



ISSN 2414-438X (Print)  
ISSN 2414-441X (Online)

# ***THEORY AND PRACTICE OF MEAT PROCESSING***

# ***ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ПЕРЕРАБОТКИ МЯСА***

Vol. 3 (2), 2018

**Федеральное агентство научных организаций**  
Federal Agency of Scientific Organizations  
(FANO of Russia)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН  
Federal State Budgetary Scientific Institution «V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences» (Gorbatov Research Center for Food Systems)

**Теория и практика переработки мяса**  
Theory and Practice of Meat Processing

**Учредитель и издатель:** **Founder and publisher:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Federal State Budgetary Scientific Institution «V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences»

**Главный редактор:**

**Лисицын Андрей Борисович**, доктор технических наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

**Заместитель главного редактора:**

**Чернуха Ирина Михайловна**, доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель научного направления ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

**Научный редактор:**

**Горбунова Наталия Анатольевна**, кандидат технических наук, ученый секретарь ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

**Выпускающий редактор:**

**Захаров Александр Николаевич**, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, заведующий редакционно-издательским отделом ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия.

**Адрес редакции и типографии:**

109316, Россия, Москва, Талалихина, 26,  
Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН.  
www.meatjournal.ru

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре  
Регистрационные данные:

ПИ № ФС77-71611 от 13.11.2017 года

ЭЛ № ФС77-71609 от 13.11.2017 года

Периодичность — 4 номера в год.

Издается с 2015 года.

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» 38871

Подписано в печать 29.06.18.

Тираж 1000 экз. Заказ № 112.

Типография ФНЦПС.

© ФНЦПС, 2018

ISSN 2414-438X (Print)

ISSN 2414-441X (Online)

**Редакционная коллегия:**

**Баженова Баяна Анатольевна**, доктор технических наук, доцент, профессор кафедры «Технология мясных и консервированных продуктов» ФГБОУ ВПО Восточно-Сибирский университет технологии и управления, г. Улан-Удэ, Россия

**Белозеров Георгий Автономович**, доктор технических наук, член-корреспондент РАН, директор Всероссийского научно-исследовательского института холодильной промышленности — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

**Горлов Иван Федорович**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции», г. Волгоград, Россия

**Дедерер Ирина**, кандидат технических наук, научный сотрудник Института Макса Рубнера, Кульбах, ФРГ.

**Джорджевич Весна**, доктор, директор Института гигиены и технологии мяса, г. Белград, Сербия

**Дунченко Нина Ивановна**, доктор технических наук, профессор, заведующая кафедрой «Управление качеством и товароведения продукции ФГБОУВО «Российский государственный аграрный университет имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия

**Жайлаубаев Жанибек Далелович**, доктор технических наук, Академик АСХН РК, директор СФ ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности»,

г. Семей, Республика Казахстан

**Замарацкая Галя**, доктор наук, Шведский сельскохозяйственный университет, г. Уппсала, Швеция

**Кочеткова Алла Алексеевна**, доктор технических наук, профессор, руководитель лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», г. Москва, Россия

**Мелещеня Алексей Викторович**, кандидат экономических наук, директор НПРДУП «Институт мясо-молочной промышленности», г. Минск, Республика Беларусь

**Мирошников Сергей Александрович**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства», г. Оренбург, Россия

**Римарева Любовь Вячеславовна**, доктор технических наук, профессор, Академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, заместитель директора Всероссийского научно-исследовательского института пищевой биотехнологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»,

г. Москва, Россия

**Рудь Андрей Иванович**, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник отдела генетики, биотехнологии и технологии в свиноводстве ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», г. Подольск, Россия

**Риочи Саката**, профессор, университет Аджабу, г. Сагамихара, Япония

**Семенова Анастасия Артуровна**, доктор технических наук, профессор, заместитель директора ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

**Тимошенко Николай Васильевич**, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой технология хранения и переработки животноводческой продукции Кубанского ГАУ, г. Краснодар, Россия

**Ханферьян Роман Авакович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией иммунологии, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

**Федеральное агентство  
научных организаций**

**Federal Agency of Scientific Organizations  
(FANO of Russia)**

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «Федеральный научный центр  
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН»  
Federal State Budgetary Scientific Institution  
«V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food  
Systems of Russian Academy of Sciences»  
(Gorbatov Research Center for Food Systems)

**Теория и практика переработки мяса  
Theory and Practice of Meat Processing**

**Учредитель и издатель:** **Founder and publisher:**

Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем  
им. В.М. Горбатова» РАН

Federal State Budgetary Scientific Institution  
«V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food  
Systems of Russian Academy of Sciences»

**Editor-in-Chief:**

**Andrey B. Lisitsyn**, doctor of technical sciences, professor,  
Academician of RAS, Scientific supervisor  
of FGBNU «V.M. Gorbatov Federal Research Center  
for Food Systems of Russian Academy of Sciences»,  
Moscow, Russia

**Deputy Editor-in-Chief:**

**Irina M. Chernukha**, doctor of technical sciences,  
professor, corresponding members of RAS,  
head of the scientific direction FGBNU «V.M. Gorbatov  
Federal Research Center for Food Systems of Russian  
Academy of Sciences», Moscow, Russia

**Science editor:**

**Natalia A. Gorbunova**, candidate  
of technical sciences, Academic Secretary of FGBNU  
«V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food  
Systems of Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia

**Production editor:**

**Aleksandr N. Zakharov**, candidate of technical sciences,  
senior research worker, Head of the Editorial and  
Publishing Department of FGBNU «V.M. Gorbatov Federal  
Research Center for Food Systems of Russian Academy  
of Sciences», Moscow, Russia

**Printing Office:**

109316, Talalikhina str. 26, Moscow, Russia,  
Gorbatov Research Center for Food Systems.  
www.meatjournal.ru

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре

Регистрационные данные:

ПИ № ФС77-71611 от 13.11.2017 года

ЭЛ № ФС77-71609 от 13.11.2017 года

Frequency — 4 issues a year.

Published in 2015.

Subscription index in the catalogue «Press of Russia» 38871

Signed print 29.06.18.

Circulation — 1000 copies. Order №112.

Printing house — FNCFC.

© FNCFC, 2018

ISSN 2414-438X (Print)

ISSN 2414-441X (Online)

**Editorial board:**

**Baiana A. Bazhenova**, doctor of technical sciences, docent,  
professor of the chair «Meat and canned product technology»,  
FGBOU VPO East Siberia State University of Technology and  
Management, Ulan-Ude, Russia

**Georgy A. Belozarov**, doctor of technical sciences, corresponding  
members of RAS, Director of All-Russian Scientific Research  
Institute of Refrigeration Industry — Branch of V.M. Gorbatov Federal  
Research Center for Food Systems of RAS, Moscow, Russia

**Ivan F. Gorlov**, doctor of agricultural sciences, professor,  
academician of RAS, Scientific supervisor of FGBNU «Povolzhskiy  
Research Institute of Production and Processing of Meat and Dairy  
Products», Volgograd, Russia

**Irina Dederer**, candidate of technical sciences, research worker,  
Max Rubner-Institut, Kulmbach, Germany.

**Vesna Djordjevic**, doctor, director, the Institute of Meat Hygiene  
and Technology, Belgrad, Serbia

**Nina I. Dunchenko**, doctor of technical sciences, professor, the  
head of the chair «Product quality management and merchandise  
knowledge», FGBOUBO Russian State Agrarian University —  
Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

**Zhinibek D. Zhailaubayev**, doctor of technical sciences,  
academician of the Academy of Agricultural Sciences of the  
Republic of Kazakhstan, Director of the Semey Branch of the  
Kazakh Scientific Research Institute for Processing and Food  
Industry, Semey, The Republic of Kazakhstan

**Galia Zamaratskaya**, candidate of technical sciences, docent,  
research worker, the Swedish University of Agricultural Sciences,  
Uppsala, Sweden

**Alla A. Kochetkova**, doctor of technical sciences, professor, the  
head of the «Laboratory of food biotechnologies and specialized  
products», FGBUN «Federal Research Centre of nutrition,  
biotechnology and food safety», Moscow, Russia

**Aliaksei V. Meliashchenia**, candidate of economical sciences,  
Director of NPRDUP «The Institute of Meat and Dairy Industry»  
of the Republican Unitary Enterprise «The Scientific-practical  
Center of the National Academy of Sciences of Belarus for food»,  
Minsk, the Republic of Belarus

**Sergey A. Miroshnikov**, doctor of biological sciences, professor,  
corresponding members of RAS, Director of FGBNU «The  
All-Russian Research Institute of Beef Cattle», Orenburg, Russia

**Liubov V. Rimareva**, doctor of technical sciences, professor,  
academician of RAS, Honored worker of science of the RF, deputy  
director of The All-Russian Scientific Research Institute of Food  
Biotechnology — branch FGBUN «Federal Research Centre of  
nutrition, biotechnology and food safety», Moscow, Russia

**Andrey I. Rud**, doctor of agricultural sciences, chief research  
worker of the Department of Genetics, biotechnology and  
technology in pig of FGBNU «The All-Russian Research Institute  
for Animal Husbandry named after academician L.K. Ernst»  
Podolsk, Russia

**Sakata Ryoichi**, PhD, doctor, professor of agricultural sciences,  
Azabu University, Sagamihara, Japan

**Anastasiya A. Semenova**, doctor of technical sciences, professor,  
Deputy Director of FGBNU «V.M. Gorbatov Federal Research  
Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences»,  
Moscow, Russia

**Nikolai V. Timoshenko**, doctor of technical sciences, professor,  
the head of the chair «Technology of storage and processing of  
animal products» of the Kuban State Agrarian University (Kub  
SAU), Krasnodar, Russia

**Roman A. Khanferyan**, doctor of medical sciences, professor, the  
head of the laboratory of Immunology, FGBUN «Federal Research  
Centre of nutrition, biotechnology and food safety», Moscow,  
Russia

# СОДЕРЖАНИЕ

Вострикова Н.Л., Кузнецова О.А., Куликовский А.В. МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИЦ .....	4
Батаева Д.С., Соколова О.В., Зайко Е.В., Пашкова В.В. ОЦЕНКА БАКТЕРИОЦИНОГЕННОСТИ ИНДИГЕННЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ С ТУШ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА .....	22
Павлов А.В., Рудь А.И., М.А. Занкевич ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ В ОСНОВНЫХ ОТРУБАХ (ПРЕМИАЛЬНЫХ ЧАСТЯХ) И ТУШЕ УБОЙНЫХ СВИНЕЙ .....	33
Минаев М.Ю., Махова А.А. ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ПРОКАРИОТ .....	40

# CONTENTS

Natal'ya L. Vostrikova, Oksana A. Kuznetsova, Andrey V. Kulikovskii METHODOLOGICAL ASPECTS OF LIPID EXTRACTION FROM BIOLOGICAL MATRICES .....	4
Dagmara S. Bataeva, Olga V. Sokolova, Elena V. Zajko, Victoria V. Pashkova ASSESSMENT OF THE BACTERIOCINOGENICITY OF INDIGEN LACTOBACILLUS ONTO CATTLE CARCASSES .....	22
Andrey V. Pavlov, Andrey I. Rud, Maxim A. Zankevich THE CORRELATION BETWEEN LEAN MEAT PERCENTAGE IN PRIMAL CUTS AND TOTAL LEAN MEAT PERCENTAGE IN CARCASS .....	33
Mihail Yu. Minaev., Anzhelika A. Makhova THE STUDY OF PROKARYOTIC GENE EXPRESSION .....	40

## МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИЦ

Вострикова Н.Л.,\* Кузнецова О.А., Куликовский А.В.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

**Ключевые слова:** жир, определение жира, экстракция, растворитель

### Аннотация

В работе представлены исследования по изучению степени экстрагирования сырого жира из мясных систем различными методами. Показаны сравнительные отличия методов экстракции в зависимости от полярности используемых растворителей. Жир извлекали, используя классический метод Сокслета, а также с использованием двухступенчатой экстракции. В качестве опытных образцов использовали специально приготовленные модельные системы, которые включали в себя как простую, так и многокомпонентную смесь в виде муки мясокостной, костной и мясорастительной. Выявлено что при использовании неполярных растворителей теряется большое количество полярных липидов. Показано влияние растворителя на степень экстракции глицеридов, фосфатидов, свободных жирных кислот и продуктов окисления. Приведен ряд экспериментов и представлены результаты по степени выделения жира с помощью смесей органических растворителей с минеральной кислотой. Проведенные исследования позволили выбрать наилучший метод экстракции для каждой группы мясного и мясосоудержающего сырья. По результатам работы предложены методические рекомендации по использованию гидрофобных и гидрофильных растворителей и их смесей. Рассмотрены методы извлечения липидов из пищевых продуктов после щелочного и кислотного гидролиза. Приведены примеры определения жиров инструментальными методами (рефрактометрический). Описаны классические методы определения содержания жира (методы Рэндалла, Твиссельмана, Рушковского).

Review paper

## METHODOLOGICAL ASPECTS OF LIPID EXTRACTION FROM BIOLOGICAL MATRICES

Natal'ya L. Vostrikova,\* Oksana A. Kuznetsova, Andrey V. Kulikovskii

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**Key words:** fat, determination of fat, extraction, solvent

### Abstract

The paper presents the studies on the degree of raw fat extraction from meat systems by various methods. Relative differences in extraction methods are shown depending on the polarity of solvents used. Fat was extracted using the classical Soxhlet method, as well as two-step extraction. Specially prepared model systems were used as test samples including both simple and multicomponent mixtures in the form of meat-and-bone meal, bone meal, and meat-and-plant meal. It was found that when using non-polar solvents, a large amount of polar lipids was lost. The influence of the solvent on the degree of extraction for glycerides, phosphatides, free fatty acids and oxidation products was shown. A number of experiments are presented and the results are given on the degree of fat extraction using mixtures of organic solvents with mineral acid. The studies allowed to choose the best extraction method for each type of meat and meat-containing raw materials. Based on the results, methodical recommendations are proposed on the use of hydrophobic and hydrophilic solvents and their mixtures. Methods of lipid extraction from food products after alkaline and acid hydrolysis are considered. Examples of fat determination by instrumental methods (refractometry) are given. Classical methods for fat content evaluation are described (Randall method, Twisselmann method, and Rushkovsky method).

### Введение

Липидами (от греч. lipos — жир) называют сложную смесь органических соединений с близкими физико-химическими свойствами, которая содержится в растениях, животных и микроорганизмах. Липиды широко распространены в природе и вместе с белками и углеводами составляют основную массу органических веществ всех живых организмов, являясь обязательным компонентом каждой клетки.

Они широко используются при получении многих продуктов питания, являются важными компонентами пищевого сырья, полуфабрикатов и готовых пищевых продуктов, во многом определяя их пищевую и биологическую полноценность и вкусовые качества [1,2].

Липиды не растворимы в воде (гидрофобны), хорошо растворимы в органических растворителях (бензине, диэтиловом эфире, хлороформе и др.).

**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:** Вострикова Н.Л., Кузнецова О.А., Куликовский А.В. Методические аспекты извлечения липидов и биологических матриц. Теория и практика переработки мяса. 2018; 3(2): 4–21. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-4-21

**FOR CITATION:** Vostrikova N.L., Kuznetsova O.A., Kulikovskii A.V. Methodological aspects of lipid extraction from biological matrices. Theory and practice of meat processing. 2018; 3(2): 4–21. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-4-21

В растениях липиды накапливаются главным образом, в семенах и плодах. Ниже приведено содержание липидов (%) в разных культурах: арахис (ядро) — 50–68; какао (бобы) — 49–57; подсолнечник — 30–58; соя (семена) — 15–25; кукуруза — 5,6; гречиха — 3,8; рис — 2,9; пшеница — 2,7.

У животных и рыб липиды концентрируются в подкожных, мозговой и нервных тканях и тканях, окружающих важные органы (сердце, почки). Содержание липидов в тушке рыбы (осетров) может достигать 20–25 %, сельди — 10 %; у туш наземных животных оно сильно колеблется: 33 % (свинина), 9,8 % (говядина), 3,0 % (поросята). В молоке оленя — 17–18 %, козы — 5,0 %, коровы — 3,5–4,0 %. Содержание липидов в отдельных видах микроорганизмов может достигать 60 % [3].

По химическому строению липиды являются производными жирных кислот, спиртов, альдегидов, построенных при помощи сложноэфирной, простой эфирной, фосфоэфирной, гликозидной связей. Липиды делят на две основные группы: простые и сложные липиды. К простым нейтральным липидам (не содержащим атомов азота, фосфора, серы) относят производные высших жирных кислот и спиртов, глицериды, воски, эфиры холестерина, гликопептиды и другие соединения. Молекулы сложных липидов содержат в своём составе не только остатки высокомолекулярных карбоновых кислот, но и фосфорную или серную кислоты.

Липиды — важные ингредиенты пищи человека, так как обладают высокой энергетической ценностью и являются источником пластического материала для тканей организма. Отдельные компоненты жира — некоторые жирные кислоты, фосфатиды, стеролы, жирорастворимые витамины — выполняют важные биологические функции в организме. Липиды — вещества растительного и животного происхождения, растворимые в органических растворителях и малорастворимые в воде, содержащие в молекуле высшие алкильные или ацильные радикалы.

При количественном определении липидов в исследуемом объекте предусматривается извлечение из него глицеридов и сопутствующих им веществ (пигментов, витаминов, свободных жирных кислот, фосфатидов и др.) [4,5].

Существующие методы определения содержания жира в различных видах сырья и продуктов можно условно подразделить на две группы — одноступенчатые и двухступенчатые.

Одноступенчатые методы, основанные на использовании ультразвука, ядерно-магнитного резонанса, фотометрии и инфракрасных лучей, позволяют проводить количественное определение жира непосредственно в исследуемом объекте. Однако для этого требуется сложное и дорогостоящее оборудование, а применение некоторых из них (например, метод ядерно-магнитного резонанса) рекомендуется в слу-

чае невозможности использования какого-либо другого метода для установления количества определяемого вещества в объекте.

Большинство физико-химических методов (экстракционно-весовые, рефрактометрические и др.), применяемых для количественного определения жира, относятся ко второй группе. Характерной особенностью их является двухступенчатость — извлечение жира из объекта и количественное определение его. Для извлечения жира используются различные органические растворители — бензин, петролейный эфир, серный эфир, ацетон, хлороформ, монобром- и монохлорнафталин, трикрезилортофосфат и др. Следует иметь в виду, что гидрофобные растворители (петролейный эфир, бензин и др.) извлекают вместе с глицеридами несколько меньше сопутствующих им веществ. При этом выделение их происходит селективно. Более быстро извлекаются глицериды, и медленнее — фосфатиды, свободные жирные кислоты и продукты окисления. В связи с этим, при применении гидрофобного растворителя процесс извлечения жира проходит длительно до 2...3 сут. Для ускорения и более полного выделения глицеридов и сопутствующих им веществ из анализируемого объекта рекомендуется использовать гидрофильные растворители (метилловый, этиловый эфиры и др.) или смесь гидрофобных и гидрофильных растворителей (бинарные растворители) [6,7,8,9].

### Методология

На практике для выделения липидов чаще всего используют два основных рутинных метода экстракции, позволяющих количественно извлекать липиды практически всех классов из самой ткани и ее фракций. Наиболее распространенным является метод Фолча, согласно которому экстракцию проводят смесью хлороформ-метанол (2:1) из расчета 20 частей экстрагирующей смеси на одну часть ткани. Этот метод позволяет получить достаточно высокий выход нейтральных липидов, диацилглицерофосфолипидов и сфинголипидов. Лизофосфолипиды переходят в раствор лишь частично, а более полярные кислые липиды могут теряться при промывке экстракта растворами солей и водой. Однако при повторных экстракциях и ограничении промывок выход липидов можно повысить до количественного. Другой метод предложен Блайем и Дайером, когда экстракцию липидов осуществляют смесью хлороформ-метанол (1:1) из расчета две части смеси на одну часть ткани. Однако и в этом случае при промывке водой наиболее полярные кислые фосфолипиды и лизофосфолипиды переходят в водную фазу и теряются.

В зависимости от химической природы липидов используют модифицированные методы извлечения. Заменив смесь хлороформ-метанол на смесь хлороформа с 2 %-ным раствором уксусной кислоты в мета-

ноле, можно повысить выход полярных липидов. Впоследствии для этих же целей была применена смесь хлороформ-метанол с 1М HCl (4:2:3) [10,11].

При экстракции нейтральных и общих липидов часто используют неполярные растворители, такие, как хлороформ, гексан, диэтиловый эфир. Естественно, что при этом теряется большое количество полярных липидов.

Для более полного понимания методологии извлечения липидов (жиров) из сырья и готовой продукции рассмотрим перечень методов чаще всего используемый, который приведён ниже.

**Метод Гербера** используют при определении жира в полуфабрикатах из мяса (мясной фарш, полуфабрикаты из котлетной массы), творога, в кулинарных изделиях, мучных кондитерских изделиях, молока и молочных продуктах, сухих продуктов детского и диетического питания.

Метод основан на разрушении белков исследуемого продукта концентрированной серной кислотой и растворении жира в изоамиловом спирте. Образующийся в реакции изоамилового спирта с серной кислотой сложный эфир растворяется в ней, что способствует выделению жира. Полученную смесь центрифугируют в жиромерах (бутирометрах). Отделившийся жировой слой собирается в градуированной части жиромера и его определяют количественно.

Определение жира проводят в молочных или сливочных жиромерах, отличающихся размером и градуировкой. Объём деления в молочных жиромерах равен 0,1%. В сливочных жиромерах объём двух делений соответствует 1% жира в продукте при навеске 5 г. Их используют, если содержание жира в продукте превышает 10%.

**Весовой или гравиметрический метод** с экстракцией жира в микроизмельчителе. Метод используется для кулинарных изделий и некоторой продукции консервной промышленности. Жир извлекают из продукта при измельчении последнего в микроизмельчителе. После отгона растворителя высушенный жир взвешивают [12,13,14].

**Рефрактометрический метод** применяют для определения жира в мучных кулинарных, сдобных булочных и мучных кондитерских полуфабрикатах и изделиях, овощных полуфабрикатах, консервированных продуктах.

Метод основан на том, что при растворении жира коэффициент преломления растворителя понижается пропорционально количеству присутствующего жира. По разности между коэффициентом преломления чистого растворителя и раствора жира определяют массовую долю последнего. Чем больше разница между этими коэффициентами, тем точнее определение [15].

**Метод определения жира с предварительным гидролизом крахмала** используют при определении жира в полуфабрикатах из муки, булочных и мучных

кондитерских изделиях (ГОСТ 31902–2012). Он основан на извлечении жира растворителем из навески, обработанной предварительно соляной кислотой, удалении растворителя и взвешивании жира.

Для качественного определения масел существуют следующие характерные реакции.

**Проба на акролеин.** Две — три капли испытуемого вещества (масло, экстракт после отгонки растворителя) нагревают в пробирке на голом огне с 1,5–2 частями безводного сульфата натрия. Появление после вспенивания тяжёлых белых паров и резкого, чадящего запаха акролеина, вызывающего слезотечение, указывает на наличие масла. Акролеин — непредельный альдегид  $\text{CH}_2=\text{CHCHO}$  — образуется из глицерина при отщеплении двух молекул воды. Если пары отвести в пробирку с фуксинсернистой кислотой, то последняя приобретает красную окраску.

**Проба на омыление.** Нагревают 2–3 капли испытуемого вещества в пробирке с 5 см<sup>3</sup> раствора спиртовой щелочи; отгоняют спирт. Оставшийся продукт растворяют в воде (мыло в воде растворимо). Прибавление кислоты до кислой реакции вызывает образование всплывающих на поверхность водного раствора жирных кислот.

**Проба с галоидами.** Эта реакция является характерной для масел, содержащих непредельные жирные кислоты. В пробирку с раствором масла в эфире прибавляют 1–2 капли бромной воды и встряхивают. Быстрое исчезновение желтой окраски бромной воды указывает на присутствие ненасыщенных кислот [16].

**Техника жидкостной экстракции** используется, например, для определения содержания жира в различных объектах. Экстракция по Сокслету является одной из самых широко распространенных аналитических техник. За последние годы она была значительно модернизирована, в частности, удалось увеличить температуру растворителя, вступающего в контакт с извлекаемым веществом, с целью уменьшить время экстракции. Модификации, представленные американским химиком Э. Рэндаллом, являются одними из самых эффективных в этом отношении:

**Метод Рэндалла:** метод состоит из двух этапов: на первом этапе образец в гильзе помещается в кипящий растворитель, а на втором промывается растворителем, капаящем с конденсатора. Быстрое растворение компонентов образца происходит на первом этапе посредством кипящего растворителя, что значительно сокращает время, необходимое для всего анализа. Методика Рэндалла также позволяет восстановить использованный растворитель в конце процедуры экстракции.

**Экстракция по Сокслету** — это процесс извлечения растворимых веществ из твердых материалов, который был разработан немецким агрохимиком Францем фон Сокслетом в 1879 году. Метод Сокслета: растворение извлекаемого соединения происходит

с помощью холодного растворителя, капающего из конденсатора. Обычно полная экстракция длится часами [13,14].

### Обсуждение

Большинство методов определения липидов в пищевых продуктах можно разделить на три группы.

Методы первой группы основаны на извлечении липидов из определяемого продукта путем многократного экстрагирования растворителем до тех пор, пока остаточное содержание их в продукте не будет представлять ничтожно малую величину. Затем из полученной вытяжки отгоняют растворитель, а остаток, содержащий липиды, высушивают и взвешивают (весовой метод определения жира). Эту операцию обычно проводят в специальных аппаратах для экстракции — аппаратах Сокслета, дающих возможность одной и той же порцией эфира многократно производить извлечение жира. Для экстракции используют неполярные растворители: диэтиловый эфир, гексан, петролейный эфир.

Разнообразная природа пищевых продуктов, обуславливающая различную прочность связи липидов с другими частями продукта, оказывает влияние на эффективность экстракции. Методы этой группы позволяют извлечь из пищевых продуктов свободные и слабосорбированные липиды. Прочно связанные липиды при этом не экстрагируются. Кроме того, жировые растворители экстрагируют не только глицериды жирных кислот, но и целый ряд других веществ: свободные жирные кислоты, органические кислоты, такие как янтарная, винная, лимонная, яблочная; фосфатиды, стерины, эфирные масла, воскообразные вещества, смолы, альдегиды, кетоны, красящие вещества. Ввиду этого продукт, извлекаемый растворителями, не представляет собой чистый жир, почему и называется «сырым». Часто разницей между массой «сырого» и собственно жира пренебрегают. Количество примесей в «сыром» жире увеличивается, если применяется необезвоженный серный эфир, растворяющий до 2% влаги, такой эфир легко извлекает сахара, содержащиеся в пищевом сырье (овошах, крупах и т.д.). Спирт, содержащийся в серном эфире, хорошо растворяет многие органические соединения. Ввиду этого серный эфир, применяемый для извлечения жира, предварительно промывают водой для удаления спирта и обезвоживают прокаленным хлористым кальцием; после удаления примесей эфир перегоняют.

Для ускорения экстракции и полного извлечения жира исследуемый продукт тщательно измельчают и подсушивают, так как чем крупнее и влажнее частицы, тем медленнее извлекается жир; кроме того, из влажных объектов жир полностью не экстрагируется.

В связи с этим, а также ввиду значительного окисления липидов в процессе выделения, были предпри-

няты поиски других, более эффективных способов экстракции.

Методы второй группы основаны на использовании для экстракции смеси полярного и неполярного растворителей. При этом полярный растворитель (обычно метанол или этанол) разрывает связь липидов с белками и другими компонентами пищевых продуктов, а неполярный (хлороформ, бензол, петролейный эфир) непосредственно растворяет липиды. Наибольшее применение получили смеси: хлороформ-метанол (2:1) и хлороформ-этанол (2:1). Однако в отличие от методов первой группы, такие бинарные смеси извлекают дополнительно значительное количество нелипидов (до 25% суммы экстрагируемых веществ). Поэтому во многих случаях появилась необходимость удаления этих веществ путем перерастворения в хлороформе или промывки 1%-ным раствором NaCl или KCl.

Методы третьей группы предусматривают извлечение липидов из пищевых продуктов после кислотного или щелочного гидролиза. Для этого пищевой продукт гидролизуют водным или спиртовым раствором щелочи при нагревании. После щелочного гидролиза полученные мыла разлагают раствором кислоты, а выделившиеся жирные кислоты извлекаются эфиром (петролейным, диэтиловым) и освобождаются от примесей фильтрованием. После отгона эфира, определяют массу жирных кислот, который пересчитывают на жир. Указанным методом выделить липиды в нативном состоянии теоретически невозможно. Поэтому об их содержании в пищевых продуктах судят по количеству жирных кислот и неомыляемых веществ, выделяемых из гидролизата. К этой группе методов относится кислотный метод определения жира с помощью жиromeра в молоке, молочных продуктах и консервах. Жир выделяют действием концентрированной серной кислоты при нагревании. Смесь центрифугируют. При этом жир переходит в фазу добавляемого изоамилового спирта. Объем выделившегося жира измеряют в градуировочной части жиromeра.

Методы первой группы не рекомендуются для исследования продуктов, богатых фосфолипидами, прочносвязанными в клетках (некоторые виды рыб), но пригодны для продуктов, с преобладающим содержанием триглицеридов — масличных семян.

Методы второй группы практически во все случаях позволяют получить надежные количественные результаты, но они относительно трудоемки и не всегда пригодны для массовых анализов.

Применение методов третьей группы, хотя и не приводит к извлечению натуральных липидов, в большинстве случаев позволяет получать результаты, близко совпадающие с результатами, получаемыми методами второй группы. Их преимущество — в возможности проведения массовых анализов [17,18].

**Определение жира непрерывной экстракцией (по Сокслету).** Жир экстрагируют из исследуемого



продукта серным эфиром в аппарате Сокслета, состоящего из экстрактора с сифонной трубкой, шарикового обратного холодильника и приемной колбы. Навеску тщательно измельченного продукта в количестве 5–10 г (в зависимости от предполагаемого содержания жира в продукте) отвешивают с точностью до 0,0001 г в патрон из фильтровальной бумаги. Перед экстракцией взятую навеску продукта подсушивают при температуре 100–105 °С в течение 2 ч.

Для изготовления патрона, прямоугольным кусочком фильтровальной бумаги несколько раз обертывают деревянную болванку или стеклянный цилиндр, диаметр которых несколько меньше диаметра экстрактора. Конец бумаги, выступающий за край болванки на длину ее диаметра, загибают складками и получают, таким образом, дно патрона; на него кладут кружок из фильтровальной бумаги и кусочек обезжиренной ваты. Навеску в патроне закрывают сверху кружком фильтровальной бумаги, обезжиренной ватой и свободные края патрона загибают складками. Высота патрона должна быть на 10–15 мм ниже верхнего колена сифонной трубки экстрактора.

Патрон с навеской помещают в экстрактор, который соединяют на шлифах с высушенной до постоянной массы приемной колбой и холодильником. В колбу предварительно наливают до 2/3 ее объема высушенного перегнанного серного эфира. В холодильник пускают воду и нагревают колбу с серным эфиром на водяной бане с закрытым электро или паровым нагревом на специальной закрытой электрической плитке. Температура воды в бане должна быть не более 60 °С. Пары растворителя, образующиеся в колбе при кипении, попадая в холодильник, стущаются в жидкость, которая каплями стекает в экстрактор, где находится патрон с навеской продукта. Когда уровень растворителя в экстракторе поднимется несколько выше верхнего колена сифонной трубки, эфир с растворенным в нем жиром стечет в приемную колбу. После этого весь процесс повторяется снова. Пример оборудования для экстракции жира по методу Сокслета приведен на Рис. 1.

Жир экстрагируют в течение 10–12 ч, при этом нагревание и кипение эфира должны быть отрегулированы так, чтобы в час происходило 6–8 сливаний при объеме экстрактора 100 мл. Для более полного извлечения жира навеску продукта перед экстракцией помещают для настаивания в растворитель в течение 6–8 ч; настаивание ведут в экстракторе, наполненном эфиром ниже сифонной трубки.

Когда экстракция закончится, патрон с навеской вынимают из экстрактора и растворитель из приемной колбы отгоняют в пустой экстрактор. Остаток жира в колбе высушивают в шкафу до постоянной массы при температуре 100–105 °С; первый раз колбу с жиром взвешивают через 1 ч сушки, а затем через каждые 0,5 ч. Перед взвешиванием колбу охлаждают

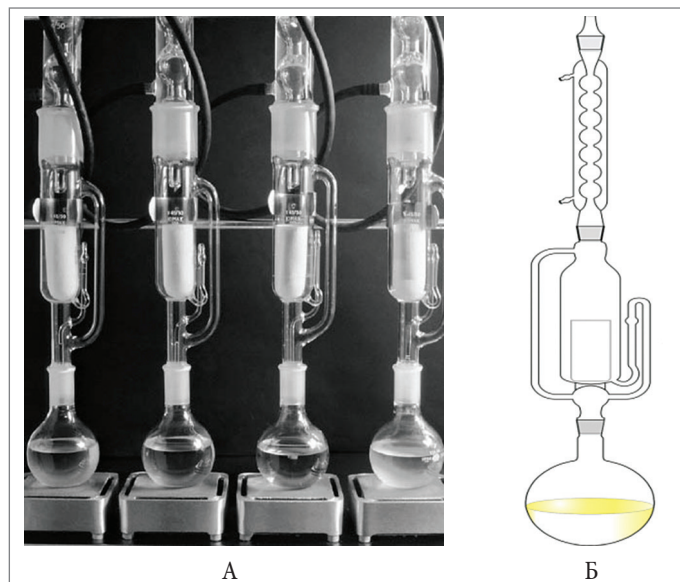


Рис. 1. Аппарат для экстракции жира по методу Сокслета: А — автоматический экстрактор, Б — сборное экстрагирование образца

в эксикаторе в течение 30–35 мин и затем взвешивают с точностью до 0,0001 г.

Количество жира (X,%) рассчитывают по следующей формуле:

$$X = (G - G_1) \cdot 100/g,$$

где  $G$  — масса колбы с жиром, г;

$G_1$  — масса пустой колбы, г;

$g$  — навеска исследуемого продукта, г.

Конечный результат выражают как среднее арифметическое двух определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,3%.

Полноту выделения жира из навески анализируемого объекта следует проверять следующим образом. На чистое, обезжиренное стекло нанести каплю мисцеллы (растворителя). При полном выделении жира на стекле после испарения растворителя не должно появляться жирное пятно [19,20,21].

**Определение жира настаиванием с растворителем.** Навеску исследуемого продукта в количестве 2 г берут с точностью до 0,01 г в коническую колбу емкостью 50–100 мл. Приливают 10 мл растворителя — бензина или дихлорэтана, закрывают колбу корковой пробкой и снова взвешивают для определения массы растворителя. Жир экстрагируют в течение 1 ч, периодически взбалтывая навеску с растворителем. Затем содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в сухую колбу, предварительно взвешенную с точностью до 0,001 г. Колбу с фильтратом взвешивают с точностью до 0,01 г и по разности определяют массу фильтрата.

Растворитель отгоняют на песочной бане, приняв соответствующие меры предосторожности, колбу с остатком помещают в сушильный шкаф и высушивают при температуре 100–105 °С. Затем колбу с жиром

охлаждают в эксикаторе и взвешивают с точностью до 0,001 г.

Содержание жира (X,%) определяют по формуле:

$$X = G \cdot G_1 \cdot 100 / (G_2 - G_1) \cdot g,$$

где  $G$  — количество растворителя, г;

$G_1$  — количество жира, г;

$G_2$  — количество фильтрата, г;

$g$  — навеска исследуемого продукта, г.

Конечный результат выражают как среднее арифметическое двух определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,3% [22].

**Определение жиров рефрактометрическим методом.** Метод основан на определении коэффициента преломления раствора жира в  $\alpha$ -монобромнафталине, автоле или смеси монобромнафталина с машинным маслом, которыми предварительно извлекают жир из исследуемого продукта. Растворение жира в любом из указанных растворителей вызывает понижение его показателя преломления, прямо пропорциональное концентрации жира в экстракте.

$\alpha$ -Бромнафталин имеет высокий показатель преломления — 1,65, он мало летуч и не растворяет воду. Все эти свойства делают его наиболее приемлемым растворителем при определении количества жира при помощи рефрактометра. При выполнении анализа применяют универсальный рефрактометр со шкалой, градуированной до  $n_D = 1,75$ ; сахарный рефрактометр, имеющий шкалу  $n_D$  только до 1,54, непригоден для работы с монобромнафталином.

*Методика определения жира с применением в качестве растворителя монобромнафталина.* Навеску тщательно измельченного продукта в количестве около 2 г берут по разности с точностью до 0,0001 г в маленькую фарфоровую ступку (диаметром не более 5 см), добавляют из бюретки 1,3 мл мелкого прокаленного песка и около 6 г монобромнафталина, отвешенного по разности с точностью до 0,01 г. Тщательно растирают пестиком навеску с песком и растворителем в течение 5 мин. Затем содержимое ступки переносят на небольшой складчатый фильтр, диаметром 7 см, и полученный после фильтрования жировой экстракт собирают в маленький химический стаканчик.

Перемешав экстракт стеклянной палочкой, 2–3 капли его наносят на призму рефрактометра и определяют коэффициент преломления. Определение рефракции повторяют не менее 3 раз с новыми порциями экстракта и берут для расчета среднее арифметическое.

Показатель преломления чистого монобромнафталина и испытуемого жирового экстракта определяют при одной и той же температуре. Температура во время определения поддерживается постоянной, что достигается пропусканием воды через оправы призм.

Количество жира (X,%) рассчитывают по следующей формуле:

$$X = 10^4 \cdot a \cdot (H_0 - H) \cdot g / g_1,$$

где  $H_0$  — показатель преломления чистого растворителя;

$H$  — показатель преломления испытуемого жирового экстракта;

$g$  — навеска растворителя, г;

$g_1$  — навеска исследуемого продукта, г;

$a$  — показатель отношения процентного содержания жира в растворителе к разности между показателями преломления растворителя и жирового экстракта.

Для пищевых концентратов  $a$  равен 0,0368 [17]. При вычислении процента содержания жира пользуются показателями преломления и плотности жиров, указанными в Табл. 1.

Таблица 1. Показания преломления  $n_{20}^D$  плотности жиров [23]

Наименование жира	Коэффициент преломления $n_{20}^D$	Плотность, г/см <sup>3</sup>
Кунжутное масло	1,4730	0,919
Подсолнечное масло	1,4736	0,924
Коровье масло	1,4605	0,920
Маргарин	1,4690	0,928
Арахисовое масло	1,4696	0,914
Горчичное масло	1,4769	0,918
Кондитерский жир	1,4674	0,928
Соевое масло	1,4756	0,922
Кукурузное масло	1,4745	0,920
Концентраты фосфатидные	1,4746	0,922
Кулинарный жир	1,4724	0,926
Свиной топленый жир	1,4712	0,917

*Методика определения жира с применением в качестве растворителей автола или смеси монобромнафталина и машинного масла.* Около 5 г хорошо измельченного продукта отвешивают по разности с точностью до 0,01 г в небольшую фарфоровую ступку и добавляют 4 г взятых также по разности автола или смеси из 25 объемных единиц монобромнафталина и 75 объемных единиц машинного масла. Затем в ступку вносят 3 г мелкого прокаленного песка и полученную смесь тщательно растирают в течение 5–10 мин. Более длительное растирание рекомендуется для пищевых концентратов с мясом [24].

Если в качестве растворителя применяют смеси монобромнафталина и машинного масла, то растертую массу переносят из ступки на складчатый фильтр, 2–3 капли отфильтрованного жирового экстракта наносят на призму рефрактометра и определяют показатель преломления. В случае применения в качестве растворителя автола смесь в ступке растирают при нагревании, погрузив ступку в сосуд с горячей водой. Растертую массу переносят из ступки на фильтр из двух слоев марли с тонкой прослойкой из ваты, отжимают несколько капель жирового экстракта, охлаждают его, наносят на призму рефрактометра и определяют показатель преломления.

Содержание жира вычисляют по формуле, приведенной в методике определения жира с растворителем монобромнафталином. Показатель  $a$  равен: в случае применения автола — 0,3; в случае применения смеси монобромнафталина и машинного масла — 0,19. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,3% [22].

Рефрактометрический метод определения количества жира является одним из самых быстрых методов. Им широко пользуются при исследовании пищевых концентратов и другой продукции, содержащей жир.

**Определение жира центрифугированием.** Метод применяется для определения жира в сухих молочных продуктах: молоке, сливках, масле, а также в яичном порошке и молочных смесях продуктов детского питания. Сущность метода заключается в том, что исследуемый продукт обрабатывают концентрированной серной кислотой в присутствии изоамилового спирта при нагревании и центрифугировании. При действии серной кислоты белок молочных продуктов переходит в растворимое соединение условной формулы:  $H_2SO_4 - NH_2R(COOH)_6$ , в результате чего происходит отделение жира. Изоамиловосерный эфир, образующийся при добавлении изоамилового спирта, снижает поверхностное натяжение жировых шариков и способствует слипанию их в сплошную массу. Нагревание и центрифугирование ускоряют этот процесс. Для определения служат стеклянные приборы — бутирометры, в градуированной части которых собирается отделившийся жир. Объем жира отсчитывают непосредственно по шкале бутирометра. Бутирометр, иначе лактоскоп, предназначен для определения массовой доли жира в молоке и молочных продуктах. Наиболее распространён бутирометр для молока — стеклянный цилиндрический сосуд со шкалой, по которой определяют количество жира в молоке: цена деления шкалы 0,1% по массе.

Методика определения дана применительно к сухим молочным продуктам. Для работы могут быть использованы бутирометры для сливок или молока (Рис. 2).



Рис. 2. Примеры бутирометров

*Определение жира в бутирометре для сливок (при исследовании сухого цельного молока, сухих сливок, сухого масла).* Навеску продукта в количестве 2,5 г (сухое молоко, сухие сливки) или 2 г (сухое масло) берут с точностью до 0,01 г в химический стакан с носиком емкостью 25–50 мл, приливают 4–5 мл серной кисло-

ты (относительной плотностью 1,5–1,55) и тщательно растирают стеклянной палочкой. Полученную однородную массу количественно переносят через маленькую воронку в бутирометр и смывают стаканчик несколько раз кислотой той же плотности порциями по 3–4 мл, следя за тем, чтобы общий объем кислоты в бутирометре составил 18–19 мл, а уровень содержимого бутирометра был ниже основания его горлышка на 7–8 мм. Затем приливают 1 мл изоамилового спирта.

Бутирометр плотно закрывают сухой каучуковой пробкой, обертывают полотенцем для предохранения рук от ожога и, придерживая пробку, энергично встряхивают и одновременно несколько раз переворачивают для лучшего смешивания содержимого. Затем бутирометр помещают пробкой вниз в водяную баню с температурой 65–70 °С, при этом уровень воды в бане должен быть несколько выше уровня жидкости в бутирометре. После полного растворения белковых веществ продукта, примерно через 7–8 мин, бутирометры вынимают и устанавливают столбик жира в градуированной части бутирометров, подкручивая пробку вверх или вниз. Затем бутирометры помещают симметрично в центрифугу узкими концами по направлению к центру и центрифугируют в течение 5 мин при 800–1000 об/мин (500–1000 g).

После этого бутирометры снова ставят на 5 мин в водяную баню при температуре 65–70 °С, вторично центрифугируют 5 мин и после выдержки в бане в течение 5 мин при той же температуре быстро отсчитывают число делений, занимаемых столбиком жира. При отсчете бутирометр держат в вертикальном положении против света. Для удобства отсчета нижнюю границу столбика жира устанавливают при помощи пробки на каком-либо делении шкалы прибора. Содержание жира в процентах находят, умножая показание бутирометра на 2 при навеске 2,5 г и на 2,5 при навеске 2 г. Жир определяют в двух параллельных пробах, допускаемое расхождение — не более 0,5%.

*Определение жира в бутирометре для молока.* При исследовании цельного и обезжиренного молока или сухих сливок навеску продукта берут в количестве 1,5 г с точностью до 0,01 г в химический стакан с носиком емкостью 25–50 мл, приливают 4 мл горячей воды с температурой 70–75 °С, тщательно растирают и полученную однородную смесь без потерь переносят через маленькую воронку в бутирометр, в который предварительно наливают 10 мл серной кислоты, относительной плотностью 1,81–1,82 г/см<sup>3</sup>; стаканчик 2 раза споласкивают дистиллированной водой порциями по 3 мл, присоединяя ее к содержимому бутирометра. Затем добавляют 1 мл изоамилового спирта. В остальном анализ выполняют так, как указано выше. При исследовании сухого обезжиренного молока применяют трехкратное центрифугирование.

Содержание жира ( $X, \%$ ) вычисляют по формуле:

$$X = a \cdot K_1 / g,$$

где  $a$  — показание бутирометра;

$K_1$  — коэффициент для перевода показаний бутирометра в проценты;

$g$  — навеска продукта.

Расхождение между двумя параллельными определениями допускается не более 0,5 % [25,26,27,28].

Для определения жира в тесте и готовых изделиях Всероссийский научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности, Москва, Россия (ВНИИХП) разработал ускоренный бутирометрический метод. Он основан на растворении исследуемой навески в 60 % серной кислоты и определении слоя жира в молочном бутирометре центрифугированием в присутствии изоамилового спирта, который образует с серной кислотой изоамиловосерный эфир, уменьшающий величину поверхностного натяжения жировых шариков и способствующий слипанию их в единый жировой слой. При анализе готовых изделий удаляют все включения и поверхностную отделку, анализируя только мякиш. Из средних проб теста или готовых изделий отбирают по две навески массой 2 г каждая. Их тщательно измельчают для лучшего растворения крахмала и белка в серной кислоте. Параллельно отбирают навески для определения влажности теста на приборе ВНИИХП-ВЧ (прибор Чижовой) и готовых изделий. Навески теста или готовых изделий помещают в фарфоровые стаканчики или тигли вместимостью 20–30 мл и заливают 9 мл 60 %-ной серной кислоты. Стаканчики погружают в гнезда водяной бани с температурой воды 80 °С и растворяют навески в серной кислоте в течение 20 мин при периодическом перемешивании стеклянной палочкой. После растворения навески темную жидкость по стеклянной палочке переносят в молочные бутирометры, смывая остатки из тигля с помощью 10 мл 60 %-ной  $H_2SO_4$ .

В бутирометры осторожно, чтобы не замочить горлышко, приливают по 1 мл изоамилового спирта, плотно закрывают резиновыми пробками, плавно перемешивают в течение 3 мин и помещают в гнезда водяной бани с температурой воды 80 °С на 5 мин (пробками вниз). По истечении 5 мин бутирометры вынимают из водяной бани, размещают в молочной центрифуге Гербера и центрифугируют 5 мин при частоте вращения 1200 об/мин. После центрифугирования бутирометры снова помещают на 5 мин в водяную баню температурой 80 °С (пробками вниз), после чего вынимают и отмечают высоту желтого жирового слоя над темной жидкостью по числу малых делений градуированной части бутирометра [29].

**Метод определения содержания жира по обезжиренному остатку (по Рушковскому).** Количество жира в продукте определяется по уменьшению массы сухой навески продукта после экстракции раствори-

телем. Навеску исследуемого объекта в количестве 2...5 г, взвешенную с погрешностью 0,001 г, следует высушить в сушильном шкафу при температуре 100...105 °С и перенести в пакет из фильтровальной бумаги размером 8x9 см. Стенки бюксы протереть небольшим количеством ваты, смоченной в эфире. Вату вместе с навеской поместить в пакет из фильтровальной бумаги. Пакет с навеской вложить во второй пакет размером 9x10 см так, чтобы линии загиба пакетов не совпадали, и перевязать их ниткой. Наружный пакет пронумеровать простым графитовым карандашом, поместить в ту же бюксу, в которой ранее высушивалась навеска, и поставить в сушильный шкаф. Высушить до постоянной массы при температуре 100...105 °С. Можно сушить навеску непосредственно в пакете. Высушенный пакет с навеской должен быть помещен в экстрактор аппарата Сокслета. В один аппарат можно помещать несколько пакетов при условии, что все они полностью погружены в эфир и хорошо омываются им. Продолжительность экстрагирования 10...12 ч. Окончание процесса устанавливается следующим образом. Каплю раствора (мисцеллы), вытекающего из экстрактора аппарата, следует нанести на часовое стекло. При полном извлечении жира из навески на стекле после испарения растворителя не должно быть жирного пятна. Пакеты с обезжиренной навеской перенести в ту же бюксу и выдержать в вытяжном шкафу 20...30 мин для удаления эфира, а затем высушить в шкафу при температуре 100...105 °С до постоянной массы. Длительность процесса от 1 до 3 ч.

Содержание жира  $X, \%$  рассчитывается по формуле:

$$X = (m_1 - m_2) \cdot 100 / g,$$

где  $m_2$  — масса высушенных бюксы, пакета и навески продукта до экстракции, г;  $m_1$  — масса высушенных бюксы, пакета и навески продукта после экстракции жира, г — навеска продукта.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,5 % [30].

**Метод Рэндалла.** Так же, как и процесс в экстракторе Сокслета, метод осуществляют в 3 этапа: экстракция, промывка и сушка (Рис. 3).

Стакан с образцом помещается в растворитель. К растворителю подводится теплота. Пары растворителя поднимаются в конденсатор. После капли сконденсировавшегося растворителя попадают в стакан с образцом. Образец экстрагируется, и растворитель с анализом, проходя сквозь фритту, собираются в стакане с образцом. Промывка состоит из 2 стадий:

- растворитель упаривается и собирается в специальной емкости до тех пор, пока уровень расположения образца не будет выше уровня растворителя;
- оставшийся в стакане растворитель испаряется, после конденсации растворитель попадает в стакан с образцом, осуществляя промывку.

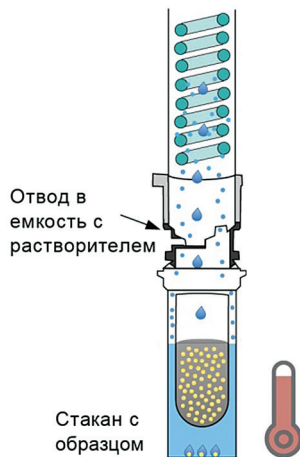


Рис. 3. Аппарат для экстракции жира по методу Рэндалла [31]

Стадия сушки протекает аналогично методу Сокслета. Оставшийся в стакане растворитель упаривается и попадает в емкость с растворителем. Аналит остается в стакане, а остатки образца — в стакане с образцом.

**Метод Твиссельмана (экономичная непрерывная экстракция).** Экстракция по методу Твиссельмана является экономичной альтернативой экстракции по методу Сокслета, позволяющей снизить время анализа и затраты на растворитель. Процесс экстракции занимает около 60 минут.

Принцип работы экстрактора по методу Твиссельмана (экономичная непрерывная экстракция): в отличие от рассмотренных ранее методов он проходит в 2 этапа: экстракция и сушка (Рис. 4).

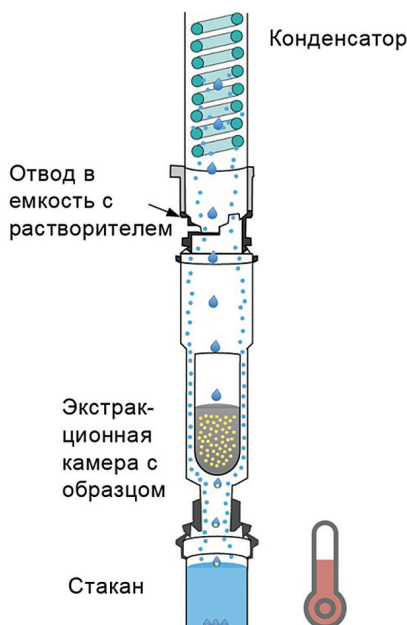


Рис. 4. Аппарат для экстракции жира по методу Твиссельмана [31]

**Экстракция.** Растворитель находится в стакане и нагревается. Пары растворителя проходят через экстракционную камеру с образцом и попадают в конденсатор. Сконденсировавшийся растворитель капает в экстракционную камеру с образцом, где протекает процесс экстрагирования. Одновременно растворитель с аналитом из экстракционной камеры переносится в стакан с растворителем. Время экстракции устанавливается заранее.

**Сушка.** На этапе сушки стакан с растворителем нагревается, растворитель упаривается и собирается в соответствующую емкость [32,33].

### Заключение

Определение содержания жиров в сырье для производства пищевых продуктов, а также определение жирности пищевых продуктов является актуальной аналитической задачей для контрольных лабораторий на производстве и лабораторий контролирующих органов. Все возрастающие требования к качеству и безопасности пищевых продуктов, а также воспроизводимости и производительности традиционных методик выделения жира подталкивают современные пищевые лаборатории к поиску различных методов выделения и анализа жиров.

Выделение индивидуальных липидов из исходного материала обычно включает несколько этапов. Первым этапом является разрушение ткани путем измельчения сухого сырья, следующим — экстракция нейтральных липидов, затем экстракция суммы фосфо- и гликолипидов с последующим фракционированием и выделением чистых веществ. Полноту извлечения липидов обеспечивает максимальное размельчение материала. Полярные растворители, такие, как метанол и этанол, которые разрушают водородные связи и ослабляют электростатическое взаимодействие липидов с белками, наиболее эффективно экстрагируют липиды. Использование спиртов для экстракции фосфолипидов удобно и тем, что они дезактивируют большинство липолитических ферментов, которые в активной форме вызывают деградацию липидов. Длительность экстракции и полноту экстрагирования, а также способ и условия проведения экстракции определяют в каждом конкретном случае [34].

Таким образом, авторы в данном обзоре предприняли попытку осветить все доступные и известные методологии по извлечению липидов (жиров) из различных биологических матриц как растительного, так и животного происхождения.

## Introduction

Lipids (from Greek «lipos» — fat) are a complex mixture of organic compounds with similar physical and chemical properties, which is found in plants, animals and microorganisms. Lipids are widely distributed in nature. Together with proteins and carbohydrates, they make up the basic mass of organic substances in all living organisms, being an obligatory component of every cell. Lipids are widely used in obtaining many food products, and are important components of food raw materials, semi-finished and finished food products, while largely determining their nutritional and biological value and taste [1,2].

Lipids are insoluble in water (hydrophobic) and well soluble in organic solvents (gasoline, diethyl ether, chloroform, etc.).

In plants, lipids accumulate mainly in seeds and fruits. Lipid content (%) in different plants is the following: peanut (kernel) — 50 to 68; cocoa (beans) — 49 to 57; sunflower — 30 to 58; soybean (seeds) — 15 to 25; corn — 5.6; buckwheat — 3.8; rice — 2.9; wheat — 2.7.

In animals and fish, lipids are localized in subcutaneous, cerebral and nerve tissues and tissues surrounding important organs (heart, kidneys). Lipid content in sturgeon carcass may be as high as 20–25%, in herring — 10%. In carcasses of terrestrial animals, it highly varies: 33% (pork), 9.8% (beef), 3.0% (piglets). In deer milk its content is 17 to 18%, in goat milk — 5.0%, in cow milk — 3.5 to 4.0%. Lipid content in certain types of microorganisms may be up to 60% [3].

According to the chemical structure, lipids are derived from fatty acids, alcohols, and aldehydes, and are built using ester, ether, phosphoester, and glycosidic linkages. Lipids are divided into two main groups: simple and complex lipids. Simple neutral lipids (not containing nitrogen, phosphorus, sulfur) include derivatives of higher fatty acids and alcohols, as well as glycerides, waxes, cholesterol esters, glycopeptides and other compounds. Molecules of complex lipids contain not only the residues of high molecular weight carboxylic acids, but also phosphoric or sulfuric acids.

Lipids are important ingredients of food, as they have high energy value and are a source of building material for human body tissues. Individual components of fat, i.e. some fatty acids, phosphatides, sterols, fat-soluble vitamins, have important biological functions in the body. Lipids are substances of plant and animal origin, soluble in organic solvents and slightly soluble in water. They contain higher alkyl or acyl radicals in the molecular structure.

Quantitative determination of lipids requires the extraction of glycerides and related substances (pigments, vitamins, free fatty acids, phosphatides, etc.) from the test object [4,5].

Existing methods for determining the fat content in different types of raw materials and products may be divided into two groups, i.e. one-step and two-stage ones.

One-step methods based on the ultrasound, nuclear magnetic resonance, photometry and infrared rays allow quantitative determination of fat directly in the test object. However, this requires complex and expensive equipment. Application of some of this equipment (for example, in nuclear magnetic resonance) is recommended only in case of the impossibility of using any other method for determining the amount of the certain substance.

Most of the physical and chemical methods (extraction weight, refractometry, etc.) used to quantify fat are from second group. Their characteristic feature is a two-step process — fat extraction from the object and the quantitative determination. For fat extraction, various organic solvents are used, i.e. gasoline, petroleum ether, diethyl ether, acetone, chloroform, monobromo- and monochloronaphthalene, tricresyl orthophosphate, etc. It should be kept in mind that hydrophobic solvents (petroleum ether, gasoline, etc.) extract together with glycerides somewhat less related substances. And their extraction is selective. Glycerides are extracted more rapidly, and phosphatides, free fatty acids and oxidation products are extracted slower. In this regard, when using a hydrophobic solvent, the fat extraction process lasts for up to 2 to 3 days. To accelerate the process and extract the glycerides and related substances from the test object more completely, it is recommended to use hydrophilic solvents (methyl and ethyl ethers, etc.) or a mixture of hydrophobic and hydrophilic solvents (binary solvents) [6,7,8,9].

## Methods

In practice, for lipid extraction, two basic routine extraction methods are most often used, which allow to extract lipids quantitatively from tissue and its fractions of almost all biological classes. The most common is the Folch method, according to which extraction is carried out with a chloroform: methanol mixture (2:1) with 20 parts of extracting mixture per one part of tissue. This method allows to obtain a sufficiently high yield of neutral lipids, diacyl glycerophospholipids and sphingolipids. Lysophospholipids are transferred into the solution only partially, and more polar acid lipids may be lost when the extract is washed out with salt solutions and water. However, repeated extractions and restriction of washing allow to increase the yield of lipids up to a quantitative level. Another method was proposed by Bligh and Dyer, when lipid extraction is carried out with a chloroform: methanol mixture (1:1) with two parts of the mixture per one part of tissue. However, even in this case, when washing out with water, the most polar acid phospholipids and lysophospholipids are transferred into the aqueous phase and lost.

Depending on the chemical nature of lipids, modified extraction methods are used. By replacing the chloroform: methanol mixture with a mixture of chloroform and 2% solution of acetic acid in methanol, the yield of polar lipids can be increased. Subsequently, for the same purposes, a mixture of chloroform: methanol with 1M HCl (4:2:3) was used [10, 11].

When extracting neutral and common lipids, non-polar solvents such as chloroform, hexane, diethyl ether are often used. Obviously, in this case, a lot of polar lipids are lost.

For a more complete understanding the methodology of the lipid extraction from raw materials and finished products, the most commonly used methods are presented below.

**Gerber method** is used to determine fat in semi-finished meat products (minced meat, semi-finished products from minced meat), curd cheese, finished food products, bakery products, milk and dairy products, dried foods for children and healthy diet.

The method is based on the destruction of test product proteins with concentrated sulfuric acid and the dissolution of fat in isoamyl alcohol. The ester formed in the reaction of isoamyl alcohol with sulfuric acid dissolves in the latter, which enables fat extraction. The resulting mixture is centrifuged in the butyrometers. The separated fat layer is collected in the graduated part of butyrometer and is quantitatively determined.

Determination of fat is carried out in milk or cream butyrometers, which differ in size and graduation. The level of graduation mark in milk butyrometers is 0.1%. In cream butyrometers, the level of two graduation marks corresponds to 1% fat in the product with a weight of 5 g. The latter are used when the fat content in the product exceeds 10%.

**Weight or gravimetric method** with fat extraction in a microniser. The method is used for finished food products and some canned products. Fat is extracted from the product by grinding it in a microniser. After solvent distilling, the dried fat is weighed [12,13,14].

**Refractometry method** is used to determine fat in finished and semi-finished bakery products, semi-finished vegetable products, and canned products.

The method is based on the fact that when the fat is dissolved, the refraction index of the solvent decreases in proportion to the amount of fat present in it. By the difference between the refraction index of the pure solvent and the fat solution, the mass fraction of the latter is determined. The greater the difference between these indices, the more precise the definition [15].

**The method for fat determining with preliminary starch hydrolysis** is used to determine fat in finished and semi-finished bakery products (GOST 31902–2012). It is based on fat extraction by solvent from the sample pretreated with hydrochloric acid, removing the solvent and weighing the fat.

For the qualitative oil determination, the following characteristic reactions exist.

*Test for acrolein.* Two to three drops of the test substance (oil, extract after solvent distillation) are heated in a test tube on a naked flame with 1.5 to 2 parts of anhydrous sodium sulfate. After foaming, the appearance of heavy white fume and pungent odor of acrolein causing lacrima-

tion, indicates the presence of oil. Acrolein is unsaturated aldehyde  $\text{CH}_2=\text{CHCHO}$  formed from glycerin upon removal of two water molecules. If the fume is transferred to a test tube with Schiff's reagent, then the latter becomes of red color.

*Test for saponification.* Two to three drops of the test substance are heated in a test tube with 5 cm<sup>3</sup> of alcohol-alkali solution, then the alcohol is distilled. The remaining product is dissolved in water (soap is soluble in water). The addition of acid for acidic pH causes the formation of aqueous solution of fatty acids floating on the surface.

*Test with haloids.* This reaction is qualitative for oils containing unsaturated fatty acids. One or two drops of bromine water is added in a test tube with a solution of oil and shook. The rapid disappearance of yellow color of bromine water indicates the presence of unsaturated acids [16].

**Liquid extraction technique** is used, for example, to determine the fat content in various objects. Soxhlet extraction is one of the most widely used analytical techniques. In recent years, it has been significantly modernized, in particular, the temperature of the solvent coming into contact with the extracted substance was increased in order to reduce the extraction time. The modifications presented by the American chemist, E. Randall, are among the most effective ones in this respect:

**Randall method** consists of two stages: at the first stage, the sample in the sleeve is placed in a boiling solvent, and at the second stage, it is washed out with a solvent dripping from the condenser. Rapid dissolution of the sample components occurs in the first stage because of boiling solvent, which greatly reduces the time required for the entire assay. Randall method also allows the solvent to be recovered at the end of the extraction procedure.

**Soxhlet extraction** is a process of extraction of soluble substances from solid materials. It was developed by the German agrochemist Franz von Soxhlet in 1879. Soxhlet method is dissolution of the extracted compound using a cold solvent that drips from the condenser. Typically, a complete extraction lasts for several hours [13,14].

## Discussion

Most methods for determining lipids in food can be divided into three groups.

The methods in first group are based on lipid extraction from the test product by repeated extraction with a solvent until the residual content in the product is negligible. Then, the solvent is distilled from the obtained extract, and the residue containing lipids is dried and weighed (weight method of fat determining). This operation is usually carried out in special extraction instrument, Soxhlet apparatus, that allows to produce repeated fat extraction with the same portion of ether. Non-polar solvents are used for the extraction, i.e. diethyl ether, hexane, petroleum ether.

The diverse nature of food products, which determines the different strength of lipid bonding to other parts of the product, affects the extraction efficiency. The meth-

ods of this group allow to extract free and slightly sorbed lipids from food products. Strongly bound lipids are not extracted. In addition, solvents extract not only fatty acid glycerides, but also a number of other substances, i.e. free fatty acids; organic acids such as succinic, tartaric, citric, and apple acid; phosphatides; sterols; essential oils; waxy substances; resins; aldehydes; ketones; colorants. In view of this, the product extracted by the solvents is not a pure fat. That is why it is called «raw fat». Often the difference between the weight of «raw fat» and the actual fat weight is neglected. The amount of impurities in «raw fat» increases, when you use non-dehydrated diethyl ether, which dissolves up to 2% moisture. Such ether easily extracts sugars contained in food raw materials (vegetables, cereals, etc.). Alcohol contained in diethyl ether readily dissolves many organic compounds. In view of this, diethyl ether used for fat extraction is pre-washed out with water to remove alcohol and dehydrated with annealed calcium chloride. After removing impurities, the ether is distilled.

To accelerate the extraction process and for complete fat extraction, the test product is thoroughly ground and dried, since the larger and moistier the particles, the more slowly the fat is extracted. In addition, fat is not completely extracted from moisty objects.

In this connection, and due to the significant oxidation of lipids in the extraction process, more efficient extraction methods were developed.

The methods in second group are based on the use of a mixture of polar and non-polar solvents for extraction. In this case, polar solvent (usually methanol or ethanol) breaks the bonds of lipids to proteins and other food components, and nonpolar solvent (chloroform, benzene, petroleum ether) directly dissolves the lipids. The most widely used mixtures are chloroform: methanol (2:1) and chloroform: ethanol (2:1). However, in contrast to the methods of the first group, such binary mixtures extract a significant amount of non-lipids (up to 25% of the amount of extractable substances). Therefore, in many cases, it became necessary to remove these non-lipid substances by re-dissolving in chloroform or washing out with a 1% solution of NaCl or KCl.

The methods in third group provide lipid extraction from food products after acid or alkaline hydrolysis. In this case, the food product is hydrolyzed by an aqueous or alcoholic solution of alkali with heating. After alkaline hydrolysis, the soaps obtained are decomposed by the acid solution, and released fatty acids are extracted with ether (petroleum, diethyl ether) and are purified by filtration. After the ether is distilled, the weight of fatty acids is determined, which is recalculated into fat weight. Theoretically, this method is unable to extract lipids in their native state. Therefore, their content in food is evaluated by the amount of fatty acids and unsaponifiable substances released from the hydrolysate. This group of methods includes the acid method of fat determining in milk, dairy products and canned foods with butyrometer. Fat is extracted by the con-

centrated sulfuric acid with heating. The mixture is centrifuged. In this case, the fat is transferred into the phase of the isoamyl alcohol added. The volume of the released fat is measured in the graduated part of butyrometer.

The methods in first group are not recommended for the products rich in phospholipids firmly bound in cells (some fish species), but are suitable for foods with a predominant triglyceride content, i.e. oil seeds.

The methods in second group, almost in all cases, allow obtaining reliable quantitative results, but they are relatively labor-consuming and not always suitable for large-scale routine analyzes.

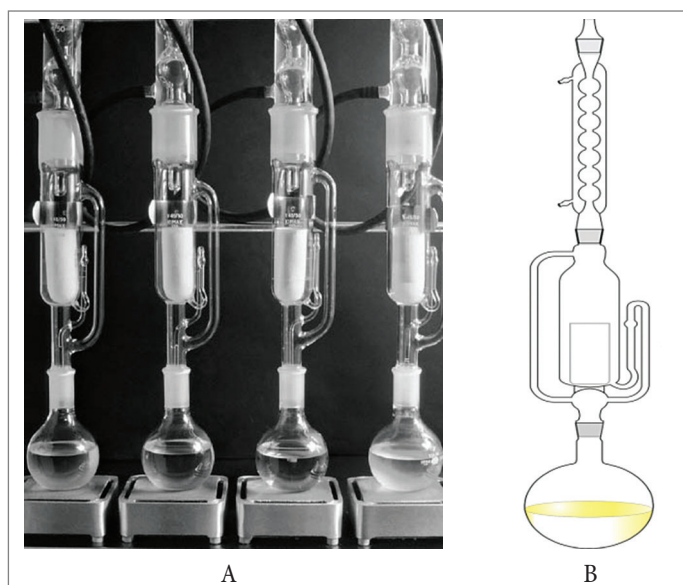
The application of the third group methods does not lead to the extraction of natural lipids, but in most cases allows obtaining results that closely correspond to the results obtained by the methods of second group. Their advantage is the use in large-scale routine analyzes [17,18].

**Determination of fat by continuous extraction (Soxhlet method).** Fat is extracted from the test product with diethyl ether in a Soxhlet apparatus consisting of extractor with siphon tube, ball-shaped reflux condenser, and receiving flask. A sample of a thoroughly ground product in an amount of 5 to 10 grams (depending on the expected fat content in the product) is weighed with an accuracy of 0.0001 g and transferred into a filter paper cartridge. Before extraction, the sample of the product is dried at a temperature of 100 to 105 °C for 2 hours.

To make a filter paper cartridge, a rectangular piece of filter paper is wrapped several times around a wooden blank or glass cylinder, whose diameter is somewhat smaller than the diameter of the extractor. The part of the paper protruding beyond the edge of the blank for the length of its diameter is folded forming the cartridge bottom. A circle of filter paper and a piece of fat-free cotton wool are put on the bottom. The sample in the cartridge is closed from the top with a circle of filter paper and a piece of fat-free cotton wool. Free edges of the cartridge are folded. The height of the cartridge should be 10 to 15 mm below the upper bend of the extractor siphon tube.

Cartridge with sample is placed in extractor, which is connected to receiving flask dried up to a constant weight and condenser. The flask is previously filled up with dried distilled diethyl ether to 2/3 of its volume. The water is passed through the condenser, and the flask with diethyl ether is heated on a water bath with closed electric or steam heating on a special closed electric heater. The water temperature in the bath should not be higher than 60 °C. The solvent vapor formed in the flask during boiling go into the condenser. There it condenses into a liquid that drips down into the extractor, where the cartridge with the product sample is located. When the level of solvent in the extractor rises slightly above the upper bend of the siphon tube, the ether with dissolved fat flows into the receiving flask. After that, the entire process is repeated again. An example of equipment for fat extraction using Soxhlet method is shown in Figure 1.





**Figure 1.** An instrument for extracting fat by Soxhlet method: A — automatic extractor; B — sample extraction

Fat is extracted for 10–12 hours, while the heating and boiling of the ether should be adjusted for 6 to 8 drains per hour with an extractor volume of 100 ml. For a more complete fat extraction, the sample of the product is placed into the solvent for 6–8 hours before the extraction. The infusion is performed in the extractor filled with ether below the siphon tube.

When the extraction is completed, the cartridge with the sample is removed from the extractor and the solvent is distilled from the receiving flask into an empty extractor. The residual fat in the flask is dried in a desiccator to constant weight at a temperature of 100 to 105 °C. For the first time, the flask with fat is weighed after 1 hour of drying and then every 0.5 hours. Before weighing, the flask is cooled down in a desiccator for 30 to 35 minutes and then weighed with an accuracy of 0.0001 g.

The amount of fat (X,%) is calculated by the following equation:

$$X = (G - G_1) \cdot 100 / g,$$

where  $G$  is the weight of the flask with fat, g;

$G_1$  is the weight of the empty flask, g;

$g$  is the weight of the test product sample, g.

The final result is expressed as the arithmetic mean of two determinations. The difference between two parallel determinations should not exceed 0.3 %.

Completeness of fat extraction from the sample of the test object should be verified as follows. Apply a drop of miscella (solvent) on a clean, degreased glass. Upon the complete fat extraction, a greasy stain should not appear on the glass after evaporation of the solvent [19,20,21].

**Determination of fat by infusion with solvent.** A sample of the test product in an amount of 2 g is weighted with an accuracy of 0.01 g in a conical flask with volume of 50 to 100 ml. Then, 10 ml of a solvent (gasoline or dichloroethane) are added, the flask is closed with a cork stopper and weighed again to determine the solvent weight. Fat is

extracted for 1 hour, while periodically shaking the sample with the solvent. Then, the contents of the flask are filtered through a paper filter into a dry flask previously weighed with an accuracy of 0.001 g. The flask with filtrate is weighed with an accuracy of 0.01 g and the filtrate weight is determined by the difference.

The solvent is distilled on a sand bath with appropriate precautions. The flask with the residue is placed in a desiccator and dried at a temperature of 100 to 105 °C. Then, the flask with fat is cooled down in a desiccator and weighed with an accuracy of 0.001 g.

The fat content (X,%) is determined by the following equation:

$$X = G \cdot G_1 \cdot 100 / (G_2 - G_1) \cdot g,$$

where  $G$  is the amount of solvent, g;

$G_1$  is the amount of fat, g;

$G_2$  is the amount of filtrate, g;

$g$  is the weight of the test product sample, g.

The final result is expressed as the arithmetic mean of two determinations. The difference between two parallel determinations should not exceed 0.3 % [22].

**Determination of fat by refractometry method.** The method is based on the determination of refraction index of a fat solution in *a*-monobromonaphthalene, motor oil or a mixture of monobromonaphthalene with motor oil, by which fat is previously extracted from the test product. Dissolving fat in any of these solvents causes a decrease in refraction index of the latter directly proportional to fat concentration in the extract.

*a*-Bromonaphthalene has high refraction index of 1.65; it is slightly volatile and does not dissolve water. All these properties make it the most suitable solvent for determining the amount of fat using a refractometer. When performing the analysis, a universal refractometer with a scale graded up to  $n_D = 1.75$  is used. A sugar refractometer with a scale of only up to  $n_D = 1.54$  is not suitable for working with monobromonaphthalene.

*Method for determination of fat with monobromonaphthalene as a solvent.* A sample of a thoroughly ground product in amount of about 2 g is weighted with an accuracy of 0.0001 g in a small porcelain mortar (not more than 5 cm in diameter), 1.3 ml of fine annealed sand are added, and about 6 g of monobromonaphthalene is weighted with an accuracy of 0.01 g. The sample with sand and solvent is thoroughly pestle for 5 minutes. Then, the contents of the mortar are transferred to a small folder filter with diameter of 7 cm. The fat extract obtained after filtration is collected in a small laboratory glass.

After stirring the extract with a glass rod, 2–3 drops of it is applied to the refractometer prism and the refraction index is determined. Determination of refraction is repeated at least 3 times with new portions of the extract and arithmetic mean is calculated.

The refraction indices of pure monobromonaphthalene and the fat extract are determined at the same temperature.

The temperature during the determination is kept constant, which is achieved by passing water through the prism casing.

The amount of fat ( $X, \%$ ) is calculated by the following equation:  $X = 10^4 \cdot a \cdot (H_0 - H) \cdot g / g_1$ , where  $H_0$  is the refraction index of pure solvent;  $H$  is the refraction index of the fat extract;  $g$  is the weight of the solvent,  $g_1$  is the weight of the test product,  $a$  is the ratio of the fat percentage in the solvent to the difference between the refraction indices of the solvent and the fat extract. For food concentrates,  $a$  is 0.0368 [17]. When calculating fat percentage, the refraction index and the fat density indicated in Table 1 are used.

**Table 1. Values of refraction index  $n_{20}^D$  and fat density [23]**

Fat type	Refraction index $n_{20}^D$	Density, g/cm <sup>3</sup>
Sesame oil	1.4730	0.919
Sunflower oil	1.4736	0.924
Butter	1.4605	0.920
Margarine	1.4690	0.928
Peanut butter	1.4696	0.914
Mustard oil	1.4769	0.918
Confectionery fat	1.4674	0.928
Soybean oil	1.4756	0.922
Corn oil	1.4745	0.920
Phosphatide concentrates	1.4746	0.922
Cooking fat	1.4724	0.926
Hog grease	1.4712	0.917

*Method for determination of fat using motor oil or a mixture of monobromonaphthalene and motor oil as solvents.* About 5 grams of well-ground product is weighed with an accuracy of 0.01 g into a small porcelain mortar and 4 grams of motor oil or a mixture of 25 volume parts of monobromonaphthalene and 75 volume parts of motor oil are added. Then, 3 g of fine annealed sand are introduced into the mortar and the resulting mixture is thoroughly ground for 5 to 10 minutes. Longer grinding is recommended for food concentrates with meat [24].

When mixture of monobromonaphthalene and motor oil is used as a solvent, the ground mass is transferred from the mortar to a folded filter, 2 to 3 drops of the filtered fat extract are applied to refractometer prism and the refraction index is determined. In the case of using motor oil as a solvent, the mixture in a mortar is pestle with heating, while immersing the mortar in a vessel with hot water. The ground mass is transferred from the mortar to a filter of two gauze fabric layers with a thin interlayer of cotton wool. Then, several drops of fat extract are squeezed out, cooled, applied to the refractometer prism and the refraction index is determined.

The fat content is calculated by the equation given in the procedure for determination of fat with monobromonaphthalene as a solvent. Value of  $a$  is equal to: in the case of using the motor oil, 0.3; in the case of using the mixture of monobromonaphthalene and motor oil, 0.19. The difference between two parallel determinations should not exceed 0.3% [22].

The refractometry method of determining the amount of fat is one of the most rapid methods. It is widely used in analysis of food concentrates and other products containing fat.

**Determination of fat by centrifuging.** The method is used to determine fat in dried dairy products, i.e. milk, cream, butter, as well as in egg powder and milk formulas for infants. In this method, the test product is treated with concentrated sulfuric acid in the presence of isoamyl alcohol with heating and centrifuging. Under the action of sulfuric acid, the protein of dairy products is converted into a soluble compound with chemical formula:  $H_2SO_4 - NH_2R(COOH)_6$  resulting in fat separation. The isoamyl-sulfuric ether formed by the addition of isoamyl alcohol reduces surface tension of fat globules and promotes their aggregation. Heating and centrifuging accelerate this process. Glass instruments, butyrometers, are used for determination, in the graduated part of which the separated fat is collected. The volume of fat is measured directly on the butyrometer scale. Butyrometer, or a lactoscope, is designed to determine fat mass fraction in milk and dairy products. The most common butyrometer for milk is a glass cylindrical vessel with a scale, on which the amount of fat in milk is determined: one graduation mark is 0.1% by mass.

The determination procedure is given for dried dairy products. Butyrometers for cream or milk may be used (Figure 2).



**Figure 2. Butyrometers**

*Determination of fat in a cream butyrometer (for analyzing dried whole milk, dried cream, dried butter).* A sample of 2.5 g (dried milk, dried cream) or 2 g (dried butter) is weighed with an accuracy of 0.01 g in 25–50 ml laboratory glass with a spout. Then, 4 to 5 ml of sulfuric acid are added (relative density 1.5 to 1.55) and thoroughly ground with a glass rod. The resulting homogeneous mass is quantitatively transferred through a small funnel into the butyrometer and the glass is washed several times with an acid of the same density in 3 to 4 ml portions ensuring that the total volume of acid in the butyrometer is 18 to 19 ml, and the content of the butyrometer is 7 to 8 mm below the neck. Then, 1 ml of isoamyl alcohol is added.

The butyrometer is tightly closed with a dry rubber stopper, wrapped with a towel to protect the hands from heat and vigorously shaken while holding the stopper and at the same time turned over several times for better mixing the contents. Then, the butyrometer is placed with a stopper down into a water bath at a temperature of 65 to

70 °C, while the water level in the bath should be slightly higher than the liquid level in the butyrometer. After complete dissolution of the protein substances of the product, about 7 to 8 minutes, butyrometers are removed and fat fraction is placed in the graduated part by turning the stopper upward or downward. Then, the butyrometers are placed symmetrically into the centrifuge with narrow ends toward the center and centrifuged for 5 minutes at 800 to 1000 rpm (500 to 1000 g).

After that, the butyrometers are put again in a water bath at a temperature of 65 to 70 °C for 5 minutes, re-centrifuged for 5 minutes and after staying in bath for 5 minutes at the same temperature, the number of graduation marks occupied by the fat is quickly counted. When counting, the butyrometer is held upright against the light. For convenient reading, the lower boundary of fat is placed on any graduation mark by stopper. The fat percentage is calculated by multiplying the butyrometer reading by 2 when sample weight is 2.5 g and by 2.5 when sample weight is 2 g. Fat is determined in two parallel samples. The difference between two parallel determinations should not exceed 0.5 %.

*Determination of fat in a milk butyrometer.* When analyzing whole and skim milk or dried cream, the sample of the product is weighed in an amount of 1.5 g with an accuracy of 0.01 g in 25–50 ml laboratory glass with a spout, 4 ml of hot water with a temperature of 70 to 75 °C are added, the mixture is thoroughly ground and the resulting homogeneous product is transferred without losses through a small funnel into a butyrometer, in which 10 ml of sulfuric acid with relative density of 1.81 to 1.82 g/cm<sup>3</sup> are preliminarily added. The glass is washed 2 times with distilled water in 3 ml portions, while adding it to the contents of the butyrometer. Then, 1 ml of isoamyl alcohol is added. In all other respects, the analysis is performed as described above. When analyzing dried skim milk, threefold centrifuging is used.

The fat content (X,%) is calculated by the following equation:

$$X = a \cdot K_1 / g,$$

where  $a$  is the butyrometer reading;

$K_1$  is the coefficient for translating the butyrometer readings into percentages;

$g$  is the weight of the product.

The difference between parallel determinations should not exceed 0.5 % [25,26,27,28].

*To determine fat in dough and finished products,* the All-Russian Research Institute of the Bakery Industry, Moscow, Russia, developed rapid butyrometric method. It is based on dissolving the sample in 60 % sulfuric acid and determining the fat in milk butyrometer by centrifuging in the presence of isoamyl alcohol, which forms isoamyl sulfuric ether with sulfuric acid. The former reduces the surface tension of fat globules and promotes their aggregation into continuous fat layer. When analyzing finished products, all inclusions and surface finish are removed, while analyzing only the crumb.

Two average samples of 2 g each are taken from dough or finished products. They are carefully ground to better dissolve starch and protein in sulfuric acid. At the same time, samples are taken to determine the moisture content of the dough (by the VNIHP-VC instrument, Chizhova's device) and finished products. Dough or finished product samples are placed in porcelain cups with volume of 20 to 30 ml and 9 ml of 60 % sulfuric acid are added. The cups are immersed in a water bath with a water temperature of 80 °C and the samples are dissolved in sulfuric acid for 20 minutes with periodic stirring with a glass rod. After dissolving the sample, the dark liquid is transferred to the milk butyrometer by means of a glass rod, and the residue is washed out from the cup with 10 ml of 60 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Carefully, not to soak the neck, 1 ml of isoamyl alcohol is added into the butyrometer, which is then tightly closed with rubber stopper. The mixture is gently stirred for 3 minutes and the butyrometers are placed in a water bath with a water temperature of 80 °C for 5 minutes (with stopper down). After 5 minutes, the butyrometers are removed from the water bath, placed in a Gerber milk centrifuge and centrifuged for 5 minutes at a speed of 1200 rpm. After centrifuging, the butyrometers are again placed in 80 °C water bath (with stopper down) for 5 minutes. Then, they are removed and the height of yellow fat layer above the dark liquid is measured according to the number of small graduation marks on the butyrometer graduated part [29].

**The method for determination of fat content by the fat-free residue (according to Rushkovsky).** The amount of fat in the product is determined by decreasing the weight of the dried sample after extraction with the solvent. Test sample of 2 to 5 g weighed with an accuracy of 0.001 g is dried in a desiccator at a temperature of 100 to 105 °C and transferred to a bag of filter paper with a size of 8 x 9 cm. Weighing cup walls are wiped with a small amount of cotton wool wetted in ether. Cotton wool with sample is put into a bag of filter paper. The bag with sample is put into the second bag with a size of 9 x 10 cm so that the folding lines do not match, and tied with a thread. The outer bag is numbered with a simple graphite pencil, placed in the same weighing cup, in which the sample was previously dried, and placed in desiccator. The sample is dried to a constant weight at a temperature of 100 to 105 °C. The sample may be dried directly in the bag. The dried bag with the sample is placed in the extractor of the Soxhlet apparatus. Several bags may be placed in one device provided that they are completely immersed in ether and well washed by it. Extraction time is 10 to 12 hours. The end of the process is established as follows. The drop of the solution (miscella) flowing from the extractor is applied to a watch glass. Upon full fat extraction, there should be no greasy stain on the glass after evaporation of the solvent. Bags with fat-free sample are transferred into the same weighing cup and held in exhaust fume hood for 20 to 30 min to remove ether, and then dried in a desiccator at 100 to 105 °C to constant weight. The duration of the process is 1 to 3 hours.

The fat content ( $X, \%$ ) is calculated by the following equation:

$$X = (m_1 - m_2) \cdot 100 / g,$$

where  $m_2$  is the weight of the dried weighing cup, the bag and the sample of the product before extraction, g;

$m_1$  is the weight of the dried weighing cup, the bag and the sample of the product after fat extraction;

$g$  is the weight of the sample.

The difference between parallel determinations should not exceed 0.5 % [30].

**Randall method.** As the process in the Soxhlet extractor, the method is carried out in 3 stages: extraction, washing out and drying (Figure 3).

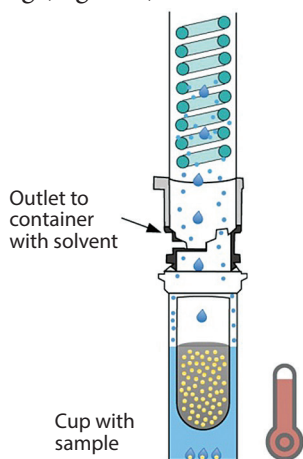


Figure 3. The apparatus for extracting fat by Randall method [31]

A cup with sample is placed in a solvent. The solvent is heated. The solvent vapor is transferred to condenser. Then, condensed solvent drops enter the cup with sample. The sample is extracted and the solvent with the analyte is collected in the sample cup. Washing out consists of 2 stages:

- the solvent is evaporated and collected in a special container until the sample level is above the solvent level;
- the solvent remaining in the cup is evaporated; after condensation, the solvent enters the cup with the sample carrying out the washing.

The drying stage is similar to the Soxhlet method. The solvent remaining in the cup is evaporated and enters the container with a solvent. The analyte remains in the cup, and the residual sample remains in the cup.

**Twisselmann method (cost-efficient continuous extraction).** Extraction by Twisselmann method is a cost-efficient alternative to Soxhlet extraction, which allows to reduce analysis time and solvent costs. The extraction process is about 60 minutes.

The principle of Twisselmann extractor (cost-efficient continuous extraction): in contrast to the methods considered earlier, it is carried out in two stages: extraction and drying (Figure 4).

**Extraction.** The solvent is placed in a cup and is heated. The solvent vapor passes through the extraction chamber with the sample and enters the condenser. The condensed solvent drips into the extraction chamber with the sample

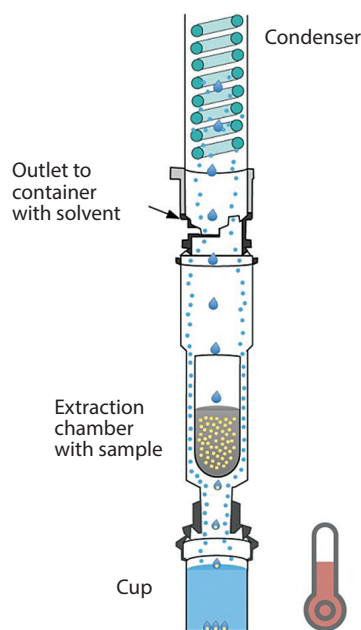


Figure 4. The apparatus for extracting fat by Twisselmann method [31]

where the extraction process proceeds. Simultaneously, the solvent with the analyte is transferred from the extraction chamber to the cup with solvent. The extraction time is set preliminarily.

**Drying.** At the drying stage, the cup with the solvent is heated, the solvent is evaporated and collected in a suitable container [32, 33].

## Conclusion

Determination of fat content in food raw materials, as well as the determination of fat content in food products, is the urgent analytical problem for control laboratories of industry and regulatory bodies. Increasing requirements for the quality and safety of food, as well as the reproducibility and effectiveness of traditional fat extraction techniques force modern laboratories to search for different methods for extraction and analysis of fats.

Extraction of individual lipids from the raw material usually involves several steps. The first step is the destruction of the tissue by grinding of dried raw material, followed by the extraction of neutral lipids, and then the extraction of total phospho- and glycolipids followed by fractioning and extraction of pure substances. The degree of lipid extraction depends on the grinding of raw material. Polar solvents, such as methanol and ethanol, which destroy hydrogen bonds and weaken the electrostatic interaction of lipids with proteins, are most effective in extracting the lipids. The use of alcohols for the extraction of phospholipids is also convenient because the former deactivate the majority of lipolytic enzymes that cause lipid degradation. The extraction time and completeness, as well as the method and conditions, are determined in each particular case [34].

Thus, in this review, the authors attempted to highlight all available and well-known methods for lipid (fat) extraction from various biological matrices of both plant and animal origin.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

1. Нечаев, А.П., Траубенберг, С.Е., Кочеткова, А.А., Колпакова, В.В., Витол, С.В., Кобелева М.Б. (2001). Пищевая химия. СПб, ГИОРД. — 592 с.
2. Евстигнеева, Р.П., Звонкова, Е.А., Серебрянникова, Г.А., Швец, В.И. (1983). Химия липидов. М., Химия. — 296 с.
3. Тютюнников, Б.Н. (1974). Химия жиров. М., Пищевая промышленность. — 448 с.
4. Проскура, И.К. (2004). Биохимия. М., Владос-пресс. — 240 с.
5. Северин, Е.С. (2011). Биохимия. Учебник для вузов. М., ГЭОТАР-Медиа. — 624 с.
6. Яновая, С.М. (2002). Химия жиров. М., НОРМА. — 240 с.
7. Овчинникова, С.И. (2010). Качественный и количественный анализ липидов, углеводов, витаминов. 2-е изд. Мурманск, МГТУ. — 125 с.
8. Коденцова, В.М., Кочеткова, А.А., Рисник, Д.В., Саркисян, В.А., Бессонов, В.В. (2015). Влияние нагрева в микроволновой печи на жировой компонент и сохранность витаминов в пищевых продуктах. *Вопросы питания*, 84(5), 16–30.
9. Van Meer, G, Voelker, D.R, Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 24–112.
10. О'Брайен, Р. (2007). Жиры и масла. Производство, состав и свойства, применение. СПб, Профессия. — 752 с.
11. Грачок, М.А. (1996). Химические основы сырья и товаров. Учебное пособие. Минск, БГЭУ, С. 111–117.
12. Анисимов, А.А., Леонтьева, А.Н., Александрова, И.Ф., Каманина, М.С., Бронштейн, Л.М. (1986). Основы биохимии: Учебник. М., Высшая школа. — 551 с.
13. Киселев, Л.Ю., Забудский, Ю.И., Голикова, А.П., Федосеева, Н.А., Селифанов, И.С., Новикова, Н.Н., Мышкина, М.С. (2012). Основы технологии производства и первичной обработки продукции животноводства. СПб, Лань. — 448 с.
14. Лисицын, А.Б., Иванкин, А.Н., Неклюдов, А.Д. (2002). Методы практической биотехнологии. М., ВНИИМП. — 402 с.
15. Колесник, А.А., Елизарова, Л.Г. (1990). Теоретические основы товароведения продовольственных товаров: Учебник для вузов. М., Экономика, С. 72–111.
16. ГОСТ 31902–2012 «Изделия кондитерские. Методы определения массовой доли жира». М., Стандартинформ. 2014. — 19 с.
17. Миколович, Л.С., Локтев, А.В., Фурс, Н.И., Брилевский, О.А. (2001). Товароведение продовольственных товаров: Учебное пособие / Под общ. ред. О.А. Брилевского. Минск, БГЭУ. — 612 с.
18. Pizarro, C., Esteban-Díez, I., Nistal, A. — J., González-Sáiz, J. — M. (2004). Influence of data pre-processing on the quantitative determination of the ash content and lipids in roasted coffee by near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 509(2), 217–227.
19. Wei H., Zhong H., Wang H. (2004). Improvement on determination of crude oil by Soxhlet extraction. *China Oilsand Fats*, 6, 52–54.
20. Luque de Castro, M.D., García-Ayuso L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369 (1–2), 1–10.
21. Корнена, Е.П., Калманович, С.А., Мартовшук, Е.В., Терещук, Л.В., Мартовшук, В.И., Позняковский, В.М. (2007). Экспертиза масел, жиров и продуктов их переработки. Качество и безопасность. Новосибирск, Сибирское университетское издательство. — 272 с.
22. Журавлева, М.Н. (2014). Теоретические основы товароведения продовольственных товаров и стандартизации: Учебник для студентов высш. учеб.заведений. Москва, Экономика. — 201с.
23. Методы определения физико-химических показателей качества хлеба: массовая доля жира [Электронный ресурс: <http://www.russbread.ru/kachestvo-xleba/metody-opredeleniya-fiziko-ximicheskix-pokazatelej-kachestva-xleba-massovaya-dolya-zhira.html>. Дата обращения 20.04.2018]
24. Азарова, Н.Г., Косой, В.Д., Дорохов, В.П., Рыжов, С.А., Пудов, М.А. (2014). Определение рационального содержания жира в фарше для производства колбас. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 5, 35–37.
25. ГОСТ ISO 14156–2015 «Молоко и молочная продукция. Методы экстракции липидов и жирорастворимых соединений». М., Стандартинформ. 2017. 11 с.
26. Пат. № 2056045. Способ определения содержания жира и белка в молоке /Абросимов В.М., Буркитбаев М.О., Цой Ю.А. Оpubl. 10.03.1996. Бюл. № 17.
27. Охрименко, О.В. (2014). Анализ и уточнение методики определения числа Рейхерта-Мейссля молочного жира. *Молочнохозяйственный вестник*, 4(16), 90–96.
28. Охрименко, О.В., Горбатова, К.К., Охрименко, А.В. (2005). Лабораторный практикум по химии и физике молока. СПб, ГИОРД. — 256 с.
29. Юдина, Т.А., Зайцева, Л.В. (2014). Роль жировых продуктов при приготовлении хлебобулочных изделий для специализированного питания. *Международная конференция «Хлебопекарное производство — 2014»*, 59–63.
30. Криштафович, В.И., Колобов, С.В. (2006). Методы и технические средства контроля качества продовольственных товаров. М., ИТК «Дашков и Ко». — 123 с.
31. Выберите свой метод экстракции для анализа жира. [Электронный ресурс: <https://www.buchi.com/ru-ru/content/выберите-свой-метод-экстракции-для-анализа-жира>. Дата обращения 11.04.2018]
32. Бухарева, Э.Ф. Ильенко-Петровская, Т.П., Твердохлеб, Г.В. (2005). Товароведение пищевых жиров, молока и молочных продуктов. М., ЮНИТИ-ДАНА. — 295 с.
33. Чурсина, Е.С., Ступак, М.В. (2006). Методы определения жира и клетчатки. *Ветеринария*, 1, 10–11.
34. Mullen, A.M. (2000). Predicting the eating quality of meat. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 12, 3–18.

## REFERENCES

1. Nechaev, A.P., Traubenberg, S.E., Kochetkova, A.A., Kolpakova, V.V., Vitol, S.V., Kobleva M.B. (2001). Food Chemistry. St. Petersburg: GIORD. — 592 p. (in Russian)
2. Evstigneeva, R.P., Zvonkova, E.A., Serebryannikova, G.A., Shvets, V.I. (1983). Chemistry of lipids. Moscow: Chemistry. — 296 p. (in Russian)
3. Tyutyunnikov, B.N. (1974). Chemistry of fats. Moscow: Food industry. — 448 p. (in Russian)
4. Proskurina, I.K. (2004). Biochemistry. Moscow: Vladospres. — 240p. (in Russian)
5. Severin, E.S. (2011). Biochemistry. Textbook for high schools. Moscow: GEOTAR-Media. — 624 p. (in Russian)
6. Yanovaya, S.M. (2002). Chemistry of fats. Moscow: NORMALITY. 240 p. (in Russian)
7. Ovchinnikova, S.I. (2010). Qualitative and quantitative analysis of lipids, carbohydrates, vitamins. 2-nd ed. Murmansk: MSTU. — 125 p. (in Russian)
8. Kodentsova, V.M., Kochetkova, A.A., Risnik, D.V., Sarkisyan, V.A., Bessonov, V.V. (2015). The effect of heating in the microwave oven on the fat component and the preservation of vitamins in food. *Voprosy Pitaniia*, 84 (5), 16–30. (in Russian)
9. Van Meer, G, Voelker, D.R, Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9 (2), 24–112.
10. O'Brien, R. (2007). Fats and oils. Production, composition and properties, application. St. Petersburg: Profession. — 752 p. (in Russian)
11. Grachok, M.A. (1996). Chemical basis of raw materials and goods. Tutorial. Minsk: BSEU, p. 111–117. (in Russian)
12. Anisimov, A.A., Leonteva, A.N., Aleksandrova, I.F., Kamani-na, M.S, Bronshtein, L.M. (1986). Fundamentals of Biochemistry: A Textbook. Moscow: High school. — 551 p. (in Russian)
13. Kiselev, L.Yu., Zabudsky, Yu.I., Golikova, A.P., Fedoseeva, N.A., Selifanov, I.S., Novikova, N.N., Myshkina, M.S. (2012). Fundamentals of production technology and primary processing of livestock products. St. Petersburg: Lan. — 448 p. (in Russian)
14. Lisitsyn, A.B., Ivankin, A.N., Neklyudov, A.D. (2002). Methods of practical biotechnology. Moscow: VNIIMP. — 402 p. (in Russian)
15. Kolesnik, A.A., Elizarova, L.G. (1990). Theoretical Foundations of Commodity Science of Food Products: A Textbook for Higher Educational Institutions. Moscow: Economics, pp. 72–111. (in Russian)
16. GOST 31902–2012. «Confectionery. Methods for determining the mass fraction of fat». Moscow: Standartinform. 2014. — 19 p. (in Russian)
17. Mikulovich, L.S, Loktev, A.V., Furs, N.I., Brilevsky, O.A. (2001). Commodity science of food products. Textbook / Ed. O.A. Brilevsky. Minsk: BSEU. — 612 p. (in Russian)
18. Pizarro, C., Esteban-Díez, I., Nistal, A.J., González-Sáiz, J.M. (2004). Influence of data, pre-processing on the quantita-

tive determination of the content and lipids in roasted coffee by near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 509 (2), 217–227.

19. Wei H., ZhongHongjian, Wang Hong. (2004). Improvement on the determination of crude oil by Soxhlet extraction. *China Oils and Fats*, 6, 52–54.

20. Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369 (1–2), 1–10.

21. Kornena, E.P., Kalmanovich, S.A., Martovschuk, E.V., Tereshchuk, L.V., Martovschuk, V.I., Poznyakovskii, V.M. (2007). Examination of oils, fats and products of their processing. Quality and safety. Novosibirsk: Siberian University Publishing House. — 272 p. (in Russian)

22. Zhuravleva, M.N. (2014.) Theoretical Foundations of Commodity Research of Foodstuffs and Standardization: A Textbook for Students of Higher Education. educational institutions. Moscow: The Economy. — 201 p. (in Russian)

23. Methods for determining the physico-chemical parameters of the quality of bread: the mass fraction of fat [Electronic resource: <http://www.russbread.ru/kachestvo-xleba/metody-opredeleniya-fiziko-ximicheskix-pokazatelej-kachestva-xleba-massovaya-dolya-zhira.html>. Date of circulation 04.20.2018]

24. Azarova, N.G., Kosoy, V.D., Dorokhov, V.P., Ryzhov, S.A., Pudov, M.A. (2014). Determination of the rational content of fat in minced meat for the production of sausages. *Storage and processing of farm products*, 5, 35–37. (in Russian)

25. GOST RU14156–2015 “Milk and dairy products. Methods of extraction of lipids and liposoluble compounds. Moscow, Standartinform. 2017. — 11 p. (in Russian)

26. Abrosimov, V.M., Burkitbaev, M.O., Tsoi, Yu.A. Method for determination of fat and protein content in milk. Patent RF no. 2056045. 1996. (in Russian)

27. Okhrimenko, O.V. (2014). Analysis and refinement of the method for determining the Reichert-Meissl number of milk fat. *Molochnokhozyaistvenny Vestnik*, 4 (16), 90–96. (in Russian)

28. Okhrimenko, O.V., Gorbatova, K.K., Okhrimenko, A.V. (2005). Laboratory practical work in chemistry and physics of milk. St. Petersburg: GIRD. — 256 p. (in Russian)

29. Yudina, T.A., Zaitseva, L.V. (2014). The role of fatty foods in the preparation of baked goods for specialized food. *International Conference “Bakery Production-2014”*, 59–63. (in Russian)

30. Krishtafovich, V.I., Kolobov, S.V. (2006). Methods and technical means of quality control of food products. Moscow: ITC “Dashkov and Co.” — 123 p. (in Russian)

31. Select your extraction method for fat analysis. [Mobility resource: <https://www.buchi.com/ru-ru/content/select-your-method-excess-for-analyzing-fat>. Date of circulation 04.11.2018]

32. Bukhtareva, E.F. Ilenko-Petrovskaya, T.P., Tverdokhle, G.V. (2005). Commodity research of food fats, milk and dairy products. Moscow: UNITY-DANA. — 295 p. (in Russian)

33. Chursina, E.S., Stupak, M.V. (2006). Methods for determining fat and fiber. *Veterinary*, 1, 10–11. (in Russian)

34. Mullen, A.M. (2000). Predicting the eating quality of meat. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 12, 3–18.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

##### Принадлежность к организации

**Вострикова Наталия Леонидовна** — кандидат технических наук, заведующий лабораторией «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН

109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Тел.: +7-495-676-79-81

E-mail: [vostrikova@fncps.ru](mailto:vostrikova@fncps.ru)

\*автор для переписки

**Кузнецова Оксана Александровна** — доктор технических наук, Врио директора, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН

109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,

Тел.: +7-495-676-72-11

E-mail: [o.kuznecova@fncps.ru](mailto:o.kuznecova@fncps.ru)

**Куликовский Андрей Владимирович** — кандидат технических наук, руководитель направления хроматографии, ведущий научный сотрудник в лаборатории «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН

109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,

Тел.: +7-495-676-79-81

E-mail: [a.kulikovskii@fncps.ru](mailto:a.kulikovskii@fncps.ru)

##### Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат

##### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 27.04.2018

#### AUTHOR INFORMATION

##### Affiliation

**Natal'ya L. Vostrikova** — candidate of technical sciences, head of laboratory «Scientific and methodical work, biological and analytical research», V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel.: +7-495-676-79-81

E-mail: [vostrikova@fncps.ru](mailto:vostrikova@fncps.ru)

\*corresponding author

**Oksana A. Kuznetsova** — doctor of technical sciences, director, V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel.: +7-495-676-72-11

E-mail: [o.kuznecova@fncps.ru](mailto:o.kuznecova@fncps.ru)

**Andrey V. Kulikovskii** — candidate of technical sciences, a head chromatography laboratory, leading scientific worker of the Laboratory «Scientific and methodical work, biological and analytical research» V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel.: +7-495-676-60-11

E-mail: [a.kulikovskii@fncps.ru](mailto:a.kulikovskii@fncps.ru)

##### Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

##### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 27.04.2018

## ОЦЕНКА БАКТЕРИОЦИНОГЕННОСТИ ИНДИГЕННЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ С ТУШ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Батаева Д.С.,\* Соколова О.В., Зайко Е.В., Пашкова В.В.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

**Ключевые слова:** бактериоцины, антибиотикорезистентность, молочнокислые бактерии, халяльный убой, *Salmonella typhimurium*, мясо

### Аннотация

Исследованы туши крупного рогатого скота ритуального убоя (халяль) с латеральной и медиальной стороны с целью выявления индигенных штаммов молочнокислых микроорганизмов, способных продуцировать бактериоцины. Из 36 штаммов микроорганизмов, выделенных из смывов, отобранных с туш, только 14 были использованы для дальнейшего исследования и идентифицированы как молочнокислые бактерии (МКБ). При изучении их бактериоциногенности по методике двухслойных агаров модифицированного состава, была доказана высокая ингибирующая эффективность в отношении роста патогенного микроорганизма *Salmonella typhimurium*, только 6 выделенных штаммов молочнокислых бактерий. Использование данного метода оценки позволит не только выявить наличие способности МКБ продуцировать бактериоцины, но и изучить их антагонистическую активность в отношении многих изучаемых микроорганизмов, которые являются индикаторами соблюдения различных режимов технологических процессов. Наличие таких микроорганизмов в мясе позволит увеличить срок хранения мяса, за счет подавления роста близкородственных лактобацилл, некоторые из которых являются микроорганизмами порчи, а также рост условно-патогенной и патогенной микрофлоры. Кроме этого, применение молочнокислых бактерий, обладающих бактериоциногенностью, в технологии производства сырокопченых колбас позволит снизить риск производства небезопасной продукции. Таким образом, наличие в мясе индигенных МКБ является дополнительным фактором, обеспечивающим протекание желательных биохимических процессов и безопасность сырокопченых колбас.

Original scientific paper

## ASSESSMENT OF THE BACTERIOCINOGENICITY OF INDIGEN LACTOBACILLUS ONTO CATTLE CARCASSES

Dagmara S. Bataeva\*, Olga V. Sokolova, Elena V. Zajko, Victoria V. Pashkova

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**Key words:** Bacteriocin, antibiotic resistance, *Lactobacillus*, halal slaughter, *Salmonella typhimurium*, meat

### Abstract

Cattle carcasses of ritual slaughter (Halal) from the lateral and medial side were investigated in order to identify the indigenous strains of lactic acid microorganisms capable of producing bacteriocins. Only 14 strains, from 36 strains of microorganisms isolated from washings taken from carcasses, were used for further research and identified as lactobacillus. In the study of their bacteriocinogenicity by the method of two-layer agars of modified composition, high inhibitory efficiency was proved with respect to the growth of the pathogen *Salmonella typhimurium*, only 6 isolated strains of lactobacillus. The use of this method of evaluation will not only reveal the presence of the ability of the lactobacillus to produce bacteriocins, but also to study their antagonistic activity against many of the studied microorganisms, which are indicators of compliance with various modes of technological processes. The presence of such microorganisms in the meat will increase the shelf life of meat, due to the suppression of the growth of closely related lactobacillus, some of which are spoilage microorganisms, as well as the growth of opportunistic and pathogenic microflora. In addition, the use of lactobacillus with bacteriocinogenicity in the production technology of raw sausages will reduce the risk of production of unsafe products. Thus, the presence of indigenous lactobacillus in meat is an additional factor that ensures the flow of desired biochemical processes and the safety of raw smoked sausages.

### Введение

В настоящее время во всем мире колоссальное внимание уделяют безопасности пищевых продуктов. Особое место занимает защита продуктов питания от воздействия ксенобиотиков, к которым

относят и микробные контаминанты, особенно патогенные бактерии. Обеспечение микробиологической безопасности производимой продукции является приоритетным направлением пищевой отрасли.

**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:** Батаева Д.С., Соколова О.В., Зайко Е.В., Пашкова В.В. Оценка бактериоциногенности индигенных молочнокислых бактерий, полученных с туш крупного рогатого скота. Теория и практика переработки мяса. 2018;3(2):22-32. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-22-32

**FOR CITATION:** Bataeva D. S., Sokolova O. V., Zaiko E. V., Pashkova V.V. Assessment of the bacteriocinogenicity of indigen lactobacillus onto cattle carcasses. *Theory and practice of meat processing*. 2018;3(2): 22-32. (In Russ.) DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-22-32

В совокупности с нейротоксическим эффектом, возникающим в результате воздействия окружающей среды, контаминированная патогенами пища несет большую опасность для здоровья человека.

Несмотря на внедрение различных программ предотвращения микробной контаминации и борьбы с патогенными микроорганизмами — проблема не теряет своей актуальности. Ситуация отягощается возрастающей устойчивостью ряда патогенов к химическим веществам, в т.ч. к антибиотикам [1].

В связи с выявлением антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, обнаруженных в пищевых продуктах, предлагаются разные подходы для сдерживания их размножения. Особенно стремительное развитие получили биологические методы. За рубежом активно применяют бактериофаги. Причем позиционируют их как альтернативные химическим веществам средства борьбы с патогенами и как агентов, продлевающих сроки годности продукции [2,3,4].

Среди прочих биологических мер борьбы с патогенами — использование бактериоцинов. Бактериоцины — антибиотикоподобные вещества, обладающие бактерицидным или бактериостатическим эффектом, были открыты в середине 1960-х годов, тогда же начались исследования их свойств. Несмотря на богатую историю изучения бактериоцинов, их потенциал еще не полностью раскрыт. Современный высокий уровень диагностических возможностей позволяет более глубоко и всесторонне изучать свойства бактериоцинов. Бактериоцины — это гетерогенные пептиды, выделяемые различными микроорганизмами, в т.ч. и молочнокислыми бактериями [5].

Механизм действия бактериоцинов в отношении патогенных микроорганизмов связывают с нарушением проницаемости цитоплазматической мембраны последних. Бактериоцины принято разделять на два класса — лантибиотики — пептиды, содержащие необычные аминокислоты (например, лантионин) и короткие термоустойчивые полипептиды, не содержащие таких аминокислот. Ряд авторов склоняются к мнению, что эти пептиды обладают способностью образовывать поры в цитоплазматической мембране, в результате чего происходит лизис клетки патогена [6,7,8,9,10].

Наиболее известный бактериоцин — это низин, который синтезируется кокковым штаммом *Streptococcus lactis*. В настоящее время низин используют в качестве консерванта при производстве некоторых пищевых продуктов [11].

Для мясной промышленности, в качестве продуцентов бактериоцина, наибольший интерес представляют микроорганизмы, составляющие непатогенный пул индигенной микрофлоры.

Таким образом, целью настоящего исследования являлось выявление и изучение индигенных молоч-

нокислых бактерий (МКБ) микробиома туш крупного рогатого скота ритуального убоя (халяль) для оценки их бактериоциногенности.

### Объекты и методы

Объектами исследования являлись смывы, отобранные с латеральной и медиальной стороны передней четвертины туш крупного рогатого скота сразу после. Для исключения контаминации туш сторонними микроорганизмами, которые могут быть внесены посредством сухой и/или мокрой обработки, забор смывов осуществляли с поверхности туш халяльного убоя. При халяльном убое не используются операции мойки туш, благодаря чему не происходит изменение исходного микробиома. Смывы отбирали с двух зон грудного и реберного отрубов каждой полутуши как с внутренней, так и с внешней поверхности. Забор смывов осуществляли стерильными губками, смоченными 10 см<sup>3</sup> физиологического раствора, с каждой зоны площадью не менее 100 см<sup>2</sup>. Затем губки помещали в стерильный пакет, добавляли забуференную пептонную воду объемом 90 см<sup>3</sup> и посредством ряда десятикратных разведений производили посев в питательные среды. Поскольку целью нашей работы являлось изучение бактериоциногенности молочнокислых бактерий, первичной задачей исследования было выделить МКБ с объекта исследования.

Для селекции молочнокислых микроорганизмов из полученных смывов, был приготовлен ряд десятикратных разведений и проведен их посев в плотную питательную среду MRS глубинным методом. Посевы инкубировали в течение 3 сут при температуре (30±2)°С. По окончании инкубирования, чашки Петри просматривали на предмет выявления колоний с типичным для молочнокислых микроорганизмов ростом (имеющих форму линзы или звездчатую форму) с целью отбора их для дальнейшего исследования. Типичные колонии пересевали в жидкую среду MRS-бульон, где в оптимальных условиях при температуре (30±2)°С проводили накопление биомассы клеток. Наличие роста микроорганизмов определяли по помутнению бульона в нижней части пробирки. Помутнение бульона в придонном пространстве пробирки является характерным признаком развития микроорганизмов с микроаэрофильным и анаэробным типом дыхания, к которым относят молочнокислые бактерии. Продолжительность культивирования составляла от одних до 5 суток. В случае отсутствия роста в течение 5 суток или роста, отличающегося от указанного выше — посевы дальнейшему исследованию не подвергались.

Для оценки принадлежности выделенных бактерий к молочнокислым микроорганизмам, согласно ГОСТ 10444.11–2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета мезофильных молочнокислых микроорганизмов», была проведена следующая комплексная



оценка каждого выделенного штамма, предположительно относящегося к молочнокислым бактериям: рост на среде MRS при 30 °С; образование каталазы; оценка микроскопического препарата: по Граму и на спорообразование. Молочнокислые микроорганизмы характеризуются способностью расти на плотных и жидких питательных средах MRS при 30 °С, они не образуют каталазу и по Граму окрашиваются положительно, при этом в микроскопическом препарате могут быть как кокки так и палочки, последние из которых не образуют спор. Культуры, идентифицированные как молочнокислые — пересевали на полужидкую среду MRS с целью дальнейшего хранения и дальнейшего изучения. Остальные микроорганизмы выбраковывали.

Для определения бактериоциногенности отобранных культур микроорганизмов, использовали модифицированную методику двухслойных агаров Ульриха Шиллингера и Фридриха-Карл Люки [12].

Согласно методике, предложенной этими исследователями, необходимо было вносить бактериоцин в лунки зараженного патогенными микроорганизмами, агара. Бактериоцин диффундировал в агар, в результате чего визуализировалась зона ингибирования роста патогенного микроорганизма. Из-за небольшой площади визуализации результатов, мы модифицировали методику. Для этого использовали две специализированные питательные среды. Первая среда — модифицированный MRS-агар (MRS-mod), следующего состава: неселективная жидкая среда MRS; глюкозы — 0,2%; агар-агара — 0,3%; вторая среда — мягкий агар (МА) имеющий в своем составе: пептон — 15 г, дрожжевой экстракт — 3 г, NaCl — 6 г, глюкоза — 1 г, агар-агар — 7 г.

Для проведения исследования подготавливали точную культуру молочнокислых бактерий на бульоне MRS, которую с помощью бактериологической петли наносили касанием на поверхность MRS-mod в определенной точке. Затем чашки инкубировали вверх крышками при температуре (30±2) °С в течение 3 сут, для максимального накопления и диффузии бактериоцина в питательную среду. По окончании инкубирования поверх MRS-mod заливали тонкий слой мягкого агара, инокулированного тест-штабмом. В качестве тест-штабма была выбрана культура *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, являющаяся распространенным возбудителем токсикоинфекций. Мягкий агар заражали тест-штабмом *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 с титром 10<sup>6</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>, и вновь помещали термостат для инкубирования крышками вверх. Образцы инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 24–48 ч.

Согласно рабочей гипотезе, за период инкубирования в среде MRS-mod молочнокислые микроорганизмы должны размножиться, вырабатывая бактериоцин, который диффундирует в агар, а затем при нанесении

второго слоя агара с тест-штабмом *Salmonella typhimurium*, бактериоцин должен препятствовать росту патогена.

### Результаты и обсуждение

Молочнокислые бактерии обладают большим потенциалом использования в связи с их широким спектром потенциальной антагонистической активности. Применение бактериоцинов, продуцируемых молочнокислыми бактериями, позиционируют как агенты, способные заменить антибиотики и повысить безопасность мяса [13,14,15].

Наиболее перспективными молочнокислыми бактериями с точки зрения их потенциала применения как ингибиторов патогенов, считают индигенные молочнокислые бактерии, то есть изолированные из естественной среды. Как правило, бактерии, обладающие потенциалом бактериоциногенности выделяют из пищевых продуктов [16,17,18,19].

Логично предположить, что мясоперерабатывающей отрасли целесообразнее всего применять бактериоцины, изолированные из индигенной микрофлоры мяса. Поскольку микроорганизмы с мяса могут быть наиболее приспособлены к нему и быть наиболее конкурентноспособны, чем выделенные из других источников, было проведено исследование его.

Как правило, молочнокислые бактерии выделяют из ферментированных мясных продуктов [20,21], то есть из уже готовых к употреблению. В нашей работе предпосылкой к исследованию индигенной микрофлоры туш служило предположение, что молочнокислая микрофлора попадает в мясные продукты на первоначальных стадиях переработки, то есть на этапе убоя, нутровки и обвалки туш.

В результате мониторинга латеральной и медиальной сторон туш крупного рогатого скота на наличие молочнокислых бактерий, с плотной питательной среды MRS было выбрано 36 колоний микроорганизмов для дальнейшего исследования. Из них были отобраны только те, формы колоний которых, на селективном агаре, являлись типичными для молочнокислых микроорганизмов: в форме трехлучевой звезды или линзы (Рис. 1). На этом этапе из исследования было исключено 15 образцов. Из оставшихся 21 штаммов все окрашивались положительно по Граму, однако 2 оказались каталазоположительными, предположительно *Brochothrix thermosphacta*, и не имели типичную для молочнокислых микроорганизмов микроскопическую картину. Согласно исследованиям канадских ученых, бактерии *Brochothrix thermosphacta* способны развиваться совместно с молочнокислыми бактериями, достигая высоких титров [22].

Дальнейшие исследования 19 штаммов проводили культивируя на бульоне MRS. При оценке характера роста отобранных колоний на этой жидкой питательной среде, не все микроорганизмы проявили рост

типичный для микроаэрофильных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, к которым относятся искомые прокариоты. На Рис.2 представлена иллюстрация из справочника со схемой типичного роста микроаэрофильных микроорганизмов (а) и фотография роста на бульоне экспериментального образца (б).

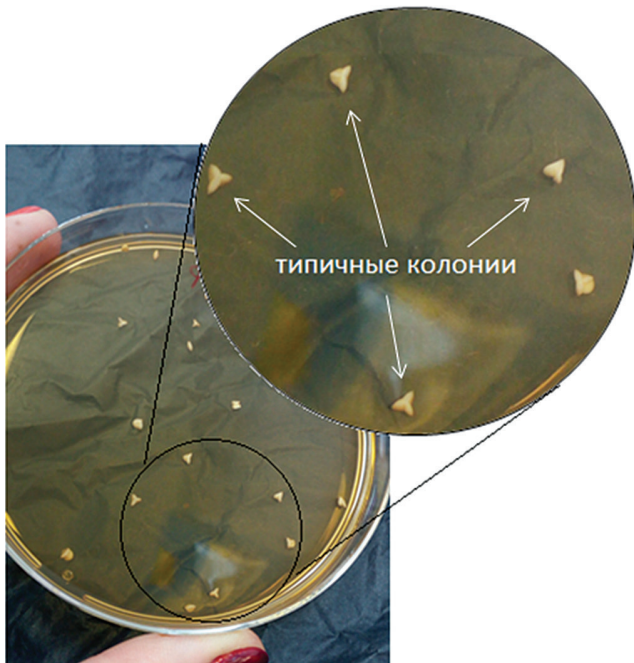


Рис. 1. Типичный рост МКБ на плотной питательной среде MRS

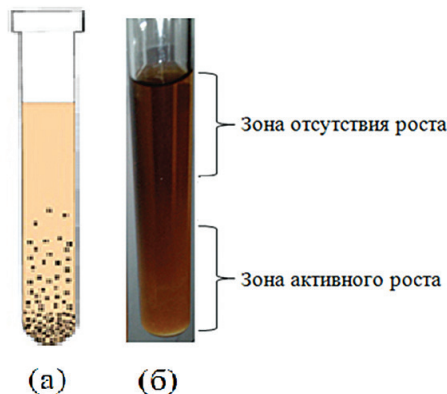


Рис. 2. Типичный рост МКБ в бульоне MRS для облигатных анаэробных микроорганизмов: (а) — схема; (б) — фотография пробирки с ростом одного из исследованных образцов

Таким образом, после изучения культурально-морфологических свойств из 36 культур микроорганизмов, выделенных из смывов с туш КРС, для изучения способности образовывать бактериоцины были отобраны только 14 штаммов.

На Рис. 3,4,5,6 представлены фотографии, полученные в результате эксперимента на 3 штаммах МКБ.

На Рис. 3 представлена фотография контрольного образца МА, зараженного тест-штаммом, в который не были внесены молочнокислые бактерии. В результате роста тест-штамма наблюдается сплошная плотная мутность данного агара, что подтверждает способность данного агара обеспечить рост *Salmonella typhimurium*.

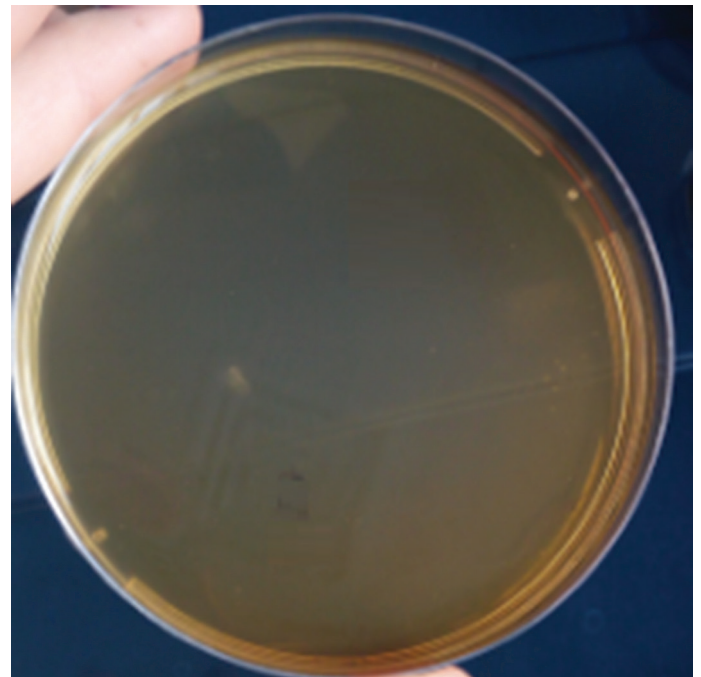


Рис. 3. Фотография роста *Salmonella typhimurium* в МА (контрольный образец)

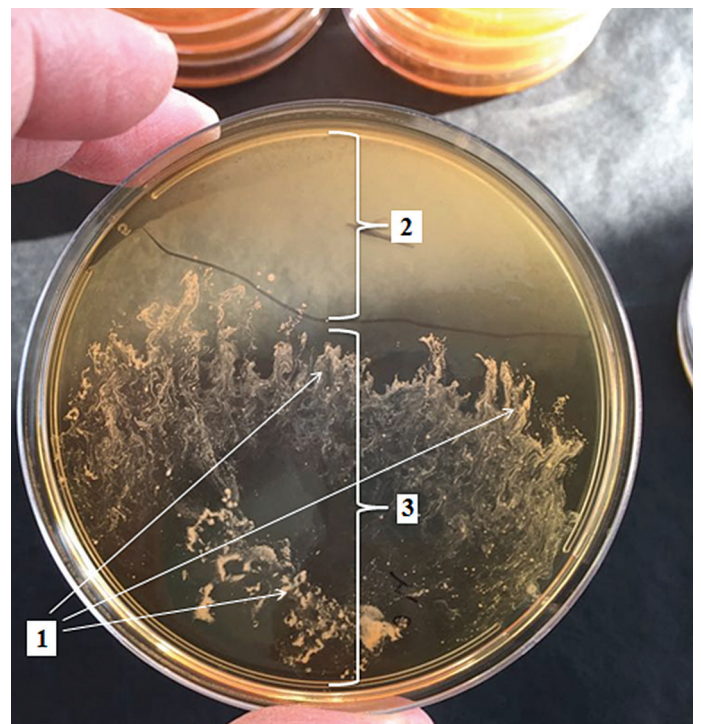


Рис. 4. Фотография чашки Петри с ростом *Salmonella typhimurium* поверх роста МКБ: 1 — рост колоний МКБ в нижнем слое агара; 2 — зона сплошного роста *Salmonella typhimurium* в верхнем слое агара; 3 — зона отсутствия роста *Salmonella typhimurium* в верхнем слое агара

На Рис. 4,5,6 представлены фотографии экспериментальных образцов после культивирования *Salmonella typhimurium* поверх роста МКБ на чашках Петри. Поскольку среда MRS-mod является полужидким агаром, молочнокислые бактерии растут на ней ближе к дну чашки Петри с образованием расплывшихся колоний причудливых форм, они показаны стрелками и отмечены цифрой «1». Согласно методике исследова-

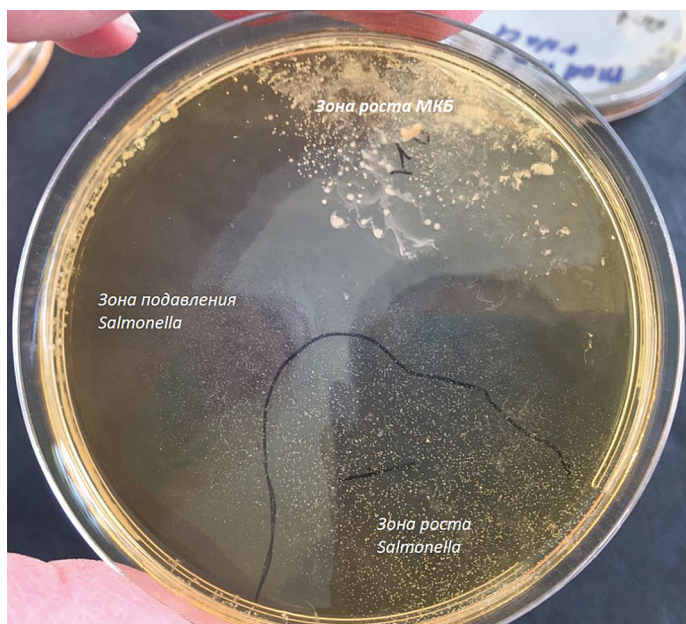


Рис. 5. Фотография чашки Петри с ростом *Salmonella typhimurium* поверх роста МКБ

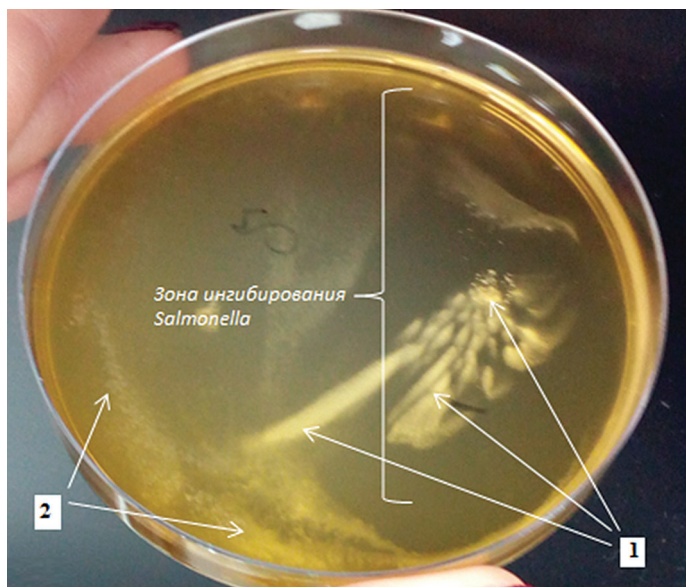


Рис. 6. Фотография чашки Петри с ростом *Salmonella typhimurium* поверх роста МКБ: 1 — рост колоний МКБ в нижнем слое агара; 2 — зона роста *Salmonella typhimurium* в верхнем слое агара

ния, на поверхность MRS-mod с предварительно выросшими молочнокислыми бактериями, был нанесен МА, зараженный *Salmonella typhimurium*.

На Рис. 4 видно, что область агара, где как предполагается должен был быть бактериоцин, отмеченная цифрой «2», потеряла прозрачность из-за роста тест-штамма. В тоже время в зоне роста молочнокислых бактерий среда осталась полностью прозрачной. Цифрой «3» на Рис. 4 показана прозрачная зона, что является результатом ингибирования роста *Salmonella typhimurium* молочнокислыми бактериями. Данный факт может быть результатом отсутствия экзогенно продуцируемого бактериоцина данным видом МКБ или антагонистической активностью только нативной культуры.

На Рис. 5 проведена граница между зонами роста и подавления тест-штамма вторым из исследуемых МКБ. В отличие от роста представленного на Рис. 4, характер роста *Salmonella typhimurium* на Рис. 5 характеризуется отсутствием роста как в зоне видимого роста МКБ, так и зоне его отсутствия. Это является доказательством того что данный штамм МКБ обладает бактериоциногенностью.

На Рис. 6 результаты аналогичны результатам, представленных на Рис. 5. Третий штамм МКБ продуцирует бактериоцин, но отличается культурально-морфологическим характером роста.

Из представленных рисунков видно, что зона подавления роста тест-штамма *Salmonella typhimurium* в присутствии двух из трех исследованных МКБ достигали 3/4 площади чашки Петри, что наглядно демонстрирует высокую антагонистическую активность исследованных МКБ и их бактериоцинов. В результате скрининга МКБ на бактериоциногенность для дальнейшего исследования были отобраны, как наиболее перспективные, только 6 штаммов молочнокислых бактерий.

Использование данного метода оценки позволит не только выявить наличие способности МКБ продуцировать бактериоцины, но и изучить антагонистическую активность как нативной культуры, так и их бактериоцинов в отношении многих изучаемых микроорганизмов, которые многие исследователи позиционируют как индикаторы корректного протекания технологических процессов [23]. Наличие таких индигенных микроорганизмов в мясе возможно позволит за счет минимальных барьерных технологий, таких как вакуумная упаковка или МГА, увеличить срок хранения мяса [24]. В том числе за счет подавления роста близкородственных лактобацилл, некоторые из которых являются микроорганизмами порчи [25], а также рост условно-патогенной и патогенной микрофлоры [26]. Кроме этого, применение молочнокислых бактерий, обладающих бактериоциногенностью, в технологии производства сырокопченых колбас позволит снизить риск производства небезопасной продукции. Таким образом, наличие в мясе индигенных МКБ является дополнительным фактором, обеспечивающим протекание желательных биохимических процессов и безопасность сырокопченых колбас [20,27].

## Выводы

В результате мониторинга туш крупного рогатого скота были отобраны индигенные МКБ обладающие бактериоциногенностью в отношении патогенного тест-штамма *Salmonella typhimurium*. Подтверждена рабочая гипотеза о накоплении бактериоцина в питательной среде. Экспериментально доказано, что выбранные для исследования индигенные молочнокислые бактерии мяса обладают бактериоциногенностью и могут быть применены для снижения роста патогенных микроорганизмов.

## Introduction

Currently, the world pays great attention to food safety. A special place is the protection of food from the effects of xenobiotics, which include microbial contaminants, especially pathogenic bacteria. Ensuring microbiological safety of products is a priority direction of the food industry.

In conjunction with the neurotoxic effect resulting from environmental exposure, food contaminated with pathogens is a great danger to human health.

Despite the introduction of various programs to prevent microbial contamination and control of pathogens — the problem does not lose its relevance. The situation is aggravated by the increasing resistance of a number of pathogens to chemicals, including antibiotics [1].

In connection with the detection of antibiotic resistance of pathogenic microorganisms found in food products, different approaches to deter their reproduction are proposed. Especially rapid development of biological methods. Bacteriophages are actively used abroad. Moreover, they are positioned as alternative to chemical substances means of controlling pathogens and as agents that prolong the shelf life of products [2,3,4].

Among other biological measures to combat pathogens is the use of bacteriocins. Bacteriocins-antibiotic-like substances with bactericidal or bacteriostatic effect, were discovered in the mid of 1960s, at the same time began to study their properties. Despite the rich history of bacteriocin research, their potential has not been fully disclosed yet. The current high level of diagnostic capabilities allows a more in-depth and comprehensive study of the properties of bacteriocins. Bacteriocins are heterogeneous peptides secreted by various microorganisms, including *Lactobacillus* [5].

The mechanism of action of bacteriocins against pathogenic microorganisms is associated with a violation of the permeability of the cytoplasmic membrane of the latter. Bacteriocins are divided into two classes — lantibiotics — peptides containing unusual amino acids (for example, lanthionin) and short heat-resistant polypeptides that do not contain such amino acids. A number of authors are inclined to believe that these peptides have the ability to form pores in the cytoplasmic membrane, resulting in cell lysis of the pathogen [6,7,8,9,10].

The most well — known bacteriocin is nisin, which is synthesized by the coccal strain *Streptococcus lactis*. Currently, nisin is used as a preservative in the production of some foods [11].

For the meat industry, as producers of bacteriocin, the most interesting are the microorganisms that make up the non-pathogenic pool of the indigenous microflora.

Thus, the aim of this study was to identify and study the indigenous *Lactobacillus* of the carcass microbiome of cattle of ritual slaughter (Halal) to assess their bacteriocinogenicity.

## Objects and methods

The objects of the study were flushes selected from the lateral and medial sides of the anterior quarter of cattle carcasses immediately after. To exclude contamination of carcasses by third-party microorganisms that may be deposited by dry and/or wet processing, the collection of swabs was carried out from the surface of carcasses Halal slaughter. When Halal slaughter is not used washing operations carcasses, so there is no change in the original microbiome. Washings were taken from two zones of thoracic and rib cuts of each half-carcass both from the inner and outer surface. Sampling of washings was carried out with sterile sponges moistened with 10 cm<sup>3</sup> of saline solution from each zone with an area of not less than 100 cm<sup>2</sup>. Then the sponges were placed in a sterile package, a buffered peptone water with a volume of 90 cm<sup>3</sup> was added, and a number of tenfold dilutions were used to sow in nutrient media. Since the aim of our work was to study the bacteriocinogenicity of *Lactobacillus*, the primary objective of the study was to identify the *Lactobacillus* from the object of study.

For selection of lactic acid microorganisms from the received washouts, a number of tenfold dilutions were prepared and their sowing in the dense nutrient medium of MRS was carried out by deep method. The crops were incubated for 3 days at a temperature of (30±2)°C at the end of incubation, Petri dishes were examined to identify colonies with a typical growth of lactic acid microorganisms (having a lens shape or a star shape) in order to select them for further study. Typical colonies were passaged in liquid medium MRS-broth, where in optimum conditions at temperature (30±2)°C conducted with the accumulation of biomass of cells. The presence of microbial growth was determined by the turbidity of the broth in the lower part of the tube. The turbidity of the broth in the bottom space of the tube is a characteristic feature of the development of microorganisms with microaerophilic and anaerobic type of respiration, which include *Lactobacillus*. The duration of cultivation ranged 1 to 5 days. In the absence of growth within 5 days or growth different from the above — crops were not further investigated.

To assess the belonging of isolated bacteria to lactic acid microorganisms, according to GOST 10444.11–2013 «Microbiology of food and animal feed. Methods of detection and calculation of mesophilic lactic acid microorganisms», the following comprehensive assessment of each isolated strain, presumably related to lactic acid bacteria, was carried out: growth on the MRS medium at 30°C; catalase formation; evaluation of the microscopic preparation: by gram and by spore formation. Lactic acid microorganisms are characterized by the ability to grow on dense and liquid nutrient media MRS at 30°C, they do not form catalase and gram stained positively, while in the microscopic preparation can be both cocci and sticks, the latter of which do not form a dispute. Culture, identified as lactic acid — passaged in a semi-liquid environment of the MRS

for the purpose of long storage and further study. Other microorganisms were culled.

To determine bacteriocinogenic selected cultures of microorganisms used a modified two-layer technique agar Ulrich Shillinger и Frededich-Karl Lücke [12].

According to the method proposed by these researchers, it was necessary to introduce bacteriocin into the wells of the infected pathogenic microorganisms, agar. Bacteriocin diffused to agar, resulting in a visualized zone of inhibition of growth of the pathogen. Due to the small area of visualization of the results, we have modified the technique. Two specialized nutrient media were used for this purpose. The first medium-modified MRS-agar (MRS-mod), the following composition: non-selective liquid medium MRS; glucose-0,2%; agar-agar-0,3%; the second medium-soft agar (MA) having in its composition: pepton — 15 g, yeast extract — 3 g, NaCl — 6 g, glucose — 1 g, agar-agar — 7 g.

To conduct the study, daily culture of lactabacillus was prepared on the MRS broth, which was applied by touching the surface of the MRS-mod at a certain point using a bacteriological loop. The cups were then incubated with the lids upwards at a temperature of  $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$  for 3 days, for maximum accumulation and diffusion of bacteriocin into the culture medium. At the end of incubation, a thin layer of soft agar, inoculated with a test strain was poured over the MRS-mod. As a test strain was chosen culture *Salmonella typhimurium* ATSS14028, which is a common causative agent of toxicoinfections. Soft agar was infected with a test strain of *Salmonella typhimurium* ATSS14028 with a titer of  $10^6$  KOE /  $\text{cm}^3$ , and the thermostat was again placed for incubation with lids up. The samples were incubated at a temperature  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$  for 24–48 h.

According to the working hypothesis, during the incubation period in the MRS-mod environment, lactic acid microorganisms must multiply, producing bacteriocin, which diffuses into the agar, and then when applying the second layer of agar with the test strain *Salmonella typhimurium*, bacteriocin should prevent the growth of the pathogen.

## Results and discussion

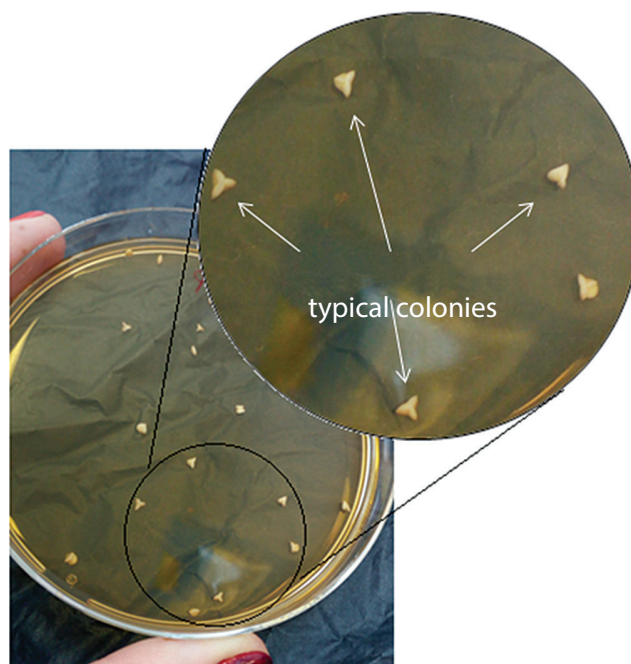
Lactobacillus has potential for use due to their wide range of potential antagonistic activity. The use of bacteriocins produced by lactabacillus is positioned as agents capable of replacing antibiotics and increasing the safety of meat [13,14,15].

The most promising lactabacillus from the point of view of their potential as inhibitors of pathogens, consider the indigenous lactabacillus, that is, isolated from the natural environment. As a rule, bacteria that have the potential of bacteriocinogenic isolated from food products [16,17,18,19].

It is logical to assume that the meat processing industry is most appropriate to use bacteriocins isolated from the indigenous microflora of meat. Since microorganisms from meat can be most adapted to it and be most competitive than those isolated from other sources, a study of it was conducted.

As a rule, lactabacillus are isolated from fermented meat products [20,21], that is, from ready-to-use. In our work, the premise of the study of the indigenous microflora of carcasses was the assumption that the lactic microflora enters the meat products at the initial stages of processing, that is, at the stage of slaughter, nutrition and boning of carcasses.

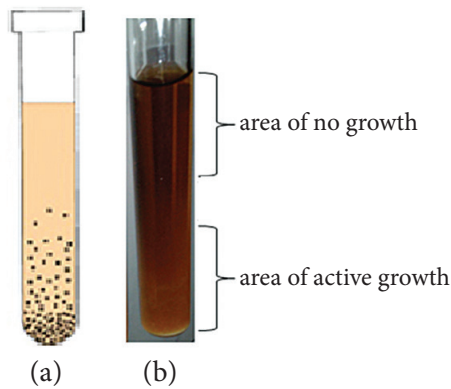
As a result of monitoring the lateral and medial sides of cattle carcasses for the presence of lactic acid bacteria, with a dense nutrient medium, MRS36 microbial colonies were selected for further research. Only those forms of colonies of which, on selective agar, were typical for lactic acid microorganisms: in the form of a three-beam star or a lens (Figure 1). At this stage, 15 samples were excluded from the study. Of the remaining 21 strains, all were positively gram-stained, but 2 were catalozopositive, presumably *Brochothrix thermosphacta*, and did not have a typical lactic acid microorganisms microscopic picture. According to studies by canadian scientists, the bacteria *Brochothrix thermosphacta* can develop together with lactabacillus, reaching high titers [22].



**Figure 1.** Typical growth of  $\mu\text{b}$  in dense MRS nutrient medium

Further studies are 19 conducted by cultivating the strains in MRS broth. When assessing the growth pattern of the selected colonies in this liquid nutrient medium, not all microorganisms showed growth typical of microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms, which include the required prokaryotes. For Figure 2 the illustration from the reference book with the scheme of typical growth of microaerophilic microorganisms (a) and the photo of growth on the broth of the experimental sample (b) is presented.

Thus, after studying the cultural and morphological properties of 36 cultures of microorganisms isolated from the washings from cattle carcasses, to study the ability to form bacteriocin were selected only 14 strains.

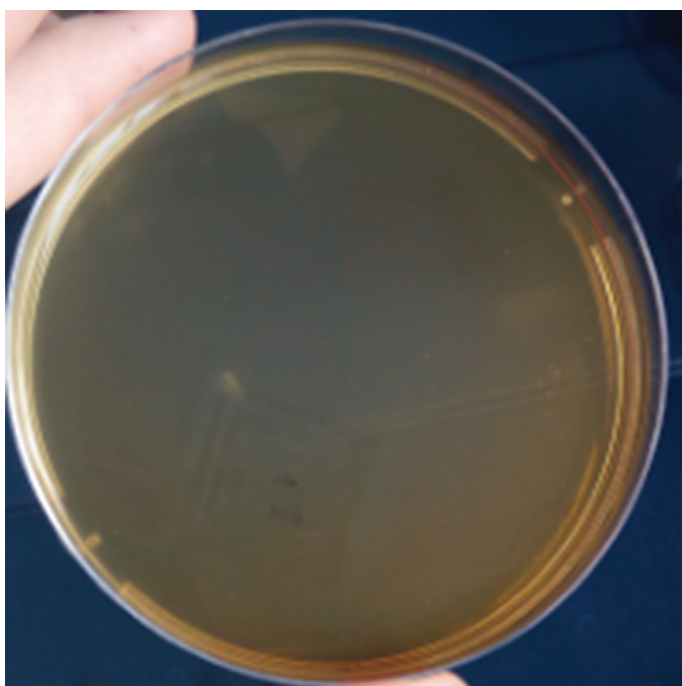


**Figure 2.** Typical growth of lactobacillus in MRS broth for obligate anaerobic microorganisms: (a) — scheme; (b) — photograph of the test tube with the growth of one of the studied samples

For Figures 3,4,5,6 photographs, obtained in the experiment, 3 strains of the lactobacillus.

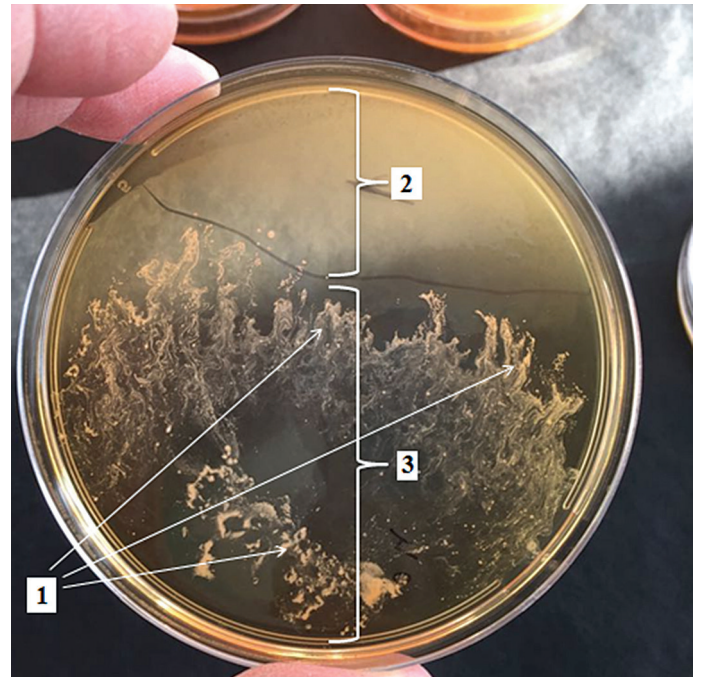
For Figure 3 a photograph of a control sample of CS infected with a test strain that has not been infested with lactobacillus is presented. As a result of the growth of the test strain, a continuous dense turbidity of the agar is observed, which confirms the ability of this agar to ensure the growth of *Salmonella typhimurium*.

For Figure 4,5,6 photos of experimental samples after cultivation of *Salmonella typhimurium* on top of growth of lactobacillus on Petri dishes are presented. Since the MRS-mod environment is a semi-liquid agar, lactobacillus grow on it closer to the bottom of the Petri dish with the formation of vague colonies of bizarre shapes, they are shown by arrows and marked with the number «1». According to the research methodology, CS infected with *Salmonella typhimurium* was applied to the surface of MRS-mod with pre-grown lactobacillus.

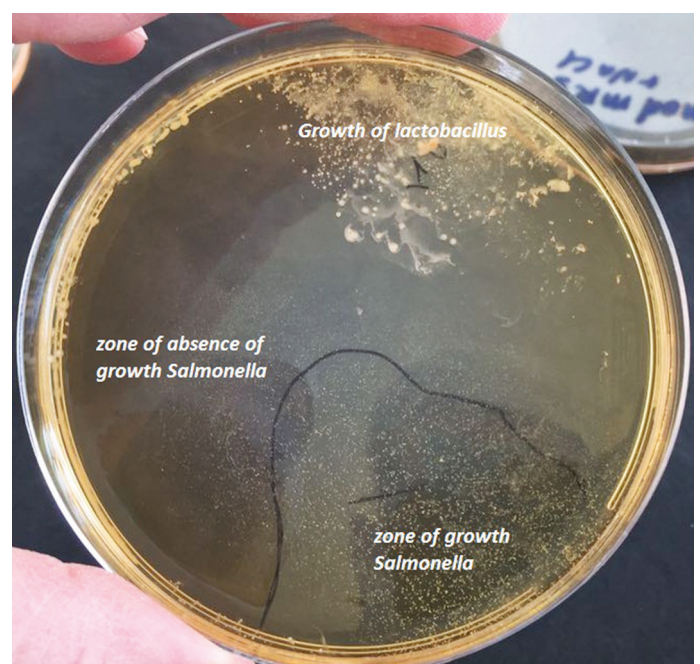


**Figure 3.** Photo of *Salmonella typhimurium* growth in CS (control sample)

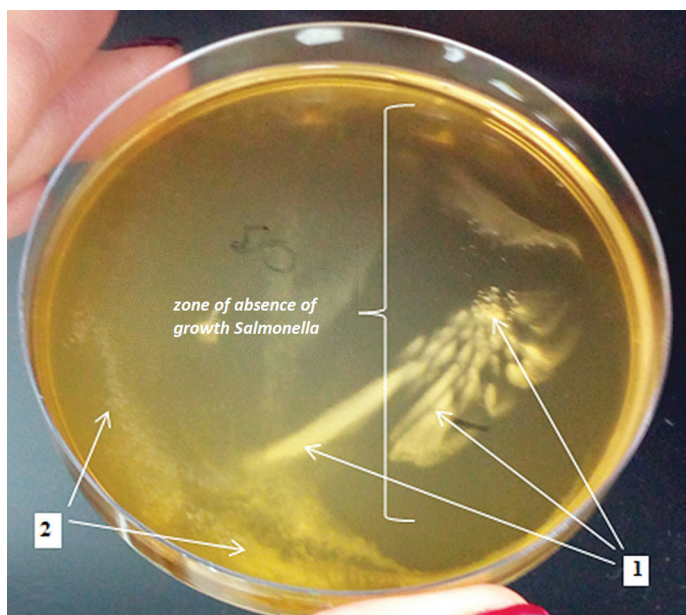
For Figure 4 it can be seen that the area of agar, where it was supposed to be bacteriocin, marked with the number «2», lost transparency due to the growth of the test strain. At the same time in the zone of lactobacillus growth the environment remained completely transparent. Figure 3 and Figure 4 shows a transparent zone, which is the result of inhibiting the growth of *Salmonella typhimurium* lactobacillus. This fact may be the result of the absence of exogenously produced bacteriocin by this type of lactobacillus or antagonistic activity of only the native culture.



**Figure 4.** Photograph of Petri dishes with growth of *Salmonella typhimurium* on top of the growth of lactobacillus: 1 — of lactobacillus colonies in the lower layer of agar; 2 — zone of continuous growth of *Salmonella typhimurium* in the upper layer of agar; 3 — zone of absence of growth of *Salmonella typhimurium* in the upper layer of agar



**Figure 5.** Photograph of Petri dishes with growth of *Salmonella typhimurium* on top of the growth of lactobacillus



**Figure 6.** Photograph of Petri dishes with growth of *Salmonella typhimurium* on top of the growth of lactobacillus: 1 — Growth of lactobacillus colonies in the lower layer of agar; 2 — growth zone of *Salmonella typhimurium* in the upper layer of agar

For Figure 5 the boundary between the growth and suppression zones of the test strain of the second of the studied lactobacillus was determined. In contrast to the growth shown in Pic.4, the growth pattern of *Salmonella typhimurium* in pic.5 it is characterized by the absence of growth in the zone of visible growth of lactobacillus, and the zone of its absence. This is proof that this strain lactobacillus has bacteriocinogenic.

For Figure 6 the results are similar to those shown in Figure 6.5. The third strain of lactobacillus produces bacteriocin, but differs in the cultural and morphological nature of growth.

The presented figures show that the growth suppression zone of the test strain *Salmonella typhimurium* in the pres-

ence of two of the three studied lactobacillus reached 3/4 of the Petri dish area, which clearly demonstrates the high antagonistic activity of the studied lactobacillus and their bacteriocins. As a result of the screening of lactobacillus for bacteriocinogenicity, only 6 strains of lactobacillus were selected for further study as the most promising.

The use of this method of evaluation will not only reveal the presence of the ability of lactobacillus to produce bacteriocins, but also to study the antagonistic activity of both the native culture and their bacteriocins in relation to many studied microorganisms, which many researchers position as indicators of the correct flow of technological processes [23]. The presence of such indigenous microorganisms in meat may allow to increase the shelf life of meat due to minimal barrier technologies, such as vacuum packaging or MGA [24]. In particular, due to the suppression of the growth of closely related lactobacilli, some of which are spoilage microorganisms [25], as well as the growth of opportunistic and pathogenic microflora [26]. In addition, the use of lactic acid bacteria with bacteriocinogenicity in the production technology of raw sausages will reduce the risk of production of unsafe products. Thus, the presence of indigenous lactobacillus in meat is an additional factor that ensures the flow of desired biochemical processes and the safety of raw smoked sausages [20,27].

### Summary

As a result of monitoring of cattle carcass were selected indigenous lactobacillus has bacteriocinogenic against pathogenic test strain *Salmonella typhimurium*. The working hypothesis about the accumulation of bacteriocin in the nutrient medium was confirmed. Experimentally proved, that the chosen for the study of indigenous lactobacillus of meat have bacteriocinogenic and can be applied to reduce the growth of pathogenic microorganisms.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Юшина, Ю.К., Батаева, Д.С., Соколова, О.В. (2017). Микробные контаминанты мяса: что нового? *Всё о мясе*, 4, 37–39
2. Anany, H., Brovko, L.Y., El Arabi, T., Griffiths, M.W. Taylor, T.M. (2015). Bacteriophages as antimicrobials in food products: Applications against particular pathogens. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Chapter 5. Woodhead Publishing, 89–116.
3. Akhtar, M., Viazis, S., Christensen, K., Kraemer, P., Diez-Gonzalez, F. (2017). Isolation, characterization and evaluation of virulent bacteriophages against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 75, 108–115
4. Yeh, Y., Purushothaman, P., Gupta, N., Ragnone, M., Verma, S.C., de Mello, A.S. (2017). Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on *Salmonella* population in final ground products. *Meat science*, 127, 30–34
5. Кудлай, Д.Г., Лиходец, В.Г. (1966). Бактериоциногенность. *Л., Медицина*. — 203 с.
6. Venema, K., Venema, G., Kok, J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiology*, 3(8), 299–303
7. Enfedaque, J., Ferrer, S., Guasch, J.F., Tomás, J., Regué, M. (1996). Identification of *E.coli* surface components involved in bacteriocin binding and translocation. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(1), 19–26
8. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., Nes, I.F. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, 174(17), 5686–5692
9. Nissen-Meyer, J., Granly Larsen, A., Sletten, K., Daeschel, M., Nes, I.F. (1993). Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *Journal of General Microbiology*, 139(9), 1973–1978
10. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1–20
11. Сарафанова, Л.А. (2011). Пищевые добавки. Энциклопедия. М, Профессия. — 776 с. ISBN: 978–5–904757–25–0
12. Schillinger, U., Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901–1906
13. Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23–28
14. Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwathana, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118–132

15. Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Al Karaawi, M.A., Siddiqui, M.U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1–11

16. Barman, S., Ranjan Ghosh, R., Mandal, N.C. (2018). Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Annals of Agrarian Science*. in press. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.05.004>

17. An, Y., Wang, Y., Liang, X., Yi, H., Zuo, Z., Xu, X., Zhang, D, Yu, C., Han, X. (2017). Purification and partial characterization of M1-UVs300, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented sausage. *Food Control*, 81, 211–217

18. Mohammadi, F., Eshaghi, M., Razavi, S., Sarokhalil, D.D., Talebi, M., Pourshafie, M.R. (2018). Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk. *Microbial Pathogenesis*. 118. 242–246

19. Devi Avaiyarasi, N., David Ravindran, A., Venkatesh, P., Arul, V. (2016). In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*, 69, 124–133

20. Swetwathana, A., Visessanguan, W. (2015). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Science*, 109, 101–105

21. Ben Belgacem, Z., Ferchichi, M., Prévost, H., Dousset, X., Manai, M. (2008). Screening for anti-listerial bacteriocin-producing

lactic acid bacteria from «Gueddid» a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Science*, 78(4), 513–521

22. Collins-Thompson, D.L., Lopez, G.R. (1982). Control of *Brochothrix thermosphacta* by *Lactobacillus* Species in Vacuum Packed Bologna. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 15(4), 307–309

23. Quedstedt, T.E., Cook, P.E., Gorris, L.G.M., Cole, M.B. (2010). Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139(SUPPL. 1), S29-S42

24. Mills, J., Donnison, A., Brightwell, G. (2014). Factors affecting microbial spoilage and shelf-life of chilled vacuum-packed lamb transported to distant markets: A review. *Meat Science*, 98(1), 71–80

25. Domínguez-Manzano, J., Jiménez-Díaz, R. (2013). Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria. *Food Control*, 30(2), 474–479

26. Fegan, N., Jenson, I. (2018). The role of meat in foodborne disease: Is there a coming revolution in risk assessment and management? *Meat Science*, in press <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.018>

27. Castro, S.M., Kolomeytseva, M., Casquete, R., Silva, J., Teixeira, P., Castro, S.M., Queirós, R., Saraiva, J.A. (2017). Biopreservation strategies in combination with mild high pressure treatments in traditional Portuguese ready-to-eat meat sausage. *Food Bioscience*, 19, 65–72

## REFERENCES

1. Yushina, Y.K., Bataeva, D.S., Sokolova, O.V. (2017). Microbial meat containments: what's new? *Vsyo o myase*, 4, 37–39. (in Russian)

2. Anany, H., Brovko, L.Y., El Arabi, T., Griffiths, M.W. Taylor, T.M. (2015). Bacteriophages as antimicrobials in food products: Applications against particular pathogens. Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. Chapter 5. Woodhead Publishing, 89–116.

3. Akhtar, M., Viazis, S., Christensen, K., Kraemer, P., Diez-Gonzalez, F. (2017). Isolation, characterization and evaluation of virulent bacteriophages against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 75, 108–115

4. Yeh, Y., Purushothaman, P., Gupta, N., Ragnone, M., Verma, S.C., de Mello, A.S. (2017). Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on *Salmonella* population in final ground products. *Meat science*, 127, 30–34

5. Kudlay, D.G., Likhodetc, V.G. (1966). Bacteriocinogeny. Leningrad: Meditsina. — 203 p.

6. Venema, K., Venema, G., Kok, J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiology*, № 3(8), 299–303

7. Enfedaque, J., Ferrer, S., Guasch, J.F., Tomás, J., Regué, M. (1996). Identification of *E.coli* surface components involved in bacteriocin binding and translocation. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(1), 19–26

8. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., Nes, I.F. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, 174(17), 5686–5692

9. Nissen-Meyer, J., Granly Larsen, A., Sletten, K., Daeschel, M., Nes, I.F. (1993). Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *Journal of General Microbiology*, 139(9), 1973–1978

10. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1–20

11. Sarafanova, L.A. (2011). Nutritional supplements. Encyclopedia. M: Profession. — 776 p. ISBN: 978–5–904757–25–0

12. Schillinger, U., Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901–1906

13. Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23–28

14. Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwathana, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118–132

15. Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Al Karaawi, M.A., Siddiqui, M.U. (2017). Antimicrobial potential of

bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 49(1), 1–11

16. Barman, S., Ranjan Ghosh, R., Mandal, N.C. (2018). Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Annals of Agrarian Science*. in press. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.05.004>

17. An, Y., Wang, Y., Liang, X., Yi, H., Zuo, Z., Xu, X., Zhang, D, Yu, C., Han, X. (2017). Purification and partial characterization of M1-UVs300, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented sausage. *Food Control*, 81, 211–217

18. Mohammadi, F., Eshaghi, M., Razavi, S., Sarokhalil, D.D., Talebi, M., Pourshafie, M.R. (2018). Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk. *Microbial Pathogenesis*. 118. 242–246

19. Devi Avaiyarasi, N., David Ravindran, A., Venkatesh, P., Arul, V. (2016). In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*, 69, 124–133

20. Swetwathana, A., Visessanguan, W. (2015). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Science*, 109, 101–105

21. Ben Belgacem, Z., Ferchichi, M., Prévost, H., Dousset, X., Manai, M. (2008). Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from «Gueddid» a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Science*, 78(4), 513–521

22. Collins-Thompson, D.L., Lopez, G.R. (1982). Control of *Brochothrix thermosphacta* by *Lactobacillus* Species in Vacuum Packed Bologna. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 15(4), 307–309

23. Quedstedt, T.E., Cook, P.E., Gorris, L.G.M., Cole, M.B. (2010). Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139(SUPPL. 1), S29-S42

24. Mills, J., Donnison, A., Brightwell, G. (2014). Factors affecting microbial spoilage and shelf-life of chilled vacuum-packed lamb transported to distant markets: A review. *Meat Science*, 98(1), 71–80

25. Domínguez-Manzano, J., Jiménez-Díaz, R. (2013). Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria. *Food Control*, 30(2), 474–479

26. Fegan, N., Jenson, I. (2018). The role of meat in foodborne disease: Is there a coming revolution in risk assessment and management? *Meat Science*, in press <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.018>

27. Castro, S.M., Kolomeytseva, M., Casquete, R., Silva, J., Teixeira, P., Castro, S.M., Queirós, R., Saraiva, J.A. (2017). Biopreservation strategies in combination with mild high pressure treatments in traditional Portuguese ready-to-eat meat sausage. *Food Bioscience*, 19, 65–72



## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Батаева Дагмара Султановна** — кандидат технических наук, доцент, руководитель направления микробиологии, ведущий научный сотрудник лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН  
109316, Москва, ул. Талалихина, 26  
Тел.: +7-495-676-60-11  
E-mail: d.bataeva@fncps.ru  
\*автор для переписки

**Соколова Ольга Вячеславовна** — кандидат технических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН  
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,  
Тел.: +7-495-676-60-11  
E-mail: o.sokolova@fncps.ru

**Зайко Елена Викторовна** — младший научный сотрудник лаборатории «Гигиена производства и микробиологии», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН  
Адрес: 109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,  
Тел.: +7-495-676-60-11  
E-mail: e.zaiko@fncps.ru

**Пашкова Виктория Витальевна** — старший лаборант лаборатории «Гигиена производства и микробиологии», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН  
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,  
Тел.: +7-495-676-60-11  
E-mail: v.pashkova@fncps.ru

## Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.

Батаева Д.С. разрабатывала научно-методические подходы к проведению работ, определяла объем исследований, анализировала полученные данные, выполняла описательную часть статьи и корректировала после подачи в редакцию  
Соколова О.В. проводила обзор и анализ литературы, выполняла описательную часть

Зайко Е.В. отбирала объекты исследования, выполняла микробиологический анализ.

Пашкова В.В. выполняла подготовительные работы, микробиологические исследования.

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 16.05.2018

## AUTHOR INFORMATION

## Affiliation

**Dagmara S. Bataeva** — candidate of technical sciences, docent, Head of the Direction of Microbiology, leading scientific worker of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-60-11  
E-mail: d.bataeva@fncps.ru  
\*corresponding author

**Olga V. Sokolova** — candidate of technical sciences, leading researcher worker of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-60-11  
E-mail: o.sokolova@fncps.ru

**Elena V. Zaiko** — senior research technician of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-60-11  
E-mail: e.zaiko@fncps.ru

**Victoria V. Pashkova** — junior laboratory assistant of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-60-11  
E-mail: v.pashkova@fncps.ru

## Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

Dagmara S. Bataeva developed scientific and methodological approaches to work, determined the scope of research, analyzed the data obtained, performed the narrative and corrected it after submitting to the editorial office.

Olga V. Sokolova conducted a review and analysis of the literature, carried out the descriptive part

Elena V. Zaiko selected research objects, carried out microbiological analysis.

Victoria V. Pashkova carried out preparatory work and microbiological analysis.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 16.05.2018

## ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ В ОСНОВНЫХ ОТРУБАХ (ПРЕМИАЛЬНЫХ ЧАСТЯХ) И ТУШЕ УБОЙНЫХ СВИНЕЙ

Павлов А.В.<sup>1</sup>, Рудь А.И.,\* М.А. Занкевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Генетика PIC, Белгород, Россия

**Ключевые слова:** содержание мяса в туше, основные отруба, лопатка, шейка, карбонат, грудинка, окорок, корреляция, стоимость, специализированная линия свиней

### Аннотация

С помощью автоматизированной системы классификации туш свиней ультразвуком AutoFOM обработаны показатели 56 682 туш убойных свиней со средней массой туши 94,3 кг. Показана масса и выход мышечной ткани из основных отрубов в туше. Изучены коэффициенты корреляции между массой и содержанием мышечной ткани в туше и основных (премиальных) отрубах (окорок, шейка, лопатка, грудинка, карбонат). Показано, как увеличение массы каждого из отрубов влияет на содержание мышечной ткани в туше в и отруб. Например, установлено, что при увеличении массы грудинки на 10 кг (с 6 до 16 кг) процент выхода мышечной ткани из туши снижается на 3,3 % (с 54,5 до 51,8 %), что составило примерно 0,33 % на 1 кг дополнительного веса грудинки. При увеличении массы корейки с 4 до 14 кг, выход мышечной ткани из туши наоборот увеличился на 11,6 %, т.е. 1,16 % на каждый дополнительный кг массы корейки. Приведена стоимость (в абсолютных и относительных единицах) основных отрубов. Дано заключение о перспективах использования полученных данных при создании специализированной терминальной линии свиней, характеризующейся повышенным содержанием массы премиальных отрубов в туше.

Original scientific paper

## THE CORRELATION BETWEEN LEAN MEAT PERCENTAGE IN PRIMAL CUTS AND TOTAL LEAN MEAT PERCENTAGE IN CARCASS

Andrey V. Pavlov,<sup>1</sup> Andrey I. Rud,\* Maxim A. Zankevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Genetika PIC Ltd, Belgorod, Russia

**Key words:** Lean meat percentage, primal cuts, shoulder, neck, loin, belly, ham, correlation, cost, special line of pigs

### Abstract

With the help of the automated system for the classification of carcasses of pigs, AutoFOM ultrasound have been processed 56 682 carcasses of slaughter pigs with an average carcass weight of 94.3 kg. The mass and yield of muscle tissue from the main cuts in the carcass is shown. Correlation coefficients between the mass and the content of muscle tissue in the carcass and the main (premium) cuts (ham, neck, shoulder, belly, and loin) were studied. It is shown how the increase in the weight of each of the cuts affects the content of muscle tissue in the carcass and in the cut. For example, it was found that when the weight of the belly is increased by 10 kg (from 6 to 16 kg), the percentage of muscle tissue from carcass is reduced by 3.3 % (from 54.5 to 51.8 %), which is approximately 0.33 % for 1 kg of additional weight of the belly. With an increase in the weight of the loin from 4 to 14 kg, the yield of muscle tissue from the carcass on the contrary increased by 11.6 %, i.e. 1.16 % for each additional kg of loin weight. A value (in absolute and relative units) of the main cuts is given. The conclusion is made about the prospects of using the obtained data in the creation of a specialized terminal line of pigs, characterized by an increased content of weight of premium cuts in the carcass.

### Введение

Развитие отечественных свиноводческих компаний, а также проекты ввода производственных мощностей до 2020 года позволяют с уверенностью говорить о положительной динамике производства свинины в России в среднесрочной перспективе. Высокая конкуренция на рынке свинины между отечественными и зарубежными производителями способствует развитию вертикальной интеграции на крупных свиномом-

плексах, включающей собственный убой и переработку животных. Технологические процессы большинства убойных предприятий предусматривают полную или частичную разделку (обвалку) туши на основные отруба (премиальные части), поэтому увеличение их выхода (массы) в туше товарной свиньи обеспечит повышение рентабельности производства свинины.

В литературе детально описаны коэффициенты наследуемости и корреляции с основными селекцион-

**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:** Павлов А.В., Рудь А.И., Занкевич М.А. Взаимосвязь между содержанием мышечной ткани в основных отрубах (премиальных частях) и туше убойных свиней. Теория и практика переработки мяса. 2018;3(2):33-39. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-33-39

**FOR CITATION:** Pavlov A.V., Rud A.I., Zankevich M.A. The correlation between lean meat percentage in primal cuts and total lean meat percentage in carcass. Theory and practice of meat processing. 2018;3(2): 33-39. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-33-39

ными признаками толщины шпика в различных топографических точках регистрации [1,2], толщины длиннейшей мышцы спины и выхода мышечной ткани из туши. Ограниченное количество публикаций в отечественной и зарубежной печати посвящено изучению наследуемости и корреляции между собой массы туши и содержанием мышечной ткани в основных отрубках: шейке, карбонате, окороке, лопатке и грудинке. Например, при изучении особенностей иберийской породы свиней испанскими учеными установлены высокие значения коэффициентов наследуемости основных отрубков (премиальных частей) туши:  $h^2 = 0,38-0,43$ ; коэффициенты корреляции между основными отрубками животных этой породы и среднесуточным приростом живой массы находятся в интервале  $0,49-0,74$  [3,4].

Американскими учеными в Университете штата Айова установлена высокая положительная корреляция массы грудинки с толщиной шпика (0,52), при отрицательной корреляции этого признака с массой карбоната (-0,54), а также высокие значения коэффициентов наследуемости трех премиальных частей: окорока (0,60), карбоната (0,61) и грудинки (0,66) [5].

При изучении французскими учеными [6] генетических корреляций между длиной туши, толщиной шпика, глубиной длиннейшей мышцы спины и массой основных премиальных частей у отцовского типа французской крупной белой породы свиней  $h^2$  массы карбоната составил 0,43; лопатки 0,23 и грудинки 0,35.

Учитывая существенную разницу в стоимости основных отрубков, а также их достаточно высокие коэффициенты наследуемости и корреляции друг с другом, актуальным является вопрос создания специализированной терминальной линии свиней, характеризующейся повышенным содержанием массы премиальных отрубков в туше. Пионерами в этом направлении стали производственная компания Triumph Foods (США) и генетическая компания PIC, которые совместно разработали и с 2008 года реализовали специальную племенную программу по созданию специализированной терминальной линии свиней, получившей название TR-4. Основанная в 1974 году, компания Triumph Foods в настоящий момент занимает второе место в США, после компании Smithfield Foods, по количеству свиноматок, которое в настоящее время превышает 380 000 голов.

В системе компании на мясокомбинате предусмотрена обвалка от 70 до 100% премиальных частей туши: карбоната, окорока, грудинки и переднего окорока. За семь лет совместной работы удалось достичь поставленных задач и увеличить массу основных отрубков: карбоната, грудинки и переднего окорока, что в конечном итоге позволило существенно увеличить доходы предприятия.

## Материалы и методы

Исследования по изучению взаимосвязи между содержанием мышечной ткани в основных отрубках (премиальных частях) и туше убойных свиней проведены на бойне одного из крупных производителей свинины в России. Данные для анализа по массе основных отрубков собраны с помощью полностью автоматизированной системы классификации туш свиней с помощью ультразвука AutoFOM (Automatic Fat-o-meat'er) (производство компании Carometec, Дания) [7]. В обработке были использованы показатели от 56 682 туш убойных свиней со средней массой туши 94,3 кг. Туши проходят через полукруглый контур с шестнадцатью ультразвуковыми датчиками. Отраженные от мышечной, жировой и костной тканей сигналы датчиков формировали трехмерное изображение, анализ которого позволял определить процент выхода мяса, вес или выход составных частей туши (окорок, филейная часть, лопатка, грудинка в кг или %).

## Результаты и обсуждение

Масса и выход мышечной ткани из основных отрубков распределились следующим образом (Табл. 1).

**Таблица 1. Масса и выход мышечной ткани из основных отрубков в туше**

Наименование отруба	Масса, кг	Выход мышечной ткани, %
Шейка	5,05	—
Лопатка	10,05	58,84
Корейка	9,52	61,55
Грудинка	11,14	53,07
Окорок	17,62	70,00

Наибольшую массу и содержание мышечной ткани имеет окорок, как один из основных отрубков туши. Следующая по массе после окорока грудинка имеет самый низкий показатель выхода мышечной ткани (Табл. 1). Шейка является самым маловесным, но самым дорогостоящим отрубком из-за ее популярности среди населения России; измерения содержания мышечной ткани в шейке в компании не производится. Выявлены корреляционные связи между массой грудинки (кг), содержанием мышечной ткани в туше (%) и грудинке (Табл. 2).

При увеличении массы грудинки на 10 кг (с 6 до 16 кг) процент выхода мышечной ткани из туши снизился на 3,3% (с 54,5 до 51,8%), что составило примерно 0,33% на 1 кг дополнительного веса грудинки. При этом содержание мышечной ткани в грудинке снизилось на 2,7% или на 0,27% на каждый дополнительный кг увеличения её массы. Полученные данные доказывают отрицательную корреляцию между массой грудинки и выходом мышечной ткани из туши и грудинки, как одного из основных отрубков туши.

Таблица 2. Корреляционные взаимосвязи между массой грудинки (кг) и выходом мышечной ткани из туши (%) и грудинки (%)

Масса грудинки, кг	Выход мышечной ткани, %	
	из туши	из грудинки
6,0	58,2	54,5
6,5	58,1	54,3
7,0	57,9	54,2
7,5	57,7	54,1
8,0	57,6	53,9
8,5	57,4	53,8
9,0	57,3	53,7
9,5	57,1	53,5
10,0	56,9	53,4
10,5	56,8	53,2
11,0	56,6	53,1
11,5	56,4	53,0
12,0	56,3	52,8
12,5	56,1	52,7
13,0	55,9	52,6
13,5	55,8	52,4
14,0	55,6	52,3
14,5	55,5	52,2
15,0	55,3	52,0
15,5	55,1	51,9
16,0	55,0	51,8

Анализ массы корейки и окорока во взаимосвязи с содержанием в них мышечной ткани, а также выходом мышечной ткани из туши позволил выявить высокую положительную корреляцию между этими признаками (Табл. 3 и Табл. 4).

Таблица 3. Взаимосвязь между массой корейки и выходом мышечной ткани из туши и корейки

Масса корейки, кг	Выход мышечной ткани, %	
	из туши	из корейки
4,0	50,2	49,4
4,5	50,7	50,5
5,0	51,3	51,6
5,5	51,9	52,7
6,0	52,5	53,8
6,5	53,1	54,9
7,0	53,6	56,0
7,5	54,2	57,1
8,0	54,8	58,2
8,5	55,4	59,3
9,0	56,0	60,4
9,5	56,5	61,5
10,0	57,1	62,6
10,5	57,7	63,7
11,0	58,3	64,8
11,5	58,9	65,9
12,0	59,4	67,0
12,5	60,0	68,1
13,0	60,6	69,2
13,5	61,2	70,3
14,0	61,8	71,4

Таблица 4. Соотношение стоимости и массы основных отрубов в туше (ср. вес туши — 95,7 кг; в ценах 2016 года)

Наименование	Масса, кг	Масса, %	Стоимость 1 кг, руб.	Стоимость по массе, руб.	Стоимость по массе, %
Грудинка	11,152	20,78	225	2509,2	16,86
Лопатка б\к	10,136	18,89	270	2736,7	18,39
Шейка	5,089	9,48	361	1837,1	12,35
Корейка	9,627	17,94	293	2820,7	18,95
Окорок б\к	17,653	32,90	282	4978,2	33,45
ИТОГО	53,657	100	1431	14881,9	100,00

При увеличении массы корейки с 4 до 14 кг, выход мышечной ткани из туши увеличился на 11,6 %, т.е. 1,16 % на каждый дополнительный кг массы корейки; при этом содержание в корейке мышечной ткани увеличивалось еще более существенно в сравнении с выходом мышечной ткани из туши, и составило 2,2 %/кг корейки.

При массе окорока 10 кг и содержании в нем мышечной ткани 67,7 %, средний выход мышечной ткани из туши составил 53,1 %. При увеличении массы окорока до 24 кг эти показатели выросли соответственно до 71,9 и 59,4 %.

Общий выход мышечной ткани из туши с увеличением массы окорока на 14 кг вырос на 6,3 %, или 0,45 %/1 кг массы окорока. При увеличении массы окорока на 14 кг содержание мышечной ткани в окороке увеличилось в среднем на 4,3 % или 0,31 % на каждый дополнительный кг массы окорока (Рис. 1).

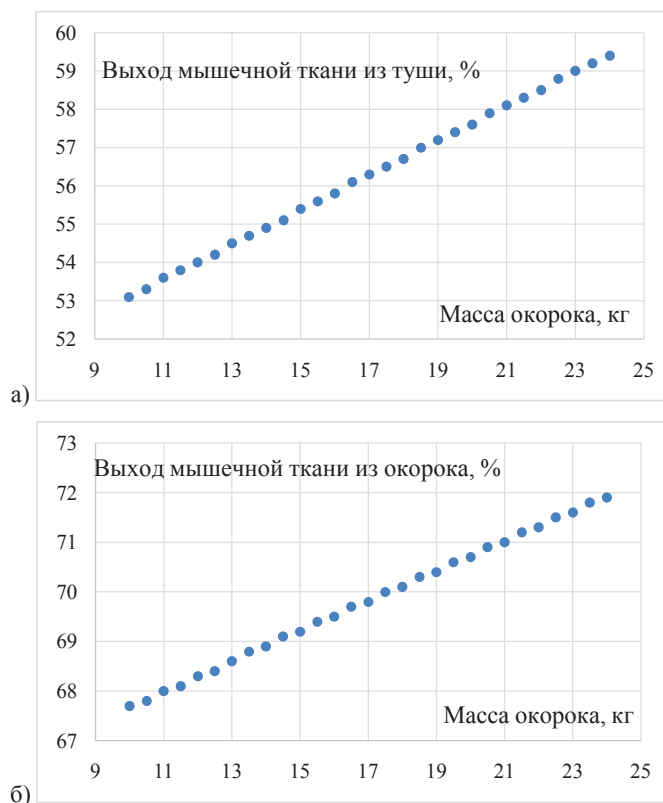


Рис. 1. Взаимосвязь между массой окорока и выходом мышечной ткани: а) — из туши; б) — из окорока

Установлены высокие коэффициенты корреляции между содержанием мышечной ткани в туше и основных отрубях: лопатки (0,81), грудинки (0,82), окорока (0,90) и корейки (0,89), а также между содержанием мышечной ткани в туше и массой таких основных отрубей, как бескостная лопатка (0,51) и корейка (0,41). Коэффициенты корреляции между массой шейки и окорока были не такими высокими и составили 0,33 и 0,24 соответственно. Установлена низкая отрицательная корреляция между массой грудинки и содержанием мышечной ткани в туше ( $-0,1$ ); корреляция между толщиной шпика (мм) и массой грудинки положительная ( $r = 0,28$ ).

Изучена масса основных отрубей в туше в кг и в процентном отношении к общей массе основных отрубей (при средней массе туши 95,7 кг), а также их стоимость в рублях и процентном отношении к общей стоимости всех основных отрубей в туше (Табл. 4).

Максимальную стоимость 1 кг имеет шейка — 361 руб. Однако, данный отруб имеет также и минимальную массу — 5,089 кг или 9,5% от общей массы всех основных отрубей в туше. Максимальную долю в туше в килограммах и в процентном отношении к массе всех основных отрубей имеет окорок (17,7 кг и 32,9%). По стоимости за 1 кг окорок занимает третье место, лишь немного уступая корейке, однако этот отруб имеет максимальный удельный вес в общем весе основных отрубей туши, и, соответственно, самую высокую удельную стоимость в %.

Учитывая близкие по значениям коэффициенты корреляции между весом шейки и окорока с содержа-

нием мышечной ткани в туше, необходим тщательный анализ данных перед принятием решения о том, какой из этих двух основных отрубей будет иметь первостепенное значение в структуре селекционного индекса терминальной линии.

Грудинка занимает последнее место в структуре стоимости всех основных отрубей. Учитывая слабую отрицательную корреляцию между массой грудинки и содержанием мышечной ткани в туше, мы считаем нерациональным проведение селекции на увеличение массы этого отруба. Увеличение массы в туше шейки, корейки, окорока и бескостной лопатки приведет одновременно к увеличению содержания мышечной ткани в туше (за счет высоких коэффициентов корреляции между этими признаками) при косвенном положительном влиянии на увеличение содержания мышечной ткани в грудинке.

### Выводы

Результаты проведенных исследований и расчетов свидетельствуют о высокой взаимосвязи между основными убойными характеристиками туши, а также существенном влиянии массы и выхода мышечной ткани из основных отрубей туши на экономическую эффективность работы свиноводческого предприятия. Необходимо учитывать описанные выше взаимосвязи при конструировании селекционных индексов различной структуры в рамках создания максимально эффективной модели при проведении селекции терминальной (отцовской) линии на увеличение массы основных отрубей в туше.

### Introduction

The development of domestic pig-breeding companies, as well as the projects of commissioning of production facilities until 2020 allow us to speak with confidence about the positive dynamics of pork production in Russia in the medium term. High competition in the pork market between domestic and foreign producers contributes to the development of vertical integration in large pig complexes, including own slaughter and processing of animals. Technological processes of the majority of the slaughter companies provide full or partial cutting (trimming) on the primal cuts, so the increase in their output (mass) in the carcass market swine will improve the profitability of pork production.

The literature describes in details the coefficients of heritability and correlation with the main selection characteristics of the thickness of the fat in various topographic points of registration [1,2], the depth of the longest back muscle and the lean meat percentage from the carcass. A limited number of publications in the domestic and foreign press is devoted to the study of the heritability and correlation between the mass of the carcass and the content of lean meat percentage in the primal cuts: neck, loin, ham,

shoulder and belly. For example, in the study of the characteristics of the Iberian breed of pigs Spanish scientists have established high values of the coefficients of heritability of the primal cuts (premium parts) carcasses:  $h^2 = 0.38-0.43$ ; correlation coefficients between the primal cuts of animals of this breed and the average daily gain of live weight are in the range between 0.49–0.74 [3,4].

American scientists at the University of Iowa established a high positive correlation of the mass of the belly with the thickness of the fat (0.52), with a negative correlation of this characteristic with the mass of loin ( $-0.54$ ), as well as high values of the inheritance coefficients of three primal cuts: ham (0.60), loin (0.61) and belly (0.66) [5].

In the study of French scientists [6] genetic correlations between the length of the carcass, thickness of fat, depth of the longest back muscle and the mass of the the primal cuts in the father type of the French large white breed of H2 pigs, the weight of loin was 0.43; the shoulder blades were 0.23 and the belly was 0.35.

Given the significant difference in the cost of the primal cuts, as well as their rather high coefficients of heritability and correlation with each other, it is important to create a specialized terminal line of pigs, characterized by a high

content of the mass of primal cuts in the carcass. The pioneers in this direction were the production company Triumph Foods (USA) and the genetic company PIC, which jointly developed and since 2008 implemented a special breeding program for the creation of a specialized terminal line of pigs, called TR-4. Founded in 1974, Triumph Foods is currently ranked second in the United States, after Smithfield Foods, in terms of the number of sows, which currently exceeds 380,000 heads.

The company's system at the meat processing plant provides for boning from 70 to 100 % of the primal parts of the carcass: loin, ham, belly and front ham. During the seven years of joint work it was possible to achieve the objectives and increase the mass of the primal cuts: loin, belly and front ham, which ultimately allowed to significantly increase the income of the enterprise.

### Material and methods

Studies of the relationship between the content of LEAN MEAT PERCENTAGE in the primal cuts and carcass of slaughter pigs were carried out at the slaughter of one of the largest pork producers in Russia. Data for analysis by mass of the primal cuts are collected within 30 days with the help of a fully automated classification system for pig carcasses with the AutoFOM ultrasound (Automatic Fatometer) (trade company Carometec, Denmark) [7]. In the treatment were used indicators from 56 682 carcasses of slaughter pigs with an average carcass weight of 94.3 kg. Carcasses pass through a semicircular circuit with sixteen ultrasonic sensors. The signals of sensors reflected from muscle, fat and bone tissue formed a three-dimensional image, the analysis of which allowed to determine the percentage of meat output, the weight or yield of the components of the carcass (ham, loin, shoulder blade, belly in kg or %).

### Results and discussion

The results of the research and their discussion: the mass and output of LEAN MEAT PERCENTAGE from the primal were distributed as follows (Table 1).

**Table 1. Mass and lean meat percentage from the primal cuts in carcasses**

The name of the cut	Mass, kg	Lean meat percentage, %
Neck	5.05	—
Shoulder	10.05	58.84
Loin	9.52	61.55
Belly	11.14	53.07
Ham	17.62	70.00

The greatest weight and content of muscle tissue is ham, as one of the main cuts of carcass. The next by mass after the ham is belly, has the lowest rate of lean meat percentage (Table 1). The neck is the smallest, but the most expensive cut because of its popularity among the population of Russia; measurement of the content of lean meat percentage

in the neck of the company is not made. Correlations between weight of bell (kg), content of lean meat percentage in carcass (%) and belly were revealed (Table 2).

**Table 2. Correlations between weight of belly (kg) and yield of lean meat percent-age from carcass (%) and belly (%)**

Mass of the belly, kg	Lean meat percentage, %	
	From the carcass	From the belly
6.0	58.2	54.5
6.5	58.1	54.3
7.0	57.9	54.2
7.5	57.7	54.1
8.0	57.6	53.9
8.5	57.4	53.8
9.0	57.3	53.7
9.5	57.1	53.5
10.0	56.9	53.4
10.5	56.8	53.2
11.0	56.6	53.1
11.5	56.4	53.0
12.0	56.3	52.8
12.5	56.1	52.7
13.0	55.9	52.6
13.5	55.8	52.4
14.0	55.6	52.3
14.5	55.5	52.2
15.0	55.3	52.0
15.5	55.1	51.9
16.0	55.0	51.8

With an increase in the mass of the belly on 10 kg (from 6 to 16 kg), the percentage lean meat from the carcass decreased by 3.3 % (from 54.5 to 51.8 %), which was about 0.33 % per 1 kg of additional weight of the belly. At the same time, the content of lean meat percentage in the belly decreased by 2.7 % or 0.27 % for each additional kg of increase in its mass. The data obtained prove a negative correlation between the mass of the belly and the lean meat percentage from the carcass and belly, as one of the primal cuts of the carcass.

Analysis of the mass of the loin and ham in relation to the content of lean meat percentage in them, as well as the lean meat percentage from the carcass revealed a high positive correlation between these characteristics (Tables 3 and 4).

With an increase in the mass of the loin from 4 to 14 kg, the output of lean meat percentage from the carcass increased by 11.6 %, i.e. 1.16 % for each additional kg of the loin weight; the content in the loin of lean meat percentage increased even more significantly in comparison with the output of lean meat percentage from the carcass, and amounted to 2.2 %/kg of the loin.

With a weight of 10 kg of ham and a lean meat percentage content of 67.7 %, the average yield of muscle tissue from the carcass was 53.1 %. With an increase in the weight of the ham to 24 kg, these figures increased to 71.9 and 59.4 %, respectively.

Table 3. The relationship between the mass of the loin and the lean meat percent-age from the carcass and loin

Mass of the loin, kg	Lean meat percentag,%	
	From the carcass	From the loin
4.0	50.2	49.4
4.5	50.7	50.5
5.0	51.3	51.6
5.5	51.9	52.7
6.0	52.5	53.8
6.5	53.1	54.9
7.0	53.6	56.0
7.5	54.2	57.1
8.0	54.8	58.2
8.5	55.4	59.3
9.0	56.0	60.4
9.5	56.5	61.5
10.0	57.1	62.6
10.5	57.7	63.7
11.0	58.3	64.8
11.5	58.9	65.9
12.0	59.4	67.0
12.5	60.0	68.1
13.0	60.6	69.2
13.5	61.2	70.3
14.0	61.8	71.4

Table 4. Ratio of cost and mass of the primal cuts in the carcass (i.e., mass — of 95.7 kg; the price of 2016)

Name	Mass, kg	Mass,%	Cost of 1 kg, rub.	Cost by mass, rub.	Cost by mass, %
Belly	11.152	20.78	225	2509.2	16.86
Boneless shoulder	10.136	18.89	270	2736.7	18.39
Neck	5.089	9.48	361	1837.1	12.35
Loin	9.627	17.94	293	2820.7	18.95
Boneless ham	17.653	32.90	282	4978.2	33.45
Total	53.657	100	1431	14881.9	100.00

The total yield of lean meat percentage from the carcass with an increase in the mass of the ham on 14 kg increased by 6.3 %, or 0.45%/1 kg of ham weight. With an increase in the weight of the ham on 14 kg, the content of lean meat percentage in the ham increased by an average of 4.3 % or 0.31 % for each additional kg of ham weight (Figure 1).

High correlation coefficients between the content of lean meat percentage in the carcass and the primal cuts: shoulder (0.81), belly (0.82), ham (0.90) and loin (0.89), as well as between the content of lean meat percentage in the carcass and the mass of such primal cuts as boneless shoulder (0.51) and loin (0.41). The correlation coefficients between the mass of the neck and ham were not so high and were 0.33 and 0.24, respectively. A low negative correlation between the mass of the belly and the content of lean meat percentage in the carcass (- 0.1) was established; the correlation between the thickness of the fat (mm) and the weight of the belly is positive (r = 0.28).

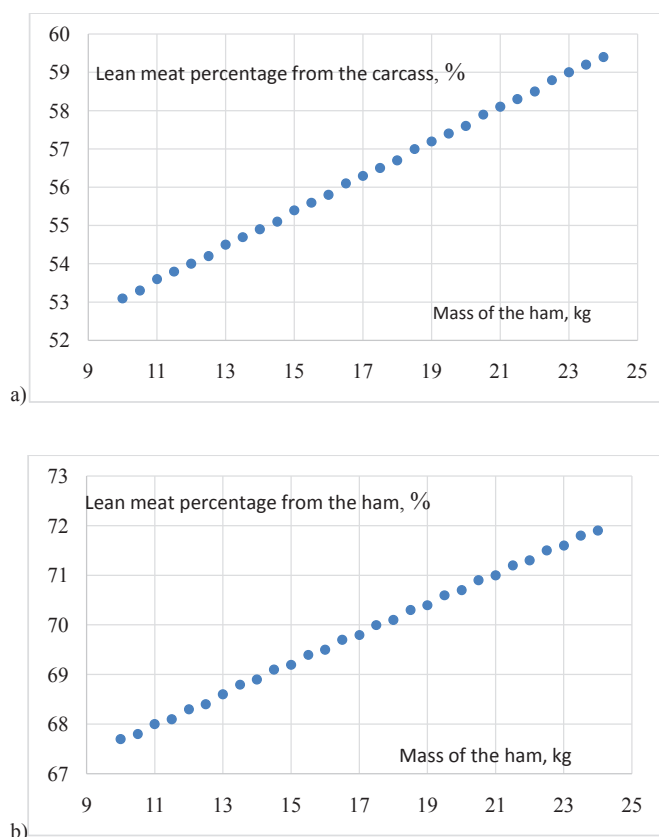


Fig. 1. The Relationship between the weight of the ham and the lean meat percentage: a) — from the carcass; b) — from the ham

The weight of the main cuts in carcass in kg and as a percentage of the total mass of the primal cuts (with an average carcass weight of 95.7 kg), as well as their cost in rubles and as a percentage of the total cost of all the primal cuts in carcass (Table 4).

The neck has a maximum cost of 1 kg -361 rubles. However, this cut also has a minimum weight — 5,089 kg or 9.5% of the total weight of all primal cuts in the carcass. The maximum share in carcass in kilograms and percentage to the mass of all the primal cuts is ham (17.7 kg and 32.9%). The ham takes third place with cost of 1 kg, only slightly inferior to the loin, but this cut has the maximum share in the total weight of the primal cuts of carcasses, and, accordingly, the highest specific cost in %.

Given the close value of the correlation coefficients between the weight of the neck and ham with the content of lean meat percentage in the carcass, a thorough analysis of the data before deciding which of these two primal cuts will be of paramount importance in the structure of the breeding index of the terminal line.

Belly occupies the last place in the cost structure of all major cuts. Given the weak negative correlation between the mass of the belly and the content of lean meat percentage in the carcass, we consider it irrational to conduct selection to increase the mass of this cut. The increase of mass in the carcass of the neck, loin, ham and boneless shoulder blade will at the same time to increase the content of muscle in the carcass (due to the high correlation coefficients between these characteristics), the indirect positive

impact on the increase in the content of lean meat percentage in the belly.

### Conclusion

The results of studies and calculations show a high relationship between the main characteristics of carcass slaughter, as well as a significant impact of mass and

muscle tissue from the primal carcass cuts on the economic efficiency of the pig enterprise. It is necessary to take into account the above relationships in the design of breeding indices of different structures in the creation of the most effective model for the selection of terminal (paternal) line to increase the mass of the primal cuts in the carcass.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

1. Пархоменко, Е.Г., Ларионова, П.В. (2014). Сравнение эффективности различных методов селекции свиней по толщине шпика. *Свиноводство*, 6, 13–16.
2. Рудь А.И., Ларионова, П.В., Пархоменко Е.Г., Атамась И.Ю., Заболотная А.А., Юдина Н.П. (2012). Получение туш свиней желательной категории. *Зоотехния*, 1, 17–20.
3. Fernández, A., García-Casco, J., De Pedro, E., Silió, L., Rodríguez, M.C. (2007). Genetic antagonism between intramuscular fat content and primal cuts in Iberian pigs? *International Symposium on the Mediterranean Pig, Zaragoza: CIHEAM*, 43–46.
4. Захаров, А.Н., Эдер, А.В., Миттельштейн, Т.М., Козырев, И.В. (2012). Система объективной оценки качества свиных туш по выходу мышечной ткани. *Все о мясе*, 4, 39–41.

5. Heritability of Primal Components (2002). [Электронный ресурс: [http://www.nationalhogfarmer.com/mag/farming\\_heritability\\_primal\\_components](http://www.nationalhogfarmer.com/mag/farming_heritability_primal_components) Дата обращения 17.05.2018]
6. Mérour, I., Hermes, S., Jones, R.M., Tribout, T. (2009). Genetic correlations between carcass length, fat and muscle depths and primal cut weights in the French large white sire line. *Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, Barossa Valley, South Australia, Australia*, 195–198.
7. Рудь, А.И., Ларионова, П.В., Быканов, А.В. (2011). Послеубойная оценка мясных характеристик туш свиней. *Свиноводство*, 7, 4–7.

## REFERENCES

1. Parkhomenko, E.G., Larionova, P.V. (2014). Comparison of efficiency of various methods of selection of pigs on backfat. *Pig-breeding*, 6, 13–16. (in Russian)
2. Rud, A.I., Larionova, P.V., Parkhomenko, E.G., Atamas, A.Yu., Zabolotnaya, A.A., Yudina, N.P. (2012). Receiving the desired category swine carcasses. *Zootekhnika*, 1, 17–20. (in Russian)
3. Fernández, A., García-Casco, J., De Pedro, E., Silió, L., Rodríguez, M.C. (2007). Genetic antagonism between intramuscular fat content and primal cuts in Iberian pigs? *International Symposium on the Mediterranean Pig, Zaragoza: CIHEAM*, 43–46.
4. Zakharov, A.N., Eder, A.V., Mittelshtein, T.M., Kozurev, I.V. (2012). System for an objective assessment of the quality of porcine carcasses in the output of muscle tissue. *Vsyo o myase*, 4, 39–41. (in Russian)

5. Heritability of Primal Components (2002). [Electronic resource: [http://www.nationalhogfarmer.com/mag/farming\\_heritability\\_primal\\_components](http://www.nationalhogfarmer.com/mag/farming_heritability_primal_components) Дата обращения Access date 17.05.2018]
6. Mérour, I., Hermes, S., Jones, R.M., Tribout, T. (2009). Genetic correlations between carcass length, fat and muscle depths and primal cut weights in the French large white sire line. *Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, Barossa Valley, South Australia, Australia*, 195–198.
7. Rud, A.I., Larionova, P.V., Bykanov, A.V. (2011). Post slaughter evaluation of meat characteristics of the pigs carcasses. *Pig-breeding*, 7, 4–7. (in Russian)

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

#### Принадлежность к организации

**Андрей Васильевич Павлов** — кандидат сельскохозяйственных наук, директор по генетическому и техническому сопровождению, ООО «Генетика ПИК»  
308000, Белгород, бульвар Народный, 79А  
Тел.: +7-4722-20-02-58  
E-mail: Andrey.Pavlov@genusplc.com

**Рудь Андрей Иванович** — доктор сельскохозяйственных наук.  
E-mail: dongrot@yandex.ru  
Тел.: +7-4722-20-02-58  
\* автор для переписки

**Максим Адамович Занкевич** — кандидат сельскохозяйственных наук, главный специалист по генетическому сопровождению, ООО «Генетика ПИК»  
308000, Белгород, бульвар Народный, 79А  
Тел.: +7-4722-20-02-58  
E-mail: Maxim.Zankevich@genusplc.com

#### Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.  
Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.  
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 30.05.2018

### AUTHOR INFORMATION

#### Affiliation

**Andrey V. Pavlov** — candidate of agricultural sciences, Director of Genetic and Technical Support, Genetika PIC Ltd  
308000, Belgorod, Narodnyi bulvar, 79A  
Tel.: +7-4722-20-02-58  
E-mail: Andrey.Pavlov@genusplc.com

**Andrey I. Rud** — doctor of agricultural sciences.  
E-mail: dongrot@yandex.ru  
Tel.: +7-4722-20-02-58  
\* corresponding author

**Maxim A. Zankevich** — candidate of agricultural sciences, chief expert on genetic support, Genetika PIC Ltd  
308000, Belgorod, Narodnyi bulvar, 79A  
Tel.: +7-4722-20-02-58  
E-mail: Maxim.Zankevich@genusplc.com

#### Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.  
All authors made an equal contribution to the work.  
The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 30.05.2018



## ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ПРОКАРИОТ

Минаев М.Ю.,\* Махова А.А.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

**Ключевые слова:** экспрессия генов, прокариоты, ПЦР, количественный анализ**Аннотация**

Количественная полимеразная цепная реакция (qПЦР) в реальном времени — один из методов оценки уровня экспрессии генов. Интерес к изучению молекулярных механизмов экспрессии генов и ее оценки в прокариотической клетке обусловлен недостатком исследований по данному вопросу и рядом методологических проблем. В работе представлено изучение механизма экспрессии генов у прокариот на примере генов гиразы B и коллагеназы *Aeromonas salmonicida* ASI. В результате проведенных исследований были протестированы применяемые в реакции обратной транскрипции случайный (Random) и праймер oligo (dT) с «якорем» (два крайних нуклеотида праймера по 3' концу, комплементарные нуклеотидам стоп-кодона транскрибируемой последовательности ДНК) и адаптером собственной разработки. Применение oligo (dT) праймера стало возможным только после полиаденирования выделенной РНК с помощью специального набора с поли — А полимеразой. Установлено, что разработанный нами протокол проведения обратной транскрипции (ОТ) с использованием oligo (dT) праймера и определенной последовательностью адаптера на его 5' конце, предназначенного для дальнейшего отжига реверс-праймера при проведении ПЦР в реальном времени наряду с предварительным полиаденированием РНК исключает специфическую амплификацию остаточной фоновой геномной ДНК. Данная методика может найти применение в оценке уровня экспрессии низкоэкспрессионных генов при высоком содержании примеси фоновой геномной ДНК в образце РНК, например, на конечной стадии логарифмического роста прокариотической клетки.

Original scientific paper

## THE STUDY OF PROKARYOTIC GENE EXPRESSION

Mihail Yu. Minaev,\* Anzhelika A. Makhova

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**Key words:** gene expression, prokaryotes, PCR, assay**Abstract**

One of the methods to evaluate the level of gene expression is a real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Interest in the study of molecular mechanisms of gene expression and its evaluation in prokaryotes is due to the lack of research on this issue and a number of methodological problems. The paper presents a study of gene expression mechanism in prokaryotes evidence from *Aeromonas salmonicida* ASI gyrase B and collagenase genes. As a result of the research, Random primer and oligo (dT) primer (two 3'-terminal nucleotides of the primer complementary to stop codon nucleotides of the transcribed DNA sequence) with anchor and adapter of our own design were tested, which are used in the reaction of reverse transcription. The use of oligo (dT) primer became possible only after polyadenylation of extracted RNA using special poly-A polymerase kit. It is determined that the developed protocol of reverse transcription (RT) using oligo (dT) primer and adapter with certain sequence on its 5'-terminus designed for further annealing of the reverse primer during real-time PCR along with preliminary polyadenylation of RNA excludes specific amplification of the background genomic DNA. This technique may be applied in evaluating the expression level of low-expression genes when high background genomic DNA content is found in the RNA sample, e.g. at the end of logarithmic growth of prokaryotic cells.

**Введение**

Клетки любого организма, какие бы функции они ни выполняли, имеют полный набор свойственных данному организму генов. У любого организма клетки разных тканей и органов отличаются по различным признакам и набору имеющихся в них белков. Даже в одной клетке на разных стадиях ее развития синтезируются и функционируют разные белки. Однако, в любой клетке имеется определенный набор генов, обеспечивающих поддержание важнейших жизненных функций организма,

которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Эти гены получили определение «гены домашнего хозяйства», они функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма. В методологии изучения экспрессии генов гены домашнего хозяйства используются в качестве генов выравнивания, относительно которых изучается экспрессия целевых генов.

Располагая полной генетической информацией, каждая клетка на определенном этапе развития ис-

**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:** Минаев М.Ю., Махова А.А. Изучение экспрессии генов у прокариот. Теория и практика переработки мяса. 2018; 3(2): 40–52. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-40-52

**FOR CITATION:** Minaev M. Yu., Makhova A.A. The study of prokaryotic gene expression. Theory and practice of meat processing. 2018; 3(2): 40–52. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-40-52

пользует лишь ту ее часть, которая необходима в настоящий момент, транскрибируются только те гены, продукты которых нужны клетке в непосредственный момент ее существования для осуществления ее функций. Клетка должна располагать механизмами, определяющими, какие гены и в какой последовательности должны экспрессироваться («выражаться», то есть давать продукт — РНК или белок), а какие подавляться. При этом мРНК генов, экспрессия которых подавляется быстро, деградирует в клеточном матриксе в отличие от, например, ДНК отмерших клеток.

Постоянное изменение экспрессии тех или иных генов проявляется в первую очередь на уровне транскрипции. Это сказывается на изменении количества молекул РНК, прежде всего, м-РНК.

Поэтому количественный анализ экспрессии генов сводится к анализу транскриптома, измерению транскрипционной активности гена, с помощью определения количества его продукта, матричной РНК (мРНК), универсальной для большей части генов. При этом конечный продукт экспрессии генов как правило белки, а не мРНК.

Для измерения количества мРНК разработаны следующие методы: количественная ПЦР в реальном времени (qPCR), применяется для анализа уровня экспрессии нескольких генов; сравнительная геномная гибридизация на чипах (CGH), позволяет видеть количественные изменения экспрессии генов прямо на хромосомах; микрочипы, с их помощью можно получать данные по уровню экспрессии большого количества генов; высокопроизводительное параллельное секвенирование РНК (NGS) [1]. Методы гибридизации и высокопроизводительного секвенирования являются «золотыми стандартами» оценки экспрессии генов, однако предусматривают наличие объемного и дорогостоящего оборудования, закупку которых могут позволить далеко не все рядовые лаборатории, а лишь специализированные медико-генетические центры. Проведение анализа экспрессии генов методом гибридизации требует большие количества РНК, чем те, которые зачастую доступны при проведении ряда экспериментов, например, при наличии незначительных количеств клеток или тканей. В этих случаях методы, основанные на ПЦР, становятся незаменимыми, поскольку ПЦР включает этап амплификации, что делает его более чувствительным. Дополнительное преимущество ПЦР в реальном времени — относительная простота и удобство использования по сравнению с вышеперечисленными методами [2].

Основные этапы протокола количественного анализа экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени:

1. Планирование эксперимента.
2. Выделение и оценка нуклеиновых кислот.
3. Проведение обратной транскрипции (ОТ).
4. Оптимизация режимов ПЦР в реальном времени, постановка ПЦР.

5. Анализ данных, полученных при проведении ПЦР в реальном времени. Абсолютная количественная оценка. Относительная количественная оценка.

Этапы выделения и очистки нуклеиновых кислот и реакция обратной транскрипции сопровождаются рядом трудностей в исполнении и получении объективных результатов [3,4,5].

Так, например, эффективность синтеза кДНК напрямую зависит от качества очистки РНК [6]. Сегодня на рынке присутствуют множество наборов реагентов для очистки РНК, но методика классической фенольной экстракции остается одним из наиболее стандартных подходов [7]. Данная методика не исключает содержания примесей ДНК в выделенном образце РНК, и, наоборот, остаточных количеств РНК в выделенном образце ДНК. Это вызывает трудность при оценке низкоэкспрессионных генов. Остаточные количества геномной ДНК маскируют единичные копии гомологичной кДНК, что приводит к ошибочной оценке результатов ПЦР. Кроме этого, скорость репликации ДНК и деления бактериальных клеток в разы больше, чем в образцах тканей эукариотических клеток.

Методология дизайна тест-системы для изучения экспрессии генов в эукариотической клетке заключается в следующем. Праймеры для участков генов эукариот подбирают так, чтобы они отжигались на последовательности экзонов по обеим сторонам длинного интрона что позволяет осуществить дифференциацию по анализу кривой плавления между амплификацией кДНК и потенциально контаминирующей геномной ДНК, или захватывают границы двух последовательных экзонов, разделенных в геномной ДНК интроном, что исключает амплификацию геномной ДНК. Геном прокариот, в отличие, от генома эукариот, не разделен на кодирующие (экзоны) и некодирующие (интроны) части. Матричная РНК в этом случае синтезируется по генам хромосомной/плазмидной ДНК, из-за чего невозможно подобрать праймеры на стыке участков экзон-экзон, чтобы они не отжигались на кодирующем участке ДНК.

В этом случае при постановке ПЦР имеет смысл использовать дополнительный контроль — пробы РНК, не подвергнутый реакции обратной транскрипции. Это позволит при оценке мРНК определить уровень контаминации геномной ДНК.

Обратная транскрипция является, пожалуй, наиболее проблемной и подверженной вариациям реакцией при проведении ПЦР. Эффективность обратной транскрипции напрямую зависит от выбранных праймеров. В реакции синтеза первичной цепи можно использовать ген-специфичные праймеры, случайные (Random) праймеры или oligo (dT) праймеры. Отсутствие на 3' конце мРНК прокариот poly (A) — хвостов, делает неэффективным использование oligo (dT) праймеров. Поли-(А) последовательности бактериальных мРНК значительно короче соответствующих эукарио-

тических. Их длина, в среднем, составляет всего 14–16 нуклеотидов (80–200 — у эукариот), а полиаденилированы лишь от 1% до 40% молекул мРНК каждого определенного вида в клетке (~100% в случае эукариот). Полиаденилирование мРНК катализирует поли (А) — полимеразы, которая осуществляет независимое от матрицы последовательное присоединение остатков аденилата к 3'-ОН-концам молекул РНК.

Некоторые учебные пособия рекомендуют использовать случайные или ген-специфические праймеры для бактериальных РНК [2]. Однако, ген-специфические праймеры, используемые в ПЦР в реальном времени имеют температуру плавления выше 50 °С, что делает невозможным использование их с классической MMLV ревертазой, имеющий температурный максимум в 42 °С.

Существующие методики и протоколы заточены на работу с эукариотическими клетками. Интерес к изучению молекулярных механизмов экспрессии генов и ее оценки в прокариотической клетке обусловлен недостатком исследований по данному вопросу и рядом методологических проблем [8]. В ряде биологических задач исследование транскриптома бактерий может быть крайне информативным. Так, было показано, что бактерии *Helicobacter pylori* из разных участков одного и того же пораженного желудка не отличаются генетически, но сильно отличаются по уровню экспрессии генов (т.е. бактерии находятся в разных функциональных состояниях). При этом профиль экспрессии может значительно отличаться — до сотни генов с существенно разным уровнем экспрессии [9]. Изучая экспрессию генов, связанных с клеточным циклом у дрожжей, ученые обнаружили, что доминирующие режимы экспрессии могут быть связаны с различными биологическими функциями, такими как фазы клеточного цикла [10].

Целью данной работы являлось изучение механизма экспрессии генов у прокариот на примере генов гиразы Б и коллагеназы *Aeromonas salmonicida* AS1.

#### Объекты и методы

*Объекты исследования:* штамм *Aeromonas salmonicida* AS1 из лабораторной коллекции:

- *Aeromonas salmonicida*, оживленная культура на TSB-бульоне с глюкозой;
- *Aeromonas salmonicida* на агаризованной среде PCA;
- *Aeromonas salmonicida* на TSB-бульоне с глюкозой без индуктора (24 ч культивирования);
- *Aeromonas salmonicida* на TSB-бульоне с глюкозой с индуктором (24 ч культивирования);
- Активированный *Aeromonas salmonicida* на пептонной среде с индуктором (24 ч культивирования);
- Неактивированный *Aeromonas salmonicida* на пептонной среде с индуктором (24 ч культивирования);

РНК и кДНК перечисленных образцов.

*Методы исследования:*

*Культуральный метод*

С целью получения биомассы для выделения РНК использовали глубинный метод культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде (TSB-бульон с глюкозой, богатая пептонная среда) и поверхностный метод культивирования на агаризованной питательной среде (PCA). В качестве индуктора использовали растворимую фракцию коллагена.

*Выделение РНК*

Для выделения РНК отбирали 50 мкл суспензии (1,0 MacFarland). Выделение РНК проводили методом магнитных частиц на роботизированной станции MagNA Pure LC2.0 Instrument (Roche, Швейцария), используя набор для выделения MagNa Pure LC RNA Isolation Kit High Performance.

*Полиаденилирование РНК*

Удлинение 5' конца м-РНК проводили с помощью набора E. coli Poly (A)- Polymerase (NEB) согласно протоколу (<https://www.neb.com/products/m0276-ecoli-poly-a-polymerase/>).

*Получение кДНК (обратная транскрипция)*

Получали кДНК с помощью набора реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ) (ООО «Синтол») согласно инструкции с использованием ген-специфических праймеров, случайного (Random) праймера и праймера собственной разработки с поли (Т) адаптером.

*ПЦР*

Дизайн праймеров и их проверка с помощью программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Форвард праймер к гену *gyrB*: GTGTCTCCATCCGTCTGCAA

Реверс праймер к гену *gyrB*: CCTTGATACCGCCCTCATAGC

Форвард праймер к гену *colA*: TCAGATAGTAGGTGGAGAGGGTCA

Реверс праймер к гену *colA*: ATCTCATCCGTCATCACAGCC

Универсальный ревер праймер: GCCTCTGCCCA-CAATGCT

Выбранные праймеры бактерий были использованы для проведения ПЦР в реальном времени. Температуру плавления определяли *in silico* с применением интерактивной программы uMELT<sup>SM</sup> (<https://dna.utah.edu/umelt/um.php>).

Постановку ПЦР и изучение экспрессии генов проводили на приборе «АНК 32» (ООО «Синтол», Россия).

#### Результаты и обсуждение

Для получения клеточной культуры *Aeromonas salmonicida* AS1 с низким уровнем экспрессии генов домашнего хозяйства и гена коллагеназы ее выращивали

на обедненной питательной среде с коллагеном в течение 24 ч до достижения стадии роста клеток выхода на плато. После выделения РНК была проведена ОТ со случайным (Random) праймером с последующей ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами к генам гиразы Б и коллагеназы (Рис.1 и Рис. 2). В качестве отрицательного контроля (ОКО) использовалась

реакция без внесения MMLV ревертазы. Данная реакция позволила нам оценить остаточное количество ДНК в пробе, выделенной РНК.

На Рис. 1 и Рис. 2 видно, что кривые ОКО РНК вышли примерно на тех же циклах, что и кривые опытных образцов — гена гиразы и гена коллагеназы (Ct = 33 – 34 цикл).

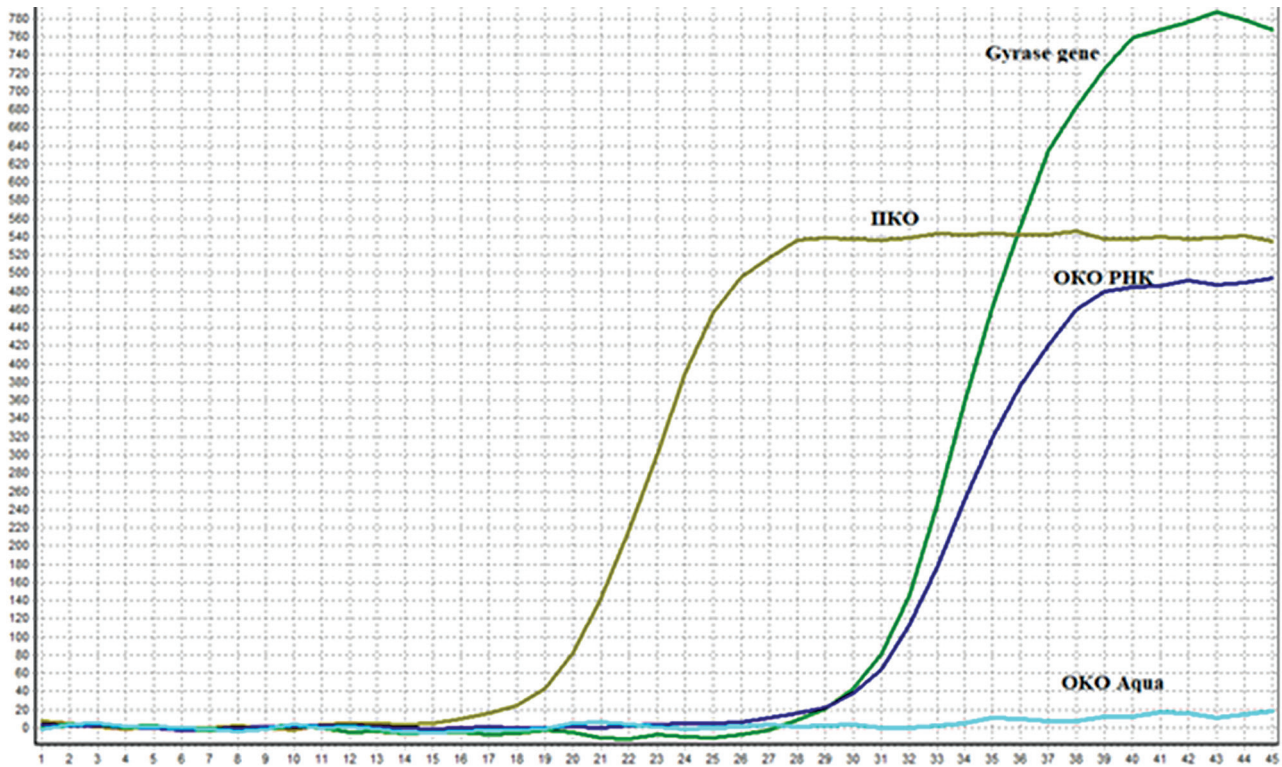


Рис. 1. Кривые амплификации к ДНК, полученной в результате обратной транскрипции со случайным (Random) праймером на ген гиразы Б (Gyrase gene)

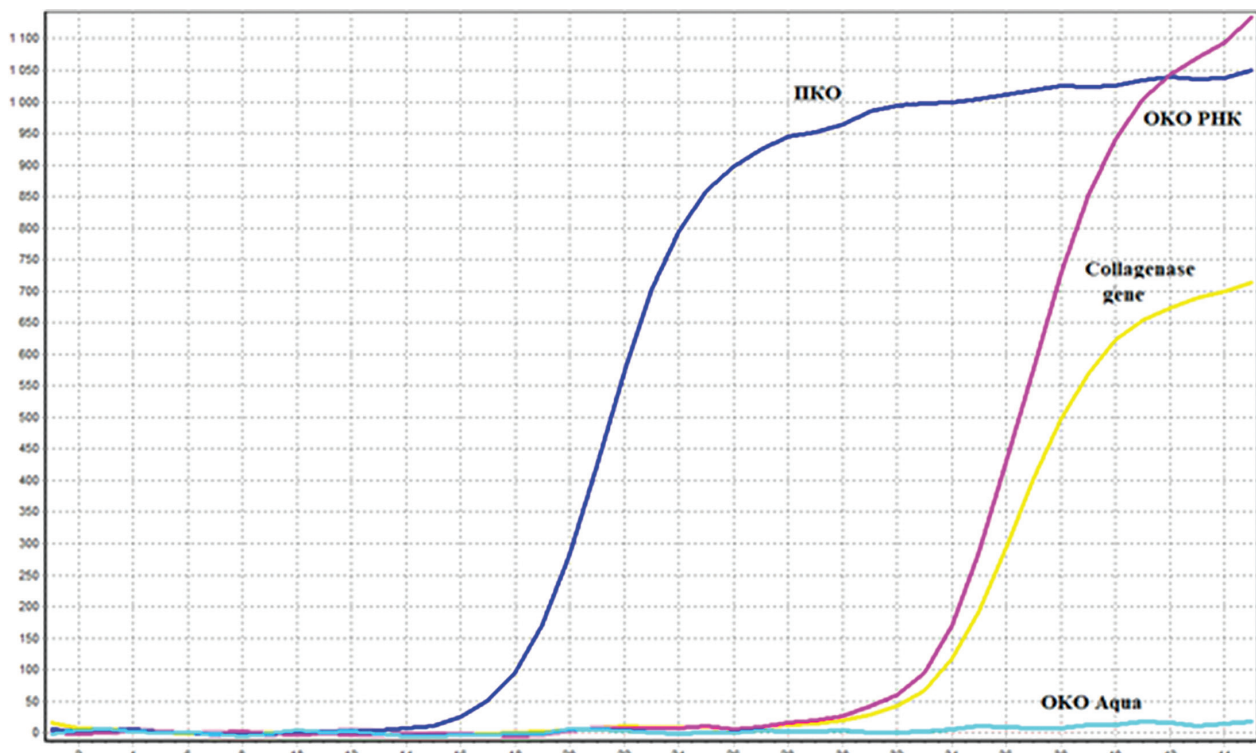


Рис. 2. Кривые амплификации кДНК, полученной в результате обратной транскрипции со случайным (Random) праймером на ген коллагеназы (Collagenase gene)

При этом отрицательные контроли ПЦР реакции (ОКО Aqua) не дали положительной реакции, что говорит о специфичности проведенной реакции и отсутствии праймерных димеров.

Выход кривых амплификации ОКО РНК наряду с кривыми амплификации опытных образцов — генами гиразы и коллагеназы, свидетельствует о содержании примеси остаточной геномной ДНК *A. salmonicida* ASI. Однако, положительная реакция ОКО РНК не означает отсутствие в образце специфической кДНК, фоновая ДНК просто маскирует ее наличие. Содержание примеси остаточной ДНК в образце РНК часто связано с качеством очистки нуклеиновых кислот на этапе выделения и может приводить к ложноположительным результатам ПЦР-ОТ. Высокое содержание фоновой ДНК в пробах выделенной РНК может быть связано с крайне высоким содержанием ДНК в культуральной жидкости отмерших клеток. Соответственно, при использовании Random праймера возникает сложность оценки уровня низкоэкспрессионных генов. К таким генам относится, например, ген коллагеназы *A. salmonicida*, уровень экспрессии которого зависит от питательных свойств среды культивирования и присутствия индукторов синтеза в условиях оптимальной для развития температуры и значения pH. [11].

Для решения проблемы высокого фонового содержания ДНК в пробах РНК нами было принято решение «пришить» к получаемой кДНК праймерный адаптер с негомологичной бактериальной ДНК последовательностью. Праймерный адаптер служил бы местом отжига универсального реверс праймера в ПЦР в реальном времени, что существенно бы повысило специфичность реакции. Однако, «пришить» адаптер к кДНК можно только через oligo (dT) прай-

мер. Но на 3' конце у большинства молекул мРНК прокариот отсутствуют поли-(А) последовательности или они очень короткие, что делает неэффективным использование oligo (dT) праймеров. В подтверждение этого была проведена постановка ОТ с обычным 15T oligo (dT) праймером и образцами выделенной РНК. Полученные результаты подтвердили теоретические данные, oligo (dT) праймер из-за отсутствия поли-(А) последовательности не отжигается на молекуле РНК, и кДНК не синтезируется. В ПЦР в реальном времени кривые амплификации полученных образцов к ДНК вышли на уровне отрицательного контроля, поэтому графические данные мы решили не приводить в этой статье.

Для решения этой проблемы мы использовали протокол полиаденилирования мРНК, который используется для повышения продуктивности синтеза трансгенных белков в клеточных культурах эукариот (NEB).

После выделения РНК было проведено ее полиаденилирование с помощью поли (А) полимеразы *E. coli* (NEB). В обратной транскрипции был использован универсальный якорный праймер 15T oligo (dT) со специальным адаптером. Два крайних нуклеотида праймера по 3' концу комплементарны нуклеотидам стоп-кодона транскрибируемой последовательности ДНК. При постановке ПЦР с кДНК, полученной в результате такой обратной транскрипции, кривая ОКО РНК (проба РНК, не подвергнутая реакции обратной транскрипции) не амплифицировалась. То есть используемый праймер исключает комплементарное соединение с фоновой геномной ДНК и отжигается только на молекуле РНК с поли-(А) последовательностью (Рис. 3).

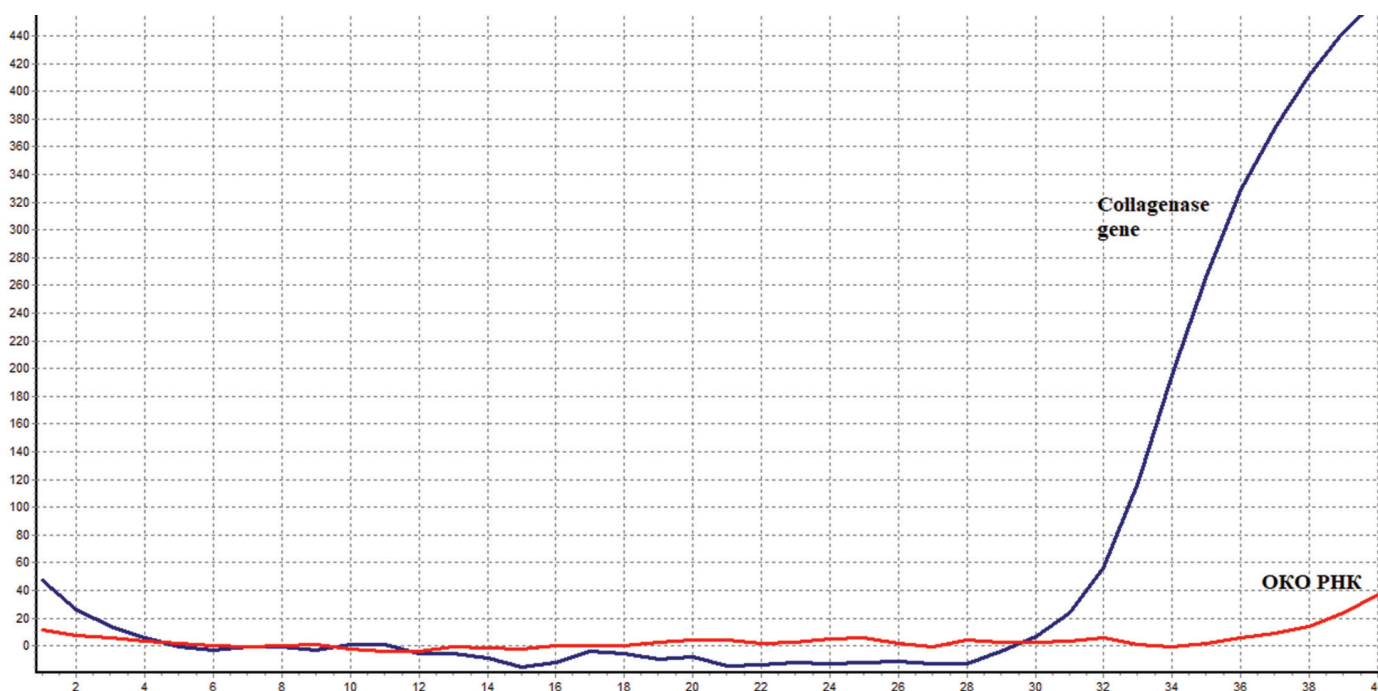


Рис. 3. Кривые амплификации кДНК гена коллагеназы (Collagenase gene), полученной в результате обратной транскрипции с «якорным» 15T oligo (dT) праймером

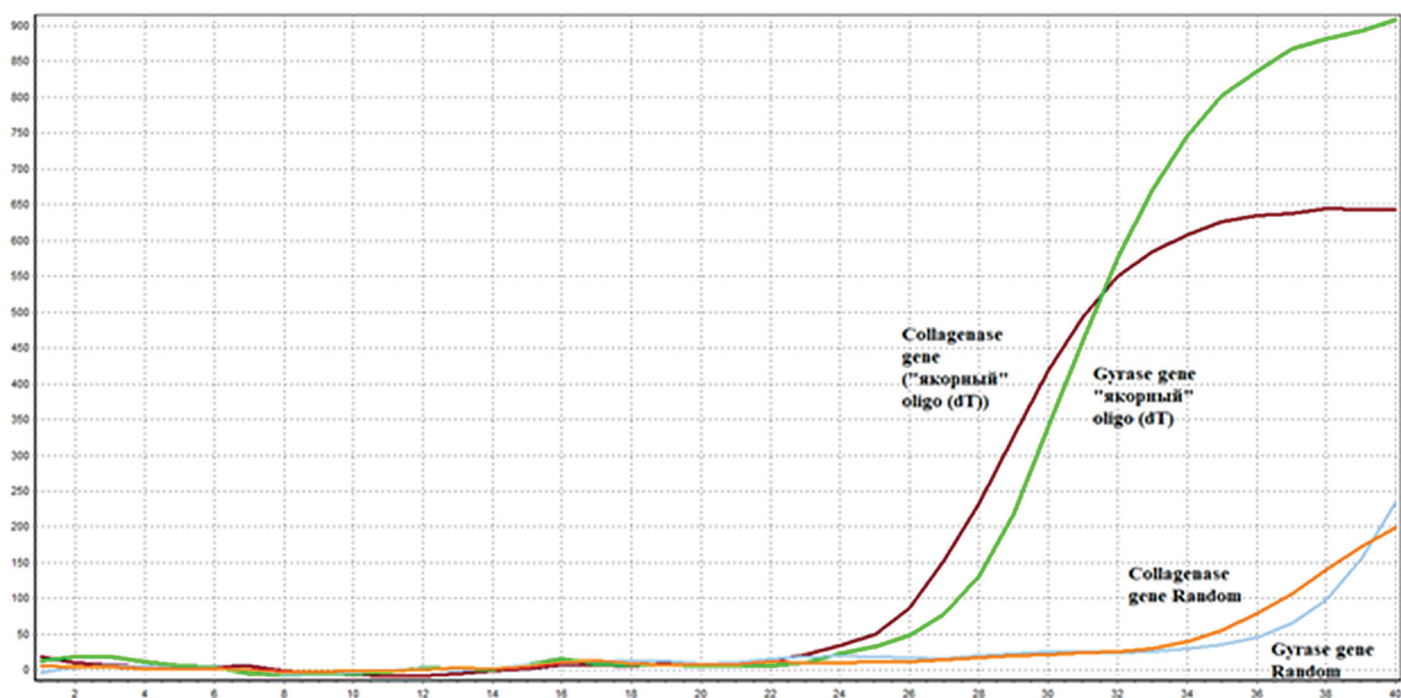


Рис. 4. Кривые амплификации кДНК генов коллагеназы и гиразы *A. salmonicida*. Отбор культуры со среды с глюкозой без индуктора

Наличие в богатой пептонной среде растворимой формы коллагена повышает уровень экспрессии фермента, в то время как среда с глюкозой без индуктора снижает уровень экспрессии гена коллагеназы. Использование разработанного нами протокола ПЦР ОТ, позволяет оценить экспрессию гена коллагеназы на всех этапах культивирования микроорганизма, в том числе и минимальную экспрессию при росте культуры на среде с глюкозой без индуктора. Логарифмический рост кривой амплификации кДНК в этом случае проходит на 26–28 циклах (Рис. 4).

При этом, при использовании Random праймера не удастся оценить низкую экспрессию гена коллагеназы, кривая амплификации кДНК в этом случае либо не выходит на плато, либо выходит на последних циклах ПЦР.

Для заключительного сравнения двух протоколов проведения ОТ были проведены две параллельные постановки с использованием случайного (Random) праймера и смоделированного нами синтетического якорного праймера oligo (dT) с адаптером. С полученными в результате обратной транскрипции кДНК были проведены две параллельные постановки ПЦР. Сравнение результатов ПЦР с использованием кДНК, полученной в результате обратной транскрипции с разными праймерами представлены в Табл. 1.

Как видно в Табл. 1 разница циклов выхода кривых генов гиразы и коллагеназы *Aeromonas salmonicida* ( $\Delta Ct$ ) с использованием этих двух протоколов не значительна (примерно 1–2 цикла). Таким образом, использование смоделированного нами синтетического якорного праймера oligo (dT) не повлияло на результаты ПЦР и привело к получению аналогичных с использованием Random праймера данных.

Таблица 1. Сравнительный анализ результатов ПЦР по результатам двух параллельных постановок ОТ

Образец кДНК	Разница циклов выхода кривых генов гиразы и коллагеназы ( $\Delta Ct$ ) ОТ со случайным (Random) праймером	Разница циклов выхода кривых генов гиразы и коллагеназы ( $\Delta Ct$ ) ОТ с синтетическим roly (T) праймером
<i>Aeromonas salmonicida</i> , оживленная культура на TSB-бульоне с глюкозой	2,03	3,59
<i>Aeromonas salmonicida</i> на агаризованной среде PCA	2,44	3,09
<i>Aeromonas salmonicida</i> на TSB-бульоне с глюкозой без индуктора (24 ч культивирования)	—	0,13
<i>Aeromonas salmonicida</i> на TSB-бульоне с глюкозой с индуктором (24 ч культивирования)	5,51	5,14
Активированный <i>Aeromonas salmonicida</i> на пептонной среде с индуктором (24 ч культивирования)	5,65	7,03
Неактивированный <i>Aeromonas salmonicida</i> на пептонной среде с индуктором (24 ч культивирования)	4,39	3,4

#### Выводы

В результате проведенных исследований были протестированы применяемые в реакции обратной транскрипции случайный (Random) и праймер oligo (dT) с «якорем» и праймерным адаптером собствен-

ной разработки. Применение oligo (dT) праймера стало возможным только после полиаденирования выделенной РНК с помощью специального набора с поли-А полимеразой.

Установлено, что разработанный нами протокол проведения обратной транскрипции (ОТ) с использованием oligo (dT) праймера и определенной последовательностью адаптера на его 5' конце, предназначенного для дальнейшего отжига реверс-праймера при проведении ПЦР в реальном времени наряду с предварительным полиаденированием РНК исключает специфическую амплификацию остаточной фоновой геномной ДНК.

Данная методика может найти применение в оценке уровня экспрессии низкоэкспрессионных генов при высоком содержании примеси фоновой геномной ДНК в образце РНК, например, на конечной стадии логарифмического роста прокариотической клетки.

## Introduction

Any type of cells in any organism have a complete set of genes special to the organism independent of their function. In any organism, cells of different tissues and organs differ in their functions and expressed proteins. Moreover, at different developmental stages, different proteins are synthesized and function in the same cell. However, any cell contains a certain set of genes that support the vital functions. Such vital genes are expressed in almost all tissues and cells at relatively constant level. They are defined as «housekeeping genes» and function everywhere in the organism at all the stages of life cycle. Methods for gene expression studying use the housekeeping genes as reference genes, versus which the expression of target genes is determined.

While containing full genetic information, each cell, at a certain stage of development, uses only the part that is needed at the moment. Only those genes whose products are needed by the cell immediately to perform its functions are transcribed. The cell must have mechanisms to determine which genes and in what order should be expressed (in other words, give the product, i.e. RNA or protein) and which ones should be suppressed. In this case, mRNA of genes, the expression of which is suppressed rapidly, degrades in the cellular matrix, in contrast to the DNA of dead cells, for example.

The constant change in the expression of certain genes is manifested primarily at the level of transcription. This affects the number of RNA molecules, mainly mRNA.

Therefore, the quantitative analysis of gene expression is the analysis of transcriptome, i.e. transcriptional activity measurement of the gene, by determining the amount of its product, matrix RNA (mRNA), which is universal for most genes. While the final product of gene expression is usually proteins, rather than mRNA.

## Условные обозначения

qПЦР	Количественная полимеразная цепная реакция
Праймер с «якорем» или якорный праймер	Праймер, в котором два крайних нуклеотида по 3' концу комплементарны нуклеотидам стоп-кодона транскрибируемой последовательности ДНК
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
кДНК	Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
3' конец	Конец полинуклеотида, на котором расположен нуклеотид со свободной ОН-группой у третьего углеродного атома рибозы или дезоксирибозы.
5' конец	Конец полинуклеотида, на котором расположен нуклеотид со свободной ОН-группой пятого атома углерода рибозы или дезоксирибозы.
ОТ	Обратная транскрипция
poly (A) — хвосты	Фрагмент молекулы мРНК, азотистые основания которого представлены только аденином
ОКО	Отрицательный контроль

To measure the amount of mRNA, the following methods have been developed: quantitative real-time PCR (qPCR) used to analyze the expression level of several genes; comparative genomic hybridization on chips (CGH) that allows to register quantitative changes in gene expression directly on chromosomes; microchips that help to obtain data on the expression level of large number of genes; next-generation parallel sequencing of RNA (NGS) [1]. Hybridization and next-generation sequencing methods are the gold standards for gene expression evaluation, but they require the availability of large and expensive equipment. Only specialized medical genetic centers can purchase such equipment, but not all the standard laboratories. Analyzing gene expression by hybridization requires higher level of RNA than usually available in experiments (for example, small amounts of cells or tissues). In these cases, methods based on PCR become irreplaceable, since the PCR includes an amplification step, which makes it more sensitive. An additional advantage of real-time PCR is relative simplicity and ease of use in comparison to the above methods [2].

The main stages of the quantitative analysis protocol of gene expression by the real-time PCR method are:

1. Design of experiment.
2. Isolation and evaluation of nucleic acids.
3. Performing of reverse transcription (RT).
4. Optimization of the real-time PCR modes, PCR run.
5. Analysis of data obtained during real-time PCR. Absolute quantitative evaluation. Relative quantitative evaluation.

The stages of nucleic acid isolation and purification and the reverse transcription are accompanied by a number of difficulties in performing and obtaining objective results [3,4,5].

For example, the efficiency of cDNA synthesis depends directly on the quality of RNA purification [6]. Nowadays,

there are many kits of RNA purification reagents on the market, but the classical phenol extraction technique remains one of the most common approaches [7]. This technique does not exclude the content of DNA impurities in the isolated RNA sample and, conversely, the residual amounts of RNA in the isolated DNA sample. This is a problem for evaluating low-expression genes. Residual amounts of genomic DNA mask single copies of homologous cDNA, which leads to erroneous evaluation of PCR results. In addition, DNA replication rate and bacterial growth rate are several times higher than in eukaryotic tissue samples.

The methodology of test system designing for gene expression evaluation in a eukaryotic cell is as follows. Primers for eukaryotic gene sites are selected so that they are annealed on the exon sequence on both sides of the long intron. This allows differentiation between amplified cDNA and potentially contaminating genomic DNA by the analysis of the melting profile. Furthermore, boundaries of two consecutive exons separated by the intron in the genomic DNA may be included, which prevents genomic DNA amplification. Prokaryotic genome, unlike the eukaryotic one, is not divided into coding (exons) and noncoding (introns) parts. In this case, messenger RNA is synthesized by the genes of chromosomal/plasmid DNA. That is why it is impossible to select the primers at the exon-exon junction, so they are not annealed to the coding region of DNA.

In this case, when running the PCR, it is reasonable to use additional control, RNA samples, not subjected to the reverse transcription. This allows to determine the level of contaminating genomic DNA when evaluating mRNA.

Reverse transcription seems to be the most problematic and varying reaction in PCR. Reverse transcription efficiency directly depends on the selected primers. In the primary chain synthesis reaction, gene-specific primers, i.e. Random primers or oligo (dT) primers may be used. The absence of poly (A)-tails on 3'-terminus of prokaryotic mRNA makes oligo (dT) primers ineffective. The poly (A) sequences of bacterial mRNAs are significantly shorter than the corresponding eukaryotic sequences. Their length is on average only 14 to 16 nucleotides (80 to 200 in eukaryotes), and only 1% to 40% of mRNA molecules of each certain type are polyadenylated (about 100% in the case of eukaryotes). Polyadenylation of mRNA is catalyzed by poly (A)-polymerase, which performs matrix-independent sequential attachment of adenylate residues to 3'-OH-termini of RNA molecules.

Some textbooks recommend using random or gene-specific primers for bacterial RNA [2]. However, gene-specific primers used in real-time PCR have a melting point above 50 °C, which makes it impossible to use them with the classical MMLV revertase acting maximum at 42 °C.

Existing methods and protocols are customized to work with eukaryotic cells. Interest in studying the molecular mechanisms of gene expression and its evaluation in prokaryotes is due to the lack of research and a number of

methodological problems [8]. In a number of biological researches, the study of bacterial transcriptome may be very informative. Thus, it was shown that *Helicobacter pylori* from different parts of the same affected stomach do not differ genetically, but greatly differ in the level of gene expression (i.e. the bacteria are in different functional states). At the same time, the expression profile may significantly differ, so up to hundreds of genes may have significantly different levels of expression [9]. In studies of the expression of genes associated with cell cycle in yeast, scientists have found that dominant expression modes may be associated with various biological functions, such as cell cycle phases [10].

The aim of this work was to study the gene expression mechanism in prokaryotes evidence from *Aeromonas salmonicida* ASI gyrase B and collagenase genes.

## Materials and methods

### Materials:

*Aeromonas salmonicida* ASI strain from the laboratory collection:

- *Aeromonas salmonicida*, live culture in TSB broth with glucose;
- *Aeromonas salmonicida* on PCA agar medium;
- *Aeromonas salmonicida* in TSB broth with glucose and no inducer (24-hour incubation);
- *Aeromonas salmonicida* in TSB broth with glucose and inducer (24-hour incubation);
- Activated *Aeromonas salmonicida* on a peptone medium with inducer (24-hour incubation);
- Non-activated *Aeromonas salmonicida* on a peptone medium with inducer (24-hour incubation);
- RNAs and cDNAs from the listed samples.

### Methods:

#### Cultural method

To obtain biomass for RNA extraction, submerged incubation of microorganisms in a liquid medium (TSB broth with glucose, enriched peptone medium) and surface incubation on an agar medium (PCA) were used. A soluble fraction of collagen was used as an inducer.

#### RNA extraction

For RNA extraction, 50 µl of the suspension was selected (1.0 MacFarland). RNA extraction was carried out by magnetic particles on automated MagNA Pure LC2.0 Instrument (Roche, Switzerland) using High Performance MagNa Pure LC RNA Isolation Kit.

#### RNA polyadenylation

Elongation of mRNA 5'-terminus was performed using the E. coli Poly (A)-Polymerase (NEB) kit according to the protocol (<https://www.neb.com/products/m0276-ecoli-poly-a-polymerase/>).

#### Obtaining cDNA (reverse transcription)

The cDNA was obtained by Reverse Transcription (RT) reagent kit (Sintol LLC) according to the instruction using gene specific primers, Random primer and a proprietary primer with a poly (T) adapter.



### PCR

Primer design and testing using Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/ analyzer>) were carried out.

Forward primer to *gyrB* gene: GTGTCTCCATCCGTCTGCAA

Reverse primer to *gyrB* gene: CCTTGATACCGCCCTCATAGC

Forward primer to *colA* gene: TCAGATAGTAGGTGAGAGGGTCA

Reverse primer to *colA* gene: ATCTCATCCGTCATCACAGCC

Universal reverse primer: GCCTCTGCCACAATGCT

The selected bacterial primers were used to carry out real-time PCR. The melting point was determined *in silico* using uMELT™ interactive software (<https://dna.utah.edu/umelt/um.php>).

PCR running and gene expression studies were performed on ANK 32 instrument (Sintol LLC, Russia).

### Results and discussion

To obtain *Aeromonas salmonicida* ASI cell culture with low-level expression of housekeeping genes and collagenase gene, cells were grown on a depleted medium with collagen for 24 hours before reaching the plateau phase. After RNA extraction, RT was performed with Random primer followed by real-time PCR with specific primers to *gyrase B* and collagenase genes (Figure 1 and Figure 2). As a negative control (NC), a reaction without the introduc-

tion of MMLV revertase was used. This reaction allowed to evaluate the residual amount of DNA in the sample of extracted RNA.

Figures 1 and 2 show that NC RNA curves appeared approximately on the same phases as the test sample curves, i.e. *gyrase* gene collagenase genes (Ct = 33 to 34 cycles).

At the same time, negative controls for PCR reaction (NC Aqua) did not show a positive reaction, which indicates reaction specificity and the absence of primer dimers.

The yield of the amplification curves for NC RNA along with the amplification curves for the test samples, *gyrase* and collagenase genes, indicates the presence of *Aeromonas salmonicida* ASI residual genomic DNA. However, the positive reaction of NC RNA does not mean the absence of specific cDNA in the sample, because the background DNA masks its presence. The content of residual DNA contamination in RNA sample is often associated with the purification quality of nucleic acids during the extraction stage and may lead to false positive results of PCR-RT. High content of background DNA in extracted RNA samples can be associated with an extremely high DNA content in the culture fluid from dead cells. Accordingly, when using Random primer, it is difficult to evaluate the level of low-expression genes. Such genes include, for example, *A. salmonicida* collagenase gene, the level of expression of which depends on the nutritional properties of culture medium and the presence of inducers under conditions of temperature and pH optimal for the development [11].

To solve the problem of high background DNA content in RNA samples, we decided to «attach» the primer adapter with non-homologous bacterial DNA sequence to

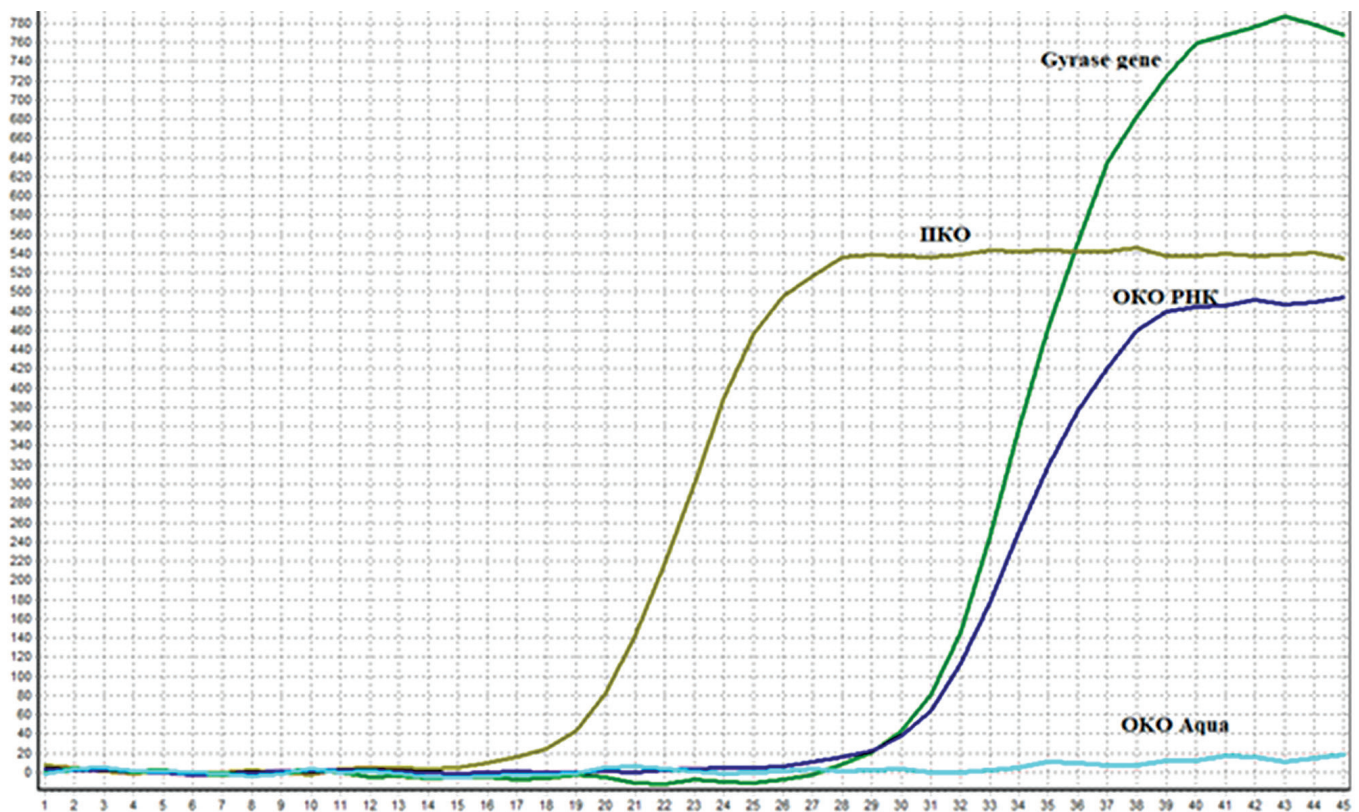
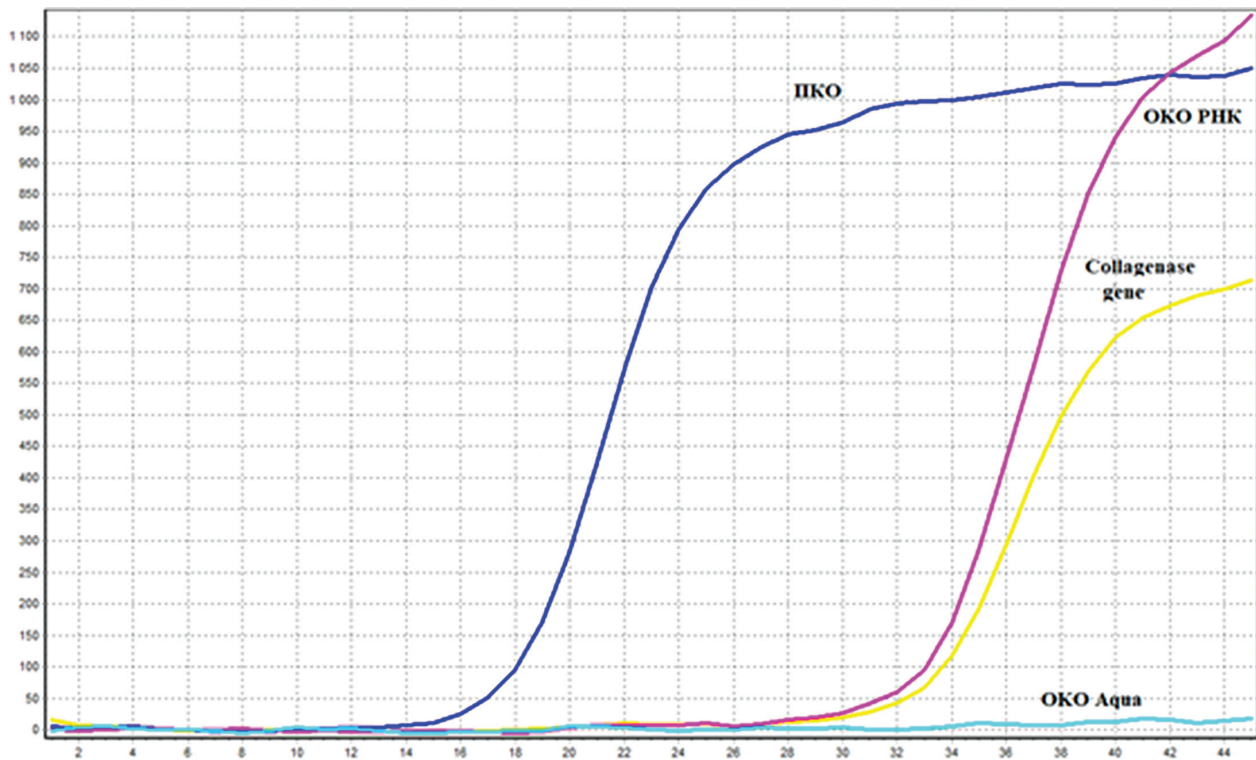


Figure 1. Amplification curves for cDNA obtained as a result of reverse transcription with Random primer to *gyrase B* gene



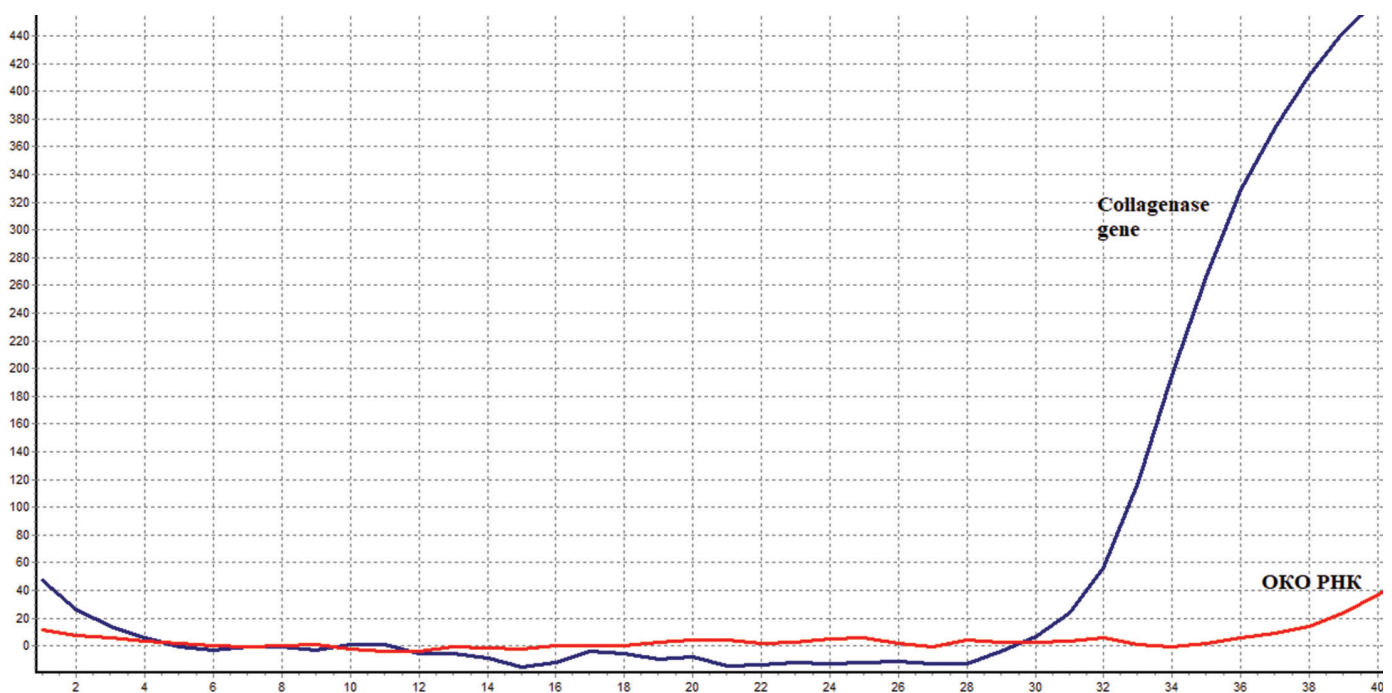
**Figure 2.** Amplification curves for cDNA obtained as a result of reverse transcription with Random primer to collagenase gene

the cDNA obtained. The primer adapter would serve as the annealing site for the universal reverse primer in real-time PCR, which would significantly increase the specificity of reaction. However, the adapter may be «attached» to the cDNA only via oligo (dT) primer. But most prokaryotic mRNA molecules have very short poly (A) sequences on 3' -terminus or have no such sequences at all, which makes oligo (dT) primers ineffective. To confirm this, RT was performed with conventional 15T oligo (dT) primer and samples of extracted RNA. The obtained results confirmed the theoretical data. Because of the absence of poly (A)

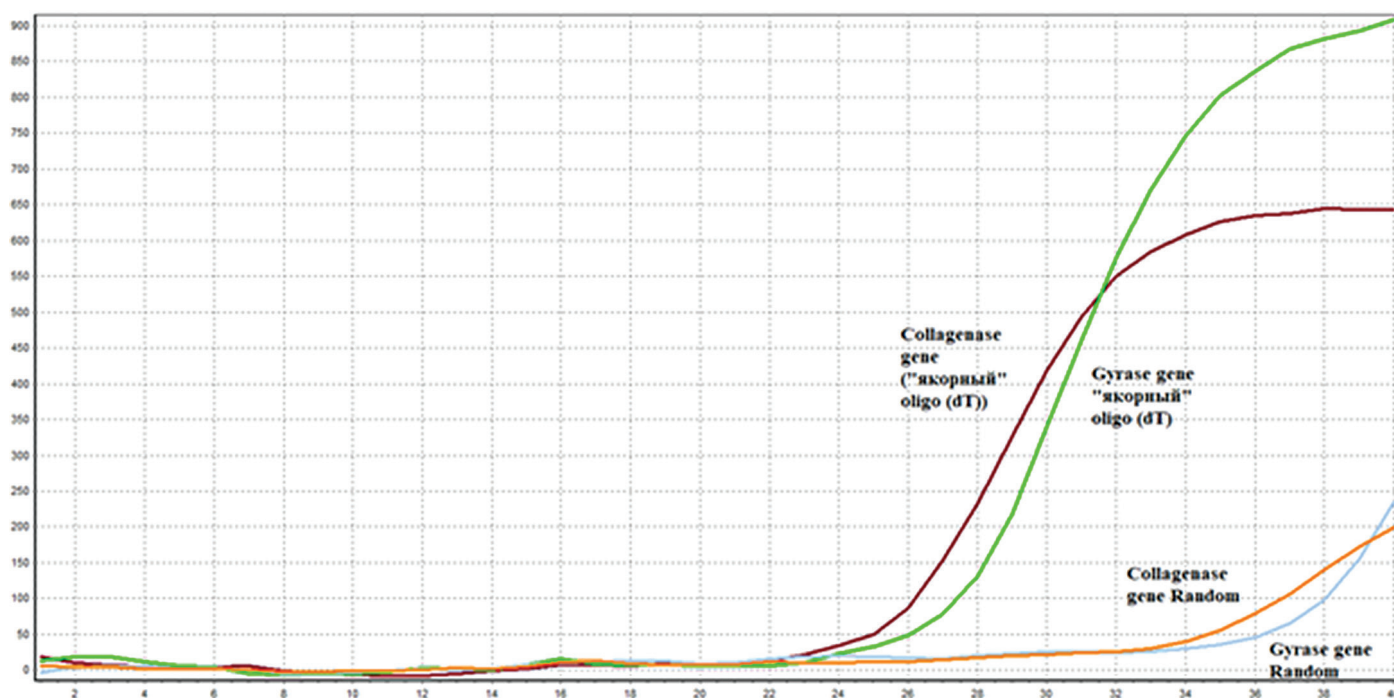
sequence, oligo (dT) primer is not annealed on the RNA molecule, and cDNA is not synthesized. In real-time PCR, the amplification curves of the obtained cDNA samples appeared at the same level as negative control, so we decided not to demonstrate the graphic data in this article.

To solve this problem, we used mRNA polyadenylation protocol, which is applied to increase the synthesis efficiency of transgenic proteins in eukaryotic cell cultures (NEB).

After RNA extraction, its polyadenylation was carried out using poly (A) polymerase of *E. coli* (NEB). Univer-



**Figure 3.** Amplification curves for cDNA of the collagenase gene, obtained as a result of reverse transcription with 15T oligo (dT) anchor primer



**Figure 4.** Amplification curves for cDNA of *A. salmonicida* collagenase and gyrase genes. Selection of the culture from the medium with glucose and no inducer

sal 15T oligo (dT) anchor primer with a special adapter was used in the reverse transcription. The two terminal nucleotides of the primer 3'-terminus are complementary to the nucleotides of the transcribed DNA stop codon. When running PCR with the cDNA obtained as a result of such reverse transcription, NC RNA curve (RNA sample not subjected to the reverse transcription) is not amplified. In other words, the primer used prevents complementary bonding to background genomic DNA and is annealed only on RNA molecule with a poly (A) sequence (Figure 3).

The presence of soluble collagen in the enriched peptone medium increases the level of enzyme expression, while the medium with glucose and no inducer reduces the level of collagenase gene expression. Using our PCR RT protocol, we can evaluate the collagenase gene expression at all stages of microorganism incubation, including minimal expression when the culture grows on a medium without glucose and no inducer. In this case, the logarithmic growth of the amplification curve for cDNA occurs after 26 to 28 cycles (Figure 4).

At the same time, when Random primer is used, it is not possible to evaluate the low expression of the collagenase gene, because, in this case, cDNA amplification curve either does not reach the plateau or appears at the last PCR cycles.

For the final comparison of two RT protocols, two parallel runs were performed using Random primer and the developed oligo (dT) anchor primer with adapter. cDNA samples obtained in the reverse transcription were used in two parallel PCR runs. A comparison of PCR results using cDNA obtained in the reverse transcription with different primers is presented in Table 1.

**Table 1.** Comparative analysis of PCR results from two parallel RT runs

cDNA sample	Difference in the number of cycles for the appearance of the curves for gyrase and collagenase genes ( $\Delta Ct$ ) RT with Random primer	Difference in the number of cycles for the appearance of the curves for gyrase and collagenase genes ( $\Delta Ct$ ) RT with synthetic poly (T) primer
<i>Aeromonas salmonicida</i> , live culture in TSB broth with glucose	2.03	3.59
<i>Aeromonas salmonicida</i> on PCA agar medium	2.44	3.09
<i>Aeromonas salmonicida</i> in TSB broth with glucose and no inducer (24-hour incubation)	—	0.13
<i>Aeromonas salmonicida</i> in TSB broth with glucose and inducer (24-hour incubation)	5.51	5.14
Activated <i>Aeromonas salmonicida</i> on a peptone medium with inducer (24-hour incubation)	5.65	7.03
Non-activated <i>Aeromonas salmonicida</i> on a peptone medium with inducer (24-hour incubation)	4.39	3.4

As Table 1 shows, the difference in the number of cycles for the appearance of the curves for *Aeromonas salmonicida* gyrase and collagenase genes ( $\Delta Ct$ ) using these two protocols is not significant (about 1 to 2 cycles). Thus, the use of the developed oligo (dT) anchor primer did not affect the PCR results and resulted in similar data as for Random primer.

## Conclusion

As a result of the research, Random primer and oligo (dT) primer with anchor and adapter of our own design were tested, which are used in the reaction of reverse transcription. The use of oligo (dT) primer became possible only after polyadenylation of extracted RNA using special poly-A polymerase kit.

It is determined that the developed protocol of reverse transcription (RT) using oligo (dT) primer and adapter with certain sequence on its 5'-terminus designed for further annealing of the reverse primer during real-time PCR along with preliminary polyadenylation of RNA excludes specific amplification of the residual background genomic DNA.

This technique may be applied in evaluating the expression level of low-expression genes when high background genomic DNA content is found in the RNA sample, e.g. at the end of logarithmic growth of prokaryotic cells.

## Abbreviations and terms

qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
Primer with an «anchor», or anchor primer	Primer with two 3'-terminal nucleotides complementary to stop codon nucleotides of the transcribed DNA sequence
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	Matrix ribonucleic acid
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
3'-terminus	Polynucleotide terminus, on which the nucleotide is located with a free OH-group in the third carbon atom of ribose or deoxyribose.
5'-terminus	Polynucleotide terminus, on which the nucleotide is located with a free OH-group in the fifth carbon atom of ribose or deoxyribose.
RT	Reverse transcription
poly (A)-tails	mRNA molecule fragment, the nitrogen bases of which are represented only by adenine
NC	Negative control

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Sharkey, F.H., Banat, I.M., Marchant, R. (2004). Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3795–3806.
2. Епринцев, А.Е., Попов, В.Н., Федорин, Д.Н. (2008). Идентификация и исследование экспрессии генов Учебно-методическое пособие для вузов. Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 18–29.
3. Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23–39.
4. Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potentials. *BioTechniques*, 26(1), 112–125.
5. Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260.
6. Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., Stolze, Y., Prowe, S., Schwarz, W., Schlüter, A., Liebl, W., Klocke, M. (2016). DNA and RNA Extraction and Quantitative

1. Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Inter-laboratory Comparison. *Bioengineering*, 3(1), 7.
7. Антонова, О.С., Корнева, Н.А., Белов, Ю.В., Курочкин, В.Е. (2010). Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии. *Обзор. Научное приборостроение*, 20(1), 3–9.
8. Bachoon, D.S., Chen, F., Hodson, R.E. (2001). RNA recovery and detection of mRNA by RT-PCR from preserved prokaryotic samples. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 127–132.
9. Ребриков, Д.В., Ильинский, В.В., Коростин, Д.О., Шубина, Е.С. (2014). NGS: высокопроизводительное секвенирование. М, БИНОМ. Лаборатория знаний. — 232 с.
10. Liebermeister, W. (2002). Linear modes of gene expression determined by independent component analysis. *Bioinformatics*, 18(1), 51–60.
11. Конон, А.Д., Петровский, С.В., Шамбурова, М.Ю., Уварова, А.В., Козлова, Ю.О., Григорьева, М.В., Москвичев, Б.В. (2016). Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ — перспективных ферментов медицинского назначения. *Медицина экстремальных ситуаций*, 2(56), 45–57.

## REFERENCES

1. Sharkey, F.H., Banat, I.M., Marchant, R. (2004). Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3795–3806.
2. Eprintsev, A.E., Popov, V.N., Fedorin, D.N. (2008). Identification and investigation of gene expression. Educational and methodological manual for universities. Publishing and printing center of Voronezh State University, 18–29. (in Russian)
3. Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23–39.
4. Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potentials. *BioTechniques*, 26(1), 112–125.
5. Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260.
6. Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., Stolze, Y., Prowe, S., Schwarz, W., Schlüter, A., Liebl, W., Klocke, M. (2016). DNA and RNA Extraction and Quantitative

1. Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Inter-laboratory Comparison. *Bioengineering*, 3(1), 7.
7. Antonova, O.S., Korneva, N.A., Belov, Yu. V., Kurochkin, V.E. (2010). Methods of nucleic acids purification and separation in molecular biology. (Review). *Scientific Instrumentation*, 20(1), 3–9. (in Russian)
8. Bachoon, D.S., Chen, F., Hodson, R.E. (2001). RNA recovery and detection of mRNA by RT-PCR from preserved prokaryotic samples. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 127–132.
9. Rebrikov, D. V., Il'inskiy, V.V., Korostin, D.O., Shubina, E.S. (2014). NGS: high-performance sequencing. M: BINOM. Knowledge lab. — 232 p. (in Russian)
10. Liebermeister, W. (2002). Linear modes of gene expression determined by independent component analysis. *Bioinformatics*, 18(1), 51–60.
11. Konon, A.D., Petrovskiy, S.V., Shamburova, M.Yu., Uvarova, A.V., Kozlova, Yu.O., Grigoryeva, M.V., Moskvichev, B.V. (2016). Features of clostridial collagenase' biotechnology — emerging enzymes for medical application. *Medicine of Extreme Situations*, 2(56), 45–57. (in Russian)

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Минаев Михаил Юрьевич** — кандидат технических наук, руководитель направления молекулярно-биологических исследований, ведущий научный сотрудник в лаборатории «Гигиена производства и микробиология» Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН  
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,  
Тел.: +7-495-676-60-11  
E-mail: m.minaev@fncps.ru  
\*автор для переписки

**Махова Анжелика Александровна** — младший научный сотрудник лаборатории «Гигиена производства и микробиология» Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН  
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,  
Тел.: +7-495-676-60-11  
E-mail: a.mahova@fncps.ru

## Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.

Минаев М.Ю. разрабатывал научно-методический подход к проведению работ, определял объем исследований, анализировал полученные данные, выполнял описательную часть и корректировала финальную версию статьи.

Махова А.А. отбирала объекты исследования, проводила выделение РНК, обратную транскрипцию, постановки ПЦР, выполняла описательную часть.

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 27.05.2018

## AUTHOR INFORMATION

## Affiliation

**Mikhail Yu. Minaev** — candidate of sciences, a head of the Molecular diagnostic division, leading researcher of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-60-11  
E-mail: m.minaev@fncps.ru  
\*corresponding author

**Anzhelika A. Makhova** — junior researcher of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-60-11  
E-mail: a.mahova@fncps.ru

## Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

Minaev M. Yu. developed scientific and methodological approaches to work, determined the scope of research, analyzed the data obtained, performed the narrative and corrected it in final.

Makhova A.A. selected research objects, carried out RNA extraction, reverse transcription and PCR analysis, performed the narrative part. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 27.05.2018