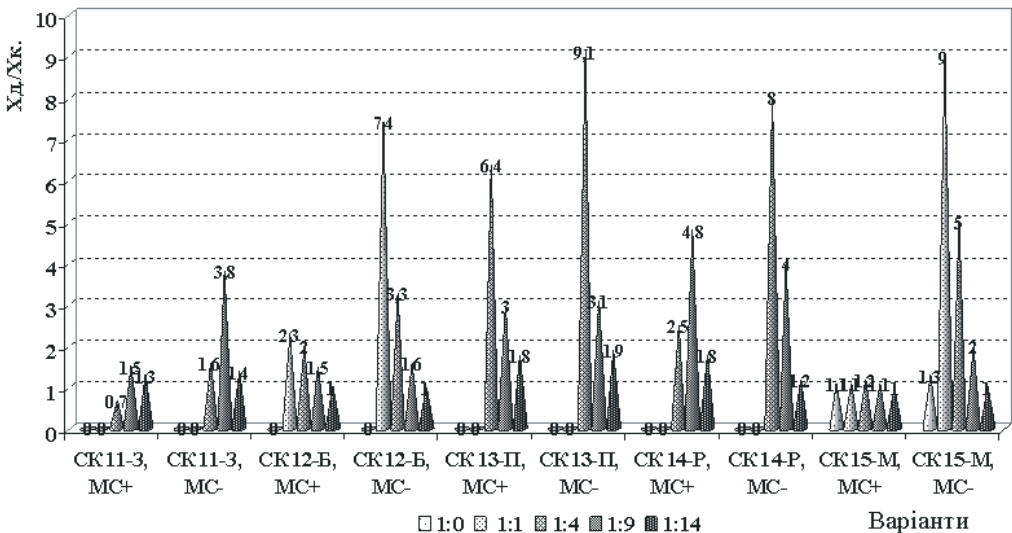


Рис. 1. Потенційна генетична активність неорганічної фракції зразків ковбасних виробів, TA98. Позначення: \bar{x}_d – середня кількість ревертантних колоній у дослідному варіанті; \bar{x}_k – середня кількість ревертантних колоній у контролі; \bar{x}_d/\bar{x}_k – кратність перевищення кількості ревертантів в досліді відносно контролю; МС+ варіант досліду з метаболічною активацією; МС- – варіант досліду без метаболічної активації

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.

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 містять 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 із 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 досліду. Ток-

сичними 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.

Різноманітнішу 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 у ковбасах хімічних речовин, активніших у генетичному відношенні (або великої кількості речовин, ефект яких сумується); по-друге, високий ступінь активності зразків у варіантах із метаболічною активацією є доказом того, що в них містяться речовини, ефекти яких обумовлені їхніми можливими метаболітами, у той час, як ефекти у варіантах без активації обумовлюються первинною хімічною структурою речовин.

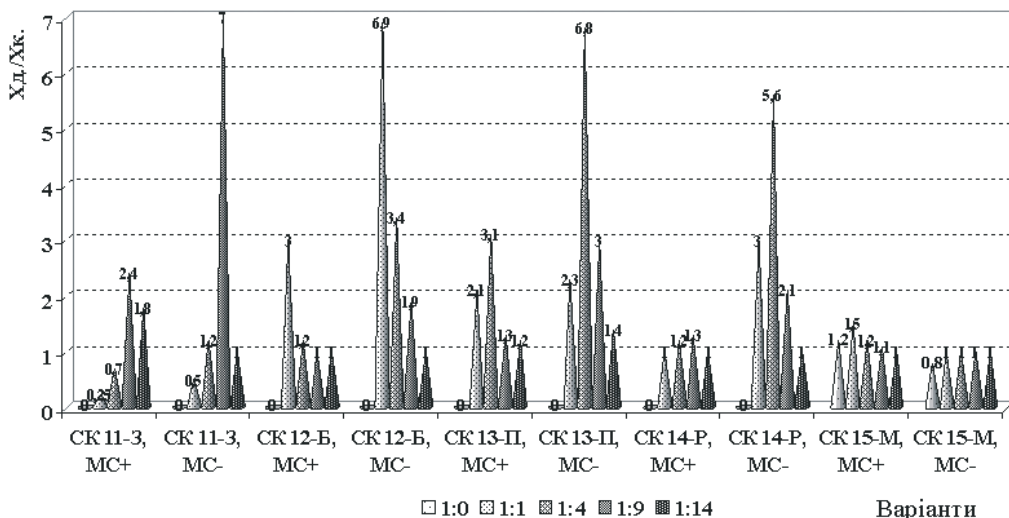


Рис. 2. Потенційна генетична активність неорганічної фракції зразків ковбасних виробів, TA 100. Позначення як на рис. 1

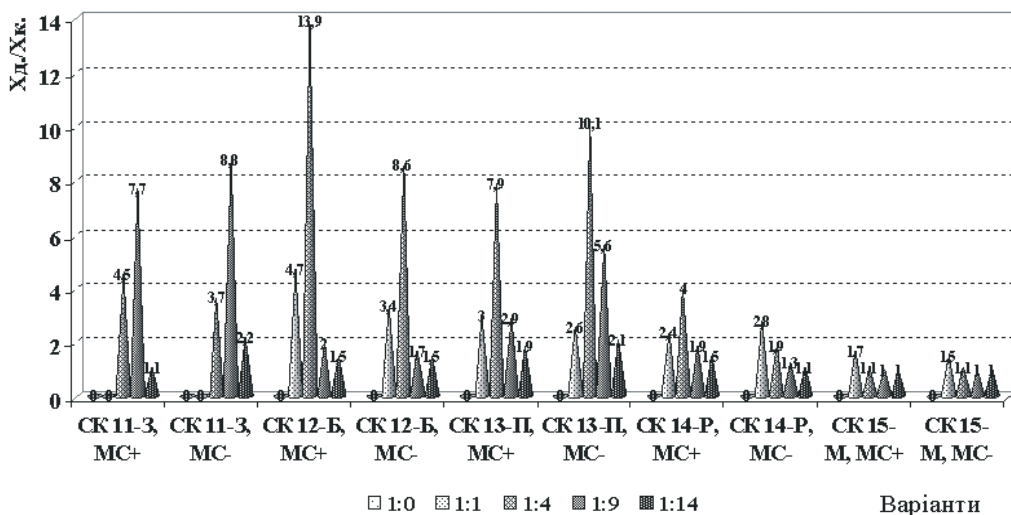


Рис. 3. Потенційна генетична активність органічної фракції зразків ковбасних виробів, ТА 100. Позначення як на рис. 1

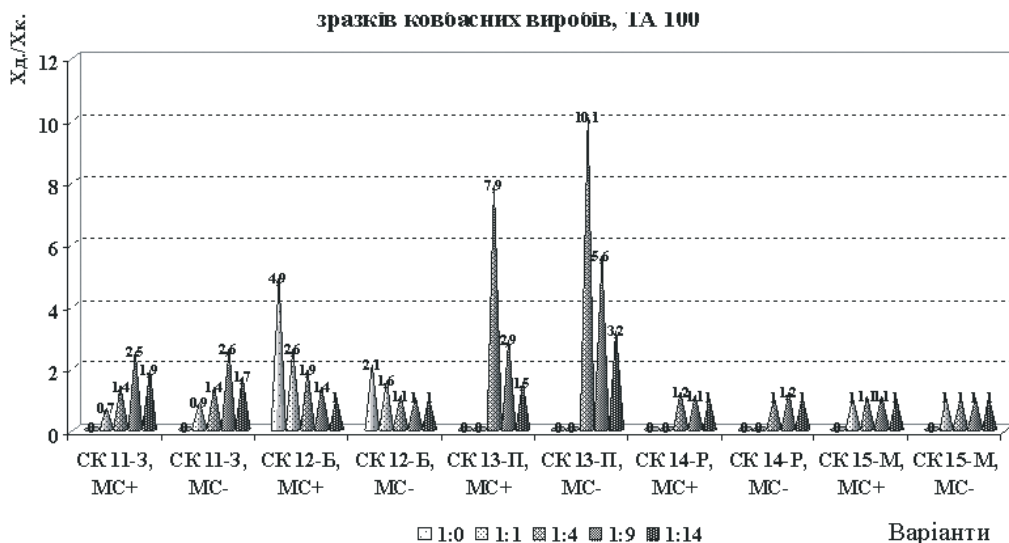


Рис. 4. Потенційна генетична активність органічної фракції зразків ковбасних виробів, ТА 100. Позначення як на рис. 1

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 винятком СК15-М, зразки яких є індіферентними відносно індукції генних

мутацій на *S. typhimurium* в обох варіантах дослідів (МС+ і МС-).

Найменш чутливим до дії мутагенних агентів зразків, що досліджувалися, 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 виявляли генетичну активність і решта два – мали слабку активність.

Висновки

Отримані нами експериментальні дані щодо потенційної мутагенної і канцерогенної дії зразків п'яти видів сировкопчених ковбас свідчать про наявність у ковбасах хімічних речовин прямої і непрямой дії, здатних індукувати генні мутації за різними механізмами, а також речовин із токсичними властивостями відносно тест-організмів. Цими речовинами можуть бути важкі метали, мутагенну дію яких описано в роботах [18], гетероциклічні аміни, поліциклічні ароматичні вуглеводи, харчові добавки, нітрати, нітрити, N-нітрозосполуки [17]. Ці речовини додають у ковбасні вироби для покращення смакових властивостей або зовнішнього вигляду продукту, або вони 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. Крім цього наявність потенційної генетичної активності в зразках цих продуктів є підставою для спроби оцінити генетичну небезпеку використання означених видів ковбас для людини.

Перелік літератури

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. Дуган А. М. *Salmonella typhimurium* как тест-система для выявления мутагенной активности загрязнителей окружающей среды // Цитология и генетика. – 1994. – Т. 28, № 3. – С. 32–35.
5. Дуган А.М., Журков В.С., Абилов С.К. Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса // Цитология и генетика. – 1990. – Т. 24. – С. 41–45.
6. Мезенова О. Я., Ким Н. И. Технология, экология и оценка качества копченых продуктов. – 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/ Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2004. – 100 с.
10. 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.

11. Aeschbacher H. U., Wolleb U., Porchet L. Liquid preincubation mutagenicity test for food // J. Food Safety. – 1987. – Vol. 8. – P. 167–177.
12. 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.
13. 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.
14. Oh H.-T., Kim S.-H., Choi H.-J. et al. Antioxidative and antimutagenic activities of 70% ethanol extract from masou salmon (*Oncorhynchus masou*) // Toxicol. in Vitro. – 2008. – Vol. – P. 1484–1488.
15. 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.
16. Goldman R., Shields P. G. Food mutagens // J. Nutr. Suppl. – 2003. – Vol. 133. – P. 965S –973S.
17. Jägerstad M., Skog K. Genotoxicity of heat-processed foods // Mutat. Res. – 2005. – Vol. 574. – P. 156–172.
18. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination // Br. Med. Bul. – 2003. – Vol. 68. – P. 167 –182.
19. Fratianni F., Di Luccia A., Coppola R. et al. Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated *Tuber aestivum* black truffle: A preliminary study // Food Chemistry. – 2007. – Vol. 102. – P. 471 – 474.
20. Nollet L. M. L. Handbook of food analysis. – N.-Y.: CRC Press, 2004. – 860 p.
21. Ridgway K. Lalljie S. P. D., Smith R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods // J. Chromat. – 2007. – Vol. 1153, Issues 1-2. – P. 36 – 53.

Представлено М.А. Пілінською
Надійшла 11.09.2009

МУТАГЕННЫЕ И ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПОНЕНТОВ НЕКОТОРЫХ ОБРАЗЦОВ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ В ТЕСТЕ ЕЙМСА

Д.Л. Ткачова, А.М. Дуган

Национальный технический университет Украины “КПИ”

Украина, 03056, г. Киев, пр-т Победы, 37, корпус 4, факультет биотехнологии и биотехники
e-mail: biotech@ntu-kpi.kiev.ua

При помощи теста Эймса с метаболической активацией и без таковой определена потенциальная мутагенная 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, *S. typhimurium* TA100, генные мутации.

MUTAGENIC AND TOXICAL PROPERTIES OF SOME SAUSAGE SAMPLES COMPONENTS IN THE AMES-TEST

D.L. Tkachova, O.M. Dugan

National Technical University of Ukraine “KPI”
Ukraine, 03056, Kyiv, Prospect Peremogy 37, building 4, College of Biotechnology and Bioengineering
e-mail: biotech@ntu-kpi.kiev.ua

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, *S. typhimurium* TA100, gene mutations.